

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Doğumun 21-37. gebelik haftaları içerisinde başlamasına erken doğum eylemi denir. Fetusun anne karnındaki gelişimini tam olarak tamamlamadan doğumun gerçekleşmesi, perinatal mortalite ve morbiditeyi artıran önemli bir nedendir. Gebeliğin ikinci yarısından itibaren tüm gebeliklerin %10'unda erken doğum eylemi görülmektedir. Son yıllarda obstetrik ve neonatolojideki gelişme ve ilerlemelere rağmen prematürite, perinatal morbidite ve mortalitenin %75'inden sorumludur (1).

Erken doğum eylemini başlatan nedenler halen tam olarak açıklanamamıştır (2). Ana fizyopatolojik mekanizmanın gebelik süresince sessiz kalan miyometriyal aktivitenin bozulması olduğu bilinmektedir (3). Enfeksiyon, fetal hipoksi, endokrin, parakrin ve plasental değişiklikler gibi predispozan faktörler sonucu erken doğum meydana gelmektedir (2). Bu olguların %50'sinde belirli bir etyolojik neden saptanamaz ve idiopatik erken doğum eylemi olarak tanımlanır. Etiyolojik risk faktörleri olarak obstetrik nedenler ve sosyo-demografik özellikler sayılabilir. Erken doğum eyleminde düşük sosyo-ekonomik düzey, küçük veya ileri yaş, ilk gebelik, sigara içme alışkanlığı sosyo-demografik risk faktörleridir. Hipertansiyon, diyabet, astım gibi hastalıklar da erken doğum eylemi sıklığını artırmaktadır (4). Bu faktörlerin biri veya bir kaçından birden erken doğum eylemine neden olabilir.

Erken doğum eyleminin nedenlerinin tam olarak bilinmemesinden dolayı geliştirilen tedavi yöntemlerinde istenen düzeye ulaşılamamıştır (2). Erken

doğum eyleminde başlıca tedavi yöntemi tokolizdir. Tokoliz miyometriyal kasılmaların baskılanarak, bu kasılmalara yol açan nedenlerin ortadan kaldırılmasıdır. Tokolitik ajan olarak beta-adrenerjik agonistler (ritodrin ve terbutalin gibi), magnezyum sülfat, dihidropridin tipi kalsiyum kanal blokörleri (nifedipine ve nimodipin gibi), prostaglandin sentez inhibitörleri (indometazin gibi) ve oksitosin antagonistleri (atosiban gibi) kullanılmaktadır (5). Beta-2 adrenoseptör agonisti olan ritodrin, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu'nun (FDA: *Food and Drug Administration*) onayı olan ve en sık kullanılan tokolitik ilaçtır. Bu ilaçların etkinlikleri bir çok klinik çalışmada araştırılmış olup, çoğunun gebeliği uzatıcı etkilerinin birbirlerinden farksız olduğu bildirilmiştir (2, 4). Ayrıca bu ilaçların, her birinin kendine özgü oldukça ciddi yan etkilerinin bulunması nedeniyle halen yeni tokolitik ajanların geliştirilmesi konusunda bir çok klinik çalışma yapılmaktadır.

Son zamanlarda farklı insan dokularında çeşitli fonksiyonları olan beta-3 adrenoseptör tanımlanmıştır (6). Bu reseptörün gastrointestinal, üriner, respiratuar sistem ve vasküler düz kas hücrelerinde gevşetici etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir (7-10).

Yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkması nedeniyle erken doğan bebeklerde yaşam beklentisi artmıştır. Erken doğum eyleminin tedavisi, yenidoğanın morbiditesini ve mortalitesini azaltmak için uygulanan diğer tedavilere fırsat tanıma açısından önem taşımaktadır. Ayrıca yenidoğanın ileri bakım imkanı olan bir merkeze gönderilmesine de olanak sağlanabilmektedir. Zamanında tanı konulan ve gerekli tedavinin yapıldığı olgularda yenidoğan mortalite ve morbiditesi önemli ölçüde azaltılabilir (2). Tokolitik tedavinin önemi nedeniyle bu konuda in vivo ve in vitro araştırmalar halen devam etmektedir. İn vivo uygulanan ilaçların etki mekanizması, metabolizması, etki profili ve etkinliği birçok faktör tarafından etkilendiğinden in vitro araştırmalar daha değerlidirler (11).

Bu çalışmanın amacı, erken doğum eylemi tedavisinde tokolitik ilaç olarak kullanılabilircek selektif ve uzun etkili beta-3 agonist CL 316243'ün gebe sıçan miyometriyumu üzerinde in vitro gevşetici etkilerini ve bu etkiden sorumlu β -reseptör alt-tiplerini incelemek ve karşılaştırmaktır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. Erken Doğum Eylemi

Erken doğum eylemi, düzenli uterin kontraksiyonlar ile birlikte ilerleyici servikal dilatasyon ve silinmenin 21-37'inci gebelik haftaları içinde başlamasıdır (1). Erken doğum eyleminin genel popülasyondaki sıklığı % 10'dur. Erken doğum eylemi infeksiyon, fetal hipoksi, endokrin, parakrin ve plasental değişiklikler gibi predispozan faktörler sonucu meydana gelen bir sendromdur. Erken doğum eyleminin gerçekleşme nedenine ilişkin bir çok teori üretilmiştir. Genel olarak maternal, plasental, fetal ve çoğunlukla da idiyopatik nedenler söz konusudur (12). Prematür yenidoğanlar bronko-pulmoner displazi, respiratuvar distres, intraventriküler hemoraji, retrolental fibroplazi, sepsis, serebral palsy, görme ve işitme problemleri gibi nedenlerden dolayı yüksek morbiditeye sahiptir.

Erken doğum eyleminin etiyolojisi multifaktöriyel olduğundan ve sıklıkla bilinmediğinden kimde erken doğum eylemi gelişeceğinin tahmin edilme şansı sınırlıdır (13).

Erken doğum eyleminin tedavisinde hedef, miyometriyal aktiviteyi baskılayarak uterin kasılmaları doğuma neden olmayacak düzeye indirmektir. Erken doğum eylemini önlemek veya durdurmak için yapılan tedaviye tokoliz, bu amaçla kullanılan ilaçlara da tokolitik ajanlar denmektedir. Doğumun en önemli itici gücü olan miyometriyal aktivitenin tanımlanması ve bu aktiviteyi etkileyen fizyolojik, biyokimyasal ve farmakolojik mekanizmaların kontrol altına

alınabilmesi obstetrik tedavi yöntemlerinin büyük bir hızla gelişmesini sağlamıştır (14,15).

Günümüzde kullanılmakta olan temel tokolitik ajanlar, beta-2 agonistler, kalsiyum kanal blokerleri, magnezyum sülfat ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlardır. Bunlar arasında klinikte en sık kullanılan ilaçlar beta-2 agonistler ve kalsiyum kanal blokerleridir. Bu ilaçların çoğunun istenmeyen ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Yüz bin kadını kapsayan geniş bir çalışmada kullanılan tokolitik tedavilere rağmen, erken doğum eyleminin prevalansında önemli bir azalma saptanmamıştır (12). Tokolitik tedavinin istenen başarıya ulaşamamasının asıl nedeni miyometriyal aktiviteyi düzenleyen kompleks mekanizmaların yeterince anlaşılammış olmasıdır. Miyometriyal aktivitenin biyomoleküler düzeyde tanımlanması, bu aktivite üzerinde etkili olabilecek ajanların da geliştirilmesini sağlayacaktır (3,12).

II.2. Miyometriyal Kasılma Fizyolojisi

Gebeliğin sağlıklı bir şekilde devamı ve dış ortama uyum sağlayabilecek bir fetüsün dünyaya gelmesi, bir dizi fizyolojik düzenleme mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Bu düzenleme mekanizmalarının kavranması, gebelik ve doğum sırasında gerçekleşen bazı patofizyolojik olayların tanımlanmasına ve tedavilerinin sağlanmasına yardımcı olacaktır. Fizyolojik düzenleme olaylarından en önemlisi gebelik ürününün yerleştiği organ olan uterustaki miyometriyal aktivitenin kontrol mekanizmasıdır. Miyometriyal aktivite fetus yaşam kabiliyeti kazanana dek sessiz fazda seyrederken, miyada doğru bu faz sona erer, miyometriyum transformasyon geçirir ve güçlü, düzenli miyometriyal kasılmalar başlayarak doğum gerçekleşmiş olur. Sessiz-latent fazda, miyometriyal aktivite kontrolü bozulursa erken doğum eylemi veya doğum eyleminin gecikmesi gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelir (16). Sağlıklı bir gebeliğin devamı ve büyümekte olan fetüse uygun bir ortamın sağlanabilmesi için öncelikle uterusun bazı yapısal değişikliklere uğraması gerekmektedir. Uterusun transformasyonu sırasında miyometriyumda özellikle iki önemli değişim gerçekleşmektedir.

Bunlardan ilki miyometriyal hücrelerin sayısı (hiperplazi) ve büyüklük olarak (hipertrofi) artmasıdır. İkincisi ise bu hücrelerdeki kontraktil miyometriyal aktivitenin doğuma kadar baskılanmasıdır (3).

II.3. Miyometriyal Aktivitenin Biyokimyasal Temeli

II.3.1. Kontraktil Elementler

Miyometriyumun kasılma işlevi nöral, humoral ve parakrin faktörlerden çok miyometriyal hücrelerin içsel 'pacemaker' aktivitesine bağlıdır (16). Korpus ve servikte katekolaminlerin konsantrasyonunun saptanması sonucu miyometriyumda nöral faktörlerin etkisinin zayıf olduğu bulunmuştur. Uterusun korpus bölümünde katekolaminlerin konsantrasyonu yok denecek kadar az bulunduğundan, doğum olayında da belirgin bir etkilerinin olmadığı bildirilmiştir. Ancak servikte katekolaminlerin konsantrasyonunun arttığı ve servikal olgunlaşmada etkili oldukları gösterilmiştir (3). Presakral sempatik ganglionlardan kaynaklanan sempatik innervasyon α ve β reseptörleri üzerinden etki gösterir. Bu adrenerjik innervasyon hormonal kontrol altındadır. Östrojen α adrenerjik reseptörleri, progesteron ise β adrenerjik reseptörleri uyarmak suretiyle etki gösterir. Steroid hormonların miyometriyuma etkileri diurnal ritmisite gösterir. Gebelik terme yaklaştıkça progesteron azalırken, östrojen artmakta ve travayın başlamasında tetikleyici görevi üstlenen prostaglandin sentezini başlatmaktadır. Ayrıca östrojen oksitosin reseptörlerinin sentezini ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların (gap junction) sayısını artırarak uterusu daha duyarlı hale getirir. Oksitosin reseptör sayısının artışı fetal büyüme ve uterin distansiyonla da ilişkilidir. Terme yaklaştıkça oksitosinin nörohipofizden salgılanma frekansı da artar (3).

