



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2009; 23 (1): 11 - 14
http://www.fusabil.org

Gebe Sıçanlarda Oksitosinle İndüklenmiş Miyometriyum Kasılmaları Üzerine Nebivololün İnhibe Edici Etkisi *

Salih Burçin KAVAK¹
Ebru ÇELİK KAVAK¹
Selim KUTLU²
Mehmet ŞİMŞEK³
Mete ÖZCAN⁴
Selahattin KUMRU³
Bayram YILMAZ²
Haluk KELEŞTİMUR²

¹Sarahatun Doğumevi,
Kadın Hastalıkları ve
Doğum Kliniği,
Elazığ, TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

³Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Kadın Hastalıkları ve
Doğum Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

⁴Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 13.10.2008
Kabul Tarihi : 05.01.2009

Yazışma Adresi Correspondence

Salih Burçin KAVAK
Sarahatun Doğumevi,
Kadın Hastalıkları ve
Doğum Kliniği,
Elazığ-TÜRKİYE

burcinkavak@yahoo.com

Bu çalışma, oksitosin ile indüklenen izole miyometriyum kasılmaları üzerine, seçici β_1 blokör olan ve nitrik oksit (NO) aracılı etkileri bulunan nebivololün, etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı.

Çalışmada 10 adet 250-300 g ağırlığında erişkin Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı, östrus siklusları günlük vajinal smear bakılarak takip edildi. Smearlarında sperm görüldüğü gün, gebeliğin ilk günü olarak kabul edildi. Gebeliğin 16. günü sıçanlar servikal dislokasyonla öldürüldü. Uterus dokuları, fetal dokular ve plasentalarından ayrıldı. Krebs solüsyonuna alındı. 1x 0,2x 0,2 santimetre boyutlarında miyometriyum kesitleri hazırlandı. Miyometriyum kesitleri Krebs solüsyonu içerisinde; %95 oksijen ve %5 karbondioksitle sürekli gazlandırılan PH 7,4 ve 37 °C bulunan organ banyosuna alındı. 1 g istirahat gerilimi altında asılarak izometrik kontraksiyonlar kayıt edildi. Miyometriyum kesitlerinde 30 dakika süreyle spontan kasılmalar gözlemlendi. Ardından miyometriyum aktivitesi oksitosin hormonu uygulanarak anlamlı bir şekilde artırıldı. Daha sonra nebivololün farklı dozları (50, 250 ve 500 μ M) uygulandı.

Uygulanan oksitosin sonrası, ortama ilave edilen 50, 250 ve 500 μ M nebivolol, ortalama frekans (f) ve ortalama eğri altında kalan alan (EKA)'da istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gerçekleştirdi. ($p<0,05$). Yalnız ortalama pik amplitüd (PA) üzerinde 50 μ M nebivolol ilavesinden sonra istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadı. Ortalama PA'da 250 ve 500 μ M nebivolol ilavesinden sonra istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gerçekleştirdi. ($p<0,05$).

Bir beta bloker olan nebivololün miyometriyum kontraksiyonları üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Nebivolol, miyometriyum, kontraksiyon, gebe sıçan.

Nebivolol Decreases the Oxytocin Induced Myometrial Contractions of Pregnant Rat

This study was designed to determine the effect of nebivolol, which is a selective β_1 blocker and has nitric oxide (NO) mediated effects, on oxytocin induced isolated myometrial contractions.

Ten adult Wistar female rats, weighting between 250-300 grams, were used in our study. Oestrus cycles were determined by taking vaginal smears everyday. The day when sperm was determined on smear was accepted as the first day of pregnancy. On 16th day of pregnancy, rats were killed by cervical dislocation. Placentas and fetal tissues were separated from each uterus and placed in Krebs solutions. Myometrium strips measuring 1x 0,2x 0,2 cm. were prepared and placed in an organ bath containing krebs solution constantly bubbled with 95% oxygen, 5% carbon dioxide, at 37 °C and pH 7,4. Under 1 gram of resting tension, isometric contractions were recorded. Spontaneous contractions were seen for 30 minutes and then myometrial activity was stimulated with oxytocin. After stimulation with oxytocin different doses of nebivolol (50,250 and 500 μ M) were applied.

