

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIRLARDA TULATROMİSİN VE GAMİTROMİSİNİN TRAKEA DÜZ
KASININ KASILMASI İLE TRAKEA EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE
APOPTOTİK, NEKROTİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Araş. Gör. Yaşar ŞAHİN

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI (VETERİNER)
DOKTORA TEZİ**

**I. DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru YILDIRIM**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN**

2020 - KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIRLARDA TULATROMİSİN VE GAMİTROMİSİNİN TRAKEA DÜZ
KASININ KASILMASI İLE TRAKEA EPİTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE
APOPTOTİK, NEKROTİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Araş. Gör. Yaşar ŞAHİN

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI (VETERİNER)
DOKTORA TEZİ**

**I. DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru YILDIRIM**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN**

Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler 2018/047


2020 - KIRIKKALE

KABUL ve ONAY

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner, Ortak Program) Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2020



Prof. Dr. Gökhan ERASLAN

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Emine BAYDAN

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Üye



İmza

Prof. Dr. Murat KANBUR

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Üye



İmza

Prof. Dr. Miyase ÇINAR

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Üye



İmza

Doç. Dr. Ebru YILDIRIM

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VII
Simgeler ve Kısaltmalar	VIII
Şekiller	X
Çizelgeler	XIII
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1.1. Sığır Trakeasının Anatomisi	6
1.2. Sığır Trakeasının Histolojisi	7
1.3. Sığır Trakeası Farmakolojisi ve Fizyolojisi	8
1.3.1. Trakeabronşial Bölgedeki Reseptörler	8
1.3.1.1. Yavaş Adapte Olan Akciğer Gerim Reseptör	9
1.3.1.2. Hızlı Adapte Olan Akciğer Gerim Reseptör	9
1.3.1.3. C-fibril Reseptör	10
1.3.1.4. Nöroepitelyal Cisimcikler Reseptör	11
1.3.2. Solunum Yolunda Bulunan Diğer Önemli Reseptör ve Kanallar	11
1.3.2.1. Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid 1	11
1.3.2.2. Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid 4	12
1.3.2.3. Geçici Reseptör Potansiyeli Ankirin 1	12
1.3.2.4. Sitokin Reseptörleri	13
1.3.3. Solunum Yolu Düz Kaslarının Kasılma Mekanizması	13
1.3.3.1. Kolinerjik Reseptör Kasılma Mekanizması	14
1.3.3.2. Adrenerjik Reseptör Kasılma Mekanizması	15
1.3.4. Solunum Yolu Düz Kaslarındaki Gevşeme Mekanizması	15
1.3.4.1. Adrenerjik Reseptör Gevşeme Mekanizması	15
1.3.5. Adrenerjik ve Kolinerjik Olmayan Mekanizmalar ve Nöropeptitler	16
1.3.5.1. Non- Adrenerjik Non-Kolinerjik Sinir Sistemi	16
1.3.5.2. Taşikininler	16
1.3.5.3. Vazoaktif İntestinal Peptid	17

1.3.5.4. Nitrik Oksit	18
1.4. Makrolidler	18
1.4.1. Kimyasal Yapısı ve Kaynağı	19
1.4.2. Etki Şekli	20
1.4.3. Direnç Mekanizması	21
1.4.4. Etki Spektrumu	22
1.4.5. Farmakokinetik	23
1.4.6. İmmünomodülatör Etki	24
1.4.7. İlaç Etkileşimleri	25
1.4.8. Yan Etkileri ve Zehirliliği	26
1.4.9. Gamitromisin	27
1.4.9.1. Kimyasal Yapısı	27
1.4.9.2. Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Etkinliği	28
1.4.9.3. Farmakokinetik Özellikleri	29
1.4.9.4. Kullanım Dozu ve Şekli	30
1.4.9.5. Yan Etkileri ve Zehirliliği	30
1.4.10. Tulatromisin	31
1.4.10.1. Kimyasal Yapısı	31
1.4.10.2. Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Etkinliği	32
1.4.10.3. Farmakokinetik Özellikleri	33
1.4.10.4. Kullanım Dozu ve Şekli	34
1.4.10.5. Yan Etkileri ve Zehirliliği	35
1.5. Apoptoz ve Nekroz	35
1.6. Sitotoksisite	39
1.7. Asetilkolin	40
1.8. Potasyum Klorür	41
1.9. Çalışmanın Amacı	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM	44
2.1. Kullanılan Deney Hayvanları	44
2.2. Kullanılan Deney Cihazları	44
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	46
2.4. İzole Organ Sistemi DeneYleri	47

2.4.1. Sığır Trakeasının İzolasyonu	47
2.4.2. Deney Protokolleri	51
2.4.2.1 Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Tek Başına Araştırılması	51
2.4.2.2. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması	51
2.4.2.3. Potasyum Klorür ile Ön Kasılma Oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Araştırılması	52
2.4.2.4. Asetilkolin EC ₈₅ Değeri ile Ön Kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin araştırılması	52
2.4.2.5. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine 10 ⁻⁶ M Gamitromisin Etkisinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması	53
2.4.3 Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi	53
2.5. Hücre Kültürü Deneyleri	54
2.5.1. Hücre Kültürü İzolasyonu	54
2.5.2. Hücre Sayımı	55
2.5.3. Sitotoksisite Testi (MTT)	55
2.5.4. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi	56
2.5.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	57
2.5.6. Hücre Kültürü Deneyleri Verilerin Değerlendirilmesi	58
2.6. İstatistiksel Analizler	59
3. BULGULAR	61
3.1. İzole Organ Deney Bulguları	61
3.1.1. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Tek Başına Araştırılması	61
3.1.2. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması	63
3.1.3. Potasyum Klorür ile Ön Kasılma Oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Araştırılması	66
3.1.4. Asetilkolin EC ₈₅ Değeri ile Ön Kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin araştırılması	68

3.1.5. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine 10^{-6} M Gamitromisin Etkisinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması	71
3.2. Hücre Kültürü Deney Bulguları	73
3.2.1. Trakea Epitel Hücre İzolasyonu	73
3.2.2. MTT Testi Sonuçları	74
3.2.3. İkili Boyama Metodu Sonuçları	79
3.2.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonu Sonuçları	88
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	92
4.1. İzole Organ Sistemi Deneyleleri	92
4.1.1. Gamitromisin ve Tulatromisinin Tek Başına Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi	93
4.1.2. Gamitromisin ve Tulatromisinin KCI ile ön kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi	94
4.1.3. Gamitromisin ve Tulatromisinin inkübasyonu sonrası ACh derişimlerinin Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi	95
4.1.4. Gamitromisin ve Tulatromisinin ACh ön kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi	96
4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	97
KAYNAKLAR	103
EKLER	118
ÖZGEÇMİŞ	119

ÖNSÖZ

Antibiyotikler, yirminci yüzyılın ikinci çeyreğinden günümüze kadar bakteriyel hastalıkların sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda artan antibiyotik dirençlerine karşı çok sayıda yeni nesil antibiyotikler geliştirilmiştir. Bu yeni nesil antibiyotik sayısındaki artış, hastalık etkenine karşı en etkili antibiyotiği seçme fırsatı sağlamaktadır. Günümüzde solunum yolu bakteriyel hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak makrolid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu solunum yolu hastalığına karşı en etkili makrolid grubu antibiyotiği seçerken, sadece antibakteriyel etkisi değil aynı zamanda immunomodülatör gibi diğer etkilerine bakılarak değerlendirilmelidir. Bu sebeple, gamitromisin ve tulatromisinin, izole trakea düz kas kasılmaları ve trakea epitel hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve sitotoksik etkileri yanı sıra hücre proliferasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Doktora eğitim sürecimde ve tez çalışmamın her aşamasında bilgisiyle yol gösteren, akademik deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ebru YILDIRIM'a, ayrıca ikinci danışman hocam Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e, aldığım eğitim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e, Prof. Dr. Emine BAYDAN'a, Prof. Dr. Miyase ÇINAR'a, doktora eğitimim sırasında yardımlarıyla yanımda olan Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ'ye teşekkür ederim. Tez çalışma sürecinde zamanı ayıran; Canan ÇAKIR'a, Esra ARAT'a, Büşra MORAN'a ve Melike ATAMAN'a teşekkürlerimi sunarım. Desteği ile her zaman yanımda olan başta eşim ve kızım olmak üzere bütün aileme ayrıca teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
Ca	Kalsiyum
cAMP	3'-5' siklik guanozin monofosfat
cGMP	3'-5' siklik adenozin monofosfat
cm	santimetre
CO ₂	Karbondioksit
DAG	Diaçilgliserol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetikasit
E _{max}	İlaç Tarafından oluşturulan Maksimum Etkinlik
g	Gram
IL 1	İnterlökin 1
IL 5	İnterlökin 5
IL 6	İnterlökin 6
IL 8	İnterlökin 8
IL 10	İnterlökin 10
IL 13	İnterlökin 13
İP ₃	İnositol Trifosfat
KCl	Potasyum Klorür
Kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	miligram
mL	Mililitre
MLC	Miyozin Hafif Zinciri
mm	Milimetre
mM	Milimolar

NANK	Non-adrenerjik Non-kolinergic sinir sistemi
NK ₁	Nörokinin 1
NK ₂	Nörokinin 2
NK ₃	Nörokinin 3
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit sentetaz
O ₂	Oksijen
pD ₂	Yarı Maksimal Etkinlik için Gereken İlaç Derişiminin Negatif Logaritması
PKC	Protein Kinaz C
pm	Pikometre
rpm	Dakikada devir sayısı
spp	Türleri
Th1	T- Yardımcı Hücreleri
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TNF - γ	Tümör Nekroz Faktörü Gama
TRPA ₁	Geçici Reseptör Potansiyeli Ankinin 1
TRPV ₁	Geçici Reseptör Potansiyeli Vaniloid 1
TRPV ₄	Geçici Reseptör Potansiyeli Vaniloid 4
VİP	Vazoaktif intestinal peptid
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ g	Mikrogram
μ m	Mikrometre
μ L	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Eritromisinin kimyasal yapısı

Şekil 1.2. Gamitromisin kimyasal yapısı

Şekil 1.3. Tulatromisinin kimyasal yapısı

Şekil 1.4. Apoptoz ve nekrozun şematik karşılaştırılması

Şekil 1.5. Asetilkolin kimyasal yapısı

Şekil 2.1. Sığır Trakea görüntüsü

Şekil 2.2. Trakea düz kasının çevre dokulardan temizlenmesi,

Şekil 2.3. Çevre dokulardan arındırılmış trakea düz kasının izole organ banyosu öncesi hazırlanması ve izole organ banyosuna asılması

Şekil 3.1.1 10^{-3} M ACh uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.2 Gamitromisin derişimleri uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.3 Tulatromisin derişimleri uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.4 DMSO (sulandırması) uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.5 Kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.6 20 dakika 3×10^{-5} M gamitromisin inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.7 20 dakika 3×10^{-5} M tulatromisin inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.8 20 dakika DMSO (sulandırması) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-10} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.9 65 mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif gamitromisinin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.10 65 mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.11 65 mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif DMSO (sulandırmaları) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.12 KCl ile prekonrakte edilen dokuya tultatromisin, DMSO ve gamitromisin uygulaması sonucu oluşan % gevşeme cevapları,

Şekil 3.1.13 2.3×10^{-4} ACh ile ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif gamitromisinin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.14 2.3×10^{-4} ACh ile ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif tultatromisinin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.15 2.3×10^{-4} ACh ile ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif DMSO (sulandırmaları) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.16 2.3×10^{-4} ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, tultatromisin ve DMSO sulandırmaları yanıt eğrisi

Şekil 3.1.17 2.3×10^{-4} ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, gamitromisin ve DMSO sulandırmaları yanıt eğrisi

Şekil 3.1.18 ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.19 20 dakika 10^{-6} M gamitromisin inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.1.20 5. Protokol 20 dakika DMSO (derişimi) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Şekil 3.2.1. Trakea epitel dokudan izole olan epitel hücreleri,

Şekil 3.2.2. Trakea epitel hücreleri,

Şekil 3.2.3 2 $\mu\text{g/mL}$ - 100 $\mu\text{g/mL}$ arası konsantrasyonlarda tultatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği

Şekil 3.2.4 120 $\mu\text{g/mL}$ - 300 $\mu\text{g/mL}$ arası konsantrasyonlarda tultatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği

Şekil 3.2.5 Gamitromisin konsantrasyonları uygulanan trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği

Şekil 3.2.6 Tultatromisin konsantrasyonları uygulanan trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği

Şekil 3.2.7 Gamitromisin ve tultatromisin konsantrasyonlarının trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği

Şekil 3.2.8. 2, 4 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.9. 2, 4 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.10. 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.11. 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.12. 2, 4 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.13. 2, 4 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.14. 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.15. 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü,

Şekil 3.2.16. 2 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarda gamitromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri proliferasyon grafiği

Şekil 3.2.17. 2 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarda tulatromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri proliferasyon grafiği

Şekil 3.2.18. 2 µg/mL'lik konsantrasyonda gamitromisin ve tulatromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri karşılaştırmalı proliferasyon grafiği

Şekil 3.2.19. 10 µg/mL'lik konsantrasyonda gamitromisin ve tulatromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri karşılaştırmalı proliferasyon grafiği

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1.1 Asetilkolin, Gamitromisin+Asetilkolin, DMSO+Asetilkolin pD_2 ve E_{max} değerleri

Çizelge 3.1.2 Asetilkolin, Tulatromisin+Asetilkolin, DMSO+Asetilkolin pD_2 ve E_{max} değerleri

Çizelge 3.1.3 Asetilkolin, 10^{-6} M Gamitromisin+Asetilkolin, DMSO+Asetilkolin pD_2 ve E_{max} değerleri

Çizelge 3.2.1 120 $\mu\text{g/mL}$ - 300 $\mu\text{g/mL}$ arası konsantrasyonlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücreleri üzerine etkisi

Çizelge 3.2.2 2 $\mu\text{g/mL}$ - 100 $\mu\text{g/mL}$ arası konsantrasyonlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücreleri üzerine etkisi

Çizelge 3.2.3 2 $\mu\text{g/mL}$ - 100 $\mu\text{g/mL}$ arası konsantrasyonlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücre % indeksi

ÖZET

Sığırlarda Tulatromisin ve Gamitromisinin Trakea Düz Kasının Kasılması ile Trakea Epitel Hücreleri Üzerine Apoptotik, Nekrotik ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Bu çalışmanın amacı, tulatromisin ve gamitromisinin izole organ banyosu sisteminde *in vitro* sığır trakea kası üzerine ve sığır trakea epitel hücreleri üzerine apoptoz, nekroz yapıcı etkilerinin ve sitotoksik etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışma 2 aşamalı olarak yapıldı. Öncelikle mezbahadan alınan sığır trakeası şerit tarzında kesilerek izole edildi ve izole organ banyosuna asıldı. Gamitromisin ve tulatromisin için kümülatif doz- cevap eğrisi alındı. Dokular bu iki maddeye cevap vermediğinden dolayı asetilkolin ile birlikte çalışıldı. Ayrıca ön kasılma oluşturulan dokularda ilaçların etkilerine bakıldı. İkinci aşamada, yine mezbahadan elde edilen sığır trakea epitel hücrelerinde tulatromisin ve gamitromisinin apoptoz ve nekroz yapıcı etkisinin değerlendirmesi için ikili boyama yöntemi ile hücre çekirdeğinin farklı renklerde boyanması ile apoptoz ve nekroz hücreleri belirlendi. Ayrıca bu antibiyotiklerin epitel hücrelerine sitotoksik etkileri MTT testi, hücre proliferatif etkilerini ise XCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile bakıldı.

İzole trakea dokusu deneylerinde tulatromisin ve gamitromisin uygulama derişimlerinde sığır trakea izole kasında bir değişikliğe neden olmadı. 20 dakika 3×10^{-5} M tulatromisin, gamitromisin ve DMSO ile inkübe edilen izole kasına kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimlerinin pD_2 ve E_{max} değerlerinde istatistiksel olarak fark bulunamadı. 65 mM KCl ile ön kasılma oluşturulan dokuya kümülatif tulatromisin ve gamitromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) ile DMSO cevapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ACh'ın EC_{85} değeri ile ön kasılma oluşturulan sığır trakea düz kasında gamitromisin (10^{-7} - 10^{-6} M) kontrole göre dokularda daha fazla gevşemeye neden olduğu bulundu ($P < 0.05$). 20 dakika 10^{-6} M gamitromisin ile inkübasyon, ACh'ın E_{max} değerini sayısal olarak azalttı ($P > 0.016$).

Hücre kültürü deneylerinde ilk MTT deneyi yapıldı. Tulatromisin ve gamitromisinin uygulandığı hücreler ait toksisite sonuçları bakıldığında trakea epitel

hücrelerinde; gamitromisinin IC₅₀ değeri 156±9 µg/mL, tultatromisinin IC₅₀ değeri 134.7±7.1 µg/mL olarak hesaplandı. Gamitromisin ve tultatromisin aynı konsantrasyonları karşılaştırıldığında 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL, 180 µg/mL ve 240 µg/mL'lik konsantrasyonlarının % canlılığı arasında önemlilik bulundu. Bu konsantrasyonlardan 150 µg/mL, 180 µg/mL ve 240 µg/mL'de gamitromisinin hücre canlılığı yüzdesi tultatromisine göre daha yüksek iken, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 50 µg/mL'de tultatromisin hücre canlılığı gamitromisinin göre daha fazla olduğu bulundu (P<0.05). İkili boyama yöntemi verileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 20 µg/mL'lik konsantrasyonda apoptotik % indeksi sonuçlarının arasındaki fark önemli olup, gamitromisinin tultatromisine göre daha fazla apoptoz yapıcı etkisi olduğu bulundu (P<0.05). Tultatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücreleri üzerine uygulanan 2 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak canlılığın artışı gözlemlendi.

Gamitromisin ve tultatromisin tek başlarına sığır trakea düz kas tonusunda değişikliğe yol açmazken, gamitromisin ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda az da olsa derişime bağlı olarak gevşeme etkisi göstermiştir. Bu etkinin pratik klinik uygulamalarında özellikle astım ya da solunum yolunda ödemle seyreden hastalıklarda tedaviye katkı sağlayabilir. Gamitromisin ve tultatromisinin trakea epitel hücrelerine sitotoksitesi çok düşük olup güvenli bir şekilde kullanılabilir. Bu antibiyotikler arasında güven aralığı gamitromisinin daha yüksektir. Her iki antibiyotiğin apoptoz yapıcı etkileri; hücrelerin proliferasyon etkilerini artırarak, hastalık etkeninin ilk karşılaştığı yer olan epitel hücrelerini meydana gelebilecek hasarlara karşı koruyabilir. Gamitromisin ve tultatromisinin zamana bağlı olarak epitel hücre proliferasyonundaki artışı, bu antibiyotiklerin hastalık tedavisi sonrasında da koruyucu tedaviyi uzun süreli devam ettirebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, epitel hücresi, gamitromisin, nekroz, proliferasyon, sığır trakea düz kası, sitotoksiste, tultatromisin

SUMMARY

The Investigation of the Effect of Tulathromycin and Gamithromycin on Tracheal Smooth Muscle Contraction and the Apoptotic, Necrotic and Cytotoxic Effects on Tracheal Epithelial Cells in Bovine

The aim of this study was to investigate the effects of tulatromycin and gamithromycin in vitro on bovine trachea smooth muscle in isolated organ bath system; and apoptotic, necrotic and cytotoxic effects on bovine tracheal epithelial cells.

The study was conducted in 2 stages. First the bovine trachea from the slaughterhouse was isolated as strips and suspended in the isolated organ bath. Cumulative dose response curve was obtained for gamithromycin and tulatromycin. As the tissues did not respond to these two substances, coincubation was studied acetylcholine. In addition, the effects of these drugs on precontracted tissues were examined. In the second stage, in the bovine tracheal epithelial cells were obtained from the slaughterhouse, cells with apoptosis and necrosis were determined by staining the cell nucleus in different colors by dual staining method to evaluate the effect of tulathromycin and gamithromycin on apoptosis and necrosis. In addition cytotoxic effects of these antibiotics on epithelial cells were examined by MTT test and cell proliferative effects were examined by XCelligence real time cell analysis system.

In isolated trachea tissue experiments, tulatromycin and gamithromycin cumulative concentrations did not cause any change in isolated bovine trachea muscle. There was no statistically significant among in pD_2 and E_{max} values of cumulative ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) concentrations in isolated muscle incubated with 3×10^{-5} M tulatromycin, gamithromycin and DMSO for 20 minutes. There was no statistically significant difference between the cumulative tulatromycin and gamithromycin (10^{-10} - 10^{-5} M) and DMSO responses on the tissue which was precontracted with 65 mM KCl. Gamithromycin (10^{-7} - 10^{-6} M) caused more relaxation in tissues compared to control in bovine tracheal smooth muscle which

was precontracted by the EC₈₅ value of ACh (P <0.05). Incubation with 10⁻⁶ M gamithromycin for 20 minutes numerically reduced the E_{max} of ACh (P>0.016).

First of all MTT assay was performed in cell culture experiments. When the toxicity results of tulatromycin and gamithromycin were evaluated, in tracheal epithelial cells the IC₅₀ value of gamithromycin was 156±9 µg / mL and the IC₅₀ value of tulatromycin was 134.7±7.1 µg / mL. The difference between gamithromycin and tulatromycin, at concentrations 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL, 180 µg/mL in terms of cell viability was found to be significant. While the cell viability percentage of gamithromycin was higher at 150 µg / mL, 180 µg/mL and 240 µg/mL than tulatromycin; at 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL and 50 µg/mL concentrations tulatromycin cell viability was higher than gamithromycin (P <0.05). When the staining method data were evaluated, the difference between the results of % apoptotic index at 20 µg/mL concentration was significant and it was found that gamithromycin had more apoptotic effect than tulatromycin (P <0.05). It was seen that tulatromycin and gamithromycin applied on tracheal epithelial cells at concentrations of 2 and 10 µg/mL; increased the viability depending on time.

Gamithromycin and tulatromycin alone did not cause a change in bovine tracheal smooth muscle tone, while gamithromycin showed a slight relaxation effect due to the concentration on the tissues precontracted with ACh. This relaxation effect may contribute to treatment of asthma or respiratory edema in practical clinical applications. Gamithromycin and tulatromycin have very low cytotoxicity to tracheal epithelial cells and can be used safely. The confidence interval between these antibiotics is higher in gamithromycin. Apoptotic effects of both antibiotics, can protect the epithelial cells, which are the first place of the disease agent, against the damages by increasing the proliferation effects of the cells. The increase in epithelial cell proliferation of gamithromycin and tulatromycin due to time shows that these antibiotics can maintain long-term prophylactic treatment against diseases.

Key words: Apoptosis, bovine tracheal smooth muscle, cytotoxicity, epithelial cell, gamithromycin, necrosis, proliferation, tulatromycin

1. GİRİŞ

Makrolid antibiyotiklerin çoğu *Streptomyces* türlerinden türetilen ve yapısal olarak birbirine benzeyen bileşiklerdir. Bu bileşikler; iki veya daha fazla şeker molekülünün bağlandığı lakton halkasına sahip olma özelliği ile karakterize olup, lakton halkasındaki karbon atom sayısına göre sınıflandırılırlar. Makrolid grubu bazı bileşiklerin lakton halkasında; iki veya üç azot grubu bulunabilmektedir (Papich 2018).

Makrolid grubu antibiyotikler, prokaryot organizmaların 50S ribozomal alt ünitesinin 23S rRNA bölgesine bağlanır ve bu organizmaların protein sentezini engellerler (Gaynor ve Mankin 2003, Giguère 2013, Papich 2018). Bu antibiyotikler; bakterilerin protein sentezini engelleyerek bakteriyostatik etki yaparlar, ama düşük oranda bakterisit etki de gösterebilirler (Huang ve ark, 2009). Makrolidler, penisilin alerjisi olanlara alternatif olarak kullanılabilirler (Kwiatkowska ve Maślińska 2012).

Genel olarak makrolidlerin; periferik dokulardaki yoğunluğu serumdaki yoğunluğundan fazla olması, dokulara geniş dağılım göstermesi ve akciğerdeki yoğunluğunun uzun süreli olması gibi özelliklerinden dolayı solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Benchaoui ve ark. 2004, Nowakowski ve ark. 2004). Son yıllarda geliştirilmiş olan tulatromisin ve gamitromisin gibi makrolid antibiyotikler, solunum yolu bakteriyel hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Villarino ve ark. 2013, Wyns ve ark. 2014, Dedonder ve ark. 2015, Hildebrand ve ark. 2015).

Makrolidler; birçok ökaryot hücre tipine nüfuz etme ve birikme yeteneğine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı, hücre içi organizmalara karşı terapötik etkide göstermektedirler. Bu grup antibiyotikler, nötrofil ve makrofajlar kadar olmasa da epitel benzeri hücre hatlarında birikme kabiliyeti bulunmaktadır (Čulić ve ark. 2001). Solunum yolu epiteli; inhale patojenler (bakteri, virüs vb.) ve iritanlara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynayan fizikokimyasal bariyerdir (Mills ve ark. 1999,

Tam ve ark. 2011). Solunum yolu epitel hücreleri *in vitro* inflamatuvar mediatörlere maruz kaldığında, makrolidler epitel hasarına karşı koruyucu etki gösterir (Altenburg ve ark. 2011).

Makrolid grubu antibiyotikler antimikrobiyel etkisinin yanında immün sistemi hücrelerinin fonksiyonlarını da düzenlediği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı makrolid grubu antibiyotiklerin apoptoza neden olduklarını göstermektedir (Fischer ve ark. 2011, Kwiatkowska ve Maślińska 2012). Bu çalışma ile gamitromisin ve tularromisinin antibakteriyel etkileri yanında diğer sistemlere etkilerinin değerlendirilmesi veteriner pratikte sağaltım uygulamalarına katkıda bulunacaktır.

1.1. Sığır Trakeasının Anatomisi

Solunum sistemi; gaz alışverişi, kan pH düzenleme, vücuda alınan havayı filtre etme, nemlendirme ve ısıtma gibi çok sayıda fonksiyonun düzenlediği sistemdir. Sığır solunum sisteminde sırasıyla; burun, farenks, larenks, trakea, bronşlar ve akciğerler bulunmaktadır. Genellikle bu sistem; alt ve üst solunum sistemi olmak üzere ikiye ayrılmakta olup, üst solunum sisteminde burun ve farenks, alt solunum sisteminde ise larenks, trakea, bronşlar ve akciğerler yer almaktadır. Alt solunum yolunda yer alan trakea; larenks'in kaudalinden başlayıp, C- şeklinde hiyalin kıkırdaklar dizisi halinde sağ ve sol bronşların birleştiği (Bifurcatio tracheae) bölüme kadar uzanan silindirik yapıdır (König ve Liebich 2007, Akers ve Denbow 2008b).

Uzunluğu ve iç çapı değişmekle birlikte, ortalama 450-500 kg ağırlığında olan bir sığırın trakeası yaklaşık 95 cm uzunluğunda ve 3.2 cm iç çapındadır (Veit ve Farrell 1978). Ayrıca hiyalin kıkırdakları birbirine bağlayan ve trakeanın esnekliğini sağlayan fibroelastik bir bağ dokusu (ligamentum annularia) bulunmaktadır. Bu

kıkırdak halkalarının dorsal açıklığı, düz kas olan musculus trakealis tarafından bağlanmaktadır (König ve Liebich 2007, Akers ve Denbow 2008b, Frandson ve ark. 2009b). Bu düz kas; trakeanın dorsalinde olup, trakeanın çap tonunu etkilemektedir (Frandson ve ark. 2009b).

1.2. Sığır Trakeasının Histolojisi

Trakea; mukoza, submukoza ve adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakaların ilki olan mukoza tabakası, epitel ve lamina propria olmak üzere iki kesime ayrılır (Reynolds ve ark. 2015). Trakea epitel dokusu, yalnızca çok katlı silyalı epitel ile kaplıdır (König ve Liebich 2007, Akers ve Denbow 2008a). Yetişkin sığır trakea bazal laminasında 323 ± 24 (hücre/mm) epitel hücre bulunmaktadır. Bu epitel hücrelerinin %31'i bazal, %42'si silli, %4'ü goblet, %23'ü diğer hücrelerdir. Bu bölgede seröz ve clara hücresi yer almazken %1' in altında fırçamsı hücre bulunmaktadır (Reynolds ve ark. 2015). Goblet hücreleri solunum yolu lümenine mukus salgılar. Bu mukus epitel tabakasının; yüzeyi kaygan hale getirmek, solunan havayı nemlendirmek, zararlı yabancı partikülleri yakalamak ve ozon gibi zararlı gazları içine almak gibi çok sayıda görevi bulunmaktadır (Soleas ve ark. 2012). Silli hücreler, bazal laminadan kök alıp lümen yüzeyine kadar uzanmaktadır (Harkema ve ark. 1991). Bu hücrenin apikal yüzeyinde 100-300 arasında hareketli siller bulunmaktadır. Bu siller, koordineli dalgalar halinde mukus ve yabancı partiküllerin boğaza doğru hareketini sağlar (Harkema ve ark. 1991, Soleas ve ark. 2012). Sığır trakeası silli hücrelerdeki siller 4.2 ± 0.5 μ m uzunluğundadır (Reynolds ve ark. 2015). Bazal hücreler çok küçük olup, solunum yolu epitel hücrelerinin kök hücresi olarak kabul edilir. Ayrıca bu hücreler bazal laminada bulunup, solunum yolu lümenine kadar uzanmazlar. Fırçamsı hücreler; apikal yüzeyinde bulunan mikrovilluslar ile karakterize olup, işlevleri tam olarak bilinmemektedir (Harkema ve ark. 1991, Soleas ve ark. 2012). Mukoza tabakasının lamina propria kısmı, trakea bezleri, sinir ve damarları çevreleyen gevşek bağ

dokusundan oluşur. Submukoza tabakası; kan damarları, lenfatik organ ve damarlar ve trakeal bezleri saran düzensiz sıkı bağ dokusudur. En dış tabaka olan adventisya; C şeklinde hyalin kıkırdak halkaları ve sıkı bağ dokuyu sarar. Bu hyalin kıkırdak halkalarının dorsal ucu, düz kas olan musculus trakealis ile köprülenir (Samuelson 2007). Çoğu türde olduğu gibi bu kas, kıkırdağın iç tarafındaki perikondriyuma bağlanır (Plopper ve Adams 2006). Bu tabakadaki düz kas hücreleri boyutları değişmekle birlikte, 5-10 µm çap ve 30-250 µm uzunlunda. Bu hücrelerin çekirdeği tek ve merkezdedir (Akers ve Denbow 2008a, Frandson ve ark. 2009a). Trakeanın dış tabakası olan adventisya tabakası ise, gevşek bağ dokusudur (Reynolds ve ark. 2015).

1.3. Sığır Trakeası Farmakolojisi ve Fizyolojisi

Memelilerin solunum yolu düz kası, hem kasılma hem de gevşetici özelliğine sahiptir. Bu kas, sempatik ve parasempatik sinir sistemi tarafından innerve edilmektedir. Böylece; *in vivo* veya *in vitro* olarak solunum yolu belirgin şekilde daralabilir veya genişleyebilir (Canning ve Fischer 2001). Solunum yolu düz kas tonusu; hormon, nörotransmitter, ilaç ve mediatör gibi birçok maddeden etkilenir. Bu maddeler solunum yolu düz kas hücreleri üzerindeki yüzey reseptörlerine bağlanarak etkilerini oluşturmaktadır (Barnes 1989). Bu gibi maddeler; sinirler ve bağışıklık sisteminin bir parçası olan hücrelerden salınabilmektedir (Andersson ve Grundström 1987).

1.3.1. Trakeabronşial Bölgedeki Reseptörler

Trakea-bronşiyal bölgede dikkatimizi çeken 4 önemli reseptör tipi bulunmaktadır. Bunlar; yavaş adapte olan akciğer gerim reseptör, hızlı adapte olan

akciğer gerim reseptör, c-fibril reseptör ve nöroepitelyal cisimcikler'dir (Widdicombe 2001).

1.3.1.1. Yavaş Adapte Olan Akciğer Gerim Reseptör

Yavaş adapte olan akciğer gerim reseptör, solunum yolu düz kasının içinde anatomik olarak yerleşmiş olmakla birlikte ağırlıklı olarak miyelinli sinir sonlarında bulunur (Barnes 1990, Schelegle ve Green 2001). Trakeanın arka tarafından trakealis kası içinde uzanmakta olup, düz kas yoğunluğu olan bronşial dallanma noktalarında yaygındır (Widdicombe 2001). Bu reseptör, mukoza tabakasının uzaklaştırılması durumunda çalışmaya devam ederken, solunum yolu düz kasının çıkarılması durumunda işlevsiz kalmaktadır (Schelegle ve Green 2001).

Başlangıçta bu reseptörlerin uyarılarının mekanik olduğu ve fizyolojik-kimyasal değişikliklere duyarsız olduğu düşünülmekle beraber, bu düşüncenin son dönemde yapılan çok sayıda çalışma ile doğru olmadığı ortaya çıkmıştır. Örneğin bu reseptörlerin, solunum yolunda CO₂ yoğunluğunun arttığı durumlarda ve halaton, trikloretilen gibi uçucu anestezikler ile inhibe olduğu görülmüştür (Widdicombe 1982).

1.3.1.2. Hızlı Adapte Olan Akciğer Gerim Reseptör

Hızlı adapte olan akciğer gerim reseptörleri; yavaş adapte olan akciğer gerim reseptörler gibi solunum yolu düz kaslarının miyelinli sinir sonlarında bulunur (Barnes 1990). Bu reseptör, trakeanın her yerinde eşit şekilde dağılmış bulunması ve hızlı adapte olmasıyla yavaş adapte olan akciğer gerim reseptörlerden ayrılmaktadır (Barnes 1990, Widdicombe 1982).

Hızlı adapte olan akciğer gerim reseptörü; solunum yoluyla alınan irritan madde ve aerosoller tarafından uyarılır, bu nedenle irritan reseptör olarak da bilinmektedir (Widdicombe 1982, Kappagoda ve Ravi 2006). Bu uyarıcılara, kükürt dioksit, amonyak, sigara dumanı ve karbon tozları örnek verilebilir. Ancak bu uyarıcılara karşı reseptörün hassasiyeti farklılıklar göstermektedir (Widdicombe 1982).

1.3.1.3. C-fibril Reseptör

C-fibril reseptör; diğer reseptörlerin aksine miyelinize olmayan sinir uçlarında bulunur (Barnes 1990). C-fibril reseptör, akciğer ve bronşiyal tipleri olmak üzere ikiye ayrılabilir (Yu 2005). Yu (2005)'ya göre bu reseptör çok sayıda endojen ve ekzojen kimyasal maddeye tepki verdiği için kemosenördür. C-fibril reseptör, akciğer hacim değişikliklerine çok duyarlı olmazken akciğer yangılarında uyarılmaktadır. Bu reseptör, akciğer konjesyonu ve ödeme neden olan ilaçlara ise şiddetli duyarlıdır. Ayrıca egzersiz gibi akciğerde kan akış hızının arttığı durumlarda da bu reseptörler uyarılmaktadır. C-fibril reseptör, çeşitli mediatörlere karşı akciğer ve bronşiyallerde farklı düzeyde duyarlılık gösterebilir (Widdicombe 1982). C-fibril reseptör, kimyasal, termal ve asidik uyarılara karşı cevap verir. Ayrıca hava kirliliği ve sigara dumanına karşı duyarlıdır (Rogerio ve ark. 2011). Bu reseptörler bazı kimyasal maddeler ve fizyolojik stres ile aktive olmasıyla; solunum yolunda kasılma, öksürük, mukoza salgısı ve taşipne gibi durumlar ortaya çıkabilir (Adriaensen ve Timmermans 2011).

1.3.1.4. Nöroepitelyal Cisimcikler

Nöroepitelyal cisimcikler, nöroepitelyal endokrin hücrelerdendir. Bu reseptörler, çok sayıda marker ve bioaktif madde içerir. Ayrıca bu reseptörler hipoksi ve havayolu düz kasları bronşiyal ve akciğer vasküler yatak hareketlerine yanıt olarak açığa çıkmaktadır (Widdicombe 2001).

1.3.2. Solunum Yolunda Bulunan Diğer Önemli Reseptör ve Kanallar

1.3.2.1. Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid 1

Geçici reseptör potansiyeli vanilloid 1 (TRPV₁) geçici reseptör potansiyeli iyon kanalları gruplarından bir tanesidir. Geçici reseptör potansiyeli vanilloid kanalının 1'den 6'ya kadar toplam 6 alt tipi vardır. Bu kanal, çeşitli fizyolojik durumlara duyarlıdır ve Ca⁺² geçirgenliği yüksek olduğu için sağlıklı veya hastalıklı durumlarda hava yolu tonunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığına inanılmaktadır (Jia ve Lee 2007).

Geçici reseptör potansiyeli vanilloid 1, pozitif sinir fibrilleri; burun, larenks, trakea, alveoller, düz kas, kan damarları ve akciğer parankimi dahil olmak üzere tüm solunum yolunu innerve etmektedir. İlk zamanlar TRPV₁, tehlikeli ısı ve ağrıyı algılayan nöronal olarak ifade edilen iyon kanalı iken, son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu kanalın değiştiği ve TRPV₁, iritan kimyasallar, asidik pH, yüksek sıcaklıklar (>43°C) ve endojen mediatörler gibi çeşitli uyarılar tarafından aktif hale geldiği bildirilmektedir (Grace ve ark. 2014).

1.3.2.2. Geçici Reseptör Potansiyeli Vanilloid 4

Geçici reseptör potansiyeli vanilloid 4 (TRPV₄) kanal, trakea ve bronşiyallerin epitelyum dokusu, solunum yolu düz kası, alveol duvarı, akciğer dokusu ve damarlarında bulunmaktadır (Grace ve ark. 2014). Geçici reseptör potansiyeli vanilloid 4, sıcaklık artışı ve hipotonik çözeltiler tarafından aktive olur. Solunum yolu sıvısı izotonik olduğu durumlarda ve solunum yolu sıvısının hipotonik olduğu ama epitel bariyerlerin zarar görmediği durumlarda TRPV₄ kanal aktive olmaz. Ancak astım gibi solunum yolu hastalıkları solunum yolu epitelinde bozulmalara neden olur. Solunum yolu düz kas epitelinin bozulması ile hipotonik solunum yolu sıvısına korumasız kalır. Bu durum sonucunda TRPV₄ kanal aktive olur. Geçici reseptör potansiyeli vanilloid 4 aktive olduğunda hücre içi Ca⁺² yoğunluğu artmaktadır (Jia ve Lee 2007). Son yıllarda insan ve kobay solunum yolu düz kası üzerinde yapılan çalışmalarda, TRPV₄ kanalının aktivasyonu sonucu solunum yolu düz kasında kasılma meydana geldiği bildirilmiştir (Grace ve ark. 2014).