Miyometriyal düz kas hücreleri (miyositler) oldukça esnek hücreler olup, gebelikte boyları 5-10 μm 'den 300-600 μm 'ye kadar değişebilmektedir. Ekstraselüler matriksinde miyometriyal hücreler tarafından sentezlenen kollajen ve glikozaminoglikan gibi moleküller kontraktil aktivitenin düzenlenmesinde

görevlidirler. Miyositler aktin ve miyozin kontraktıl proteinlerinden oluşan ince ve kalın filamentler içerirler ve bunlar spiral demetler halinde dizilirler. Kalın filamentler miyozin içerirler ve 16 nm kalınlığında ve 2,2 μm uzunluğundadırlar. Kalın filamentlerden daha uzun olan ince filamentlerse aktin monomerleri içerirler ve 6 nm uzunluğundadırlar (3).

Gebe ve gebe olmayan uteruslarda bu protein oranları farklı bulunmamıştır. Miyozin kas kontraksiyonunun esas proteinidir. Miyozin asimetrik bir yapıya sahip olup hegzamer yapılı globüler bir baş ile helikal kuyruk kısmından meydana gelmektedir. Globüler baş bölgesi adenozin trifosfataz (ATPaz) aktivitesi içerir ve aktin ile birleşen kısımdır. Kuyruk kısmı ise fosforilasyon bölgesi içerir ve Ca^{2+} ile kalmudilini bağlar. Kontraktıl elementlerin Ca^{2+} sensitizasyonu siklik-guanozin trifosfat (cGTP) ve GTP'ye bağımlı G proteini tarafından artırılmaktadır. Aktin, helikal yapıda dizilmiş olup ince tropomiyozin ile sarmal oluşturur. Aktin, Mg^{2+} -bağımlı miyozin-ATPazı aktive ettiği zaman enerji açığa çıkar ve miyozinin globüler başı aktin flamanına bağlanır (3, 17).

Miyometriyal hücrelerde kasılma, aktin ve miyozin filamentlerinin köprüleşerek birbirine bağlanması sonucu oluşur. Aktin miyozin etkileşimi kalsiyum, kalsiyum bağlayıcı protein olan kalmudilin, siklik-adenozin monofosfat (cAMP) ve fosforilasyon-defosforilasyonda görevli enzimlerin rol oynadığı biyokimyasal bir olaydır. Miyometriyal hücre kasılmasında, miyozin hafif zinciri fosforile edildikten sonra aktinle reaktive olarak, akto-miyozin formasyonunu meydana getirir. Myozin hafif zincir kinaz (MLCK) tarafından katalizlenen bu enzimatik reaksiyon basamağı, hız kısıtlayıcı basamaktır. Kalsiyum-kalmudilin kompleksinin oluşması MLCK enzimini indükleyerek kasılmaya neden olur. MLCK'nın, cAMP'ye bağımlı protein kinazlar tarafından fosforilasyonla inaktive edilmesi ise aktin miyozin köprülerinin yıkılmasına ve düz kaslarda gevşeme olayının meydana gelmesine neden olur (17).

II.3.2.Miyometriyal Aktivitenin İyonik ve Elektriksel Temeli

Miyometriyum hücre kasılabilirliği ile ilgili çeşitli iyon kanalları içermektedir. Miyometriyumda saptanmış olan başlıca iyon kanalları sodyum, potasyum, kalsiyum, klorid ve non-selektif kanallarıdır. İyonların kanallardaki akışkanlığı membran potansiyelinin iyonik gradyentine bağlıdır. Ancak bu kanalların hepsi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla kalsiyum akışını değiştirerek membran potansiyelini etkilediklerinden, kalsiyum iyonu eksitabilite ile ilgili en önemli iyondur (17). Tokolitik ve oksitosik ilaçların çoğu da bu mekanizma ile kalsiyum iyonu üzerinden etki gösterirler. Üç tip kalsiyum kanalı saptanmıştır. Bunlar; voltaja bağlı kalsiyum kanalları, reseptöre bağlı kalsiyum kanalları ve hücre içi sarkoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum kanallarıdır. Sıçanlarda yapılan elektrofizyolojik ve biyokimyasal çalışmalarda voltaja bağlı kalsiyum kanallarının gebeliğin geç dönemlerinde arttığı gösterilmiştir. Tezuka ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda ise progesteronun bu kanalların ekspresyonundan sorumlu proteini azalttığı gösterilmiştir (18).

Düz kas hücrelerinde sodyum ve potasyum iyonları istirahat membran potansiyelinden sorumlu majör iyonlardır. Potasyum kanallarının aktivasyonu miyometriyal hücrelerin uyarılabilirliğini azaltır. Miyometriyumda çeşitli potasyum kanalları tanımlanmıştır (18). Bunlar depolarizasyonun inhibisyonundan, repolarizasyon ve hiperpolarizasyonun indüksiyonundan sorumludurlar. Miyositlerde istirahat membran potansiyeli statik değildir. Gastrointestinal sistemdeki düz kas yapısı gibi bazal düşük amplitüdümlü siklik kasılma dalgaları mevcuttur. Hücre membranındaki polarizasyona göre bazal aktiviteden farklı kasılma ve gevşemeler görülür. Depolarizasyon fazında eşik değeri aşan kalsiyum, voltaja bağlı kalsiyum kanallarını açarak hücre içine girer ve kasılma olayı tetiklenmiş olur. Hiperpolarizasyon fazında ise bu kanallar kapanır ve gevşeme meydana gelir.

Normal şartlar altında istirahat halindeki miyositlerde kalsiyum konsantrasyonu ortalama 10^{-7} - 10^{-8} M'dür. Kalsiyum konsantrasyonu 10^{-6} M'a yükselince, kalsiyum kalmudilinle birleşerek MLCK enzimi aktive edilir. Hücre içi

kalsiyumun artması hücre içi sarkoplazmik retikülüm depolarından salgılanma, dışa kalsiyum akımının azalması veya hücre içine kalsiyum girişinin artırılması şeklinde olabilir. Sarkoplazmik retikülümden kalsiyumun salgılanması hücre içi kalsiyumu artıran en önemli mekanizmadır. Hücre içine kalsiyum akımının artışı, aksiyon potansiyeli gradiyentine ve reseptöre bağımlı olarak gerçekleşir. Agonist-reseptör aktivasyonu fosfolipaz C enzimini indükler. Fosfolipaz C, hücre membranındaki inozitol trifosfatı (IP₃) hidrolize eder. IP₃ hidroliziyle inozitol fosfat-3 ve diaçil gliserol (DAG) meydana gelir. IP₃ hücre içi depolardan kalsiyumun salgılanmasını sağlarken, DAG de prostaglandin sentezinde substrat olarak kullanılır. Ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonu ise 10⁻³ M'dir. Bu düzeyin regülasyonu adenosin trifosfata (ATP) bağımlı Ca²⁺, Mg²⁺, ATPazın ve ATP'den bağımsız (Na⁺ değişimi ile çalışan) kalsiyum pompalarının aktivasyonu ile sağlanır. Miyometriyal hücrelerin kasılma-gevşeme işlevi çeşitli farmakolojik ilaçlarla artırılabilir veya azaltılabilir (17).

II.3.3.Hücre İçi Kalsiyum Seviyesinin Kontrolü

Hücre içi kalsiyum seviyesi iki mekanizma ile düzenlenir. Bu mekanizmalardan biri kalsiyumun hücre membranından içeri girmesi, ikincisi ise hücre içi depolardan Ca²⁺ salınımıdır. Hücre dışından içeri kalsiyum girmesi en az iki mekanizma ile olur:

(a) Depolarizasyon. Voltaj-bağımlı spesifik kalsiyum kanallarından kalsiyum girişini sağlar. Bu kanallar kalsiyum kanal blokörlerinin etki yeridir.

(b) Kalsiyum voltaj-bağımsız mekanizmalarla da hücre içine girebilir. Bunlardan en iyi bilineni Ca²⁺, Mg²⁺, ATPaz sistemidir.

Ca²⁺'un hücre membranından geçiş mekanizmasında ileri sürülen görüş nörotransmitter, hormon ve diğer fizyolojik uyarılara karşı aksiyon potansiyeli değişmesi ile membranın kalsiyuma geçirgenliğinin artmasıdır. Hücre membranından kalsiyum akışını anlamada önemli bir adım fosfolipidlerin keşfedilmesidir. Fosfatidik asit hücre membranının geçirgenliğini artırarak kalsiyum girişini kolaylaştırır. Çeşitli agonistler fosfolipaz C'yi aktive ederek

hücre membranındaki polifosfoinositlerin yıkımına ve IP_3 salınımına sebep olur. IP_3 endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını sağlayan ikincil ulaktır. Kalsiyum'un hücre içindeki miktarının artması, hücre dışından kalsiyum akışını da başlatır. Sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde hücre içi kalsiyum depolarının önemi büyüktür. Miyometriyumun kalsiyum olmayan ortamda bile kasıldığı gösterilmiştir. Bu olay endoplazmik retikulum ve mitokondrinin kasılmanın başlaması için yeterli kalsiyumu sağladığını gösterir (19). Beta-2 agonistler cAMP aracılığı ile hem MLCK'yı inhibe ederler, hemde depolardan kalsiyum salınımını inhibe ederler ve sonuçta hücre içi kalsiyum miktarını azaltırlar (3).

II.4. Miyometriyal Aktiviteyi Etkileyen Endokrin Faktörler

Feto-meterno-plasental akstaki endokrin faktörler, miyometriyal aktivitenin kontrolünü sağlayarak, gebeliğin devamı ve sonlanmasında etki göstermektedir. Miyometriyal aktivitenin kontrolünde rol oynadığı bilinen hormonlar CRH (kortikotropin salgılatıcı hormon), ACTH (adrenokortikotrop hormon), oksitosin, östrojen ve progesterondur. Plasentadan sentezlenen CRH, fetal hipotalamo-hipofizo-adrenal akstan salgılanan ACTH ve katekolaminler miyometriyal aktiviteyi artırmaktadırlar. Progesteron hormonu miyometriyal hücrelerde kalsiyumun sarkoplazmik retikulumdan salgılanmasını inhibe ederek, miyometriyal aktiviteyi baskılamakta ve gebeliğin devamını sağlamaktadır. Ayrıca oluşmuş miyometriyal kasılmaların komşu hücrelere yayılmasına neden olan adezyon moleküllerinin sentezini inhibe etmektedir. Östrojen hormonu ise gebeliğin sonlanması ve doğum eyleminin başlaması için gerekli bir hormondur. Östrojen miyometriyal hücrelerin elektriksel bağlantılarını, eksitabilitelerini, oksitosine duyarlılıklarını ve prostaglandin sentezini artırmaktadır. Böylece miyometriyal kasılmalar güçlü ve düzenli olmakta doğum eylemi başlamaktadır. Gebeliğin sonlarına doğru östrojen sentezi artmakta, progesteron/östrojen oranı östrojen lehine değişmektedir. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda doğum eylemi sırasında elde edilen miyometriyal dokularda östrojen

reseptörlerinin arttığı ve progesteron reseptörlerinin ise azaldığı bildirilmiştir (3, 20).