Addition of 50, 250 and 500 μ M nebivolol showed statistically significant decrease on mean peak amplitude, mean frequency and mean area under curve ($p<0,05$ Wilcoxon Rank Test). But no statistically significant difference was determined on mean peak amplitude after addition of 50 μ M nebivolol.

It was determined that nebivolol, a beta blocker, had an inhibitory effect on oxytocin-induced contractions of myometrium.

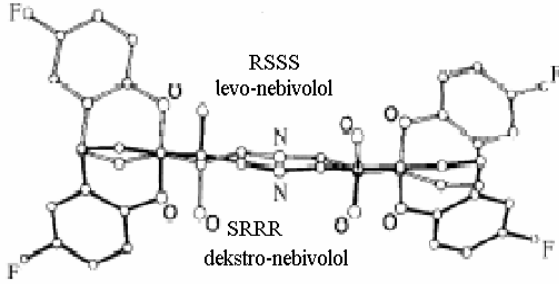
Key Words: Nebivolol, myometrium, contraction, pregnant rat.

Giriş

Nitrik oksit (NO) aracılı bazı ek vazodilatatör etkilerle donatılmış, yüksek düzeyde seçici bir β_1 blokör olan nebivolol ilk kez 1995 yılında Hollanda'da esansiyel hipertansiyon endikasyonu için ruhsat almış bir ajandır (1). Kimyasal yapısına bakıldığında diğer β_1 -blokörlerden ayrılır. Nebivolol molekülünün, bir nitrojen atomu etrafında bir C₂ simetri eksenine, 4 asimetrik karbon atomu vardır. Nebivolol, d-nebivolol

* British Endocrine Societies 24th Joint Meeting 4-6 April 2005, Harrogate,UK

(SRRR-OSR₃'lü dekstro-izomer konfigürasyonu) ile l-nebivolol (RSSS ORS₂ levo-izomer konfigürasyonu) enantiyomerlerinin eşit oranlı rasemik karışımıdır. Bu nedenle karışıma dl-nebivolol adı verilir (Şekil 1) (2).



Şekil 1. Nebivololün moleküler yapısı.

Nebivololün damar düz kaslarına olan gevşetici etkisi NO ve cGMP bağılı mekanizmalarla olur (3). Nebivolol çift etki mekanizmalı bir ajandır. Hem NO salınımını arttırarak, hemde β_1 adrenoreseptör antagonizmasıyla etki eder. Damar endotelinde NO aktivasyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır.

Deneylerde nebivolol ile NG-monometil-L-Arjinin maddesinin (LNMA), beraber kullanılması esnasında düz kas gevşemesinin bozulması, nebivololün vazodilatasyonu endotelial metabolik sistem L-arjinin/NO aktivasyonu ile yaptığını destekler. Çünkü L-NMA bir NO sentez inhibitörüdür (4, 5). Nebivololün endotelium bağımlı vazodilatör etkisi mikrosirkülasyon içinde geçerlidir (6).

NO vücuttaki tüm dokularda bulunur ve önemli işlevler yürütür. Uterin dokularda NO sentaz enziminin bulunması, miyometriyal kontraktilite ve plasental kan akımının düzenlenmesinde NO'nun rol aldığı bir göstergesidir (7). NO'nun moleküler hedefleri arasında çözünebilir guanilat siklaz (çGS) ve adenosin difosfat (ADP)-ribozil transferaz yer alır. Guanilat siklaz aracılığı ile oluşan siklik guanozin monofosfat (cGMP), çeşitli protein kinazları, siklik nükleotid fosfodiesterazları, iyon kanallarını ve diğer bazı proteinleri etkiler. (8).