1.3.2.3. Geçici Reseptör Potansiyeli Ankirin 1

Geçici reseptör potansiyeli iyon kanalları gruplarından biri de geçici reseptör potansiyeli ankyrin 1 (TRPA₁)'dir (Jia ve Lee 2007). Geçici Reseptör Potansiyeli Ankirin 1, zararlı çevresel irritanlar ve endüstriyel hava kirlilikleri bulunduğu ortamlarda aktive olmaktadır. Geçici Reseptör Potansiyeli Ankirin 1 kanalının açılmasına neden olan irritanlar öksürük, hırıltılı soluma ve nefes darlığı gibi semptomlara veya astıma neden olmaktadır (Grace ve ark. 2014). Geçici Reseptör Potansiyeli Ankirin 1, sigara dumanının neden olduğu bronşiyal inflamasyonların erken döneminde açıldığı hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde görülmüştür. Geçici Reseptör Potansiyeli Ankirin 1 kanalının açılmasının asıl nedeni ise sigara dumanı

içinde bulunan nikotin, akrolein gibi iritatan maddelerdir (Grace ve ark. 2014). Ayrıca TRPA₁ kanalı; hardal yağı, göz yaşartıcı gaz, α ve β -doymamış aldehit, egzoz gazı gibi çevresel iritatanlar tarafından da aktive olmaktadır (Gerhold ve Bautista 2008).

1.3.2.4. Sitokin Reseptörleri

Sitokin reseptörleri, hücre yüzeyine bağlı ve çözünebilir şekilde bulunabilir. Sitokinler; nötrofil, monosit, makrofaj ve lenfosit gibi immun sistemi hücreleri tarafından üretilen çözülebilir proteinlerdir. Bu proteinlerin, birkaç çeşit alt birimi vardır (Stenzen ve Poschenrieder 2015). Sitokinler, hem proinflamatuvar (IL-1, IL-6, IL-8 vb.) hem de antiinflamatuvar (IL-10 vb.) etkileriyle inflamatuvar yanıtın ana düzenleyicileridir (Kanoh ve Rubin 2010).

Yangısel sitokinler IL-1 β ve TNF- α , Th₁ sitokin viral hastalıklarda salgınır; Th₂ sitokin, IL-13, IL-5 alerji ve atopi ile birlikte görülür. Bu sitokinler solunum yolu düz kas hücre cevaplarını değiştirirler. Astım gibi aşırı β_2 adrenoreseptör cevabın azalmasına bağlı durumların sitokinlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuçta sitokinlerin etki mekanizmasının araştırılması astımın tedavisinde önemli bir basamak olarak değerlendirilir (Shore ve Moore 2002).

1.3.3. Solunum Yolu Düz Kaslarının Kasılma Mekanizması

Solunum yolu düz kasının kasılması, ventilasyon-perfüzyon eşleşmesine, kıkırdak yapı içermeyen solunum yollarının dengesi ve yabancı cisimlerin dışarı atılması gibi birçok fizyolojik olayların gelişmesine önemli katkıda bulunur (Pelaia ve ark. 2008). Solunum yolu düz kasının kasılma durumu, spesifik hücre zarı

reseptörlerine etki eden birçok hücre dışı habercilerin kontrolü altındadır. Bu habercilerin spesifik hücre zarı reseptörlerine bağlanması sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. Sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ile kasılma cevabı şekillenir (Ouedraogo ve Roux 2014).

1.3.3.1. Kolinerjik Reseptör Kasılma Mekanizması

Solunum sisteminde kolinerjik uyarı, fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda solunum yolu düz kası tonunun kontrolünü sağlar. Kolinerjik sinir sisteminin nörotransmitteri asetilkolindir (ACh). Asetilkolin, kolin asetil transferaz enzimi tarafından asetil CoA ve kolin'den sentezlenir. Kolinerjik reseptörler nikotinic ve muskarinic reseptörler olmak üzere iki ayrılır (Racké ve ark. 2006). Bu reseptörlerden; nikotinic reseptör, kanal protein reseptör ailesinden, muskarinic reseptör ise, G-proteine kenetli reseptör ailesindedir (Roux ve ark. 1998). Muskarinic reseptör M_1 , M_2 , M_3 , M_4 ve M_5 olmak üzere 5 alt tipe ayrılır. Bu muskarinic reseptör alt tiplerinden solunum yolu düz kasında M_2 ve M_3 reseptörleri bulunur. M_2 , solunum yolu düz kas kasılmalarında doğrudan rol oynamasına rağmen solunum yolu düz kasında bulunan muskarinic reseptörlerin çoğunluğunu oluşturur. Solunum yolu düz kas kasılmalarına aracılık eden muskarinic reseptör M_3 'tür (Coulson ve Fryer 2003). M_3 reseptörleri, insan ve sıçan solunum yolu düz kasında, başlangıçta $Gq\alpha$ (G-proteini) ve Fosfolipaz C'nin artışına, bu artış da inositol 1, 4, 5-trifosfat (IP_3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşumu ile sonuçlanır. İnositol 1, 4, 5-trifosfatın aktivasyonu ile sitoplazmada Ca^{+2} konsantrasyonu geçici ama hızlı artış olur. Hücre içinde Ca^{+2} artışı, kalsiyum-kalmoduline bağlanır. Bu kalsiyum-kalmodulin bağlantısı da miyozin hafif zincir kinazı aktive eder ve aktin- miyozin etkileşimi ile kasılmaya neden olur. Diaçilgliserol, protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu başlatır. Protein kinaz C, çeşitli proteinin fosforilasyonu ile solunum yolu düz kas kasılma mekanizmasını kontrol eder (Racké ve Matthiesen 2004). M_2 muskarinic reseptör; heterotrimerik G protein G_i aracılığıyla, Ca^{+2} düzeyinde

sabitlenmeye ve solunum yolu düz kasından kasılmasına katkıda bulunur (Hirshman ve ark. 1999).

1.3.3.2. Adrenerjik Reseptör Kasılma Mekanizması

Adrenerjik sistem, α ve β adrenerjik reseptörleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Nieuwstadt ve ark. 1994). Bu reseptörler kendi içinde α_1 , α_2 , β_1 ve β_2 gibi alt tipleri vardır (Strosberg 1993). α ve β adrenerjik reseptörlerinin nörotransmitteri adrenalin ve noradrenalin'dir. Bu reseptörlerden α -adrenerjik reseptörleri solunum yolu düz kasının kasılmasıyla ilgili olmaktadır (Barnes 1990). Sığır, köpek, at ve kobayın solunum yolu düz kaslarının inervasyonunda adrenerjik sistem yer almaktadır (Nieuwstadt ve ark. 1994).

1.3.4. Solunum Yolu Düz Kaslarındaki Gevşeme Mekanizması

1.3.4.1. Adrenerjik Reseptör Gevşeme Mekanizması

Solunum yolu düz kasının gevşemesinde en önemli reseptör β -adrenerjik reseptörüdür (Broadley 2006). β -adrenerjik reseptör, trakeadan bronşiyollerde dahil bütün solunum yolu düz kaslarında bulunmaktadır (Barnes 1990). β -adrenoseptörün, β_1 , β_2 ve β_3 olmak üzere 3 alt tipi vardır. Bu üç alt tip β -adrenoseptör, Gs'ye bağlanır. β -adrenoseptörün aktivasyonu ile, Gs ve adenilil siklaz yoluyla düz kas 3'-5' siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyeleri yükselir. Siklik adenozin monofosfat seviyesinin yükselmesiyle birlikte, kas gevşemesiyle ilişkili olan membranları veya

hücre içi proteinleri fosforilasyonuna neden olan cAMP'ye bağımlı protein kinaz A'yı aktive olur (Tanaka ve ark. 2005). Bu fosforilasyon sonucu solunum yolu düz kas hücre içi Ca^{+2} yoğunluğu veya Ca^{+2} olan duyarlılığı azalır (Billington ve ark. 2013) ve solunum yolu düz kasında gevşeme meydana gelir (Shore ve Moore 2002).

1.3.5. Adrenerjik ve Kolinerjik Olmayan Mekanizmalar ve Nöropeptitler

1.3.5.1. Non- Adrenerjik Non-Kolinerjik Sinir Sistemi

Solunum yolu düz kasının; sempatik (adrenerjik) ve parasempatik (kolinerjik) innervasyonuna ek olarak, non-adrenerjik non-kolinerjik (NANK) solunum yollarının innervasyonu da bulunmaktadır. Otonom sinir sisteminin bu üçüncü bölümü kendi içinde ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, gevşemeye aracılık eden bir inhibitör bileşen (i-NANK) iken, ikincisi solunum yolu düz kasının kasılmasına aracılık eden bir eksitator bileşendir (e-NANK) (Thirstrup 2000a). İnhibitör ve eksitator bileşenlerin transmitterleri; solunum yolu düz kası üzerine yaptığı etki ile kan damarları, bezler ve epitel gibi diğer hedeflere yaptığı etki zıt olabilir. Örneğin, e-NANK sisteminin transmitteri olan P maddesi ve nörokinin A solunum yolu düz kasını kasarken, mukozal damarları gevşetmektedir (Widdicombe 1998). i-NANK sistemin transmitteri nitrik oksit ve vazoaaktif intestinal peptid, solunum yolu düz kasın gevşemesine neden olmaktadır (Hasaneen ve ark. 2003).

1.3.5.2. Taşikininler

P maddesi, nörokinin A ve nörokinin B bilinen en yaygın üç taşikinin peptidleri ailesi üyeleridir (Rupniak ve Kramer 2002, Mechiche ve ark. 2011). Bu

taşıkininler biyolojik etkilerine nörokinin₁ (NK₁), nörokinin₂ (NK₂) ve nörokinin₃ (NK₃) olarak adlandırılan G-proteine bağlı reseptörler aracılık etmektedir. Bu reseptörleri agonistleri; NK₁ için P maddesi, NK₂ için nörokinin A ve NK₃ için nörokinin B'dir (Rupniak ve Kramer 2002).

Taşıkinin aile üyesi olan P maddesi, hayvanlarda spesifik reseptörleri aktive ederek solunum yolu düz kasını kasmaktadır (Barnes 1989). Li ve Shang (2019) P maddesi ve NK₁ reseptör antagonistinin, solunum yolu düz kası hücrelerinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonuna etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda; solunum yolu düz kas hücrelerinde, P maddesi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artış olurken NK₁ reseptör antagonistinde hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda azalma olduğunu bulmuşlardır. Nakajima ve ark. (1995) kobay trakea solunum yolu düz kası üzerinde yapmış oldukları çalışmada, neurokinin A trakea düz kas hücrelerinin kasılmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

1.3.5.3. Vazoaktif İntestinal Peptid

Vazoaktif intestinal peptid (VIP), akciğerlerin de dahil olduğu geniş anatomik dağılımı olan 28 amino asitlik bir peptittir. Vazoaktif intestinal peptid içeren nöronlar; trakeabronşial düz kas tabakasında, submukozal bezlerin etrafında, lamina propria ve solunum yolu damar duvarlarında bulunur (Thirstrup 2000b). Solunum sisteminde, VPAC₁ ve VPAC₂ olmak üzere iki reseptörü bulunmaktadır (Groneberg ve ark. 2006, Mathioudakis ve ark. 2013). Ayrıca VIP'e bağlanan PAC₁ reseptörü de bulunmaktadır (Groneberg ve ark. 2006). Bu reseptörlerden; VPAC₁ akciğer dokusu ve T lenfositlerde fazla bulunurken, VPAC₂ ise öncelikle düz kasta olmak üzere mast hücreleri ve akciğer mukozasının bazal kısımlarında bulunur (Mathioudakis ve ark. 2013). Vazoaktif intestinal peptid ile uyarılan solunum yolu düz kasının gevşemesi; adenilat siklaz uyarıcı G-protein Gs bağlanan spesifik reseptörlere bağlanma ve

bağlanmayı takiben hücre içi cAMP seviyesinin yükselmesi yoluyla meydana gelmektedir (Barnes 1987, Thirstrup 2000b).

1.3.5.4. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO); adrenerjik ya da kolinerjik olmayan sinir, makrofajlar, endotelial ve epitel hücrelerinde dahil olduğu çok sayıda solunum yolu hücreleri tarafından üretilir (Thirstrup 2000b). Nitrik oksit, L- argininin nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi tarafından L-sitrüline enzimatik olarak katalize edilmesi sırasında sentezlenmektedir (Jia ve ark. 1998, Thirstrup 2000b). Nitrik oksit aktivitesini cGMP'ye bağımlı veya bağımsız olarak göstermektedir ve solunum yolu düz kas gevşemesinde her iki fonksiyonu da kullandığı görülmektedir. Guanil siklazın aracılık ettiği mekanizma; NO, guanil siklaz Fe^{+2} bağlanır, guanozin trifosfatın siklik guanozin monofosfata (cGMP) dönüşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, damar ve solunum yolu düz kas gevşemesi gibi hücresel süreçlere yol açar. Nitrik oksit, cGMP bağımsız mekanizması ise, iyon kanalları bronkomotor tonun düzenlenmesinde rol oynar ve bazıları NO tarafından aktive edilmektedir. Siklik guanozin monofosfata bağımsız mekanizması ile bronkomotor tonun düzenlenmesinde rol oynayan iyon kanallarının bazıları NO tarafından aktive edilmektedir. Nitrik oksit; guanil siklazı aktive eder, cGMP seviyesini artırır ve trakeal ve bronşiyal düz kasların gevşemesine neden olur (Antosova ve ark. 2017).

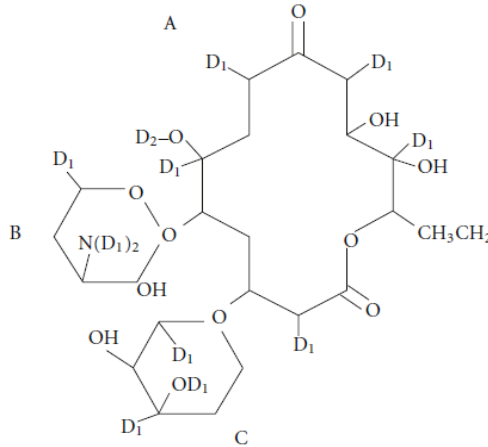
1.4. Makrolidler

Makrolidler; veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan antibiyotik gruplarından bir tanesidir (Villarino ve Martín-Jiménez 2012). Bu grupta yer alan antibiyotiklerden; gıda için yetiştirilen hayvanlarda kullanılan ilk bileşik, 1960'ların

başlarında ortaya çıkarılan spiramisinidir. Bu makrolidi, 1970'lerin başlarında eritromisin ve tilosin bileşikleri izlemiştir. 1990'ların başında, yarı sentetik yeni nesil makrolidler yani azalidler insan hekimliğinde kullanılırken, veteriner hekimlikte ilk azalid olan gamitromisin 2008 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Pyörälä ve ark. 2014). Makrolidler, penisilin alerjisi olduğu durumlarda penisiline alternatif olarak kullanılmaktadır (Papich 2018).

1.4.1. Kimyasal Yapısı ve Kaynağı

Makrolid antibiyotiklerin çoğu, toprak kaynaklı çeşitli *Streptomyces* türlerinden türetilen ve yapısal olarak benzer bileşiklerdir. Ayrıca bileşiklerin lakton halka yapısında, 12-20 arasında karbon atomu bulunmaktadır (Papich ve Riviere 2001). Makrolidler, iki veya daha fazla şeker molekülünün bağlandığı, lakton halkasına sahip olma özelliği ile karakterize antibiyotikler olup, lakton halkasındaki (12, 13, 14, 15 ve 16 üyeli) karbon atom sayısına göre sınıflandırılırlar (Zhanel ve ark. 2001, Mankin 2008, Pyörälä ve ark. 2014). Makrolid antibiyotik olan eritromisinin, lakton halka yapısı ve şeker molekülleri Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Eritromisinin kimyasal yapısı (14 lakton halkalı) A) Makrosiklik lakton halka, B) Desosamin, C) Kladinoz, D1) CH₃, D2) H (Kwiatkowska ve Maślińska 2012).

Makrolidleri sınıflandıracak olursak; ilk olarak 12 üyeli lakton halkalı gelmektedir ve günümüzde bu sınıfta bulunan antibiyotikler klinik kullanımı bulunmamaktadır. İkinci sınıfı ise 13 üyeden oluşan lakton halkalıdır. Bu sınıfa, yarı-sentetik bileşik olan tulatromisin örnek verilmektedir. Tulatromisin, %10' u 13-üyeli ve %90'ı 15-üyeli bileşiklerin regioizomerik karışımıdır. On dört üye halkalı bileşikler sınıfı, doğal ve yarı-sentetik olmak üzere ikiye ayrılır. Bu grupta; doğal bileşiklere eritromisin ve oleandomisin, yarı-sentetik bileşiklere klaritromisin, roksitromisin ve diritromisin yer almaktadır. Azitromisin, gamitromisin ve tulatromisinin izomeri (%90) ise 15 üyeli halkalı grubunda yer almaktadır. Ayrıca bu grup da yer alan bileşiklerin lakton halkasında bir azot atomu bulunduğu için azalidler olarak da adlandırılırlar. Makrolidlerin son sınıfı olan 16 üyeliler grubuna spiramisin, josamisin, tilosin ve midekamisin doğal bileşikler; tilmikosin, tildipirosin, tilvalosin, rokitamisin ve miokamisin yarı-sentetik bileşikler girmektedir (Giguère 2013).

Makrolidlerin pKa değerleri 6-9 (Örn: tilosin pKa:7.1, eritromisin pKa:8.7-8.8) arasında değişmekte olup, zayıf bazik bileşiklerdir (Papich ve Riviere 2001). Bu özelliklerinden dolayı makrolidler; asidik ortamlara göre alkali ortamlarda daha iyi etki oluşturmaktadırlar (Kaya 2013). Örneğin, eritromisinler, pH değeri 8 olan şartlarda en ideal antimikrobiyal etki göstermektedirler. Ancak eritromisinlerin antimikrobiyal etkisi, nekrotik doku, apse ve idrar gibi asidik ortamlarda baskılanmaktadır (Papich ve Riviere 2001).

1.4.2. Etki Şekli

Makrolidler, ribozomun 50S alt birimine bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe ederek, bakteriyostatik etki göstermektedirler (Kannan ve Mankin 2011, Gamerdinger ve Deuerling 2012, Giguère 2013). Ayrıca transpeptidasyonu ve translokasyon sürecini engelleyerek tamamlanmamış polipeptit zincirlerinin erken

ayrılmasına neden olurlar (Giguère 2013). Makrolidlerin ribozoma bağlandıkları bölge kloramfenikollerle aynı (yakın bölge) değildir, ancak birlikte uygulandıklarında antagonistik etki oluşmaktadır. Makrolidler, mitokondriyal ribozomlara bağlanırlar ama mitokondriyal membranı geçemezler. Bu nedenle, kloramfenikollerin aksine kemik iliği üretimine baskı yapmazlar. Genel olarak bu grupta yer alan bileşikler, memelilerin ribozomlarına bağlanmadıkları için güvenli antibiyotiklerdir. Ayrıca makrolidlerin tedavi edici konsantrasyonların da, bakteriyostatik etkisinin yanında azda olsa bakterisit (özellikle *Streptococcus*) etki göstermektedirler (Papich ve Riviere 2001).

Bununla birlikte makrolidlerin, lökosit apoptozunda artış (Urban-Chmiel ve ark. 2017) ve proinflamatuvar madde seviyesindeki azalma gibi etkilere sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu proinflamatuvar madde seviyesindeki azalma, sitokinlerin (TNF, IL-1, IL-6 ve IL-8) üretiminin inhibe edilmesi ile meydana gelmektedir (Kwiatkowska ve Maślińska 2012). Bu antimikrobiyal olmayan etkilerinin akciğer iltihabı hastalıklarının tedavisinde yararlı olduğu bildirilmiştir (Villarino ve Martín-Jiménez 2012).

1.4.3. Direnç Mekanizması

Makrolidlere karşı direnç, hedef bölge modifikasyonu (rRNA metilasyonu), aktif efluks (pompa) ve enzimatik inaktivasyonu olmak üzere 3 farklı mekanizma ile meydana gelmektedir. Bu direnç mekanizmalarının ilki ve klinik olarak en önemli direnç mekanizması olan hedef bölge modifikasyonunda; eritromisin dirençli metilaz genleri tarafından kodlanan rRNA metilasyonu ile makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye (MSLB direnci) çapraz direnç ortaya çıkmaktadır (Chu 1999, Giguère 2013). Eritromisin dirençli metilaz genleri, hem *Gram-pozitif* hem de *Gram-negatif* bakterilerde yaygın halde bulunmakla birlikte, plazmidler veya transpozonlar üzerinde bulunabilir. Bu genlerin ekspresyonu doğal

veya kazanılma ile oluşmaktadır. Doğal direnç, metilaz enzimi doğal olarak üretildiğinde ortaya çıkmaktadır. Kazanılmış direnç ise, mikroorganizmanın makrolidlere (14 veya 15 üyeli halkalı) maruz kalması sonucu oluşan enzim indüksiyonuyla meydana gelmektedir (Giguère 2013).

Direnç mekanizmalarından ikincisi olan aktif efluks (pompa) mekanizması, antimikrobiyal maddeleri hücre veya hücre zarından dışarı pompalayarak bakteriyel ribozomların tekrar çalışmasını sağlar. Şu ana kadar, 20 farklı efluks geni olduğu kabul edilmektedir. Bu genlerin bazıları, sadece 14 ve 15 üyeli halkalı makrolidlere karşı direncin oluşmasına aracılık etmektedir. Diğer kalan genler ise tüm makrolidler ve linkozamidlere karşı farklı direnç modellerine yol açmaktadır. Bu genler, çeşitli *Gram pozitif* ve *Gram negatif* bakterilerde bulunmuştur (Giguère 2013). Son direnç mekanizmasında; makrolidin fosforilasyonu, glikozilasyonu ve lakton halkasının esterleştirilmesi ile oluşmaktadır. Örneğin; oleandomisin modifikasyonunda, iki glikozil transferaz ve bir glikozidazın rol oynadığı bulunmuştur (Chu 1999).

1.4.4. Etki Spektrumu

Makrolidler, hayvanlarda meydana gelen birçok yaygın enfeksiyonların tedavisinde kullanılan önemli antibakteriyellerdir (Pyörälä ve ark. 2014). Örneğin eritromisin; solunum yolu, gastrointestinal ve genital sistem enfeksiyonlarına ilaveten deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olan *Gram-pozitif* ve *Gram-negatif* mikroorganizmalara karşı etkindir (Jelić ve Antolović 2016). Bu makrolid grubu antibiyotik, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Pasteurella multocida*, *Brucella* ve bazı *Haemophilus* suşlarına karşı *in vitro* etkinlik göstermektedir (Emea 2000). Bir diğer makrolid grubu antibiyotik olan tilosin ise, *Gram pozitif* bakterilere karşı veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu ve Douthwaite 2002). Tilosin, eritromisine benzer etki spektrumuna sahiptir. Ancak tilosin, *Mycoplasma spp.* karşı daha geniş

etki gösterirken, *Brachyspira hyodysenteriae* haricinde diğer bakterilere karşı daha dar etki göstermektedir (Giguère 2013). Tilosinden sentezlenen yarı sentetik antibiyotik olan tilmikosin, çoğu *Streptococci*, *Staphylococcus spp*, *Actinobacillus spp*, ve *Pasteurella spp*. karşı *in vitro* etkinliğe sahiptir (Womble ve ark. 2006, Kaya 2013). Ama tilmikosin; *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, ve *Enterobacteriaceae* türlerine karşı etkili değildir (Womble ve ark. 2006). Tilmikosin, tilosine göre *Pasteurella multocida* ve *Actinobacillus pleuropneumoniae* karşı daha iyi postantibiyotik etki göstermektedir (Diarra ve ark. 1999). Makrolid antibiyotiklerden bir diğeri azitromisin, *Gram pozitif* aerobik (*Staphylococci*, *Streptococci*) ve anaerobik bakterilere karşı etkindir. Ama azitromisinin, *Staphylococci*'ye karşı etkinliği eritromisine göre daha azdır. Bu makrolid grubu antibiyotik *Haemophilus* gibi bazı *Gram negatif* bakterilere etkinken, *Pseudomonas* gibi *Gram negatif* bakterilere karşı etkin değildir. Ayrıca azitromisin, *Chlamydia* ve *Toxoplasma* gibi hücre içi organizmalara karşı etkinliği iyi olan bir ilaçtır (Papich ve Riviere 2001).

1.4.5. Farmakokinetik

Makrolidler, 6-9 (Papich ve Riviere 2001) arasında pKa değerine sahip lipofilik zayıf bazik ilaçlardır. Bu nedenle pasif difüzyon (iyonize olmamış halde) ile kolayca dokulara (kandan daha düşük pH ile) nüfuz etmektedirler (Anadón ve Reeve-Johnson 1999). Örneğin, solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan eritromisin, tilosin ve tilmikosin gibi makrolid grubu antibiyotikler, serum konsantrasyonlarına kıyasla doku konsantrasyonları (özellikle akciğerlerde) daha yüksektir (Papich ve Riviere 2001). Makrolidler dokulara iyi nüfuz ettikleri için, gamitromisin ve tildipirosin gibi antibiyotiklerin konsantrasyonları, plazmada 2 hafta ve akciğerde 3-4 hafta boyunca kalmaktadır (Pyörälä ve ark. 2014).

Makrolid grubu antibiyotikler oral olarak uygulandıklarında tam olarak emilmezler (Pyörälä ve ark. 2014). Ancak yeni nesil makrolidler eritromisine göre, daha iyi oral biyoyararlanıma sahiptirler; serum ve dokularda daha yüksek ve kalıcı seviyelerde bulunurlar. Bu durum, yeni nesil makrolidlere klinikte avantajlar sağlamıştır (Kirst ve Sides 1989). Ayrıca yarı sentetik makrolidlerin klirens oranı düşük olmasından dolayı daha uzun süreli etki göstermektedirler. Örneğin, tulatromisinin sığır ve domuzlarda yarı ömrü 4 güne yakın iken, gamitromisinin sığırlarda yarı ömrü 2 günden fazladır. En uzun yarı ömrü olan makrolid grubu antibiyotik ise sığırlarda 9 gün, domuzlarda 4 günden fazla olan tildipirosindir (Pyörälä ve ark. 2014).

Makrolidler, plazma proteinlerine bağlanma oranı düşüktür (Papich ve Riviere 2001). Örneğin tilosin, organik bir bazık olduğundan ($pK_a = 7.1$) dolayı serum proteinleri (% 40) orta derecede bağlanırlar. Bu maddenin yüksek derecede lipit çözünürlüğüne sahip olmasından dolayı vücut sıvıları ve dokularında yaygın olarak dağıldıkları düşünülmektedir (Gingerich ve ark. 1977). Bununla birlikte tilosinin sığırlarda dağılım hacmi $1.33 \pm 0.09 L/kg$ 'dır (Saurit ve ark. 2002).

Bazı 14 üyeli makrolidler, sitokrom P450'ye afinite göstermektedirler. Bu makrolidler, ilaç ile etkileşmesi sonrası, ilaç metabolizmasına bir dizi müdahalede bulunmaktadır (Zhanel ve ark. 2001). Örneğin, eritromisin metabolizması, hepatik mikrozomal enzimler yoluyla elde edilir ve eritromisin molekülünün desosamin şeker parçası üzerinde metil gruplarından birinin demetile edilmesine neden olmaktadır (Papich ve Riviere 2001). Demetilasyona uğrayan eritromisin, genellikle değişmeden veya metabolitler halinde safra ile atılmaktadır (Kaya 2013).

1.4.6. İmmünomodülatör Etki

Makrolid antibiyotikler, yirminci yüzyılın ortalarından bu yana bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Shinkai ve ark. 2005, Kwiatkowska ve

Mašlínska 2012). Bu antibiyotiklerin, antimikrobiyal etkilerinin yanında immünomodülatör özelliklerinin de olduğu ifade edilmiştir (Kovaleva ve ark. 2012). Bu immünomodülatör etkileri, kronik yangılı akciğer hastalıklarının tedavisi üzerinde olumlu yönde etki gösterdiği çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Kovaleva ve ark. 2012). Özellikle immün hücrelerde konsantre olan gamitromisin, tultatromisin, azitromisin, tilmikosin ve tildipirosin gibi makrolidler, solunum yolu hastalıkları olduğu gibi başka hastalıklarda da immünomodülatör etkiye sahip olabilirler. Bu etki; degranülasyonda artış, nötrofillerin apoptozu ve proinflamatuvar sitokinler (TNF, IL1, IL6 ve IL8) ile kemokinlerin üretiminin engellenmesi ile oluşabilmektedir (Kwiatkowska ve Mašlínska 2012, Papich 2018). Bunlara ilaveten makrofajların işlevinde meydana gelen artışla birlikte enfeksiyonların temizlenmesini daha hızlı olabilir (Papich 2018). Ayrıca makrolidler immünomodülatör özelliklerinden dolayı; bakteriyel biyofilm oluşumunu engeller, nötrofillerin doku hasarını sınırlar, mukus viskozitesini azaltma gibi birçok etki oluşturmaktadır (Bulska ve Orszulak-Michalak 2014). Örneğin; son zamanlarda yapılan çalışmalarda, tilmikosinin nötrofil apoptozunu uyardığı ve bunun sonucu güçlü immünomodülatör etkiye sahip olduğu görülmektedir (Buret 2010).

1.4.7. İlaç Etkileşimleri

Bazı makrolid antibiyotikler, karaciğerde mikrozomal enzimlerin hem kompleks oluşumu hem de inaktivasyonu ile ilaç metabolizmasını inhibe edebilmektedirler (Anadón ve Reeve-Johnson 1999). Örneğin eritromisin, genellikle ilaç metabolizmasında yer alan sitokrom P450 (CYP3A4) enzimi için bir substrat ve inhibitördür. Eritromisin CYP3A4 enziminin inhibitörü olmasından ötürü teofilin, siklosporin, varfarin, digoksin gibi ilaçların metabolizmasını inhibe edebilmektedir (Papich ve Riviere 2001). Buna ilaveten makrolidler, eşzamanlı olarak uygulanan ilaçların metabolizmalarını değiştirerek klinik ilaç etkileşimlerine neden olmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda makrolidlerin; kafein, terfenadin,

benzodiazepin triazolam, disopiramid, felodipin, fenazon, metilprednizolon, alfentanil gibi ilaçlarla etkileşime girdiği gösterilmiştir (Anadón ve Reeve-Johnson 1999).

Makrolidlerin farmakokinetik ilaç etkileşim, bağırsak florasındaki mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkilerinden ve gastrik boşalmada meydana gelen artıştan kaynaklanabilir. Bu duruma; eritromisin neden olduğu gastrik boşalmadaki artışla paralel digoksinin oral biyoyararlanımında meydana gelen artış örnek gösterilebilir (Anadón ve Reeve-Johnson 1999).

Eritromisin diğer makrolidler, linkozamidler ve kloramfenikol ile kombine kullanımlarında (*in vitro*) antagonistik etki gözlenir. Ancak makrolidler; florokinolon veya aminoglikozid antibiyotiklerle kombine kullanıldıklarında, mikroorganizmaya bağlı olarak sinerjik, antagonistik veya etkisiz olabilirler. Örneğin, *Rhodococcus equi*'ye karşı, makrolid ve rifampin kombinasyonu sinerjik etki meydana getirmektedir (Giguère 2013).

1.4.8. Yan Etkileri ve Zehirliliği

Makrolid grubu antibiyotikler, insanlarda ve hayvanlarda çok yüksek doz ve uzun süreli kullanımlarda, geçici işitme bozukluğu ve süperenfeksiyon gibi istenmeyen etkilere neden olmaktadır (Arunvikram ve ark. 2014). Ayrıca makrolid grubu antibiyotiklerin ortak problemi, intramusküler enjeksiyonundan sonra şiddetli ağrıya, intravenöz enjeksiyondan sonra tromboflebit veya periflebite ve meme içi uygulamasından sonra ise inflamatuvar bir reaksiyona neden olan tahriş edici etki meydana getirmektedirler (Giguère 2013, Pyörälä ve ark. 2014).

Eritromisinin dozuna bağlı olarak, çoğu tedavi edilen hayvanlarda ya da midede motilin reseptörüne bağlanarak düz kas üzerindeki uyarıcı etkileri sonucu

mide bulantısı, kusma, ishal, bağırsak ağrısı gibi gastrointestinal rahatsızlıklara neden olabilmektedir (Giguère 2013).

Birçok makrolid antibiyotik hayvanlar üzerinde ciddi toksik etkiler yaratmaz, ancak tilosin ve tilmikosin gibi antibiyotiklerde kardiyovasküler toksisite oluşturma eğilimindedir (Arunvikram ve ark. 2014). Bu kardiotoksisite riski, makrolidlerin farmakokinetik etkileşimleri yani sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) enzimi ve / veya P-glikoprotein taşıma sisteminin inhibisyonundan kaynaklanarak artabilmektedir (Simkó ve Lörinez 2013).

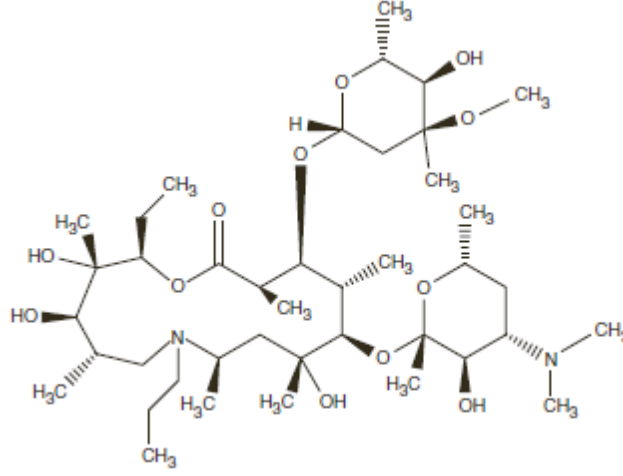
1.4.9. Gamitromisin

Gamitromisin, sığır solunum yolu hastalıkları tedavi ve önlenmesi için geliştirilen yarı-sentetik azalid grubu üyesi makrolid antibiyotiktir (Sgoifo ve ark. 2010, Lechtenberg ve ark. 2011a).

1.4.9.1. Kimyasal Yapısı

Gamitromisin, 7a pozisyonuna yerleştirilen alkilenmiş azot (N) atomuna sahip olmasıyla diğer veteriner kullanımı için onaylanan çoğu makrolidlerden ayrılan, 15-üye lakton halkalı yarı-sentetik antibiyotiktir (Giguère 2013). Yapısında 2-bazik N grubuna sahiptir. Bu temel N grupları, pKa'larının altındaki asidik bir ortamda pozitif bir yük oluşturur. Bu pozitif yük, iyon tuzağından dolayı hücre içi bölgeler için ilgiyi artırmaktadır. Gamitromisinin bu özelliğinden dolayı, hücre içi

dağılımı ve dağılım hacmi artmaktadır (Papich 2018). Kimyasal yapısı Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Gamitromisin kimyasal yapısı (Papich 2018).

1.4.9.2. Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Etkinliği

Gamitromisin diğer makrolidler gibi, ribozomal 50S alt birimine bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe ederek etkisini göstermektedir. Gamitromisin, bakteriyostatik olarak kabul edilmesine rağmen *in vitro* bakterisit özelliğine de sahip olabilmektedir (Papich 2011).

Gamitromisin, azitromisin gibi diğer azalidlere benzer bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Giguère 2013). Bu madde, *Mannheimia haemolytica* (EKEY₉₀ 1µg/ µg/mL), *Pasteurella multocida* (EKEY₉₀ 1 µg/mL), *Histophilus somni* (EKEY₉₀ 0,5 µg/mL) (Lechtenberg ve ark. 2011b, Giguère 2013), *Mycoplasma bovis* (EKEY₉₀ 4 µg/mL) (Lechtenberg ve ark. 2011a, Giguère 2013), *Streptococcus zooepidemicus* (EKEY₉₀ 0,125 µg/mL) ve *Rhodococcus equi*'ye (makrolidlere duyarlı izolatlar için EKEY₉₀ 1 µg/mL; makrolidlere dirençli izolatlar için EKEY₉₀ 128 µg/mL) karşı *in vitro* olarak aktiftir (Berghaus ve ark. 2011). Gamitromisin,

henüz diğerk bakteriyel patojenlere karşı çalışılmadığı için etkinliği bilinmemektedir (Giguère 2013). Ancak gamitromisin pozitif yüklü bir molekül olması nedeniyle, *Gram negatif* bakterilere diğerk makrolid antibiyotiklerden daha kolay nüfuz edebileceği düşünölmektedir (Papich 2011).

1.4.9.3. Farmakokinetik Özellikleri

Azalid grubu antibiyotik olan gamitromisin (6 mg/kg) sığırlara deri altı uygulamasının ardından plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alanın 9.42 ± 1.11 µg.sa/mL, atılma yarı-ömrünün 50.8 ± 3.80 saat olduğu saptanmıştır. Gamitromisin, deri altı uygulamadan sonra iyi emilir ve biyoyararlanımı %97.2-112'dir. Gamitromisin (0.1-3.0 µg/mL), plazma proteinine bağlanma oranı 26 ± 0.60 'dır (Huang ve ark. 2009).

Gamitromisin uygulamasından bir gün sonra, akciğerkdeki konsantrasyonu 18 500 ng/g olarak bulunmuştur. Ayrıca uygulamanın 6'ıncı saatindeki plazma konsantrasyonu ortalama 261 ng/mL'dir. Bu maddenin, doz uygulamasından 1, 5, 10, ve 15'inci günlerde akciğerk/plazma konsantrasyon oranı sırasıyla 265, 410, 329 ve 247' dir. Gamitromisinin farmakokinetik parametrelerine bakıldığında, yüksek biyoyararlanım, akciğerk dokusuna hızlı ve geniş dağılım ve düşük plazma proteinine bağlanma oranına sahip olmasından dolayı sığır solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve korunmasında iyi bir antimikrobiyal ilaç olduğu görölmektedir (Huang ve ark. 2009).

Gamitromisin, domuzlar üzerine intravenöz (6 mg/kg) enjeksiyon uygulaması sonrası; plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan 3.67 ± 0.75 µg.sa/mL, kararlı halde dağılım hacmi (Vss) 31.03 ± 6.68 L / kg, plazma klirensi 1.69 ± 0.33 L / sa.kg ve atılma yarı ömrü 16.03 saat olarak bulunmuştur. Domuzlara deri altı (6 mg/kg) enjeksiyon uygulaması sonrasında, hızlı ve tam emilim göstermiş olup, 0.63 ± 0.21 saatte ortalama maksimum plazma konsantrasyonu (Cmax) 0.41 ± 0.090

$\mu\text{g/mL}$ ' ye ulaşmıştır. Bu maddenin mutlak biyoyararlanımı % 118' dir (Wyns ve ark. 2014).

Gamitromisin, koyunlar üzerine deri altı (6 mg/kg) enjeksiyon uygulama sonrası farmakokinetik değerleri şunlardır: Maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}) 573 ± 168 ng /mL, plazma konsantrasyon- zaman eğrisi altında kalan alan 8.00 ± 1.41 $\mu\text{g}\cdot\text{sa} / \text{mL}$ ve ortalama yarı ömrü 34.5 ± 5.4 saattir (Kellermann ve ark. 2014). Berghaus ve ark. (2011), taylar üzerine 6 mg/kg kas içi gamitromisin enjeksiyonu sonrası ilacın farmakokinetik parametrelerini araştırmışlar ve maksimum plazma konsantrasyonun 0.33 ± 0.12 $\mu\text{g/mL}$ ve yarı-ömrün 39.1 saat olduğunu tespit etmişlerdir.

1.4.9.4 Kullanım Dozu ve Şekli

Gamitromisin sığır solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve korunması için boyun bölgesinden deri altı 6 mg/kg dozda uygulanmaktadır (Forbes ve ark. 2011, Lechtenberg ve ark. 2011b, Papich 2018). Domuz ve koyunlar için de 6 mg/kg dozda deri altı uygulanmaktadır (Kellermann ve ark. 2014, Wyns ve ark. 2014). Taylarda bronkopnömoni ile ilişkili bakteriyel ajanlara karşı, 6 mg/kg kas içi enjeksiyon olarak uygulanmaktadır (Berghaus ve ark. 2011, Hildebrand ve ark. 2015).

