

Köpeklerde Enrofloksasinin Myometrial Kontraktilite Üzerine Etkisi**

Zahid PAKSOY^{1*}, Akif Hakan KURT², Yusuf ERGÜN²

¹Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Gümüşhane, Türkiye.

²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Dahili Tıp Bilimleri, Kahramanmaraş, Türkiye.

Geliş Tarihi: 11.10.2016

Kabul Tarihi: 25.10.2016

Özet: Antibiyotiklerin uterus kasılması üzerine uyarıcı ve inhibe edici etkileri bulunmaktadır. Enrofloksasin de bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bu çalışmanın amacı, in vitro ortamda Prostaglandin F₂ alfa (PGF₂ alfa) ile indüklenmiş köpek uterusu üzerinde enrofloksasinin etkilerini araştırmaktır. Uterus dokusu, postpartum dönemde bulunan ve ovariyohisterektomi operasyonu yapılan köpeklerden elde edildi. İzole myometrium şeritleri, içinde Kumagai solüsyonu bulunan, %95 oksijen ve %5 karbondioksit ile sürekli gazlanan organ banyosuna asıldı (28°C). Ekiibrasyon süresi sonunda organ banyosuna PGF₂ alfa eklendi ve myometrial şeritlerin kasılma cevapları elde edildi. Daha sonra organ banyosuna 2 mM (n=6) ve 5 mM (n=10) enrofloksasin uygulandı ve % kasılma takip edildi. Enrofloksasin ile 60 dakika inkübe edilen şeritlerin üzerine ikinci PGF₂ alfa verildi ve kasılmalar takip edildi. Enrofloksasin, uterus kontraksiyonları üzerinde bifazik etki gösterdi. Yüksek doz (5 mM) Enrofloksasinin kontrol grubuna kıyasla kasılma cevabını anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi. Bu çalışma, yüksek doz enrofloksasinin köpek myometriumu üzerinde inhibitör etkili olduğunu gösterdi. Bu sebeple, metritis tedavisinde enrofloksasin kullanılırken uterotonik ajanlarla tedavinin desteklenmesinin daha faydalı olacağı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Enrofloksasin, Kasılma, Köpek, Miyometriyum

The Effect of Enrofloxacin on Myometrial Contractility in Bitches

Abstract: Enrofloxacin is a broad spectrum antibiotic used to treat bacterial infections. The aim of present study was to investigate the effect of enrofloxacin on Prostaglandin F₂ alpha (PGF₂ alpha) induced postpartum canine myometrium in vitro. Uterine tissues were obtained from bitches undergoing ovariohysterectomy in the postpartum period. Isolated myometrium strips suspended in organ bath filled with Kumagai solution and continuously gassed with 95% oxygen and 5% carbon dioxide (28°C). At the end of equilibration period, PGF₂ alpha was added to the organ bath and the myometrial strips were observed to be contracted. Then the organ bath were administered solvent (n = 6), 2 mM (n = 6) and 5 mM (n = 10) enrofloxacin and % contraction was monitored. PGF₂ alpha was given a second time and the contractions were recorded after incubation with enrofloxacin. Solvent inhibited significantly myometrial contractions and enrofloxacin treated group showed a biphasic effect. The contractile response was significantly inhibited by 5 mM enrofloxacin compared to the control group. Our results show that high-dose enrofloxacin had inhibitory effects on the canine myometrial contractions. For this reason, enrofloxacin should be used combine with uterotonik agents in the metritis treatment.

Keywords: Enrofloxacin, Dog, Myometrium, Contraction

Giriş

Doğum sonrası dönem köpeklerin uterus enfeksiyonlarına en duyarlı olduğu periyotlardan biridir. Bu dönemde serviks açık olması sebebiyle bakterilerin uterusu ulaşması kolaydır. Ayrıca güç doğum, yavru zarlarının retensiyonu ve hijyenik olmayan çevre şartları uterusu metritise predispoze bir hale getirir. Metritis köpeklerde postpartum dönemde yaygın görülen bir genital sistem hastalığıdır. Hastalıkta; ateş, dehidrasyon, depresyon, yavruların ihmal edilmesi, iştahsızlık ve purulent vaginal akıntı gibi klinik belirtiler görülmektedir. Hastalığa serviks vasıtasıyla uterusu ulaşan gram negatif bakteriler sebep olmaktadır. En sık izole edilen enfeksiyon etkeni E. coli'dir. Bu etken salgıladığı endotoksinler ile sekonder olarak böbrekleri de etkiler (Linde-Forsberg ve Eneroth, 2004; Pretzer, 2008; Kustritz, 2010; Shukla, 2012). Hastalığın tedavisi için genellikle geniş spektrumlu