Klinik etkileri açısından bakıldığında nebivolol uygulanması kolay, tolerabilitesi yüksek bir ilaçtır. Yan etkileri oldukça az görülür. Başlıca yan etkileri bradikardi, baş dönmesi, baş ağrısı, asteni, taşikardi, çarpıntı, döküntü, ağız kuruluğu uykusuzluk, bulantı, parestezi, ekstremitte ödemi ve anksiyetedir (9).

Bu çalışmada nebivololün damar düz kasları üzerine olan nitrik oksit aracılı gevşetici etkisinden yola çıkılarak uterus düz kasları üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmış, gebe sıçan miyometriyum üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma lokal etik komite tarafından onaylanmasını takiben gerçekleştirildi. Çalışmada

kullanılan 10 adet 250-300 g. ağırlığında erişkin Wistar cinsi dişi sıçan Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜTDAM)'dan temin edildi. Sıçanların östrus siklusları günlük vajinal smear bakılarak takip edildi. Östrus tespitinde sıçanlar, her kafeste dört dişi bir erkek olacak şekilde eşlenerek kafeslendikten sonra, vajinal smearlarında sperm görüldüğü gün gebeliğin ilk günü olarak kabul edildi. Gebeliğin 16. günü deneylere başlandı. Sıçanlar servikal dislokasyonla öldürüldü ve uterusları çıkarıldı. Uterus dokuları, fetal dokular ve plasentalarından ayrılarak içerisinde Krebs çözeltisi bulunan petri kutularına alındı. + dört santigrat derecede saklandı. Uterus üst kutuplarından 1x 0,2x 0,2 santimetre boyutlarında miyometriyum kesitleri hazırlandı. Her bir sıçan uterusundan bir adet kesit hazırlandı.

Kesitler içerisinde % 95 oksijen ve % 5 karbondioksitle sürekli gazlandırılan 37°C'de Krebs solüsyonu bulunan termostatlı peristaltik pompa düzenekli ve çift çeperli izole organ banyosuna alındı. İstirahat şartlarını oluşturmak için kesitler, 1 gram istirahat gerimi altında asıldı ve izometrik kasılmalar kaydedildi. İzometrik kasılmalar "izometrik güç çevirgeci" (Harvard Apparatus Limited, Kent, İngiltere) ve arabirim ile osilografa (Harvard Apparatus Limited, Kent, İngiltere) aktarılarak yazdırıldı. Ölçüm ve değerlendirmeler bu kayıtlar üzerinde yapıldı.

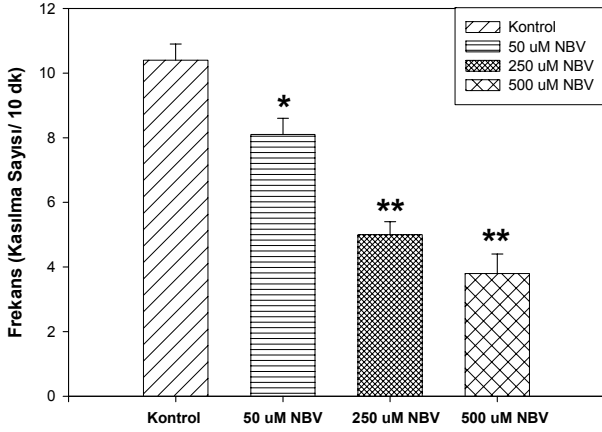
Her bir sıçandan alınan kesitler, organ banyosunda 30 dakikalık uyum periyodunu takiben, sekiz adet kas 1 μ M oksitosin (Synpitan Forte, Deva, İstanbul) ile indüklendi ve yine on beş dakika arayla ve sırasıyla 50, 250 ve 500 μ M olacak şekilde nebivolol (Vazoxen, İbrahim&Ethem Ulagay, İstanbul) kümülatif olarak ilave edildi. Ortam pH'sı her uygulamayı takiben kontrol edildi. Oluşan etki kayıt altına alındı. İki adet kas spontan düzenli kasılma göstermediğinden çalışmaya dahil edilmedi.

Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Nonparametrik Wilcoxon Signed Ranks Testi ve gruplar arası farklılığı ortaya koymak için Mann Whitney-U Testi kullanıldı. p<0,05 değeri anlamlı kabul edildi. Hazırlanan grafikler ise Sigma Plot 80 programıyla oluşturuldu. Bütün istatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 programı kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirildi.

Bulgular

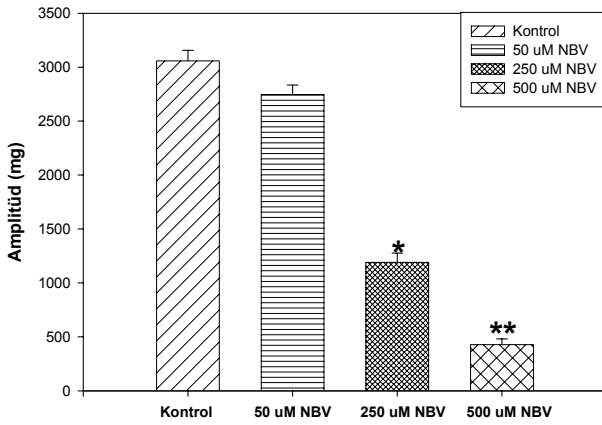
Çalışmada kullanılan on adet sıçandan alınan on adet uterus kas kesitinin sekiz tanesi spontan düzenli kasılma gösterdi. İki tanesi spontan düzenli kasılma göstermediğinden değerlendirmeye alınmadı. Sekiz adet preparata 1 μ M oksitosin uygulandıktan sonra düzenli kasılmalar elde edildi. Yirmi dakikalık düzenli kasılmadan sonra ortama 50 μ M nebivolol eklendi ve sonrasında on beş dakikalık kasılma kaydedildi. Oksitosin sonrası PA: 3058 \pm 97,8 g, f: 10,4 \pm 0,5 /15 dk. ve EKA: 1587 \pm 94 idi. 50 μ M nebivolol uygulandıktan sonra ortalama PA: 2746 \pm 89 g, ortalama f: 8,1 \pm 0,5 /15 dk. ve EKA: 1033 \pm 95 olarak bulundu.

Ardından ortama 250 μM neбиволol ilave edildi. On beş dakika kayıt alındı Bu ilave işlemiyle birlikte ortalama PA: $1191 \pm 84,7$ g., ortalama f: $5,0 \pm 0,4$ /15 dk. ve EKA: 126 ± 75 olarak bulundu. Yine son aşamada ortama bu defa 500 μM neбиволol ilave edildi ve on beş dakika kayıt alındı. Ortalama PA: 427 ± 54 g. ve f: $3,8 \pm 0,6$ /15 dk. ve EKA: 45 ± 25 olarak bulundu. Neбиволol deney aşamaları esnasında kümülatif olarak uygulandı.(Şekil 2, 3, 4)



Şekil 2. Gebe sıçan uterusunda oksitosinle indüklenen kasımlarda neбиволolün frekans üzerine olan etkileri.

