

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SELEKTİF COX-2 İNHİBİTÖRÜ 5,5-DİMETHYL-3-(3-
FLUOROPHENYL)-4-(4-METHYLSULPHONYL) PHENYL-2(5H)-
FURANONE'NUN GEBE SIÇANLARIN ERKEN DOĞUM VE MİYAD
DOĞUMDA TOKOLİTİK ETKİSİNİN VE FETAL DUKTUS
ARTERİYOSUS ÜZERİNDEKİ KASICI ETKİSİNİN DİĞER COX
İNHİBİTÖRLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Arş.Gör.Dr.Barış KARADAŞ
UZMANLIK TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi
Doç.Dr.Tijen TEMİZ

SİVAS
2003

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 28.03.2002 tarih ve 2002/463 No'lu kararı kabul edilen "TEZ YAZMA YÖNERGESİ" ne ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun 12.03.2002 tarih ve 2002/1 sayılı kararına göre yazılmıştır.

TEŐEKKÜR

Tezimin hazırlamasında büyük emeği geçen tez danıŐmanım Doç.Dr. Tijen TEMİZ'e, emeklerini esirgemeyen Doç.Dr. Serdar SOYDAN, Doç.Dr. Ali ÇETİN, Yrd.Doç.Dr. Celal KALOĐLU, Uz.Dr. İhsan BAĐCIVAN ve Arş.Gör.Dr. Bülent SARAÇ'a katkılarından dolayı teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	V
İNGİLİZCE ÖZET	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
TABLolar	VIII
ŞEKİLLER	IX
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER-	3
II.1. Erken Doğum Eylemi	3
II-2. Myometriyal Kasılma Fizyolojisi	4
II-3. Miyometriyal Kasılma Fizyolojisinin Biyokimyasal Temeli	5
II-4. Miyometriyal Aktiviteyi Etkileyen Endokrin Faktörler	9
II-5. Miyometriyal Kontraktiliteyi Etkileyen Parakrin Medyatörler	9
II-6. Fetal Duktus Arteriyosus	11
II-7. Myometriyal Aktiviteyi İnhibe Eden İlaçlar ve Etki Mekanizmaları	12
II-8. İnflamasyona Bağlı Erken doğumun Fizyopatolojisi	15
ARAÇ GEREÇ ve YÖNTEMLER	17
III.1. Erken-Dönem ve Miyadında Gebe Sıçanların Elde Edilmesi	17
III.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve İlaçlar	17
III.3. İzole Miyometrium Şeritlerinin İn Vitro Deneylere Hazırlanışı ve Miyometrial Kontraksiyonların Mekanik Olarak Ölçümü	19
III.4. Fetal Duktus Arteriyosus'un Ölçülmesi	20

	<u>SAYFA</u>
BULGULAR	22
IV.1. Erken Doğum Oranının Değerlendirilmesi	22
IV.2. KCl ile Kasılan Myometriyal Şeritlerde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi	22
IV.3. Oksitosin ile Stimüle Edilmiş Spontan Myometriyal Kasılmalar Üzerinde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi	23
IV.4. PGE ₂ ile Stimüle Edilmiş Spontan Myometriyal Kasılmalar Üzerinde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi	23
IV.5. PGF _{2α} İle Stimüle Edilmiş Spontan Myometriyal Kasılmalar Üzerinde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi	24
IV.6. Myometriyal Şeritlerin Spontan ve Stimüle-Edilmiş Kontraksiyonları Üzerinde DMSO ve DFU'nun Etkisi	25
IV.7. Fetal Duktus Arteriyosus'a DFU ve İndometasinin Etkisi	25
TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	47

ÖZET

Erken doğumun % 20'sinde uterin enfeksiyon görülür ve intrauterin dokularda prostaglandin (PG) ürünlerinin artması ile sonuçlanır. Siklooksijenaz (COX) inhibitörleri, esas olarak COX-1 inhibitörleri, erken doğum eyleminin tedavisi için kullanılmaktadır, fakat ciddi fetal yan tesirlere neden olurlar. Bu çalışmanın amacı, LPS ile indüklenmiş erken ve miyad doğum eylemindeki sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin KCl, oksitosin, PGE₂ ve PGF_{2α} ile stimüle edilmiş kontraksiyonlarının amplitüd ve frekansı üzerinde DFU'nun tokolitik etkisini nimesulid ve indometasin ile karşılaştırmayı amaçladık. Ayrıca, fetal duktus arteriyosus (FDA) üzerinde DFU ve indometasin etkilerini de karşılaştırdık.

Erken doğum (n=15) ve miyad doğum (n=15) eylemindeki Wistar albino sıçanlardan myometriyal şeritler elde edildi ve izometrik gerilimleri kaydetmek için organ banyolarına asıldı. İndüklenmiş myometriyal kasılmalar üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin kümülatif konsantrasyonlarının etkileri ölçüldü, ve $-\log(10) EC_{50}$ ve maksimal inhibisyon (E_{max}) değerleri karşılaştırıldı. Erken (n=25) ve miyad (n=25) dönemindeki sıçanların DFU (10, 100 mg/kg) ve indometasin (10, 100 mg/kg) verilmeden önce (kontrol) ve verildikten sonra pulmoner arter ve FDA iç çapları binoküler mikroskop altında mikrometre kullanılarak ölçüldü ve karşılaştırıldı.

DFU, nimesulid ve indometasin; erken ve miyad doğum eylemindeki sıçanlardan izole edilen ve KCl, oksitosin, PGE₂ ve PGF_{2α} ile indüklenen myometriyal kasılmalar üzerinde anlamlı inhibitör etkiler oluşturdu. Erken ve miyad doğum eylemindeki myometriyal şeritlerde indometasinin E_{max} değeri DFU ve nimesulid ile karşılaştırıldığında belirgin derecede düşüktü ($p < 0.05$), fakat $-\log(10) EC_{50}$ değerlerinde anlamlı bir değişiklik yoktu ($p > 0.05$). Tüm dokularda DFU ve nimesulidin $-\log(10) EC_{50}$ ve E_{max} değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Erken ve miyad doğum eylemindeki sıçanlardan izole edilen myometriyal dokular arasında bu üç ilacın her birinin $-\log(10) EC_{50}$ ve E_{max} değerleri arasında da anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). DFU (10 ve 100 mg/kg), indometasine (10 ve 100 mg/kg) göre hem erken dönemde hem de miyad dönemde FDA'da daha az kasılmaya neden oldu ($p < 0.05$).

Bu bulgular; selektif bir COX-2 inhibitörü olan DFU'nun erken ve miyad doğumda yeni bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılabileceğini gösterir. Bununla birlikte FDA'daki kasılma açısından dikkatli olunmalıdır.

Anahtar kelimeler: DFU, nimesulid, indometasin, myometriyum, fetal duktus arteriyosus.

SUMMARY

Uterine infection occurs in as much as 20 % of preterm delivery and results increased prostaglandin (PG) productions in intrauterine tissues. Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors, which are mainly COX-1 inhibitors, have been used for treatment of preterm labor but are associated with significant adverse fetal effects. The aim of this study was to compare the tocolytic effects of DFU with indomethacin and nimesulide on the amplitude and frequency of KCl, oxytocin, PGE₂ and PGF_{2 α} stimulated contractions of myometrial strips isolated from rats in the lipopolysaccharide-induced preterm labour and term labour. We also compared the effects of DFU and indomethacin on the fetal ductus arteriosus.

Myometrial strips were obtained from preterm (n=15) and term (n=15) labor Wistar albino rats and were mounted in organ baths for the recording of isometric tensions. The effects of cumulative concentrations of DFU, nimesulide and indomethacin on stimulated myometrial contractions were measured, and values for $-\log(10) EC_{50}$ and mean maximal inhibition (E_{max}) were compared. The inner diameters of pulmonary artery and ductus arteriosus before (control) and after administration of DFU (10, 100 mg/kg) and indomethacin (10, 100 mg/kg) in preterm (n=25) and near-term (n=25) rats were measured under binocular microscope with a micrometer and compared.

DFU, nimesulide and indomethacin exerted significant inhibitor effects on KCl-, oxytocin-, PGE₂- and PGF_{2 α} -stimulated contractions of myometrial strips isolated from rats in the preterm and term labour. E_{max} value of indomethacin was markedly lower than in the DFU and nimesulide ($P < 0.05$), with no change $-\log(10) EC_{50}$ values, in the preterm and term labour myometrial strips. There were no significant difference between $-\log(10) EC_{50}$ and E_{max} values of DFU and nimesulide in all tissues ($P > 0.05$). There were no significant difference between $-\log(10) EC_{50}$ and E_{max} values of each one of this three agents between myometrial tissues isolated from rats in either preterm or term labour ($P > 0.05$). Constriction rates on fetal ductus arteriosus of DFU (10 or 100 mg/kg) were significantly lower than indomethacin (10, 100 mg/kg) in both preterm rats and near term rats ($P < 0.05$).

These data demonstrate that DFU, a specific COX-2 inhibitor, could be used as a new therapy for preterm and term labour. However, careful attention to constriction of the fetal ductus arteriosus should be given.

Key words: DFU, nimesulide, indomethacin, myometrium, fetal ductus arteriosus.

SİMGELER ve KISALTMALAR

NSAİİ	: Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar
PG	: Prostaglandin
COX	: Siklooksijenaz
FDA	: Fetal duktus arteriyosus
DFU	: 5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl) phenyl-2(5H)-furanone
LPS	: Lipopolisakkarid
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
GTP	: Guanezin trifosfat
cAMP	: Siklik-adenozin monofosfat
MLCK	: Myosin light-chain kinase
DAG	: Diaçilgliserol
IP₃	: İnozitoltrifosfat
CRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
ACTH	: Adrenokortikotrop hormon
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
NO	: Nitrik oksit
PGI₂	: Prostatiklin
TX	: Tromboksan
PA	: Pulmoner arter
H-E	: Hemotoksin-Eozin

TABLOLAR

Tablo 1. Myometriyal parakrin faktörler ve işlevleri.

Tablo 2. Hamileliklerinin 15. gününde LPS (2x50 µg/kg) ve distile (2x125 µl) su verilen sıçanlarda erken doğum oranlarının değerlendirilmesi (n=20).

Tablo 3. Erken ve miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin kontraksiyon amplitüd ve frekansı üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin pD₂ değerleri.

Tablo 4. Erken ve miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin kontraksiyon amplitüd ve frekansı üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin E_{max} değerleri.

ŞEKİLLER

Şekil 1. Erken (A) ve miyad (B) doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve KCl (80 mM) ile kasılan myometrial şeritler (her grupta n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin gevşeme yanıtları. Bulgular ortalama \pm standart hata ile sunulmuştur.

Şekil 2. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

Şekil 3. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

Şekil 4. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve PGE₂ (10⁻⁷ M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

Şekil 5. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve PGE₂ (10⁻⁷ M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

Şekil 6. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve PGF_{2 α} (10⁻⁷ M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

Şekil 7. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10^{-7} M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

Şekil 8. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin spontan kontraksiyonlar üzerinde DMSO (A)'nın ve KCl (B) ile kasılan myometriyal şeritlerde DFU'nun konsantrasyona bağlı etkisi.

Şekil 9. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (A), PGE_2 (B) ve $\text{PGF}_{2\alpha}$ (C) ile indüklenen myometriyal şeritlerde DFU'nun konsantrasyona bağlı inhibitör etkisi.

Şekil 10. Erken ve miyad dönemdeki sıçanların FDA/PA oranlarına göre, DFU ve indometasinin kasıcı etkileri.

Şekil 11. Erken dönemdeki sıçanların fetuslarından alınan kalp kesitleri üzerinde, 10 mg/kg DFU (A) ve 10 mg/kg indometasinin (B), FDA ve PA üzerine etkileri.

Şekil 12. Erken dönemdeki sıçanların fetuslarından alınan kalp kesitleri üzerinde, 100 mg/kg DFU (A) ve 100 mg/kg indometasinin (B), FDA ve PA üzerine etkileri.

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Erken doğum eylemi, doğum hekimliğinde karşılaşılan önemli bir sorundur. Doğum eyleminin 21-37. haftalar içinde başlaması olarak tanımlanan erken doğum eylemi, tüm gebeliklerin yaklaşık %10'unda görülür (1). Erken doğum, intrapartum dönemde fetüsün ve postpartum dönemde yeni doğanın morbidite ve mortalitesini artıran önemli bir nedendir. Erken doğum eyleminde en önemli tedavi yöntemi tokolizdir. Tokoliz, myometriyal kasılmaların baskılanarak, bu kasılmalara yol açan nedenlerin ortadan kaldırılmasıdır. Tokoliz tedavisinde β_2 -sempatomimetikler, magnezyum sülfat, kalsiyum kanal blokörleri ve nonsteroidal antiinflatuvar ilaçlar (NSAİİ) kullanılmaktadır. Bu ilaçların etkinlikleri bir çok klinik çalışmada araştırılmış ve tokolitik etkilerinin birbirlerinden çok farklı olmadığı bildirilmiştir (1, 2). Tokolitik tedavide kullanılan ilaçların herbirinin kendine özgü oldukça ciddi yan tesirlerinin bulunması nedeniyle yeni tokolitik ilaçların geliştirilmesi için bir çok deneysel ve klinik çalışma yapılmaktadır. Erken doğum tedavisinde mevcut ilaçlara göre daha etkili ve yan tesirleri daha az olan yeni ilaçlara gereksinim duyulmaktadır.

Erken veya miyadında doğumda uterusu prostaglandin (PG) sentezi artar (3, 4). PG'ler özellikle de $PGF_{2\alpha}$ 'nın insan, fare ve koyun gibi birçok türde doğumda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (5). PG sentez yolağında ana enzim olan siklooksijenaz (COX)'ın aktivitesi, annenin amniyonunda gestasyon yaşı ilerledikçe artmaktadır (6). Uterusta iki COX enzimi izole edilmiştir. Bunlar COX-1 ve COX-2'dir. COX-1 yapısal bir enzimdir ve fizyolojik PG'in üretimine katkıda bulunur. COX-2 indüklenbilir bir enzimdir ve inflamasyon ile ilişkilidir (7). İnsanda COX-2'nin up-regulasyonu erken veya miyadında doğumun başlangıcı ile çok güçlü bir ilişki içerisindedir (8, 9). Bu dönemlerde COX-2'nin inhibisyonu insanlarda inflamasyona bağımlı erken doğumun önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

İnflamatuvar olayların erken doğuma neden olduğu bilinmektedir. İntraamniyotik enfeksiyon ve korioamniyonitis erken doğuma neden olabilir (10). PG üretimini inhibe eden NSAİİ erken veya miyadında doğumu geciktirmede etkili ilaçlardır (11, 12). Fakat NSAİİ'nin fetal duktus arteriyosus (FDA)'un erken kapanması ve amniyotik sıvının azalması sonucu renal perfüzyonda bozulma gibi yan tesirleri nedeniyle, erken doğum tedavisinde kullanılmaları kısıtlıdır (13, 14, 15).

COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe eden indometasin'in gebeliğe özgü birkaç önemli yan tesiri nedeniyle tokolitik bir ilaç olarak kullanımı sınırlıdır. İndometasin gibi nonselektif COX inhibitörlerinin yan tesirlerinden bazılarının COX-1 inhibisyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (7, 15). Bu nedenle, COX-2'ye selektif NSAİİ'ler erken doğumda daha az yan tesirli tokolitik tedavi yapabilirler. Selektif bir COX-2 inhibitörü olan nimesulid'in erken doğumda gecikmeye neden olduğu bildirilmiştir (16). Fakat gebe annede nimesulid kullanımı sonucu yeni doğanda böbrek yetmezliği geliştiği gösterilmiştir (17). COX-2 enzimini COX-1'e göre 375 kat selektif inhibe eden selekoksib'in farelerde erken doğum eylemi insidansını azalttığı, anne ve fetusun böbrek ağırlıklarını ve morfolojilerini değiştirmede, miyad doğumlu farelerde duktus arteriyosusu güçlü bir şekilde kasarken, erken doğumlu farelerde hafif bir kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir (18).

5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl) phenyl-2(5H)-furanone (DFU), COX-1 enzimi ile karşılaştırıldığında COX-2 enzimini 1000 kat daha selektif inhibe eden yeni bir ilaçtır (19). Selektif COX-2 inhibitörlerinden meloksikam, nimesulid, selekoksib ve rofekoksib'in in vitro tokolitik etkileri ve yan tesirlerini gösteren bir çok çalışma yapılmıştır (20, 21, 22). Ancak DFU'nun tokolitik etkisini ve fetal yan tesirlerini araştıran herhangi bir yayın bulunamamıştır. İn vivo uygulanan ilaçların etki mekanizması, metabolizması, etki profili ve etkinliği birçok faktör tarafından etkilendiğinden in vitro araştırmalar randomizasyon açısından daha değerli olabilirler (23).

