



## Gamitromisin ve Tulatromisinin sığır trakea düz kası üzerine etkileri

Yaşar Şahin<sup>1\*</sup>, Ebru Yıldırım<sup>2</sup>, Begüm Yurdakök Dikmen<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup> Kırkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kırkkale, Türkiye

<sup>3</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 01.07.2020, Kabul tarihi / Accepted: 25.11.2020

**Özet:** Bu çalışmada; sığır solunum yolu hastalıklarında yaygın olarak kullanılan gamitromisin ve tulatromisinin, erkek Simental ırkı sığır trakea düz kası üzerine etkilerinin izole organ banyosunda araştırılması ve bu iki makrolid antibiyotiklerin karşılaştırılması amaçlandı. İlk protokolde gamitromisin ve tulatromisin  $10^{-7}$ -  $3 \times 10^{-5}$  M derişimlerinde tek başına, trakea düz kası üzerine etkisiz olduğu bulundu. İkinci protokolde; 20 dakika  $3 \times 10^{-5}$  M gamitromisin veya tulatromisin ile inkübe edilen trakea düz kası üzerine kümülatif (ACh) ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M) derişimleri uygulandı, elde edilen yarı en yüksek değer için gerek duyulan maddenin derişiminin negatif logaritması ( $pD_2$ ) ve ilaç tarafından oluşturulan maksimum etkinliğin % (yüzde) şeklinde ifadesi ( $E_{max}$ ) değerleri arasında fark bulunamadı. Üçüncü protokolde; 65 mM potasyum klorür (KCl) ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine uygulanan gamitromisin ve tulatromisin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinde bir fark bulunamadı. Asetilkolin  $EC_{85}$  ( $2,3 \times 10^{-4}$  M) değeriyle ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin araştırıldığı dördüncü protokolde; tulatromisinin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinde kasılma veya gevşeme yanıtı oluşmadı. Buna karşın gamitromisinin  $10^{-7}$  M (%5,45 ± 1,13) ve  $10^{-6}$  M (%8,51 ± 1,69) derişimlerinde, kontrole göre istatistiksel olarak gevşeme cevapları tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Dördüncü protokol sonucu yapılan son protokolde; gamitromisinin  $10^{-6}$  M derişiminin inkübasyonunda; ACh cevaplarının  $E_{max}$  değeri sayısal olarak azalmıştır. Sonuç olarak derişime bağlı şekilde gamitromisin; ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda az da olsa gevşeme etkisi göstermiş olup, bu etki özellikle astım ya da solunum yolunda ödeme seyreden hastalıklarda tedaviye katkı sağlayabilir.

**Anahtar kelimeler:** Gamitromisin, izole organ banyosu, sığır, trakea düz kas, tulatromisin

### Effects of Gamithromycin and Tulathromycin on bovine tracheal smooth muscle

**Abstract:** In this study; the effects of gamithromycin and tulathromycin, which are widely used in bovine respiratory diseases, on the bovine trachea smooth muscle derived from male Simental strain were evaluated in isolated organ bath and the effects of these two macrolide antibiotics were compared. In the first protocol gamithromycin and tulathromycin had no effect on the tracheal smooth muscle at  $10^{-7}$ -  $3 \times 10^{-5}$  M concentrations. In the second protocol, ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M) concentrations were applied cumulatively on the tracheal smooth muscle incubated with  $3 \times 10^{-5}$  M gamithromycin or tulathromycin for 20 minutes, no difference was found between the obtained  $pD_2$  and  $E_{max}$  values. In the third protocol; concentrations of gamithromycin and tulathromycin concentrations ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) had no effect on the tracheal smooth muscle precontracted with 65 mM KCl. In the fourth protocol the effects of gamithromycin and tulathromycin on the tracheal smooth muscle pre-contracted with  $EC_{85}$  value of ACh ( $2,3 \times 10^{-4}$  M) were investigated. No contraction or relaxation response occurred in the concentrations of tulathromycin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M). In contrast,  $10^{-7}$  M (5.45% 1,13%) and  $10^{-6}$  M (8,51 ± 1.69%) concentrations of gamithromycin showed statistically significant relaxation ( $p < 0.05$ ). The last protocol was made according to the results of fourth protocol; and incubation of  $10^{-6}$  M gamithromycin decreased the  $E_{max}$  value of Ach concentrations numerically. As a result, depending on the concentration, gamithromycin showed a slight relaxation effect on tissues precontracted with ACh, and this effect may contribute to the treatment of diseases especially in asthma or respiratory edema.

**Keywords:** Bovine, gamithromycin, isolated organ bath, trachea smooth muscle, tulathromycin

### Giriş

Makrolid grubu antibiyotikler; solunum yolu, ürogenital, cilt, yumuşak doku enfeksiyonları ve penisiline alerjisi olan hastaların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır (Carbon 1998, Kannan ve Mankin 2011, Zuckerman ve ark. 2011). Bu antibiyotikler; güçlü antibakteriyel etki gösterebilirler de, genellikle zayıf biyoyararlanım ve öngörülemez bazı farmakokinetik özelliklerinden dolayı yeni nesil türev-

lerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (Dinos 2017). Bu nedenle sığır solunum yolu hastalıkları tedavisi için, yeni nesil yarı-sentetik tulatromisin ve gamitromisin geliştirilmiştir (Sgoifo ve ark. 2010, Lechtenberg ve ark. 2011, Maletić ve ark. 2015). Gamitromisin ve tulatromisin (%10'u 13 üye halkalı ve %90'ı 15 üye halkalı regioizomer karışımı) 15 üyeden oluşan lakton halkalılar grubunda yer almakta olup, yapılarında azot atomu bulunduğundan aza-

lidler olarak da adlandırılmaktadır (Giguère 2013). Her iki antibiyotik; hızlı emilim (Wang ve ark. 2011, Kellermann ve ark. 2014), geniş dağılım ve yüksek biyoyararlanım gibi farmakokinetik parametrelere sahiptirler (Evans 2005, Huang ve ark. 2009). Sahip oldukları bu farmakokinetik özelliklere bağlı olarak, sığır solunum yolu hastalıklarının tedavisi ve korunmasında iyi antibakteriyel ilaçlar oldukları bilinmektedir (Evans 2005, Huang ve ark. 2009). Ancak makrolid antibiyotikler antimikrobiyal etkilerinin yanında, anti-inflamatuvar etki gibi ikincil özellikleri de bulunmaktadır (Steel ve ark. 2012). Ayrıca bu sınıfta yer alan azitromisin gibi antibiyotiklerin; antibakteriyel ve anti-inflamatuvar etkilerinin yanında bronkodilatör etkilerinin bulunduğu da bildirilmiştir (Daenas ve ark. 2006). Memelilerin solunum yolu düz kası; hem kasılma hem de gevşetici innervasyon özelliğine sahip olup, *in vivo* veya *in vitro* olarak belirgin şekilde daralma veya genişleme özelliklerine sahiptir (Canning ve Fischer 2001). Solunum yolu düz kas tonusu; hormon, nörotransmitter, ilaç ve mediatör gibi birçok maddeden etkilenmektedir (Barnes 1989). Bu nedenle yapılan çalışmada; sığır solunum yolu hastalıklarında yaygın olarak kullanılan gamitromisin ve tulatromisinin sığır trakea düz kası üzerine farmakodinamik etkilerinin araştırılması ve bu iki makrolid antibiyotiğin etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada hayvan materyali olarak mezbahada kesilen 12-36 aylık, 32 erkek Simental ırkı sığırlardan elde edilen 84 trakeanın üst 1/3'lük kısımları kullanılmıştır. Kesimden hemen sonra trakea örnekleri, önceden hazırlanmış olan modifiye Krebs çözeltisi içeren behere konulup, soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Modifiye Krebs çözeltisi (mM): NaCl (Merck, Almanya): 136,8, KCl (Merck, Almanya): 5,4, CaCl<sub>2</sub> (Merck, Almanya): 1,5, MgCl<sub>2</sub> (Merck, Almanya): 1,0, NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Almanya): 11,9, glukoz (Merck, Almanya): 5,5 (pH 7,2). Trakea düz kası, steril penset ve makas yardımıyla kıkırdak, bağ ve epitel dokularından temizlenerek, yaklaşık 2 mm genişliği ve 7 mm uzunluğunda olacak şekilde izole edildi. İzole edilen trakea düz kas kesiti 10 mL modifiye Krebs çözeltisi (37°C) içeren izole organ banyosuna 3 g'lık ön gerim uygulanarak asıldı. Deney sırasında dokulara; %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> gaz karışımı uygulandı (Kaneda ve ark. 2005). Çalışmada kullanılan gamitromisin (Sigma-Aldrich 32161, Almanya) ve tulatromisin (Sigma-Aldrich SLM2107, Almanya), dimetil sülfoksit (DMSO, İsolab, Almanya) de çözdürüldü.

## Deney Protokolleri

İzole edilen trakea düz kası; 3 g'lık ön gerim uygulanmasından sonra, kırk beş dakikalık dengelenme süresi boyunca 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile yıkandı. Dengelenme süresi sonrasında asetilkolin (ACh, Sigma A 6625, Almanya) ile canlılık bakıldı ve tekrar 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile yıkandı. Ardından aşağıdaki beş protokol uygulandı.

Sığır trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin tek başına araştırılması amacıyla yapılan birinci protokolde; dokulara kümülatif olarak gamitromisin ve tulatromisin (10<sup>-7</sup>, 3×10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 3×10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 3×10<sup>-5</sup> M) derişimleri uygulandı. Aynı dokular, kırk beş dakikalık dengelenme süresi boyunca 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile tekrar yıkandıktan sonra DMSO (seyreltmeleri) kontrol amacıyla uygulandı.

Trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin ACh ile birlikte araştırılması amacı için yapılan ikinci protokolde; önce dokulara kümülatif olarak ACh (10<sup>-8</sup>-10<sup>-3</sup> M) denenip, dokular yıkandı. Dokular, 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile yıkandıktan sonra, 20 dakika 3×10<sup>-5</sup> M gamitromisin veya tulatromisin ile inkübe edildi ve kümülatif ACh (10<sup>-8</sup>-10<sup>-3</sup> M) derişimleri uygulandı. Aynı dokular yıkanıp, 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi ile tekrar yıkanıp, dengelendikten sonra, 20 dakika DMSO (seyreltmeleri) ile inkübe edilip kümülatif ACh derişimleri uygulandı.