* $p < 0,05$, Wilcoxon Rank Test. ** $p < 0,01$, Wilcoxon Rank Test

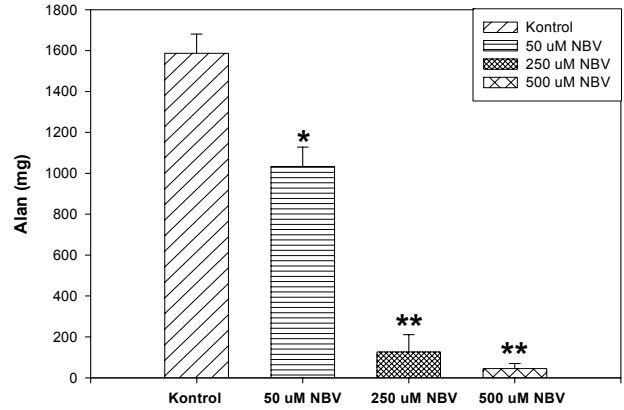


Şekil 3. Gebe sıçan uterusunda oksitosinle indüklenen kasımlarda neбиволolün peak amplitüd üzerine olan etkileri.

* $p < 0,05$, Wilcoxon Rank Test. ** $p < 0,01$, Wilcoxon Rank Test.

Bu grupta uygulanan oksitosin sonrası, ortama ilave edilen 50, 250 ve 500 μM neбиволol, ortalama f ve EKA'da istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gerçekleştirdi. ($p < 0,05$ Wilcoxon Rank Test). Ortalama PA'da 250 ve 500 μM neбиволol dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşurken, ortalama PA'da 50 μM

neбиволol ilavesinden sonra istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadı. (Tablo 1)



Şekil 4. Gebe sıçan uterusunda oksitosinle indüklenen kasımlarda neбиволolün eğri altında kalan alan üzerine olan etkileri.

* $p < 0,05$, Wilcoxon Rank Test. ** $p < 0,01$, Wilcoxon Rank Test.

Tablo 1. Gebe sıçan uterusunda oksitosinle indüklenen kasımlara neбиволolün etkisi.

Gebe OT ile İndüklenmiş Kasılmalar	Kontrol (n:8)	50 μM NBV	250 μM NBV	500 μM NBV
Frekans	$10,4 \pm 0,5$	$8,1 \pm 0,5^*$	$5,0 \pm 0,4^{**}$	$3,8 \pm 0,6^{**}$
Amplitüd	$3058 \pm 97,8$	$2746 \pm 89,1$	$1191 \pm 84,7^*$	$427 \pm 54^{**}$
Alan	1587 ± 94	$1033 \pm 95^*$	$126 \pm 75^{**}$	$45 \pm 25^{**}$

OT: Oksitosin NBV:Neбиволol

* $p < 0,05$, Wilcoxon Rank Test ** $p < 0,01$, Wilcoxon Rank Test

Tartışma

Yaptığımız çalışmada, ilk kez 1995 yılında Hollanda da esansiyel hipertansiyon tedavisinde kullanılmak üzere ruhsat almış, yüksek düzeyde seçici bir β_1 blokör olan neбиволolün oksitosin ile indüklenmiş gebe rat miyometriyumundaki kasılmalar üzerine olan etkileri incelendi. Neбиволol; oksitosin hormonuyla indüklenmiş olan kasılmaların pik amplitüdünü ve eğri altında kalan alanı doza bağımlı olarak baskıladı. Kasılmaların frekanslarında ise tüm neбиволol dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gelişti. ($p < 0,05$, Wilcoxon Rank Test).

Günümüzde uterin kontraksiyonları inhibe etmek için beta mimetikler (ritodrin, terbutalin, izoksuprin, salbutamol), magnezyum sülfat, prostaglandin sentetaz inhibitörleri (indometazin), kalsiyum kanal blokörleri (nifedipin), nitrik oksit, oksitosin antagonisti (atosiban) ve potasyum kanal açıcılar kullanılmaktadır (10).

Literatür incelendiğinde neбиволolün uterin kontraksiyonlar üzerine etkisi çalışılmamıştır. Ancak neбиволolün damar düz kaslarına olan gevşetici etkisi

çalışılmış olup etkisini NO ve cGMP bağlı mekanizmalarla göstermektedir (3, 11, 12). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda sıçan hipokampal membranlarına biraz bağlanma dışında, alfa₁ adrenerjik, Beta₂-adrenerjik, D₁-dopamin, D₂-dopamin, H₁-histamin, H₂-histamin, kolinerjik, muskarinik, μ -opiyad, benzodiyazepin ve Ca⁺² kanal siteleriyle anlamlı bir bağlanma görülmemiştir. Nebivololün terapötik dozlarda intrinsik sempatomimetik aktivitesi (ISA) ve uygun bir membran dengeleyici etkisi de yoktur (13, 14).