Bu çalışmada, sıçanlarda, DFU'nun myometriyal kontraksiyonlar üzerindeki in vitro tokolitik etkisi, hem lipopolisakkarid (LPS) ile oluşturulan erken doğum eyleminden sonra, hemde miyadında gebe sıçan myometriyumu üzerinde, nimesulid ve indometasin'in etkileriyle karşılaştırılmalı olarak araştırıldı. Ayrıca, DFU'nun erken ve miyad doğumda FDA üzerinde kasıcı etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II-1. Erken Doğum Eylemi:

Erken doğum, doğum eyleminin 21-37. haftalar arasında başlaması olarak tanımlanır (1). Erken doğum eyleminin genel popülasyondaki sıklığı % 10'dur. Erken doğum eyleminin nedenlerine ilişkin bir çok teori üretilmiştir. Maternal, plasental, fetal ve çoğunlukla da idiyopatik nedenler söz konusudur (2). Erken doğum eylemine en sık neden olan durumlar fetomaternal enfeksiyonlar, fetal distres, erken membran rüptürü ve plasenta previa veya plasenta dekolmanına bağlı antepartum kanamalarıdır (1, 2). Erken doğum, halen yenidoğan mortalite ve morbiditesini artıran en önemli nedendir. Yenidoğanda herhangi bir konjenital anomali olmaksızın ölümlerinin % 85-90'ından prematürite sorumludur. Prematür yenidoğanlar bronko-pulmoner displazi, respiratuvar distres, intraventricüler hemoraji, retrolental fibroplazi, sepsis, serebral palsi, görme ve işitme problemleri gibi nedenlerden dolayı yüksek morbiditeye sahiptir. Geliştirilen yeni tedavi metodları sonucu 24, 28, 32 ve 36 haftalık bebeklerin yaşama şansları sırasıyla % 10, % 77, % 96 ve % 99 olarak bulunmuştur (2).

Erken doğum eyleminin etiyojisi multifaktöriyel olduğundan ve sıklıkla bilinmediğinden erken doğum eyleminin başlayacağını önceden tahmin edilmesi oldukça güçtür (24). Erken doğum eyleminin az bir kısmı fetüsün uygun olmayan intrauterin çevreye cevabı olarak oluşurken, geri kalan kısmı doğumun başlamasından sorumlu fizyolojik mekanizmaların anormal aktivasyonundan ve utero-feto-plasental ilişkinin bozulması nedeniyle gebelik süresince sessiz kalan myometriyal aktivitenin yeniden başlamasından kaynaklanmaktadır (2). Bilinen etiyojistik nedenleri maternal (yaş, parite, kilo, stres, alkol ve sigara kullanımı gibi), fetal (intrauterin büyüme geriliği, hipoksi, intrauterin enfeksiyonlar,

konjenital anomaliler gibi) ve çevresel faktörler (meslek, düşük sosyoekonomik düzey gibi) olarak üç gruba ayırabiliriz (1, 2).

Erken doğum eyleminin tedavisinde hedef, myometriyal aktiviteyi baskılayarak uterin kasılmaları doğuma neden olmayacak düzeye indirmektir. Bu amaçla uygulanan tedavi yöntemine tokoliz, kullanılan ilaçlara da tokolitik ilaçlar denmektedir. Doğumun en önemli itici gücü olan myometriyal aktivitenin tanımlanması ve bu aktiviteyi etkileyen fizyolojik, farmakolojik süreçlerin kontrol altına alınabilmesi, obstetrik tedavi yöntemlerinin büyük bir hızla gelişmesini sağlamıştır (25, 26). Tedavide kullanılan ilaçların etki mekanizmalarını ve farmakokinetiklerini tam olarak açıklığa kavuşturabilmek için hedef organ olan uterus düz kas yapısının (myometriyum) kasılma-gevşeme fizyolojisinin bilinmesi gerekmektedir.

Günümüzde kullanılmakta olan tokolitik ajanlar β_2 semptomimetikler, kalsiyum kanal blokerleri, magnezyum sülfat ve NSAİİ'dir. Bunlar arasında klinikte en sık kullanılan ilaçlar β_2 semptomimetiklerdir (25). Bu ilaçların çoğunun istenmeyen ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Yüz bin kadını kapsayan bir çalışmada kullanılan tokolitik tedavilere rağmen erken doğum eyleminin prevalansında önemli bir azalma saptanmamıştır (2). Tokolitik tedavinin istenen başarıya ulaşamamasının asıl nedeni myometriyal aktiviteyi düzenleyen kompleks mekanizmaların yeterince anlaşılammış olmasıdır. Myometriyal aktivitenin moleküler mekanizmalarının tanımlanması, bu aktivite üzerinde etkili olabilecek yeni ilaçların geliştirilmesini sağlayabilir.

II-2. Myometriyal Kasılma Fizyolojisi:

Gebeliğin sağlıklı bir şekilde devamı ve dış ortama uyum sağlayabilecek bir fetusun dünyaya gelmesi bir dizi fizyolojik regülasyon mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Bu regülasyon mekanizmalarının kavranması, gebelik ve doğum sırasında gerçekleşen bazı patofizyolojik olayların tanımlanması ve tedavilerinin sağlanmasında yardımcı olacaktır. Fizyolojik regülasyon olaylarından en önemlisi gebelik ürününün yerleştiği organ olan uterustaki myometriyal aktivitenin kontrol mekanizmasıdır (27). Myometriyal aktivite fetus yaşam kabiliyeti kazanana kadar sessiz-latent fazda seyrederken, miyada doğru bu faz sona erer. Myometriyum transformasyon geçirir ve güçlü, düzenli myometriyal kasılmalar başlayarak doğum gerçekleşmiş olur. Sessiz-latent fazda, myometriyal aktivite kontrolü bozulursa erken doğum eylemi veya doğum eyleminin gecikmesi gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelir (28).

Gebe uterusu kitle olarak 15 kat, volüm olarak ise 500-1000 kat artar. Doğum sonrası uterus involusyona uğrayarak tekrar eski haline döner. Sağlıklı bir gebeliğin devamı ve büyümekte olan fetusa uygun bir ortamın sağlanabilmesi için öncelikle uterusun bazı yapısal değişikliklere uğraması gerekmektedir. Uterusun transformasyonu sırasında myometriyumda özellikle iki önemli değişim gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki myometriyal hücrelerin sayı (hiperplazi) ve büyüklük olarak (hipertrofi) artmasıdır. İkincisi ise bu hücrelerdeki kontraktil myometriyal aktivitenin doğuma kadar baskılanmasıdır (29).

II-3. Myometriyal Kasılma Fizyolojisinin Biyokimyasal Temeli:

II-3.1. Kontraktil elementler:

Myometriyumun kasılma işlevi nöral, humoral ve parakrin faktörlerden ziyade myometriyal hücrelerin intrensik pace-maker aktivitesine bağlıdır (28, 30). Korpus ve servikte katekolaminlerin konsantrasyonunun saptanması sonucu myometriyumda 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 (29). 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 myometriyuma etkileri diurnal ritmisi 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 gap junction sayısını artırarak, uterusu daha duyarlı hale getirmektedir. Oksitosin reseptör sayısının artışı fetal büyüme ve uterin distansiyonla da ilişkilidir ve terme yaklaştıkça oksitosinin nörohipofizden salgılanma frekansı artmaktadır (29).

Myometriyum, uterusun üçte ikisini teşkil eden, dış tarafta longitudinal, iç tarafta sirküler olarak seyreden bir düz kas kitlesidir. Sirküler ve longitudinal kas demetlerinin kontraktil güçleri birbirinden farklıdır. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, gebeliğin geç dönemlerinde longitudinal kas kitlesindeki oksitosin reseptörlerinin artışının, sirküler kas kitlesinden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle longitudinal kasların kontraktil gücü daha fazladır (31).

Bir gram myometriyal dokuda yaklaşık olarak 1-4 mg miyozin ve 16-60 mg aktin mevcut olup aktin miyozin oranı 14:1'dir. Aktin ve miyozin fibrilleri adeta hücre iskeleti gibi işlev görmektedir. Ayrıca uterusu az miktarda da olsa sikletin ve tropomiyozin gibi yapısal proteinler de bulunmaktadır. Gebe ve gebe olmayan uteruslarda bu protein oranları farklı bulunmamıştır. Miyozin kas kontraksiyonunun esas proteindir, 16 nm kalınlıkta, 2.2 mm uzunlukta ve 500 000 dalton moleküler ağırlıktadır. Miyozin asimetrik bir yapıya sahip olup hegzamer yapılı globüler bir baş ile helikal kuyruk kısmından meydana gelmektedir. Globüler baş iki ağır zincirden (her biri 200 000 dalton), kuyruk kısmı ise iki adet hafif zincirden (her biri 20 000 dalton) oluşmaktadır. 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 GTP (guanezin trifosfat) ve GTP'ye bağımlı G proteini tarafından artırılmaktadır. Aktin 43 000 daltonluk globüler bir proteindir. Bu protein 6 nm çapında ve kalın flamanlardan daha uzun olan ince flamanları yapmak üzere fizyolojik sıvılarda polimerize olur. Helikal yapıda dizilmiş aktin, ince tropomiyozin ile sarmal oluşturur. Aktin, Mg^{2+} -bağımlı miyozin-ATPazı aktive ettiği zaman enerji açığa çıkar ve miyozinin globüler başı aktin flamanına bağlanır (32).

Myometriyal 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. Myometriyal hücre kasılmasında, miyozin hafif zinciri fosforile edildikten sonra aktinle reaktif olarak, akto-miyozin formasyonunu meydana getirir. Myosin light-chain kinase (MLCK) tarafından katalizlenen bu enzimatik reaksiyon basamağı, hız kısıtlayıcı basamaktır. Kalsiyum-kalmudilin kompleksinin oluşması MLCK enzimini indükleyerek kasılmaya neden olur. cAMP'ye bağımlı protein kinazlar tarafından MLCK'nın fosforilasyonla inaktive edilmesi ise aktin miyozin köprülerinin yıkılmasına ve düz kaslarda gevşeme olayının meydana gelmesine neden olur (32).

II-3.2. Myometriyal Kontraktilitenin İyonik ve Elektriksel Temeli:

Myometriyum hücresi kasılabilirliği ile ilgili çeşitli iyon kanalları içermektedir. Myometriyumda saptanmış olan başlıca iyon kanalları sodyum, potasyum, klor ve non-selektif kanallardır. İyonların kanallardaki akışkanlığı membran potansiyelinin iyonik gradiyentine bağlıdır. Ancak bu kanalların hepsi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla

kalsiyum akışını değiştirerek membran potansiyelini etkilediklerinden, kalsiyum iyonu eksitabilite ile ilgili en önemli iyondur (33). Tokolitik ve oksitoksik 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 kalsiyum kanallarıdır. Sıçanlarda yapılan elektrofizyolojik ve biyokimyasal çalışmalarda voltaja bağlı kalsiyum kanallarının gebeliğin geç dönemlerinde arttığı ve progesteronun bu kanalların ekspresyonundan sorumlu mRNA düzeyini azalttığı gösterilmiştir (26).

Düz kas hücrelerinde sodyum ve potasyum iyonları istirahat membran potansiyellerinden sorumlu temel iyonlardır. Potasyum kanalının aktivasyonu myometriyal hücrelerin eksitabilitesini inhibe eder. Myometriyumda çeşitli potasyum kanalları tanımlanmıştır (34). Bunlar depolarizasyonun inhibisyonundan, repolarizasyon ve hiperpolarizasyonun indüksiyonundan sorumludurlar. β -sempatomimetik agonistler ve relaksin hormonu K^+ kanallarını aktive ederler. Miyositlerde istirahat membran potansiyeli statik değildir, gastrointestinal sistemdeki düz kaslar gibi düşük amplitüdü bazal siklik kasılma dalgaları gösterir. Hücre membranındaki polarizasyona göre bazal aktiviteden farklı kasılma ve gevşemeler görülür. Depolarizasyon fazında eşik değeri aşan kalsiyum, voltaja bağlı kalsiyum kanallarının açılmasıyla hücre içine girer ve kasılma olayı tetiklenmiş olur. Hiperpolarizasyon fazında ise bu kanallar kapanır ve gevşeme meydana gelir (35).

Normal şartlar altında istirahat halindeki miyositlerde kalsiyum konsantrasyonu ortalama 10^{-7} - 10^{-8} M'dir. Kalsiyum konsantrasyonu 10^{-6} M'e yükselince, kalmudilinle birleşerek MLCK aktive eder. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması, hücre içindeki sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salgılanması, dışa kalsiyum akımının azalması veya hücre içine kalsiyum girişinin artırılması şeklinde olabilir. Sarkoplazmik retikulumdan kalsiyumun salgılanması hücre içi kalsiyumu artıran en önemli mekanizmadır. İçe kalsiyum akımının artışı aksiyon potansiyeli gradiyentine ve reseptöre bağımlı olarak gerçekleşir. Hücre membranında reseptörlerle etkileşebilen ve reseptör aktivasyonuna bağlı sinyal transdüksiyonu sağlayan enzimlerden biri fosfoinozitolidaz (fosfolipaz C)' dir ve aktivasyonu fosfoinozitolid hidrolizini hızlandırır. Başka bir deyişle, membrandaki bir polifosfoinozitolid türü olan fosfatidilinozitol 4, 5-bifosfat'ın hidrolizine neden olur. Bu olay sonucu diaçilgliserol (DAG) ve inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3) oluşur. IP_3 hücre içi depolardan kalsiyumun salgılanmasını sağlarken, DAG'de prostaglandin sentezinde substrat olarak kullanılır.

Ekstrasellüler kalsiyum konsantrasyonu 10^{-3} M'dir. Bu düzeyin regülasyonu ATP'ye bağımlı Ca^{2+} -ATP'az, Mg^{2+} -ATP'azın ve ATP'den bağımsız (Na^+ değişimi ile çalışan) kalsiyum pompalarının aktivasyonu ile sağlanır. Myometriyal hücrelerin kasılma-gevşeme işlevi çeşitli farmakolojik ilaçlarla da artırılabilir veya azaltılabilir (33).

II-3.3. İntrasellüler Kalsiyum Seviyesinin Kontrolü

İntrasellüler kalsiyum seviyesi iki mekanizma ile düzenlenir. Bu mekanizmalar biri kalsiyumun hücre membranından içeri girmesi, ikincisi ise intrasellüler depolardan Ca^{2+} salınımıdır. Hücre dışından içeri kalsiyum girmesi en az iki mekanizma ile olur:

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

(2) Kalsiyum voltaj-bağımsız mekanizmalarla da hücre içine girebilir. Bunlardan en iyi bilineni Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPaz sistemidir.

Ca^{2+} '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 keşfidir. 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. Sitolazmik kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesinde intrasellüler kalsiyum depolarının önemi büyüktür. Myometriyumun kalsiyum olmayan ortamda bile kasıldığı gösterilmiştir, bu olay endoplazmik retikulum ve mitokondrinin kasılmanın başlaması için yeterli kalsiyumu sağladığını gösterir (32). Hem hücre membranı hem de endoplazmik retikulum membranındaki aktif transport pompaları ile hücre içi kalsiyumun hücre dışından 10 000 kez daha az olması sağlanır (32, 36). β_2 mimetikler cAMP aracılığı ile hem MLCK'yı inhibe ederler, hemde depolardan kalsiyum salınımını inhibe ederler ve sonuçta intrasellüler kalsiyum miktarını azaltırlar (29).