Potasyum klorür (KCl) ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin araştırılması için yapılan üçüncü protokolde; dokular 65 mM KCl (Kaneda ve ark. 2018) ile platoya gelinceye kadar (yaklaşık 30 dakika) ön kasılma oluşturuldu. Üzerine kümülatif olarak gamitromisin (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M), DMSO (seyreltmeleri) ve tulatromisin (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M) derişimleri uygulandı. Her farklı madde için ayrı bir trakea düz kası kullanıldı.

Asetilkolin EC<sub>85</sub> değeri ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin araştırılması amacı için yapılan dördüncü protokolde; dokulara 2,3×10<sup>-4</sup> M ACh (GraphPad Prism Software ver. 6 programı ile daha önceden elde edilen ACh derişim yanıt eğrilerinden, ACh'ın EC<sub>85</sub> değeri elde edildi, n:12) derişimi uygulanarak ön kasılma oluşturuldu. Asetilkolin uygulaması sonrası platoya gelen dokular üzerine kümülatif olarak gamitromisin (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M) ve tulatromisin (10<sup>-10</sup>-10<sup>-5</sup> M) derişimleri uygulandı. Aynı dokular yıkanıp, 15 dakika ara ile 3 kez modifiye Krebs çözeltisi

ile tekrar yıkanıp dengelendikten sonra, DMSO (seyreltmeleri) uygulandı.

Dördüncü protokol sonucu; gamitromisinin  $10^{-7}$  ve  $10^{-6}$  M derişimlerinde, trakea düz kası az da olsa gevşeme yanıtları istatistiksel olarak anlamlı bulununca beşinci protokol yapılması kararlaştırıldı. Trakea düz kası üzerine  $10^{-6}$  M gamitromisin etkisinin ACh ile birlikte araştırılması amacıyla yapılan son protokole; dokulara kümülatif ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M) derişimleri denenip, dokular yıkandı. Dokular; 3 kez 15 dakika ara tekrar yıkanıp dengelendikten sonra, 20 dakika  $10^{-6}$  M gamitromisin ile inkübe edildi ve kümülatif olarak ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M) derişimleri uygulandı. Daha sonra aynı dokular, 15 dakika ara ile 3 kez yıkandı ve dengelenme sonrası üzerinde 20 dakika DMSO seyreltmeleri ile inkübe edilip ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M) derişimleri uygulandı.

### İstatistiksel Değerlendirme

Dokularda oluşan; kasılma ve gevşemeler veya gerimde meydana gelen değişiklikler izometrik gerim iletimcisi (Biopac Systems Mp 35, Commat, Türkiye) ile ölçüldü ve her bir protokol kendi içinde ayrı ayrı değerlendirildi. Birinci protokole göre elde edilen verileri, bazal çizgi 100 kabul edilerek % (yüzde) kasılmalarına göre hesaplandı ve değerlendirildi. İkinci ve beşinci protokolde tüm derişimlerin bazal çizgiye göre % (yüzde) kasılmaları hesaplandı ve elde edilen bu verilerden ACh kasılmalarının  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri GraphPad Prism (Software ver. 6) Programı ile belirlendi. Daha sonra  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerlerinin karşılaştırılması yapıldı. Bulunan  $pD_2$  değeri yarı en yüksek değer için gerek duyulan maddenin derişiminin negatif logaritması;  $E_{max}$  ise, ilaç tarafından oluşturulan maksimum etkinliğin % (yüzde) şeklinde ifadesi olarak tanımlandı. Üçüncü deneyde ise KCl ile ön kasılma oluşturulan dokuların ulaştığı maksimum kasılma % 100 olarak kabul edildi. Ardından oluşan gevşeme yanıtları bu değer 100 kabul edilerek hesaplandı. Dördüncü protokolde; ilk olarak ACh'ın  $EC_{85}$  derişimi belirlendi. Bu derişim ile dokularda ön kasılma oluşturuldu. Dokularda kasılma sonucu elde edilen maksimum kasılma % 100 olarak kabul edildi. Madde uygulaması sonrası dokularda meydana gelen gevşeme yanıtları bu değer 100 kabul edilerek hesaplandı.

Sunulan çalışmada elde edilen veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verildi. İstatistik analizler SPSS 15.0 paket programında yapıldı. Yapılan testlerde  $P < 0,05$  değeri önemli olarak kabul edildi. Grupların parametrik dağılıp dağılmadığına normalite testi ile bakıldı. İzole organ banyosu için yapılan analizlerde ikinci protokolde; gamitro-

misin uygulanan dokularda  $pD_2$  parametrik, tulatromisinde ise nonparametrik olarak dağılmış,  $E_{max}$  ise gamitromisin uygulanan grupta nonparametrik,  $pD_2$  ise parametrik olarak dağılmıştır. Parametrik dağılan gruplarda tekrarlı ANOVA, nonparametrik dağılanlara ise Friedman testi uygulanmıştır. Üçüncü grupta OneWay ANOVA, gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Duncan testi (post hoc) uygulanmıştır. Nonparametrik testler ise Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Dördüncü grupta; eşli karşılaştırmalar yapıldı. Tulatromisin derişimlerinden  $10^{-6}$  M normal dağılım olmadığından Wilcoxon non- parametrik testi yapıldı. Normal dağılım gösteren tulatromisin derişimleri ( $10^{-6}$  M hariç) ve gamitromisin derişimlerine eşli gruplar T testi uygulandı. Normal dağılım gösteren derişimlerde ( $10^{-6}$  M hariç) T testi, normal dağılım göstermeyen  $10^{-6}$  M derişime ise Mann Whitney U testi uygulandı. Yapılan testlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Son protokolde ise;  $E_{max}$  ve  $pD_2$  değerleri normal dağılım göstermediği için Friedman testi yapıldı ve  $E_{max}$  değerinde fark bulundu ve hangi gruplar arasında fark olduğunu tespit etmek için Wilcoxon testi yapıldı. Bonferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra  $p < 0,016$  olarak kabul edildi.