1.4.9.5. Yan Etkileri ve Zehirliliği

Gamitromisin sığırlarda kullanımı güvenlidir. İlacın klinik gelişim programı sırasında ciddi bir olumsuz olay kaydedilmemiştir. Bu ilaç ile tedavi edilen hayvanlarda, geçici huzursuzluk ve hafif orta dereceli enjeksiyon bölgesi şişme ve

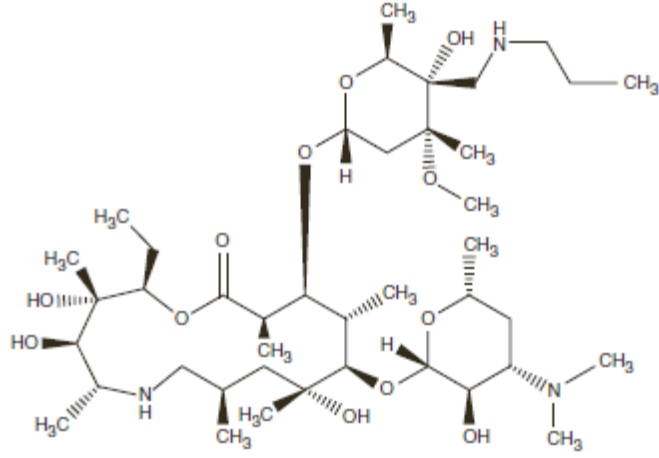
tahriş gibi yan etkiler görülebilir (Giguère 2013, Papich 2018) Ayrıca gamitromisinin diğer türlerde yan etkileri henüz değerlendirilmemiştir (Giguère 2013).

1.4.10. Tulatromisin

Tulatromisin, temel olarak sığır ve domuz solunum yolu hastalıklarının tedavisi için geliştirilmiş, yarı sentetik ve triamilid grubu üyesi makrolid antibiyotiktir (Maletić ve ark. 2015).

1.4.10.1. Kimyasal Yapısı

Tulatromisin, 13-üyelik lakton halka (%10) ve 15- üyelik lakton halka (%90) bileşiklerinin regioizomerik karışımından oluşan yarı sentetik azalid maddedir (Giguère 2013). Bu lakton halkalarından büyük olanına, 2 şeker molekülü bağlıdır. Ayrıca yapısında 3 azot/ amin fonksiyonel grubu ihtiva ettiği için triamilid grubunun ilk temsilcisidir (Villarino ve ark. 2013b). Bütün makrolid grubu bileşiklerin iyonlaşma sabitesinin negatif logaritması (pKa) 7'den daha yüksektir (Villarino ve ark. 2013a). Tulatromisinin kimyasal yapısı Şekil 1.3' de gösterilmiştir. Villarino ve ark. (2013a) tulatromisin molekülündeki bazik amino grubuna bağlı olarak pKa değeri 8.6-9.6 arasında olabileceğinden diğer makrolid grubu moleküllere göre daha bazik olduğunu bildirmişlerdir. Bu kimyasal özelliğinden dolayı, ilacın iyonize olmayan kısmının dokulara kolayca nüfuz etmesini ve asidik bölümlerde birikmesine neden olduğunu ifade etmişlerdir.



Şekil 1.3. Tulatromisinin kimyasal yapısı (Papich 2018).

1.4.10.2. Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Etkinliği

Tulatromisin, diğer makrolidler gibi ribozomal 50S alt birimine bağlanarak bakteriyel sentezini engelleyerek etki şeklini göstermekte olup (Papich 2011), tilmikosine benzer antimikrobiyal etkinliğe sahiptir (Giguère 2013). Tulatromisin, bakteriyostatik olarak kabul edilmesine rağmen *in vitro* olarak bakterisid özellikle gösterebilmektedir (Papich 2011).

Tulatromisin, pozitif yüklü bir molekül olması nedeniyle, *Gram negatif* bakterilere diğer makrolid antibiyotiklerden daha kolay nüfuz edebilir (Papich 2011). Bu molekül, *Mycoplasma bovis* (EKEY₉₀ 0.5-1 µg/mL) (Siugzdaite ve ark. 2012), *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus sommi*, *Moraxella bovis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, *Histophilus parasuis* (EKEY₉₀ 2 µg/mL) ve *Bordetella bronchiseptica* (EKEY₉₀ 8 µg/mL) gibi birçok *Gram negatif* patojenlere ve *Mycoplasma* türlerinin çoğuna karşı etkindir.

Ayrıca *Arcanobacterium pyogenes* (EKEY₉₀ 1 µg/mL) ve *Rhodococcus equi* (EKEY₉₀ >64 µg/mL) bakterilerine karşıda etkindir (Giguère 2013). Ayrıca yapılan çalışmalarda tulatromisin, bakteriyel etken dışında *Plasmodium yoelii* (Villarino ve ark. 2015), *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* ve *Theileria equi* gibi etkenlere karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Silva ve ark. 2018).

Diğer makrolid antibiyotikler gibi tulatromisin, antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Bu etki, lökositlerde meydana gelen sitokin ekspresyonu ve inflamatuvar etkinin azaltılması gibi durumlarla açıklanabilir (Papich 2011). Ayrıca tulatromisin, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak nötrofillerde apoptoza neden olmaktadır (Duquette ve ark. 2015).

1.4.10.3. Farmakokinetik Özellikleri

Tulatromisin, sığırlar üzerine intravenöz uygulama (tek doz) sonrası bazı farmakokinetik değerleri şunlardır: Dağılım yarılanma ömrü 0.166 saat, atılma yarı ömrü 48.348 saat, kararlı durumdaki dağılım hacmi 4.252 L/kg'dır. Tulatromisinin sığırlar üzerine deri altı uygulama sonrası bazı farmakokinetik değerleri; (tek doz) emilim yarılanma ömrü 0.155 saat, atılma yarı ömrü 65.874 saat, maksimum yoğunluğu 0.309 µg/mL (Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi(tmax):1.234 saat), biyoyararlanımı %71.85 olarak bulunmuştur. Sığırlar üzerine kas içi uygulama sonrası (tek doz) emilim yarılanma ömrü 0.135 saat, atılma yarı ömrü 68.929 saat, maksimum yoğunluğu 0.330 µg/mL (tmax:1.118 saat) ve biyoyararlanımı %82.8 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca plazma proteinlerine bağlanma oranı %38.86'dır (Tohamy ve ark. 2011). Domuzlarda 2.5 mg/kg dozda tulatromisinin bazı farmakokinetik değerleri şunlardır: Damar içi uygulama, kararlı durum dağılım hacmi 13.2 L/kg, yarı ömrü 67.5 saat; ve kas içi uygulama, plazmadaki maksimum yoğunluğu 616 ng/mL (tmax: 0.25 saat), biyoyararlanımı >%87 ve yarı ömrü 75.6 saattir (Benchaoui ve ark. 2004). Tulatromisin, sığır ve domuz solunum yolu

hastalıklarının tedavisinde kullanılmak için üretilmiş olmasına rağmen keçilerde de kullanılmaktadır (Young ve ark. 2011). Yapılan bir çalışmada, laktasyondaki keçilerde (2.5 mg/kg damar içi ve kas içi) tulatromisinin farmakokinetiği araştırılmıştır. Tulatromisinin damar içi uygulamasından sonra, ortalama dağılım hacminin (16.1L/kg) yüksek olduğu, süte iyi geçtiği, plazma proteinlerine bağlanma oranının %23 ve yarı ömrünün 88 saat olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada, tulatromisinin kas içi uygulamasını takiben hızlı bir şekilde emildiği, yarım saatte ortalama maksimum plazma yoğunluğuna (0.73 µg/mL) ulaştığı ve ortalama biyoyararlanımının %95.8 olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak laktasyondaki keçiler ile laktasyonda olmayan keçiler arasında bir farkın olmadığı; ve sığırlardaki tulatromisinin farmakokinetiğine benzer olduğu ifade edilmiştir (Amer ve ark. 2012)

Tulatromisin uygulama bölgesinden hızlı emilim (Wang ve ark, 2011), dokuya yaygın dağılım ve yavaş eliminasyon ile karakterize olmasından dolayı, akciğerde yüksek ve uzun süreli ilaç konsantrasyonu sağlamaktadır (Evans 2005).

1.4.10.4. Kullanım Dozu ve Şekli

Tulatromisin; sığır solunum yolu hastalıklarının tedavisinde 2.5 mg/kg, tek doz ve deri altı enjeksiyon olarak uygulanmaktadır (Kilgore ve ark. 2005, Robb ve ark. 2007). Domuzda ise; 2.5 mg/kg, tek doz ve kas içi enjeksiyon olarak uygulanmaktadır (Nutsch ve ark. 2005). Bu bilgilere ilaveten tulatromisin sığır ve domuzun boyun bölgesine uygulanmaktadır (Papich 2011). Young ve ark. (2011) göre, sığır ve domuz solunum yolu hastalıklarının tedavisi amacıyla piyasaya sürülen tulatromisin preparatlarının, keçilerde de 2.5 mg/kg, tek doz ve deri altı enjeksiyon olarak uygulanabileceğini bildirmişlerdir. Naccari ve ark. (2015) ise tulatromisinin koyun solunum yolu hastalıklarının tedavisinde, 2.5 mg/kg, tek doz ve deri altı (boyun bölgesi) enjeksiyon olarak uygulanabileceğini ifade etmişlerdir.

Ayrıca sığır enfeksiyöz keratokonjunktivitisin etkeni ile enfekte edilen buzağular üzerinde yapılan bir çalışmada, deri altı uygulanan tulatromisinin (2.5 mg/kg, tek doz) hastalığı tedavi ettiği görülmüştür (Lane ve ark. 2006).

1.4.10.5. Yan Etkileri ve Zehirliliği

Tulatromisin uygulaması sonrasında ciddi olumsuz reaksiyonlar gözlenmemiştir. Ancak bazı hayvanlarda enjeksiyon bölgesinde şişlik veya tahriş gibi reaksiyonlar görülmesi mümkündür. Tulatromisin, yüksek dozlarında (dozun beş katı) bazı hayvanlarda miyokard lezyonları olmuştur. Bununla birlikte, çoğu hayvanda etiket dozunun 10 katına kadar kullanımlarda toksisite oluşturmadığı bildirilmiştir (Papich 2011). Ayrıca Maletić ve ark. (2015); yüksek konsantrasyonlarda tulatromisinin (50 ve 100 µM), sıçan lenfositlerinde DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

1.5. Apoptoz ve Nekroz

Solunum yolu epiteli, solunum yolunun ilk bariyer ve ana savunma hattıdır (White 2011). Bu epitel doku; yaralanma ve yangılara karşı su ve mukus salgılama, solunum yoluna giren yabancı parçacıkları hapsederek ve silli hareketlerle vücuttan çıkarılmasını sağlama, yerel bölge ve dolaşıma mediyatörlerin (örneğin; sitokin, kemokinler) salgılanması ile cevap oluşturmaktadır (Tesfaigzi 2006, White 2011). Solunum yolu mukozasında meydana gelen hasarların onarılması ve korunmasının, apoptozu kontrol eden işlemlere bağlı olduğu ifade edilmiştir (White 2011).

Apoptoz, normal doku ve organ homeostazi için düzenlenmiş nekrotik olmayan (O'Brien ve Kirby 2008, White 2011) programlanmış hücre ölümü sürecidir (Schwartz ve ark. 1993). Bu programlanmış hücre ölümü; normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik ve beyin gelişimi gibi birçok biyolojik işlemde sorumlu özenle düzenlenmiş süreçtir (Martinez ve ark. 2010). Kısacası apoptoz, çekirdekli hücrelerin kromozomlarında kodlanan bir hücre intiharı işlemidir (Kam ve Ferch 2000). Bu hücre intiharı işlemi, istenmeyen hücreleri yok eden fizyolojik hücre ölümünde, doku homeostazinde, viral enfeksiyon ve mutasyona karşı savunmada önemli rol oynar (Kam ve Ferch 2000, Fuchs ve Steller 2011).

Apoptoz, fizyolojik ve patolojik olarak dört ana grup madde tarafından uyarılmaktadır. Bunlardan birinci grupta, DNA hasarına neden olan alkilleyici anti-kanser ilaçları ve iyonlaştırıcı radyasyon yer almaktadır. İkinci grupta, glukokortikoidler, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin (IL-3) gibi reseptör aracılı etmenler bulunmaktadır (Kam ve Ferch 2000). Diğer grupta, fosfataz ve kinaz inhibitörleri (staurosporin vb.) gibi apoptotik yolağın bileşenleri yönünde artış yapan biyokimyasal maddeler bulunmaktadır. Apoptozu uyaran en son grupta ise; ısı, ultraviyole ışık ve oksitleyici maddeler gibi doğrudan hücre zarı hasarına neden olan ajanlar yer almaktadır (McConkey 1998, Kam ve Ferch 2000).

Apoptoz sırasında hücrede bazı morfolojik değişiklikler meydana gelir. İlk olarak; endoplazmik retikulum dilatasyonu ve plazma membranının kıvrılması ile birlikte hücre hacminde belirgin küçülme görülür (Trump ve ark. 1997, Chatterjea ve Shinde 2012). Bu küçülmeye birlikte hücre yoğunluğu artar (Trump ve ark. 1997, Cruchten ve Broeck 2002, Chatterjea ve Shinde 2012). Daha sonra hücreler, yapısal olarak normal fakat mitokondri gibi yoğunlaşmış sıkı organeller içeren, zara bağlı küresel gövdelere ayrılır (Elmore 2007, Chatterjea ve Shinde 2012). Çekirdek nükleer çevre etrafındaki belirgin şekilde kromatin yoğunlaşması meydana gelir. Kromatin yoğunlaşmasının sonucu piknozdur ve apoptozun en karakteristik özelliğidir (Elmore 2007, Chatterjea ve Shinde 2012). Son olarak da, çekirdek parçalanabilir (Karyoreksis). Genellikle tomurcuklanma olarak adlandırılan hücre zarı yüzeyindeki çıkıntılar oluşur ve bunlarda hücre parçaları içeren apoptotik

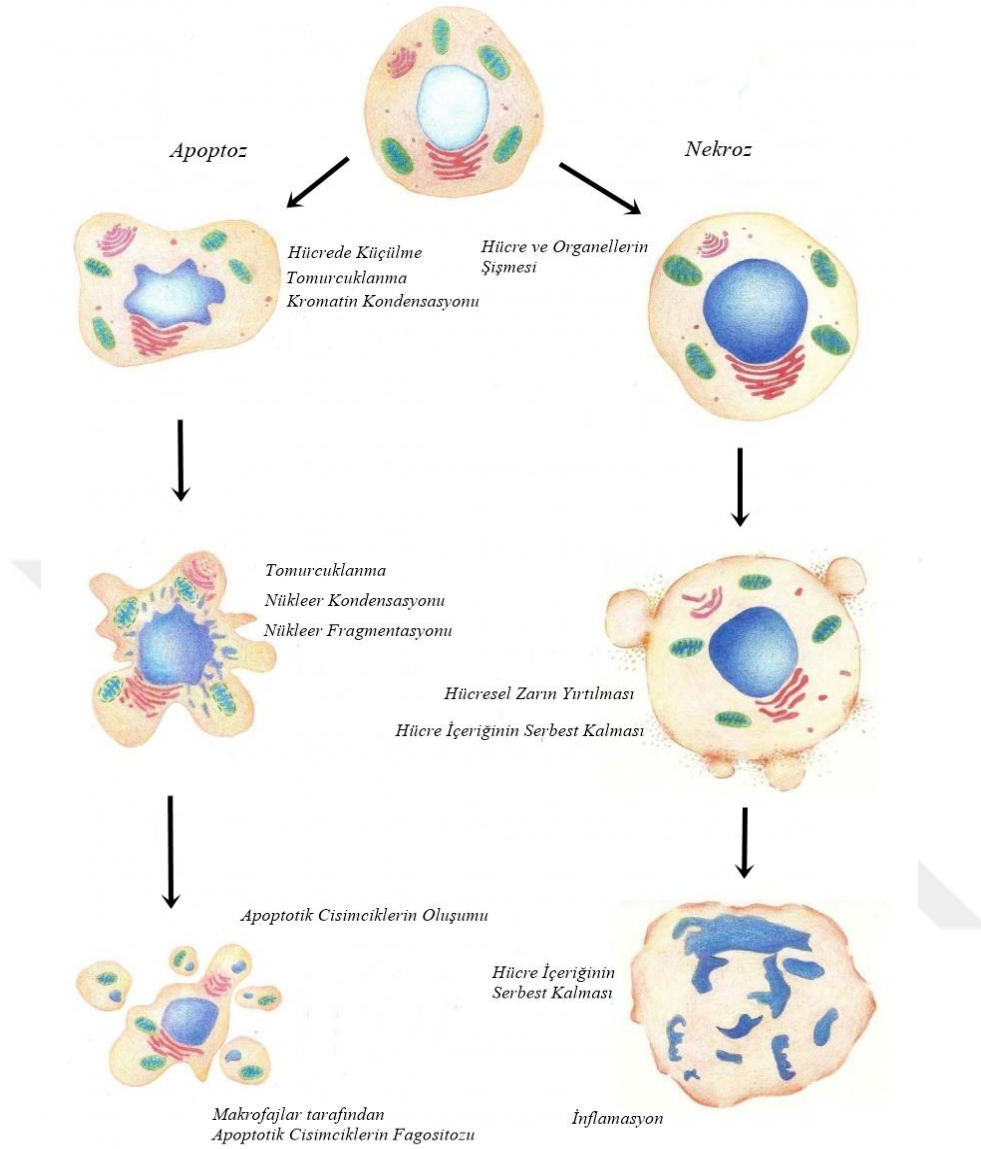
cisimcikler meydana getirir. Bu apoptotik cisimcikler; makrofajlar veya komşu hücreler (epitel hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlar) tarafından fagosite edilebilecek şekilde, çekirdeğin bir parçası olan veya olmayan ve sıkı şekilde paketlenmiş organellere sahip sitoplazmadan oluşur (Manjo ve Joris 1995, Elmore 2007, Elliott ve Ravichandran 2010).

Apoptozun aksine nekroz; çevresel bozulmalar sonucu inflamatuvar hücresel içeriğin serbest kalması ile karakterize pasif ve kontrolsüz hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Patoloğlara göre nekroz, ölüm öncesi süreçten bağımsız olarak hücrelerin ölümünden sonra meydana gelen değişiklikleri; ölü doku ve hücre varlığını belirlemek için kullanılan bir terimdir (Fink ve Cookson 2005). Nekroz sonucu ölen hücrelerin morfolojisine bakıldığında oldukça çeşitli olduğu görülmektedir. Bu hücrelerde, ölüm sürecinin ilk sıralarında hücre zarı geçirgen olmaktadır. Hücrelerde meydana gelen geçirgenlikle, organeller şişebilir ve ribozomlar endoplazmik retikulumdan ayrılabilirler (Ziegler ve Groscurth 2004). Daha sonra hücre hacminde artışla birlikte hücre zarı yırtılır ve şişmiş organeller düzensiz bir şekilde boşalır (Galluzzi ve ark. 2007). Ayrıca hücre zarının parçalanması ile hücresel içerik ve pro- inflamatuvar moleküller salınır ve ölen hücrenin çevresinde yangı oluşmasına neden olur (Edinger ve Thompson 2004).

Hücre ölümlerinin karakteristik morfolojik yönleri şunlardır: apoptotik hücre ölümlerinde; hücrenin yuvarlaklaşması, hücresel ve çekirdek hacminin azalması (piknoz), çekirdek parçalanması (karyoreksis), sitoplazmik organellerde küçük değişiklikler, hücre zarı yüzeyinde çıkıntı oluşurken, nekrotik hücre ölümlerinde sitoplazmik şişme, sitoplazmik organellerin şişmesi, orta düzeyde kromatin yoğunlaşması ve hücre zarının yırtılmasıdır (Kerr ve ark. 1972, Zeiss 2003, Galluzzi ve ark. 2007, Doonan ve Cotter 2008). Bu karakteristik özelliklerinin yanında apoptoz ve nekroz arasında bazı farklılıklarda vardır. Örneğin; apoptoz fizyolojik ve patolojik durumlarda meydana gelirken, nekroz ise sadece patolojik durumlarda meydana gelmektedir. Ayrıca apoptoz, eş zamanlı olmayan ve bir hücrede oluşurken, nekroz de birden çok hücrede ve eş zamanlı olarak oluşur (Kam ve Ferch 2000). Bu bilgilere ilaveten apoptozun morfolojisinde, internükleozomal DNA parçalanması

görülmektedir (Garcia-Martinez ve ark. 1993, Bortner ve ark. 1995). Apoptoz ve nekrozun şematik karşılaştırılması Şekil 1.4'de gösterilmiştir.

Örneğin, sığır bakteriyel pnömonisinin tedavisinde kullanılan ve makrolid grubu antibiyotik olan tilmikosin, nötrofiller üzerinde apoptotik etki oluşturduğu bulunmuştur (Chin ve ark. 2000). Ayrıca kan modellerinde eritromisin ve azitromisin proapoptotik etkisi olduğu belirlenmiştir (Čulić ve ark. 2001). Fischer ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada, tulatromisine bağlı *in vitro* ve *in vivo* (*Mannheimia haemolytica* ile enfekte olmuş buzağı) olarak meydana gelen apoptotik nötrofilleri makrofajlar tarafından fagosite edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, tulatromisinin dozuna bağlı olarak *in vitro* sığır makrofajlarında apoptozu teşvik ederken, nekrozu teşvik etmediğini eklemiştir. Yapılan bir başka çalışmada, tulatromisin, zaman ve konsantrasyona bağlı olarak nötrofillerde apoptozu neden olduğu ve bunu takiben makrofajlar tarafından temizlenmesinde artış olduğu bildirilmiştir (Fischer ve ark. 2014).



Şekil 1.4. Apoptoz ve nekrozun şematik karşılaştırılması (Monterio ve ark. 2015).

1.6. Sitotoksisite

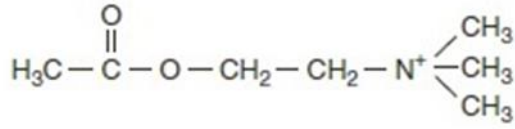
İn vitro çalışmaları, biyolojik olarak değerlendirmek için kullanılan en önemli göstergelerden biri sitotoksisitedir (Aslantürk 2018). Genel olarak sitotoksisite, bir bileşiğin (madde) hücre ölümüne sebep olan potansiyelidir (Eisenbrand ve ark.

2002). Sitotoksitesite testi, ilaç taraması ve kimyasalların sitotoksitesini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç gibi kimyasal maddeler; hücre zarlarının tahrip edilmesi, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla hücreler üzerinde toksisiteye sebep olabilmektedir (Aslantürk 2018). Gao ve ark. (2007) makrolid grubu antibiyotik olan roksitromisin; *in vitro* olarak sülfür mustarda maruz kalan insan küçük solunum yolu epitel, trakea ve bronş epitel hücreleri üzerine antisitotoksik ve anti inflamatuvar etkilerini araştırmışlar ve roksitromisin, insan küçük solunum yolu epitel, trakea ve bronş epitel hücrelerinde sülfür hardalı sitotoksitesini azalttığını bildirmişlerdir.

1.7. Asetilkolin

Asetilkolin; klinik olarak kullanılmayan (Adams 2001), ancak kolinomimetik ilaçların farmakolojik etkilerini anlamak için kullanılan prototip kolinerjik agonisttir. Asetilkolinin ilaç olarak kullanılmamasının iki temel sebebi bulunmaktadır. Bunlardan ilki; etkilediği muskarinik ve nikotinik reseptörlerin çok sayıda dokuda bulunmasından dolayı, etkisinin seçici olmamasıdır. İkincisi ise, asetilkolinesteraz tarafından hızla etkisizleştirilmesinden dolayı kısa süreli etki göstermesidir (Mcmurphy ve ark. 2018).

Kolin esteri olan asetilkolin; üç metil grubunun bağlı olduğu bir kuarterner azot atomu içerir. Asetilkolin; yapısında yer alan kuarterner azot atomu sayesinde, kolinerjik reseptörler üzerine doğrudan etki göstermektedir. Bu kuarterner azot grubu, pozitif bir yük (katyonik) taşır ve kolinerjik reseptörün negatif yüklü (anyonik) bir bölgesine bağlanır. Asetilkolini tanıyan ve bağlanan makromoleküller, anyonik bölgenin yanında asetilkolinin ester bileşeni ile birleşen bir alana da sahiptir (Mcmurphy ve ark. 2018). Asetilkolinin kimyasal yapısı Şekil 1.5’de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Asetilkolin kimyasal yapısı (McMurphy ve ark. 2018).

Asetilkolin; hem nikotinic hem de muskarinic reseptörleri aktive eder (McMurphy ve ark. 2018). Asetilkolin, solunum yolu (Pirinççi 2014), bağırsak (Mitsui-Saito ve Karaki 1996), idrar kesesi (Han ve ark. 2019) ve uterus düz kaslarını uyarak kasılmalarına sebebiyet verir (McMurphy ve ark. 2018). Bunlara ilaveten, mide-bağırsak hareketi ve salgısını artırır (Adams 2001).

Asetilkolin ve esterleri; konsantrasyonlarına bağlı olarak sığır trakeasının kasılmasına neden olmaktadır (Kaneda ve ark. 2018). Bergner ve Sanderson (2002); asetilkolin (10-500 nM) solunum yolu düz kası hücre içi kalsiyum (Ca⁺²) miktarında geçici artış meydana geldiği ve bu artışla birlikte solunum yolu lümeninde bir kasılma görüldüğünü bildirmişlerdir. Jones ve ark. (1993); asetilkolinin trakea düz kasında sitozolik Ca⁺² konsantrasyonunda geçici bir artışa, sarkoplazmik retikulumdan salıverilen Ca⁺² düzeyinde artışa neden olduğunu, ama bu artışın zamanla azaldığını ifade etmişlerdir.

1.8. Potasyum Klorür

Solunum yolu düz kas hücresinin kasılması; yüksek oranda hücre dışı K⁺ (KCl) veya diğer agonistler tarafından hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunda bir artışla başlamaktadır (Wang ve ark. 2010).

Potasyum klorürün (KCl) solunum yolu düz kasında meydana getirdiği kasılma, gerilime bağlı Ca⁺² kanallarından Ca⁺² girişi, Ca⁺² bağlı miyozin hafif zincir

(MLC) kinazın aktivasyonu ve MLC fosforilasyonunda artışa bağlı olduğuna inanılmaktadır (Ratz ve ark. 2005, Sommer ve ark. 2014).

Cattali ve Janssen (2004), astım ve kistik fibroz gibi hastalıklarla karakterize olan ve oksidatif dönemlerde üretilen izoprostanların, sığır trakea düz kasındaki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, 8-izoprostaglandin E₂'nin en yüksek dozlarda bile KCl'nin meydana getirdiği kasılmanın bir kısmı kadar uyarı meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Tang ve ark. (1992), sığır trakeal düz kasında Ca⁺² bağımlı miyozin hafif zincir fosforilasyonunun düzenlenmesindeki hücresel mekanizmalarını araştırmışlardır. KCl konsantrasyonunda artışla, depolarizasyon durumunda hücre içi Ca⁺² yoğunluğu, hafif zincir fosforilasyonu ve kuvvetinde orantılı artışlara yol açtığını bildirmişlerdir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Makrolid grubu antibiyotikler veteriner hekimlikte birçok sistemik hastalığın sağaltımında kullanılmaktadır. Özellikle solunum yolu hastalıklarının tedavisinde ve penisilin grubu antibiyotiklere karşı gelişen alerji olgularında penisiline alternatif olarak tercih edilen antibiyotiklerdir. Bu maddelerin, serum konsantrasyonlarına kıyasla doku konsantrasyonlarının yüksek olması, yarı-ömürlerinin uzun olması ve hücre içine girebilme gibi özelliklerinden dolayı birçok hastalığın tedavisi ve korunmasında avantaj sağlamaktadır. Özellikle besi sığır yetiştiriciliğinde, farklı antibiyotikler ile tedavi edilemeyen solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde ve korunmasında gamitromisin veya tulatromisin antibiyotikleri tercih edilmektedir. Ülkemizde yaygın olarak kullanılan ve sığır için özelleşmiş olan bu ilaçların solunum yolundaki etkilerinin değerlendirilmesi bu açıdan önemlidir. Antibiyotiklerin sadece antibakteriyel etkilerini değerlendirmek, bu ilaçların kullanım sahasında olumlu veya olumsuz etkilerini tam olarak ortaya çıkarmayabilir. Nitekim antibiyotiklerin,

biyolojik sistemlerde birçok olumlu veya olumsuz etkileri bulunmaktadır. Ayrıca bu antibiyotiklerin; hücre içine girme ve birikme kabiliyetlerinin yüksek olmasından dolayı; hücreler üzerine apoptotik, nekrotik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi gerekir.

Yapılan literatür taramalarda gamitromisin ve tultatromisinin sığır trakea kası üzerinde *in vitro* izole organ banyosunda etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca bazı hücrelerde apoptoz üzerine çalışmalar bulunsa da, gamitromisin ve tultatromisinin sığır trakea epitel hücrelerinde apoptoz, nekroz ve sitotoksik etkiyi araştıran bir çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle bu çalışma tultatromisin ve gamitromisinin *in vitro* sığır trakeası düz kası üzerine ve sığır trakea epitel hücreleri üzerine apoptoz, nekroz, sitotoksik ve hücre proliferatif yapıcı etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Böylece hedef hayvan olan sığırdaki yapılacak çalışma ile veteriner sahaya ve literatür bilgiye destek sağlanacaktır. Bu bilgilere ilaveten bu çalışma; ülkemizde ölümcül solunum yolu hastalıklarının tedavisinde yaygın kullanılan gamitromisin ve tultatromisin antibiyotikler arasında da solunum yolundaki etkilerini değerlendirme olanağı sağlayacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada hayvan materyali olarak mezbahannede kesilen 12-36 aylık, erkek Simental ırkı sığırlardan elde edilen trakeaların üst 1/3'lük kısımları kullanıldı. Deneysel çalışmalara başlanılmadan önce Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, deneyde kullanılacak mezbahane materyalleri hakkında etik kurulu kararı gerekli olup olmadığı hakkında görüş alındı (Karar tarih ve sayısı: 24/07/2017 - E.6718). İzole organ sistemi deneyleri Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nın farmakoloji laboratuvarında yürütüldü. Hücre kültürü deneyi ise, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin hücre kültürü laboratuvarında çalışıldı. Çalışmanın izole organ deneyleri bölümünde 32 erkek Simental ırkı sığırlardan alınan 84 trakea kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarında ise değişik zamanlarda 4 adet simental erkek sığır trakeasından alınan epitel dokulardan primer hücreler üretildi.

2.2. Kullanılan Deney Cihazları

İzole organ banyosu

Dörtlü kanal veri toplama sistemi (Biopac Systems Inc. MP35- U.S.A.)

İzole organ banyosu standı (May IOBS99- Türkiye)

Isıtıcı sirkülatör cihazı (May WBC3044-PR- Türkiye)

İzometrik gerim sistemi (May FDT05- Türkiye)

%95 O₂, %5 CO₂ içeren gaz karışımı tüp

Hassas terazi (Precisa XB220A- İsviçre)

Distile su cihazı (Tetra zeneer RO 180- Kore)

Otoklav poşetleme cihazı (Euroseal 2001 plus- İtalya)

Otoklav (Nüve OT 23B- Türkiye)

Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İldam, Türkiye)

İnverted mikroskop (Leica DM6000B, Almanya),

Soğutmalı santrifüj (Rotina 380R Hettich, Almanya)

Elisa plate okuyucu (Biotek, USA)

Hemositometri (İnvitrogen-Countess, USA)

Karbondiyoksitli etüv (Binder CB150, Almanya)

Vortex (Heidolph- Reax top, Almanya)

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Xcelligence RTCA) (Roche, Almanya)

Floresan Ataçmanlı Araştırma Mikroskobu (Leica, Almanya)

Mikropipet (20 µm, 100 µm, 1000 µm) (Corning, USA)

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Tulatromisin (Sigma-Aldrich SLM2107, Almanya)

Gamitromisin (Sigma-Aldrich 32161- Almanya)

Dimetil Sülfoksit (DMSO) (İsolab, Almanya)

Asetilkolin (Sigma A 6625, Almanya)

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail)

Fötal sığır serumu (FBS) (Biological industries, İsrail)

Penisilin-streptomisin (Biological Industries, İsrail)

Tripsin-EDTA (Biological Industries, İsrail)

Tripan mavisi (İnvitrogen, ABD)

Propodium iyot (Serva, İsrail)

Hoechst 33342 (Serva, İsrail)

Ribonukleaz- A (Serva, İsrail)

48 Kuyucuklu plate (Corning, ABD)

96 Kuyucuklu plate (Corning, ABD)

E-plate (Roche, Almanya)

25 cm²'lik hücre kültür flaskı (Corning, ABD)

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Sigma, Almanya)

Serum fizyolojik (Polifarma, Türkiye)

İzopropanol (Sigma, ABD)

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Ambresco-Life Science, ABD)

Otomatik pipetler (Eppendorf- Almanya)

Tek kullanımlık steril pipet (2 mL, 5 mL, 10 mL) (Corning, ABD)

Steril Santrifüj Tüpü (Corning, ABD)

Sodyum Klorür (Merck, Almanya)

Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya)

Glukoz (Merck, Almanya)

Potasyum Klorür (Merck, Almanya)

Kalsiyum Klorür (Merck, Almanya)

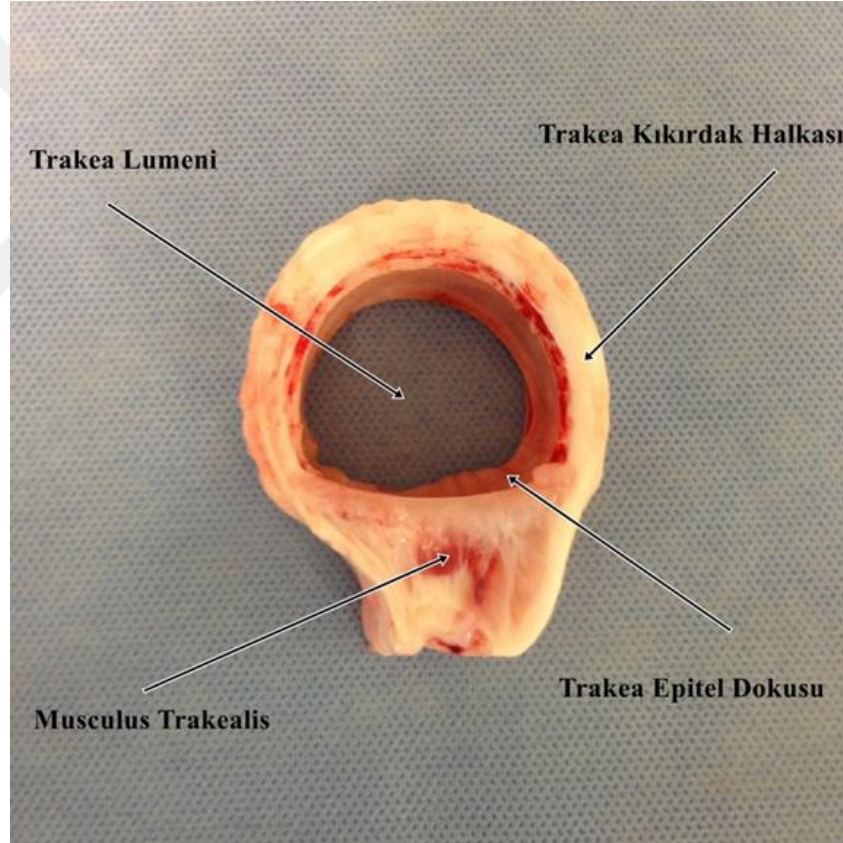
Magnezyum Klorür (Merck, Almanya)

2.4. İzole Organ Sistemi Deneyleri

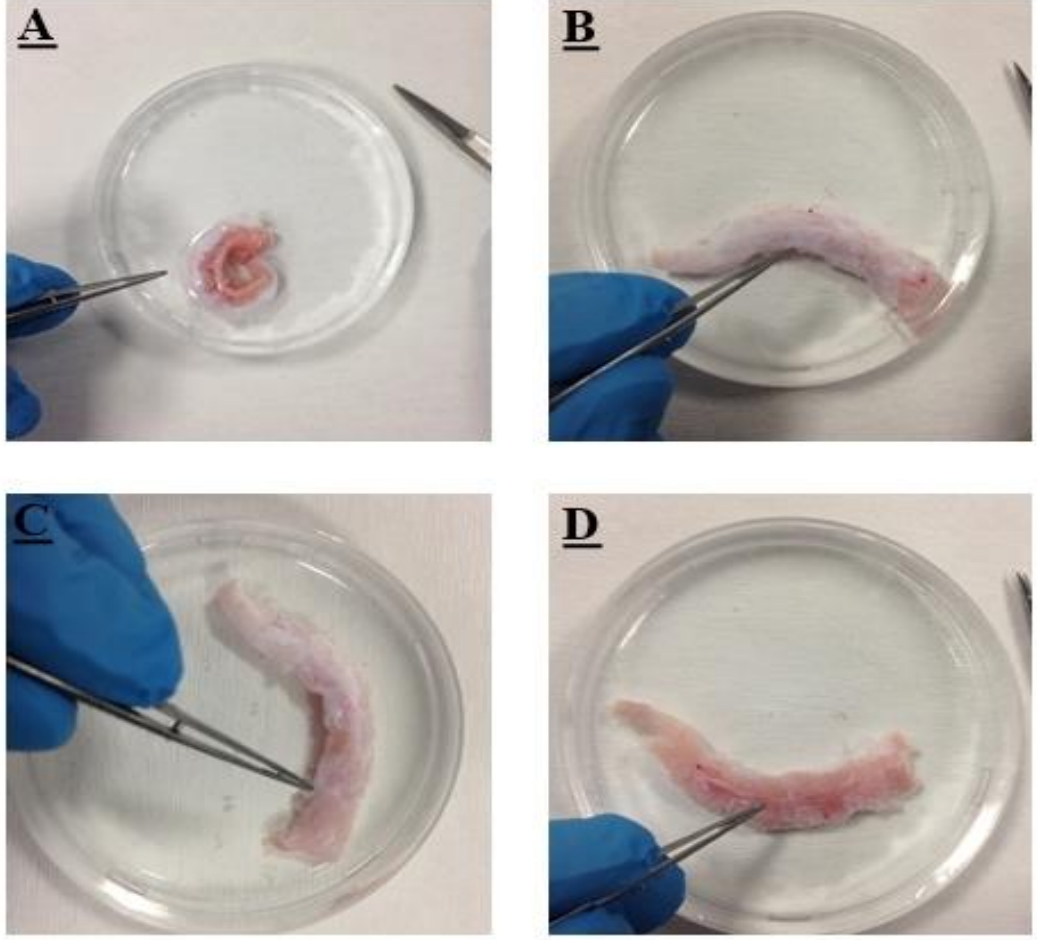
2.4.1. Sığır Trakeasının İzolasyonu

Kırıkkale ilinde, yerel bir mezbahannede kesilen 12- 36 aylık Simental ırkı erkek sığır trakea örnekleri, önceden hazırlanmış olan modifiye Krebs çözeltisi [136.8 mM Sodyum Klorür (NaCl), 5.4 mM potasyum klorür (KCl), 1.5 mM kalsiyum klorür (CaCl₂), 1.0 mM magnezyum klorür (MgCl₂), 11.9 mM sodyum bikarbonat (NaHCO₃), 5.5 mM glukoz, pH 7.2] içeren beherlere konuldu. Bu beherler, polistiren kutuda buz kasetleri ile birlikte soğuk zincirde Kırıkkale

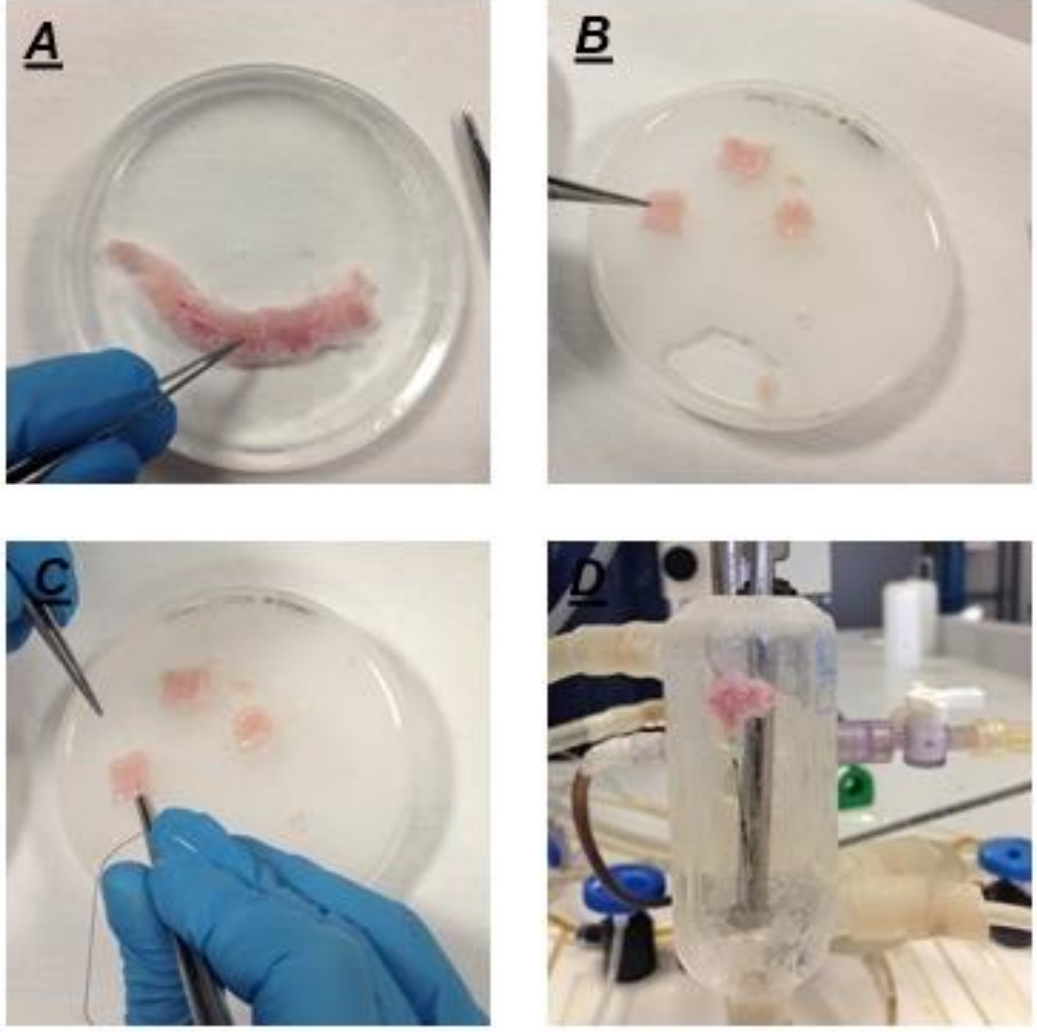
Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nın farmakoloji laboratuvarına taşındı. Sığır trakea kesitinin görüntüsü Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Trakea düz kası, steril penset ve makas yardımıyla kıkırdak, bağ ve epitel dokularından temizlenerek modifiye Krebs çözeltisi içeren petri kutusuna alındı. Trakea düz kasının çevre dokudan arındırılması Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Çevre dokulardan arındırılmış olan trakea düz kası, yaklaşık 2 mm genişliği ve 7 mm uzunluğunda olacak şekilde izole edildi ve iki ucuna kancalar geçirildi. İzole edilen trakea düz kas kesiti 10 mL modifiye Krebs çözeltisi (37°C) içeren izole organ banyosuna 3 g'lık ön gerim uygulanarak asıldı. Bu aşamalar Şekil 2.3'de gösterildi. Deney sırasında dokulara; % 95 O ve % 5 CO₂ gaz karışımı uygulandı (Kaneda ve ark. 2005).