II-4. Myometriyal Aktiviteyi Etkileyen Endokrin Faktörler:

Feto-materno-plasental akstaki endokrin faktörler, myometriyal aktivitenin kontrolünü sağlayarak, gebeliğin devamı ve sonlanmasında etki göstermektedir. Myometriyal aktivitenin kontrolünde rol oynadığı bilinen hormonlar kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), adrenokortikotrop hormon (ACTH), oksitosin, östrojen ve progesteron'dur. Plasentadan sentezlenen CRH, fetal hipotalamo-hipofizo-adrenal akstan salgılanan ACTH ve katekolaminler myometriyal aktiviteyi artırmaktadırlar. Progesteron hormonu myometriyal hücrelerde kalsiyumun sarkoplazmik retikulumdan salgılanmasını inhibe ederek, myometriyal aktiviteyi baskılamakta ve gebeliğin devamını sağlamaktadır. Ayrıca oluşmuş myometriyal kasılmaların komşu hücelere yayılmasına neden olan adezyon moleküllerinin sentezini inhibe etmektedir. Östrojen hormonu ise gebeliğin sonlanması ve doğum eyleminin başlaması için gerekli bir hormondur. Östrojen myometriyal hücrelerin elektriksel bağlantılarını, eksitabilitelelerini, oksitosine duyarlılıklarını ve PG sentezini artırmaktadır. Böylece myometriyal kasılmalar güçlü ve düzenli olmakta ve doğum eylemi başlamaktadır. Gebeliğin sonlarına doğru östrojen sentezi artmakta, progesteron/östrojen oranı östrojen lehine değişmektedir. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda doğum eylemi sırasında elde edilen myometriyal dokularda östrojen reseptörlerinin arttığı ve progesteron reseptörlerinin ise azaldığı bildirilmiştir (29, 37).

Nörohipofizer hormonlardan oksitosin myometriyal aktiviteyi artırır. Myometriyal aktiviteyi oksitosin gibi artıran maddelere oksitosik ajanlar denmektedir. Bilinen endojen oksitosik ajanlar, α -adrenajik agonistler, parakrin mediyatör olan PG'ler 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 (33). Oksitosin, endotelin-1 gibi diğer endojen oksitosiklerden farklı olarak, miyoflamanların kalsiyuma olan duyarlılığını da artırmaktadır (38).

II-5. Myometriyal Kontraktiliteyi Etkileyen Parakrin Mediyatörler:

Myometriyal dokuda çeşitli parakrin mediyatörler bulunmaktadır. Bu mediyatörler myometriyumun kontraktil aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Tablo 1). Bunlardan en önemlileri nitrik oksit, prostaglandinler, lökotrienler ve sitokinlerdir. Parakrin

mediyatörler son derece lipofilik olup, buldukları dokularda fonksiyon gösterdikten sonra hızlıca metabolize edilip yıkılırlar. Ayrıca sentez ve salgılanımları steroid hormonların kontrolü altındadır (26, 31).

Parakrin mediyatörlerden prostaglandinlerin myometriyal aktivitedeki işlevleri çok önemlidir. Myometriyal dokuda kasıcı etkisi olan prostaglandinler, PGE₁, PGE₂ ve PGF_{2α}'dir. PG ile indüklenmiş myometriyal dokuda in vitro ve in vivo uterin kontraksiyonlar görülür.

Tablo 1. : Myometriyal parakrin faktörler ve işlevleri.

Hücre Tipi	Ürün	Hedef	Etki
Epitelyal hücreler	PGF _{2α} , PGE ₁ , PGE ₂	Myometriyum	Kasılma
Stromal hücreler	PGF _{2α}	Myometriyum	Kasılma
Mast hücreleri	Histamin	Stromal hücreler ve kan damarları	PG salgılanması ve vazodilatasyon
Lökositler	Sitokinler, PGE ₁ , PGE ₂	Stromal hücreler ve myometriyum	PG salgılanması ve kasılma
Endotel ve kan damarları	Endotelin	Myometriyum kan damarları	Kasılma
	EDRF/ NO	Myometriyum kan damarları	Gevşeme

EDRF (endothelium-derived relaxing faktör): endotel kaynaklı gevşetici faktör.

II-5.1. Prostaglandin Sentezi:

Prostanoidler diye adlandırılan siklooksijenaz ürünü eikozanoidler, PG'ler, PGI₂ (prostasiklin) ve TX (tromboksan)'lardır. Prostanoidlerin biyosentezi üç basamaklıdır. İlk basamakta hücre membranındaki fosfolipidlerden serbest yağ asidlerinin oluşması için fosfolipaz enzimi aktive edilir. İkinci basamakta serbest yağ asidleri COX enzimleri ile siklik endoperoksidler olan PGG₂ ve PGH₂'ye dönüştürülür. Üçüncü basamakta ise siklik endoperoksidler prostanoidler'e indirgenmektedir. COX'ın iki izoformu tanımlanmıştır, bunlar COX-1 ve COX-2'dir. COX-1 ile COX-2 arasındaki en önemli fark COX-1'in esas olarak konstitütif (yapısal) olması, yani üretildiği hücrelerde sürekli sentez edilmesi nedeniyle daima var olmasıdır. COX-2 reaktif bir enzimdir. Hücrelerde enzimi stimüle eden bir uyarı yoksa, sentezi duraklar (7). COX-2 özellikle endotoksin (bakteriyel lipopolisakkarid), TNFα,

IL-1B, IL-6 gibi inflamasyon yapan etkenler, endotelin, serotonin, büyüme faktörleri ve mekanik sürtünme stresi tarafından indüklenebilir (39).

II-5.2. Prostaglandinlerin Myometriyuma Etkileri:

Genel kural olarak, prostaglandinlerin çoğu, damar düz kaslarını gevşetirler, diğer yapıların düz kaslarını (barsak ve uterus gibi) ise kasarlar. İnsanda intravenöz olarak verilen PGE'ler ve PGF'ler gebelik olsun veya olmasın, uterusu oksitosik etki yaparlar, tonusu artırır ve ritmik kasılmalara neden olurlar. Ritmik kasılmalar, tonus üzerindeki etkiye göre daha uzun devam eder. Gebelik esnasında verilmeleri aborsiyona ve gebelik sonunda verilmeleri doğum eylemin başlamasına neden olur (5).

Prostaglandinler, uterus düz kasını, oksitosin gibi kendi reseptörleri aracılığı ile stimüle ederek kasarlar ve kontraktilitesini artırır. Erken ve miyadında doğumda uterusu PG sentezi artırmıştır (3, 4). PG sentez yolağında ana enzim olan COX'ın aktivitesi, annenin amniyonunda gestasyon yaşı ilerledikçe artmaktadır (6). Doğum eylemi sırasında gebenin kanında ve amniyotik sıvısında prostaglandin düzeyi yükselir. İnsanda COX-2'nin up-regulasyonu erken ve miyadında doğumun başlangıcı ile çok güçlü ilişki içerisindedir (8, 9). PG'ler PG reseptörleri aracılığı ile IP₃ yolağını stimüle ederek endoplazmik retikulumdan Ca²⁺ salıverilmesini artırır ve sonuçta uterusu kasılma oluştururlar (40).

II-6. Fetal Duktus Arteriyosus

II-6.1 Fetal dolaşım:

Fetal dolaşımında, plasentadan umbilikal venle dönen kan duktus venosusla karaciğeri kanlandırmadan geçer. Sağ atriya giren kanın büyük kısmı sağ atriyumun arka duvarına yaklaşarak foramen ovaleden geçerek sol atriya ulaşır. Bu nedenle plasentadan gelen bu iyi oksijenlenmiş kan kalbin sağ tarafına değil, sol tarafına geçerek, sol ventriküldeki kan, başa ve ön ekstremitelerin damarlarına pompalanır. Sağ atriya superior vena kavadan giren kanın bir kısmı aşağıya akarak triküspit kapaktan sağ ventriküle girer. Bu kan esas olarak fetusun baş bölgesinden gelen deoksijene kandır. Deoksijene kan sağ ventrikülden pulmoner arter (PA)'e pompalanarak, oradan da FDA yoluyla inen aortaya ve iki umbilikal arter ile plasentaya gönderilerek orada oksijenlenir (41).

II-6.2. Prostaglandinlerin Fetal Duktus Arteriyosus'a Etkileri:

FDA aorta ile PA'ı birleştiren bir kanaldır ve fetal dönemde açıktır. Fetal dolaşımdan PA'e gelen kan bu kanal yardımı ile aortaya aktarılır. FDA'un normal kapanması doğumdan sonradır. Doğumdan sonra pulmoner dolaşımda direnç azalır, küçük dolaşım fonksiyonel olmaya başlar. Arteriyel pO₂ artması, endojen NO ve gevşetici PG'lerin azalması ve endotelin-1 ürünlerinin artması duktal kapanmaya neden olur (42, 43). FDA'un hamilelikte açık kalmasında iki önemli vazodilatör PG (PGE₂ ve PGI₂) önemli bir rol oynar. Doğumdan sonra FDA kapanmasındaki yetmezlik matürlere kıyasla prematürlerde daha sıktır. FDA kapanması doğumdan sonra iki fazlıdır. İlki musküler kasılma, ikincisi intimal kalınlaşmadan sonra mekanik kapanmadır. Musküler kasılma ve intimal kalınlaşma prematür yenidoğanda yetersizdir (44). Bu nedenle prematürlerde FDA tam olarak kapanmayabilir.

Hamilelikte kullanılan COX inhibitörleri PG üretimini inhibe eder ve FDA'da kasılma oluşturur. Gestasyon ilerledikçe COX inhibitörlerinin etkisine FDA daha duyarlı hale gelir. İndometasin bir PG sentez inhibitörüdür, klinikte duktal kapanmayı sağlamak için kullanılır. İnsanlarda gebeliğin 24. haftasından önce çok az bir etki gösterir (45). Gebeliğinin 19. gününde olan sıçanlara indometasin verildiğinde orta derecede duktal kasılma olurken, gebeliğinin 21. gününde olan sıçanlarda güçlü bir kasılma meydana gelmiştir (46). Selektif COX-2 inhibitörü selekoksib (1mg/kg) gebeliğinin son döneminde olan sıçanlara verildiğinde duktal kasılmaya neden olmazken, aynı miktarda indometasin önemli miktarda duktal kasılma oluşturmuştur. Bu bulgu selektif COX-2 inhibitörlerinin term gebede FDA üzerinde indometasinden daha güvenli olabileceklerini göstermektedir (18).

II-7. Myometriyal Aktiviteyi İnhibe Eden İlaçlar ve Etki Mekanizmaları:

Erken doğum eyleminin tedavisinde myometriyal aktiviteyi inhibe etmek amacıyla farklı tokolitik ilaçlar kullanılmaktadır. Tokoliz tedavisinin primer hedefi oluşan uterin kontraksiyonların durdurulmasıdır. Bu amaçla kullanılan ilaçlar aşağıda sırasıyla sunulmuştur.

II-7.1. β_2 -Adrenerjik Agonistler:

β_2 -agonistler tüm düz kaslarda olduğu gibi uterus düz kasında da gevşemeye neden olurlar. β_2 agonist-reseptör kompleksini, membran reseptörü, GTP'ye bağımlı intramembranöz G proteini ve intraselüler adenilat siklaz enzimi oluşturur. Adenilat siklazın aktivasyonu intraselüler ATP'den cAMP yapılmasına sebep olur. β_2 -mimetikler cAMP aracılığı ile iki yoldan etki edebilirler. Birincisinde cAMP, cAMP-bağımlı protein kinazi

aktive eder. Bu enzimde kalsiyumun hücre membranından içeri akışını inhibe eder ve intrasellüler veziküllere Ca^{2+} girişini artırır (24, 47). İkincisinde, MLCK'yi fosforilize eden protein kinazı aktive eder ve ardından aktin-miyozin kompleksinin mevcut kalsiyuma duyarlılığının azalmasıyla kompleksin parçalanmasına sebep olur (29).

Günümüzde tokolitik olarak en sık kullanılan ilaç, β_2 -adrenerjik agonist olan ritodrin'dir. Ritodrinin uzun süreli kullanımında β_2 -adrenerjik reseptör sayısı düşer (down-regulasyon) ve ilacın etkisi azalır. Kronik β_2 -mimetik tedavi sonrasında cAMP seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Diğer β -mimetik ilaçlar gibi ritodrinin de istenmeyen etkileri bulunmaktadır. Bunlar taşikardi, hipotansiyon, tedirginlik, göğüs sıkışması veya ağrısı, elektrokardiyogramda değişiklikler (S-T çökmesi, T düzleşmesi veya negatifliği, Q-T aralığının uzaması gibi), pulmoner ödem, ölüm, hipokalemi, hiperglisemi, hiperinsülinemi (diabet olmadan), laktik-keto-asidoz gibi metabolik etkiler, bulantı, kusma, sinirlilik, anksiyete, başağrısı, titreme, ateş ve hallüsinasyon gibi etkilerdir (24).

II-7.2. Magnezyum:

İn vivo ve in vitro olarak Mg^{2+} myometriyal aktiviteyi inhibe eder (8). 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 ve ATP'nin etkilediği aktin-miyozin ilişkilerini engellemektedir (48). Klinik bulgular $MgSO_4$ 'ın etkisini kalsiyum antagonisti olarak yaptığını göstermektedir. Zira $MgSO_4$ alan hastalarda kalsiyum verildiğinde uterus aktivitesi artmaktadır (49). Magnezyum, ekstrasellüler kalsiyumun hücre içine girişini, intrasellüler depolardaki kalsiyumun salınımını, sitozoldeki kalsiyumun hareketini ve böylece de myometriyumun 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 (48). Magnezyum sülfatın daha önemsiz yan tesirleri başağrısı, görme bulanıklığı, şaşılık, bulantı, hipotermi, nistagmus, letarji, güçsüzlük, dalgınlık, üriner retansiyon ve fekaloiddir. Hastaların birçoğunda bu etkiler hafif ve geçicidir. Daha nadir ama ciddi bir yan tesiri ise hipokalsemidir (23, 50). 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 fonksiyon bozukluğunda, kalp bloğu ve myokardiyal hasarı olanlarda ve myastenia graviste kullanılmamalıdır (50). Magnezyum sülfat tedavisinin bırakılmasının en sık sebebi uterus kontraksiyonlarının durdurulamamasıdır. Yüksek dozlarda kalp atımında değişkenlik tanımlanmıştır. Yenidoğanda letarji, hipotoni, solunum depresyonu görülebilir (48, 25).

II-7.3. 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. Myometriyum gibi düz kasların aktivitesi direkt olarak sitoplazma içindeki serbest kalsiyum miktarı ile ilişkilidir. İntrasellüler serbest kalsiyum miktarının azalması myometriyal 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 kalsiyum kanalları sayesinde olur. Kalsiyum kanal blokörlerinin esas etki yeri, düz kaslarda en çok bulunan L-tipi voltaj-bağımlı kanallardır (51). Bağlandıkları kanalları depolarizasyondan sonra 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 (52).

Bu ilaçların sebep olduğu düz kas gevşemesi organa spesifik olmadığından birçok dokuda istenmeyen etkilere sebep olabilir. Ancak, tokolitik amaçla kullanılan dozlarda bu yan tesirlerinin görülmesi nadirdir. Kalsiyum kanal blokörleri ile en sık görülen istenmeyen etki geçici flushing, baş ağrısı ve bulantıdır (53). Kalsiyum kanal blokörlerinin kardiyovasküler yan tesirleri 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 (51). β_2 -mimetikler gibi kan potasyumu üzerine etki etmezler, ancak glukozu çok hafif yükseltebilirler. Bazı hayvan deneylerinde kalsiyum kanal blokörlerinin uteroplasental kan akımını azaltarak fetusta hipoksemiye neden olabileceği iddia edilmesine rağmen bu görüş diğer hayvan deneyleriyle desteklenmemiştir (25) Yine de bu ilaçların maternal ve fetal istenmeyen etkilerinin iyice araştırılması gerekmektedir.

II-7.4. Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ):

NSAİİ'lerin pek çoğunda bulunan ortak özellik, dokularda araziidonik asidden PG'ler ve diğler bazı eikozanoidlerin oluşmasını katalize eden siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) enzimlerini inhibe etmeleridir. Pek çoğunda analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkiler bir arada bulunur. Bazılarında sadece analjezik ve antipiretik etki vardır (asetaminofen gibi). Antipiretik ve analjezik etkileri, hipotalamus ve omurilik arka boynuzunda prostaglandin sentez ve salıverilmesini inhibe etmeleri ile ilişkilidir. Antiinflamatuvar etkinlikleri, sentetik veya doğal en güçlü antiinflamatuvar ilaçlar olan glukokortikoidlere göre daha zayıftır. Analjezik etkinlikleri de güçlü analjezikler olan, fakat antiinflamatuvar etkisi bulunmayan narkotik analjeziklerine göre zayıftır (54).

Selektif COX-2 inhibitörleri analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar olarak kullanılmaktadır. Bu grup ilaçların insan myometriyal kontraksiyonlarını güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. COX-2'nin up-regulasyonu erken doğum ve miyad doğumun başlangıcı ile çok güçlü ilişki içerisinde (22). Nimesulid ve indometasinin, insan myometriyal kontraksiyonları üzerindeki inhibitör etkilerinin PG sentezinin inhibisyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kalsiyum kanallarındaki akımı azaltarak da myometriyal düz kaslarda gevşeme oluşturdukları gösterilmiştir. Kalsiyum kanallarının blokajı, NSAİİ'nin birkaç etki mekanizmasından biri olabilir (21).