Nörohipofizer hormonlardan oksitosin miyometriyal aktiviteyi artırır. Miyometriyal aktiviteyi oksitosin gibi artıran maddelere oksitosik ajanlar denmektedir. Bilinen endojen oksitosik ajanlar; α -adrenerjik agonistler, parakrin mediyatör olan prostaglandinler ve endotelin-1'dir. Oksitoksikler arasında klinikte sık olarak kullanılanlar oksitosin ve prostaglandinlerdir. Oksitosik ajanlar, hücre içi kalsiyum düzeyini artırarak hücrelerin kasılmasına yol açarlar. Oksitosinin kalsiyum mobilizasyonunu klorür ve katyon (sodyum ve potasyum) kanallarını aktive etmek suretiyle meydana getirdiği gösterilmiştir. Oksitosin endotelin-1 gibi diğer endojen oksitosiklerden farklı olarak miyoflamanların kalsiyuma olan duyarlılığını da artırmaktadır (17,21-23).

II.5. Miyometriyal Aktiviteyi Etkileyen Parakrin Faktörler

Miyometriyal dokuda çeşitli parakrin mediatörler bulunmaktadır. Bu mediatörler miyometriyumun kontraktıl aktivitesinin düzenlenmesinde ve gebeliğin devamı ile sonlanmasında önemli rol oynarlar. Bunlardan en önemlileri nitrik oksit (NO), prostaglandinler, lökotrienler ve sitokinlerdir. Parakrin mediatörler son derece lipofilik olup, buldukları dokularda fonksiyon gösterdikten sonra hızlıca metabolize olup yıkılırlar. Ayrıca sentez ve salgılanımları steroid hormonların kontrolü altındadır (22, 24).

Parakrin mediatörlerden prostaglandin ve NO vericilerinin miyometriyal aktivitedeki işlevleri oldukça önemlidir. Uterusta kasıcı etkisi olan prostaglandinler, PGE₁, PGE₂ ve PGF_{2 α} 'dır. İnsan ve sıçan miyometriyumu üzerinde yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda NO'nun gevşetici etkisi gösterilmiştir (21,25,26).

NO, L-arginin amino asidinin guanidino grubundaki nitrojenin hidroksilasyonu sonucu meydana gelir. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim NO sentetazdır. NO sentetaz kofaktör olarak oksijen, nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve tetrahidrobiopterine gereksinim duyar.

NO'nun genel olarak düz kas hücrelerindeki etki mekanizması guanilat siklazı aktive ederek hücre içi cGMP konsantrasyonunu artırmak ve cGMP'ye bağımlı protein kinazlar aracılığıyla sitozoldeki kalsiyumun ekstraselüler sıvıya mobilizasyonunu ile dokularda gevşeme oluşturmaktır. Fosfodiesteraz enzimi ve kalsiyum, cGMP'nin regülasyonundan sorumludur. Kalsiyum guanozin trifosfata (GTP) bağlı G proteini aracılığıyla fosfolipaz-C enzimini aktive ederek hücre kasılmasına neden olmaktadır. Ancak yapılan bazı çalışmalarda NO'nun uterusu guanilat siklazın yanısıra ATP'ye bağımlı potasyum kanallarını da aktive ederek gevşemeye yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca vasküler yataktaki etkisi tamamen cGMP'den bağımsız olup direk olarak potasyum kanallarının aktivasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (27).

II.6 Miyometriyal Aktiviteyi İnhibe Eden Diğer İlaçlar ve Etki Mekanizmaları

Erken doğum eyleminin tedavisinde miyometriyal aktiviteyi inhibe etmek amacıyla farklı tokolitik ilaçlar kullanılmaktadır. Tokoliz tedavisinin primer hedefi oluşan uterin kontraksiyonların durdurulmasıdır. Tokoliz tedavisinde β_2 -sempatomimetikler, magnezyum sülfat, kalsiyum kanal blokörleri ve nonsteroidal antiinflatuvar ilaçlar (NSAİ) kullanılmaktadır.

II.6.1. Magnezyum

In vivo ve in vitro olarak Mg^{2+} miyometriyal aktiviteyi inhibe eder (28). Magnezyum, düz kas gevşetici olarak iki yolla etki etmektedir; birincisi uterus kasına uyarıları ileten sinirlerin bloke edilmesi ve ikincisi uterus düz kas hücrelerine direkt etkidir. İlkinde artmış Mg^{2+} seviyesi kas-sinir kavşağındaki sinir hücrelerine kalsiyum girişini engelleyerek ve asetilkolin salınımını azaltarak etki eder. İkincisinde ise magnezyum uterus düz kasında kalsiyumla yarışa girmekte, ATP'nin etkilediği aktin-miyozin ilişkilerini engellemektedir (29). Klinik bulgular $MgSO_4$ 'ın etkisini kalsiyum antagonisti olarak yaptığını göstermektedir. Çünkü $MgSO_4$ alan hastalarda kalsiyum verildiğinde uterus aktivitesi artmaktadır (30).

Magnezyum ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine girişini, intrasellüler depolardaki kalsiyumun salınımını, sitozoldeki kalsiyumun hareketini ve böylece de miyometriyumun fazik kasılmalarını inhibe eder.

Tokolitik amaçla kullanıldığında infüzyon hızı 4 g/saat'den yüksek değilse veya böbrek yetmezliği yoksa Mg^{2+} toksisitesi riski düşüktür. Plazma Mg^{2+} seviyesi 9-13 mg/dl arasında iken patellar refleks kaybolur, 14 mg/dl'de solunum depresyonu oluşur (29). Magnezyum sülfatın daha önemsiz yan etkileri başağrısı, görme bulanıklığı, şaşılık, bulantı, hipotermi, nistagmus, letarji, güçsüzlük, dalgınlık, üriner retansiyon ve fekaloidtir. Hastaların birçoğunda bu etkiler hafif ve geçicidir. Daha nadir ama ciddi bir yan etkisi ise hipokalsemidir (11,31). β_2 -mimetiklerin aksine magnezyum sülfat taşikardi yapmaz. Özellikle hafif preeklampsi, diabet, hipertiroidi, maternal kardiyak hastalık, vajinal kanama, plasenta previa gibi durumlarda magnezyum sülfat ritodrine tercih edilir. Magnezyum sülfat, böbrek fonksiyonları bozukluğunda, kalp bloğu ve miyokardiyal hasarı olanlarda ve myastenia graviste kullanılmamalıdır (31). Magnezyum sülfat tedavisinin bırakılmasının en sık sebebi uterus kontraksiyonlarının durdurulamamasıdır. Yenidoğanda letarji, hipotoni, solunum depresyonu görülebilir (4, 29).

II.6.2. Kalsiyum Kanal Blokörleri

Kalsiyum kanal blokörleri esas olarak hücre membranındaki voltaj-bağımlı kanallardan içeriye kalsiyum akışını inhibe etmektedir. Kalsiyum kanal blokörü olarak tokolitik amaçla klinik uygulamada en sık, dihidropridin türevi olan nifedipin kullanılmaktadır. Miyometriyum gibi düz kasların aktivitesi direk olarak sitoplazma içindeki serbest kalsiyum miktarı ile ilişkilidir. İntrasellüler serbest kalsiyum miktarının azalması miyometriyal kasılmaları inhibe etmekte, artması ise aktive etmektedir. Hücre içi kalsiyum, esas olarak ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine girişi ile artar. Bu ekstrasellüler kalsiyumun intrasellüler alana transferi voltaj-bağımlı veya reseptör aracılı kanallar sayesinde olur. Kalsiyum kanal blokörlerinin esas etki yerleri düz kaslarda en çok bulunan L-tipi voltaj-

bağımlı kanallarıdır (32). Bağlandıkları kanalları depolarizasyondan sonra kesinlikle açılabilir halden nadiren açılabilir hale getirirler. Böylece membranın kalsiyum geçirgenliğinde azalma görülür ve kas uzun süreli gevşek kalır. Bu ilaçlar ayrıca intrasellüler sarkolemmalardan kalsiyum salınımını baskılar (33).

Bu ilaçların sebep olduğu düz kas gevşemesi organa spesifik olmadığından birçok dokuda istenmeyen etkilere sebep olabilir. Ancak, tokolitik amaçla kullanılan dozlarda bu yan etkilerinin görülmesi nadirdir. Kalsiyum kanal blokörleri ile en sık görülen istenmeyen etki geçici flushing, baş ağrısı ve bulantıdır (34). Kalsiyum kanal blokörlerinin kardiyovasküler yan etkileri β_2 -mimetiklere benzer ancak daha hafiftir. Vazodilatasyon, kan basıncında hafif bir düşme ve buna bağlı olarak kalp hızında biraz yükselmeye neden olabilirler. Kalp hızında artış yapmalarının bir sebebi de düz kaslardan farklı olarak kalp hücrelerinde artırdıkları cAMP'nin kalsiyumu kontraktıl bölgelere bağlanmaya hazır hale getirmesi ve kasılmayı uyarmasıdır (32). β_2 -mimetikler gibi kan potasyumu üzerine etki etmezler ancak glikozu çok hafif yükseltebilirler. Bazı hayvan deneylerinde kalsiyum kanal blokörlerinin uteroplasental kan akımını azaltarak fütüste hipoksemiye neden olabileceği iddia edilmesine rağmen bu görüş diğer hayvan deneyleriyle desteklenmemiştir (4) Bu ilaçların maternal ve fetal istenmeyen etkilerinin iyice araştırılması gerekmektedir.

II.6.3. Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

NSAİİ 'lerin pek çoğunda bulunan ortak özellik, dokularda araşidonik asidden PG'ler ve diğer bazı eikozanoidlerin oluşmasını katalize eden siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) enzimlerini inhibe etmeleridir. Pek çoğunun, hem analjezik, hem antipiretik ve hem de antiinflamatuvar etkileri vardır. Bazılarında sadece analjezik, ve antipiretik etki bulunur (asetaminofen gibi). Antipiretik ve analjezik etkileri, hipotalamus ve omurilik arka boynuzunda peroksidlerden fakir ortamda prostaglandin sentez ve salıverilmesini inhibe etmesi ile ilişkilidir. Antiinflamatuvar etkinliği, sentetik veya doğal en güçlü antiinflamatuvar steroid ilaçlar olan glukokortikoidlere göre daha zayıftır.

Analjezik etkinlikleri de güçlü analjezikler olan, fakat antiinflamatuvar etkisi bulunmayan narkotik analjeziklerinkine göre zayıftır (35).