Şekil 2.1. Sığır trakea görüntüsü



Şekil 2.2. Trakea düz kasının çevre dokulardan temizlenmesi
A) Çevre dokudan arındırılmamış trakea düz kası. B) Bağ dokusu. C) Bağ dokudan arındırılmış trakea düz kası. D) Epitel dokudan arındırılmış trakea düz kası



Şekil 2.3. Çevre dokulardan arındırılmış trakea düz kasının izole organ banyosu öncesi hazırlanması ve izole organ banyosuna asılması A) Çevre dokudan arındırılmış trakea düz kası. B) Çevre dokudan arındırılmış trakea düz kası kesiti. C) Trakea düz kası kesitinin bir ucuna kancanın geçirilmesi. D) Trakea düz kası kesitinin izole organ banyosundaki asılmış hali.

2.4.2. Deney Protokolleri

Sığır trakea dokusu izole edildikten sonra içinde 10 mL modifiye Krebs çözeltisi bulunan izole organ banyosunda izometrik gerim ileticisine bağlandı ve 3 g ön gerilim verildi. Kırk beş dakikalık dengelenme periyodunun ardından deney protokolüne geçildi. Dengeleme süresi boyunca dokular 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile yıkandı. Ardından aşağıdaki beş protokol uygulandı.

2.4.2.1. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Tek Başına Araştırılması

Birinci protokolde, 45 dakika dengeleme sonrasında ACh ile canlılık bakıldı. 15 dakika ara ile 3 kez yıkanan dokular normal platoya gelince kümülatif gamitromisin ve tulatromisin (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} M) derişimleri uygulandı. Aynı dokulara (Yıkama ve dengeleme sonrası) DMSO (sulandırılmaları) uygulandı.

2.4.2.2. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması

İkinci protokolde, 45 dakika dengeleme sonrasında ACh ile canlılık bakıldı. 15 dakika ara ile 3 kez yıkanan dokular normal platoya gelince kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) denendi, 3 kez 15 dakika ara ile yıkanan dokular 20 dakika 3×10^{-5} M gamitromisin ile inkübe edildi ve kümülatif ACh derişimleri uygulandı. Daha sonra

aynı dokular, 15 dakika ara ile 3 kez yıkandı ve dengelenme sonrası üzerinde 20 dakika DMSO ile inkübe edilip ACh derişimleri uygulandı. Aynı uygulama asılan diğer dokuda 20 dakika boyunca 3×10^{-5} M tultatromisin ile de yapıldı; daha sonra yıkanma ve dengelenme sonrası aynı doku üzerinde DMSO ile inkübe edilip ACh derişimleri uygulandı.

2.4.2.3. Potasyum Klorür ile Ön Kasılma Oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tultatromisinin Etkilerinin Araştırılması

Üçüncü protokolde, 45 dakika dengeleme sonrasında ACh ile canlılık bakıldı. On beş dakika ara ile 3 kez yıkanan dokular normal platoya gelince, 65mM KCl (Kaneda ve ark. 2018) ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturuldu. Üzerine kümülatif gamitromisin (10^{-10} - 10^{-5} M), DMSO (sulandırmaları) ve tultatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) uygulandı. Her farklı madde için ayrı bir trakea düz kası kullanıldı.

2.4.2.4. Asetilkolin EC₈₅ Değeri ile Ön Kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tultatromisinin Etkilerinin araştırılması

Dördüncü protokolde ön kasılma yapılan dokularda gamitromisin, tultatromisin ve DMSO'nun etkisini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Kırk beş dakika dengeleme sonrasında ACh ile canlılık bakıldı. On beş dakika ara ile 3 kez yıkanan dokular normal platoya gelince, 2.3×10^{-4} M ACh (GraphPad Prism Software ver. 6 programı ile daha önceden elde edilen ACh derişim yanıt eğrilerinden, ACh'ın EC₈₅ değeri elde edildi, n:12) derişimi uygulanarak ön kasılma oluşturuldu. Üzerine kümülatif gamitromisin ve tultatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) uygulandı. Aynı dokuda DMSO (sulandırmaları) uygulandı

2.4.2.5. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine 10^{-6} M Gamitromisin Etkisinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması

Dördüncü deneyin sonucunda gamitromisin 10^{-7} ve 10^{-6} M derişimlerinde görülen gevşeme yanıtları istatistiki olarak anlamlı bulununca bu protokolün yapılması kararı verilmiştir. On beş dakika ara ile 3 kez yıkanan dokular normal platoya gelince kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) denendi, 3 kez 15 dakika ara ile yıkanan dokular 20 dakika 10^{-6} M gamitromisin ile inkübe edildi ve kümülatif ACh derişimleri uygulandı. Daha sonra aynı dokular, 15 dakika ara ile 3 kez yıkandı ve dengelenme sonrası üzerinde 20 dakika DMSO sulandırması ile inkübe edilip ACh derişimleri uygulandı.

2.4.3. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Dokularda oluşan; kasılma ve gevşemeler veya gerimde meydana gelen değişiklikler izometrik gerim ileticisi (Biopac Systems Mp 35, Commat, Türkiye) ile ölçüldü ve her bir protokol kendi içinde ayrı ayrı değerlendirildi. Birinci protokole göre elde edilen verileri, bazal çizgi 100 kabul edilerek % (yüzde) kasılmalarına göre hesaplandı ve değerlendirildi. İkinci ve beşinci deneyde tüm derişimlerin bazal çizgiye göre % (yüzde) kasılmaları hesaplandı ve elde edilen bu verilerden ACh kasılmalarının pD_2 ve E_{max} değerleri GraphPad Prism (Software ver. 6) Programı ile belirlendi. Daha sonra pD_2 ve E_{max} değerlerinin karşılaştırılması yapıldı. pD_2 değeri yarı en yüksek değer için gerek duyulan maddenin derişiminin negatif logaritması; E_{max} ise, ilaç tarafından oluşturulan maksimum etkinliğin % (yüzde) şeklinde ifadesi olarak tanımlandı. Üçüncü deneyde ise KCl ile ön kasılma oluşturulan dokuların ulaştığı maksimum kasılma % 100 olarak kabul edildi. Ardından oluşan gevşeme

yanıtları bu değer 100 kabul edilerek hesaplandı. Dördüncü protokolde; ilk olarak ACh'ın EC₈₅ derişimi belirlendi. Bu derişim ile dokularda ön kasılma oluşturuldu. Dokularda kasılma sonucu elde edilen maksimum kasılma % 100 olarak kabul edildi. Madde uygulaması sonrası dokularda meydana gelen gevşeme yanıtları bu değer 100 kabul edilerek hesaplandı.

2.5. Hücre Kültürü Deneyleri

2.5.1. Hücre Kültürü İzolasyonu

Yerel bir mezbahannede kesilen 12- 36 aylık Simental ırkı erkek sığırlardan steril pens ve makas ile çıkartılan trakea epitel doku örnekleri, önce %1-2 batikon-serum fizyolojik solüsyonuna batırıldı, sonra serum fizyolojik içine batırıldı, ardından taşıma solüsyonu (%99 DMEM-F2, %1 penisilin-streptomisin) bulunan falkon tüpe aktarıldı. Bu falkon tüp, polistiren kutuda buz kasetleri (0 °C) ile birlikte Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin hücre kültürü laboratuvarına taşındı. Trakea epitel doku örnekleri; laminar akışlı kabinde antibiyotikli PBS ile yıkandıktan sonra, petrilere yerleştirilip steril pens ve bistüri ile bağ dokusu parçalarından arındırıldı ve steril petri kutularına yerleştirildi. Trakea epitel dokusundan; epitel hücrelerini izole etmek için örnekler steril bistüri ile mekanik olarak kazındı ve çok küçük parçalara bölündü. Daha sonra bu parçalar; 25 cm²'lik kültür flasklarına koyuldu ve üzerine 3 mL besiyeri (%79 DMEM-F2, %20 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin) ilave edilip etüvide (%5 CO₂/hava, 37°C ve >%90 nem) inkübe edildi. Trakea epitel hücrelerinin çoğalmasına bağlı olarak 48 saatte bir besiyeri (%89 DMEM-F2, %10 fetal sığır

serumu, %1 penisilin-streptomisin) değiştirildi (Beckmann ve ark. 1991, Krm ve ark. 2019).

2.5.2. Hücre Sayımı

Trakea epitel hücrelerinin bulunduğu kültür flaskı; etüvden alındı ve steril laminar kabinde, içerisindeki vasat dökülüp 1 mL PBS ile yıkandı. Daha sonra bu flask, içine 0.5 mL tripsin-EDTA ilave edilip etüvde 3-4 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda trakea epitel hücrelerinin, kültür flaskı yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları mikroskopik olarak izlendi. Mikroskopik olarak hücrelerin ayrıldıkları gözlendikten sonra, kültür flaskına besiyeri eklenip, hücreler falkon tüpe aktarıldı. Bu falkon tüpler, 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında falkon tüpün içindeki vasat atılıp, tüpün dibinde kalan hücre peleti üzerine 1 mL besiyeri eklendi. Bu falkon tüp içinde bulunan hücre peleti ve besiyeri süspanse edildikten sonra, bu karışımdan 10 µL alıp eppendorf tüpe koyuldu. Bu eppendorf tüpe 10 µL tripan mavisini eklenip homojenize edildi. Eppendorf tp içindeki karışımdan 10 µL alınıp hemositometri lamına koyuldu. Bu lam, hemositometri cihazına yerleştirilip hücre sayımı yapıldı.

2.5.3. Sitotoksisite Testi (MTT)

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), hücre canlılığını metabolik aktivite olmlerinin elde edilmesini dayanır. Bu sitotoksisite deneyi, canlı hücrede mavi-mor renkte görünüp, alkolde çözünen formazana indirgenir. Bu formazanın alkolde çözünüp, renk yoğunluğu fotometrik olmlerle

belirlenir. Fotometrik ölçüm sonucu elde edilen renk yoğunluğuna bağlı olarak hücre sayısı hesaplanır.

Bu sitotoksisite deneyi için 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Sığır trakea epitel hücreleri; sayımı yapıldıktan sonra, her kuyucukta 10×10^3 hücre (100 μ L) olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'e ekildi. Hücreler, etüvde (%5 CO₂/hava, 37°C ve >%90 nem) 24 saat inkübe edildi. Bu 24 saatlik inkübasyon sonunda, 96 kuyucuklu platede bulunan hücre vasatları atıldı. Daha önceden hazırlanmış olan 2 mg/mL'lik (%0.5 DMSO, %99.5 besiyeri) etken madde stoklarının (2 μ g/mL - 300 μ g/mL arası) farklı konsantrasyonları üç tekrarlı olacak şekilde hücreler üzerine uygulandı. Kontrol grubu olarak; hücreler üzerine %0.5 DMSO besiyeri karışımı eklendi. Hücreler tekrar 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 96 kuyucuklu platede bulunan hücre vasatları atılıp, kuyucuklara 50 μ L MTT (1 mg MTT kit ürünü 1 mL Fenol Red'siz besiyerinde çözdürüldü) çözeltisi eklendi. Hücreler, etüvde (%5 CO₂/hava, 37°C ve >%90 nem) 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 96 kuyucuklu platede bulunan hücre vasatları atılıp, 100 μ L izopropanol eklendi. 96 kuyucuklu plate yavaş çalkalanıp, Elisa cihazında 570 nm dalga boyunda okutuldu. Sitotoksisite testi yöntemi, ISO 10993-5 no'lu protokolüne göre uygun olarak yürütüldü.

2.5.4. İkili Boyama Metodu ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

Sığır trakea epitel hücreleri; sayımı yapıldıktan sonra, her kuyucukta 10×10^3 hücre olacak şekilde 48 kuyucuklu plate'e ekildi. Hücreler, etüvde (%5 CO₂/hava, 37°C ve >%90 nem) 24 saat inkübe edildi. Bu 24 saatlik inkübasyon sonunda, 48 kuyucuklu platedeki kuyucuklarda bulunan hücre vasatları atıldı. Daha önceden hazırlanmış olan 2 mg/mL'lik (%0.5 DMSO, %99.5 besiyeri) etken madde stoklarının (2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL) farklı konsantrasyonları üç tekrarlı olacak şekilde hücreler üzerine uygulandı. Ayrıca her kuyucuğun hacmi 200 μ L olması gerektiğinden, konsantrasyonların üzerine

besiyeri eklenerek tamamlandı. Kontrol grubu olarak; hücreler üzerine %0.5 DMSO besiyeri karışımı eklendi. Hücreler tekrar 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 48 kuyucuklu platedeki kuyucuklarda bulunan hücre vasatları atılıp, 70 µL ikili boyama solüsyonu (2 mg/mL Hoechst 33342, 100 µg/mL Ribonükleaz A, 2 µg/mL Propodium iodid) eklendi. İkili boyama solüsyonu eklenen plate ışık görmeyecek şekilde kapatılıp, 15 dakika inkübe edildi. Bu 15 dakikalık inkübasyon sonunda; inverted mikroskopta, DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi (480-520 nm dalga boyunda) kullanılarak nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı.

İkili boyama solüsyonu içinde Hoechst (33342) ve propodium iyot (PI) floresan boyaları bulunmaktadır. Bu floresan boyalarından Hoechst (33342), DNA'ya bağlanarak hücrelerin çekirdeklerini maviye boyar. Ancak apoptotik hücreler, çekirdeklerinin parçalanması, daha parlak olması ve çekirdek sınırlarının bozulmasıyla diğer hücrelerden ayırt edilmektedir. Diğer floresan boya olan PI ise, sadece hücre zarı hasar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçip, hücre çekirdeğinin kırmızı görünmesiyle nekroza uğramış hücreleri göstermektedir (Çiftçi ve ark. 2013).

2.5.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

XCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi; hücrelerin canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitesini, zamana bağlı olarak hücrelerin fizyolojik durumlarını göstererek değerlendirme olanağı veren bir deneştir. Bu sistem, elektriksel empedansı ölçerek canlı hücrelerin sayısı ve morfolojisi hakkında nicel bilgiler verir.

Sığır trakea epitel hücreleri; sayımı yapıldıktan sonra, her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde altın kaplı 96 kuyucuklu e-plate'e ekildi. E-plate etüvde (%5

CO₂, 37°C ve >%90 nem) bulunan RTCA-SP yerleştirilip, hücrelerin plağa tutunması ve çoğalması için 24 saat inkübe edildi. Bu 24 saatlik inkübasyon sonunda, hücreler çoğalma fazına geçtiğinde e-plate etüvden çıkarılıp, vasat kuyucuklardan atıldı. Daha önceden hazırlanmış olan 2 mg/mL'lik (%0.5 DMSO,%99.5 besiyeri) etken madde stoklarının (2 µg/mL ve 10 µg/mL) farklı konsantrasyonları üç tekrarlı olacak şekilde hücreler üzerine uygulandı. Ayrıca her kuyucuğun hacmi 200 µL olması gerektiğinden, konsantrasyonların üzerine besiyeri eklenerek tamamlandı. Kontrol grubu olarak; hücreler üzerine %0.5 DMSO besiyeri karışımı eklendi. Pozitif kontrol grubunda hücreler üzerine %20 DMSO besiyeri karışımı eklendi. E-plate etüvde bulunan RTCA-SP yerleştirip, 96 saat süre ile kültürü yapılmış ve 10 dakika ara ile sistemden gerçek zamanlı empedans ölçümü alındı. 96 saatli inkübasyon sonunda, hücre proliferasyonunu gösteren grafikler elde edildi (Çiftçi ve ark. 2013).

2.5.6. Hücre Kültürü Deneyleri Verilerin Değerlendirilmesi

Hücre canlılığını belirlemek için yapılan MTT testinde; deney protokolüne uygun olarak hazırlanan 96 kuyucuklu plate, Elisa plate okuyucusu cihazında 570 nm dalga boyunda okutuldu ve absorbans değerleri elde edildi. Elisa plate cihazında okutularak elde edilen kontrol grubu absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Hücre canlılık değeri; gamitromisin veya tulatromisin uygulanan kuyucukların absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine bölünüp, yüzle çarpılarak bulundu. İkili boyama metodu ile apoptoz ve nekroza uğramış hücreler inverted mikroskopta, DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi (480-520 nm dalga boyunda) kullanılarak nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı. Inverted mikroskopta; normal hücre, apoptoza ve nekroza uğramış hücreler sayılarak toplam hücre sayısı belirlendi. Apoptoza veya nekroza uğramış hücrelerin, sayıları toplam hücre sayısına oranlandı ve yüzde değerleri bulundu. İkili boyama metodu ve MTT testi en az üç kez tekrarlandı.

2.6. İstatistiksel Analizler

Sunulan çalışmada elde edilen veriler aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde verildi. İstatistik analizler SPSS 15.0 paket programında yapıldı. Yapılan testlerde $P < 0.05$ değeri önemli olarak kabul edildi. Grupların parametrik dağılıp dağılmadığına normalite testi ile bakıldı. İzole organ banyosu için yapılan analizlerde ikinci protokolde; gamitromisin uygulanan dokularda pD₂ parametrik, tultatromisinde ise nonparametrik olarak dağılmış, E_{max} ise gamitromisin uygulanan grupta nonparametrik, pD₂ ise parametrik olarak dağılmıştır. Parametrik dağılan gruplarda tekrarlı ANOVA, nonparametrik dağılanlara ise Friedman testi uygulanmıştır. Üçüncü grupta OneWay ANOVA, gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Duncan testi (*post hoc*) uygulanmıştır. Nonparametrik testler ise Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Dördüncü grupta; eşli karşılaştırmalar yapıldı. Tultatromisin derişimlerinden 10⁻⁶ M normal dağılım olmadığından Wilcoxon non- parametrik testi yapıldı. Normal dağılım gösteren tultatromisin derişimleri (10⁻⁶ M hariç) ve gamitromisin derişimlerine eşli gruplar T testi uygulandı. Normal dağılım gösteren derişimlerde (10⁻⁶ M hariç) T testi, normal dağılım göstermeyen 10⁻⁶ M derişime ise Mann Whitney U testi uygulandı. Yapılan testlerde $p < 0.05$ istatikselsel olarak anlamlı kabul edildi. Son protokolde ise; E_{max} ve pD₂ değerleri normal dağılım göstermediği için Friedman testi yapıldı. E_{max} değerinde fark bulundu ve hangi gruplar arasında farkın olduğunu tespit etmek için Wilcoxon testi yapıldı. Bonfferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra $p < 0.016$ olarak kabul edildi.

Hücre kültürü deneylerinde, sitotoksisite, apoptoz ve nekroz verilerinin değerlendirilmesi Microsoft Excel (Microsoft Office 2010) programı kullanılarak hesaplandı. MTT sonuçlarına göre IC₅₀ hesaplanmasında GraphPad Prism (Software ver. 6) kullanıldı. MTT testi sonuçları; her bir grup kendi içinde derişimleri arasındaki farkı OneWay ANOVA, gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Tukey testi (*post hoc*) uygulandı. Gamitromisin ve Tultatromisinin gruplar arasındaki

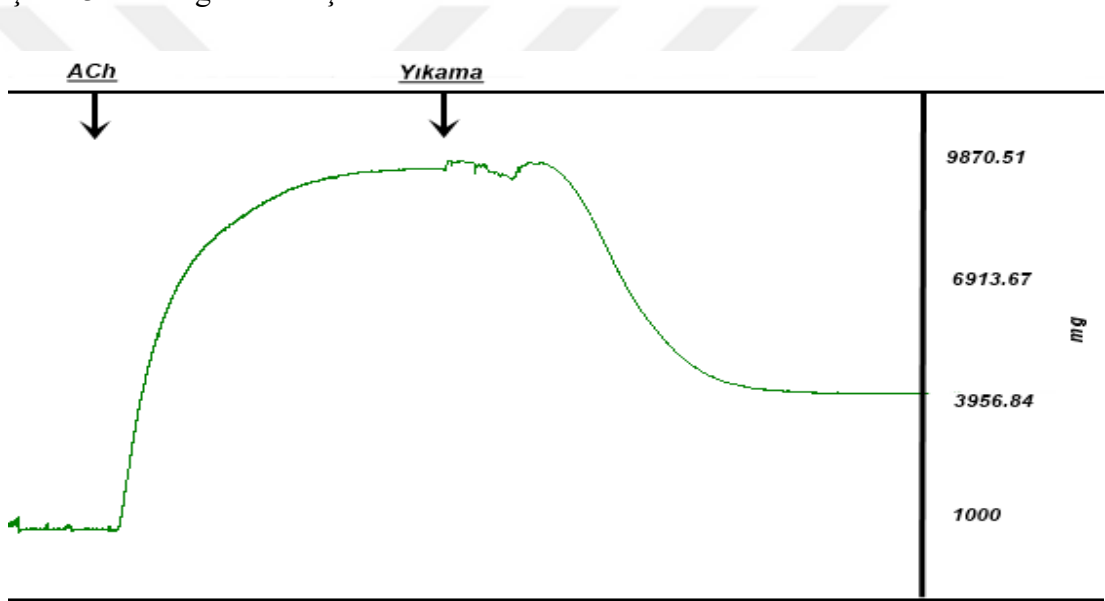
hücre canlılığının farkının değerlendirilmesinde Student t testi ile hesaplandı. Gamitromisin ve Tulatromisinin gruplar arasındaki apoptotik ve nekrotik % indeksi farkının değerlendirilmesinde Student t testi ile hesaplandı. Yapılan testlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



3.BULGULAR

3.1. İzole Organ Deney Bulguları

İzole organ deneyi protokollerine geçilmeden önce; izole organ banyosu (10 mL Krebs çözeltisi) izometrik gerim ileticisine bağlanan izole trakea düz kası 15 dakika ara ile 3 kez Krebs solüsyonu ile yıkandı ve dengelenme sonrası 10^{-3} M ACh ile canlılık bakıldı. Asetilkolin uygulanmış izole trakea düz kası canlılık yanıt eğrisi Şekil 3.1.1’de gösterilmiştir.

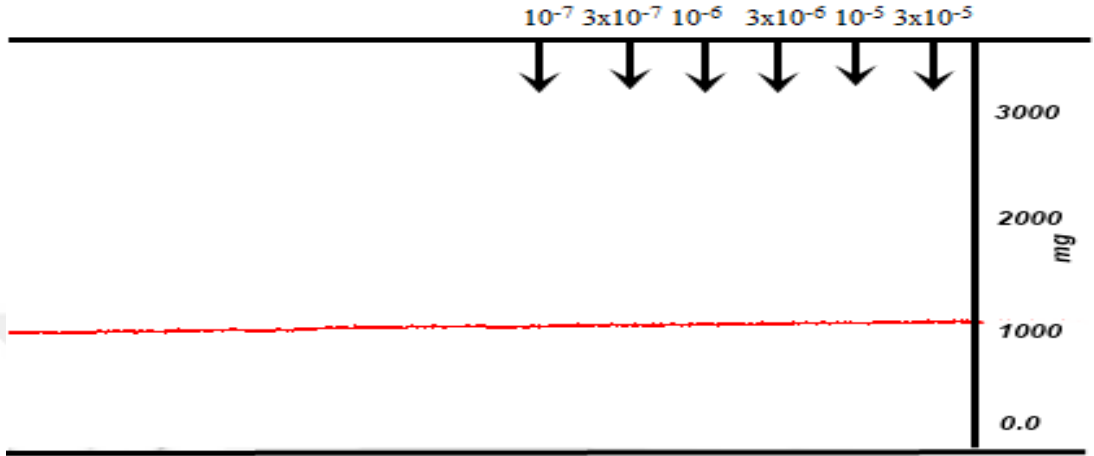


Şekil 3.1.1. 10^{-3} M ACh uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü

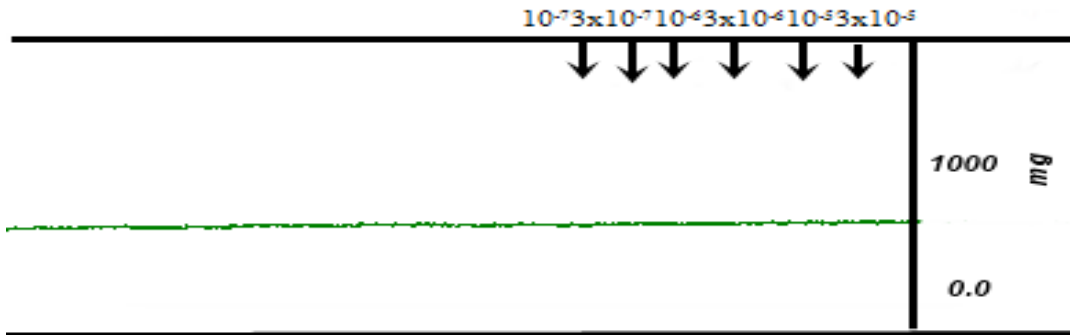
3.1.1. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Tek Başına Araştırılması

Gamitromisin, tulatromisin ve DMSO'nun sığır trakea düz kası üzerine tek başına etkisini araştırmak amacıyla, gamitromisin (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} M), DMSO (sulandırılmaları) ve tulatromisin (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} M) derişimlerde kümülatif olarak uygulandı. Gamitromisin, tulatromisin ve

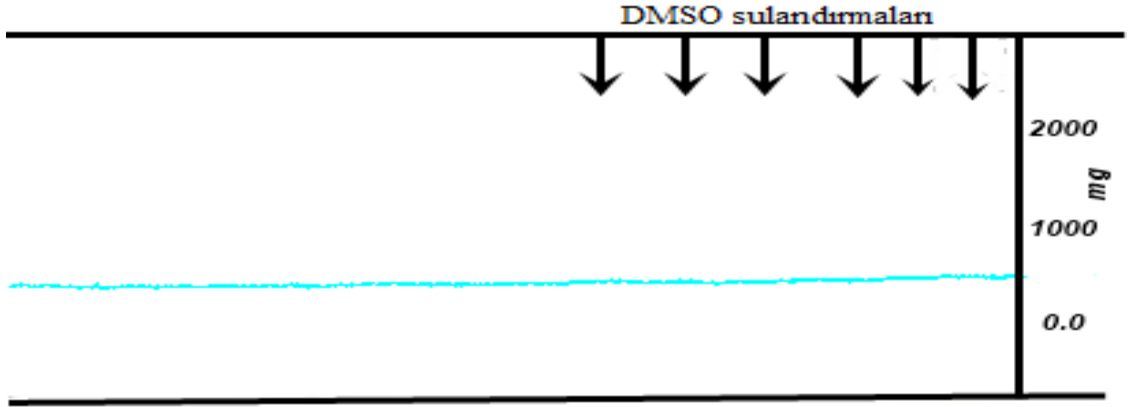
DMSO uygulama derişimlerinde izole sığır trakea düz kası dokusunda kasılma ya da gevşeme gibi bir cevap oluşturmadı. Gamitromisin, tulatromisin ve DMSO sulandırılmaları uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrileri Şekil 3.1.2, Şekil 3.1.3 ve Şekil 3.1.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1.2. Gamitromisin derişimleri uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü



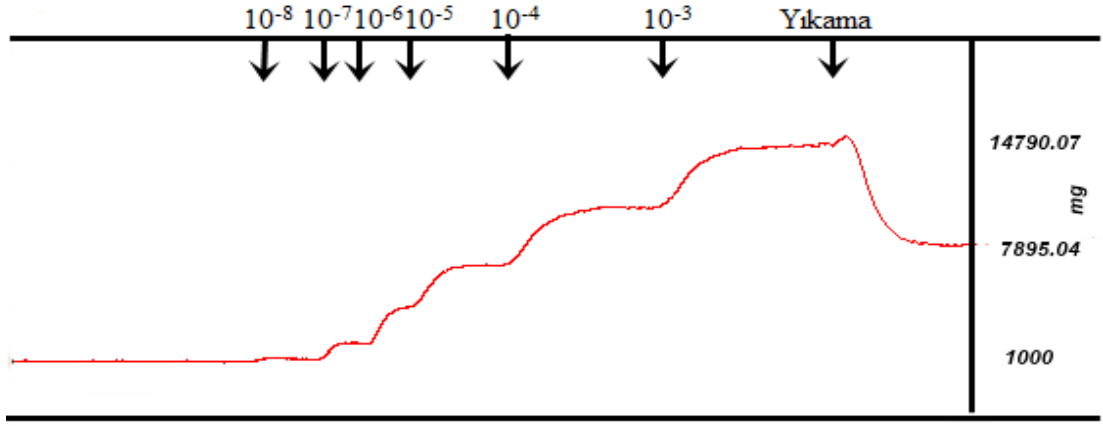
Şekil 3.1.3. Tulatromisin derişimleri uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü



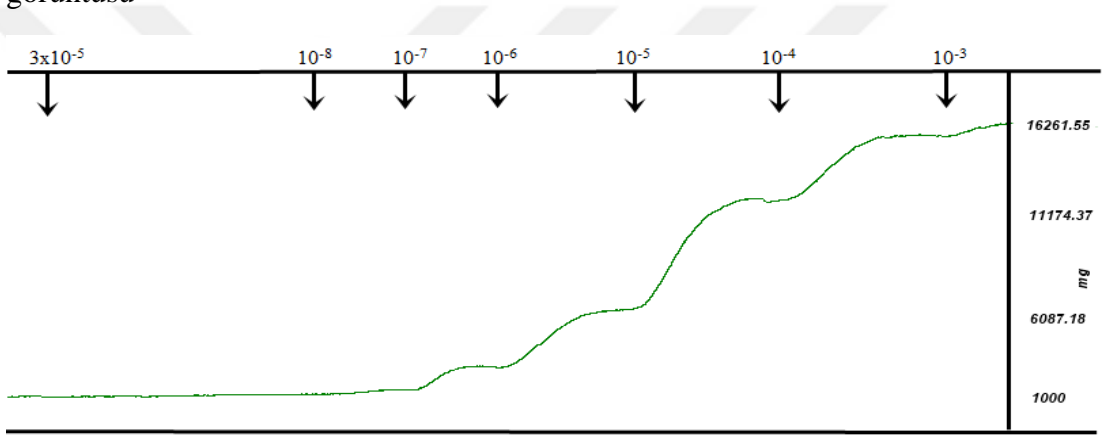
Şekil 3.1.4. DMSO sulandırmaları uygulanmış izole trakea düz kası derişim yanıt eğrisi görüntüsü

3.1.2. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması

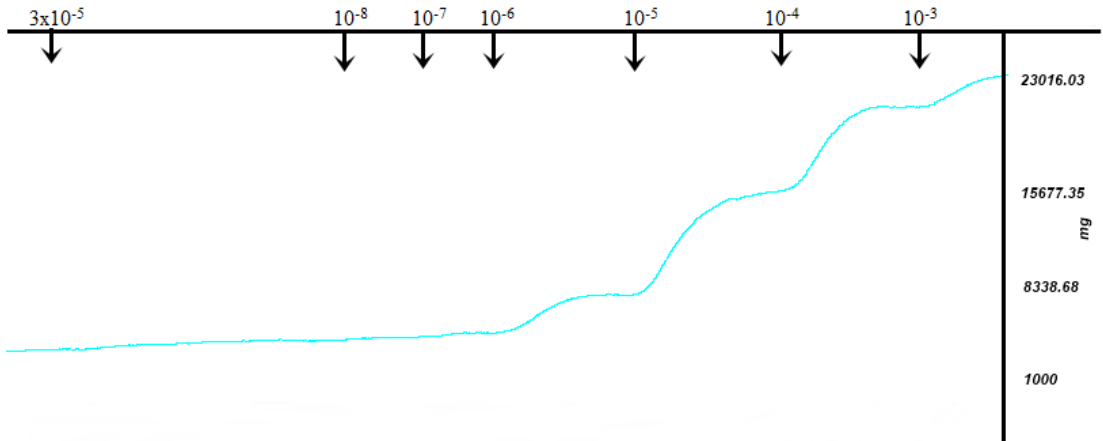
Bu protokol, 20 dakika 3×10^{-5} M gamitromisin, 3×10^{-5} M tulatromisin ve DMSO'nun derişimi inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrileri Şekil 3.1.5, Şekil 3.1.6, Şekil 3.1.7 ve Şekil 3.1.8'de gösterilmiştir. Alınan sonuçlar pD_2 ve E_{max} değerleri hesaplandı. Asetilkolin derişimleri pD_2 ve E_{max} değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunamadı ($P > 0.05$) (Çizelge 3.1.1, Çizelge 3.1.2).