PGE'ler ve PGF'ler gebelik olsun veya olmasın, uterusu tonusu artırır ve ritmik kasılmalara neden olurlar. Erken ve miyadında doğumda uterusu PG sentezi artmıştır. Bu sentezi inhibe eden NSAİİ doğumu geciktirirler (11, 12). Fakat NSAİİ'nin, FDA'un erken kapanması ve amniyotik sıvının azalması sonucu renal perfüzyonda bozulma gibi yan tesirlere neden oldukları bilindiğinden, erken doğum tedavisinde kullanılmaları kısıtlıdır (13, 14, 15). İndometasin gibi nonselektif COX inhibitörlerinin yan tesirlerinin birçoğundan COX-1 inhibisyonunun sorumlu olduğu gösterildiğinden, COX-2 selektif NSAİİ'ler erken doğumda daha az yan tesir ile tokolitik tedavi yapabilirler (7, 15).

II-8. İnflamasyona Bağlı Erken Doğumun Fizyopatolojisi:

İnflamasyon canlı dokuların her çeşit zedelenmeye karşı gösterdiği bir savunma reaksiyonudur. Akut inflamasyonun üç önemli bileşeni vardır: i) Kan akış hızı artırımına yol açan vasküler çap değişiklikleri, ii) mikro dolaşımda plazma proteinleri ve lökositlerin dolaşımdan çıkmasına olanak tanıyan yapısal değişiklikler, iii) lökositlerin zedelenme alanında birikimleridir. İnflamasyon sırasında makrofajlardan salıverilen TNF α , IL-1 β ve IL-6 gibi

sitokinler tarafından COX-2'nin up-regulasyonu sonucu prostaglandinlerin sentezi artmaktadır. Prostaglandinlerin ve lökotrienlerin dokuda çeşitli etkenlerden ileri gelen lokal inflamasyon hallerinde iltihaplı bölgelerde konsantrasyonlarının yükseldiği bulunmuştur (54).

İnflamatuvar olayların erken doğuma neden olduğu bilinmektedir. İntraamniyotik enfeksiyon ve korioamniyonitis erken doğumla yakından ilişkilidir (10). Hayvan modelleri, enfeksiyon ve erken doğum arasındaki olası ilişkiyi doğrular niteliktedir (12, 55, 56). İnsan ve hayvan çalışmalarında gestasyonel dokular bakteriyel stimulusa inflamatuvar cevap olarak TNF α ve IL-1 üretimine neden olurlar. Bu proinflamatuvar stimulanlar, COX-2 ekspresyonu artırarak PG sentezini stimüle ederler (39, 57). PGF $_{2\alpha}$ ve PGE $_2$ erken doğumda önemli rol oynar. COX-2 enzimi inflamasyon ile indüklenir ve erken doğum eylemi süresince artar (8). Bununla birlikte insanlarda doğum eyleminin başlatılması ve tetiklenmesindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Sıçanlarda, COX-1'den oluşan PG'ler luteolizisten sorumludur, halbuki COX-2'den oluşan PG'ler doğum eyleminin son basamağında rol oynar (58). İnflamasyon aracılı erken doğum eylemini başlatıcı mekanizmaların miyad doğumdaki başlatıcı mekanizmalardan farklı olduğu düşünülmektedir. Esas olarak COX-2 up-regulasyonu myometriyum, plasenta ve fetal membranlarda bulunur (8, 59). İnsanlarda ve sıçanlarda miyad doğum eyleminin mekanizması farklı bulunmakla birlikte, hem insanda hem de sıçanlarda inflamasyon nedeni ile olan erken doğum eylemlerinde COX-2'nin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (7).

BÖLÜM III

ARAÇ GEREÇ VE YÖNTEMLER

III.1. Erken ve Miyad Dönem Gebe Sıçanların Elde Edilmesi:

Bu çalışmada, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarından alınan 180-200 gram ağırlığında 100 adet erişkin dişi albino sıçan kullanıldı. Dişi sıçanların her biri 22 °C sabit ısıda, saat 17:00 ile 9:00 arası, erişkin erkek sıçanlarla çiftleştirildi. Çiftleştirmeden sonraki gün vajinal sürüntü testi yapılarak sperm arandı. Dişi sıçanlarda sperm görüldüğü gün, gestasyonun 0. günü olarak kabul edildi ve bu sıçanlar ayrı bir kafese konularak üzerlerine gebelik tarihi yazıldı. Sıçanlara hamileliklerinin 15. gününde intraperitoneal olarak günde iki kez saat 14:00 ve 17:00'de 50 µg/kg dozunda LPS verilerek erken doğum sıçan modeli oluşturuldu (18). Bu modelde 10 adet sıçana LPS, 10 adet sıçana ise LPS'in çözücüsü olarak kullandığımız distile su günde iki kez (saat 14:00 ve 17:00'de) intraperitoneal yoldan verilerek iki grup arasındaki erken doğum oranları karşılaştırıldı. Gebelik süresinin 16-18. gününde olanlar erken dönem, 19-21. gününde olanlar ise miyad dönem olarak kabul edildi. 15 adet erken dönem ve 15 adet ise miyad dönem sıçandan izole edilen myometriyal şeritler izometrik kasılmaları ölçmek için kullanıldı. Ayrıca, 25 adet sıçan erken dönem ve 25 adet sıçan ise miyad dönem FDA'un ölçümü amacıyla kullanıldı.

III.2. Deneysel Kullanılan Kimyasallar ve İlaçlar:

Deneysel kullanılan Krebs Bikarbonat solüsyonunun içeriği mM/L olarak şu şekildedir: NaCl 125 mM, KCl 2.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NaHCO₃ 23.9 mM ve glukoz 11.0 mM

Deneysel kullanılan ilaçlar:

Oksitosin (Synpitan forte ampul) (Deva)

DFU (Merck Sharp & Dohme)

İndometasin, nimesulid, PGE₂, PGF_{2α}, LPS (Sigma)

Silinmiş: III)

Silinmiş:)

Silinmiş: nin yanına

Silinmiş: ve

Silinmiş: her

Silinmiş: e

Silinmiş: değerlendirildi

Silinmiş: gebelik gününün tespitinde kullanıldı

Silinmiş: Sıçanların

Silinmiş: g

Silinmiş: ğinin

Silinmiş: ile

Silinmiş: gebeliğinin

Silinmiş:

Silinmiş: i

Silinmiş: ve gebeliğinin

Silinmiş: ile

Silinmiş: gebeliğinin

Silinmiş:

Silinmiş: adetinde

Silinmiş: , 15 adetinde miyad dönem izole sıçan myometriyumu,

Silinmiş: i

Silinmiş: ve 25 adeti erken dönem fetal ductus arteriosusunun ölçümü

Oksitosin, PGE₂, PGF_{2α} ve LPS distile suda çözüldü. İndometasin, nimesulid ve DFU ise DMSO'da çözüldü. Tüm ilaçlar deney sabahı hazırlandı.

III.3.1. İzole Myometriyum Şeritlerinin İn Vitro Deneylere Hazırlanışı ve Myometriyal Kontraksiyonların Mekanik Olarak Ölçümü:

Erken ve miyad dönem olarak gebelik tarihleri saptanan sıçanlar boyunları kırılarak öldürüldü, uterusları çıkarılarak gebelik materyali dikkatlice tahliye edildi. Myometriyal doku, endometriyum ve çevre dokularından ayrıştırılarak, her bir sıçandan 6 adet 8x2x2 mm. uzunluğunda myometriyal şeritler elde edildi. Myometriyal dokular içerisinde Krebs Bikarbonat solüsyonu bulunan, % 95 O₂ ve % 5 CO₂ ile gazlandırılan, pH'sı 7.4 değerinde ve sıcaklığı 37 °C olan, 10 ml'lik izole organ banyolarına bir ucu organ askısına diğer ucu transdüsyora (Grass-FT 03 Force Displacement) gelecek şekilde yerleştirildi. Myometriyal 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 kümülatif konsantrasyonlarda eklendi. İzometrik gerilim değişiklikleri Grass 79E model 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 myometriyal kontraksiyonları stabil hale gelen şeritler, KCl (80 mM), Oksitosin (10 mU/ml), PGE₂ (10⁻⁷ M), ve PGF_{2α} (10⁻⁷ M) ile stimüle edildi. Stimülasyondan 15 dk sonra, myometriyal kontraksiyonlar üzerinde indometasin (10⁻⁹-10⁻⁴ M), nimesulid (10⁻⁹-10⁻⁴ M) ve DFU (10⁻⁹-10⁻⁴ M)'nun kümülatif-konsantrasyonlarına bağlı gevşeme cevapları kaydedildi.

Çalışmanın bu bölümü Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

III.3.2. İlaçların Uygulanması:

Erken (n=15) ve miyadında (n=15) gebelik döneminde bulunan sıçanların uteruslarından elde edilen myometriyal şeritler üzerinde çalışıldı. Gebe sıçanların her birinden en az 6 adet myometriyal şerit elde edildi, bunlardan 4 tanesi izole organ banyolarına asıldı, diğer ikisi düzenli çalışmayan dokuların yerine kullanmak üzere oksijenlendirilmiş Krebs solüsyonunda bekletildi. Myometriyal şeritlerden 60 dk içerisinde stabil spontan kontraksiyon oluşturmayanları organ banyolarından çıkarıldı ve yerine yeni preparatlar asıldı. Ayrıca,

Silinmiş:)

Silinmiş: preparatının

Silinmiş: :

Silinmiş: y

Silinmiş: bağ

Silinmiş: dokular

Silinmiş: şeritler

Silinmiş: u içerene

Silinmiş: karbon dioksit

Silinmiş: 'lük Ph

Silinmiş: .

Silinmiş: izometrik gerilimler kaydedildi. İlaçlar uygulanmadan ve uygulandıktan sonraki miyometriyal kontraksiyonları izometrik gerilim ölçer transdüserle

Silinmiş: ölçüldü.¶

Silinmiş: Hazırlanan

Silinmiş: e

Silinmiş: miş

Silinmiş: oluşan

Silinmiş: Deneysel ç

Silinmiş: III-2.2) Myometrial kontraksiyonların mekanik olarak ölçümleri:¶

Miyometriyal şeritlere deneysel ilaçların ilavesinden önce 1 g'lık istirahat gerilimi uygulanarak 30 dakika beklenip izometrik kasılmaların düzenli hale gelmesi sağlandı. Çalışma yapılacak ilaçlar organ banyolarına kümülatif konsantrasyonlarda eklendi. İzometrik gerilim değişiklikleri Grass FT03 force-displacement algılayıcısı ve Grass 79E model Poligraf cihazı (Grass, Quincy, MA, USA) ile kaydedildi. Kaydedicinin kağıt hızı 5 mm/dk'ya ayarlandı. Cihazın kalibrasyonu trasede 1 g'lık gerilimin vertikal olarak 1 cm'lik yer değişikliğine karşılık gelecek şekilde yapıldı.¶

Silinmiş:)M

Silinmiş: Gebeliğinin

Silinmiş: e

Silinmiş: y

Silinmiş: ki

Silinmiş: üçer

Silinmiş: i

Silinmiş: di

Silinmiş: ve etki profiline bakıldı.

yapılan ilk deneyler sırasında düzenli kontraktıl aktiviteye sahip dokuların en az 4 saat süreyle spontan kontraktıl aktivitesini koruduğu gözlemlendi.

Erken ve miyadında gebelik döneminde bulunan, sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritler kullanılarak;

Set 1: Spontan kontraksiyonlar üzerinde, COX inhibitörü ilaçların çözücüsü olarak kullanılan, DMSO'nun herhangi bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

Set 2: 80 mM KCl ile kastrılan myometriyal şeritler üzerinde indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve DFU (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

Set 3: Oksitosin ile stimüle edilen myometriyal şeritlerin amplitüd ve frekansı üzerinde indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve DFU (10^{-9} - 10^{-4} M)'nun kümülatif konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

Set 4: PGE₂ ile stimüle edilen myometriyal şeritlerin amplitüd ve frekansı üzerinde indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve DFU (10^{-9} - 10^{-4} M)'nun kümülatif konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

Set 5: PGF_{2α} ile stimüle edilen myometriyal şeritlerin amplitüd ve frekansı üzerinde indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve DFU (10^{-9} - 10^{-4} M)'nun kümülatif konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı.

III.3.3. Deney Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi:

Kontraksiyon 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 karşılaştırıldı.

Kontraksiyon verileri hesaplanırken, 80 mM KCl ile elde edilen kasılma cevabı % 100 (kontrol) olarak kabul edildi. İndometasin, nimesulid, ve DFU'nun kümülatif konsantrasyonları uygulandıktan sonra elde edilen cevap bu kasılmanın % değişimi olarak hesaplandı.

Oksitosin, PGE₂ ve PGF_{2α} ile stimüle edilmiş her myometriyal şeridin kontraksiyonlarının amplitüd ve frekansları % 100 (kontrol) olarak kabul edildi. İndometasin, nimesulid ve DFU'nun kümülatif konsantrasyonlarının uygulanmasından sonra amplitüd ve frekanslardaki değişimler o şeridin kontrol amplitüd ve frekansındaki % değişim olarak hesaplandı.

Silinmiş: e

Silinmiş: y

Silinmiş: ki

Silinmiş: nun

Silinmiş: dozda organ banyosuna eklenerek sıçan miyometriyumunun spontan kontraksiyonları üzerindeki inhibitör etkisi kaydedildi.¶

Silinmiş: spontan kontraksiyonların indometazin (10^{-8} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-8} - 10^{-4} M) ve DFU (10^{-8} - 10^{-4} M) kümülatif dozda organ banyosuna eklenerek sıçan miyometriyumunun spontan kontraksiyonları üzerindeki inhibitör etkisi kaydedildi.¶

Silinmiş: spontan kontraksiyonların indometazin (10^{-8} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-8} - 10^{-4} M) ve DFU (10^{-8} - 10^{-4} M) kümülatif dozda organ banyosuna eklenerek sıçan miyometriyumunun spontan kontraksiyonları üzerindeki inhibitör etkisi kaydedildi.¶

Silinmiş: Kasılmaların

Silinmiş: 1200

Silinmiş: 2

Silinmiş: asılma

Silinmiş: uygulanan gebe sıçan miyometriyal şeridinde oluşan

Silinmiş: amplitüdüler ilaçları uygulanmadan (kontrol) ve

Silinmiş: i

Silinmiş: amplitüdülerin trasesi değerlendirildi

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 bulunduğu 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 indometasin, nimesulid ve DFU'nun 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 (EC₅₀) her bir deneyin log-konsantrasyon yanıt eğrilerinden elde edildi ve aritmetik ortalama \pm standart hata olarak gösterildi.

pD₂ değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

A = Agonist ilacın molar konsantrasyonu

E_{max} = Agonist ilacın oluşturduğu maksimum etki

E_A = Agonist ilacın belirli bir konsantrasyonda oluşturduğu etki

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

III.4. Fetal Duktus Arteriyosusun Ölçülmesi:

FDA'un ölçülmesi amacıyla, gebelikleri erken (18. gün) ve miyad (21. gün) dönem olarak saptanmış 25'er adet sıçan kullanıldı. Her bir dönemdeki sıçanlar 5'er adetlik 5 gruba ayrıldı. Bu grupların her birine sırasıyla 10 mg/kg indometasin, 100 mg/kg indometasin, 10 mg/kg DFU, 100 mg/kg DFU ve 1 ml' lik DMSO (indometasin ve DFU'nun çözücüsü) saat 17:00'de gastrik tüp ile verildi. Ertesi gün saat 08:00'de boyunları kırılarak öldürülen anne sıçanlardan elde edilen fetusların toraksı kesilerek temizlendi, % 10'luk nötral formaldehit içerisine alındı ve 48 saat fiske edildi. Dokular artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidre

Silinmiş: d

edildi ve parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotom ile 5 mikron' luk seri kesitler elde edildi ve Hemotoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı ve fotoğrafları çekildi.