Selektif COX-2 inhibitörleri antiinflamatuvar olarak kullanılmaktadır. Selektif COX-2 inhibitörleri insan miyometriyumda güçlü uterusu gevşetici ajanlardır. COX-2'nin up-regulasyonu erken doğum ve doğumun başlangıcı ile çok güçlü ilişki içerisindedir (36). Nimesulid ve indometazin, kalsiyum kanallarındaki akımı azaltarak insan miyometriyal kontraksiyonlar üzerinde inhibitör etkilidir. Kalsiyumun azalması düz kaslarda gevşetici etki göstermektedir. Kalsiyum kanal akışını inhibe etmeleri, miyometriyal kontraktilitenin inhibe edilmesinde PG sentezinin inhibisyonuna göre daha az etkilidir. Kalsiyum kanallarının blokajı, NSAİİ'nin bir kaç etki mekanizmasından biri olabilir (37).

PGE'ler ve PGF'ler gebelik olsun veya olmasın, uterusu tonusu artırır ve ritmik kasılmalara neden olurlar. PG sentez yolağında ana enzim olan COX'ın aktivitesi, annenin amniyon sıvısında gestasyon yaşı ilerledikçe artmaktadır. Erken ve miyadında doğumda uterusu artmış PG sentezini inhibe eden NSAİİ, erken ve miyadında doğumu geciktirmede etkili ajanlardır (38,39). Fakat NSAİİ'nin ductus arteriosusun erken kapanması ve amniyotik sıvının azalması sonucu renal perfüzyonda bozulma gibi yan etkilere neden olduklarından erken doğum tedavisinde kullanılmaları kısıtlıdır (40-42). Erken doğum ve miyadında doğumda COX-2'nin up regule olması ve indometazin gibi nonselektif COX inhibitörlerinin yan etkilerinin birçoğundan COX-1 inhibisyonu sorumlu olduğundan, COX-2 selektif NSAİİ'ler erken doğumda daha az yan etki ile tokolitik tedavi yapabilirler (42,43).

II.7. Adrenoseptör Farmakolojisi

Adrenoseptörler nöronal ve nöronal olmayan dokularda, hücre membranının dış yüzeyi boyunca yerleşmiş, endojen katekolamin olan noradrenalin ve adrenalin cevaplarının farklı şekilde oluşumunu sağlayan membran bağımlı reseptörlerdir. Bu reseptörler, izole dokuda yapılan

farmakolojik çalışmalara göre alfa-reseptörler ve beta reseptörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar.

Geçen yüzyılın son yarısında alfa-reseptörler anatomik lokalizasyonlarına göre alfa-1 ve alfa-2 olmak üzere iki alt grupta toplanır. Moleküler biyolojik tekniklerdeki gelişmeler ve devam eden farmakolojik çalışmalar sonucunda alfa-reseptörler daha sonra kendi içinde tekrar alt gruplara ayrıldılar (43).

Beta adreseptrler heterojen zellekle olup başlangıçta in vivo ve in vitro sistemlerde katekolaminlerin etkilerine bağlı olarak iki alt gruba ayrıldılar. Kalp, ince barsak ve yağ dokusunda beta-1 adreseptrler hakim iken vasküler, uterus ve solunum düz kaslarında ise beta-2 adreseptrler bulunmaktadır. Devam eden fonksiyonel çalışmalar, genetik teknikler ve reseptör bağlama çalışmalarının kullanılması ile atipik beta reseptörlerinin olduğu bildirildi. Emorine ve arkadaşları 1989 yılında ilk olarak beta-3 reseptörünü insan genomunda klonlayarak varlığını kanıtladılar (44). Sonradan beta adreseptr alt gruplarına ek olarak kardiyak dokuda da başka bir atipik reseptör olan beta-4 adreseptrler tanımlandı (45).

II.7.1.Beta-2 Adreseptr Agonistleri

Beta adrenerjik agonistlerin yapıları endojen katekolaminlere benzemektedir. Bu gruptan kullanılan ilk ilaç isoksuprindir. Daha sonra ritodrin, terbutalin, hezoprenalin, fenoterol, nilidin, salbutamol, metoproterenol, albuterol ve oreiprenoline gibi türevleri geliştirilmiştir. Bunların arasında, klinikte kullanılan ritodrin ve terbutalindir. Beta-2 adreseptrler uterus düz kasında, kan damarlarında, diafragmada ve bronşiollerde bulunmaktadır. Vazodilatasyon, bronkodilatasyon, glikojenoliz ve uterin relaksasyon yaparlar. Tokolitik ilaçların etkinliği ve yan etkileri reseptör cevabı ile ilişkilidir. Tokolitik amaçla kullanılan beta-2 agonistlerin uterus düz kasına spesifik olması beklenir. Ancak az miktarda da olsa beta-1 reseptörlere etki etmektedirler . Beta adrenerjik ilaçlar beta-2 reseptörlere bağlanarak adenil siklaz enzimini aktive eder ve siklik adenzin mono fosfat (cAMP) düzeyini artırırlar. Bu da MLCK'nın direk

fosforilasyon ile inhibisyonuna ve hücre içi kalsiyum düzeyinin azalmasına neden olur. Bunun neticesinde aktin-myozin etkileşmesi gerçekleşmez ve miyometriyal kas lifinin kontraksiyonu önlenmiş olur. En sık rastlanan yan etkiler taşikardi, hipotansiyon, bulantı, göğüs ağrısı ve solunum sıkıntısıdır (13).

II.7.2.Beta-3 Adrenoseptör Agonistleri

Beta-3 adrenoseptör agonistleri ilk olarak 1980 yılının başlarında keşfedilmişlerdir. Daha sonra Arch ve arkadaşları 1984 de beyaz yağ dokusunda lipolize, kahverengi yağ dokusunda termogeneze neden olduğu kadar trakeal yada uterus kasılmalarını gevşetici etkisinin olabileceği düşünülen yeni bir beta-3 agonist buldular (46). İlk olarak kemirgenlerdeki yağ dokusunda beta-3 adrenoseptör mRNA'sı gösterildi (44). İkinci olarak beta-3 adrenoseptör mRNA'sı immünohistokimyasal çalışmalarla iskelet dokusu dahil olmak üzere primer yağ dokusu ve diğer insan dokularında gösterildi (45). Beta-3 adrenoseptör agonistlerinin kolon, ileum, mesane, solunum düz kaslarında ve iskelet kasında gevşetici etkilerinin olduğu çeşitli in vitro çalışmalarla gösterildi (47,48). Chamberlain ve arkadaşları beta-3 adrenoseptör mRNA'sını immünohistokimyasal çalışmalarla kas ve iskelet dokusu da dahil olmak üzere pek çok insan dokusunda bulunduğunu gösterdiler (49). Daha sonra beta-3 agonistlerin ilk generasyon bileşikleri, obesite ve diabet tedavisindeki etkinlikleri yönünden araştırılmaya başlandı. Bu grup ilaçların düz kas üzerinde gevşetici etkilerinin gösterilmesi, tokolitik tedavide de miyometriyal gevşeme yaparak faydalı olabileceğini düşündürmektedir (50-52). Bu amaçla yapılmış bir kaç çalışma olmasına rağmen yeterli düzeyde değildir.

[(R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino]-propyl]1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate] (CL 316243) maddesinin değişik hayvanlarda mesane detrüsör, mide fundus, özafagus, koroner arter , kolon ve ince barsak gibi düz kaslarda gevşetici etkilerinin olduğu gösterilmiştir.(53 - 59)

BÖLÜM III

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu Çalışmanın yapılması CÜTF Hayvan Etik Kurulu'nun 01/07/2004 tarih ve B.30.CUM.0.1.H.00.00/55 sayılı karar ile uygun bulunmuştur.(Bkz Ek)

III.1. Sıçanların Bakımı ve Miyad Gebelik Oluşturulması:

Bu çalışmada, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'nda bakımı yapılan 180-200 g ağırlığında 10 adet erişkin dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Oda ısında tutulan dişi sıçanlar gece saat 17:00 ile sabah saat 9:00 arası, erişkin erkek sıçanlarla çiftleştirildi. Ertesi gün sabah saat 09.00-10.00 arasında çiftleşmenin bulgusu olan kopulatuvar plug tespiti için muayene edildi. Daha önce yapılmış çalışmalarda uygulanan yöntem ile kopulatuvar plak muayenesi yapıldı (60,61). Muayenede pediatrik otoskop (HEINE mini 2000, Heine Optotechnik, Herrsching, Germany) kullanıldı. Daha sonra vajinal sürüntü alınarak spermler arandı. Kopulatuvar plağın saptandığı ve spermatozoanın görüldüğü gün gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi .

Sıçan gebeliği yaklaşık 21 gün sürmektedir. Gebeliğin 19-21. günleri term gebelik olarak kabul edilmektedir (62). Çalışmamızda term gebe sıçanlar (n=10) kullanıldı.

III.2. Yapılan deneysel işlemler

Bu çalışmada yapılan deneyler iki bölüm halinde düzenlendi. İlk bölümde, oksitosin ile uyarılmış miyometriyal kasılmaların amplitüd ve frekansı üzerinde CL 316243'ün etkisi doku banyosu deneyleri ile incelendi. İkinci bölümde ise beta-1 reseptör antagonisti metoprolol, beta-2 reseptör antagonisti ICI-118.551 ve beta-3 reseptör antagonisti SR-59230A ve varlığında, miyometriyal kasılmaların amplitüd ve frekansı üzerinde CL 316243'ün oluşturduğu gevşetici etkiye tekrar bakıldı.

III.3. Doku banyosu deneyleri

III.3.1 Miyometriyal dokunun hazırlanması ve kontraktıl aktivitelerinin mekanik olarak ölçülmesi

Gebe sıçanlar (n=10) boyunları kırılarak öldürüldü. Sıçanların uterusları çıkarılarak gebelik materyali dikkatlice alındı. Miyometriyal doku, endometriyum ve çevre dokulardan ayrıştırılarak, her bir sıçandan 4 adet 8 x 2 x 2 mm. uzunluğunda miyometriyal şeritler elde edildi. Bunlardan 4 tanesi içerisinde Krebs-Henseleit solüsyonu bulunan, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan, pH'sı 7.4 değerinde, sıcaklığı 37°C olan, 10 ml'lik izole organ banyolarına bir ucu organ askısına diğer ucu gerilim algılayıcısına (Grass-FT 03 Force Displacement) gelecek şekilde yerleştirildi. Diğer iki miyometriyal şerit düzenli çalışmayan dokuların yerine kullanmak üzere oksijenlendirilmiş Krebs- Henseleit solüsyonunda bekletildi. Miyometriyal şeritlerden 60 dk içerisinde stabil spontan kontraksiyon oluşturmayanları organ banyolarından çıkarıldı ve yerine yeni preparatlar asıldı. Miyometriyal şeritlere 1 g'lık istirahat gerilimi uygulandı ve spontan kontraksiyonlar stabil hale gelene kadar dokular her 15 dk'da yıkanarak 60 dk beklendi. Çalışma yapılacak ilaçlar organ banyolarına artan konsantrasyonlarda eklendi. İzometrik gerilim değişiklikleri Grass 79E Poligraf (Grass, Quincy, MA, USA) aracılığı ile kaydedildi. Kaydedicinin kağıt hızı

2.5 mm/dk'ya ayarlandı. Cihazın kalibrasyonu 1 g'lık gerilim vertikal olarak 0.5 cm'lik yer değişikliğine karşılık gelecek şekilde yapıldı.