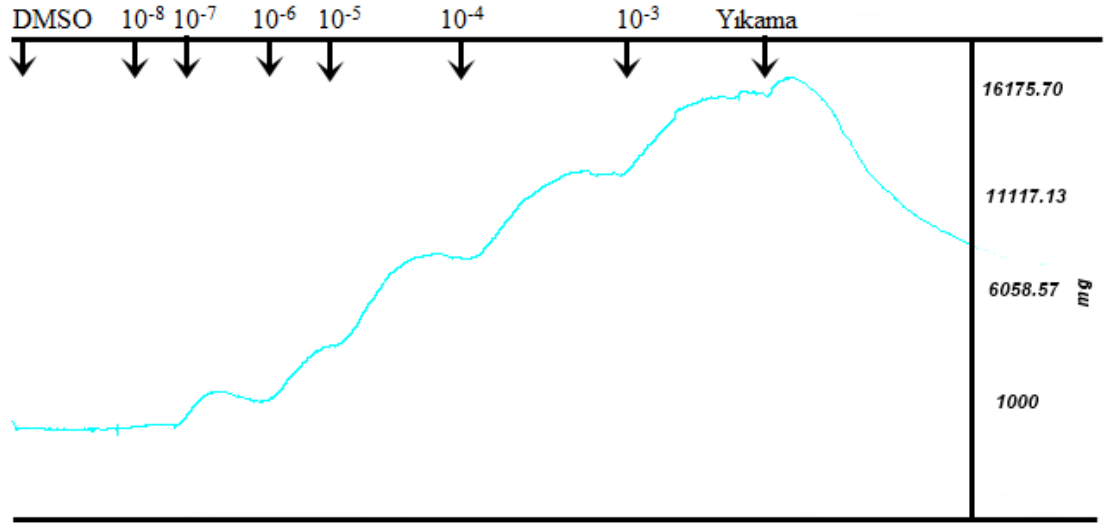
Şekil 3.1.5. Kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim uygulaması derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.6. 20 dakika 3×10^{-5} M gamitromisin inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.7. 20 dakika 3×10^{-5} M tulatromisin inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.8. 20 dakika DMSO sulandırması inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Çizelge 3.1.1. Asetilkolin, Gamitromisin+Asetilkolin, DMSO+Asetilkolin pD_2 ve E_{max} değerleri

Uygulama	pD_2	E_{max}
Asetilkolin(10^{-8} - 10^{-3} M)	4.81 ± 0.13	1473.06 ± 607.41
3×10^{-5} M gamitromisin+ Asetilkolin (10^{-8} - 10^{-3} M)	4.72 ± 0.21	1845.82 ± 616.63
DMSO+ Asetilkolin (10^{-8} - 10^{-3} M)	4.81 ± 0.15	1672.40 ± 636.99

Aynı sütündeki gruplar arasında fark yoktur ($P > 0,05$)

Çizelge 3.1.2. Asetilkolin, Tulatromisin+Asetilkolin, DMSO+Asetilkolin pD_2 ve E_{max} değerleri

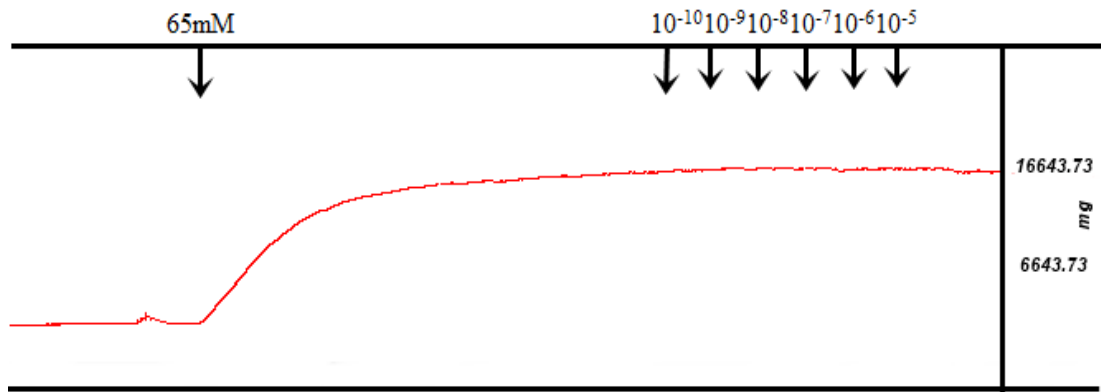
Uygulama	pD_2	E_{max}
Asetilkolin (10^{-8} - 10^{-3} M)	5.11 ± 0.09	1187.94 ± 318.17
3×10^{-5} M tulatromisin+ Asetilkolin(10^{-8} - 10^{-3} M)	5.37 ± 0.11	665.24 ± 145.97

DMSO+Asetilkolin (10 ⁻⁸ -10 ⁻³ M)	5.31±0.11	695,34±101.89
--	-----------	---------------

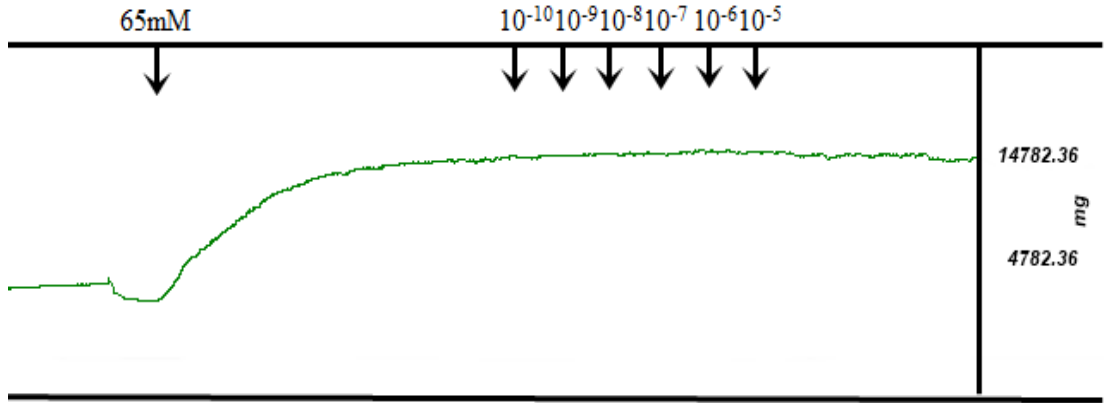
Aynı sütundaki gruplar arasında fark yoktur PD₂ için (P>0.016), E_{max} için (P>0.05)

3.1.3. Potasyum Klorür ile Ön Kasılma Oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin Araştırılması

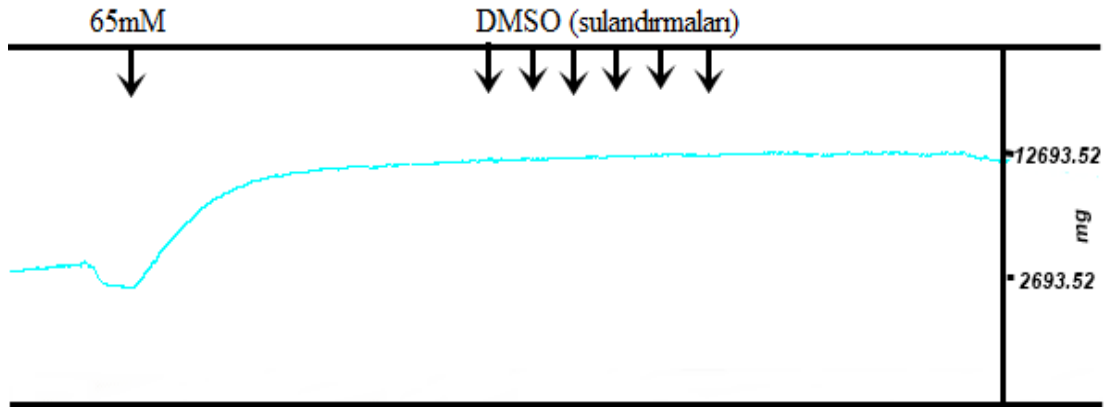
Kırk beş dakika dengeleme sonrasında ACh ile canlılık bakıldı. On beş dakika ara ile 3 kez yıkanan dokular normal platoya gelince 65 mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturuldu. Üzerine kümülatif tulatromisin (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M), DMSO sulandırmaları ve gamitromisin (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) uygulandı. Atmış beş mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif tulatromisin (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M), DMSO sulandırmaları ve gamitromisinin (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) derişim yanıt eğrileri Şekil 3.1.9, Şekil 3.1.10, Şekil 3.1.11’de gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucunda grup derişimleri karşılaştırılmış ve gruplar arasında fark bulunamamıştır (P>0.05) (Şekil 3.1.12).



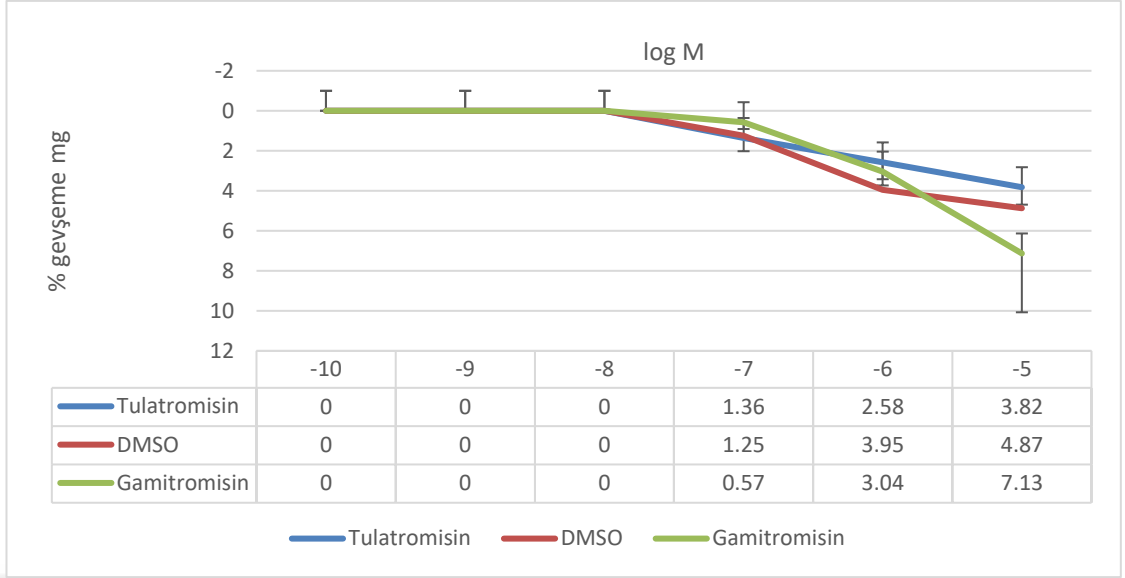
Şekil 3.1.9. 65 mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif gamitromisinin (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.10. 65 mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



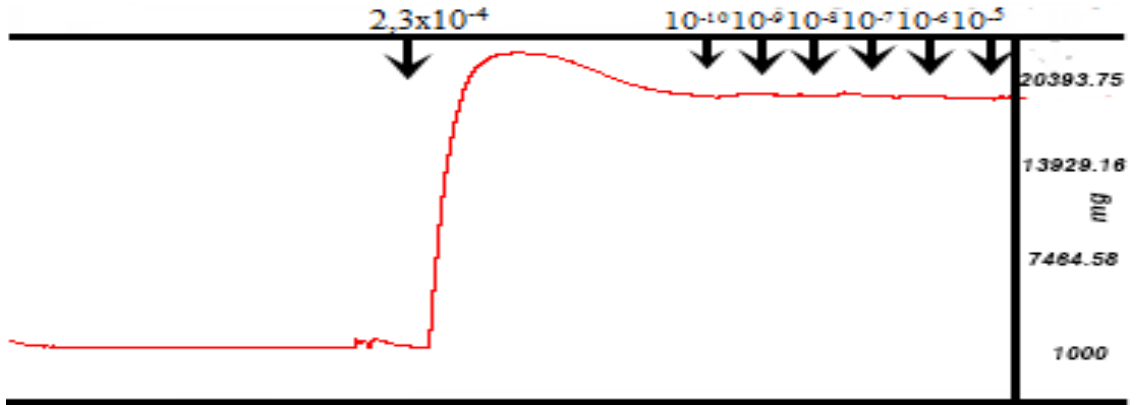
Şekil 3.1.11. 65 mM KCl ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif DMSO sulandırmaları yanıt eğrisi görüntüsü



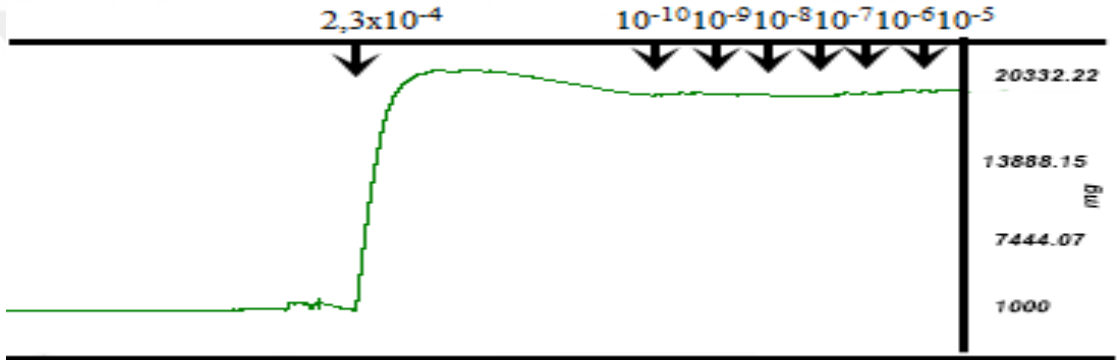
Şekil 3.1.12. KCl ile prekontrakte edilen dokuya tulatromisin, DMSO ve gamitromisin uygulaması sonucu oluşan % gevşeme cevapları (n:8).

3.1.4. Asetilkolin EC₈₅ Değeri ile Ön Kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Gamitromisin ve Tulatromisinin Etkilerinin araştırılması

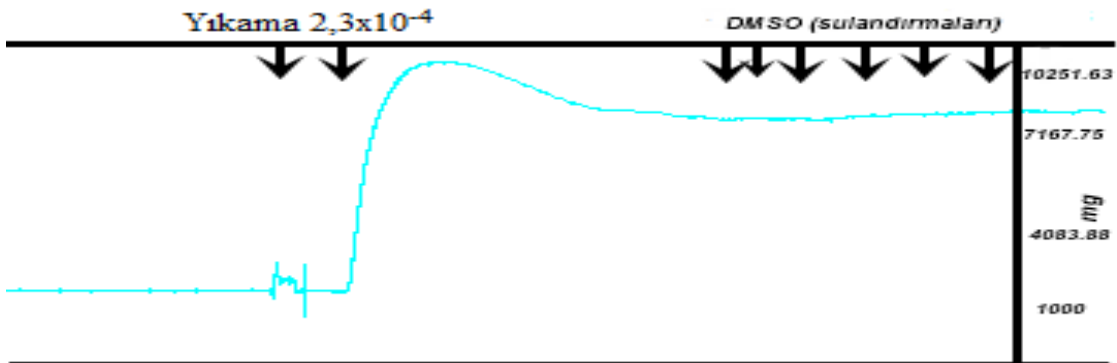
Bu protokol ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda gamitromisin, tulatromisin ve DMSO'nun etkisini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Kırk beş dakika dengeleme sonrasında ACh ile canlılık bakıldı. On beş dakika ara ile 3 kez yıkanan dokular normal platoya gelince, 2.3×10^{-4} M ACh derişimi uygulanarak ön kasılma oluşturuldu. Üzerine kümülatif gamitromisin (10^{-10} - 10^{-5} M), DMSO (sulandırılmaları) ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) uygulandı. Yapılan analiz sonucunda, tulatromisin derişimler arasında istatistik olarak bir fark bulunamamıştır ($P > 0.05$) (Şekil 3.1.16). Buna karşın gevşeme yanıtları çok yüksek olmasada 10^{-7} M ($\%5.45 \pm 1.13$) ve 10^{-6} M'da ($\%8.51 \pm 1.69$), gamitromisinin gevşeme cevapları kontrole göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edildi ($P < 0.05$) (Şekil 3.1.17).



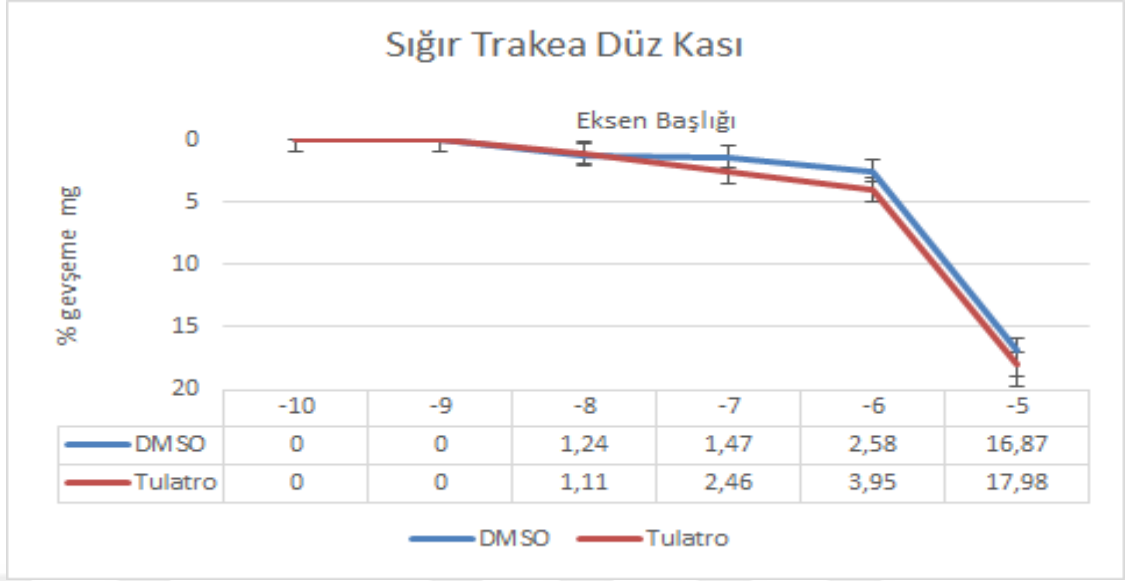
Şekil 3.1.13 $2,3 \times 10^{-4}$ ACh ile ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif gamitromisinin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



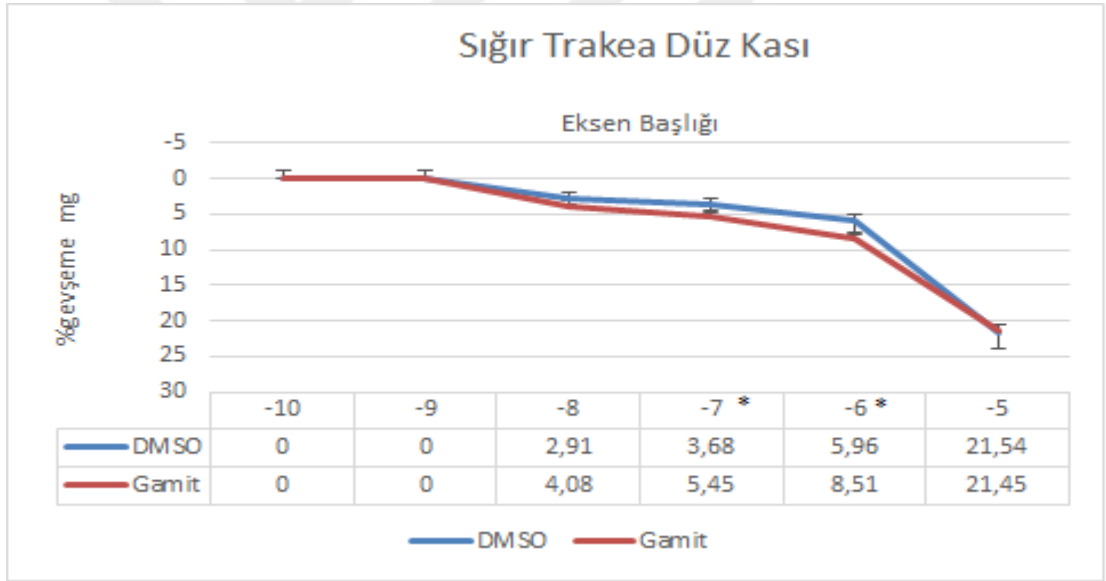
Şekil 3.1.14 $2,3 \times 10^{-4}$ ACh ile ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif tulatromisinin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.15 $2,3 \times 10^{-4}$ ACh ile ön kasılma oluşturulan dokulara kümülatif DMSO (sulandırılmaları) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.16 2.3×10^{-4} ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, tulatromisin ve DMSO sulandırmaları yanıt eğrisi

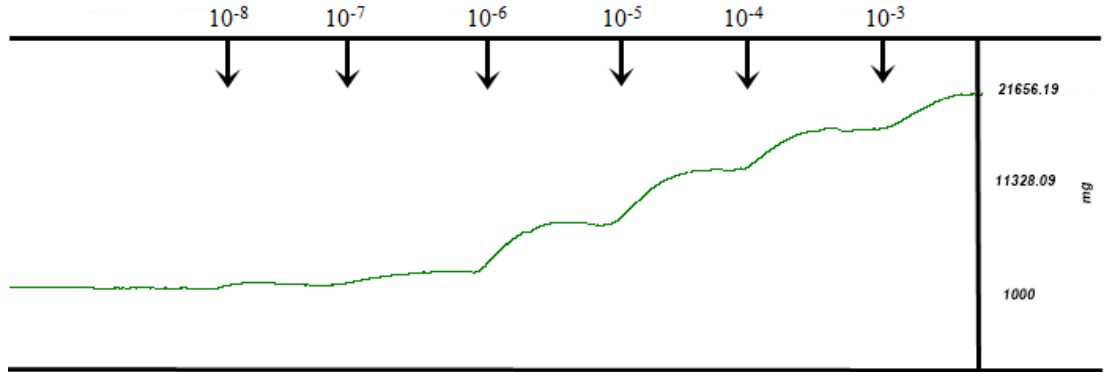


*Aynı sütundaki gruplar arasında fark önemlidir ($P < 0.05$)

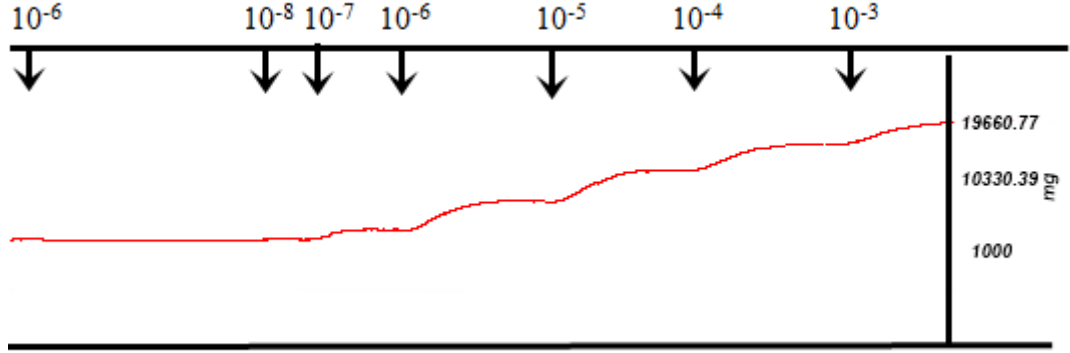
Şekil 3.1.17 2.3×10^{-4} ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, gamitromisin ve DMSO sulandırmaları yanıt eğrisi

3.1.5. Sığır Trakea Düz Kası Üzerine 10^{-6} M Gamitromisin Etkisinin Asetilkolin ile Birlikte Araştırılması

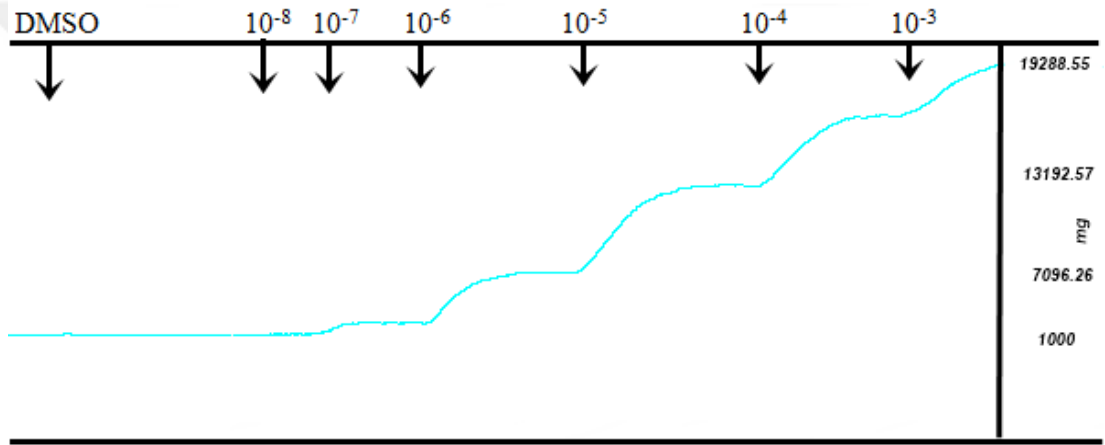
Bu protokol, 20 dakika 10^{-6} M gamitromisin ve DMSO'nun (derişimi) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrileri Şekil 3.1.18, Şekil 3.1.19 ve Şekil 3.1.20'de gösterilmiştir. Gamitromisin (10^{-6} M) ve DMSO'nun (derişimi) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimlerinin pD_2 ve E_{max} değerleri karşılaştırılmıştır. pD_2 değerleri arasında bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). E_{max} değerleri arasında ise farklılık çıkmıştır ($P<0.05$). Bu farkın; gamitromisin inkübasyonu ile DMSO inkübasyonu arasında ($P=0.028$) olduğu görülmüş, ancak istatistiki olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra bu farklılığın istatistiksel değil sayısal olduğu saptanmıştır ($P>0.016$) (Çizelge 3.1.3).



Şekil 3.1.18 ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.19 20 dakika 10^{-6} M gamitromisin inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü



Şekil 3.1.20 5. Protokol 20 dakika DMSO (sulandırması) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişim yanıt eğrisi görüntüsü

Çizelge 3.1.3 Asetilkolin, 10^{-6} M Gamitromisin+Asetilkolin, DMSO+Asetilkolin PD₂ ve E_{max} değerleri

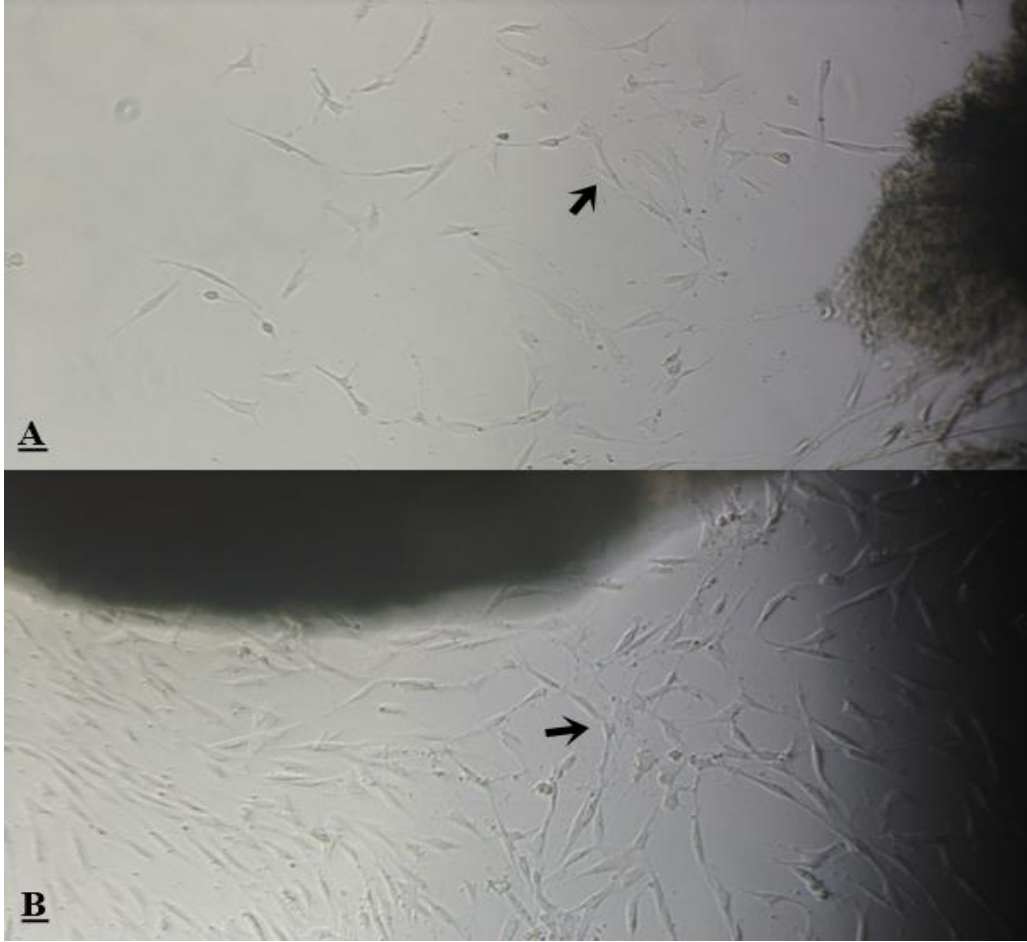
Uygulama	PD ₂	E _{max}
Asetilkolin(10^{-8} - 10^{-3} M)	5.04±0.18	1408.67±820.57
10^{-6} M gamitromisin+Asetilkolin (10^{-8} - 10^{-3} M)	5.05±0.14	828.82±702.67*
DMSO+ Asetilkolin (10^{-8} - 10^{-3} M)	5.01±0.32	2275.58±2165.70*

* Aynı sütundaki E_{max} değerleri arasındaki fark vardır (P<0.05). Fakat E_{max} grupları arasındaki fark Bonfferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.016).

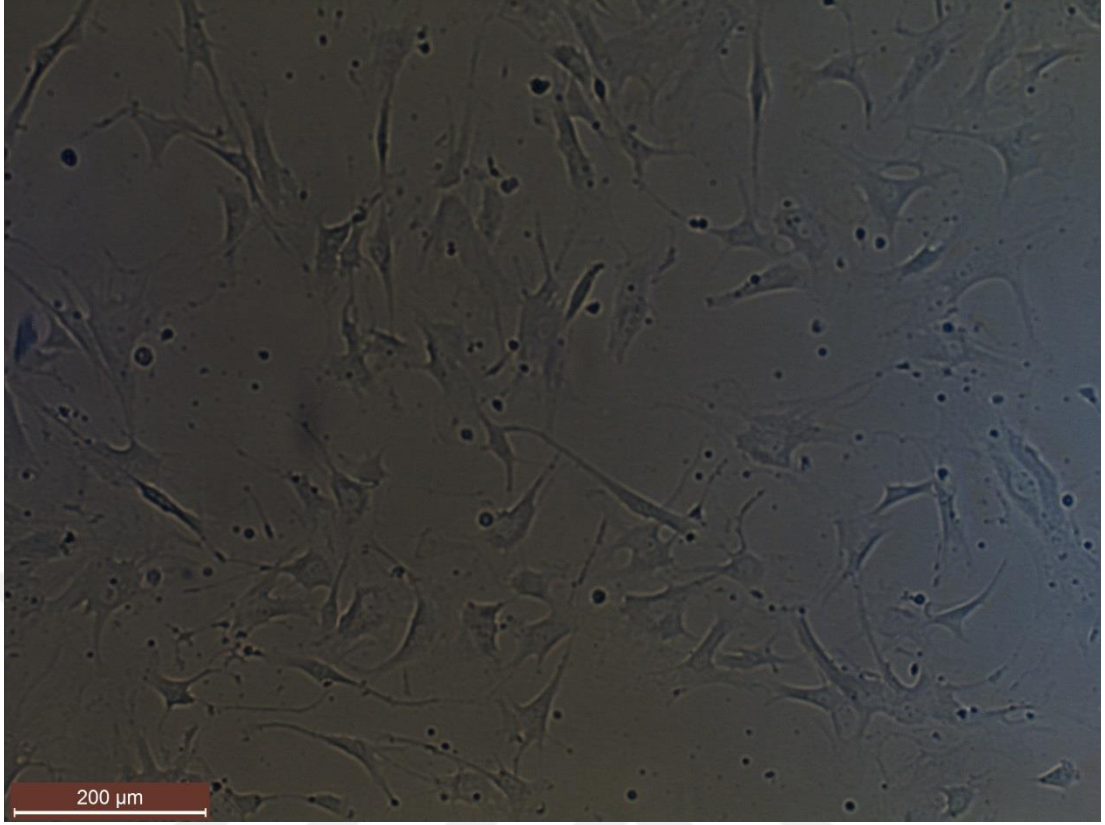
3.2. Hücre Kültürü Deney Bulguları

3.2.1. Trakea Epitel Hücre İzolasyonu

Primer hücreler, sığır trakea epitel izolasyonunun yaklaşık 4'üncü gününde görülmeye başlamıştır ve yaklaşık 9'uncu gününde hücre sayısında artışın hızlandığı gözlemlenmiştir. Trakea epitel hücreleri, yaklaşık 3 hafta içerisinde istenilen sayıya ulaşmıştır. Trakea epitel hücrelerinin mikroskop görüntüleri Şekil 3.2.1 ve Şekil 3.2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.1. Trakea epitel dokudan izole olan epitel hücreleri, A) Trakea epitel dokudan izole edilmiş epitel hücreleri 4'üncü gün görüntüleri, B) Trakea epitel dokudan izole edilmiş epitel hücreleri 9'uncu gün görüntüleri (Fotoğraflar Leica DM6000 İverted Mikroskopta 10X büyütmede görüntülenmiştir.)



Şekil 3.2.2. Trakea epitel hücreleri, (Fotoğraflar Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir.)

3.2.2. Sitotoksisite Testi Sonuçları

Çalışmada, tulatromisin ve gamitromisinin sığır trakea epitel hücreleri üzerindeki toksisitesi MTT testi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak; hücreler üzerine %0.5 DMSO besiyeri karışımı eklendi.

Çizelge 3.2.1. 120 µg/mL - 300 µg/mL arası konsantrasyonlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücreleri üzerine etkisi

Konsantrasyon	Gamitromisin % Canlılık	Tulatromisin % Canlılık
Kontrol	100	100
300 µg/mL	25.701±3.37	20.093±2.47
240 µg/mL	28.738±1.24*	22.430±2.14*
210 µg/mL	31.776±3.27	28.505±4.46
180 µg/mL	42.991±3.71*	36.215±1.124*
150 µg/mL	55.841±4.51*	43.458±1.62*
120 µg/mL	61.215±3.28	57.009±4.51

*Aynı sütündeki gruplar arasında fark önemlidir (P<0.05)

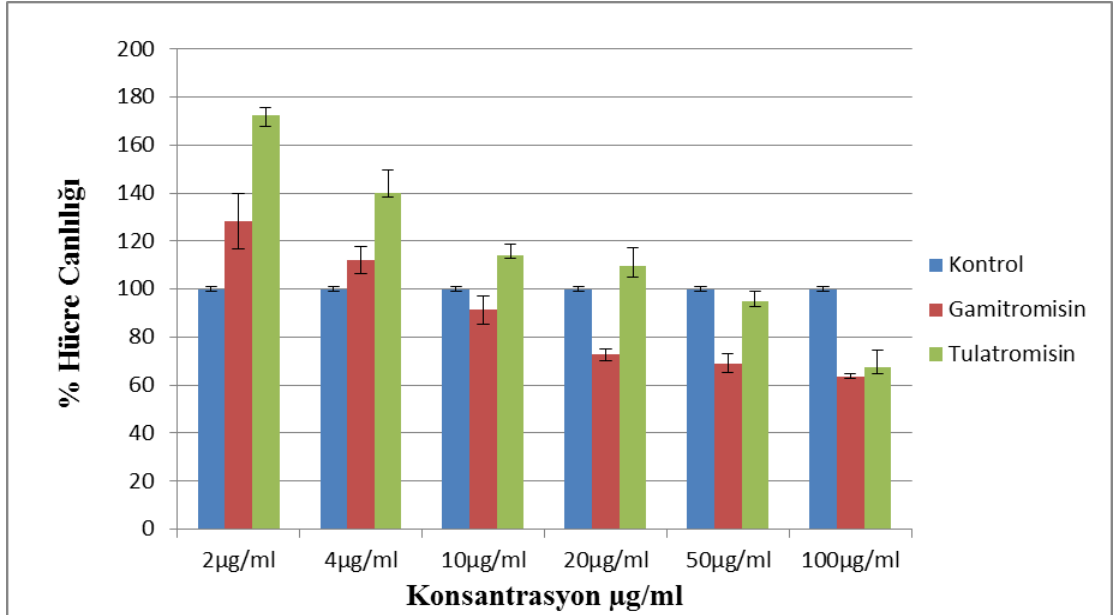
Çizelge 3.2.2. 2 µg/mL - 100 µg/mL arası konsantrasyonlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücreleri üzerine etkisi

Konsantrasyon	Gamitromisin % Canlılık Oranı	Tulatromisin % Canlılık Oranı
Kontrol	100	100
100 µg/mL	63.677±0.9	67.265±7.12
50 µg/mL	69.058±3.91*	95.067±4.11*
20 µg/mL	72.646±2.37*	109.417±7.66*
10 µg/mL	91.480±5.88*	113.901±4.99*
4 µg/mL	112.108±5.6*	139.910±9.49*
2 µg/mL	128.251±11.45*	172.197±3.23*

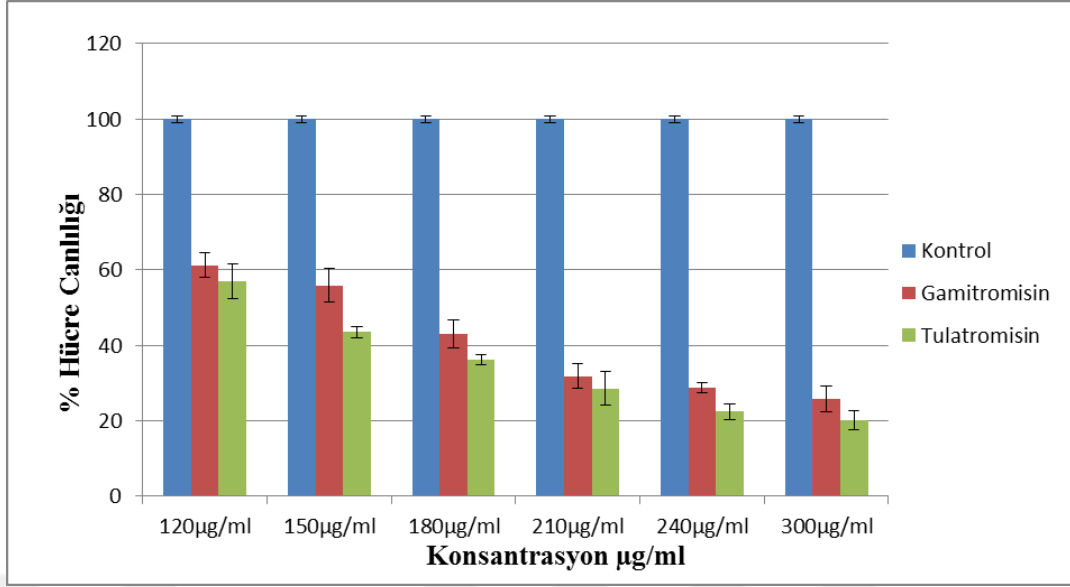
*Aynı sütündeki gruplar arasında fark önemlidir (P<0.05)

Tulatromisin ve gamitromisinin uygulandığı hücreler ait toksisite sonuçları çizelge 3.2.1 ve 3.2.2'te verilmiştir. Buna göre; en yüksek konsantrasyon olan 300 µg/mL'de gamitromisinin canlılığı %25.701±3.37 iken tulatromisinin canlılığı %20.093±2.47 olarak bulundu. Düşük konsantrasyon olan 2 µg/mL'e ise tulatromisinin canlılığı

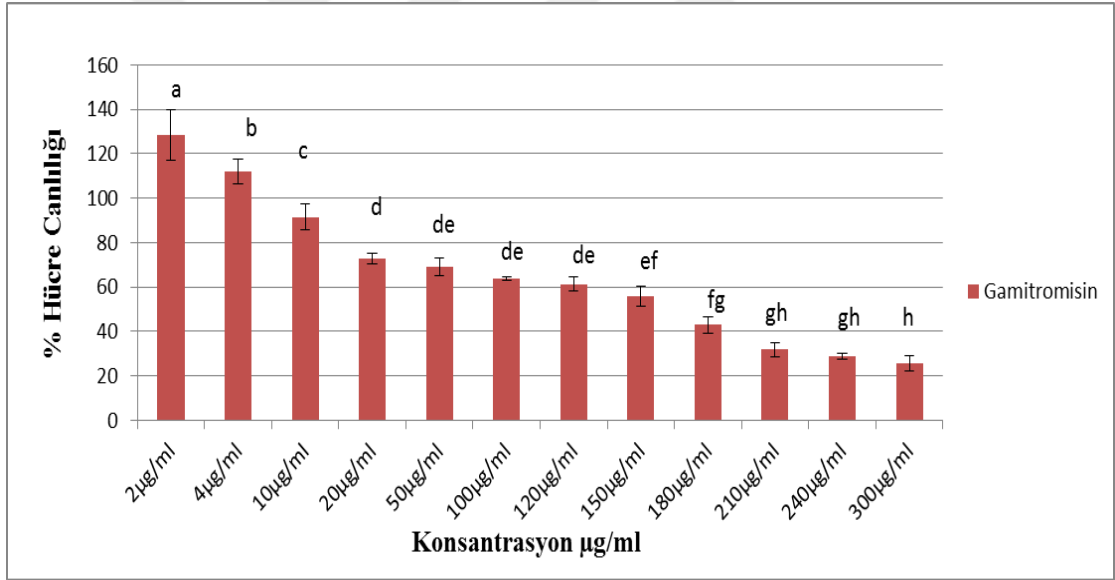
(%172.197±3.23) gamitromisin canlılığına (%128.251±11.45) göre fazla olduğu bulundu. MTT yöntemine göre, sığır trakea epitel hücrelerinde gamitromisin ve tulatromisinin IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu trakea epitel hücrelerinde; gamitromisinin IC₅₀ değeri 156±9 µg/mL, tulatromisinin IC₅₀ değeri 134.7±7.1 µg/mL olarak bulundu. Her iki etken maddede düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyonlara doğru hücre canlılığının azaldığı Şekil 3.2.3 ve Şekil 3.2.4'de gözlemlendi. Gamitromisinin sığır trakea epitel hücrelerine uygulanan konsantrasyonları arasında yüzde canlılık açısından istatistiki olarak önemli farklar bulunmuştur (P<0.001) (Şekil 3.2.5). Tulatromisinin sığır trakea epitel hücrelerine uygulanan konsantrasyonları arasında yüzde canlılık açısından istatistiki olarak önemli farklar bulunmuştur (P<0.001) (Şekil 3.2.6). Gamitromisin ve tulatromisin aynı konsantrasyonları karşılaştırıldığında 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL, 180 µg/mL ve 240 µg/mL'lik konsantrasyonlar arasında önemlilik bulunmuştur. Bu konsantrasyonlardan 150 µg/mL, 180 µg/mL ve 240 µg/mL'de gamitromisinin hücre canlılığı tulatromisine göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu konsantrasyonlardan 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 50 µg/mL'de tulatromisin hücre canlılığı gamitromisinin göre daha fazla olduğu bulunmuştur (*P<0.05) (Şekil 3.2.7).