### Bulgular

Gamitromisin ve tulatromisin ( $10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  M) derişimlerinin, siğır trakea düz kası üzerine kasılma veya gevşeme yanıtları göstermedi. Gamitromisin ( $3 \times 10^{-5}$  M), tulatromisin ( $3 \times 10^{-5}$  M) ve DMSO'nun derişimlerinin 20 dakikalık inkübasyonu sonrası, kümülatif ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M) derişim yanıt eğrileri elde edildi. Elde edilen  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri hesaplandı ve bulgular Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterildi. Asetilkolin derişimleri  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunamadı ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 1.** Asetilkolin, Gamitromisin+ACh, DMSO+ACh  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri

Uygulama	$pD_2$	$E_{max}$
ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	4,81 $\pm$ 0,13	1473,06 $\pm$ 607,41
$3 \times 10^{-5}$ M Gamitromisin+ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	4,72 $\pm$ 0,21	1845,82 $\pm$ 616,63
DMSO+ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	4,81 $\pm$ 0,15	1672,40 $\pm$ 636,99

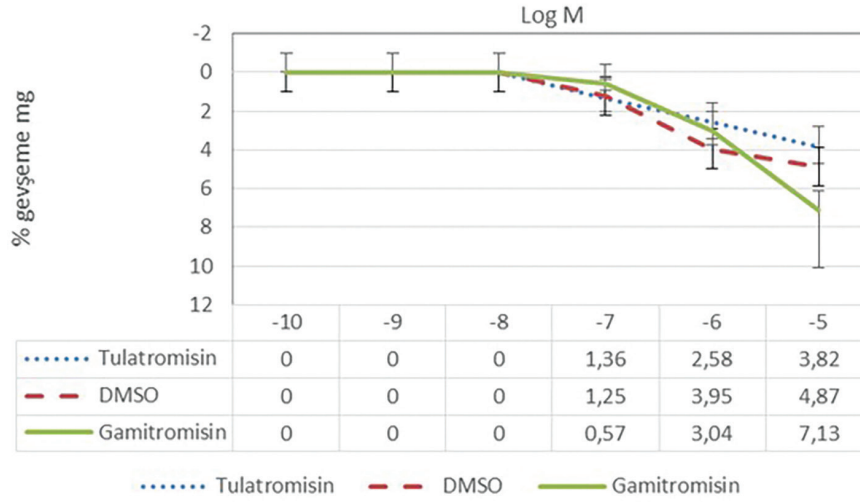
Aynı sütündeki gruplar arasında fark yoktur ( $P > 0,05$ )

Potasyum klorür (65 mM) ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisinin etkilerinin sonuçları Şekil 1'de gösterildi. Yapılan analiz sonucunda, grup derişimleri karşılaştırılmış ve gruplar arasında fark bulunamadı ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 2.** Asetilkolin, Tulatromisin+ACh, DMSO+ACh  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri

Uygulama	$pD_2$	$E_{max}$
ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	$5,11 \pm 0,09$	$1187,94 \pm 318,17$
$3 \times 10^{-5}$ M Tulatromisin+ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	$5,37 \pm 0,11$	$665,24 \pm 145,97$
DMSO+ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	$5,31 \pm 0,11$	$695,34 \pm 101,89$

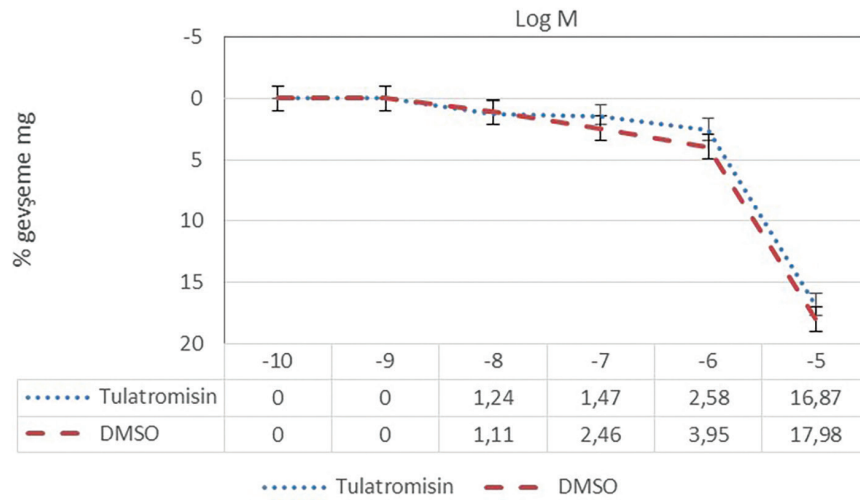
Aynı sütundaki gruplar arasında fark yoktur ( $P > 0,05$ )



**Şekil 1.** Potasyum klorür ile ön kasılma oluşturulan dokularda tulatromisin, DMSO ve gamitromisin uygulaması sonucu oluşan % gevşeme cevapları (n:8)