Spontan miyometriyal kontraksiyonları stabil hale gelen şeritlerde düzenli kontraksiyonlar oluşturmak için uterotonik ajan olarak oksitosin (10 mU/ml) ilave edilerek 15 dk beklendi. Kontraksiyonları düzenli hale gelen miyometriyal şeritler üzerine selektif β_3 agonist CL 316243'ün artan konsantrasyonlarda ilave edilerek gevşeme cevapları kaydedildi. Sonra doku banyolarına sırasıyla β_1 , β_2 , β_3 antagonistler (metoprolol, ICI-118.551, SR-59230A) ilave edilerek CL 316243'ün gevşeme cevapları tekrar kaydedildi. Bu amaçla yapılan deneyler aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.

III.3.2. Deneylerin Yapılışı

Set 1: Oksitosin ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin (n=10) amplitüd ve frekansı üzerinde CL 316243 (10^{-10} - 10^{-5} M) 'ün artan konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

Set 2: Oksitosin ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin (n=10) amplitüd ve frekansı üzerinde, metoprolol (10^{-6} M) uygulandıktan 15 dk. sonra, CL 316243 (10^{-10} - 10^{-5} M) 'ün artan konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

Set 3: Oksitosin ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin (n=10) amplitüd ve frekansı üzerinde, ICI-118.551 (10^{-6} M) uygulandıktan 15 dk. sonra, CL 316243 (10^{-10} - 10^{-5} M) 'ün artan konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

Set 4: Oksitosin ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin (n=10) amplitüd ve frekansı üzerinde, SR-59230A (10^{-6} M) uygulandıktan 15 dk. sonra, CL 316243 (10^{-10} - 10^{-5} M) 'ün artan konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

Tüm deneyler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

III.4. Kullanılan İlaçlar ve Solüsyonlar:

Deneylerde kullanılan CL 316243, metoprolol, ICI-118.551, SR-59230A ilaçları Tocris Cookson Ltd. firmasından (Bristol, UK) elde edildi. Oksitosin

(Synpitan forte ampul) deva ilaç firmasının ürettiği ampullerden elde edildi. İlaç içeren solüsyonlar deneylerden hemen önce hazırlandı.

Deneyleerde kullanılan Krebs-Henseleit solüsyonu mM/L olarak şu şekilde hazırlandı: NaCl 125 mM, KCl 2.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaHCO₃ 23.9 mM ve glukoz 11.0 mM.

III.5. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi:

Kontraksiyon (kasılma) karakteristikleri, ilaçların artan konsantrasyonlarının ilavesinden hemen sonra 600 saniyelik intervallerle analiz edildi. Kontraksiyonların 600 sn süresince ortalama amplitüdüleri (gram) ve frekansları (600 sn'deki kontraksiyon sayısı) hesaplanarak kontrol değerlerle (ilaç verilmeden hemen önceki kontraksiyonlar) karşılaştırıldı.

Kontraksiyon verileri hesaplanırken, oksitosin ile elde edilen kasılma cevabı % 100 (kontrol) olarak kabul edildi. Antagonistlerin varlığında ve yokluğunda, CL 316243'ün kümülatif konsantrasyonları uygulandıktan sonra elde edilen cevap, bu kasılmanın % değişimi olarak hesaplandı.

Her set için grup içi tekrarlayıcı ölçüm (repeated measures) varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Her testten önce grup içi tekrarlayıcı ölçüm ANOVA testinin parametrik veya nonparametrik tiplerinin doğru seçilmesine yardım eden normalite testi verilere uygulandı. Verilerin normalite testini geçtiği durumlarda tekrarlayıcı ölçüm ANOVA testi kullanılarak kontrol ve ilaç konsantrasyonlarının eklenmesinden sonra oluşan kasılmaların amplitüd ve frekansları arasında fark olup olmadığı incelendi. Fark bulunduğunda post hoc test olarak Bonferroni variance t testi ile ilaç konsantrasyonlarının etkilerinin kontrolden farklı olup olmadığı incelendi. Veriler normalite testini geçemediğinde Friedman tekrarlayıcı ölçüm ANOVA testi uygulandı. Kontrol ve ilaç konsantrasyonları arasında fark bulunduğu durumlarda ilaç konsantrasyonlarının etkisinin kontrole göre farklı olup olmadığı post hoc test olarak Dunnett testi ile incelendi. Ayrıca hangi ilacın diğerlerinden daha fazla inhibitör etki sağladığını araştırmak amacıyla ilaçların amplitüd ve frekans üzerine olan etkileri gruplar arası tekrarlayıcı ölçüm ANOVA

testi ile analiz edildi. Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak sunuldu. İstatistiksel analizlerin sonucunda P değerinin 0.05'den küçük olduğu durumlarda fark anlamlı kabul edildi. Agonist ilaçların oluşturduğu maksimum yanıtın % 50'sini oluşturmak için gereken konsantrasyon (EC_{50}) her bir deneyin log-konsantrasyon yanıt eğrilerinden elde edildi. Bulgular aritmetik ortalama \pm standart hata olarak sunuldu.

pD_2 değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

A = Agonist ilacın molar konsantrasyonu

E_{max} = Agonist ilacın oluşturduğu maksimum etki

E_A = Agonist ilacın belirli bir konsantrasyonda oluşturduğu etki

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

BÖLÜM IV

BULGULAR

IV.1. Oksitosin ile Stimüle Edilen Miyometriyal Şeritlerin Amplitüd ve Frekansı Üzerinde CL 316243'ün Etkisi.

Gebelik süresinin 19-21 günlerindeki (miyad doğum) sıçanlardan (n=10) izole edilen miyometriyum şeritleri 10 mU/ml oksitosin ile stimüle edildikten ve bu stimülasyon dengeye ulaştıktan sonra (kontrol kasılmalar), CL 316243 (10^{-10} - 10^{-5} M) ile konsantrasyona-bağımlı gevşeme yanıtları alındı. CL 316243'ün miyometriyal kasılmaların amplitüdü üzerindeki gevşetici etkisi 10^{-9} M konsantrasyondan başlayarak istatistiksel anlamlılığa ulaşırken, miyometriyal kasılmaların frekansı üzerindeki gevşetici etkisi 10^{-7} M konsantrasyondan başlayarak istatistiksel anlamlılığa ulaştı ($P<0.05$).

IV. 2. CL 316243 Yanıtlarına Metoprolol, ICI-118.551 ve SR-59230A'nın Etkisi.

Miyometriyal kasılmaların amplitüd ve frekansı üzerinde CL 316243'ün yaptığı gevşetici etkiye metoprolol (10^{-6} M), ICI-118.551(10^{-6} M) ve SR-59230A (10^{-6} M) varlığında tekrar bakıldı. Miyometriyal kasılmaların amplitüdü üzerinde CL 316243'ün gevşetici etkisi beta-3 reseptör antagonisti SR-59230A varlığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalırken ($P<0.05$), beta-1 antagonist metoprolol ve beta-2 antagonist ICI-118.551 varlığında ise anlamlı şekilde değişmedi. ($P>0.05$) (Şekil 1). Miyometriyal kasılmaların frekansı üzerinde

CL 316243'ün gevşetici etkisi ise her üç antagonist varlığında da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmedi ($P>0.05$) (Şekil 2).

IV. 3. CL 316243'ün E_{max} ve pD_2 Değerleri Üzerinde Metoprolol, ICI-118.551 ve SR-59230A' nın Etkisi.

Miyometriyal kasılmaların amplitüdü üzerinde, SR-59230A (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün E_{max} değeri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalırken ($P<0.05$), metoprolol (10^{-6} M) ve ICI-118.551 (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün E_{max} değerleri anlamlı olarak değişmedi ($P>0.05$) (Tablo 1). Her üç antagonist varlığında da miyometriyal kasılmaların amplitüdü üzerinde CL 316243'ün pD_2 değeri değişmedi ($P>0.05$) (Tablo 1).

Miyometriyal kasılmaların frekansı üzerinde, metoprolol (10^{-6} M), ICI-118.551 (10^{-6} M) ve SR-59230A (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün E_{max} ve pD_2 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmedi ($P>0.05$) (Tablo 2).

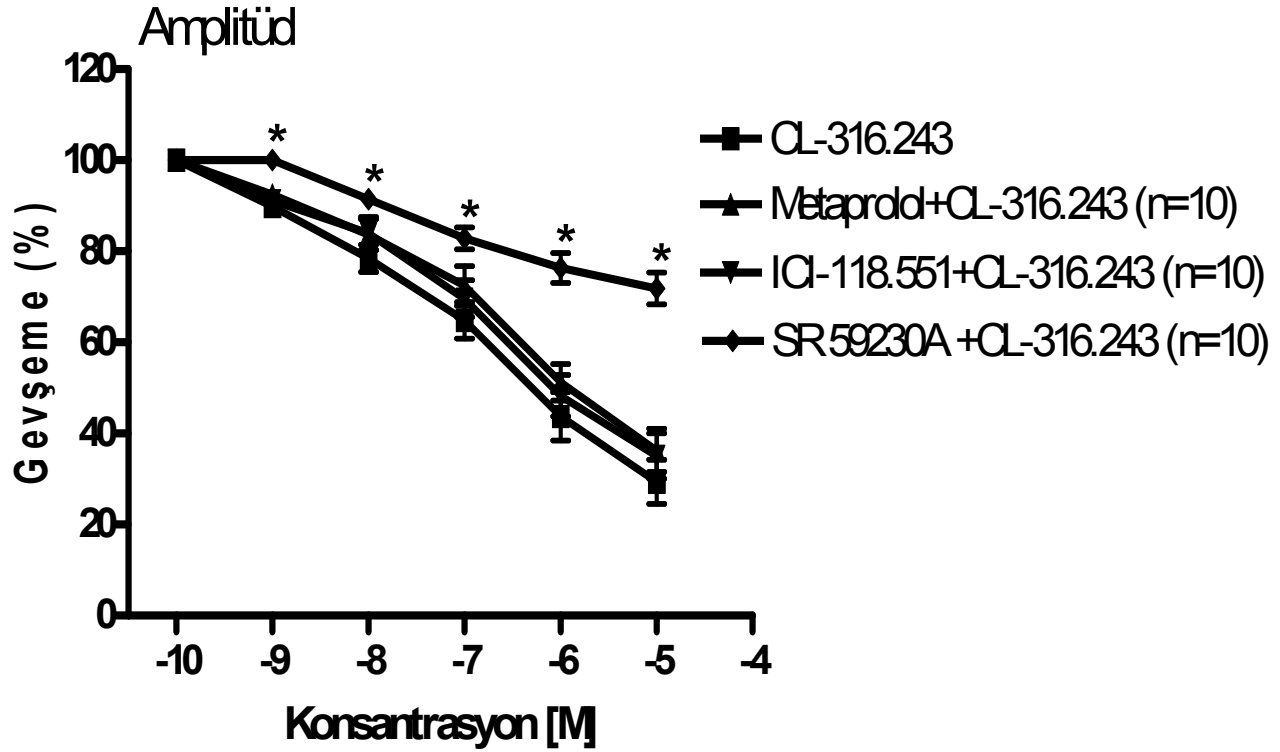
Tablo 1. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin amlitüdü üzerinde, CL 316243'ün ve metoprolol (10^{-6} M), ICI-118.551 (10^{-6} M) ve SR-59230A (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün E_{max} ve pD_2 değerleri. Değerler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur (n=10).