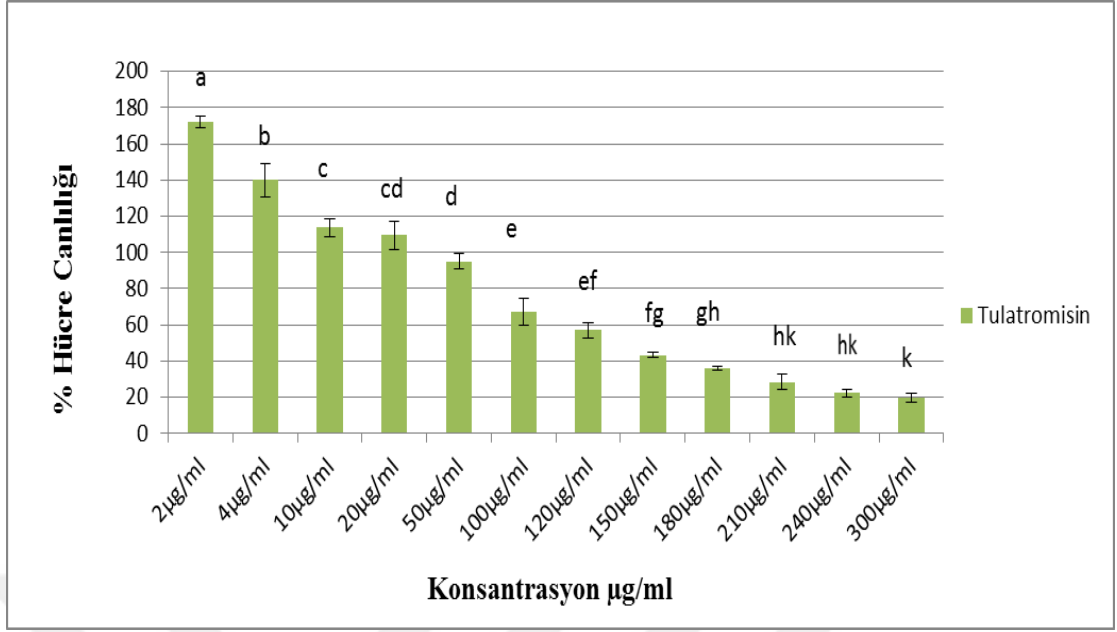
Şekil 3.2.3. 2 µg/mL - 100 µg/mL arası konsantrasyonlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği



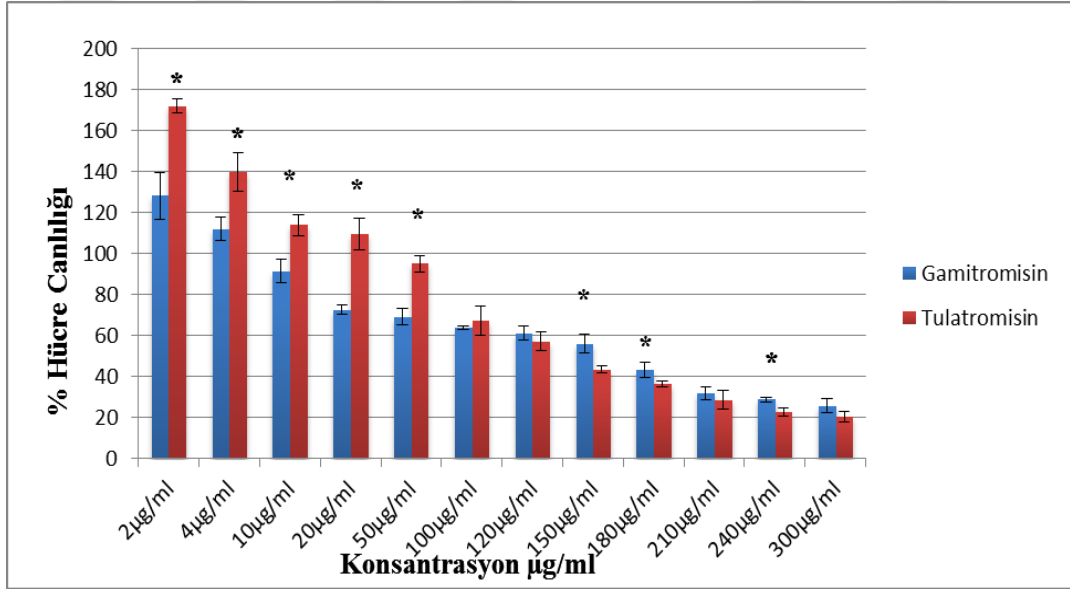
Şekil 3.2.4. 120 µg/mL - 300 µg/mL arası konsantrasyonlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği



Şekil 3.2.5. Gamitromisin konsantrasyonları uygulanan trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği. Farklı harfler arasındaki fark önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 3.2.6. Tulatromisin konsantrasyonları uygulanan trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği, Farklı harfler arasındaki fark önemlidir (P<0.05).



Şekil 3.2.7. Gamitromisin ve tulatromisin konsantrasyonlarının trakea epitel hücrelerine ait % canlılık grafiği *Aynı sütundaki gruplar arasında fark önemlidir (P<0.05)

3.2.3. İkili Boyama Metodu Sonuçları

Trakea epitel hücreleri üzerine tultatromisin ve gamitromisinin apoptotik ve nekrotik etkileri ikili boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile farklı konsantrasyonlarda tultatromisin ve gamitromisinin trakea epitel hücrelerine ait % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları Çizelge 3.2.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.2.3. 2 µg/mL - 100 µg/mL arası konsantrasyonlarda Tultatromisin ve Gamitromisinin trakea epitel hücrelerine ait apoptotik ve nekrotik hücre % indeksi

Derişim (µg/mL)	Gamitromisin		Tultatromisin	
	%Apoptoz	%Nekroz	%Apoptoz	%Nekroz
100	15.89±3.3	7.48±1.9*	14.47±1.3	2.63±0.6*
50	14.17±2.9	5.51±1.9	11.54±1.4	1.92±0.1
20	13.16±4.6*	5.26±1.2*	7.84±1.2*	1.31±0.7*
10	8.02±1.8	3.70±1.7	7.27±1.7	0.91±0.6
4	7.69±2.2	0.59±0.5	5.73±0.7	0.88±0.4
2	4.58±0.9	0.33±0.4	5.13±0.7	0.85±0.5
Kontrol	3.44±0.9	0.76±0.6	3.44±0.9	0.76±0.6

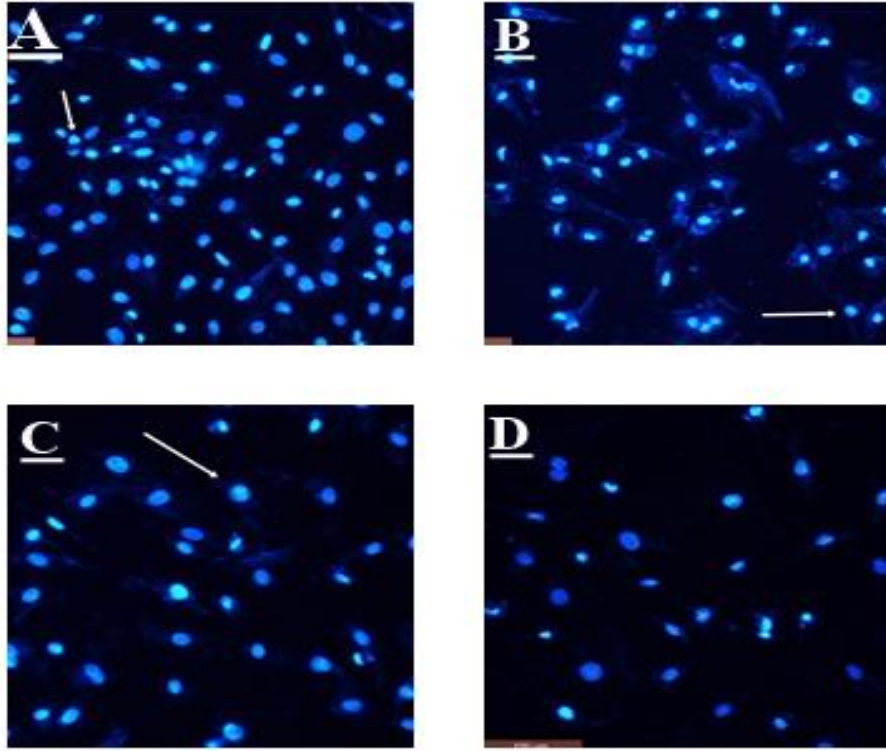
*Aynı satır arasındaki farklar önemlidir (P<0.05). Apoptoz ve nekroz sütunları kendi içinde değerlendirilmiştir.

İkili boyama yönteminde kullanılan Hoechst 33342 ve Propodium iodide boyalarından; Hoechst 33342 boyası canlı hücre zarından geçip hücrelerin çekirdeklerini maviye boyamaktadır. Apoptotik hücrelerin çekirdeklerinin parçalanması, daha parlak mavi olması ve çekirdek sınırlarının bozulmasıyla diğer çekirdeği açık maviye boyanmış hücrelerden ayırt edilirler. Bu yöntem de kullanılan ikinci boya olan PI ise, sadece hücre zarı hasar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçip, nekroza uğramış hücreleri çekirdeğinin kırmızı boyamaktadır.

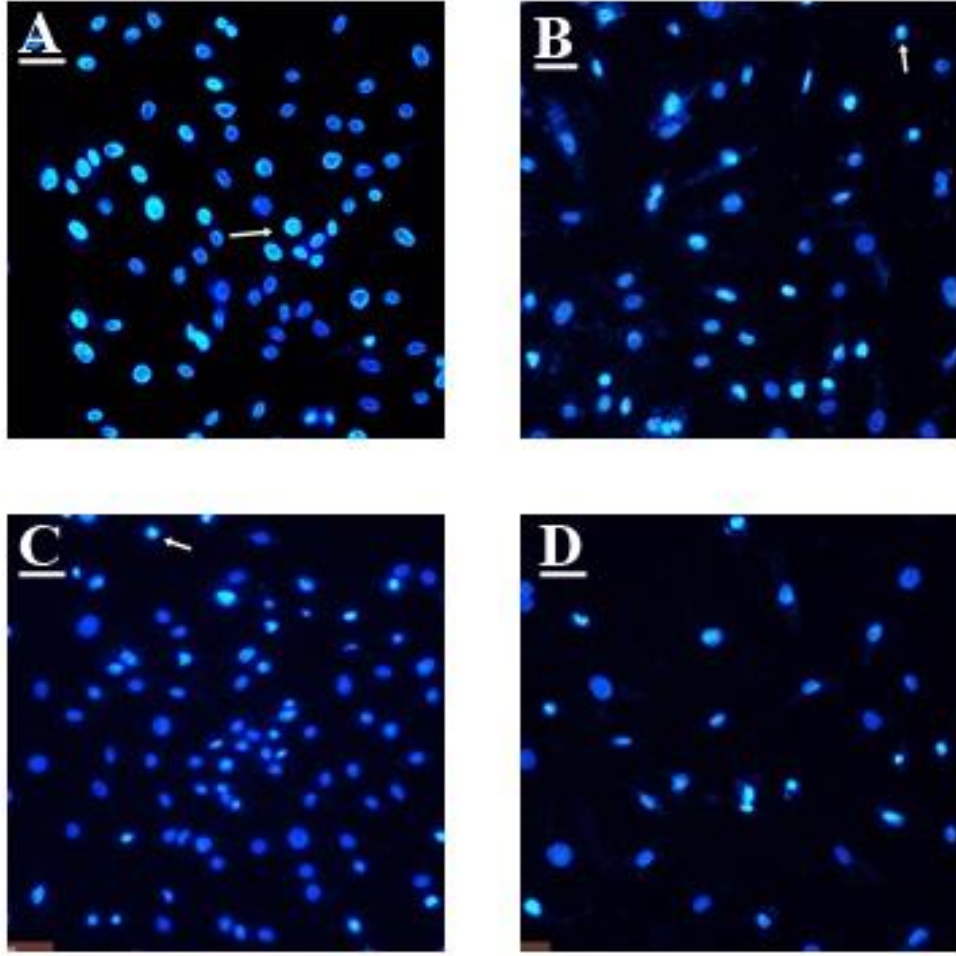
Her iki etken maddenin düşük konsantrasyonlarından yüksek konsantrasyonlarına doğru apoptotik ve nekrotik hücre % indeksi sonuçları yükselmektedir. Ama istatistiksel olarak 20 µg/mL’lik konsantrasyonda apoptotik % indeksi sonuçları farkı önemli olup, gamitromisinin tultatromisine göre daha fazla

apoptotik % indeksi daha yüksektir (Çizelge 3.2.3.) ($P<0.05$). Gamitromisin ve tultatromisinin uygulandığı trakea epitel hücrelerine ait apoptoz floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.2.8, Şekil 3.2.9, Şekil 3.2.10 ve Şekil 3.2.11’de gösterilmiştir.

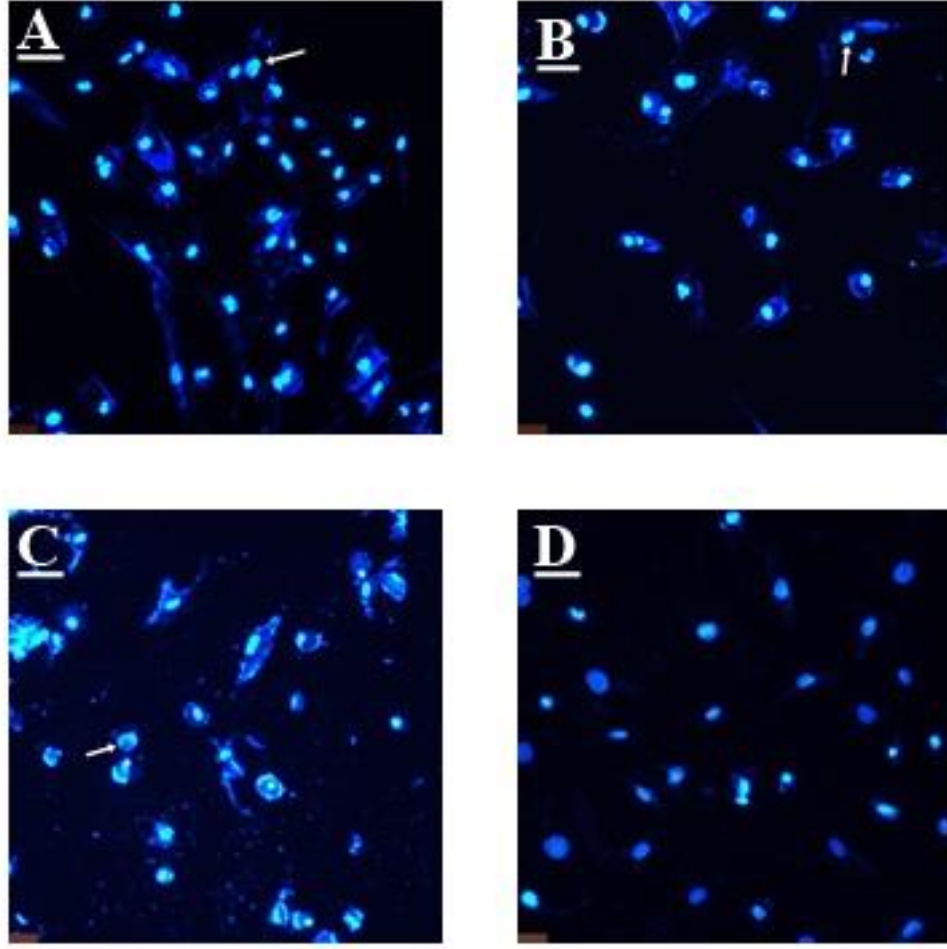
Gamitromisin ve tultatromisinin düşük konsantrasyonlarından yüksek konsantrasyonlarına doğru apoptotik ve nekrotik hücre % indeksi sonuçları yükselmektedir. Ama istatistiksel olarak 20 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’lik konsantrasyonlarda apoptotik % indeksi sonuçları farkı önemli olup, tultatromisinin gamitromisine göre daha fazla nekrotik % indeksi daha yüksektir (Çizelge 3.2.3.) ($P<0.05$). Gamitromisin ve tultatromisinin uygulandığı trakea epitel hücrelerine ait nekroz floresan mikroskop görüntüleri Şekil 3.2.12, Şekil 3.2.13, Şekil 3.2.14 ve Şekil 3.2.15’de gösterilmiştir.



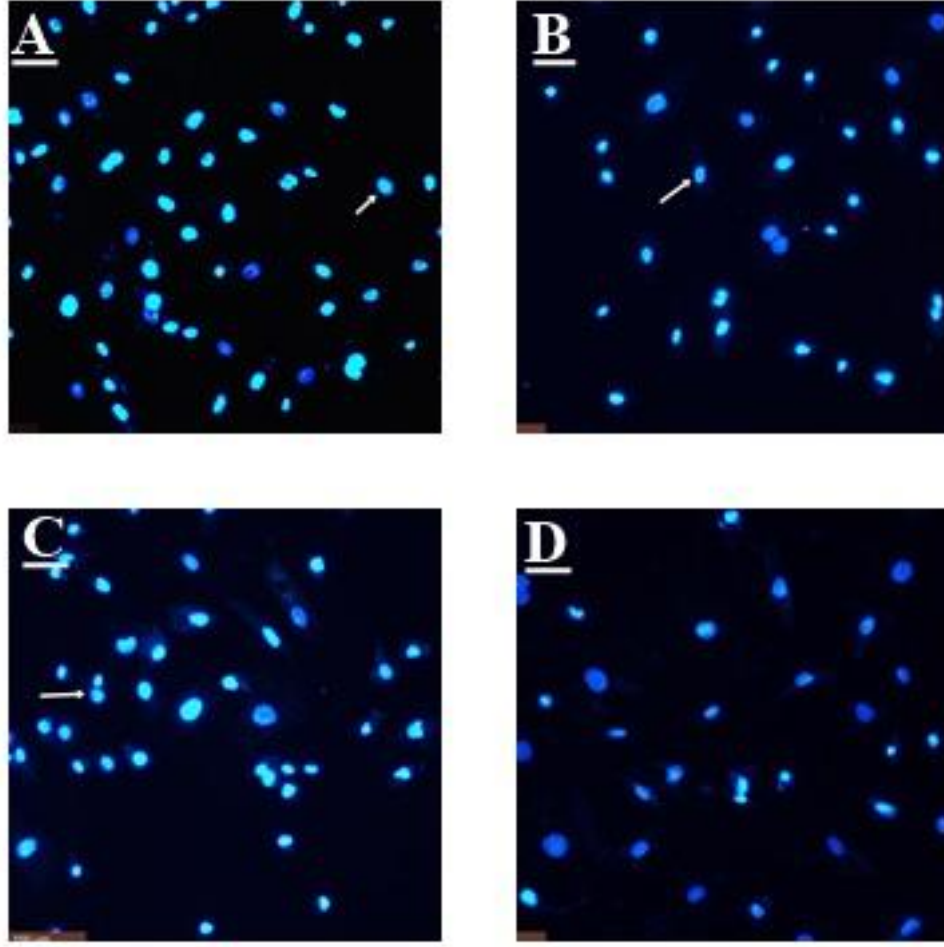
Şekil 3.2.8. 2, 4 ve 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).



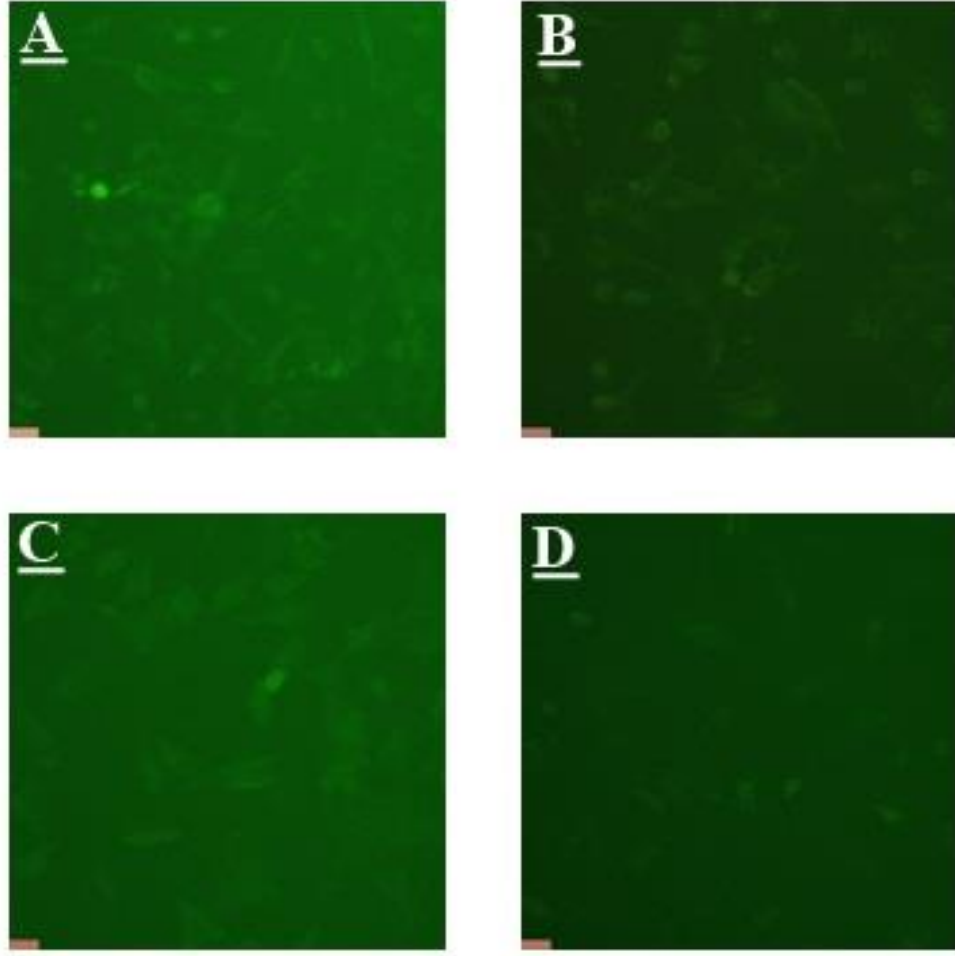
Şekil 3.2.9. 2, 4 ve 10 µg/ mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 2 µg/ mL'de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 4 µg/ mL'de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 10 µg/ mL'de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).



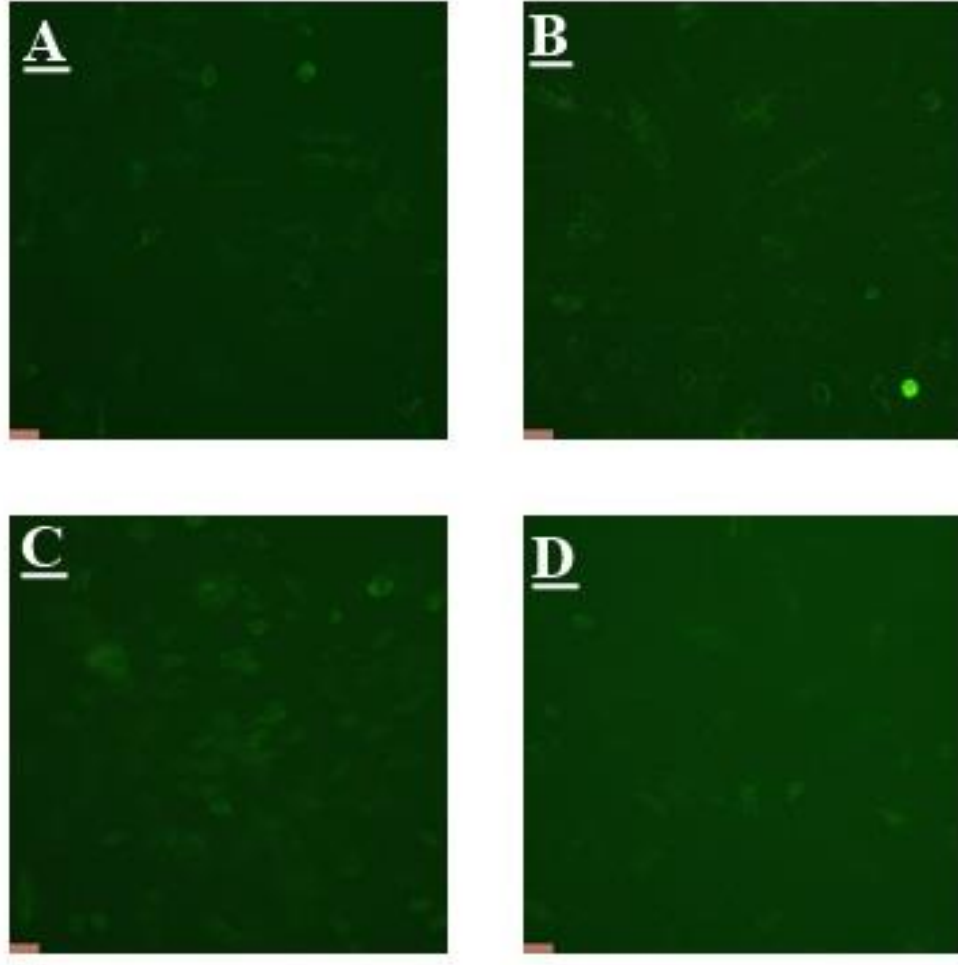
Şekil 3.2.10. 20, 50 ve 100 $\mu\text{g/ mL}$ konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 20 $\mu\text{g/ mL}$ 'de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 50 $\mu\text{g/ mL}$ 'de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 100 $\mu\text{g/ mL}$ 'de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İnverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).



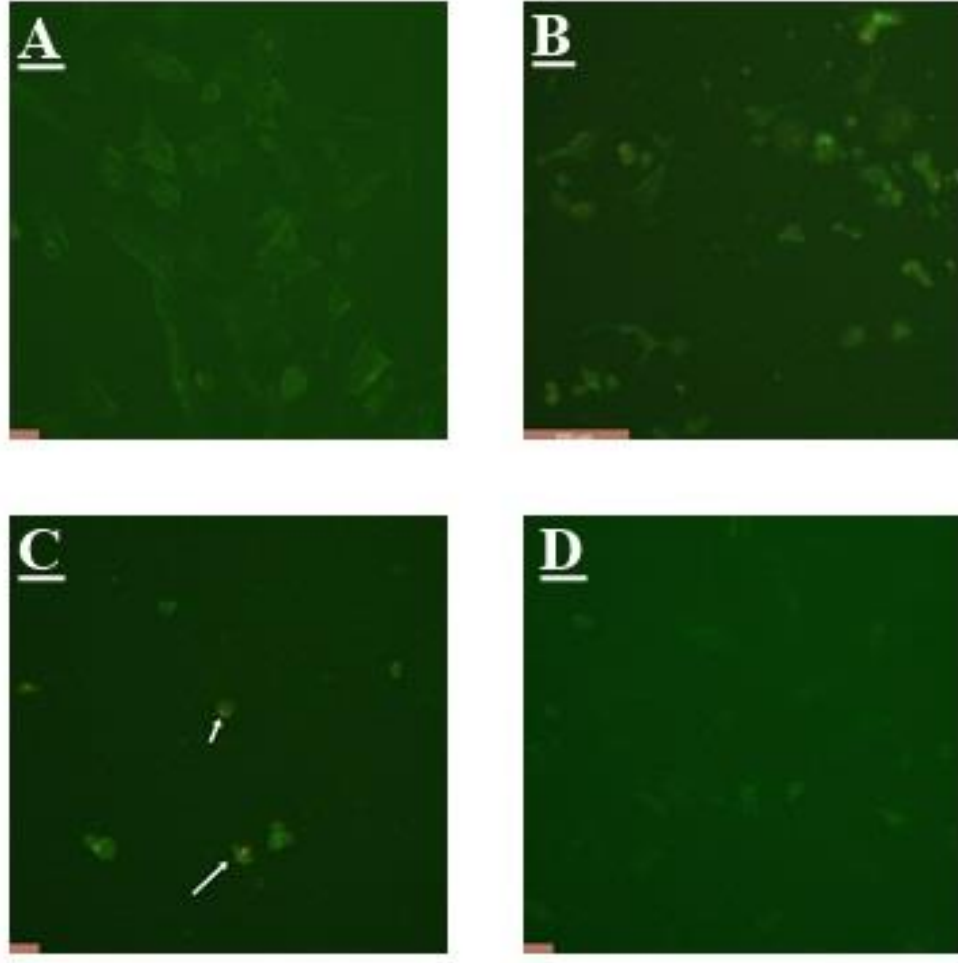
Şekil 3.2.11. 20, 50 ve 100 µg/ mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile apoptoza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 20 µg/ mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 50 µg/ mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 100 µg/ mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İnverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).



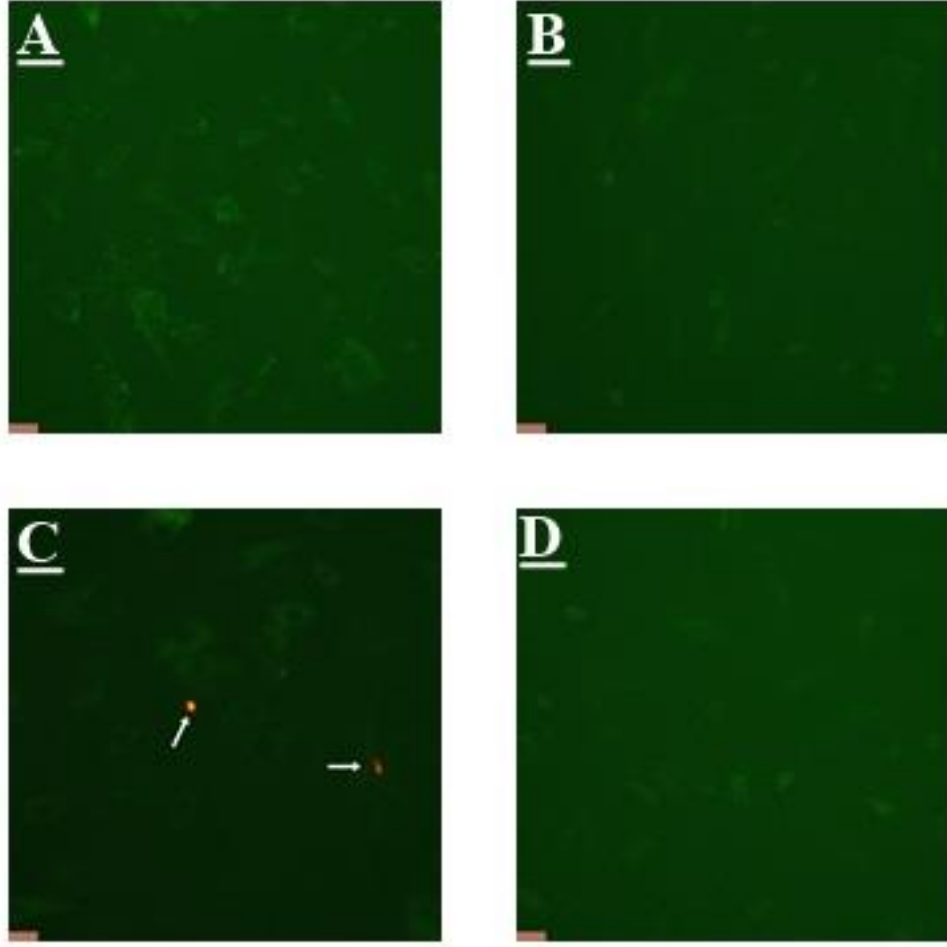
Şekil 3.2.12. 2, 4 ve 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).



Şekil 3.2.13. 2, 4 ve 10 µg/ mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 2 µg/ mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 4 µg/ mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 10 µg/ mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).



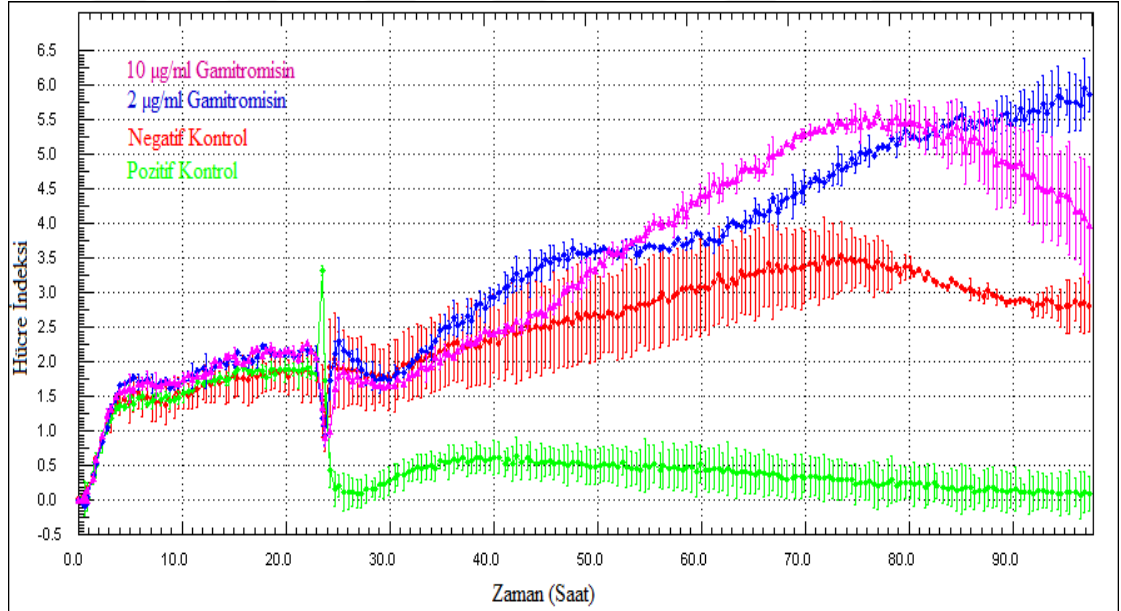
Şekil 3.2.14. 20, 50 ve 100 µg/ mL konsantrasyonlarda gamitromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 20 µg/ mL’de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 50 µg/mL’de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 100 µg/ mL’de gamitromisinin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).



Şekil 3.2.15. 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücrelerin, ikili boyama ile nekroza uğramış hücrelerinin görüntüsü, A) 20 µg/mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, B) 50 µg/mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, C) 100 µg/mL’de tulatromisin uygulanmış trakea epitel hücreleri, D) Kontrol grubu (Fotoğraflar Leica DM6000 İnverted Mikroskopta 20X büyütmede görüntülenmiştir).

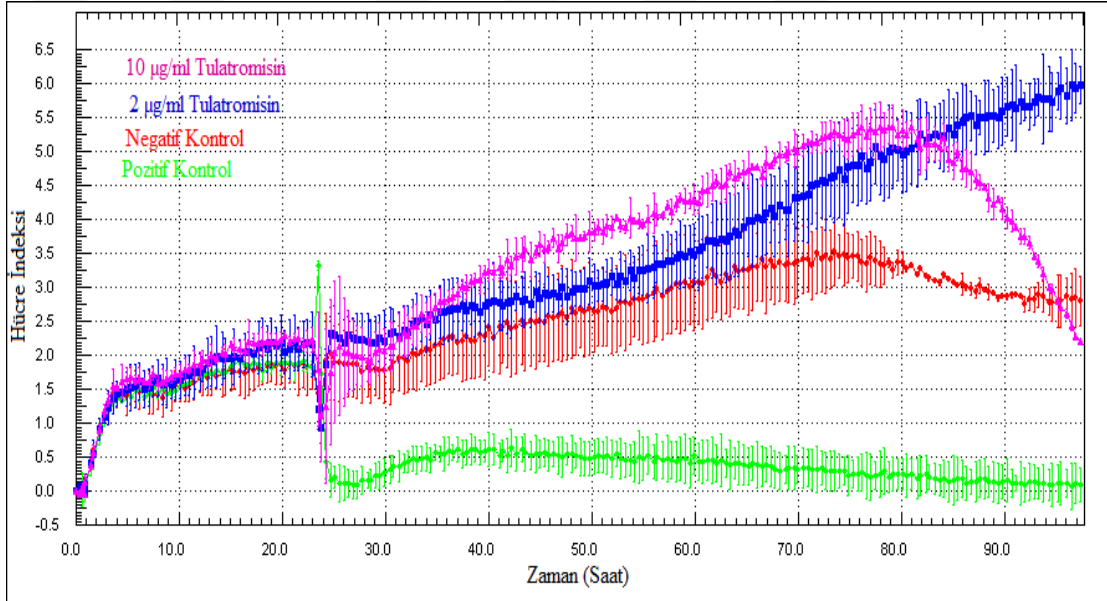
3.2.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Hücre Proliferasyonu Sonuçları

XCelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi; zamana bağlı olarak hücrelerin canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitesini göstererek değerlendirme olanağı vermektedir. Bu çalışmada, gamitromisinin uygulandığı trakea epitel hücrelerine ait proliferasyon grafiği şekil 3.2.16'da verilmiştir. Gamitromisinin 2 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları 24'inci saatte uygulanmıştır. 2 $\mu\text{g/mL}$ gamitromisin konsantrasyonu uyguladıktan sonra yaklaşık 50'inci saate kadar 10 $\mu\text{g/mL}$ gamitromisin konsantrasyonuna oranla proliferasyonu daha fazladır. Ancak bu saatten sonraki 40 saat boyunca 10 $\mu\text{g/mL}$ gamitromisin konsantrasyonu, 2 $\mu\text{g/mL}$ gamitromisin konsantrasyonuna oranla proliferasyonu daha fazla olduğu gözlenmiştir. 10 $\mu\text{g/mL}$ gamitromisin konsantrasyonu, uyguladıktan 65 saat sonra hücre proliferasyonunda düşüş gözlemlenirken, 2 $\mu\text{g/mL}$ gamitromisin konsantrasyonunda uyguladıktan 80 saat sonra bile hücre proliferasyonunda yükselmenin devam ettiği görülmektedir.