FDA ve PA çapları çizim tüplü Carl Zeis Jenamed II foto mikroskop ve bir gratikül yardımıyla ölçüldü. Bu ölçüm sırasında gerçek boyutu 1mm olan, 100 birime bölünmüş bir gratikül ve çizim tüpünün altına konmuş bir cetvelin görüntülerinin üst üste bindirilmesi yoluyla 10'luk objektifte gerçek büyütmenin x100 olduğu saptandı. Daha sonra gratikül alınarak yerine FDA ve PA görüntüleri içeren kesitler konuldu. Bunların iç çapları çizim tüpü altındaki cetvel yardımıyla ölçüldü ve mm cinsinden elde edilen değer 100 ile çarpılarak mikron cinsinden çap değeri elde edildi. Bu ölçümlerde her bloktan 5 kesit sistematik random yöntemiyle belirlenerek ölçüldü. Daha sonra her gurubun ortalama FDA ve PA çapları μm cinsinden belirlendi. PA'in en dar yerinin FDA'ya oranı (FDA/PA) ilaçların kasıcı etkisi olarak değerlendirildi. Student t-testi kullanılarak gruplar arasında farklılıklar istatistiksel olarak belirlendi.

Çalışmanın bu bölümü Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

Silinmiş: Deneysel ç

BÖLÜM IV

BULGULAR

IV.1. Erken Doğum Oranının Değerlendirilmesi :

Hamileliklerinin 15. gününde günde iki kez (saat 14:00 ve 17:00'de) intraperitoneal LPS (50 µg/kg) verilen 10 adet sıçanın gebeliklerinin 16-18. günlerinde doğum (erken doğum) yaptıkları saptandı. Hamileliklerin 15. gününde günde iki kez (saat 14:00 ve 17:00'de) LPS'in çözücüsü olan distile su verilen 10 adet sıçanın ise gebeliklerinin 19-21. günlerinde doğum (miyad doğum) yaptıkları saptandı (Tablo 2).

IV.2. KCl ile Kasılan Myometriyal Şeritlerde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi :

Erken ve miyad doğum dönemindeki sıçanlardan izole edilen myometriyum şeritleri 80 mM KCl ile kasıldıktan ve bu kasılma dengeye ulaştıktan sonra, DFU (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M) ile konsantrasyona bağımlı gevşeme yanıtları alındı. Her iki dönemde de, KCl (80 mM) ile kasılan myometriyal şeritler üzerinde DFU, nimesulid ve indometasin sırasıyla 10^{-8} , 10^{-8} ve 10^{-7} M konsantrasyonlardan başlayarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde gevşeme yanıtları oluşturdu ($p<0.05$). Hem erken hem de miyad dönemde, DFU ve nimesulid gevşeme yanıtları, indometasin gevşeme yanıtlarından özellikle yüksek konsantrasyonlarda (10^{-5} - 10^{-4} M) belirgin olmak üzere, istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla idi ($p<0.05$) (Şekil 1.A, 1.B). Her iki dönemde de, DFU ve nimesulidin E_{max} değerleri indometasine göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.05$), fakat pD_2 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Her bir ilacın E_{max} ve pD_2 değerleri erken ve miyad dönem olarak karşılaştırıldığında, dönemler arasında anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 3, 4).

Silinmiş: Sıçanların

IV.3. Oksitosin ile Stimüle Edilmiş Myometriyal Kontraksiyonlar Üzerinde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi :

Erken ve miyad doğum dönemlerindeki sıçanlardan izole edilen myometriyum şeritleri 10 mU/ml oksitosin ile stimüle edildikten ve bu stimülasyon dengeye ulaştıktan sonra, DFU (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M) ile konsantrasyona bağımlı inhibitör yanıtlar alındı. Her iki dönemde de, oksitosin (10 mU/ml) ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonların amplitüdünü DFU, nimesulid ve indometasin sırasıyla 10^{-8} , 10^{-8} ve 10^{-7} M konsantrasyonlardan başlayarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe ederken ($p < 0.05$) (Şekil 2.A, 3.A), kontraksiyon frekansını 10^{-6} M konsantrasyondan başlayarak anlamlı şekilde inhibe etti ($p < 0,05$) (Şekil 2.B, 3.B). Hem erken hem de miyad dönemde, myometriyal kontraksiyonların amplitüdü üzerinde DFU ve nimesulid'in inhibitör etkisi, özellikle yüksek konsantrasyonlarda (10^{-5} - 10^{-4} M), indometasinin inhibitör etkisinden anlamlı şekilde fazlaydı ($p < 0.05$) (Şekil 2.A, 3.A). Erken ve miyad dönemde, myometriyal kontraksiyonların frekansı üzerinde bu üç ilacın inhibitör etkileri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p > 0.05$) (Şekil 2.B, 3.B). Her iki dönemde de, myometriyal kontraksiyonların amplitüdü üzerinde DFU ve nimesulidin E_{max} değerleri indometasine göre anlamlı bir şekilde yüksekti ($p < 0.05$), fakat pD_2 değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0.05$). İki dönemde de, myometriyal kontraksiyonların frekansı üzerinde, kullanılan üç ilacın E_{max} ve pD_2 değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Her bir ilacın E_{max} ve pD_2 değerleri erken ve miyad dönem olarak karşılaştırıldığında, dönemler arasında anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 3, 4).

IV.4. PGE₂ ile Stimüle Edilmiş Myometriyal Kontraksiyonlar Üzerinde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi :

Erken ve miyad doğum dönemlerindeki sıçanlardan izole edilen myometriyum şeritleri 10^{-7} M PGE₂ ile stimüle edildikten ve bu stimülasyon dengeye ulaştıktan sonra, DFU (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M) ile konsantrasyona bağımlı inhibitör yanıtlar alındı. Her iki dönemde de, PGE₂ (10^{-7} M) ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonların amplitüdünü DFU, nimesulid ve indometasin sırasıyla 10^{-7} , 10^{-7} ve 10^{-7} M konsantrasyonlardan başlayarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe ederken ($p < 0.05$) (Şekil 4.A, 5.A), kontraksiyon frekansını 10^{-6} M konsantrasyondan başlayarak anlamlı şekilde azalttı ($p < 0,05$) (Şekil 4.B, 5.B). Hem erken hem de miyad dönemde, myometriyal kontraksiyonların amplitüdü üzerinde DFU ve nimesulid'in inhibitör etkisi özellikle yüksek konsantrasyonlarda (10^{-5} - 10^{-4} M) indometasinden anlamlı şekilde

fazlaydı ($p < 0.05$) (Şekil 4.A, 5.A). Erken ve miyad dönemde, myometriyal kontraksiyonların frekansı üzerinde DFU, nimesulid ve indometasin'in inhibitör etkileri arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Şekil 4.B, 5.B). Her iki dönemde de, myometriyal kontraksiyonların amplitüdü üzerinde DFU ve nimesulidin E_{max} değerleri indometasine göre anlamlı bir şekilde yüksekti ($p < 0.05$), fakat pD_2 değerleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0.05$). İki dönemde de, myometriyal kontraksiyonların frekansı üzerinde, kullanılan üç ilacın E_{max} ve pD_2 değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Her bir ilacın E_{max} ve pD_2 değerleri erken ve miyad dönem olarak karşılaştırıldığında, dönemler arasında anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 3, 4).

IV.5. PGF_{2α} İle Stimüle Edilmiş Myometriyal Kasılmalar Üzerinde DFU, Nimesulid ve İndometasinin Etkisi :

Erken ve miyad doğum dönemlerindeki sıçanlardan izole edilen myometriyum şeritleri 10^{-7} M PGF_{2α} ile stimüle edildikten ve bu stimülasyon dengeye ulaştıktan sonra, DFU (10^{-9} - 10^{-4} M), nimesulid (10^{-9} - 10^{-4} M) ve indometasin (10^{-9} - 10^{-4} M) ile konsantrasyona bağımlı inhibitör yanıtlar alındı. Her iki dönemde de, PGF_{2α} (10^{-7} M) ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonların amplitüdünü DFU, nimesulid ve indometasin sırasıyla 10^{-7} , 10^{-7} ve 10^{-7} M konsantrasyonlardan başlayarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe ederken ($p < 0.05$) (Şekil 6.A, 7.A), kontraksiyon frekansını 10^{-6} M konsantrasyondan başlayarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe etti ($p < 0.05$) (Şekil 6.B, 7.B). Hem erken hem de miyad dönemde, myometriyal kontraksiyonların amplitüdü üzerinde DFU ve nimesulid'in inhibitör etkisi özellikle yüksek konsantrasyonlarda (10^{-5} - 10^{-4} M) indometasinden anlamlı şekilde fazlaydı ($p < 0.05$) (Şekil 6.A, 7.A). Erken ve miyad dönemde, myometriyal kontraksiyonların frekansı üzerinde DFU, nimesulid ve indometasin'in inhibitör etkileri arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Şekil 6.B, 7.B). Her iki dönemde de, myometriyal kontraksiyonların amplitüdü üzerinde DFU ve nimesulidin E_{max} değerleri indometasine göre anlamlı bir şekilde yüksekti ($p < 0.05$), fakat pD_2 değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0.05$). İki dönemde de, myometriyal kontraksiyon frekansı üzerinde, kullanılan üç ilacın E_{max} ve pD_2 değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$). Her bir ilacın E_{max} ve pD_2 değerleri erken ve miyad dönem olarak karşılaştırıldığında, dönemler arasında anlamlı bir değişiklik bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 3, 4).

IV.6. Spontan ve Stimüle-Edilmiş Myometriyal Şeritlerin Kontraksiyonlar Üzerinde DMSO ve DFU'nun Etkisi :

Erken doğumdaki sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin spontan kontraksiyonları üzerinde, COX inhibitörü ilaçların çözücüsü olarak kullanılan DMSO myometriyal kontraksiyonların amplitüd ve frekansında anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 8.A).

Erken doğumdaki sıçanlardan izole edilen ve KCl, oksitosin, PGE₂ ve PGF_{2α} ile stimüle edilen myometriyal şeritlerin amplitüd ve frekansını, DFU konsantrasyona bağlı inhibe etti (Şekil 8.B, 9.A, 9B, 9C).

IV.7. Fetal Duktus Arteriyosus'a DFU ve İndometasinin Etkisi :

Erken ve miyad dönemdeki sıçanların fetuslarından alınan kalp kesitlerinde, FDA ve PA ölçümleri yapıldıktan sonra FDA/PA oranlarına bakılarak, DFU ve indometasinin kasıcı etkileri değerlendirildi. DFU ve indometasin verilen sıçanların fetuslarından alınan kalp kesitleri, tedavi almamış fetusların kalp kesitleri ile karşılaştırıldığında FDA'un orta derecede kasılma gösterdiği saptandı. DFU (10 ve 100 mg/kg), indometasine (10 ve 100 mg/kg) göre hem erken dönemde hem de miyad dönemde FDA'da daha az kasılma oluşturdu ($p<0.05$). DFU ve indometasin verilmesinden sonra FDA'da oluşan kasılma erken dönem sıçanlarda miyad dönem sıçanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha düşüktü ($p<0.05$) (Şekil 10).

Erken dönemdeki sıçanların fetuslarına DFU (10 ve 100 mg/kg) ve indometasin (10 ve 100 mg/kg) verilmesinden sonra FDA ve PA'in kasıcı etkileri değerlendirildi (Şekil 11, 12).

Tablo 2. Hamileliklerinin 15. gününde LPS (2x50 µg/kg) ve distile su (2x125 µl) verilen sıçanlarda erken doğum oranlarının değerlendirilmesi (n=20).

	Doğum Sayısı	Erken Doğum Günleri			Miyad Doğum Günleri		
		16	17	18	19	20	21
n	10	16	17	18	19	20	21
Kontrol (Distile su)	10	-	-	-	1	4	5
LPS	10	7	2	1	-	-	-

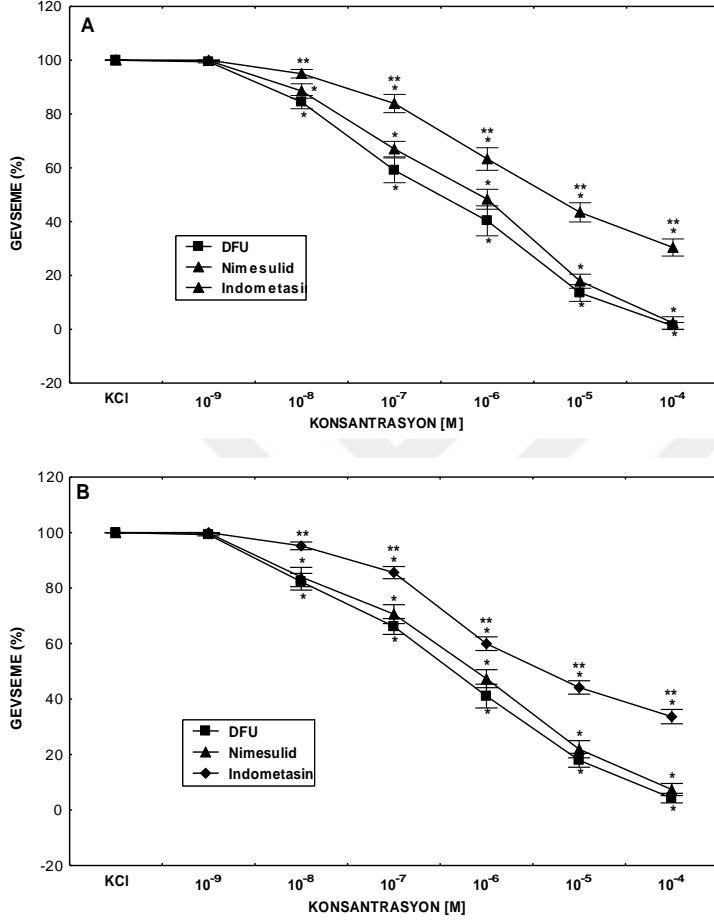
Tablo 3. Erken ve miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin kontraksiyon amplitüd ve frekansı üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin pD₂ değerleri.

pD ₂	AMPLİTÜD		FREKANS	
	ERKEN	MİYAD	ERKEN	MİYAD
İndometasin	6,16 ± 0,07	6,30 ± 0,05		
KCl Nimesulid	6,18 ± 0,08	6,36 ± 0,05		
DFU	6,52 ± 0,10	6,48 ± 0,06		
İndometasin	6,06 ± 0,08	6,28 ± 0,06	5,02 ± 0,06	5,02 ± 0,05
Oks. Nimesulid	6,25 ± 0,08	6,32 ± 0,07	5,02 ± 0,04	4,90 ± 0,06
DFU	6,30 ± 0,10	6,46 ± 0,09	5,05 ± 0,03	4,88 ± 0,05
İndometasin	6,12 ± 0,07	6,20 ± 0,05	5,18 ± 0,02	5,48 ± 0,08
PGE₂ Nimesulid	6,18 ± 0,08	6,36 ± 0,05	5,10 ± 0,04	5,32 ± 0,10
DFU	6,52 ± 0,10	6,48 ± 0,06	4,99 ± 0,05	5,16 ± 0,05
İndometasin	6,18 ± 0,05	6,16 ± 0,03	5,00 ± 0,07	5,17 ± 0,08
PGF_{2α} Nimesulid	6,18 ± 0,08	6,36 ± 0,05	4,96 ± 0,10	5,14 ± 0,08
DFU	6,52 ± 0,10	6,48 ± 0,06	4,98 ± 0,10	5,10 ± 0,05

Tablo 4. Erken ve miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin kontraksiyon amplitüd ve frekansı üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin E_{max} değerleri.