ilaç	Antagonist	pD_2	E_{max} (%)
CL 316243	yok	7.02 ± 0.09	70.6 ± 4.8
CL 316243	metoprolol	6.86 ± 0.10	63.7 ± 4.7
CL 316243	ICI-118.551	6.94 ± 0.09	65.0 ± 5.0
CL 316243	SR-59230A	7.27 ± 0.11	$28.2 \pm 3.5^*$

* CL 316243'ün beta-3 antagonist SR-59230A varlığında E_{max} değerlerinde anlamlı bir azalmanın olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$).

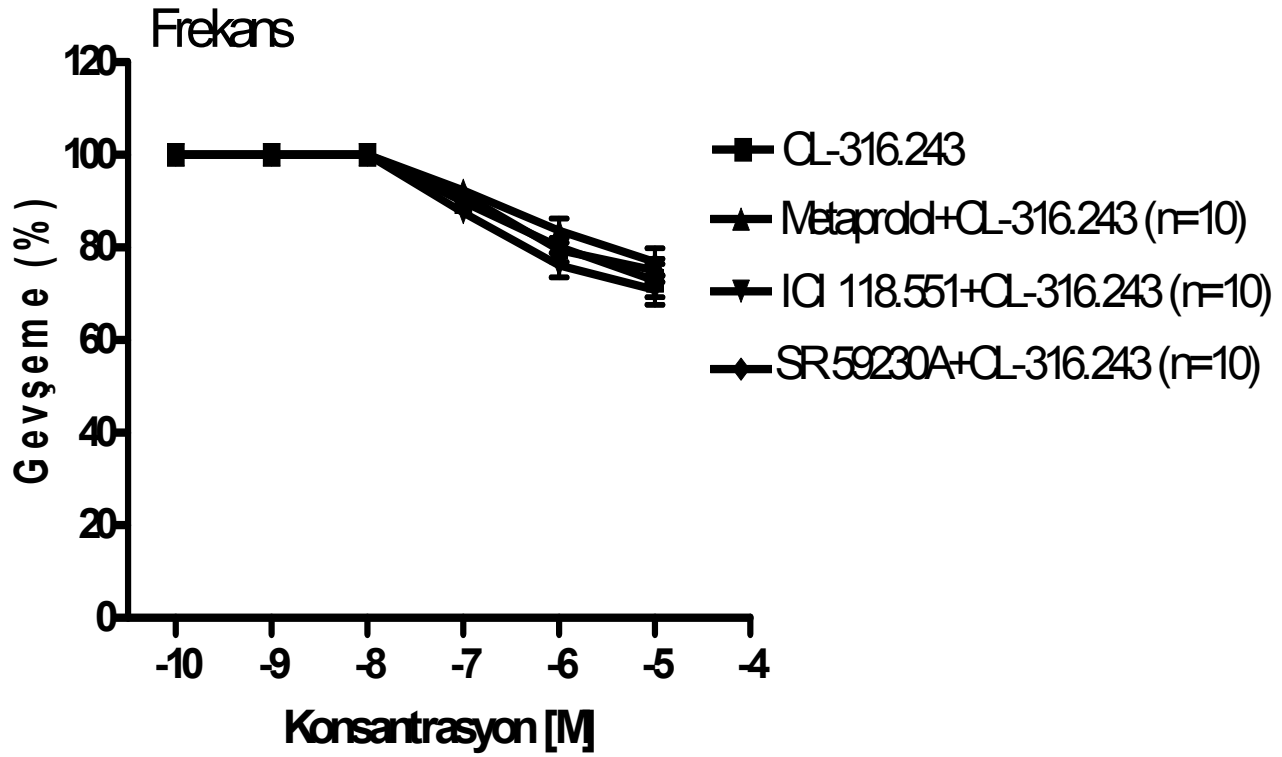
Tablo 2. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin frekansı üzerinde, CL 316243'ün ve metoprolol (10^{-6} M), ICI-118.551 (10^{-6} M) ve SR-59230A (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün E_{max} ve pD_2 değerleri. Değerler ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur (n=10).

ilaç	Antagonist	pD_2	E_{max} (%)
CL 316243	yok	6.76 ± 0.07	27.8 ± 3.6
CL 316243	metoprolol	6.64 ± 0.08	23.2 ± 3.0
CL 316243	ICI-118.551	6.87 ± 0.10	31.6 ± 3.2
CL 316243	SR-59230A	6.90 ± 0.07	25.0 ± 2.5



Şekil 1. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin amplitüdü üzerinde CL 316243'ün ve metoprolol (10^{-6} M), ICI-118.551 (10^{-6} M) ve SR-59230A (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün gevşeme yanıtları.

* SR-59230A (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün gevşeme yanıtlarının diğer gruplardan anlamlı şekilde farklı olduğunu gösterir.



Şekil 2. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile stimüle edilen miyometriyal şeritlerin frekansı üzerinde CL 316243'ün ve metoprolol (10^{-6} M), ICI-118.551 (10^{-6} M) ve SR-59230A (10^{-6} M) varlığında CL 316243'ün gevşeme yanıtları.

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Erken doğum eylemi gebelikte istenmeyen sonuçları nedeniyle önemli bir sorundur. Erken doğum riski olan gebelerin tespit edilip, önceden gerekli önlemlerin alınması tedavinin başarısını artırmaktadır. Erken doğum eyleminde kullanılan ilaçlar, çeşitli mekanizmalarla miyometriyum kasılmasını baskılayarak etki göstermektedir (2, 24). Halen kullanılmakta olan tokolitik ilaçların etki potansiyelleri, istenen düzeyde olmayıp bir çoğunun ciddi yan tesirleri vardır.

Obstetrik ve farmakoloji bilim dallarının ortak amaçlarından biri, istenen özelliklerde yeni tokolitik ilaçların geliştirilmesidir. Miyometriyuma diğer dokulardan daha spesifik ve uzun etkili, sistemik yan etkileri daha az ve etkisine taşiflaksi gelişmeyen, güçlü ilaçlar erken doğum sıklığının azaltılması için daha faydalı olabilir.

Bu çalışmada, beta-3 agonist CL 316243 maddesinin, term gebe sıçanlardan elde edilen ve oksitosin ile uyarılmış izole sıçan miyometriyumunda amplitüd ve frekans üzerine gevşetici etkileri incelendi. Beta-1, beta-2 ve beta-3 antagonist varlığında, bu ilacın gevşetici etkilerindeki değişiklikler kaydedilip, kontrol değerler ile karşılaştırıldı. CL 316243 konsantrasyona bağımlı olarak miyometriyal kasılmaları inhibe etti.

CL 316243'ün amplitüd üzerine etkinliği beta-1 ve beta-2 antagonistler varlığında değişmezken beta-3 antagonist varlığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldı. Bu sonuçlar, CL 316243'ün amplitüd üzerindeki gevşetici etkisini

beta-1 ve beta-2 adrenoseptörleri etkilemeden, büyük oranda beta-3 reseptörler aracılığıyla oluşturduğunu göstermektedir.

CL 316243'ün frekans üzerine etkinliği beta-1, beta-2 ve beta-3 antagonistler varlığında değişmedi. Bu sonuçlar, CL 316243'ün frekans üzerindeki azaltıcı etkisinin beta-1, beta-2 ve beta-3 adrenoseptörlere bağlı olmadığını düşündürür. Bu etki CL 316243 maddesinin nonspesifik bir etkisine bağlı olabilir.

Selektif beta-2 agonistler erken doğumu önlemek için tercih edilen bir ilaç grubu olmakla birlikte, ritodrin gibi geleneksel formları kısa etki sürelidir. Ritodrin tedavisinin, erken doğumu 48 saat engellediği gösterilmekle birlikte, gebeliği uzattığına dair oldukça az veri vardır. Tokolizin, başarılı bir akut tedavi sonrası idame tedavisinin değerlendirildiği bir araştırmada erken doğum eyleminin sıklığının azalmadığı ve perinatal sonuçları düzeltmediği bildirilmiştir (63).

Son zamanlarda yapılan in vitro çalışmalar, beta-3 agonist ilaçların insan miyometriyum kasılmaları üzerine gevşetici etkisinin, beta-2 agonist ilaçların etkisine eşdeğer olduğunu göstermektedir (51,52). CL 316243 maddesinin değişik hayvanlarda mesane detrüsör, mide fundus, özafagus, koroner arter , kolon ve ince barsak gibi düz kaslarda gevşetici etkilerinin olduğu gösterilmiştir (53 - 59).

Erken doğum eyleminde temel fizyopatolojik mekanizma fetusun dış ortama uyum sağlayabilecek olgunluğa gelebilmesi için gerekli olan miyometriyal latent fazın kısa sürmesidir. Uterusun latent fazdan miyometriyal kasılmaların başladığı aktif doğum eylemine geçmesi bir takım moleküler ve enzimatik değişiklikler sonucu olmaktadır. Bunlar; prostaglandinler, sitokinler, cAMP ve hormonlar ile ilgili değişimlerdir. Miyometriyal aktiviteyi baskılamak amacı ile moleküler ve enzimatik değişimlerin inhibe edilmesi, erken doğum eylemi tedavisinin temel hedefidir (2).

Erken doğum eylemi tedavisinin önemli kısmını düz kas gevşetici ilaçlar oluşturur. Günümüzde beta-2 agonistler, magnezyum sülfat, kalsiyum kanal

blokörleri ve prostaglandin sentez inhibitörleri bu amaçla klinik uygulamaya girmiş olan ilaçlardır.