Şekil 3.2.16. 2 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda gamitromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri proliferasyon grafiği

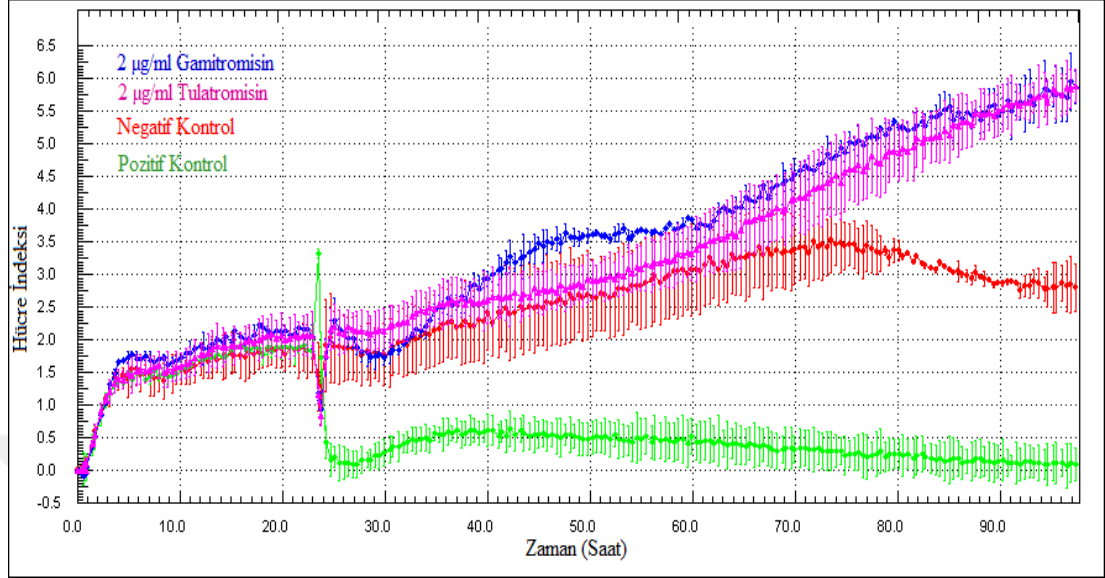
Bu çalışmada, tulatromisinin uygulandığı trakea epitel hücrelerine ait proliferasyon grafiği Şekil 3.2.17’de verilmiştir. Tulatromisinin 2 ve 10 µg/mL’lik konsantrasyonları 24’inci saatte uygulanmıştır. 2 µg/mL tulatromisin konsantrasyonu uyguladıktan sonra 10’uncu saate kadar 10 µg/mL tulatromisin konsantrasyona oranla proliferasyonu daha fazladır. Ancak konsantrasyonu uyguladıktan sonra yaklaşık 48’inci saate kadar 10 µg/mL tulatromisin konsantrasyonu, 2 µg/mL tulatromisin konsantrasyona oranla proliferasyonu daha fazla olduğu gözlenmiştir. 10 µg/mL tulatromisin konsantrasyonu, uyguladıktan 65 saat sonra hücre proliferasyonunda düşüş gözlemlenirken, 2 µg/mL tulatromisin konsantrasyonunda uyguladıktan 80 saat sonra bile hücre proliferasyonunda yükselmenin devam ettiği görülmektedir.



Şekil 3.2.17. 2 ve 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarda tulatromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri proliferasyon grafiği

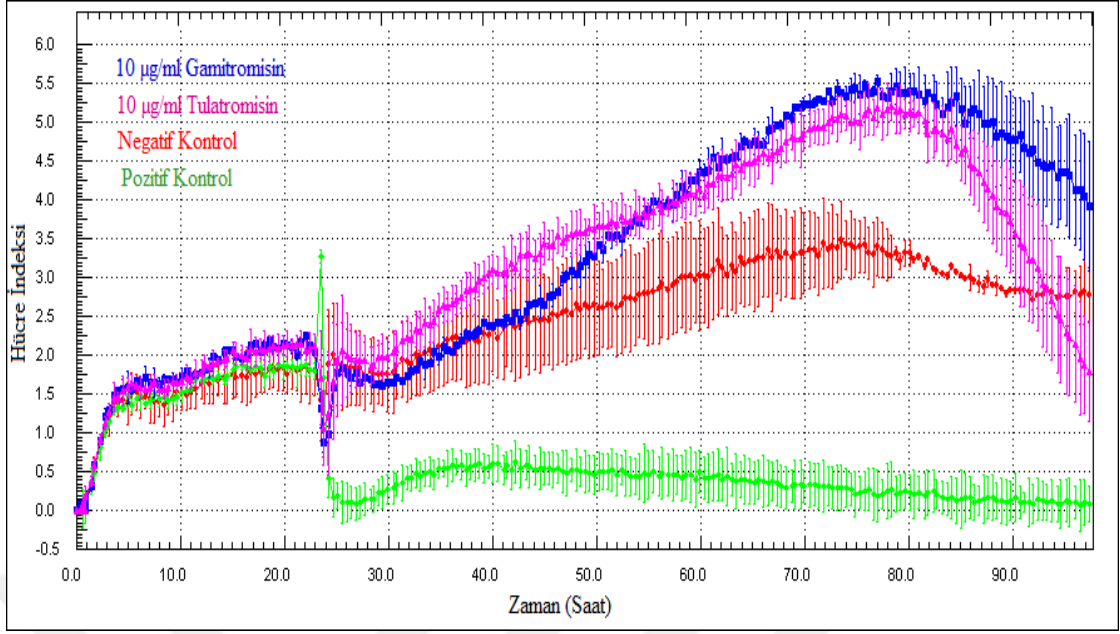
Trakea epitel hücreleri üzerine 2 µg/mL konsantrasyonda uygulanan gamitromisin ve tulatromisinin karşılaştırmalı proliferasyon grafiği Şekil 3.2.18’de verilmiştir. Bu iki etken maddenin trakea epitel hücrelerine uygulandıktan sonraki ilk 10 saat tulatromisinin gamitromisine göre proliferasyonu daha yüksektir. Bu proliferasyon sonuçları MTT testi sonuçlarına paraleldir. 10. saatten sonra yaklaşık 50 saat boyunca gamitromisin tulatromisine göre proliferasyon oranı daha yüksektir. Ayrıca trakea epitel hücrelerine uygulama yapıldıktan sonra gamitromisin ve

tulatromisinde proliferasyonda sürekli artış gözlemlenirken kontrol gruplarında belli bir saatten sonra proliferasyonun azaldığı görülmektedir.



Şekil 3.2.18. 2 µg/mL'lik konsantrasyonda gamitromisin ve tulatromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri karşılaştırmalı proliferasyon grafiği

Trakea epitel hücreleri üzerine 10 µg/mL konsantrasyonda uygulanan gamitromisin ve tulatromisinin karşılaştırmalı proliferasyon grafiği Şekil 3.2.19'da verilmiştir. Bu iki etken maddenin trakea epitel hücrelerine uygulandıktan sonraki ilk 30 saat tulatromisinin gamitromisine göre proliferasyonu daha yüksektir. Bu saatten sonra gamitromisin tulatromisine göre proliferasyon oranı daha yüksektir. Ayrıca gamitromisin ve tulatromisinin uygulama yapıldıktan sonra yaklaşık 54 saat boyunca trakea epitel hücrelerin de proliferasyon artış gözlemlenirken bu saatten sonra proliferasyonda azalma gözlemlenmiştir. Negatif kontrol grubunda, trakea epitel hücre proliferasyonu; yaklaşık ilk 52 saat artarken, bu saatten sonra azalma gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubunda hücre proliferasyonu; ilk saatlerde artış, sonra durma ve en son azalma görülmüştür.



Şekil 3.2.19. 10 µg/mL’lik konsantrasyonda gamitromisin ve tulatromisinin uygulandığı trakea epitel hücreleri karşılaştırmalı proliferasyon grafiği

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Veteriner sahada antibiyotik sağaltımının etkili bir şekilde yapılabilmesi için antibiyotik moleküllerinin temel kimyasal yapılarının, etki şekillerinin iyi anlaşılması, antimikrobiyel etkinliğinin iyi değerlendirilmesi, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin doğru bir şekilde saptanması önem arz etmektedir (Bambeke ve Tulkens 2001). Makrolidler kimyasal olarak makrosiklik lakton halkaya farklı deoksi- şeker grubu bağlanarak elde edilen önemli bir antibiyotik grubudur. Genel olarak *Gram pozitif* bakterilerin neden olduğu solunum yolu ve yumuşak doku hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotik gruplarından biri makrolid antibiyotiklerdir (Steel ve ark. 2012). Makrolidlerin; bakteriyostatik ve bakterisid etkilerinin yanında yangı önleyici etkileri de bulunmaktadır. Ayrıca bu antibiyotiklerin dokulara iyi nüfuz etmeleri ve hücre içine girmeleri olumlu yönleridir (Kwiatkowska ve Maślińska 2012).

Bu çalışmada gamitromisin ve tulatromisin adlı iki makrolid antibiyotiğın sığır izole trakea düz kas kasılmaları ve sığır trakea epitel hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve sitotoksik etkileri yanı sıra hücre proliferasyonu üzerine etkisi incelenmiştir.

4.1. İzole Organ Sistemi Deneyleri

Solunum yolu düz kası, solunum yolu hacmini kontrol eden unsurların en başında yer almaktadır. Solunum yolu düz kası üzerinde yapılacak olan çalışmalar; astım gibi solunum yolu hastalıklar sonucu ortaya çıkan fizyopatolojik durumların çözümüne fırsat sağlayabilir (An ve ark. 2007). Bakteriyel hastalıkların etiyolojik tedavisinde antibiyotikler özel bir yer tutar. Solunum yolu hastalıklarında en çok tercih edilen makrolidlerin sadece anti-bakteriyel etkinliğinin değil aynı zamanda solunum yolu

düz kasları üzerine etkileri de değerlendirilmelidir (Anadón ve Reeve-Johnson 1999, Panettieri ve ark. 2008, Kannan ve Mankin 2011, Pyörälä ve ark. 2014).

4.1.1. Gamitromisin ve Tulatromisinin Tek Başına Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi

Bir makrolid antibiyotik olan eritromisinin sıçan uterus düz kası kasılmaları üzerine etkisini araştıran Liu ve ark. (2003) derişime bağılı olarak kasılma sıklığının arttığını bildirmişlerdir. Eritromisinin 5×10^{-5} ve 5.5×10^{-4} M derişimleri; uterus düz kası üzerinde herhangi bir etki oluşturmazken, 1.55×10^{-3} M derişimi uterus düz kası kasılma sıklığını arttırdığını bulmuşlardır. Itoh ve ark. (1985) makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin ve oleandomisin gibi 14 üyeli makrolidlerin köpeklerin mide bağırsağında kasılma doğurucu ve endojen motilin salgılayıcı bir etkisi olduğunu ancak 16 üyeli lekomisin, asetilspiramisin ve tilosinin böyle bir etkiye sahip olmadığını saptamış; etkide oluşan bu farklılığı makrolidlerin kimyasal yapılarındaki farklılığa bağlamışlardır. Sunulan çalışmada dokularda tek başına gamitromisin ve tulatromisinin etki oluşturmaması bu ilaçların kimyasal yapılarındaki farklılığa bağlanabilir. Farklılık deneylerde kullanılan tür ve doku farklılığından da kaynaklanabilir. Tamaoki ve ark. (1995) eritromisinin *in vitro* insan izole bronşiyal şeritlerinin dinlenme tonunu değıştirmediğini göstermişlerdir. Trak ve ark. (2019) gamitromisinin sıçan uterus düz kası kasılmaları üzerine etkisini araştırmış ve gamitromisinin sıçan uterus kasılmaları üzerine tek başına bir etkisi olmadığını saptamıştır. Sunulan çalışmada sığır trakea düz kasına gamitromisin ve tulatromisinin derişimlerini (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} M) kümülatif olarak uygulanması sonucu, trakea düz kasında herhangi bir cevap oluşturmamıştır. Çalışılan dokular farklı olmakla birlikte bu çalışma Tamaoki ve ark. (1995) ve Trak ve ark. (2019) çalışmasıyla uyumludur.

4.1.2. Gamitromisin ve Tulatromisinin KCl ile ön kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi

Genel olarak düz kaslar; fazik (ileum, sidik kesesi, uterus vas deferens) ve tonik kaslar (solunum yolu ve damarlar) olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Bu düz kaslardan fazik olan kasların kasılmaları genellikle ritmik ve aralıklı olurken, tonik kasların kasılmaları ise sürekli ve yavaş gerçekleşmektedir (Dillon ve ark. 1981, Hai ve Murphy 1989, Fisher 2010, Kuo ve Erhlich 2015). Tonik kas sınıfında yer alan sığır trakea düz kasına 65 mM KCl uygulandığında kasın, kasılma şiddetinin yavaş yavaş arttığı (maksimum kasılmaya ulaşma süresi yaklaşık 15 dakika) ve maksimum kasılma seviyesinde belli süre (yaklaşık 120 dakika) devam ettiği görülmüştür (Kaneda ve ark. 2006). Sunulan çalışmada da KCl'in platoya erişmesi yaklaşık 30 dakika sürmüştür.

Potasyum klorür; Ca^{+2} dalgalı salınımını indükleyip, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) miktarının artışıyla birlikte solunum yolu düz kası hücrelerinin kasılmasına neden olmaktadır (Sanderson ve ark. 2008, Wang ve ark. 2010). Daenas ve ark. (2006) bir makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin, KCl (80 mM) ve karbakol (10^{-5} M) ile prekontrakte edilen tavşan trakeası üzerine etkisini incelemişlerdir. Karbakol (10^{-5} M) ile ön kasılma oluşturulan tavşan trakeası 10^{-6} ve 10^{-4} M azitromisin gevşeme yanıtı oluşturduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, azitromisinin 10^{-4} M derişimi, KCl (80 mM) ile prekontrakte edilen tavşan trakeasını gevşettiğini bulmuşlardır. Tulatromisin 1, 2, 4, 8 ve 16 mM derişimlerinin sıçan uterus kasılmaları üzerine etkisini araştıran Mehrdad ve ark. (2011) KCl (80 mM) ile prekontrakte edilen sıçan uterus düz kasının derişime bağlı olarak gevşediğini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, 65 mM KCl'le ön kasılma oluşturulmuş simental ırkı sığır trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimlerinin bir etkisi bulunmamıştır. Sunulan çalışmanın bahsi geçen çalışmalardan farklı olmasının nedeni etken maddelerinin; kimyasal yapılarının ve derişimlerinin, uygulandığı hayvan türlerinin ve dokularının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.1.3. Gamitromisin ve Tulatromisinin inkübasyonu sonrası ACh derişimlerinin Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi

Asetilkolin; parasempatik sinir sisteminin en önemli nöromedyotörüdür ve çeşitli düz kasları (ileum, sidik kesesi, solunum yolu ve damar gibi düz kasları) depolarize etmektedir. Asetilkolin, muskarinik reseptörleri aktive ederek kasılma olayını başlatmaktadır (Zholos ve ark. 2004). Asetilkolin derişimine bağılı olarak; sığır, domuz, kobay, sıçan ve fare trakea düz kasının kasılmasına neden olmaktadır (Kaneda ve ark. 2018). Trakea düz kası ACh ile uyarıldığında, trakea düz kas hücrelerinde eş zamanlı olmayan (tekrarlayan) Ca²⁺ dalgaları oluşmakta olup, (Dai ve ark. 2005) sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonunun geçici bir artışıyla kasılma meydana gelmektedir (Jones ve ark. 1993).

Tamaoki ve ark. (1995) makrolid grubu antibiyotikleri olan eritromisin, roksitromisin ve klaritromisinin bronşlar üzerine etkisini araştırmışlardır. Eritromisin, roksitromisin ve klaritromisinin (3×10^{-5} M) inkübasyonu sonrası ACh derişimlerinin oluşturduğu kasılmaları değıştirmedini bildirmişlerdir. Sunulan çalışma bahsi geçen çalışma ile uyumlu olup, gamitromisin ve tulatromisinin (3×10^{-5} M) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh (10^{-8} - 10^{-3} M) derişimlerinin oluşturduğu kasılmaların pD₂ (potens) ve E_{max} (efikasite) değerlerini değıştirmedini bulunmuştur. Çalışılan doku ve etken maddeler farklı olmakla birlikte, bu çalışmanın sonucu ile uyumludur (Tamaoki ve ark. 1995).

Asetilkolin EC₈₅ derişimi ile ön kasılma oluşturulan dokularda gamitromisinin 10^{-7} ve 10^{-6} M derişiminde az da olsa gevşeme yanıtları kontrolün gevşeme yanıtlarına göre istatistiksel bir farklılık bulunmuştur. Bu sebeple deneylere 10^{-6} M gamitromisin inkübasyonu da eklenmiştir. Sonuçta, istatistiksel olarak Bonfferroni düzeltmesi yapıldığında (P>0.016) önemli olarak bulunmasa da, gamitromisin inkübasyonu sayısal olarak kontrol grubuna göre ACh'nin E_{max} (efikasite) değerini düşürmüştür. Yani gamitromisin derişime bağılı şekilde ACh'nin maksimum etki derecesini azaltmıştır. Gamitromisin kullanılırken böyle bir etki ile karşılaşılabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

4.1.4. Gamitromisin ve Tulatromisinin ACh ön kasılma oluşturulan Sığır Trakea Düz Kası Üzerine Etkisi

Wang ve ark. (2019) azitromisinin; insan, fare, kobay ve tavşanın solunum yolu düz kası üzerine etkisine bakmışlardır. Azitromisin, ACh (10^{-4} M) derişimi uygulanması ile ön kasılma oluşturulmuş solunum yolu düz kası gevşeme yanıtı oluşturduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada solunum yolu düz kası üzerinde makrolid grubu antibiyotik olan roksitromisin ve klaritromisinin gevşeme yanıtının azitromisine göre daha az olduğu diğer antibiyotiklerin (aminoglikozitler, penisilin ve streptomisin) ise gevşeme yanıtı oluşturmadığını eklemiştir. Ayrıca azitromisin; L tipi voltaja bağlı kalsiyum kanalı ve M_2 reseptörünü inhibe edip sitolitik Ca^{+2} derişimini azaltarak solunum yolu düz kasında gevşeme oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışma sonuçları bahsi geçen çalışma ile uyumlu olup, gamitromisin (10^{-7} ve 10^{-6} M) her ne kadar azitromisin (10^{-5} M) kadar gevşeme yanıtı oluşturmasa da dilatasyon yapıcı etkisi olabileceği düşünülmektedir. Tamaoki ve ark. (1995), insan izole bronş şeritlerinde eritromisinin sinirsel kasılmaları azalttığını; bu azalmanın sebebinin muhtemelen solunum yolu düz kasında kolinerjik nöroeffektör iletimi önlemesi ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Aynı etkiyi roksitromisin ve klatromisin gibi diğer makrolid antibiyotiklerde de gösteren Tamaoki ve ark. (1995); aynı etkinin ampisilin ve sefazolinde oluşmadığını, dolayısıyla bu inhibitör etkinin makrolidler için özel olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada 2.3×10^{-4} M (EC_{85}) ACh ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin ve tulatromisin (10^{-10} - 10^{-5} M) derişimlerinin etkisine bakılmıştır. Gamitromisin 10^{-7} ve 10^{-6} M derişimlerinde asetilkolin ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasında gevşeme yanıtı görülürken, tulatromisin derişimlerinde gevşeme yanıtı görülmemiştir.

Trak ve ark. (2019) sıçan uterusunu oksitosin ve kloprostenol ile prekontrakte etmiş; ve prekontrakte edilen dokunun üstünde gamitromisinin bir etkisi olmadığını göstermişlerdir. Sunulan çalışmada da Trak ve ark. (2019) çalışması ile uyumlu olarak 10^{-5} M derişimde gamitromisin hem KCl hem de ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda gevşeme cevabı oluşturmamıştır. Bu sonuç kullanılan

derişimin önemine işaret etmektedir. Keza 10^{-7} ve 10^{-6} M derişimlerinde gamitromisin ACh kasılmalarını az da olsa önlemiştir.

4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Makrolidler; birçok ökaryot hücre tipine nüfuz etme ve birikme yeteneğine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı, solunum yolu epitel hücrelerini direkt etkilemekte olup, nötrofil ve makrofajlar kadar olmasa da hücre içinde birikmektedir (Čulić ve ark. 2001).

Hücrelerin, canlılık düzeyleri ve/ veya proliferasyon oranları, hücrelerin sağlık durumları hakkında bilgi veren en iyi göstergelerdir. Fiziksel veya kimyasal maddelerin konsantrasyonu, sıcaklığı ve uygulama süresi gibi unsurlar hücre sağlığı ve metabolizmasını etkilemektedir. Eğer bu maddeler; hücre zarını tahrip etme, protein sentezini önleme ve reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma gibi farklı mekanizmalara neden olurlarsa hücrelerde toksisite meydana gelmektedir. Bu sebeple *in vitro* hücre canlılığı veya sitotoksikite analizleri, ilaç ve kimyasalların sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Aslantürk 2018).

Duwelhenke ve ark. (2007) primer insan osteoblast, MG63 osteosarkom ve Hela epitel hücre dizisi üzerine 20 farklı antibiyotığın sitotoksik etkisini araştırmışlardır. 400 µg/mL'lik konsantrasyonda siprofloksasin ve moksifloksasin (%10- %20), klindamisin (% 25) ve eritromisin; (% 40) primer osteoblast hücreleri üzerine farklı oranlarda sitotoksik etki meydana getirdiğini göstermişlerdir. Makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin ve roksitromisinin, primer insan osteoblast hücreleri üzerine sitotoksik etki oranının konsantrasyona (100 µg/mL %20-30, 200 µg/mL%30-45, 400 µg/mL %40-60) bağlı olarak artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada siprofloksasin ve moksifloksasin (10 µg/mL), primer insan osteoblast hücresi proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Aynı etken maddelerinin MG63 osteosarkom ve Hela epitel hücre dizisi daha yüksek

konsantrasyonlarda proliferasyonu engellediğini ifade etmişlerdir. Diğer bir çalışmada; Stamatiou ve ark. (2009) azitromisinin (10^{-6} - 10^{-5} M) farklı konsantrasyonlarına fetal sığır serumu (%10) eklenip eklenmemesine göre, tavşan trakea düz kas hücreleri üzerine etkisine incelemişlerdir. Tavşan trakea düz kas hücreleri üzerine; azitromisin (10^{-5} M = 8.93 mg/L) uygulamasından 48 saat sonra hücre proliferasyonu %114.1, 72 saat sonra hücre proliferasyonun %99.5 olduğunu bildirmişlerdir. Viluksela ve ark. (1996), makrolid grubu antibiyotikleri olan eritromisin baz, eritromisin estolat, eritromisin 11,12 –siklik karbonat, roksitromisin, klaritromisin ve azitromisinin karaciğer hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu makrolid grubu antibiyotiklerin 4- 48 saat inkübasyonu sonrası karaciğer hücrelerine en sitotoksik olanının eritromisin estolat olduğu, ve sırasıyla eritromisin 11,12 –siklik karbonat, klaritromisin, roksitromisin, eritromisin baz, azitromisinin takip ettiğini bulmuşlardır. Bu antibiyotiklerin 72- 96 saat inkübasyonu sonrası karaciğer hücrelerine en az sitotoksik olanının eritromisin baz olduğu ve bunu sırasıyla azitromisin, klaritromisin, roksitromisin, eritromisin 11,12 –siklik karbonat ve eritromisin estolatın izlediğini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, bahsi geçen çalışmalarla uyumlu olup, maddelerin konsantrasyonuna bağlı olarak sitotoksitenin değiştiği saptanmıştır.

Sunulan bu çalışmada tulatromisin ve gamitromisinin; 2 µg/mL'den 300 µg/mL'ye doğru artan konsantrasyonuna paralel olarak trakea epitel hücresi sitotoksitesinde de artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçla doza bağlı olarak sitotoksiste de görülen artış diğer çalışmalarla uyumludur (Viluksela ve ark. 1996, Duewelhenke ve ark. 2007, Stamatiou ve ark. 2009).

Bazı ilaçların; izole edilmiş mitokondri ve hücre hatları üzerine sitotoksik etkisini araştırmışlar. Bu çalışmalar sonucu bazı ilaçlar tarafından oluşan sitotoksiste, hücrelerin mitokondriyal toksisite geçirmesinden dolayı meydana geldiğini bildirmişlerdir. Hücrelerde oluşan mitokondriyal toksisite artarsa; karaciğer, iskelet kası, böbrek ve kalp de organ toksisitesi meydana getirebilmektedir. Bu mitokondriyal toksisiteye neden ilaçlar arasında; anti-diyabetikler, kolesterol düşürücüler, anti-depresanlar, ağrı kesiciler (NSAID), bazı antibiyotikler (Florokinonlar, makrolidler) ve anti kanser ilaçları yer almaktadır (Will ve ark. 2019). Jiang ve ark. (2019) azitromisinin; insan MCF-12A ve fibroblast hücreleri

üzerinde mitokondriyal toksisite meydana getirip getirmediğini araştırmışlardır. Azitromisin artan konsantrasyonuna bağlı olarak; hücre proliferasyonunu azalttığını ve mitokondriyal toksisite meydana getirdiğini bildirmişleridir. Azitromisin gibi gamitromisin ve tultatromisin makrolid grubu antibiyotik sınıfında bulunmaktadır. Sunulan bu çalışmada her iki etken maddenin yüksek konsantrasyonları, azitromisin gibi hücre proliferasyonunda azalma meydana getirmektedir. Bu sebeple; gamitromisin ve tultatromisinin, trakea epitel hücreleri üzerinde oluşan toksisite, diğer makrolid grubu maddeler gibi mitokondriyal toksisite sonucu meydana gelebileceği düşünülmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda, gamitromisin ve tultatromisinin trakea epitel hücreleri üzerine sitotoksik etkisi konsantrasyona ve etken maddeye bağlı olarak değiştiği görüldü. MTT değerlerine göre etken maddelerinin IC₅₀ değerlerine bakıldığında, gamitromisinin IC₅₀ değeri (156±9 µg/mL) tultatromisinin IC₅₀ değerinden (134.7±7,1 µg/mL) daha yüksektir. Bu değerlere göre gamitromisin, tultatromisine göre trakea epitel hücreleri üzerinde güven aralığı daha yüksektir. Gamitromisin ve tultatromisinin trakea epitel hücreleri üzerine canlılık yüzdesi kıyaslandığında 2- 100 µg/mL konsantrasyonlarda tultatromisinin, 120-300 µg/mL konsantrasyonlarda ise gamitromisinin yüksek olduğu görüldü. Ancak istatistiksel olarak 150 µg/mL, 180 µg/mL ve 240 µg/mL'lik konsantrasyonlarda gamitromisinin hücre canlılığı tultatromisine göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu sebeple gamitromisin yüksek konsantrasyonlarda tultatromisine göre daha az sitotoksiktir.

Bu konsantrasyonlardan 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 50 µg/mL'de tultatromisin hücre canlılığı gamitromisine göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu dozlarda tultatromisinin hücre proliferatif yönü daha iyi olup, epitel hücre hasarlarına karşı koruyucu etkisi gamitromisine göre daha iyi olabileceği düşünülmektedir.

Apoptoz, tüm memeli dokularının gelişmesi ve korunmasında önemli rol oynamaktadır. Bu rolünü de; hasar görmüş, yaşlanmış veya sayıca fazla hücrelerin memeliye zarar vermeden programlanmış şekilde hücre ölümüne neden olmasıyla sağlamaktadır (Elliott and Ravichandran 2010). İnsan ve hayvan akciğer biyopsilerinden elde edilen bilgiler; apoptozun hücre proliferasyonu ve çeşitli

solunum yolu hastalıklarının gelişim sürecinde önemli etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Pierce ve ark. 2007).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda makrolidlerin makrofajlar ve epitel hücrelerine apoptoz yapıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Kwiatkowska ve Maślińska 2012). Duquette ve ark. (2015) domuz kan örneklerinden izole edilen nötrofil ve monosit kaynaklı makrofajların, tulatromisinin konsantrasyonu ve maruz kaldığı süreye bağlı olarak apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Moges ve ark. (2018) domuz kanlarından elde edilen nötrofil ve monosit kaynaklı makrofajlara 0.1, 1 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarda tilvalosine maruz bırakılıp, apoptoz, nekroz yapıcı etki ile sitokinlerin üretimindeki değişiklikleri incelemişlerdir. Tilvalosin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak, nekroz ve reaktif oksijen tür oluşumunu etkilemeden domuz nötrofil ve makrofajlarda apoptoza neden olduğunu ve nötrofillerin lökotiren B₄ üretimini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ishimatsu ve ark (2004); lenfositler üzerinde 2, 20 ve 200 µg/mL'lik konsantrasyonlarda azitromisin, klaritromisin ve josamisinin apoptoz yapıcı etkilerini araştırmışlardır. Lenfositler üzerine 200 µg/mL'lik konsantrasyonda; azitromisin (%44.1), klaritromisin (%49.6) ve josamisinin (% 21.6) uygulamasından 12 – 48 saat sonra erken dönem apoptoza uğramış hücrelerde artış görüldüğünü bildirmişlerdir. Aynı çalışmada azitromisin (%49.6), klaritromisin (%30.3) ve josamisinin (%6.2) uygulamasından 48 – 72 saat sonra geç dönem apoptoza uğramış hücrelerde zamana bağlı olarak artış görüldüğünü ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada; kullanılan gamitromisin ve tulatromisin adlı makrolid grubu antibiyotiklerin trakea epitel hücreleri üzerine apoptoz ve nekroz yapıcı etkileri, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değiştiği görüldü. Her iki maddenin konsantrasyonun yükselmesine bağlı olarak apoptoz etkisinin arttığı görülmesine rağmen istatistiksel olarak 20 µg/mL'lik konsantrasyonda apoptotik % indeksi sonuçları farkı önemli olup, gamitromisinin tulatromisine göre daha fazla apoptotik % indeksi daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Yapılan birçok çalışma apoptozun, rejenerasyon olayı arkasındaki itici güç olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, blastema formasyon durumu da dahil rejenerasyon olayının proliferatif yönü, apoptotik hücrelerden gelen sinyaller ile uyarılmaktadır (Fuchs ve steller 2011). Sunulan çalışmada; her iki maddenin de, trakea epitel hücrelerinde apoptoz yapıcı etkisi görülmüştür. Gerçek zamanlı hücre

analiz sistemi sonuçlarına göre, her iki maddenin 2 ve 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarında görülen hücre proliferasyonu arkasındaki itici gücün apoptotik hücrelerden gelen sinyaller tarafından olabileceği düşünülmektedir.

Makrolidler, hücre içine nüfuz etme ve birikme kabiliyeti bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı, hücre içi organizmalara karşı terapötik etkide göstermektedirler (Čulić ve ark. 2001). Solunum yolu epiteli; inhale patojenler (bakteri, virüs vb.) ve iritanlara karşı konak savunmasında önemli rol oynayan fizikokimyasal bariyerdir (Mills ve ark. 1999, Tam ve ark. 2011). Bu fizikokimyasal bariyerde yer alan solunum yolu epitel hücreleri; *in vitro* inflamatuvar mediatörlere maruz kalan, makrolidler epitel hasarına karşı koruyucu etki gösterir (Altenburg ve ark. 2011).

Bu fizikokimyasal bariyerde yer alan solunum yolu epitel hücreleri; *in vitro* inflamatuvar mediatörlere maruz kalırsa, solunum yolu epitel hasarı meydana gelmektedir. Makrolidler, böyle olaylar sonucu oluşan epitel hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir.

Sunulan çalışmada, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi sonuçlarına göre gamitromisin ve tultatromisinin düşük konsantrasyonlarında zamana bağlı olarak epitel hücre proliferasyonu artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.2.16 ve Şekil 3.2.17). Gamitromisin ve tultatromisinin hücre proliferasyonu arttırıcı özelliğinden dolayı, trakea epitel hücrelerinde meydana gelebilecek epitel hasarlarına karşı diğer makrolid grubu antibiyotikler gibi terapötik etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak makrolid antibiyotiklerin etkileri; kimyasal yapıları, kullanılan derişimleri ve uygulandıkları dokular ve hayvan türlerine bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Gamitromisin ve tultatromisin tek başlarına sığır trakea düz kas tonusunda değişikliğe yol açmazken, gamitromisin ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda az da olsa derişime bağlı olarak gevşeme etkisi göstermiştir. Bu etkinin pratik klinik uygulamalarında özellikle astım ya da solunum yolunda ödeme seyreden hastalıklarda tedaviye katkı sağlayabilir. Hücre içine nüfuz etme ve birikme kabiliyeti olan bu gamitromisin ve tultatromisinin trakea epitel hücrelerine sitotoksitesi çok düşük olup güvenli bir şekilde kullanılabilir. Bu antibiyotikler arasında güven aralığı gamitromisinin daha yüksektir. Her iki antibiyotiğin apoptoz

yapıcı etkileri; hücrelerin proliferasyon etkilerini artırarak hastalık etkeninin ilk karşılaştığı yer olan epitel hücrelerinde meydana gelebilecek hasarlara karşı hücreleri koruyabilir. Ayrıca gerçek zamanlı hücre analiz sistemi sonuçlarına göre gamitromisin ve tulatromisinin zamana bağlı olarak epitel hücre proliferasyonu artışı, bu antibiyotiklerin hastalık tedavisi sonrasında da koruyucu tedaviyi uzun süreli devam ettirebilir.



KAYNAKLAR

- ADAMS HR (2001) Cholinergic pharmacology: autonomic drugs. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Ed. HR ADAMS, 8th ed, Blackwell Publishing, Iowa, p: 120-123.
- ADRIAENSEN D, TIMMERMANS JP (2011) Breath-taking complexity of vagal C-fibre nociceptors: implications for inflammatory pulmonary disease, dyspnoea and cough, *J Physiol.*, 589(1): 3-4.
- AKERS RM, DENBOW DM (2008a) *Anatomy and Physiology of Domestic Animals*, 1st ed, Blackwell Publishing, Iowa, chapter 7.
- AKERS RM, DENBOW DM (2008b) *Anatomy and Physiology of Domestic Animals*, 1st ed, Blackwell Publishing, Iowa, chapter 14.
- ALTENBURG J, FRAAFF CSD, WERF TSVD, BOERSMA WG (2011) Immunodulatory effects of macrolide antibiotics- part1: biological mechanisms, *Respiration*,81: 67-74.
- AMER AMM, CONSTABLE PD, GOUDALH A, BADAWT SAE (2012) Pharmacokinetics of tulathromycin in lactating goats, *Small Ruminant Research*, 108, 137-143.
- AN SS, BAI TR, BATES JHT, BLACK JL, BROWN RH, BRUSASCO V, CHITANO P, DENG L, DOWELL M, EIDELMAN DH, FABRY B, FAIRBANK NJ, FORD LE, FREDBERG JJ, GERTHOFFER WT, GILBERT SH, GOSENS R, GUNST SJ, HALAYKO AJ, INGRAM RH, IRVIN CG, JAMES AL, JANSSEN LJ, KING GG, KNIGHT DA, LAUZON AM, LAKSER OJ, LUDWIG MS, LUTCHEN KR, MAKSYM GN, MARTIN JG, MAUAD T, MCPARLAND BE, MIJAILOVICH SM, MITCHELL HW, MITCHELL RW, MITZNER W, MURPHY TM, PARE PD, PELLEGRINO R, SANDERSON MJ, SCHELLENBERG RR, SEOW CY, SILVEIRA PSP, SMITH PG, SOLWAY J, STEGHENS NL, STERK PJ, STEWART AG, TANG DD, TEPPER RS, TRAN T, WANG L (2007) Airway smooth muscle Dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma, *Eur Respir J*, 29: 834-860.
- ANADÓN A, REEVE-JOHNSON L (1999) Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine, *Research in Veterinary Science*, 66: 197-203
- ANDERSSON RGG, GRUNDSTROM N (1987) Innervation of airway smooth muscle efferent mechanisms, *Pharmac Ther.*32: 107-130.
- ANTOSOVA M, MOKRA D, PEPUCHA L, PLEVKOVA J, BUDAY T, STERUSKY M, BENCOVA A (2017) Physiology of nitric oxide in the respiratory system, *Physiol. Res.*, 66(2): 159-172.

- ARUNVIKRAM K, MOHANTY I, SARDAR KK, PALAI S, SAHOO G, PATRA RC (2014) Adverse drug reaction and toxicity caused by commonly used antimicrobials in canine practice, *Veterinary World*, 7(5): 299-305.
- ASLANTÜRK ÖS (2018) In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages, *Genotoxicity- A Predictable Risk to Our Actual World*, Ed. M LARRAMENDY, Intech Open, London, p: 1-17.
- BAMBEKE FV, TULKENS PM (2001) Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18: 17-23.
- BARNES PJ (1987) Regulatory peptides in the respiratory system, *Experientia*, 43: 832-839.
- BARNES PJ (1989) Airway receptors, *Postgraduate Medical Journal*, 65,532-542.
- BARNES PJ (1990) Neural control of airway function: new perspectives, *Molec Aspects Med*, 11: 351-423.
- BECKMANN JD, TAKIZAWA H, ROMBERGER D, ILLIG M, CLAASSEN L, RICKARD K, RENNARD SI (1991) Serum-free culture of fractionated bovine bronchial epithelial cells, *In Vitro Cell Dev Biol*, 28a: 39-46.
- BENCHAOUI HA, NOWAKOWSKI M, SHERINGTON J, ROWAN TG, SUNDERLAND SJ (2004) Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 27: 203-210.
- BERGHAUS KJ, GIGUÉRE S, STURGILL TL, BADE D, MALINSKI TJ, HUANG R (2011) Plasma pharmacokinetics, pulmonary distribution, and *in vitro* activity of gamithromycin in foals, *J Vet Pharmacol Therap*, 35: 59-66.
- BERGNER A, SANDERSON MJ (2002) Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices, *Gen Physiol*, 119: 187-198.
- BILLINGTON CK, OJO OO, PENN RB, ITO S (2013) cAMP regulation of airway smooth muscle function, *Pulm Pharmacol Ther.*, 26(1): 112-120.
- BORTNER CD, OLDENBURG NBE, CIDLOWSKI JA (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis, *Trends in Cell Biology*, 5: 21-26.
- BROADLEY KJ (2006) β –Adrenoceptor responses of the airways: for better or worse?, *European Journal of Pharmacology*, 533: 15-27.
- BULSKA M, ORSZULAK-MICHALAK D (2014) Immunomodulatory and anti-inflammatory properties of macrolides, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 21(1): 61-64.
- BURET AG (2010) Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilmicosin, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 74: 1-10.