Asetilkolin  $EC_{85}$  değeri ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kası üzerine gamitromisin ve tulatromisin derişimlerinin etkileri sonuçları Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterildi. Yapılan analiz sonucunda, tulatromisin'in ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) derişimleri arasında istatistik olarak

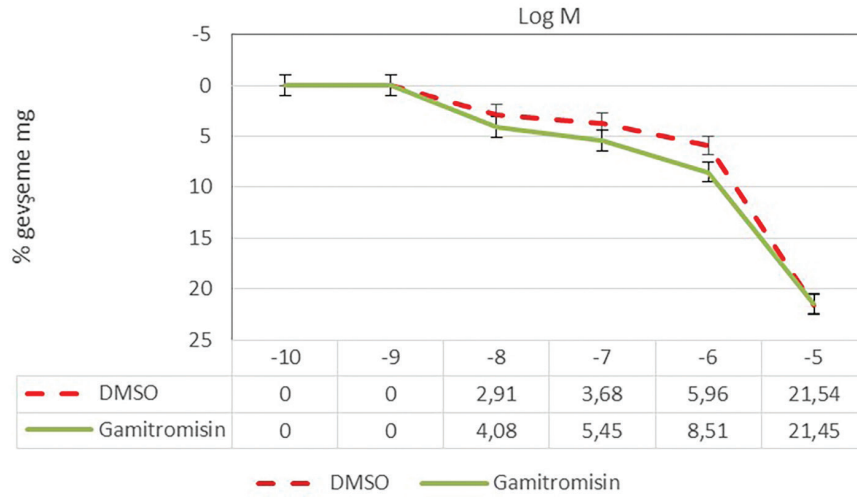
bir fark bulunamadı ( $P > 0,05$ ). Buna karşın gevşeme yanıtları çok yüksek olmasa da  $10^{-7}$  M ( $\%5,45 \pm 1,13$ ) ve  $10^{-6}$  M'da ( $\%8,51 \pm 1,69$ ) gamitromisin'in gevşeme cevapları kontrole göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edildi ( $P < 0,05$ ).



**Şekil 2.**  $2,3 \times 10^{-4}$  ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, tulatromisin ve DMSO seyreltmeleri yanıt eğrisi

Dördüncü protokolün sonucunda gamitromisin  $10^{-7}$  ve  $10^{-6}$  M derişimlerinde görülen gevşeme yanıtları istatistiksel olarak anlamlı bulunması sonucu, trakea düz kası üzerine  $10^{-6}$  M gamitromisin etkisinin ACh ile birlikte araştırıldı. Bu protokilde elde edilen  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri hesaplandı ve sonuçlar Tablo 3'te gösterildi. Yapılan çalışmada,  $pD_2$  değerleri ara-

sında bir fark tespit edilmedi ( $P > 0,05$ ). Buna karşın  $E_{max}$  değerleri arasında ise farklılık çıkmıştır ( $P < 0,05$ ). Bu farkın; gamitromisin inkübasyonu ile DMSO inkübasyonu arasında ( $P = 0,028$ ) olduğu görülmüş, ancak istatistiksel olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra bu farklılığın istatistiksel değil sayısal olduğu saptandı ( $P > 0,016$ ).



**Şekil 3.**  $2,3 \times 10^{-4}$  ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda, gamitromisin ve DMSO seyreltmeleri yanıt eğrisi

**Tablo 3.** Asetilkolin,  $10^{-6}$  M Gamitromisin+ACh, DMSO+ACh  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerleri

Uygulama	$pD_2$	$E_{max}$
ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	$5,04 \pm 0,18$	$1408,67 \pm 820,57$
$10^{-6}$ M Gamitromisin+ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	$5,05 \pm 0,14$	$828,82 \pm 702,67$
DMSO+ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$ M)	$5,01 \pm 0,32$	$2275,58 \pm 2165,70$

\* Aynı sütundaki  $E_{max}$  değerleri arasındaki fark vardır ( $P < 0,05$ ). Fakat  $E_{max}$  grupları arasındaki fark Bonfferroni düzeltmesi yapıldıktan sonra istatistiksel olarak önemli değildir ( $P > 0,016$ ).

## Tartışma ve Sonuç

Veteriner sahada antibiyotik sağaltımının etkili bir şekilde yapılabilmesi için antibiyotik moleküllerinin temel kimyasal yapılarının, etki şekillerinin iyi anlaşılması, antimikrobiyel etkinliğinin iyi değerlendirilmesi, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin doğru bir şekilde saptanması önem arz etmektedir (Bambeke ve Tulkens 2001).

Solunum yolu düz kası, solunum yolu hacmini kontrol eden unsurların en başında yer almaktadır. Solunum yolu düz kası üzerinde yapılacak olan çalışmalar; astım gibi solunum yolu hastalıklar sonucu ortaya çıkan fizyopatolojik durumların çözümüne fırsat sağlayabileceği düşünülmektedir (An ve ark. 2007). Solunum yolu hastalıkları tedavisinde en çok tercih edilen makrolidlerin; sadece anti-bakteriyel etkinliğinin değil aynı zamanda solunum yolu düz kasları üzerine etkileri de değerlendirilmelidir (Anadón ve Reeve-Johnson 1999, Panettieri ve ark. 2008, Kannan ve Mankin 2011, Pyörälä ve ark. 2014).

Köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada; makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin ve oleandomisin gibi 14 üyeli makrolidlerin köpeklerin mide bağırsağında kasılma doğurucu ve endojen motilin

salgılayıcı bir etkisi olduğunu ancak 16 üyeli lekominin, asetilspiramisin ve tilosinin böyle bir etkiye sahip olmadığı saptanmış; etkide oluşan bu farklılığın makrolidlerin kimyasal yapılarındaki farklılığa bağlanmışlardır (Itoh ve ark. 1985). Trak ve ark. (2019) gamitromisinin sıçan uterus düz kası kasılmaları üzerine etkisini araştırmış ve gamitromisinin sıçan uterus kasılmaları üzerine tek başına bir etkisi olmadığını saptamıştır. Çalışılan dokular farklı olmakla birlikte bu çalışma; Itoh ve ark. (1985) ve Trak ve ark. (2019) çalışmasıyla uyumlu olup, gamitromisin ve tulatromisinin tek başına siğir trakea düz kası üzerine etki oluşturmamıştır. Bu durumun; ilaçların kimyasal yapıları veya deneylerde kullanılan tür ve doku farklılığından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Potasyum klorür;  $Ca^{+2}$  dalgali salınımını indükleyip, hücre içi kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) miktarının artışıyla birlikte solunum yolu düz kası hücrelerinin kasılmasına neden olmaktadır (Sanderson ve ark. 2008, Wang ve ark. 2010). Siğir trakea düz kasına 65 mM KCl uygulandığında kasın, kasılma şiddetinin yavaş yavaş arttığı (maksimum kasılmaya ulaşma süresi yaklaşık 15 dakika) ve maksimum kasılma seviyesinde belli süre (yaklaşık 120 dakika) devam ettiği bildirilmiştir (Kaneda ve ark. 2006). Sunulan çalışmada Kaneda ve ark. (2006) farklı olarak 65 mM KCl uygulanmasından yaklaşık 30 dakika sonra platoya eriştiği bulunmuştur. Daenas ve ark. (2006) bir makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin, KCl (80 mM) ve karbakol ( $10^{-5}$  M) ile prekontrakte edilen tavşan trakeası üzerine etkisini incelemişlerdir. Karbakol ( $10^{-5}$  M) ile ön kasılma oluşturulan tavşan trakeası  $10^{-6}$  ve  $10^{-4}$  M azitromisin gevşeme yanıtı oluşturduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, azitromisinin  $10^{-4}$  M derişimi, KCl (80 mM) ile prekontrakte edilen tavşan trakeasını gevşettiğini bulmuşlardır. Tulatromisinin 1, 2,

4, 8 ve 16 mM derişimlerinin sıçan uterus kasılmaları üzerine etkisini araştıran Mehrdad ve ark. (2011); KCl (80 mM) ile prekontrakte edilen sıçan uterus düz kasının derişime bağlı olarak gevşediğini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, 65 mM KCl ile ön kasılma oluşturulmuş simental ırkı sığır trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) ve tulatromisin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin bir etkisi bulunmamıştır. Sunulan çalışmanın bahsi geçen çalışmalardan farklı olmasının nedeni etken maddelerinin; kimyasal yapılarının ve derişimlerinin, uygulandığı hayvan türlerinin ve dokularının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Asetilkolin; parasempatik sinir sisteminin önemli bir nöromediyotörüdür ve çeşitli düz kasları (ileum, sidik kesesi, solunum yolu ve damar gibi düz kasları) depolarize etmektedir. Asetilkolin, muskarinik reseptörleri aktive ederek kasılma olayını başlatmaktadır (Zholos ve ark. 2004). Asetilkolin derişimine bağlı olarak; sığır, domuz, kobay, sıçan ve fare trakea düz kasının kasılmasına neden olmaktadır (Kaneda ve ark. 2018). Trakea düz kası ACh ile uyarıldığında, trakea düz kas hücrelerinde eş zamanlı olmayan (tekrarlayan)  $Ca^{+2}$  dalgaları oluşmakta olup, (Dai ve ark. 2005) sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun geçici bir artışıyla kasılma meydana gelmektedir (Jones ve ark. 1993). Tamaoki ve ark. (1995) makrolid grubu antibiyotikleri olan eritromisin, roksitromisin ve klaritromisinin bronşlar üzerine etkisini araştırmışlardır. Eritromisin, roksitromisin ve klaritromisinin ( $3 \times 10^{-5}$  M) inkübasyonu sonrası ACh derişimlerinin oluşturduğu kasılmaları değiştirmediğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışma bahsi geçen çalışma ile uyumlu olup, gamitromisin ve tulatromisinin ( $3 \times 10^{-5}$  M) inkübasyonu sonrası kümülatif ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-3}$  M) derişimlerinin oluşturduğu kasılmaların  $pD_2$  ve  $E_{max}$  değerlerini değiştirmediği bulunmuştur. Çalışılan doku ve etken maddeler farklı olmakla birlikte, bu çalışmanın sonucu ile uyumludur (Tamaoki ve ark. 1995).