bir antibiyotik ve uterotonik bir ajan uygulanır. Uterotonik olarak Prostaglandin F₂ alfa (PGF₂ alfa) kullanılır. PGF₂ alfa uterus içeriğinin boşaltılmasını sağlar (Linde-Forsberg ve Eneroth, 2004; Kustritz, 2010). Bakterilerin eliminasyonu için de penisilinler (amoksisilin), aminoglikozitler (gentamisin), sefalosporinler (seftiofur) ve florokinolonlar (enrofloksasin) gibi geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılır (Gabor ve ark., 1999; Smith 2006; Coggan ve ark., 2008; Versteegen ve ark., 2008).

Florokinolonlar özellikle sindirim, solunum ve ürogenital sistem hastalıklarında yaygın şekilde kullanılır (Thungrat ve ark., 2015; Huebschle ve ark., 2006; Babacan ve ark., 2011; Uçmak ve ark., 2012). Hayvanlarda kullanılmaya başlanan ilk florokinolon ilaç enrofloksasin'dir (Martinez ve ark., 2006). Bununla birlikte bu grup içerisinde nalidiksik asit, ciprofloksacin, levofloksacin, marbofloksacin,

danofloxacin, difloxacin, norfloxacin, enoxacin ve trovafloxacin gibi antibiyotikler de bulunur.

Enrofloksasin genital sistem enfeksiyonlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte enrofloksasinin izole köpek miyometriyum kasılması üzerine etkisini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada amaç, postpartum dönemdeki köpek uterusunun kasılması üzerinde enrofloksasinin etkisini değerlendirmektir.

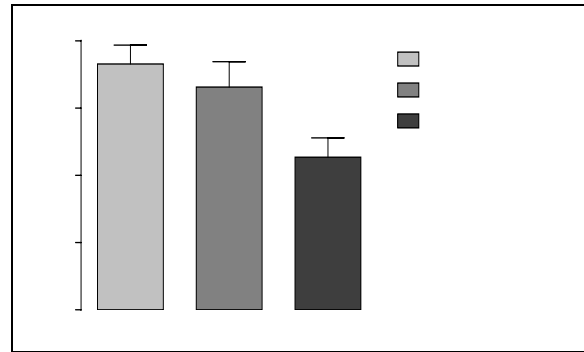
Materyal ve Metot

Kahramanmaraş hayvan barınağında bulunan ve doğum sonrası 40-60. günler arasında ovaryohistektomi ile kısırlaştırılan 11 dişi köpekten elde edilen 22 tane uterus dokusu çalışmada kullanıldı. Hayvan barınağında rutin olarak köpekler ksilazin (0,1 mg/kg) ve ketamin (10 mg/kg) protokolü kullanılarak anestezi edilmekteydi. Köpekler genel anestezi altında iken uteruslar alındı. Uteruslar makroskopik olarak normaldi. Cornu uterilerin dorsal kısmının distal bölgesinden longitudinal şeritler alındı. İçerisinde Kumagai solüsyonu (NaCl 150.6 mmol/l; KCl 5.4 mmol/l; CaCl₂ 0.4 mmol/l; MgCl₂ 0.2 mmol/l; NaHCO₃ 3.5 mmol/l; Na₂HPO₄ 0.6 mmol/l; KH₂PO₄ 0.1 mmol/l ve glikoz, 11 mmol/l) bulunan bir kaba konularak 20 dk içerisinde laboratuvara nakledildi. Daha sonra uterus dokusu 10-15 mm uzunlukta ve 2-3 mm genişlikte küçük şeritler haline getirildi. Şeritlerin her iki ucu ipele bağlandı. Miyometriyal şeritler içinde kumagai solüsyonu bulunan 4 kanallı, ısıtıcı izole organ banyosuna (20 ml) aktarıldı. Şeritler sürekli olarak %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandı. Şeridin distal ucu organ banyosu içindeki çengele takılırken, proksimal uç transdüserle bağlandı. Isıtıcı ile su banyosunun ısısı 28°C'de sabitlendi (Gogny ve ark., 2010). Miyometriyal şeritler organ banyosuna yerleştirildikten sonra 1 g gerim uygulandı ve 60 dk süresince ekilibre edildi. Bu süre içerisinde her 20 dakikada bir solüsyon yenilendi. Köpek uterusları 3 gruba ayrıldı. Tüm gruplara ekilibrasyon süresi sonunda 5 nM dozda PGF₂ alfa (Dinoprost, Enzaprost, Ceva) uygulandı. PGF₂ alfa uygulaması sonrası kasılma düzeyi ölçüldü. Daha sonra miyometriyal şeritler 3 kez 5 dakika aralıklarla yıkandı. Yıkamalar tamamlandıktan 5 dakika sonra kontrol grubuna (n=6) enrofloksasinin çözücüsü olan etil alkol +butanol (%1'lik) karışımı verildi. İkinci gruba (n=6) 2 mM enrofloksasin (Baytril, Bayer), üçüncü gruba (n=10) 5 mM enrofloksasin (Baytril, Bayer) verildi ve 60 dk boyunca şeritler inkübe edildi. Bu süre sonunda ikinci PGF₂ alfa uygulaması yapıldı ve izometrik kasılma transdüser aracılığıyla bilgisayara aktarıldı ve veriler bilgisayara kaydedildi (Biopac MP35, Commat İletişim Ltd., Ankara, Türkiye).