- CANNING BJ, FISCHER A (2001) Neural regulation of airway smooth muscle tone, *Respiration Physiology*, 125: 113-127.
- CATTALLI A, JANSSEN LJ (2004) Augmentation of bovine airway smooth muscle responsiveness to carbachol, KCl, and histamine by the isoprostane 8-iso-PGE₂, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: 1035-1041.
- CHATTERJEA MN, SHINDE R (2012) Textbook of Medical Biochemistry, 8th ed, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, London, p: 804-805.
- CHIN AC, LEE WD, MURRIN KA, MORCK DW, MERRILL JK, DICK P, BURET AG (2000) Tilmicosin induces apoptosis in bovine peripheral neutrophils in the presence or in the absence of *Pasteurella haemolytica* and promotes neutrophil phagocytosis by macrophages, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9): 2465-2470.
- CHU DTW (1999) Recent developments in macrolides and ketolides. *Current Opinion in Microbiology*, 2(5): 467-474.
- COULSON FR ve FRYER AD (2003) Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 98: 59-69.
- CRUCHTEN SV, BROECK VD (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis, *Anat Histol Embryol*, 31: 214-223.
- ČULIĆ O, ERAKOVIĆ V, PARNHAM MJ (2001) Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics, *European Journal of Pharmacology*, 429: 209-229.
- ÇİFTÇİ H, TÜRK M, TAMER U, KARAHAN S, MENEMEN Y (2013) Silver nanoparticles: cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells, *Turkish Journal of Biology*, 37:573-581.
- DAI JM, KUO K-H, LEO JM, BREEMEN CV, LEE C-H (2005) Mechanism of ACh-induced asynchronous calcium waves and tonic contraction in porcine tracheal muscle bundle, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290: 459-469.
- DAENAS C, HATZIEFTHIMIOU AA, GOURGOULIANIS KI, MOLYVDA PA (2006) Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle, *European Journal of Pharmacology*, 553: 280-287.
- DEDONDER KD, APLEY MD, LI M, GEHRING R, HARHAY DM, LUBBERS BV, WHITE BJ, KUKANICH B, RIVIERE JE, TESSMAN RK (2015). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gamithromycin in pulmonary epithelial lining fluid in naturally occurring bovine respiratory disease in multi source commingled feed lot cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic*, 39(2): 157-166.
- DIARRA MS, MALOUIN F, JACQUES M (1999) Postantibiotic and physiological effects of tilmicosin, tylosin, and apramycin at subminimal and supra-inhibitory concentrations on some swine and bovine respiratory tract pathogens, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12: 229-237.

- DILLON PF, AKSOY MO, DRISKA SP, MURPHY RA (1981) Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle, *Science*, 211: 495-497.
- DOONAN F, COTTER TG (2008) Morphological assessment of apoptosis, *Methods*, 44, 200-204.
- DUEWELHENKE N, KRUT O, EYSEL P (2007) Influence on mitochondria cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1): 54-63.
- DUQUETTE SC, FISCHER CD, WILLIAMS AC, SAJEDY S, FEENER TD, BHARGAVA A, RETI KL, MUENCH GP, MORCK DW, ALLISON J, LUCAS MJ, BURET AG (2015) Immunomodulatory effects of tulathromycin on apoptosis, efferocytosis, and proinflammatory leukotriene B₄ production in leukocytes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*-or zymosan-challenged pigs, *American Journal of Veterinary Research*, 76(6): 1-13.
- EDINGER AL, THOMPSON CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 663-669.
- EISENBRAND G, POOL-ZOBEL B, BAKER V, BALLS M, BLAAUBOER BJ, BOOBIS A, CARERE A, KEVEKORDES S, LHUGUENOT JC, PIETERS R, KLEINER J (2002) Methods of *in vitro* toxicology, *Food and Chemical Toxicology*, 40: 193-236.
- ELLIOTT MR, RAVICHANDRAN KS (2010) Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease, *JCB*, 189(7): 1059-1070.
- ELMORE S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol.*, 35(4): 495-516.
- European Medicines Agency (EMA) (2000) Alıntılama: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/erythromycin-erythromycin-thiocyanate-erythromycin-stearate-summary-report-1-committee-veterinary_en.pdf, Alıntılama tarihi: 09.09.2019
- EVANS NA (2005) Tulathromycin: an overview of a new triamilide antimicrobial for livestock respiratory disease, *Veterinary Therapeutics*, 6(2): 83-95.
- FINK SL, COOKSON BT (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells, *Infection and Immunity*, 73(4): 1907-1916.
- FISCHER CD, BEATTY JK, DUQUETTE SC, MORCK DW, ALLISON J, LUCAS MJ, BURET AG (2013) Direct and indirect anti-inflammatory effects of tulathromycin in bovine macrophages: inhibition of CXCL-8 secretion, induction of apoptosis, and promotion of efferocytosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3): 1385-1393.
- FISCHER CD, BEATTY JK, ZVAIGZNE CG, MORCK DW, LUCAS MJ, BURET AG (2011) Anti-inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis:

tulathromycin induces caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF-kappaB signaling and CXCL8 transcription, *Antimicrob Agents Chemother*, 55(1): 338-348.

- FISCHER CD, WILLIAMS AC, SAJEDY S, FEENER TD, BHARGAVE A, RETI KL, MUENCH GP, MORCK DW, ALLISON J, LUCAS MJ, BURET AG (2014) Immunomodulatory effects of tulathromycin on apoptosis, efferocytosis, and proinflammatory leukotriene B₄ production in leukocytes from *Actinobacillus pleuropneumoniae* or zymosan-challenged pigs, *AJVR*, 76(6): 1-13.
- FISHER SA (2010) Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function, *Physiol Genomics*, 42(3): 169-187.
- FORBES AB, RAMAGE C, SALES J, BAGGOTT D, DONACHIE W (2011) Determination of the duration of antibacterial efficacy following administration of gamithromycin using a bovine *Mannheimia haemolytica* challenge model, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2): 831-835.
- FRANDSON RD, WILKE WL, FAILS AD (2009a) *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 7th ed, Wiley-Blackwell, Lova, chapter 8.
- FRANDSON RD, WILKE WL, FAILS AD (2009b) *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 7th ed, Wiley-Blackwell, Lova, p: 324-325.
- FUCHS Y, STELLER H (2011) Programmed cell death in animal development and disease, *Cell*, 147(2): 742-758.
- GALLUZZI L, MAIURI MC, VITALE I, ZISCHKA H, CASTEDO M, ZITVOGEL L, KROEMER G (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications, *Cell Death and Differentiation*, 14: 1237-1243.
- GAMERDINGER M, DEUERLING E (2012) Makrolides: the plug is out, *Cell*, 151: 469-471.
- GARCIA-MARTINEZ V, MACIAS D, GAÑAN Y, GARCIA-LOBO MJ, FRANCIJA MV, FERNANDEZ-TERAN MA, HURLE JM (1993) Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud, *Journal of Cell Science*, 106: 201-208.
- GAO X, RAY R, XIAO Y, BARKER PE, RAY P (2007) Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the macrolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells, *BMC Cell Biology*, 8(17): 1-9.
- GAYNOR M, MANKIN AS (2003) Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3: 949-961.
- GERHOLD KA, BAUTISTA DM (2008) TRPA1: irritant detector of the airways, *J. Physiol*, 586(14): 3303.
- GIGUÈRE S (2013) Macrolides, azalides, and ketolides. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Ed. S GIGUÈRE, JF PRESCOTT, PM DOWLING, 5th ed, Wiley Blackwell, Lova, p:211-231.

- GINGERICH DA, BAGGOTJD, KOWALSKI JJ (1977) Tylosin antimicrobial activity and pharmacokinetics in cows, *Can. Vet. Jour.*, 18: 96-100.
- GRACE MS, BAXTER M, DUBUIS E, BIRRELL MA, BELVISI MG (2014) Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease, *British Journal of Pharmacology*, 171: 2593-2607.
- GRONEBERG DA, RABE KF, FISCHER A (2006) Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors, *European Journal of Pharmacology*, 553: 182-194.
- HAI CM, MURPHY RA (1989) Ca²⁺, crossbridge phosphorylation, and contraction, *Annu. Rev. Physiol.*, 5: 285-298.
- HAN JS, KIM SJ, NAM Y, LEE HY, KIM GM, KIM DM, SOHN UD (2019) The inhibitory mechanism on acetylcholine-induced contraction of bladder smooth muscle in the streptozotocin –induced diabetic rat, *Biomolecules Ther*, 27(1): 101-106.
- HARKEMA JR, GEORGE JST, HYDE DM, PLOPPER CG, MARIASSY A (1991) Epithelial cells of the conducting airways a species comparison, *The Airway Epithelium Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology*. Ed. SG FARMER, DWP HAY, Marcel Dekker, New York, p:3-39.
- HASANEEN NA, FODA HD, SAID SI (2003) Nitric oxide and vasoactive intestinal peptide as co-transmitters of airway smooth-muscle relaxation, *Chest*, 124(3): 1067-1072.
- HILDEBRAND F, VENNER M, GIGUÉRE S (2015) Efficacy of gamithromycin for the treatment of foals with mild to moderate bronchepneumonia, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29: 33-338.
- HIRSHMAN CA, LANDE B, CROXTON TL (1999) Role of M₂ muscarinic receptors in airway smooth muscle contraction, *Life Sciences*, 64: 443-448.
- HUANG RA, LETENDRE LT, BANAV N, FISCHER J, SOMERVILLE B (2009) Pharmacokinetics of gamithromycin in cattle with comparison of plasma and lung tissue concentrations and plasma antibacterial activity, *J Vet Pharmacol Therap*, 33: 227-237.
- ISHIMATSU Y, KADOTA J-I, IWASHITA T, NAGATA T, ISHII H, SHIKUWA C, KAIDA HI MUKAE H, KOHNO S (2004) Macrolide antibiotics induce apoptosis of human peripheral lymphocytes in vitro, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 49-55.
- ITOH Z, SUZUKI T, NAKAYA M, INOUE M, ARAI H, WAKABAYASHI K (1985) Structure-activity relation among macrolide antibiotics in initiation of interdigestive migrating contractions in the canine gastrointestinal tract, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 248(3): G320-G325.

- JELIĆ D, ANTOLOVIĆ R (2016) From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials, *Antibiotics*, 5(29): 1-13.
- JIA Y, LEE LY (2007) Role of TRPV receptors in respiratory diseases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772: 915-927.
- JIA Y, ZACOUR M, TOLLOCZKO B, MARTIN JG (1998) Nitric oxide synthesis by tracheal smooth muscle cells by a nitric oxide synthase-independent pathway, *The American Physiological Society*, 895-901.
- JIANG X, BAUCOM C, ELLIOTT RL (2019) Mitochondrial toxicity of azithromycin results in aerobic glycolysis and DNA damage of human mammary epithelia and fibroblasts, *Antibiotics*, 8(110): 1-17.
- JONES KA, HOUSMANS PR, WARNER DO, LORENZ RR, REHDER K (1993) Halothane alters cytosolic calcium transient in tracheal smooth muscle, *Am. J. Physiol.* 265: 80-86.
- KAM PCA, FERCH NI (2000) Apoptosis: mechanisms and clinical implications, *Anaesthesia*, 55: 1081-1093.
- KANEDA T, KANDA H, TAJIMA T, URAKAWA N, SHIMIZU K (2018) Imidazole-induced contraction in bovine tracheal smooth muscle are not dependent on the cAMP pathway, *J Vet Med Sci*, 80(2): 341-345.
- KANEDA T, SAKAGUCHI R, SHIMIZU K, URAKAWA N, NAKAJYO S (2006) Effects of high-K⁺, Na⁺-deficient solution on contractility of the smooth muscles of the bovine trachea, *J Vet Med.Sci*, 68(10): 1039-1045.
- KANEDA T, TAKEUCHI Y, MATSUI H, SHIMIZU K, URAKAWA N, NAKJYO S (2005) Inhibitory mechanism of papaverine on carbachol-induced contraction in bovine trachea, *J Pharmacol Sci*, 98: 275-282.
- KANNAN K, MANKIN AS (2011) Makrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action, *Ann. N. Y.Acad. Sci.*, 1241: 33-47.
- KANO S, RUBIN BK (2010) Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications, *American Society for Microbiology*, 23(3): 590-615.
- KAPPAGODA CT, RAVI K (2006) The rapidly adapting receptors in mammalian airways and their responses to changes in extravascular fluid volume, *Experimental Physiology*, 91(4): 647-654.
- KAYA S (2013) Kemoterapötikler. Veteriner Farmakoloji. Ed. S KAYA, 5. baskı, 2. cilt, Medisan, Ankara, s: 392-402.
- KELLERMANN M, HUANG RA, FORBES AB, REHBEIN S (2014) Gamithromycin plasma and skin pharmacokinetics in sheep, *Research in Veterinary Science*, 97: 199-203.

- KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.
- KILGORE WR, SPENSLEY MS, SUN F, NUTSCH RG, ROONEY KA, SKOGERBOE TL (2005) Therapeutic efficacy of tulathromycin, a novel triamilide antimicrobial, against bovine respiratory disease in feeder calves, *Veterinary Therapeutics*, 6(2): 143-153.
- KIRST HA, SIDES GD (1989) New directions for macrolides antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(9): 1419-1422.
- KOVALEVA A, REMMELTS HHF, RIJKERS GT, HOEPELMAN AIM, BIESMA DH, OOSTERHEERT JJ (2012) Immunomodulatory effects of macrolides during community-acquired pneumonia: a literature review, *J Antimicrob Chemother*, 67: 530-540.
- KÖNIG HE, LIEBICH HG (2007) Respiratory System. Veterinary Anatomy of Domestic Mammals. Ed. HE KÖNIG, HG LIEBICH, 3rd Ed, Schattauer, Stuttgart, p:384.
- KUO IY, EHRLICH BE (2015) Signaling in muscle contraction, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: 1-14.
- KÜRÜM A, KARAHAN S, KOCAMIŞ H, ÇINAR M, ERGÜN E (2019) Determination of antioxidant in bovine oviduct epithelial cell culture isolated at different periods of the estrous cycle, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43: 1-8.
- KWIATKOWSKA B, MAŚLIŃSKA M (2012) Macrolide therapy in chronic inflammatory diseases, *Mediators of Inflammation*, 2012:636157.
- LANE VM, GEORGE LW, CLEAVER DM (2006) Efficacy of tulathromycin for treatment of cattle with acute ocular moraxella bovis infection, *JAVMA*, 229(4): 557-561.
- LECHTENBERG KF, DANIELS CS, SCHIEBER T, BECHTOL DT, DRAG M, KUNKLE BN, CHESTER ST, TESSMAN RK (2011a) Field efficacy study of gamithromycin for the treatment of bovine respiratory disease associated with *Mycoplasma bovis* in beef and non-lactating dairy cattle, *Intern J Appl Res Vet Med*, 9(3): 225-232.
- LECHTENBERG K, TESSMAN RK ROMANO D (2011b) Efficacy of gamithromycin injectable solution for control of pneumonia in cattle challenged with *Histophilus somni* after treatment, *Intern J Appl Res Vet Med*, 9(3): 241-248.
- LI M, SHANG Y-X (2019) Neurokinin-1 receptor antagonist decreases $[Ca^{2+}]_i$ in airway smooth muscle cells by reducing the reverse-mode Na^+/Ca^{2+} exchanger current, *Peptides*, 115: 69-74.
- LIU H, ZHU T, MA Y, QU S (2003) Effect of erythromycin on contractile response of uterine smooth muscle strips in non-pregnant rats, *Polish Journal of Pharmacology*, 55: 57-62.

- LIU M, DOUTHWAITE S (2002) Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy, *PNAS*, 99(23): 14658-14663.
- MAJNO G, JORIS I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis an overview of cell death, *American Journal of Pathology*, 146(1): 3-15.
- MALETIĆ J, DJELIĆ N, RADAKOVIĆ M, MALETIĆ M, LAKIĆ N, KUKOLJ V, ALEKSIĆ N, ANDJELKOVIĆ M, STANIMIROVIĆ Z (2015) Evaluation of DNA damage in rat lymphocytes exposed to tulathromycin *in vitro*, *Genetica*, 47(1): 339-348.
- MANKIN AS (2008) Macrolide myhs, *Current Opinion in Microbiology*, 11: 414-421.
- MARTINEZ MM, REIF RD, PAPPAS D (2010) Detection of apoptosis: a review of conventional and novel techniques, *Analytical Methods*, 2: 996-1004.
- MATHIOUDAKIS AG, CHATZIMAVRIDOU-GRIGORIADOU V, EVANGELOPOULO E, MATHIOUDAKIS GA (2013) Vasoactive intestinal peptide inhaled agonist: potential role in respiratory therapeutics, *Hippokratia*, 7(1): 12-16.
- MCCONKEY DJ (1998) Biochemical determinants of apoptosis and necrosis, *Toxicology Letters*, 99: 157-168.
- MCMURPHY RM, DAVIS EG, RANKIN AJ, ARTZER MA, LUTJEMEJER BJ, KENNEY MJ (2018) Cholinergic Pharmacology: autonomic drugs, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Ed. RIVIERE JE, PAPICH MG, 10th, Jhon Wiley and Sons, Hoboken, p:151-162.
- MECHICHE H, GRASSIN-DELYLE S, PINTO FM, BUENESTADO A, CANDENAS L, DEVILLIER P (2011) Smooth muscle neurokinin-2 receptors mediate contraction in human saphenous veins, *Pharmacological Research*, 63: 414-422.
- MEHRDAD NG, YAGOOB A, SAEÏD S, SÏNA S (2011) Effects of tulatromycin (Draxxin) on contractility of isokated myometrium in rats, *Middle East Journal of Scientific Research*, 10(4): 496-500.
- MILLS PR, DAVIES RJ, DEVALIA JD (1999) Airway epithelial cells, cytokines, and pollutants, *Am J Respir Crit Care Med*, 160: 38-43.
- MITSUI-SAITO M, KARAKI H (1996) Carbachol but not acetylcholine inhibits contraction by the protein kinase c-dependent and independent pathways in the smooth muscle of guinea pig taenia caeci, *Jpn. J. Pharmacol*, 72: 23-28.
- MOGES R, LAMACHE DDD, SAJEDY S, RENAUX BS, HOLLENBERG MD, MUENCH G, ABBOTT EM, BURET AG (2018) Anti-inflammatory benefits of antibiotics: Tvlvalosin induces apoptosis of porcine neutrophils and macrophages, promotes efferocytosis, and inhibits pro-inflammatory CXCL-8, IL1 α , and LTB $_4$ production, while inducing the release of pro-resolving lipoxin A $_4$ and resolvin D1, *Frontiers in Veterinary Science*, 5(57): 1-13.

- MONTEIRO AJ, SILVA CG, VILLAR JC (2015) Cell spotting- let's fight cancer together, *Science in School*, 31: 46-52.
- NACCARI V, GIOFRÉ F, NACCARI F (2015) Tulathromycin in the treatment of respiratory infections in sheep, *International Journal Animal and Veterinary Advances*, 7(2): 34-39.
- NAKAJIMA T, HAZAMA H, HAMADA E, OMATA M, KURACHI Y (1995) Ionic basis of neurokinin-A-induced depolarization in single smooth muscle cells isolated from guinea-pig trachea, *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, 430: 552-562.
- NIEUWSTADT RAV, HAJER R, BREUKINK HJ (1994) Autonomic innervation of the airways, *The Veterinary Quarterly* 16(2): 110-114.
- NOWAKOWSKI MA, INSKEEP PB, RISK JE, SKOGERBOE TL, BENCHAOUI HA, MEINERT TR, SHERINGTON J, SUNDERLAND SJ (2004). Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin, a new triamilide antibiotic, in cattle. *Veterinary Therapeutics* 5: 60-74.
- NUTSCH RG, HART FJ ROONEY KA (2005) Efficacy of tulathromycin injectable solution for the treatment of naturally occurring swine respiratory disease, *Veterinary Therapeutics*, 6(2): 214-224.
- O'BRIEN MA, KIRBY R (2008) Apoptosis: a review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6): 572-585.
- OUEDRAOGO N, ROUX E (2014) Physiology of airway smooth muscle contraction: an overview, *J Pulm Respir Med*, 4(6): 1-6.
- PANETTIERI RA, KOTLIKOFF MI, GERTHOFFER WT, HERSHENSON MB, WOODRUFF PG, HALL IP, BANKS-SCHLEGEL S (2008) Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodeling, *Am J Respir Crit Care Med*, 177: 248-252.
- PAPICH MG (2011) Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large Animal, 4th ed, Elsevier Saunders, Missouri (The United States of America), p: 824-825
- PAPICH MG (2018) Chloramphenicol and Derivatives, Macrolides, Lincosamides, and Miscellaneous Antimicrobials, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Ed. RIVIERE JE, PAPICH MG, 10th, John Wiley and Sons, Hoboken, p:912-925.
- PAPICH MG, RIVIERE JE (2001) Chloramphenicol and derivatives, macrolides, lincosamides and miscellaneous antimicrobials. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ed. HR ADAMS, 8th ed, Blackwell Publishing, Iowa, p: 876-882
- PELAIA G, RENDA T, GALLELI L, VATRELLA A, BUSCETI MT, AGATI S, CAPUTI M, CAZZOLA M, MASELLI R, MARSICO SA (2008) Molecular mechanism underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma, *Respiratory Medicine*, 102: 1173-1181.

- PIERCE JD, PIERCE J, STREMMING S, FAKHARI M, CLANCY RL (2007) The role of apoptosis of respiratory diseases, *Clinical nurse specialist*, 21(1): 22-28.
- PİRİNÇCİ İ (2014) Parasempatomimetik İlaçlar. Veteriner Farmakoloji. Ed. S KAYA, 6. baskı, 1. cilt, Medisan, Ankara, s:393-400.
- PLOPPER CG, ADAMS DR (2006) Respiratory System. Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. Ed. JA EURELL, BL FRAPPIER, 6th ed, Blackwell Publishing, Iowa, p: 160.
- PYÖRÄLÄ S, BAPTISTE KE, CATRY B, DUJKEREN EV, GREKO C, MORENO MA, POMBA MCMF, RANTALA M, RUŽAUSKAS M, SANDERS P, THRELFALL EJ, TORREN-EDO J, TÖRNEKE K (2014) Macrolides and lincomides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance, *The Veterinary Journal*, 200: 230-239.
- RACKÉ K, MATTHIESEN S (2004) The airway cholinergic system: physiology and pharmacology, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 17: 181-198.
- RACKÉ K, JUERGENS UR, MATTHIESEN S (2006). Control by cholinergic mechanisms, *European Journal of Pharmacology*, 553: 57-68.
- RATZ PH, BERG KM, URBAN NH, MİNER AS (2005) Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus, *Am J Physiol Cell Physiol*, 288: C769-C783.
- REYNOLDS SD, PINKERTON KE, MARIASSY AT (2015) Epithelial Cells of Trachea and Bronchi, *Comparative Biology of the Normal Lung*, Ed. RA PARENT, 2nd ed, Elsevier, United States of America, p:61-81.
- ROBB EJ, TUCKER CM, CORLEY L, BRYSON WL (2007) Efficacy of tulathromycin versus enrofloxacin for initial treatment of naturally occurring bovine respiratory disease in feeder calves, *Veterinary Therapeutics*, 8(2): 127-135.
- ROGERIO AP, ANDRADE EL, CALIXTO JB (2011) C-fibers, but not the transient potential receptor vanilloid 1 (TRPV1), play a role in experimental allergic airway inflammation, *European Journal of Pharmacology*, 662: 55-62.
- ROUX E, MOLIMARD M, SAVINEAU J-P, MARTHAN R (1998) Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells, *Gen Pharmac*, 31: 349-356.
- RUPNIAK NMJ, KRAMER MS (2002) Substance P and related tachykinins, *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Ed. KL DAVIS, D CHARNEY, JT COYLE, C NEMEROFF, Lippincott, Williams & Wilkins, Pennsylvania, p: 169-177.
- SAMUELSON DA (2007) Textbook of Veterinary Histology, Saunders Elsevier, Missouri, p: 231-234.
- SANDERSON MJ, DEMOLTTE P, BAI Y, PEREZ-ZOGBHI JF (2008) Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity, *Proc Am Thorac Soc*, 5: 23-31.

- SAURIT AR, RUBIO M, BARONI E, ANDRÉS MS, SÁNCHEZ S, BOGGIO JC (2002) Some comparative aspects of the pharmacokinetics of tylosin in buffaloes and cattle, *Veterinary Research Communications*, 26: 49-54.
- SCHELEGLE ES, GREEN JF (2001) An Overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors, *Respiration Physiology*, 125: 17-31.
- SCHWARTZ LM, SMITH SW, JONES MEE, OSBORNE BA (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 980-984.
- SGOIFO RCA, VANDONI SL, BONFANTI M, FORBES AB (2010) Effects of arrival medication with gamithromycin on bovine respiratory disease in feedlot cattle in Italy, *Intern J Appl Res Vet Med*, 8(2): 87-96.
- SHINKAI M, PARK CS, RUBIN BK (2005) Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics, *Clinical Pulmonary Medicine*, 12(6): 341-348.
- SHORE SA, MOORE PE (2002) Effects of cytokines on contractile and dilator responses of airway smooth muscle, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29: 859-866.
- SHORE SA, MOORE PE (2003) Regulation of β - Adrenergic responses in airway smooth muscle, *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 137: 179-195.
- SILVA MG, VILLARINO NF, KNOWLES DP, SUAREZ CE (2018) Assessment of draxxin (tulathromycin) as a inhibitor of *in vitro* growth of *babesia bovis*, *babesia bigemina* and *theileria equi*, *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 8: 265-270.
- SIMKÓ J, LÓRINEZ I (2013) The cardiotoxicity of macrolides: the role of interactions, microbial pathogenes and strategies for combating them: Science, Technology and Education, Ed. A MÉNDEZ-VILAS, Formatex, Spain, Vol 3, p: 1941-1949.
- SIUGZDAITE J, GABINAITIENE A, KERZIENE S (2012) Susceptibility of *Mycoplasma bovis* Field isolates to antimicrobial agents, *Veterinarni Medicina*, 57(11): 575-582.
- SOLEAS JP, PAZ A, MARCUS P, MCGUIGAN A, WADDELL TK (2012) Engineering airway epithelium, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012:982971.
- SOMMER B, MONTAÑO LM, CHÁVEZ J, CARBAJAL V, GARCÍA-HERNANDEZ LM, IRLS C, JIMÉNEZ-GARDUÑO AM, ORTEGA A (2014) ROCK1 translocates from non-caveolar to caveolar regions upon KCl stimulation in airway smooth muscle, *Physiol. Res.*, 63: 179-187.
- STAMATIOU R, PARASKEVA E, BOUKAS K, GOURGOULIANIS KI, MOLYVDAS PA, HATZIEFTHIMIOU AA (2009) Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells, *Eur Respir J* 34: 721-730.
- STEEL HC, THERON AJ, COCKERAN R, ANDERSON R, FELDMAN C (2012) Pathogen- and host- directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics, *Mediators of Inflammation*, 1-17.

- STENKEN JA, POSCHENRIEDER AJ (2015) Bioanalytical chemistry of cytokines-A review, *Anal Chim Acta*, 835: 95-115.
- STROSBURG AD (1993). Structure, function, and regulation of adrenergic receptors, *Protein Science*, 2: 1198-1209.
- TAM A, WADSWORTH S, DORSCHER D, MAN SFP, SIN DD (2011) The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther Adv Respir Dis*, 5(4): 255-273.
- TAMAOKI J, TAGAYA E, SAKAI A, KONNO K (1995) Effects of macrolide antibiotics on neurally mediated contraction of human isolated bronchus, *J Allergy Clin Immunol*, 95(4): 853-859.
- TANAKA Y, HORINOUCHE T, KOIKE K (2005) New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32: 503-514.
- TANG DC, STULL JT, KUBOTA Y, KAMM KE (1992) Regulation of the Ca^{2+} dependence of smooth muscle contraction, *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (17): 11839-11845.
- TESFAIGZI Y (2006) Roles of apoptosis in airway epithelia, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34: 537-547.
- THIRSTRUP S (2000a) Control of airway smooth muscle tone. I- Electrophysiology and contractile mediators, *Respiratory Medicine*, 94: 328-336.
- THIRSTRUP S (2000b) Control of airway smooth muscle tone: II- pharmacology of relaxation, *Respiratory Medicine*, 94: 519-528.
- TOHAMY MA, EL-GENDY AAM, ATTIA TA (2011), Some pharmacokinetic aspects of tulathromycin in fresian cattle calves, *Journal of American Science*, 7(5): 651-655.
- TRAK T, YILDIRIM E, YURDAKÖK DİKMEN B (2019). Gamitromisinin in vitro rat uterus düz kası üzerine etkisi. I. Uluslararası VI. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, 4-7 Eylül. 2019, Ed., Altıntaş L, Ekici H, Kayseri, s.413.
- TRUMP BF, CHANG SH, PHELPS PC (1997) The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis, *Toxicologic Pathology*, 25: 82-88.
- URBAN-CHMIEL R, WERNICKI A, LISIECKA U, PUCHALSKI A, DEC M, STEGIERSKA D, KUREK L (2017) The effect of selected macrolides on the properties of bovine leukocytes, *Veterinarski Arhiv*, 87(5): 571-584.
- VEIT HP, FARRELL RL (1978) The anatomy and physiology of the bovine respiratory system relating to pulmonary disease, *The Cornell Veterinarian*, 68(1): 555-581.
- VILLARINO N, MARTÍN-JIMÉNEZ T (2012) Pharmacokinetics of macrolides in foals, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36: 1-13.

- VILLARINO N, BROWN SA, MARTÍN-JIMÉNEZ T (2013a) The role of the macrolide tulathromycin in veterinary medicine, *The Veterinary Journal*, 198: 352-357
- VILLARINO N, BROWN SA, MARTÍN-JIMÉNEZ T (2013b) Understanding the pharmacokinetics of tulathromycin: a pulmonary, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 37: 211-221.
- VILLARINO N, DENNY JE, SCHMIDT NW (2015) Antimalarial activity of tulathromycin in a murine model of malaria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6): 3672-3674.
- VILUKSELA M, VAINIO PJ, TUOMINEN RK (1996) Cytotoxicity of macrolide antibiotics in a cultured human liver cell line, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38: 465-473.
- WANG IY, BAI Y, SANDERSON MJ, SNEYD J (2010) A mathematical analysis of agonist- and KCl-induced Ca^{2+} oscillations in mouse airway smooth muscle cells, *Biophysical Journal*, 98: 1170-1181.
- WANG Q, YUM-F, ZHANG W-J, LIU B-B, ZHAO Q-Y, LUO X, XU H, SHE Y-S, ZANG D-A, QIU J-Y, SHEN J, PENG Y-B, ZHAO P, XUE L, CHEN W, MA L-Q, NIE X, SHEN C, CHEN S, CHEN S, LIU Q, DAI J, QIN G, ZHENG Y-M, WANG Y-X, ZHUGE R, CHEN J, LIU Q-H (2019) Azitromisin inhibits muscarinic 2 receptor-activated and voltage-activated Ca^{2+} permeant ion channels Ca^{2+} and sensitization, relaxing airway smooth muscle contraction, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 46: 329-336.
- WANG X, TAO YF, HUANG LL, CHEN DM, YIN SZ, IHSAN A, ZHOU W, SU SJ, LIU ZL, PAN YH, YUAN ZH (2011) Pharmacokinetics of tulathromycin and its metabolite in swine administered with an intravenous bolus injection and a single gavage, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 35: 282-289.
- WHITE SR (2011) Apoptosis and the airway epithelium, *Journal of Allergy*, 2011:948406
- WIDDICOMBE JG (1982) Pulmonary and respiratory tract receptors, *J. Exp. Biol*, 100: 41-57.
- WIDDICOMBE JG (1998) Autonomic Regulation i-NANC/ e-NANC, *Am J Respir Crit Care Med*, 158: 171-175.
- WIDDICOMBE JG (2001) Airway receptors, *Respiration Physiology*, 125:3-15.
- WILL Y, SHIELDS JE, WALLACE KB (2019) Drug-induced mitochondrial toxicity in the geriatric population: challenges and future directions, *Biology*, 8(32): 1-14.
- WOMBLE A, GIGUÉRE S, MURTHY YVSN, COX C, OBARE (2006) Pulmonary disposition of tilmicosin in foals and *in vitro* activity against *rhodococcus equi* and other common equine bacterial pathogens, *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 29:561-568.
- WYNS H, MEYER E, PLESSERS E, WATTEYN A, BAERE SD, BACKER PD, CROUBELS S (2014) Pharmacokinetics of gamithromycin after intravenous and subcutaneous administration in pigs, *Research in Veterinary Science*, 96: 160-163.

- YOUNG G, SMITH GW, LEAVENS TL, WETZLICH SE, BAYNES RE, MASON SE, RIVIERE JE, TELL LA (2011) Pharmacokinetics of tulathromycin following subcutaneous administration in meat goats, *Research in Veterinary Science*, 90: 477-479.
- YU J (2005) Airways mechanosensors, *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 148:217-243.
- ZEISS CJ (2003) The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice, *Vet Pathol*, 40: 481-495.
- ZHANEL GG, DUECK M, HOBAN DJ, VERCAIGNE LM, EMBIL JM, GIN AS, KARLOWSKY JA (2001) Review of macrolides and ketolides, *Drugs*, 61(4): 443-498.
- ZIEGLER U, GROSCURTH P (2004) Morphological features of cell death, *News Physiol Sci*, 19: 124-128.
- ZHOLOS AV, BOLTON TB, DRESVYANNIKOV AV, KUSTOV MV, TSVILOVSKII VV, SHUBA MF (2004) Cholinergic excitation of smooth muscles: multiple signaling pathways linking M₂ and M₃ muscarinic receptors to cationic channels, *Neurophysiology*, 36(5/6): 398-406.



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



TS-EN-ISO 9001
KALİTE SİSTEM BELGESİ

Sayı : 60821397-010.99-
Konu : Etik Kurul

SAYIN DOÇ.DR.EBRU YILDIRIM

İlgi : 24.08.2017 tarihli dilekçeniz.

15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Çalışma Usül ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 8.Maddenin , (k) bendinin 2.fıkrasında yer alan "Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetuslar ile yapılan prosedürler.," in etik kurul iznine gerek olmadığı açık bir şekilde yazılı olup "Sığırlarda Tulatromisin ve Gamitromisinin Trakea Düz Kasının Kasılması ile Trakea Epitel Hücreleri Üzerine Apoptotik,Nekrotik ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması" isimli projeniz, Yönetmeliğin ilgili maddesi kapsamında değerlendirilerek etik kurul onayına gerek duyulmamıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır

Prof.Dr.Siyami KARAHAN
Etik Kurulu Başkanı

**Belgenin Aslı
Elektronik İmzalıdır**

Hakan BAYRAM
Bilgisayar İşletmeni

Evrak Doğrulamak İçin : <http://dogrulama.kku.edu.tr/envision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE8A3KYV4>

Merkez Yerleşke 71450 Yahşihan/Kırıkkale
Telefon No: 0 (318) 357 42 42 Faks:
E-Posta: İnternet Adresi:www.kku.edu.tr

Bilgi için: Hakan BAYRAM
Unvan: Memur
Telefon No: 03183574242-1467



ÖZGEÇMİŞ

A. KİŞİSEL BİLGİLER

1. Adı Soyadı : Yaşar ŞAHİN
2. Doğum Yeri ve Tarihi : Serik/ANTALYA, 1987
3. Cep Telefonu : 0532 174 01 57
4. Mail adresi : yasarsahin06@hotmail.com
5. Adres : Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz
Deneysel Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı/ Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

B. EĞİTİM DURUMU

1. İlköğretim : Çandır Ş. Ö. M. S. KÜÇÜK İlköğretim Okulu
2. Lise : Serik Yabancı Dil Ağırlıklı Lise
3. Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi -2011
4. Ön Lisans : Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi
Adalet Bölümü -2014
5. Lisans : Akdeniz Üniversitesi Hukuk Fakültesi-2018
6. Doktora : Kırıkkale Üniversitesi- Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimler Enstitüsü Ortak Program, Farmakoloji ve Toksikoloji – 2015
(Halen devam ediyor)

C. MESLEKİ DENEYİM

1. Biomed İlaç ve Kimya San. Tic. Ltd. Şti. 2011-2012
2. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Kırıkkale İl Müdürlüğü-2013(8 Ay)
3. Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Araştırma ve Uygulama
Laboratuvarı- Sorumlu Veteriner Hekim, 2013-2017
4. Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı - 2017 (Halen devam ediyor)
5. Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Araştırma ve Uygulama
Laboratuvarı (Görevlendirme- 2018 Halen devam ediyor)
- 6.

D. ÜYELİKLER

1. Türk Veteriner Hekimler Birliği Merkez Konsey yedek üyeliği (2012-2014)
2. Türk Veteriner Hekimler Birliği Vakfı Genel Sekreterliği (2013-2015)

3. Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2015- Halen devam ediyor)

E. SERTİFİKA VE KATILIM BELGELERİ

1. Radyoloji Sertifikası
2. Veteriner Sağlık Ürünleri Değerlendirme ve eğitimi Katılım belgesi
3. Topluluk Önünde Söz Söyleme ve Diksiyon Sertifikası
4. Laboratuvar Hayvanları Bilimi 3. Ulusal Kongresi Katılım Belgesi
5. 4. Ulusal Laboratuvar Hayvanları Kongresi Katılım Belgesi
6. Sığırlarda Recto- Vaginal Metodla Suni tohumlama Sertifikası
7. Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası
8. Arı Çalıştayı (Vet- ARI7) Katılım Belgesi
9. Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programına Dair Genel ve Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik ile ilgili Bilgilendirme Toplantısı Katılım Belgesi
10. Buzağı Sempozyumu Katılım Belgesi
11. Akdeniz Veteriner Hekimliği Kongresi Katılım Belgesi
12. IV. Türk Veteriner Hekimliği Kurultayı Katılım Belgesi
13. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulları Eğitim Semineri Katılım Belgesi

F. BİLİMSEL ARAŞTIRMA FAALİYETLERİ

1. 2019/017 İskemik kolon anastomoz iyileşmesinde proton pompa inhibitörü olan Esomeprazole'nın etkisi (Yardımcı Araştırmacı) Devam ediyor.
2. 2018/072 Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı Olan Obez Rat'larda Tiyo/Disülfid Dengesinin Araştırılması (Yardımcı Araştırmacı) Devam ediyor.
3. 2018/047 Sığırlarda Tulatromisin Ve Gamitromisinin Trakea Düz Kasının Kasılması İle Trakea Epitel Hücreleri Üzerine Apoptotik, Nekrotik Ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması (Yardımcı Araştırmacı) Proje tamamlandı.
4. 2018/003 Rat Overinde İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonrası Krill Oil' in Over Üzerindeki Protaktif Etkisinin Araştırılması (Yardımcı Araştırmacı) Proje tamamlandı.
5. 2016/132 Ratlarda Fluoksetin, Sertralin, Paroksetin ve Essitalopram Gibi Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörlerinin Spermatogenetik Aktivite ve Spermatozoa Üzerine Etki Mekanizması (Yardımcı Araştırmacı) Proje tamamlandı.

Yayınlanmış Bilimsel Makaleler

1. EKICI HÜSAMETTİN, **ŞAHİN YAŞAR** Çevre Kirletici Maddelerin Hayvanlarda Nefrotoksik Etkileri, Nephrotoxic Effects of Environmental Pollutants in Animals. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics 2018;4(1):38-45.
2. ÇINAR MİYASE, **ŞAHİN YAŞAR** Hayvanlarda Çevre Kirletici Maddelerin Oksidatif Hasar Üzerine Etkileri, Effects of Environmental Pollutants on the Oxidative Damage in Animals. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics 2018;4(1):46-57
3. Yıldırım E, **Şahin Y.** Veteriner Hekimlikte İzole Organ ve Doku Çalışmalarının Önemi. Güvenç D, editör. İlaç Araştırma Geliştirme ve Toksikolojik Çalışmalarda Kullanılan Alternatif Yöntemler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2019. p.48- 52. (Kitap Bölümü)
Uluslararası :
4. YERAL İLKİN, SAYAN D. CEMİLE, KARACA GÖKHAN, ŞİMŞEK YAVUZ, SAĞSOZ NEVİN, OZKAN S. ZEHRA, ATASOY PINAR, **ŞAHİN YAŞAR**, NESELİOĞLU SALİM, EREL OZCAN. What is the protective effect of krill oil on rat ovary against ischemia- reperfusion injury. The Journal Obstetrics and Gynaecology Research 2018; <https://doi.org/10.1111/jog.13876>