E_{max}	AMPLİTÜD		FREKANS	
	ERKEN	MİYAD	ERKEN	MİYAD
İndometasin	69,60 ± 7,09	66,34 ± 5,74		
KCl Nimesulid	97,68 ± 5,20*	92,62 ± 4,88*		
DFU	98,75 ± 2,79*	95,70 ± 4,87*		
İndometasin	57,28 ± 11,71	57,72 ± 8,87	33,04 ± 11,46	29,90 ± 7,56
Oks. Nimesulid	86,60 ± 9,77*	88,13 ± 5,35*	30,91 ± 6,02	28,67 ± 4,04
DFU	90,98 ± 11,06*	91,20 ± 6,20*	32,92 ± 5,88	33,84 ± 6,59
İndometasin	42,20 ± 6,26	44,80 ± 8,16	31,70 ± 7,00	39,20 ± 6,45
PGE₂ Nimesulid	67,37 ± 6,77*	80,14 ± 5,60*	37,00 ± 2,44	37,60 ± 10,73
DFU	71,78 ± 6,35*	83,24 ± 5,52*	34,20 ± 7,29	35,42 ± 6,74
İndometasin	50,20 ± 7,52	47,67 ± 6,09	36,60 ± 5,68	36,37 ± 12,51
PGF_{2α} Nimesulid	81,55 ± 4,57*	76,97 ± 5,42*	37,40 ± 7,09	38,80 ± 11,66
DFU	85,23 ± 5,62*	80,92 ± 6,57*	33,80 ± 8,67	37,55 ± 11,40

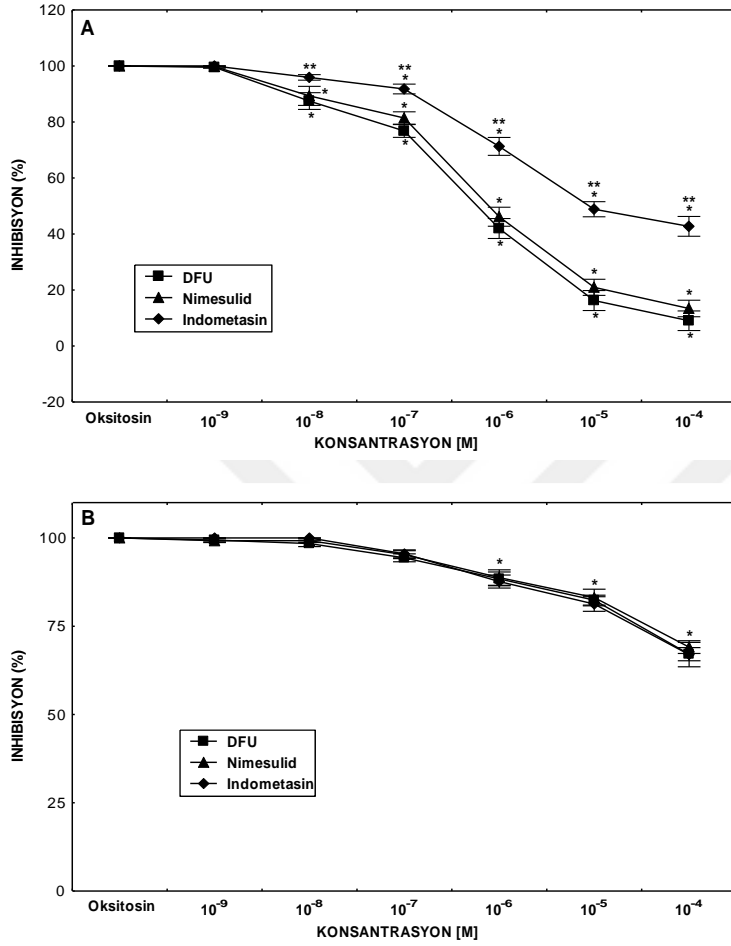
* İndometasin ile karşılaştırıldığında, DFU ve nimesulidin E_{max} değerlerinin anlamlı şekilde farklı olduğunu gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 1. Erken (A) ve miyad (B) doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve KCl (80 mM) ile kasılan myometriyal şeritler (her grupta n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin gevşeme yanıtları. Bulgular ortalama \pm standart hata ile sunulmuştur.

* KCl ile oluşturulan kasılmaya göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

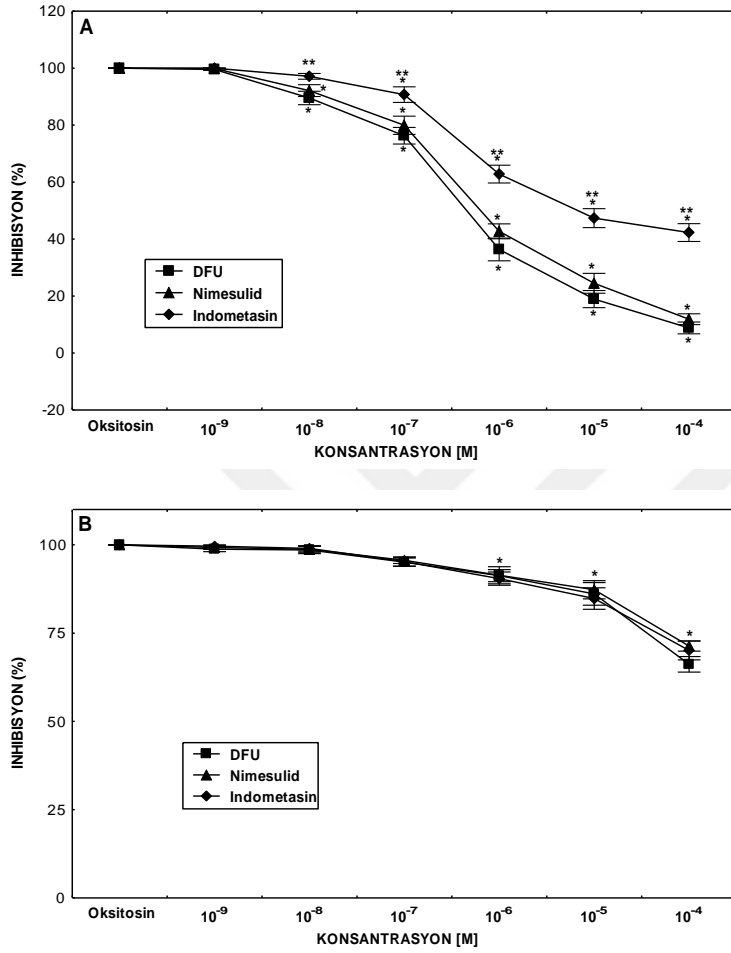
** DFU ve nimesulidin oluşturduğu gevşeme yanıtlarının indometasin gevşeme yanıtlarından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 2. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

* Oksitosin ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonlara göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

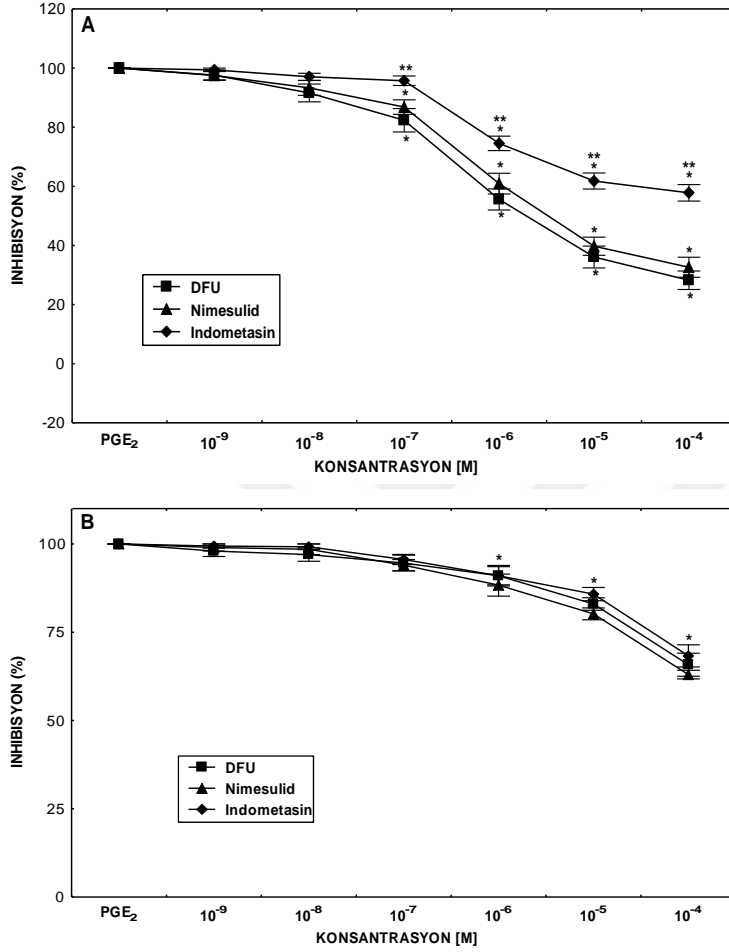
** DFU ve nimesulidin oluşturduğu gevşeme yanıtının indometasin gevşeme yanıtından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 3. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (10 mU/ml) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur.

* Oksitosin ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonlara göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).

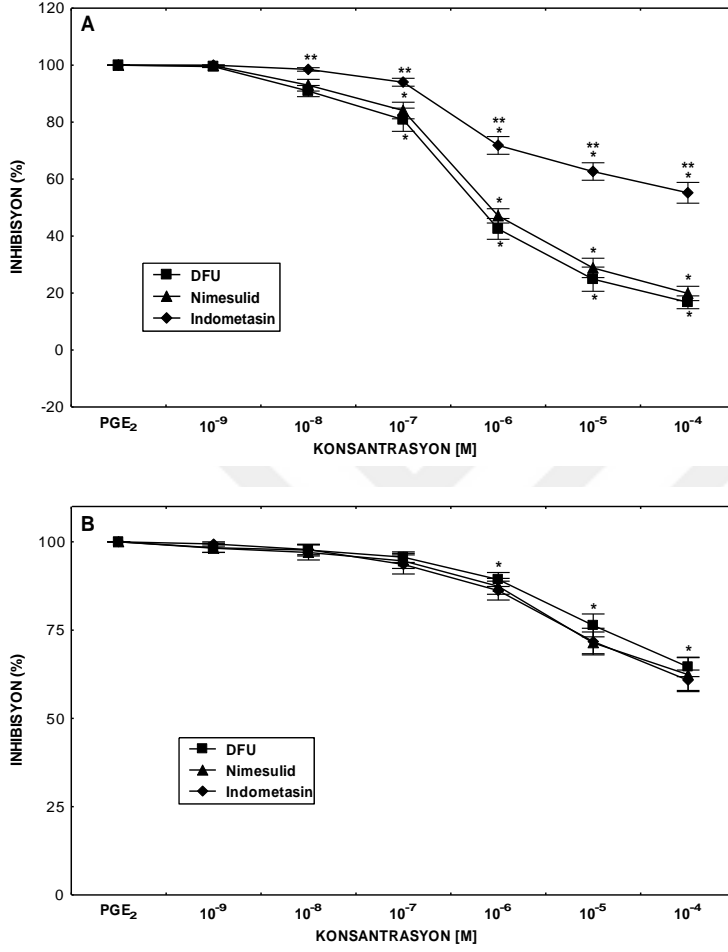
** DFU ve nimesulid'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarının indometasin gevşeme yanıtlarından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir (p<0.05).



Şekil 4. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve PGE₂ (10⁻⁷ M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur.

* PGE₂ ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonlara göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).

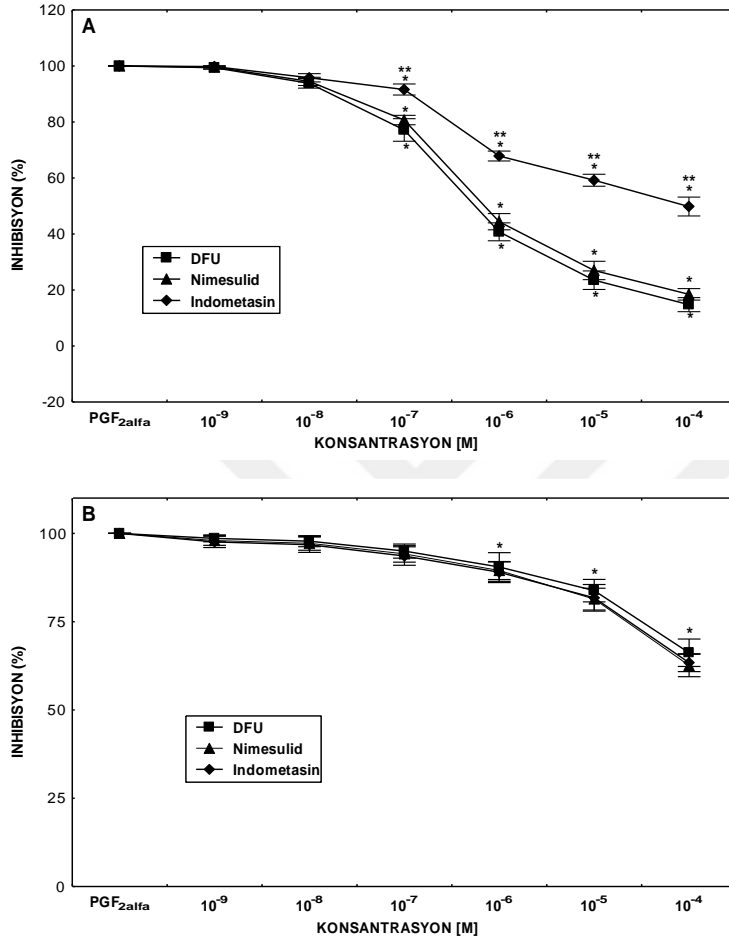
** DFU ve nimesulidin oluşturduğu gevşeme yanıtının indometasin gevşeme yanıtından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir (p<0.05).



Şekil 5. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve PGE₂ (10⁻⁷ M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur.

* PGE₂ ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonlara göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).

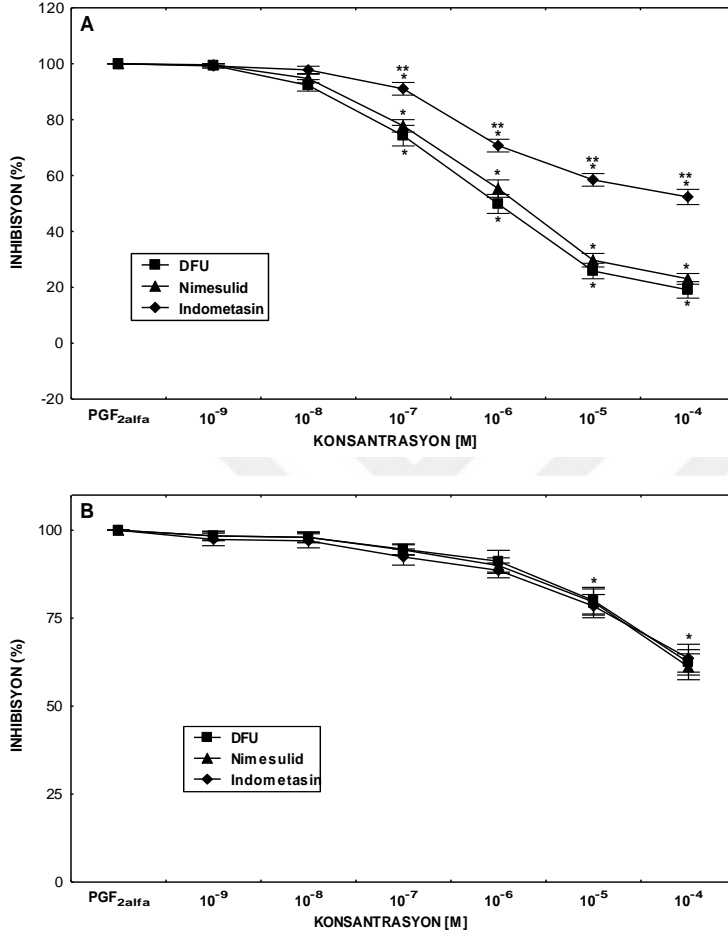
** DFU ve nimesulid'in oluşturduğu gevşeme yanıtlarının indometasin gevşeme yanıtlarından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir (p<0.05).



Şekil 6. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve PGF_{2α} (10⁻⁷ M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur.

* PGF_{2α} ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonlara göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).

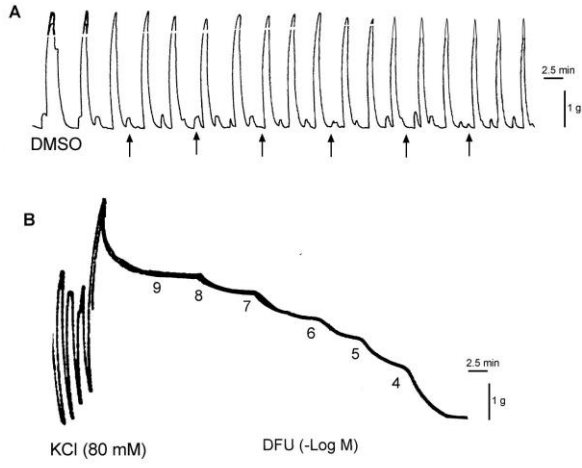
** DFU ve nimesulidin oluşturduğu gevşeme yanıtlarının indometasin gevşeme yanıtlarından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir (p<0.05).