Wang ve ark. (2019) azitromisinin; insan, fare, kobay ve tavşanın solunum yolu düz kası üzerine etkisini incelemişlerdir. Azitromisin, ACh ( $10^{-4}$  M) derişimi uygulanması ile ön kasılma oluşturulmuş solunum yolu düz kası gevşeme yanıtı oluşturduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada solunum yolu düz kası üzerinde makrolid grubu antibiyotik olan roksitromisin ve klaritromisinin gevşeme yanıtının azitromisine göre daha az olduğu diğer antibiyotiklerin (aminoglikozitler, penisilin ve streptomisin) ise gevşeme yanıtı oluşturmadığını eklemişlerdir. Ayrıca azitromisin; L tipi voltaja bağlı kalsiyum kanalı ve  $M_2$  reseptörünü inhibe edip sitolitik  $Ca^{+2}$  derişimini azaltarak solunum yolu düz kasında gevşeme oluş-

turduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada  $2,3 \times 10^{-4}$  M ( $EC_{85}$ ) ACh ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin ve tulatromisin ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  M) derişimlerinin etkisine bakılmıştır. Gamitromisin  $10^{-7}$  ve  $10^{-6}$  M derişimlerinde ACh ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasında gevşeme yanıtı görülürken, tulatromisin derişimlerinde gevşeme yanıtı görülmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları bahsi geçen çalışma ile uyumlu olup,  $2,3 \times 10^{-4}$  M ( $EC_{85}$ ) ACh ile ön kasılma oluşturulan trakea düz kasına, kümülatif olarak uygulanan gamitromisin ( $10^{-7}$  ve  $10^{-6}$  M) her ne kadar azitromisin ( $10^{-5}$  M) kadar gevşeme yanıtı oluşturmasa da dilatasyon yapıcı etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Asetilkolin  $EC_{85}$  derişimi ile ön kasılma oluşturulan dokularda gamitromisinin  $10^{-7}$  ve  $10^{-6}$  M derişimlerinde az da olsa gevşeme yanıtları kontrolün gevşeme yanıtlarına göre istatistiksel bir farklılık bulunmuştur. Bu sebeple deneylere  $10^{-6}$  M gamitromisin inkübasyonu da eklenmiştir. Sonuçta, istatistiksel olarak Bonferroni düzeltmesi yapıldığında ( $P > 0,016$ ) önemli olarak bulunmasa da, gamitromisin inkübasyonu sayısal olarak kontrol grubuna göre ACh'in  $E_{max}$  değerini düşürmüştür. Yani gamitromisin derişime bağlı şekilde ACh'in maksimum etki derecesini azaltmıştır. Gamitromisin kullanılırken böyle bir etki ile karşılaşılabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak makrolid antibiyotiklerin etkileri; kimyasal yapıları, kullanılan derişimleri ve uygulandıkları dokular ve hayvan türlerine bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Gamitromisin ve tulatromisin tek başlarına sığır trakea düz kas tonusunda değişikliğe yol açmazken, gamitromisin ACh ile ön kasılma oluşturulan dokularda az da olsa derişime bağlı olarak gevşeme etkisi göstermiştir. Bu etki, pratik olarak klinik uygulamalarında özellikle astım ya da solunum yolunda ödemle seyreden hastalıklarda tedaviye katkı sağlayabilir.

**Maddi destek ve çıkar ilişkisi:** "Sığırlarda tulatromisin ve gamitromisinin trakea düz kasının kasılması ile trakea epitel hücreleri üzerine apoptotik, nekrotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması" başlıklı tezin bir kısmından özetlenen bu çalışma; Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, 2018/047 proje numarası ile desteklenmiştir. Yazarların herhangi bir çikara dayalı ilişkisi yoktur.

## Kaynaklar

An SS, Bai TR, Bates JHT, Black JL, Brown RH, Brusasco V, Chitano P, et. al. (2007) Airway smooth muscle Dynamics: a common

- pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J.* 29(5), 834-860.
- Anadón A, Reeve-Johnson L (1999) Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicine. *Res Vet Sci.* 66(3), 197-203.
- Bambeke FV, Tulkens PM. (2001) Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents.* 18, 17-23.
- Barnes PJ. (1989) Airway receptors. *Postgrad Med J.* 65(766), 532-542.
- Canning BJ, Fischer A. (2001) Neural regulation of airway smooth muscle tone. *Res Physiol.* 125(1-2), 113-127.
- Carbon C. (1998) Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: effect on extracellular pathogens. *Clin Infect Dis.* 27(1), 28-32.
- Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgoulialis KI, Molyvda PA. (2006) Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 553(1-3), 280-287.
- Dai JM, Kuo K-H, Leo JM, Breemen CV, Lee C-H. (2005) Mechanism of ACh-induced asynchronous calcium waves and tonic contraction in porcine tracheal muscle bundle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(3), 459-469.
- Dinos GP. (2017) The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol.* 174(18), 2967-2983.
- Evans NA. (2005) Tulathromycin: an overview of a new triamylide antimicrobial for livestock respiratory disease. *Veterinary Therapeutics.* 6(2), 83-95.
- Giguère S. (2013) Macrolides, azalides, and ketolides. Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Fifth edition, Wiley Blackwell, Iowa, p:211-231.
- Huang RA, Letendre LT, Banav N, Fischer J, Somerville B. (2009) Pharmacokinetics of gamithromycin in cattle with comparison of plasma and lung tissue concentrations and plasma antibacterial activity. *J Vet Pharmacol Therap.* 33(3), 227-237.
- Itoh Z, Suzuki T, Nakaya M, Inoue M, Arai H, Wakabayashi K. (1985) Structure-activity relation among macrolide antibiotics in initiation of interdigestive migrating contractions in the canine gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 248(3), 320-325.
- Jones KA, Housmans PR, Warner DO, Lorenz RR, Rehder K. (1993) Halothane alters cytosolic calcium transient in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 265(1), 80-86.
- Kaneda T, Kanda H, Tajima T, Urakawa N, Shimizu K. (2018) Imidazole-induced contractions in bovine tracheal smooth muscle are not dependent on the cAMP pathway. *J Vet Med Sci.* 80(2), 341-345.
- Kaneda T, Sakaguchi R, Shimizu K, Urakawa N, Nakajyo S. (2006) Effects of high-K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-deficient solution on contractility of the smooth muscles of the bovine trachea. *J Vet Med Sci.* 68(10), 1039-1045.
- Kaneda T, Takeuchi Y, Matsui H, Shimizu K, Urakawa N, Nakajyo S. (2005) Inhibitory mechanism of papaverine on carbachol-induced contraction in bovine trachea. *J Pharmacol Sci.* 98(3), 275-282.
- Kannan K, Mankin AS. (2011) Makrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Ann N Y Acad Sci.* 1241, 33-47.
- Kellermann M, Huang RA, Forbes AB, Rehbein S. (2014) Gamithromycin plasma and skin pharmacokinetics in sheep. *Res Vet Sci.* 97(2), 199-203.
- Lechtenberg KF, Daniels CS, Schieber T, Bechtol DT, Drag M, Kunkle BN, Chester ST, Tessman RK. (2011) Field efficacy study of gamithromycin for the treatment of bovine respiratory disease associated with *Mycoplasma bovis* in beef and non-lactating dairy cattle. *Intern J Appl Res Vet Med.* 9(3), 225-232.
- Maletić J, Djelić N, Radaković M, Maletić M, Lakić N, Kukolj V, Aleksić N, Andjelković M, Stanimirović Z. (2015) Evaluation of DNA damage in rat lymphocytes exposed to tulathromycin *in vitro*. *Genetica.* 47(1), 339-348.
- Mehrdad NG, Yagoob A, Saeid S, Sina S. (2011) Effects of tulathromycin (Draxxin) on contractility of isokated myometrium in rats. *Middle-East J Sci Res.* 10(4), 496-500.
- Panettieri RA, Kotlikoff MI, Gerthoffer WT, Hershenson MB, Woodruff PG, Hall IP, Banks-Schlegel S. (2008) Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodeling: basic knowledge to clinical relevance. *Am J Respir Crit Care Med.* 177(3), 248-252.
- Pyörälä S, Baptiste KE, Cattray B, Dujkeren EV, Greko C, Moreno MA, Pomba MCMF, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Törneke K. (2014) Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *The Veterinary Journal.* 200, 230-239.
- Sanderson MJ, Demoltte P, Bai Y, Perez-Zogbhi JF. (2008) Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca<sup>2+</sup> signaling and sensitivity. *Proc Am Thorac Soc.* 5, 23-31.
- Sgoifo RCA, Vandoni SL, Bonfanti M, Forbes AB. (2010) Effects of arrival medication with gamithromycin on bovine respiratory disease in feedlot cattle in Italy. *Intern J Appl Res Vet Med.* 8(2), 87-96.
- Steel HC, Theron AJ, Cockeran R, Anderson R, Feldman C. (2012) Pathogen- and host- directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. *Mediators Inflamm.* ID 584262. doi:10.1155/2012/584262.
- Tamaoki J, Tagaya E, Sakai A, Konno K. (1995) Effects of macrolide antibiotics on neurally mediated contraction of human isolated bronchus. *J Allergy Clin Immunol.* 95(4), 853-859.
- Trak T, Yıldırım E, Yurdakök Dikmen B. (2019) The effect of gamithromycin on smooth muscle of rat uterus *in vitro*. *IJVAR.* 2(2), 46-50.
- Wang IY, Bai Y, Sanderson MJ, Sneyd J. (2010) A mathematical analysis of agonist- and KCl-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse airway smooth muscle cells. *Biophys J.* 98(7), 1170-1181.
- Wang Q, Yu M-F, Zhang W-J, Liu B-B, Zhao Q-Y, Luo X, Xu H, et al. (2019) Azithromycin inhibits muscarinic 2 receptor-activated and voltage-activated Ca<sup>2+</sup> permeant ion channels Ca<sup>2+</sup> and sensitization, relaxing airway smooth muscle contraction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 46(4), 329-336.
- Wang X, Tao YF, Huang LL, Chen DM, Yin SZ, Ihsan A, Zhou W, Su SJ, Liu ZL, Pan YH, Yuan ZH. (2011) Pharmacokinetics of tulathromycin and its metabolite in swine administered with an intravenous bolus injection and a single gavage. *J Vet Pharmacol Therap.* 35(3), 282-289.
- Zholos AV, Bolton TB, Dresvyannikov AV, Kustov MV, Tsvilovskii VV, Shuba MF. (2004) Cholinergic excitation of smooth muscles: multiple signaling pathways linking M2 and M3 muscarinic receptors to cationic channels. *Neurophysiology.* 36(5-6), 398-406.
- Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. (2011) Review of macrolides (azithromycin, clarithromycin), ketolids (telithromycin) and glycolcyclines (tigecycline). *Med Clin N Am.* 95(4), 761-791.