Yapılan çeşitli çalışmalarda nebivololün hipertansif hastalarda plazma ve üriner nitrat düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı tesbit edilmiştir. Bu artırma işlemi hem NO'ün oksidatif yıkıma karşı korunması hem de sentezinin uyarılması yoluyla olur. Bu konuyla uyumlu olarak nebivololün sağlıklı gönüllülerde sistemik oksidatif stresi, azalttığı da yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (15).

Kaynaklar

- Cleophas TJ. Experimental evidences of selective antagonistic action of nebivolol on-1-adrenergic receptors. *J Clin Med* 1998; 2: 2-25.
- Van Bortel LM, de Hoon JN, et al. Pharmacological properties of nebivolol in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 51: 379-384.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Trinh K, Sisodia M, Buga GM. Nebivolol: a selective beta (1)-adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *Nitric Oxide* 2002; 7: 75-82.
- Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, et al. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 1067-1071.
- Bowman AJ, Chen CP, Ford GA. Nitric oxide mediated venodilator effects of nebivolol. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38: 199-204.
- Arosio E, De Marchi S, Prior M, Zannoni M, Lechi A. Effects of nebivolol and atenolol on small arteries and microcirculatory endothelium-dependent dilation in hypertensive patients undergoing isometric stress. *J Hypertens* 2002; 20: 1793-1797.
- Ledingham MA, Thomson AJ, Greer IA, Norman JE. Nitric oxide in parturition. *BJOG* 2000; 107: 581-593.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology*. 3rd Edition, New York: Churchill Livingstone, 1995: 203-213.
- Sieben G, Van Neuten L, Symoens J. Nebivolol in hypertension. One-year treatment data. *Drug Invest* 1991; 3: 193-195.
- Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. (editörler). *Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Güneş Tıp Kitabevi 2006: 734.
- Gupta S, Wright HM. Nebivolol: A highly selective beta-adrenergic receptor blocker that causes vasodilation by increasing nitric oxide. *Cardiovasc Ther* 2008; 26: 189-202.
- Frazier EP, Michel-Reher MB, Sand C, et al. WITHDRAWN: Is nebivolol a beta(3)-adrenoceptor agonist? *Eur J Pharmacol* 2008; 10: 10-16.
- Mangrella M, Rossi F, Fici F, Rossi F. Pharmacology of nebivolol. *Pharmacol Res* 1998; 38: 419-431.
- Janssens WJ, Xhonneux R, Janssens PAJ. Animal pharmacology of nebivolol. *Drug Invest* 1991; 3: 13-24.
- Napoli C, Liguori A, De Nigris F. Beneficial effects of nebivolol on the NO-pathway in essential hypertensive patients. *Eur Heart J* 2002; 23: 210.
- Roberts LJ, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1345: 121-135.
- Troost R, Schwedhelm E, Rojczyk S, Tsikas D, Frolich JC. Nebivolol decreases systemic oxidative stress in healthy volunteers *Br J Clin Pharmacol* 2000; 50: 377-379.
- Hekimoglu A, Celik F, Tas T, Ece A, Kavak V. The contribution of nitric oxide on the relaxation effects of diethylstilbestrol. *Saudi Med J* 2008; 29: 662-667.
- Lees CC, Lojaco A, Thompson C, et al. Glyceryl trinitrate and ritodrine in tocolysis: an international multicenter randomized study. *GTN Preterm Labour Investigation Group. Obstet Gynecol* 1999; 94: 403-408.