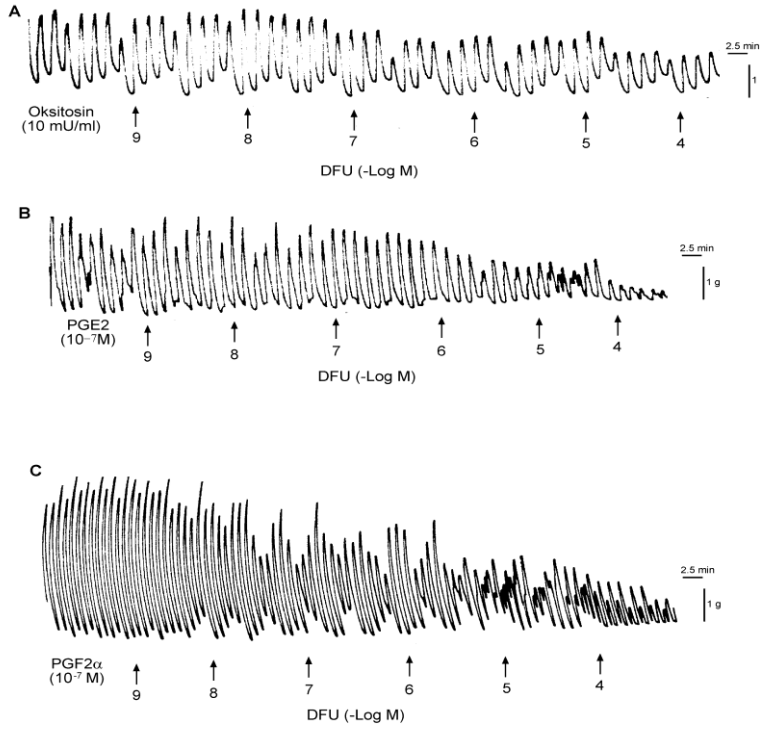
Şekil 7. Miyad doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve PGF_{2α} (10⁻⁷ M) ile indüklenen myometriyal şeritlerin amplitüd (A) ve frekansı (B) (n=15) üzerinde DFU, nimesulid ve indometasinin inhibitör etkileri. Bulgular ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur.

* PGF_{2α} ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonlara göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).

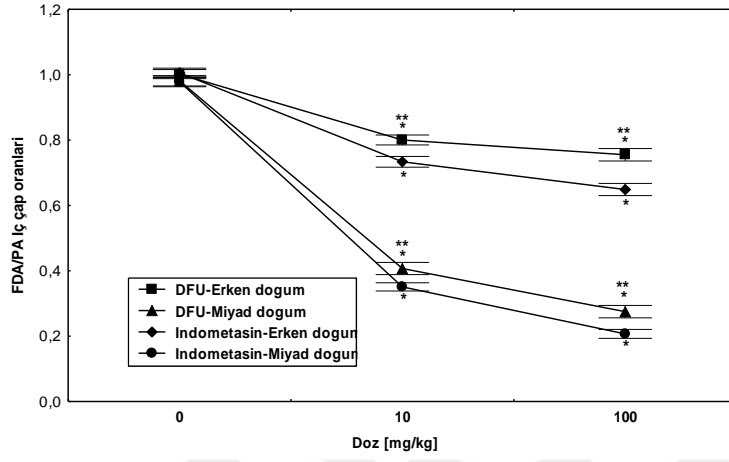
** DFU ve nimesulidün oluşturduğu gevşeme yanıtlarının indometasin gevşeme yanıtlarından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir (p<0.05).



Şekil 8. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerin spontan kontraksiyonlar üzerinde DMSO (A)'nın ve KCl (B) ile kasılan myometriyal şeritlerde DFU'nun konsantrasyona bağlı etkisi.



Şekil 9. Erken doğum dönemlerinde bulunan sıçanlardan izole edilen ve oksitosin (A), PGE₂ (B) ve PGF_{2α} (C) ile indüklenen myometriyal şeritlerde DFU'nun konsantrasyona bağlı inhibitör etkisi.

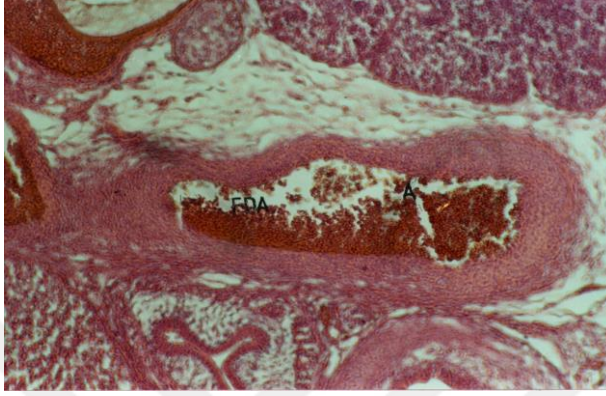


Şekil 10. Erken ve miyad dönemdeki sıçanların FDA/PA oranlarına göre, DFU ve indometasinin kasıcı etkileri.

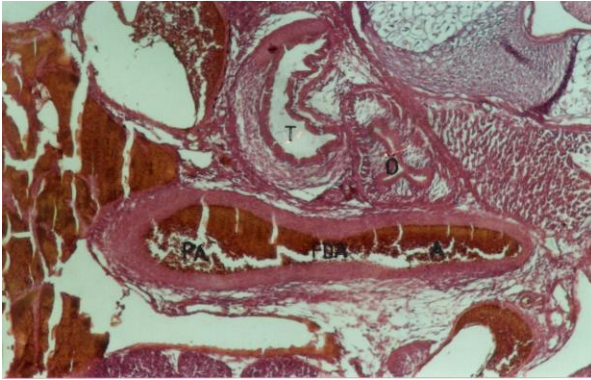
* Kontrol değerlere göre, DFU ve indometasinin FDA/PA oranının istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p < 0.05$).

** DFU'nun FDA/PA oranının, indometasin FDA/PA oranından istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir ($p < 0.05$).

A



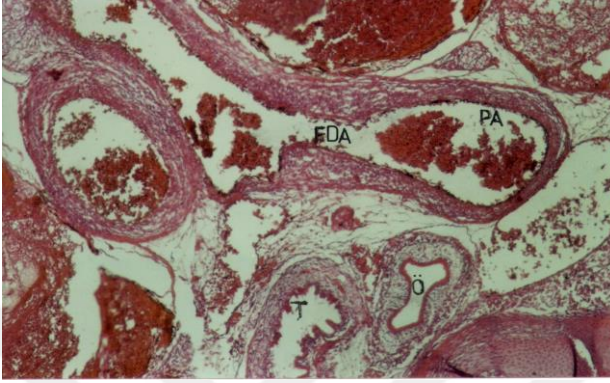
B



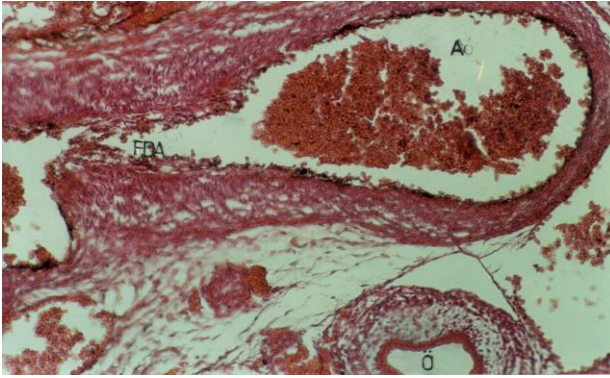
Şekil 11. Erken dönemdeki sıçanların fetuslarından alınan kalp kesitleri üzerinde, 10 mg/kg DFU (A) ve 10 mg/kg indometasinin (B), FDA ve PA üzerine etkileri.

FDA: Fetal Duktus Arteriyosus, PA: Pulmoner Arter, A: Aorta, T: Trakea, Ö: Ösefagus.

A



B



Şekil 12. Erken dönemdeki sıçanların fetuslarından alınan kalp kesitleri üzerinde, 100 mg/kg DFU (A) ve 100 mg/kg indometasinin (B), FDA ve PA üzerine etkileri.

FDA: Fetal Duktus Arteriyosus, PA: Pulmoner Arter, A: Aorta, T: Trakea, Ö: Ösefagus.

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, sıçanlarda lipopolisakkarid (LPS) ile oluşturulan erken doğum eyleminden sonra ve miyadında gebe sıçanlardan elde edilen myometriyal şeritlerde, KCl, oksitosin, PGE₂ ve PGF_{2α} ile stimüle edilmiş myometriyal kontraksiyonların amplitüd ve frekansı üzerinde, nonselektif COX inhibitörü indometasin ve selektif COX-2 inhibitörleri nimesulid ve DFU'nun konsantrasyona bağımlı inhibitör etkileri araştırıldı. Ayrıca, erken ve miyad doğumda DFU'nun FDA üzerindeki kasıcı etkisinin olup olmadığı indometasin ile karşılaştırmalı olarak araştırıldı. LPS ile indüklenmiş erken doğum eyleminde ve miyad doğum eyleminde bulunan sıçanlardan izole edilen myometriyal şeritlerde DFU ve nimesulidin, indometasine göre her iki grupta da kontraksiyon amplitüdünü daha fazla azalttığı bulunmuştur. DFU'nun indometasine oranla FDA üzerinde kasıcı etkisini hem erken hem de miyad dönemde daha az olduğu gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda selektif COX-2 inhibitörlerinden meloksikam, nimesulid, selekoksib ve rofekoksib'in in vitro tokolitik etkileri ve yan tesirleri araştırılmıştır (20, 21, 22), ancak bu gruptan yeni bir ilaç olan DFU'nun in vitro tokolitik etkisini ve FDA üzerine etkisini araştıran bir yayın rapor edilmemiştir.

Erken doğum eyleminde temel fizyopatolojik mekanizma fetusun dış ortama uyum sağlayabilecek matürasyona gelebilmesi için gerekli olan myometriyal latent fazın kısa sürmesidir. Uterusun latent fazdan myometriyal kasılmaların başladığı aktif doğum eylemine geçmesi bir takım moleküler ve enzimatik değişiklikler sonucu olmaktadır. Bunlar prostaglandinler, sitokinler, cAMP ve hormonlar ile ilgili değişimlerdir (27). Bu moleküler ve enzimatik değişimlerin inhibe edilerek myometriyal aktivitenin baskılanması düşüncesi, erken doğum eyleminde en önemli tedavi yaklaşımıdır (1, 2).

Erken doğum eyleminin tedavisi, sıklığı ve istenmeyen sonuçları doğum biliminin en önemli güncel sorunlarından biridir (1). Erken doğum eylemi tedavisinde kullanılan ilaçlar çeşitli mekanizmalarla myometriyum kasılmasını baskılayarak etki göstermektedir (1, 26).

Ancak halen kullanılmakta olan tokolitik ilaçların etki potansiyelleri, istenen düzeyde olmayıp bir çoğunun ciddi yan tesirleri bulunur. Tokoliz tedavisinde en sık kullanılan ilaç β_2 selektif agonisti ilaç ritodrin'dir. Ritodrinin özellikle kardiyovasküler sisteme ait yan tesirlerinin bulunması ve uzun süreli kullanımında etkisine taşıflaksi gelişmesi tokolitik tedavinin önünde ciddi bir problem olarak durmaktadır. Bu nedenle, myometriyuma diğer dokulardan daha spesifik olan, sistemik yan tesirleri daha az olan ve etkisine taşıflaksi gelişmeyen yeni tokolitik ilaçların geliştirilebilmesi obstetrik ve farmakoloji bilim dallarının ortak amaçlarından biridir (1, 2).

DFU, nimesulid ve indometasinin myometriyumu gevşetici etkileri, dokularda bulunan araşidonik asididen oluşan PG'ler ve diğer bazı eikozanoidlerin sentezini katalize eden, siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) enzimlerini inhibe etmelerine bağlıdır. PG'ler uterustaki kasıcı etkilerini PG reseptörleri ile ilişkili olan inositol trifosfat (IP₃) yolağını stimüle ederek göstermektedir. Selektif COX-2 inhibitörü olan rofekoksib tokolitik etkisini prostaglandin sentezini azaltarak yapmaktadır (40). Ayrıca, nimesulid'in hücre içine kalsiyum akımını azaltarak insan myometriyal kontraksiyonları üzerinde inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir. İntraselüler kalsiyumun azalması düz kaslarda gevşetici etki oluşturur. Kalsiyum kanal akışının inhibe edilmesinin myometriyal kontraktilitenin azaltılmasında, PG sentezinin inhibisyonuna göre daha az etkili bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (21). Kalsiyum kanallarının blokajı, COX inhibitörlerinin bir kaç etki mekanizmasından biri olabilir.

Erken doğumların % 20'sinde uterin enfeksiyon görülmektedir. İntraamniyotik enfeksiyon ve korioamniyotitis erken doğumla yakından ilişkilidir (10). Koriyoamniyotisin indüklediği erken doğum eyleminde yapılan tokolitik tedavilerin çok etkin olmadığı bildirilmiştir (60, 61). İnsan ve hayvan çalışmalarında gestasyonel dokular, bakteriyel stimulusla inflamatuvar yanıt olarak TNF α ve IL-1 üretirler. Bu proinflamatuvar stimulanlar, COX-2 ekspresyonu artırarak PG sentezini stimüle ederler (39, 57). PGF_{2 α} ve PGE₂ düzeylerinin artması erken doğumda önemli rol oynar. COX-2 enzimi inflamasyon ile indüklenir ve erken doğum eylemi süresince artar (8). Kemiricilerde, prostaglandinler luteolisisi indükler ve progesteron azalmasına neden olur, progesteron yokluğu da doğumda esansiyel rol oynar. Bununla birlikte progesteronun insanlarda doğum eyleminin başlatılması ve tetiklenmesindeki rolü tam olarak bilinmemektedir (62). Sıçanlarda, COX-1'den oluşan PG'ler luteolisisden sorumludur. COX-2'den oluşan PG'ler ise doğum eyleminin son basamağı ile birlikte (58). PG'ler önemli uterotonik ajanlardır. COX-1 enzim geni silinmiş ve bu nedenle doğum başlangıcında gecikme gösteren farelere, LPS verilmesinden sonra doğum eyleminin başladığı bildirilmiştir. İnflamasyon aracılı erken doğum eyleminde

başlatıcı mekanizmanın, COX-2 enzim sentezindeki artış açısından, miyad doğumu başlatıcı mekanizma ile benzer olduğu düşünülmektedir (63). İnsanlarda erken doğum eyleminin başlangıcında COX-2 mRNA'sının up-regülasyonunun, COX-1 mRNA'sından daha fazla olduğu bildirilmiştir (64). COX-2 up-regülasyonu özellikle myometriyum, plasenta ve fetal membranlarda gerçekleşir (8, 59). İnsanlarda ve sıçanlarda, erken ve miyad doğum eylemlerinin mekanizması farklı olmakla birlikte, bu bulgular, hem insanlarda hem de sıçanlarda inflamasyon nedeni ile ortaya çıkan erken doğum eyleminde COX-2'nin önemli bir rol oynadığını ve bu açıdan miyad doğum eylemiyle benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Selektif COX-2 inhibitörleri güçlü uterus gevşetici ajanlardır. COX-2 inhibitörlerinin ölçülen etki güçleri kalsiyum kanal blokerleri, nitrik oksit salıvericiler ve beta adrenerjik agonistler gibi bilinen diğer uterus gevşetici ajanlara benzemektedir (65). Yüksek derecede selektif COX-2 inhibitörlerinin erken doğum tedavisinde tercihen kullanılma olasılıkları artmıştır. Selektif COX-2 inhibitörleri nimesulid, selekoksib ve rofekoksib'in COX-2 enzimini inhibe etmesi COX-1 enzimine göre sırasıyla 100, 375, 800 kat daha fazladır (66, 18, 40). DFU bir NSAİİ'dir ve COX-2'yi COX-1'den en az 1000 kat daha selektif inhibe etmektedir (19).

Myometriyal düz kas kontraksiyonlarının oluşmasında intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonu artışının önemli rolü vardır. İntraselüler Ca^{2+} artması hem ekstraselüler Ca^{2+} 'un voltaja bağlı Ca^{2+} kanalları aracılığı ile intraselüler ortama geçişi, hem de intraselüler aralıktaki endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} 'un salıverilmesi sonucu oluşmaktadır. Spontan ve KCl ile indüklenmiş myometriyal kontraksiyonların oluşmasında voltaja bağımlı Ca^{2+} kanallarının sorumlu olduğu düşünülmektedir (38). Oksitosin ve PG'ler kendi reseptörleri aracılığı ile IP_3 yolağını stimüle ederek endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salıverilmesini artırır ve sonuçta myometriyal kontraksiyonları oluştururlar (67, 40).