Ritodrin, 1980'den beri en fazla kullanılan ve üzerinde en çok araştırma yapılmış beta-2 agonist ilaçtır. Uzun süreli kullanımda beta-2-adrenoseptör sayısı düşer, bu nedenle ilacın etkisi azalır. Yapılan bir çok araştırmada, uzun süren beta-2 agonist tedavisi sırasında cAMP seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve desensitizasyon geliştiği bildirilmektedir (11,64). Desensitizasyon gelişerek etkinliğinin azalması tokolitik tedavinin önünde önemli bir sorundur. Beta-2 agonist ilaçlar, dokulardaki beta reseptörlere kısmen seçiciliği olan ilaçlardır. Buna bağlı olarak da bu ilaçlar yüksek dozlarda kardiyak beta-1 adrenoseptörleri uyarırlar. Taşikardi, hipotansiyon, tedirginlik, göğüs sıkışması veya ağrısı, elektrokardiyogramda değişiklikler gibi kardiyovasküler, akciğer ödemi gibi pulmoner, hipokalemi, hiperglisemi, hiperinsülinemi, laktikasidoz ve ketoasidoz, bulantı, başağrısı, titreme, ateş, halüsinasyon gibi metabolik yan etkileri nedeniyle tokolitik olarak kullanımları kısıtlıdır (65). Tedavi sırasında oluşan yan etkiler, infüzyon oranı ve kan düzeyi ile ilişkili olduğundan, tedavi dozu yan etkilerin ortaya çıktığı dozdan çok daha düşük olmalıdır (11). Ritodrin ve terbutalin plasentadan hızla geçerek fetusda beta adrenerjik reseptörleri stimule ederler. Tedavinin ikinci saatinde, fetal kanda anne kan düzeyinin %30'una ulaşılır (66). Diabetik gebelerde hiperglisemi ve ketoasidoz gibi önemli komplikasyonlar geliştiği ve insülin ihtiyacı arttığı için beta-2 agonistlerle tokoliz önerilmemektedir.

Beta agonistlerin kullanımı ile ilgili olarak literatürde farklı görüşler mevcut olup, erken doğum oranını azaltma açısından yararı günümüzde tartışılmaya devam etmektedir. King ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, gebelik süresinin beta-2 agonistlerin kullanıldığı grupta kontrole göre anlamlı olarak daha uzun olduğu bildirilmektedir (67). Anneye olan yan etkileri fetusa ve yenidoğana olan etkilerinden daha sıktır (68). Oral terbutalin ritodrine göre, glukoz tolerans testini anlamlı olarak daha fazla bozar. Ritodrin ise daha çok kalbe ait yan etkiler oluşturur. Beta adrenerjiklerin bu yan etkileri daha çok uzun

sürekli parenteral tedavi sonucu ortaya çıkar. Fetusa olan yan etkileri ise taşikardi, hipoglisemi, hiperinsülinemi, hipertansiyon, hipokalemi, fetal ketoasidoz, yenidoğanda hiperbilirubinemi gibi nadir görülen etkilerdir. Kullanılan beta adrenerjikler fetusta hiperglisemi ve hiperinsulinemi yaptığı için doğumdan sonra hipoglisemi gelişebilir. Özellikle, anne kan glukozu doğumdan önce normale inmemişse gelişebilir (69).

Gebe insan miyometriyumunda bulunan beta-2 adrenoseptörlerin uyarılmasıyla cAMP düzeylerinin arttığı ve gevşetici etkinin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (64,70). Beta-2 agonistlerin miyometriyal kasılmaları gevşetme mekanizması cAMP aracılığıyla kalsiyumun sarkoplazmik veziküllerde depolanması ve aktin-miyozin etkileşiminde görevli MLCK enziminin inhibisyonu şeklindedir (54). Beta-2 adrenoseptörlerin beta-2 agonistlere maruziyet sonrası akut desensitizasyona uğradığı oysa beta-3 adrenoseptörlerde bunun olmadığı gösterilmiştir (71). Bir çok kadında tokolitiklerin uterus kontraksiyonlarını geçici olarak durdurduğu ve nadiren erken doğumu önlediği görülmüştür. Tokolitik tedavisi ile ilgili bir metaanalizde tokolitik ajanların gebeliği uzatmalarına rağmen perinatal sonuçlarda düzelmelerin gösterilemediği fakat kadınların sağlığında önemli yan etkilere neden olduğu şeklinde sonuçlandırılmıştır (63).

Beta adrenoseptörler arasında beta-1 ve beta-2 adrenoseptör olarak sınıflandırılmış olup beta-3 adrenoseptör alt tipi, 1989 yılında insan genomunda klonlanarak gösterilmesinden sonra tanımlandı (44). Beta-3 adrenoseptörler beyaz yağ dokusunda lipolize, kahverengi yağ dokusunda termogeneze neden olmaktadır (46, 72). Son 5-6 yıldır beta-3 adrenoseptör agonistlerinin, tip-2 diabetes ve obesitenin tedavisindeki etkinliği araştırılmaya başlanmıştır.

Beta-3 adrenoseptör agonistlerinin vasküler dokuda ve insan myokardında gevşetici etkide bulunurken hücre içi cGMP düzeylerinin arttığı ve NO sentez inhibitörlerinin bu etkiyi ortadan kaldırdığı gösterildi. Bu nedenle, vasküler beta-3 adrenoseptörlerinin gevşetici etkilerini NO sentetaz aktivasyonu üzerinden cGMP artışı yoluyla da olduğu düşünülmektedir (73, 74). Daha önceki araştırmalar da ise, yağ dokusunda beta-3 adrenoseptörlerinin etki

mekanizmasının, beta-1 ve beta-2 adrenoseptörleri gibi cAMP yolunun aktivasyonu ile olduğu bildirildi (75).

İlk olarak Bardou ve arkadaşları, term gebelik dönemindeki insan miyometriyumunda, beta-3 adrenoseptör mRNA'sını polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterdiler (56). Bu çalışmada selektif beta-3 agonist SR-59119A ve beta-2 agonist salbutamolün miyometriyal cAMP düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığı fakat cGMP düzeylerinde bu artışın olmadığı gözlenmiştir (76). Pek çok çalışmada gebelik terme yaklaştıkça miyometriyumda NO sentetaz aktivitesinin azaldığı ve bu etkinin insan gebeliğinde uterin istirahate katkı sağladığını ve term miyometriyumda azalarak düzenlendiği bildirilmiştir (50, 77).

Çalışmamızda in vitro olarak CL 316243'ün gebe sıçan miyometriyal kasılmalarını inhibe ettiğini tespit ettik. Miyometriyal kasılmaları kontrole göre anlamlı oranda azaltan bu ilaç erken doğum eylemi tedavisinde kullanılabilir. Çalışmamızda CL 316243'ün amplitüd üzerindeki maksimum miyometriyal gevşetici etkisinin beta-3 antagonist ilaç tarafından azaltılması bu etkiye aracılık eden reseptörlerin adrenerjik beta-3 reseptörler olabileceğini, beta-1, beta-2 ve beta-3 reseptör antagonistlerinin CL 316243'ün frekans üzerindeki azaltıcı etkisini değiştirmemesi bu etkinin ilacın spesifik olmayan bir özelliğine bağlı olabileceğini düşündürür.

Bundan sonraki çalışmalarda CL 316243 maddesinin miyometriyum üzerindeki gevşetici etkisinin mekanizmasının tam olarak araştırılması için moleküler düzeyde çalışmalar planlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Challis JR. Characteristics of Parturition. In Creasy RK, Resnik R (eds.). Maternal fetal medicine W. B. Saunders Company. 4th Ed. 1999;31:484-497.
2. Black RS, Flint S, Lees C, Campbell S. Preterm labour and delivery. Eur J Pediatr. 1996;155:2-7.
3. Fuchs AR and Fuchs F. Physiology and endocrinology of parturition. In Gabbe SG, Niebly JR, Leigh SJ (eds.). Obstetrics. Normal & problem pregnancies. New York: Churchill Livingstone Inc. 3th Ed. 1996;5:111-136.
4. Iams JD. Preterm birth. In Gabbe SG, Niebly JR, Simpson JL (eds.). Obstetrics. Normal & problem pregnancies. New York: Churchill Livingstone Inc. 3th Ed. 1996;23:743-820.
5. Şener T. Preterm eylem ve doğum. Kişnişci H, Gökşin E, Durukan E, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Önderoğlu LS (eds.). Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara. Güneş Kitapevi Ltd. Şti. 1.baskı. 1996;7:1465-1480.
6. Strosberg AD, Pietri-Rouxel F. Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor. Trends Pharmacol Sci. 1996;17:373-381.
7. Hutchinson DS, Evans BA, Summers RJ. Beta(3)-adrenoceptor regulation and relaxation responses in mouse ileum. Br J Pharmacol. 2000 ;129:1251-1259.
8. Longhurst PA, Levendusky M. Pharmacological characterization of beta-adrenoceptors mediating relaxation of the rat urinary bladder in vitro. Br J Pharmacol. 1999;127:1744-1750.
9. Mustafa SM, Yousif M, Cherian A, Oriowo MA. Beta1- and beta3-adrenoceptors mediate relaxation in ovine trachealis smooth muscle. J Auton Pharmacol. 1999;19:193-199.

10. Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, Berdeaux A, Gauthier C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*. 1999;128:69-76.
11. Higby K, Xenakis MJ, Pauerstein CJ. Do tocolytic agents stop preterm labor? A critical and comprehensive review of efficacy and safety. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1247-1259.
12. Keirse MJ. New perspectives for the effective treatment of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:618-628.
13. Caritis SN, Chiao JP, Kridgen P. Comparison of pulsatile and continuous ritodrine administration: Effects on uterine contractility and β -adrenergic receptor cascade. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:1005-12.
14. Dufour P, Vinatier D, Puech F. The use of intravenous nitroglycerin for cervico-uterine relaxation: a review of the literature. *Arch Gynecol Obstet* 1997;261:1-7.
15. Axemo P, Fu X, Lindberg B, Ulmsten U, Wessen A. Intravenous nitroglycerin for rapid uterine relaxation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77:50-53.
16. Lammers WJ, Hamid R. The initiation, continuation, and termination of spontaneous episodes of circus movements in the pregnant myometrium of the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1515-1526.
17. Izumi H, Bian K, Bukoski RD, Garfield RE. Agonists increase the sensitivity of contractile elements for Ca^{++} in pregnant in rat myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:199-206.
18. Tezuka N, Hiroi M. Changes in Ca^{2+} channel expression in the myometrium human parturition. *Obstet Gynecol* 2000;95:14.
19. Huszar G. Physiology of the myometrium. In Creasy RK, Resnik R (eds.). *Maternal fetal medicine* W. B. Saunders Company. 3th Ed. 1994;8:133-143.
20. Goodwin TM. A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:208-S213.