İstatistik: One-way Anova ve bonferroni testi ile veriler karşılaştırıldı. Bu analizler için graphpad prism 6 programı (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanıldı. P değeri <0.05 kabul edildi.

Bulgular

Enrofloksasinin PGF₂ alfa kasılması üzerine etkisi: İlk PGF₂ alfa kasılması %100 kabul edildiğinde ikinci PGF₂ alfa uygulamasına verilen kasılma cevabı kontrol grubunda %91.47 olarak gerçekleşti. Enrofloksasin ile inkübasyon sonrası oluşan kasılma cevapları ise 2 mM uygulanan grupta %82.89 iken 5 mM uygulanan grupta %56.75 oldu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 2mM enrofloksasin verilen şeritlerde PGF₂ alfa ile oluşan kasılma cevabı istatistiki olarak önemsizdi (P>0.05). Bununla birlikte 5 mM enrofloksasin verilen şeritlerde inkübasyon sonrası PGF₂ alfa kasılma cevapları istatistikî olarak anlamlı bir şekilde azaldı (*P<0.05) (Şekil 1).



Şekil 1. PGF₂ alfanın indüklediği birinci ve ikinci kasılma cevapları

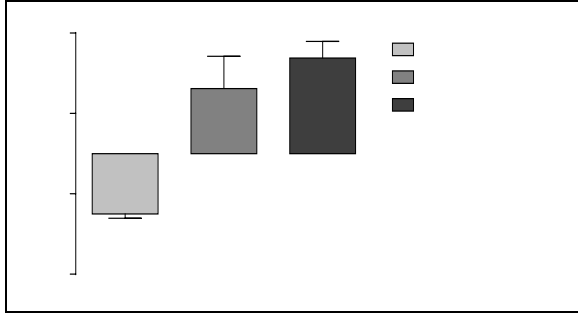
*: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir (P<0.05).

Enrofloksasinin bazal tonus üzerine etkisi: Kontrol grubunda çözücü ilavesi sonrası kontraksiyonlarda %37.3 oranında maksimal gevşeme meydana gelmiştir. Organ banyosuna 2 mM enrofloksasin ilave edilen şeritlerde ise kasılmalar maksimum %40.5 oranında artmış ve daha sonra azalmıştır. 5 mM enrofloksasin ilave edilen grupta da kasılmaların %59.5 oranında arttığı gözlenmiş olup, sonrasında ikinci grupta olduğu gibi azalmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 2 ve 5 mM enrofloksasin uygulanan gruplarda kasılmaların çok önemli bir şekilde arttığı tespit edildi (**P<0.01, ****P<0.0001) (Şekil 2).

Tartışma ve Sonuç

Köpeklerde uterus kasılması hakkında yeterli bilgi sahibi olmamız metritis tedavisi için çok önemlidir. Çünkü bu hastalığı tedavi etmek için

kullanacağımız ilaçların köpek uterusunun kasılması üzerindeki etkileri bilinmelidir. Köpeklerde metritis tedavisinde prostaglandinler ve geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılmaktadır. PGF₂ alfanın uterus kasılmasını uyardığı zaten bilinmektedir. Ancak uterustaki bakteri enfeksiyonunu kontrol altına almak için kullandığımız antibiyotiklerin uterus kasılması üzerindeki etkileri pek bilinmemektedir.



Şekil 2. Myometrium dokusu üzerinde enrofloksasinin etkileri.

** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (P<0.01), ****: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir (P<0.0001).