Bu çalışmada erken ve miyad dönemdeki sıçanlardan izole edilen ve KCl ile kasılan myometriyal şeritler üzerinde, özellikle yüksek konsantrasyonlarda DFU ve nimesulid gevşeme yanıtları, indometasin gevşeme yanıtlarından anlamlı olarak daha yüksekti. Erken ve miyad doğum dönemleri karşılaştırıldığında, bu üç ilacın gevşeme yanıtları arasında fark bulunamadı. Her iki dönemde de DFU ve nimesulidin maksimum gevşetici etkisi indometasin'den anlamlı şekilde fazlaydı, fakat pD_2 değerleri arasındaki anlamlı bir fark yoktu. Bu bulgular selektif COX-2 inhibitörlerinin myometriyal gevşeme üzerindeki efikasitelerinin nonselektif COX inhibitörlerine göre daha yüksek olduğunu, fakat potensleri arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin

myometriyal şeritlerde oluşturduğu maksimum gevşeme yanıtlarının daha yüksek bulunması, büyük olasılıkla erken ve miyad doğumda ana rol oynayan PG'lerin, COX-2 ürünleri olmasına bağlı olabilir. DFU ve nimesulidin PG sentezini inhibe etmeleri dışında Ca^{2+} 'un intraselüler konsantrasyonunu azaltmaları da, KCl ile kasılan myometriyal şeritlerde selektif COX-2 inhibitörlerinin daha yüksek oranda gevşeme yapmasına katkıda bulunmuş olabilir. Ayrıca, DFU ve nimesulidin reseptör sonrası olayları indometasine göre daha fazla etkilemesi de bu gevşeme yanıtlarının farklı bulunmasında rol oynayabilir. Erken ve miyad doğum dönemleri karşılaştırıldığında KCl ile kasılan myometriyal şeritlerde her üç ilaç ile oluşan gevşeme yanıtları arasında anlamlı bir fark bulunamaması erken ve miyad doğumu tetikleyen ve bu ilaçların etkilediği mekanizmaların benzer olmasına bağlı olabilir.

Bu çalışmada erken ve miyad dönemdeki sıçanlardan izole edilen oksitosin, PGE_2 ve $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenen myometriyal şeritlerin kontraksiyon amplitüdü üzerinde, DFU ve nimesulidin inhibitör etkileri, indometasinin inhibitör etkisinden, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, anlamlı olarak daha yüksekti. Erken ve miyad doğum dönemleri karşılaştırıldığında, bu üç ilacın kontraksiyon amplitüdüleri arasında anlamlı bir fark yoktu. DFU ve nimesulidin maksimum inhibitör etkisi indometasin'den anlamlı şekilde yüksekti, fakat pD_2 değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu. Bu bulgular selektif COX-2 inhibitörlerinin efikasitelerinin nonselektif COX inhibitörlerine göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu, fakat potensleri arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin Ca^{2+} 'un intraselüler konsantrasyonunu azaltmaları da indometasine göre daha fazla inhibitör etki oluşturmalarına katkıda bulunmuş olabilir. Ayrıca, DFU ve nimesulidin kontraksiyon amplitüdü üzerinde maksimum inhibitör etkilerinin daha yüksek olması muhtemelen erken ve miyad doğumda ana rol oynayan PG'lerin COX-2 ürünleri olmasına da bağlı olabilir. DFU ve nimesulidin reseptör sonrası olayları indometasine göre daha fazla etkilemesi de bu inhibitör etkilerinin daha fazla oluşmasına katkıda bulunabilir. Erken ve miyad doğum dönemleri karşılaştırıldığında, oksitosin ve PG'ler ile kasılan myometriyal şeritlerde her üç ilacın kontraksiyon amplitüdü üzerindeki inhibitör etkilerinin farklı bulunamaması, bu ilaçların erken ve miyad doğumu tetikleyen benzer mekanizmaları (COX-2'nin up-regulasyonu gibi) etkilemelerinden kaynaklanıyor olabilir.

Her iki döneme ait sıçanlardan izole edilen, oksitosin, PGE_2 ve $PGF_{2\alpha}$ ile stimüle edilen myometriyal şeritlerin kontraksiyon frekansını DFU, nimesulid ve indometasin, yüksek konsantrasyondan başlayarak anlamlı şekilde inhibe etti. Frekans üzerindeki inhibitör etki, kontraksiyon amplitüdü üzerindeki inhibitör etkiden anlamlı şekilde daha azdı. Kontraksiyonların frekansı üzerinde DFU, nimesulid ve indometasin'in inhibitör etkileri

arasında her iki dönemde de anlamlı bir fark bulunamadı. Erken ve miyad doğumda bu üç ilacın kontraksiyon frekansı üzerindeki maksimum inhibitör etkileri ve pD_2 değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu. Bu bulgular her üç ilacın kontraksiyon frekansında oluşturdukları inhibitör etkilerinin, intraselüler Ca^{2+} 'u azaltmaları gibi, COX-2 inhibisyonu dışında bir mekanizmaya bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca kontraksiyon frekansında özellikle yüksek konsantrasyonlardaki azalma bu ilaçların nonspesifik etkilerine de bağlı olabilir. Selektif COX-2 inhibitörleri ile indometasinin kontraksiyon frekansı üzerindeki inhibitör etkilerinin farklı bulunmaması, frekansta COX-2 ürünlerinin ana role sahip olmadığını düşündürmektedir.

İndometasin nonselektif COX inhibitörüdür ve myometriyal kontraktiletiyi inhibe etmektedir (68). İndometasin, FDA'un erken kapanmasına, amniyotik sıvının azalması sonucu renal perfüzyon bozukluğuna, yenidoğanda intrakraniyal kanamaya ve nekrotizan enterokolit oluşumuna neden olduğundan erken doğum tedavisinde kısıtlı bir kullanıma sahiptir (15). FDA aorta ile pulmoner arteri birleştiren bir kanaldır. Fetal dönemde fetal dolaşımı sağlamak için FDA açıktır ve normal doğumdan sonra kapanır. Arteriyel pO_2 artması, gevşetici PG'ler ve nitrik oksit azalması ve endotelinin artması duktal kapanmaya neden olur (43). FDA'un hamilelikte açık kalmasında PGE_2 ve PGI_2 ana rol oynamaktadır. COX inhibitörleri hamilelikte PG sentezini inhibe ederek FDA'da kasılmaya neden olurlar. Gestasyon ilerledikçe FDA kapanmasında COX inhibisyonuna yanıt artmaktadır (45). Selektif COX-2 inhibitörü olan selekoksib'in miyad dönemdeki sıçanlarda FDA'da kasılma oranlarını önemli miktarda değiştirmedeği, fakat indometasin verilmesinden sonra FDA'da önemli ölçüde kasılma oluştuğu gösterilmiştir (18). Selektif COX-2 inhibitörlerinin, COX-1 inhibisyonundan dolayı ortaya çıkan fetal yan tesirleri daha az gösterdiği için, erken doğum tedavisinde terapötik amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir (7).

DFU ve indometasin verilen sıçanlar ile verilmeyen sıçanların fetuslarının kalp kesitleri karşılaştırıldığında FDA'da orta derecede kasılma yaptığı saptandı. Hem erken dönemde hem de miyad dönemde DFU'nun FDA'da yaptığı kasılma, indometasin'in yaptığı kasılmadan anlamlı olarak daha düşüktü. DFU ve indometasin verilmesinden sonra FDA'da oluşan kasılma erken dönemdeki sıçanlarda, miyad dönem sıçanlarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha azdı.

Selektif COX-2 inhibitörü DFU'nun nonselektif COX inhibitörü indometasine göre FDA'da daha az kasılma oluşturmaması, FDA'un açık kalmasında COX-2 ürünlerinin COX-1 ürünlerine göre daha az rol oynadığını düşündürmektedir. Erken dönemdeki sıçanlarda miyad dönemdeki sıçanlara göre FDA'nın daha az kasılması gestasyon yaşı ilerledikçe FDA'un COX inhibisyonuna verdiği yanıtın artmasına bağlı olabilir.

Bu çalışmada yeni geliştirilen selektif COX-2 inhibitörü olan DFU'nun erken ve miyad doğumda özellikle myometriyal kontraksiyonların amplitüdünü nonselektif COX inhibitörü olan indometasine göre anlamlı olarak daha fazla inhibe ettiği ve FDA'yı daha az kastediği gösterilmiştir. Erken doğum eyleminin önlenmesinde DFU'nun kullanımı yeni bir tedavi yaklaşımı olabilir, fakat FDA'un kasılması yönünden dikkatli olunmalıdır.

BÖLÜM VI

KAYNAKLAR

1. Black RS, Flint S, Lees C, et al. Preterm labour and delivery. *Eur J Pediatr* 1996; 155 (Suppl 2): S2-S7.
2. Keirse MJNC. New perspectives for the effective treatment of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 618-628.
3. Skinner KA, Challis JRG. Changes in the synthesis and metabolism of prostaglandins by human fetal membranes and decidua at labor. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 151: 519-523.
4. Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988; 31: 553-561.
5. Linggins GS. Maternal endocrine system during pregnancy and parturition. In Thorburn GD and Harding R (ed.), *Textbook of Fetal Physiology*. Oxford University Press, Oxford, 1994; pp. 445-455.
6. Teixeira FJ, Zakkar T, Hirst JJ et al. Prostaglandin endoperoxidase-H synthase (PGHS) activity and immunoreactive PGHS-1 and PGHS-2 levels in human amnion throughout gestation, at term, and during labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 396-1402.
7. Slater DM, Dennes WJ, Campa JS, Poston L, Bennett PR. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 880-884.
8. 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.
9. Gibb W. The role of prostaglandins in human parturition. *Ann Med* 1998; 30: 235-241.
10. Romero R, Manogue KR, Mitchell M, Phil D, King Y, Oyarzun E, Hobbins JC, Cerami A. Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 336-341
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Sawdy R, Slator D, Fisk N et al. Use of a cyclo-oxygenase type-2 selective non-steroidal anti-inflammatory agent to prevent preterm delivery. *Lancet* 1997; 350: 265-266.
17. Peruzzi L, Gianoglio B, Porcellini MG, Coppo R. Neonatal end-stage renal failure associated with maternal ingestion of cyclo-oxygenase-type-2 selective inhibitor nimesulide as tocolytics. *The Lancet* 1999;354: 1615.
18. Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Momma K, Yoneda S, Saito S. Evaluation of the tocolytic effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in a mouse model of lipopolysaccharide-induced preterm delivery. *Mol Hum Reprod* 2001;7: 595-602.
19. Riendeau D, Percival MD, Boyce S, et al. Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 1997;121: 105-117.
20. Yousif MH, Thulesius O. Tocolytic effect of the cyclooxygenase-2 inhibitor, meloxicam: Studies on uterine contractions in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 681-685.
21. 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.
22. Slattery MM., Friel AM, Healy DG, Morrison JJ. Uterine relaxant effects of cyclooxygenase-2 inhibitors in vitro. *Obstet. Gynecol.*, 2001;98: 563-569
23. Higby K, Xenakis EMJ, 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.

24. 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.
25. 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.
26. 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;14:1307-1330.
27. Balducci J, Risek B, Norton BG, Hand A. Gap junction formation in human myometrium: A key to preterm labor? *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1609-1615.
28. Lammers W JE, 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.
29. 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.
30. Buhimschi C, Boyle M, Saade GR, Garfield E. Uterine activity during pregnancy and labor assessed by simultaneous recordings from the myometrium and abdominal surface in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:811-822.
31. Snyder S W, Rigby SL, Richard HR. Evidence for decidual modulation of contractile function in the pregnant rat uterus. *Life Sci* 1994;55:349-411.
32. 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.
33. Izumi H, Bian K, Bukoski RD and Garfield RE. Agonists increase the sensitivity of contractile elements for Ca^{++} in pregnant in rat myometrium. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175:199-206.
34. Cheuk JMS, Hollingsworth M, Hughes SJ et al. Inhibition of contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:953-60.
35. Meera P, Anwer K, Monga M, et al. Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein kinase A. *Am J Physiol* 1995;269:312-317.
36. Word RA. Myosin phosphorylation and the control of myometrial contraction/relaxation. *Semin Perinatol* 1995;19:3-14.

37. Goodwin TM. A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:208-213.
38. 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.
39. Romero R, Avila C and Sepulveda W. The role of systemic and intrauterine infection in preterm labor. In Fuchs AR, Fuchs F and Stubblefield PG (ed), *Preterm Birth*. McGraw-Hill, New York. 1993;97-136.
40. Doret M, Mellier G, Benchaib M et al. In vitro study of tocolytic effect of refocoxib, a specific cyclo-oxygenase 2 inhibitor. Comparison and combination with other tocolytic agents. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2002;109:983-989.
41. Olley PM and Coceani F. Prostaglandins and the ductus arteriosus. *Annu Rev Med*. 1981;32:375.
42. Coceani F, Kelsey L, Seidlitz E. Evidence for an effector role of endothelin in closure of the ductus arteriosus at birth. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;70:1061-1064.
43. Heymann MA, Rudolph AM. Control of the ductus arteriosus. *Physiol Rev*. 1975;55:62-78.
44. Clyman RI, Goetzman BW, Chen YQ et al. Changes in endothelial cell and smooth muscle cell integrin expression during closure of the ductus arteriosus: an immunohistological comparison of the fetal preterm newborn, and full-term newborn rhesus monkey ductus. *Pediatr Res* 1996;40:198-208.
45. Vermillion ST, Scardo JA, Lashus AG and Wiles HB. The effect of indomethacin tocolysis on fetal ductus arteriosus constriction with advancing gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:256-261.
46. Momma K, Tokao A. Increased constriction of the ductus arteriosus with combined administration of the indomethacin and betamethasone in fetal rats. *Pediatr Res* 1989;25:69-75.
47. Roberts JM. Current understanding of pharmacologic mechanisms in the preventing of preterm birth. *Clin Obstet Gynecol*. 1984;27:592.
48. Elliot JP, Colonel L. Magnesium sulfate as a tocolytic agent. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:277.
49. Morrison JC. Preterm birth: A puzzle worth solving. *Obstet Gynecol* 1990;76:5.
50. Gordon MC, Iams JD. Magnesium sulfate. *Clin Obstet Gynecol* 1995;38:706-712.
51. Epstein FH. Mechanism of disease. *N Engl J Med* 1982;307:1618.

52. 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.
53. 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.
54. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 2, 9. Baskı, Ankara. 2000:1026-1033.
55. Gravett MG, Wikin SS, Haluska GJ et al. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1660-1667.
56. Hirsh E, Saotome I and Hirsh D. A model of intrauterine infection and preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1598-1603.
57. Dudley DJ. Cytokines in preterm and term parturition. In Hill JA (ed.), *Cytokines in Human Reproduction*. Wiley-Liss, New York 2000;171-202.
58. Tsuboi K, Sugimoto Y, Iwane A et al. Uterine expression of prostaglandin H2 synthase in late pregnancy and during parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice. *Endocrinology* 2000;141:315-324.
59. Mijovic JE, Zakar T, Nairn TK et al. Prostaglandin endoperoxide H synthase (PGHS) activity and PGHS-1 and PGHS-2 messenger ribonucleic acid abundance in human chorion throughout gestation and with preterm labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1358-1367.
60. Hillier SL, Martius J, Krohn M et al. A case-control study of chorioamniotic infection and histologic chorioamnionitis. *N Eng J Med* 1988;319:972-978.
61. Romero R, Salafia CM and Athanassiadis AP. The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1382-1388.
62. Young JE, Friedman CI and Danforth DR. Interleukine-1 β modulates prostaglandin and progesterone production by primate luteal cells in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:663-667.
63. Gross G, Imamura T, Vogt SK et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R1415-1423.
64. Goldenberg RL, Hauth JC and Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-1507.
65. Saade GR, Taskin O, Belfort MA, Erturan B, Moise KJ Jr. In vitro comparison of four tocolytic agents, alone and in combination. *Obstet Gynecol* 1994;84:374-378.

- 66.** Yamada M, Niki H, Yamashita M, Mue S, Ohuchi K. Prostaglandin E₂ production dependent upon cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 and its contradictory modulation by aurano-fin in rat peritoneal macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281: 1005-1012.
- 67.** Bossmar T, Akerlund M, Fantoni G, Szamayowicz J, Melin P, Maggi M. Receptors and myometriyal responses to oxytocin and vasopressin in preterm and term human pregnancy: effects of the oxytocin antagonist atosiban. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171: 1634-1642.
- 68.** Quass L, Goppinger A, Zahradnik HP. The effect of acetylsalicylic acid and indomethacin on the catecholamine- and oxytocin-induced contractility and prostaglandin (6-keto-PGF1 alpha, PGF2 alpha)-production of human pregnant myometriyal strips. *Prostaglandins* 1987;34:257-269.