21. Kawarabayashi T, Tsukamoto T, Shojo H, et al. Changes in responsiveness of freshly isolated longitudinal muscle cells from rats uterus towards oxytocin during gestation: contractility and calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol* 1997;128:77-84.
22. Snyder SW, Rigby SL, Adams HR. Evidence for decidual modulation of contractile function in the pregnant rat uterus. *Life Sci* 1994;55:349-411.
23. Goodwin TM. A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:208-S213.
24. Caserta G, De Graaf OF, Di Renzo GC. Mechanisms of initiation of human parturition. In Kurjak A (ed). *Textbook of perinatal medicine*. New York: The Parthenon Publishing Group Inc. 1998;14:1307-1393.
25. Kawarabayashi T, Shojo H, Tsukamoto T. Effects of oxytocin, prostaglandin F₂ α and prostaglandin E₂ on intracellular free calcium concentrations of longitudinal muscle cells isolated from term pregnant rat myometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1997;43:145-149.
26. Ekerhovd E, Weidegard B, Brannstrom M, Norstrom A. Nitric oxide-mediated effects on myometrial contractility at term during prelabor and labor. *Obstet Gynecol* 1999;93:987-994.
27. Bradley KK, Buxton IL, Barber JE, McGaw T, Bradley ME. Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism. *Am J Physiol*. 1998;275:1668-73
28. Zuo J, Lei ZM, Rao CV et al. Differential cyclooxygenase-1 and -2 gene expression in human myometria from preterm and term deliveries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 894-899.
29. Elliot JP, Colonel L. Magnesium sulfate as a tocolytic agent. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:277.
30. Morrison JC. Preterm birth: A puzzle worth solving. *Obstet Gynecol* 1990;76:5.
31. Gordon MC, Iams JD. Magnesium sulfate. *Clin Obstet Gynecol* 1995;38:706-712.

32. Epstein FH. Mechanism of disease. *N Engl J Med* 1982;307:1618.
33. Kaya T, Çetin A, Çetin M, et al. Effects of nimodipine and isradipine on endothelin-1 induced contraction of pregnant rat myometrium. *Eur J Pharmacol* 1998;346:65-69.
34. Creasy RK. Preterm labor and delivery. In Creasy RK, Resnik R.(eds.). *Maternal Fetal Medicine*. USA: W:B: Saunders Company. 3th Ed. 1994;33:494-526.
35. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 2, 9. Baskı, Ankara. 2000:1026-1033.
36. Slattery MM., Friel AM, Healy DG, Morrison JJ. Uterine relaxant effects of cyclooxygenase-2 inhibitors in vitro. *Obstet. Gynecol.*, 2001;98; 563-569
37. Sawdy R, Knock GA, Bennett PR, Poston L, Aaronson PI. Nimesulide and indomethacin inhibit contractility and the Ca²⁺ channel current in myometrial smooth muscle from pregnant women. *Br J Pharmacol* 1998;125: 1212-1217.
38. Fidel PL, Romero R, Wolf N et al. systemic and local cytokine profiles in endotoxin-induced preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1467-1475.
39. Kaga N, Katsuki Y, Obata M et al. Repeated administration of low-dose lipopolysaccharide induced preterm delivery in mice : a model for human preterm parturition and for assessment of the therapeutic ability of drugs against preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 754-759.
40. Momma K and Takao A. In vivo constriction of the ductus arteriosus by nonsteroidal antiinflammatory drugs in near-term and preterm fetal rats. *Pediatr Res* 1987; 22: 567-572.
41. Moise KJ, Huhta JC, Sharif DS et al. Indomethacin in the treatment of preterm labor; effects on the fetal ductus arteriosus. *N Engl J Med* 1988; 319: 327-331.

42. Norton ME, Merrill J, Cooper BA, Kuller JA, Clyman RI. Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor. *N Engl J Med* 1993; 329: 1602-1607.
43. Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*. 1967;214:597-598.
44. Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*. 1989;245:1118-21
45. Kaumann AJ, Molenaar P. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997;355:667-81.
46. Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*. 1984;309:163-165.
47. Bardou M, Dousset B, Deneux-Tharaux C, Smadja C, Naline E, Chaput JC, Naveau S, Manara L, Croci T, Advenier C. In vitro inhibition of human colonic motility with SR 59119A and SR 59104A: evidence of a beta3-adrenoceptor-mediated effect. *Eur J Pharmacol*. 1998;353:281-297.
48. Manara L, Badone D, Baroni M, Boccardi G, Cecchi R, Croci T, Giudice A, Guzzi U, Landi M, Le Fur G. Functional identification of rat atypical beta-adrenoceptors by the first beta 3-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. *Br J Pharmacol*. 1996;117:435-442.
49. Chamberlain PD, Jennings KH, Paul F, Cordell J, Berry A, Holmes SD, Park J, Chambers J, Sennitt MV, Stock MJ, Cawthorne MA, Young PW, Murphy GJ. The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23:1057-65.

50. Bardou M, Loustalot C, Cortijo J, Simon B, Naline E, Dumas M, Esteve S, Croci T, Chalon P, Frydman R, Sagot P, Manara L, Morcillo EJ, Advenier C. Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible beta(3)-adrenoceptor in human near-term myometrium. *Br J Pharmacol.* 2000;130:1960-6.
51. Denedy M C, Friel A M, Gardeil Fand, Morrison JJ. Beta-3 versus beta-2 adrenergic agonists and preterm labour: in vitro uterine relaxation effects. *BJOG.* 2001;108:605-609.
52. Denedy MC, Houlihan DD, McMillan H, Morrison JJ. Beta2- and beta3-adrenoceptor agonists: human myometrial selectivity and effects on umbilical artery tone. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:641-647.
53. Takeda H, Yamazaki Y, Akahane M, Igawa Y, Ajisawa Y, Nishizawa O. Role of the β_3 -Adrenoceptor in Urine Storage in the Rat: Comparison between the Selective β_3 -Adrenoceptor Agonist, CL 316243, and Various Smooth Muscle Relaxants. *The J of Pharmacol and Thera.* 2000;293(3):939-945
54. Woods, Morgan, Carson, Nancyleigh, Norton, N. Wesley, Sheldon, Jeffrey H., Argentieri, Thomas M. Efficacy of the [beta]3-adrenergic Receptor agonist CL 316243 on experimental bladder hyperreflexia and detrusor instability in the rat. *Journal of Urology.* 2001; 166(3):1142-1147
55. Kelly, Piasecki, Anthony, Dhillon, Pounder, Wakefield. Reversal and protection against indomethacin-induced blood stasis and mucosal damage in the rat jejunum by a β_3 -adrenoceptor agonist. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 1998;12(11):1121
56. Sarma DN, Banwait K, Basak A, DiMarino AJ, Rattan S. Inhibitory effect of beta3-adrenoceptor agonist in lower esophageal sphincter smooth muscle: in vitro studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304(1):48-55.
57. Evans BA, Papaioannou M, Anastasopoulos F and Summers RJ. Differential regulation of β_3 adrenoceptors in gut and adipose tissue of genetically obese (ob/ob) C57BL/6J-mice. *Brit J of Pharmacol.* 1998;124:763-771

58. Wanajo I, Tomiyama Y, Yamazaki Y, Kojima M, Shibata N. Pharmacological characterization of beta-adrenoceptor subtypes mediating relaxation in porcine isolated ureteral smooth muscle. *J Urol.*2004; 172(3):1155-9
59. Oostendorp J, Preitner F, Moffatt J, Jimenez M, Giacobino JP, Molenaar P, Kaumann AJ. Contribution of beta-adrenoceptor subtypes to relaxation of colon and oesophagus and pacemaker activity of ureter in wildtype and beta(3)-adrenoceptor knockout mice. *Br J Pharmacol.* 2000;130(4):747-58
60. Voipio H, Nevalainen T. Improved method for vaginal plug detection in rats. *Scand J Lab Anim Sci* 1998;25:5-9.
61. Yurtcu N, Cetin A, Güvenal T, Cetin M. Zamanlamalı Gebeliği Olan Sıçan Elde Edilmesinde Pediatrik Otoskop İle Vajinal Kopulatuvar Plug Araştırması Yararlı Bir Yöntem Olabilir Mi? 2001;3:205-208
62. Sharp PE, La Regina MC (eds.). *The Laboratory Rat.* CRC Press. Washington D.C. 1998;104-106
63. Sanchez-Ramos L, Kaunitz AM, Gaudier FL, Delke I. Efficacy of maintenance therapy after acute tocolysis: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181:484-490.
64. Andersson RG , Berg G, Johansson SR, Ryden G. Effects of non-selective and selective beta-adrenergic agonists on spontaneous contractions and cyclic AMP levels in myometrial strips from pregnant women. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1980;11:268-293.
65. Hawkins DF, Fusi L. Preterm labor: clinical management. In Kurjak A (ed). *Textbook of perinatal medicine.* New York: the Parthenon Publishing Group Inc. 1998;14:1345-1361.
66. Caritis SN, Venkataramanan R, Darby MJ, Chiao JP, Krew M. Pharmacokinetics of orally administered intravenously; recommendations for changes in the current regimen. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:322-328.

67. King JF, Grant A, Keirse MJ, Chalmers I. Beta-mimetics in preterm labour: an overview of the randomized controlled trials. *Br J Obstet Gynecol* 1988;95: 211-22.
68. Henkis GD. Complications of beta sympathomimetics tocolytic agent in: Clark SL, Latten DB, Henkins GD, Pholen JP, (eds.). *Critical Care Obstetrics*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. 1991; 223-250.
69. Vesalainen RK, Ekholm EM, Jartti TT, Tahvanainen KU, Kaila TJ, Erkkola RU. Effects of tocolytic treatment with ritodrine on cardiovascular autonomic regulation. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999;106:238-243.
70. Berg G, Andersson RG, Ryden G. Beta adrenergic receptor in human myometrium during pregnancy: Changes in the number of receptors after β -mimetic treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:392-6.
71. Nantel F, Bouvier M, Strosberg AD, Marullo S. Functional effects of long-term activation on human beta 2- and beta 3-adrenoceptor signaling. *Br J Pharmacol*. 1995;114:1045-1051.
72. Arch JR. β 3-Adrenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *Eur J Pharmacol*. 2002;440:99-107.
73. Ida K, Hashimoto K, Kamiya M, Muto S, Nakamura Y, Kato K, Mizota M. Stereoselective action of (R*,R*)-(+/-)-methyl-4-[2-[2-hydroxy-2-(3-chlorophenyl)ethylamino] propyl]-phenoxyacetic acid (BRL37344) on beta-adrenoceptors and metabolic chiral inversion. *Biochem Pharmacol*. 1996. 22;52:1521-1527.
74. Gauthier C, Leblais V, Moniotte S, Langin D, Balligand JL. The negative inotropic action of catecholamines: role of beta3-adrenoceptors. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000;78:681-690.
75. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest*. 1998;102:1377-1384.

76. Strosberg AD. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:421-50.
77. Kaya T, Cetin A, Sarioglu Y. Changes in the nitric oxide system of rat myometrium during midgestation and delivery at term. *Pharmacol Res.* 1998;37:403-408.