Antibiyotiklerin evcil hayvan myometriumu üzerindeki etkilerini inceleyen in vitro çalışmaların sayısı çok azdır. Bu antibiyotiklerden eritromisin kasılmayı uyarırken aminoglikozidlerin ve sefalosporinlerin kasılmayı inhibe ettiği, florokinolon grubu antibiyotiklerin ise bifazik etki gösterdiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2003; Phillippe, 1994; Elsayed ve ark., 2011; Akar ve ark., 2010). İn vitro olarak yapılan bu çalışmada, enrofloksasin, köpek uterusu üzerinde prostaglandinin uyardığı kasılmayı azalttı. Özellikle yüksek doz enrofloksasin verilen şeritlerde bu azalma anlamlıydı. Uterus enfeksiyonlarının tedavisinde gentamisin, amoksisilin + klavulanik asit ve enrofloksasin gibi antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu antibiyotikler içerisinde de enrofloksasin çok tercih edilen ajanlardan biridir (Bassessar ve ark 2013, Shukla 2012). Enrofloksasin, florokinolon grubu bir antibiyotik olup etkisini DNA giraz enzimini inhibe ederek gösterir (Martinez ve ark., 2006). Bu çalışmada enrofloksasinin farklı dozlarının uterus kasılmalarının sıklığı üzerine etkisi incelendi. Literatür taramasında köpek uterusunda kasılma ile ilgili yapılan çok az çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada (Gogny ve ark., 2010) araştırmacılar östrüs siklusunun farklı evrelerindeki köpeklerde aglepristone'un etkilerini incelemişlerdir. Diğer çalışmada (Rizzo ve ark., 2011) ise gebe köpek uterusu üzerinde L-arjininin in vitro etkileri incelenmiştir. Bununla birlikte köpek uterusu üzerinde

antibiyotiklerin etkisini inceleyen in vitro bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple enrofloksasinin dozunu belirlemek için bu ilacın klinik dozda uygulanmasından sonra uterusu ulaşan dozu dikkate alındı (Kumar ve ark 2005). Ratlarda yapılan bir çalışmada (Akar ve ark., 2010) florokinolon grubu antibiyotiklerden olan danofloksasinin uterus kasılması üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar, ratlarda danofloksasinin önce kasılma sıklığını artırdığını, daha sonra da yavaş yavaş azalttığını bildirmişlerdir. Bu bifazik etkiyi de hem K⁺ kanallarının hem de hücre içi indükleyici mekanizmaların inhibisyonuna bağlamışlardır. Ayrıca yüksek doz danofloksasinin kasılma frekansını önemli bir şekilde azalttığını da rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da enrofloksasinin bifazik etki gösterdiği ve 5 mM'lık dozun kontrol grubuna kıyasla kasılmaları önemli bir şekilde inhibe ettiği tespit edildi. Bununla birlikte 2 mM enrofloksasin uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi. Piccinno ve ark. (2014) inek uterusu üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada enrofloksasinin hem foliküler hem de luteal dönemde uterus kasılmalarını artırdığını bildirmişlerdir. Bu sebeple ineklerde uterus involusyonunu ve içeriğin atılmasını kolaylaştıracağını söylemişlerdir. Ayrıca florokinolonların, PGF₂ alfa salınımını artıracığından hem uterus kasılmasını artıracığı hem de luteolizisi sağlayacağı belirtilmiştir. Ancak pyometra vakalarında uterusu kasılma azaldığından dolayı enrofloksasin uygulaması nihai olarak kasılmayı inhibe edeceği için kullanılması zararlı olabilir. Di Nucci ve ark. (1998) izole kobay ileumunda norfloksasin ve enoksasin'in spontan motor aktivite üzerine etkisini incelemişlerdir. Her iki bileşiğin mikromolar konsantrasyonları bifazik bir cevaba sebep olmuştur. Araştırmacılar her iki antibiyotikün kasılma üzerinde önce inhibitör sonra eksitatör bir etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise önce uyarılma sonra ise inhibisyon gerçekleşmiştir. Aradaki bu farklılık kullanılan izole organ düz kaslarındaki reseptör farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, enrofloksasin ilk olarak uterusu kasılmaya sebep olsa da daha sonra inhibitör bir etki göstermektedir. Ayrıca bu antibiyotikün yüksek doz kullanılması sonrasında uterus PGF₂ alfa ile daha az uyarılabilmektedir. Dolayısıyla klinikte kullanılırken bu ilacın inhibitör etkisi göz önünde bulundurulmalı ve uterotonik ajanlar ile birlikte kullanılmalıdır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda enrofloksasinin bu etkisine aracılık eden mekanizmaların ve in vivo kasılma üzerine etkisinin incelenmesi daha faydalı olacaktır.

Kaynaklar

- Akar Y, Kara H, Servi K, Yıldız H, 2010: The Effect of Danofloxacin on in vitro Rat Myometrium. *Pak Vet J*, 30, 211-214.
- Babacan O, Akan M, İzgür M, 2011: Kedi ve köpeklerin ürogenital sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Vet Hekim Der Derg*, 82, 43-48.
- Bassessar V, Verma Y and Swamy M, 2013: Antibiogram of bacterial species isolated from canine pyometra. *Vet World*, 6, 546-549.
- Coggan JA, Melville PA, de Oliveira CM, Faustino M, Moreno AM, Benites NR, 2008: Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. *Braz J Microbiol*, 39, 477-83.
- Di Nucci A, Candura SM, Tagliani M, D'Agostino G, Spelta V, Fiori E, Ricotti P, Tonini M, 1998: Fluoroquinolone-induced motor changes in the guinea-pig isolated ileum. *Pharmacol Toxicol*, 83, 263-269.
- Elsayed M, Elkomy A and Aboubakr MH, 2011: Ceftriaxone Reduces Contractility of Isolated Uterine Smooth Muscles of Pregnant and Non-Pregnant Rat. *Research Journal of Pharmacology*, 5, 31-34.
- Gábor G, Siver L, Szenci O, 1999: Intravaginal prostaglandin F2 alpha for the treatment of metritis and pyometra in the bitch. *Acta Vet Hung*, 47, 103-108.
- Gogny A, Mallem Y, Destrumelle S, Thorin C, Desfontis JC, Gogny M, Fiéni F, 2010: In vitro comparison of myometrial contractility induced by aglepristone-oxytocin and aglepristone-PGF2alpha combinations at different stages of the estrus cycle in the bitch. *Theriogenology*, 74, 1531-1538.
- Huebschle OJ, Ayling RD, Godinho K, Lukhele O, Tjipura-Zaire G, Rowan TG, Nicholas RA, 2006: Danofloxacin (Advocin) reduces the spread of contagious bovine pleuropneumonia to healthy in-contact cattle. *Res Vet Sci*, 81, 304-309.
- Kumar A, Akhtar MH and Jayachandran C, 2005: Distribution studies of enrofloxacin and gentamicin in plasma and uterine fluid of healthy cows and cows suffering from endometritis following intravenous administration. *Indian j Anim Res*, 39, 102 - 106.
- Kustritz MVR, 2010: Clinical Canine and Feline Reproduction. 1st ed., Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
- Linde-Forsberg C, Eneroth A, 2004: Parturition. In "Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology", Ed; Simpson GM, England GCW, Harvey M, BSAVA, UK.
- Liu H, Zhu T, Ma Y, Qu S, 2003: Effect of erythromycin on contractile response of uterine smooth muscle strips in non-pregnant rats. *Pol J Pharmacol*, 55, 57-62.
- Martinez M, McDermott P, Walker R, 2006: Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J*, 172, 10-28.
- Phillippe M, 1994: Neomycin inhibition of hormone-stimulated smooth muscle contractions in myometrial tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 205, 245-250.
- Piccinno M, Rizzo A, Maselli MA, Derosa M, Sciorsci RL, 2014: Modulatory effect of three antibiotics on uterus bovine contractility in vitro and likely therapeutic approaches in reproduction. *Theriogenology*, 82, 1287-1295.
- Pretzer SD, 2008: Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*, 70, 359-63.
- Rizzo A, Trisolini C, Spedicato M, Mutinati M, Minoia G, Sciorsci RL, 2011: In vitro effects of L-arginine on spontaneous and homocysteine-induced contractility of pregnant canine uteri. *Theriogenology*, 76, 715-720.
- Shukla SP, 2012: Recent Advances in Canine Pyometra. *Indian Journal of Canine Practice*, 4, 25-29.
- Smith FO, 2006: Canine pyometra. *Theriogenology*, 66, 610-612.
- Thungrat K, Price SB, Carpenter DM, Boothe DM, 2015: Antimicrobial susceptibility patterns of clinical *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in the United States: January 2008 through January 2013. *Vet Microbiol*, 179, 287-295.
- Uçmak M, Tek Ç, Gündüz MC, Sabuncu A, Şenünver A, Bağcıgil FA, Bakirel T, 2012: Optimum timing for operation in bitches with pyometra related to endotoxemia. *Turk J Vet Anim Sci*, 36: 35-42.
- Verstegen J1, Dhaliwal G, Verstegen-Onclin K, 2008: Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70, 364-374.

**Bu çalışma "The 3rd International Vetistanbul Group Congress 2016" kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.

*Yazışma Adresi: Zahid PAKSOY
Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane Meslek
Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Gümüşhane, Türkiye.
e-mail: paksoyland@yahoo.com