

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZOLE SIÇAN MİYOMETRİYUMUNDA
METABOLİK İNHİBİSYON VE KASILABİLME:
HÜCRE İÇİ KALSİYUM HOMEOSTAZİSİNİN
ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinan SARAL

ELAZIĞ – 2005

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İZOLE SIÇAN MİYOMETRİYUMUNDA
METABOLİK İNHİBİSYON VE KASILABİLME:
HÜCRE İÇİ KALSİYUM HOMEOSTAZİSİNİN
ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinan SARAL

ELAZIĞ – 2005

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ahmet AYAR

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Prof.Dr.Gıyasettin BAYDAŞ

Doç.Dr. Ahmet AYAR

Yrd.Doç.Dr.Oğuz ÖZÇELİK

Yrd.Doç.Dr. Engin ŞAHNA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet AYAR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a Fizyoloji A.D öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ'a, Sayın Doç. Dr. Bayram YILMAZ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU'ya; Dr. Sinan CANPOLAT'a, Dr. Süleyman SANDAL'a; Araştırma görevlileri Mehmet AYDIN'a, Sema Tülay KÖZ'e, Nevsun PIHTILI'ya, M.Akif YAZAR'a, Fatih EROL'a; Fizyoloji bilim uzmanı Abdullah YAŞAR'a; Yüksek lisans öğrencileri Zafer ŞAHİN'e, Özgür BULMUŞ'a, Gökçen ÖZDEMİR'e; Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK'e, Öğretim görevlisi Mete ÖZCAN'a doktora öğrencileri İhsan SERHATLIOĞLU ve Tuğrul KUZGUN'a; Farmakoloji A.D öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Engin ŞAHNA'ya ve Farmakoloji bilim uzmanı Engin YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince manevi desteğini hissettiğim Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yunus SARAL'a ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet KALKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	3
3.GİRİŞ.....	5
3. 1. MİYOMETRİYAL KASILMALARDA ELEKTRİKSEL AKTİVİTE	6
3. 2. UYARILABİLME	7
3. 3. MİYOMETRİYAL KASILMADA İYON KANALLARININ ROLÜ	8
3. 4. GAP KAVŞAKLARI	11
3. 5. DÜZ KAS KASILMASININ DÜZENLENMESİ.....	11
3. 6. HÜCRE İÇİ Ca^{++} DEPOLARI ve Ca^{++} SALINIMI	13
3.7. HÜCRE İÇİ DEPOLARDAN Ca^{++} SALINIMI, IP_3 VE G PROTEİNLERİ.....	16
3.8. RİYANODİN VE KAFEİN DUYARLI RESEPTÖRLER.....	16
3.9. MİYOMETRİYAL AKTİVİTEYİ DÜZENLEYEN NÖRONAL VE HORMONAL FAKTÖRLER.....	17
3. 10. KAN AKIMI VE UTERİN KASILMASI.....	20
3. 11. HİPOKSİNİN DÜZ KAS KASILMASI ÜZERİNE ETKİLERİ.....	21
3. 12. DANTROLEN SODYUM (DANTROLEN-Na)	23
3.13. ETİLENGLİKOL TETRAASETİK ASİD (EGTA).....	24
3.14. 2,4-DİNİTROFENOL (DNF).....	24
3.15. POTASYUM SİYANİD (KCN).....	25
4.GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
4.1.İZOLE ORGAN BANYO SİSTEMİ	27
4.2.KULLANILAN SOLÜSYONLAR	28

4.3.MİYOMETRİYUM ŞERİTLERİNİN HAZIRLANMASI.....	29
4.4.DENEY PROSEDÜRÜ	30
4.5.KİMYASAL AJANLAR	34
4.6 VERİ ANALİZİ	34
5.BULGULAR.....	35
5.1. KCl İLE STANDARDİZE EDİLEN MİYOMETRİYUM KASILMALARINA DİNİTROFENOL'UN (DNF) ETKİSİ.....	35
5.2. KCl İLE STANDARDİZE EDİLEN MİYOMETRİYUM KASILMALARINA POTASYUM SİYANİD'İN (KCN) ETKİSİ	36
5.3. KCl STANDARDİZE EDİLEN, KREBS SOLÜSYONU İÇERİSİNDEKİ MİYOMETRİYUMA ETİLEN GLİKOL TETRA ASETİKASİT (EGTA) VE 2,4- DİNİTROFENOL'UN (DNF) ETKİLERİ	37
5.4. KCl İLE STANDARDİZE EDİLEN MİYOMETRİYUM KASILMALARINA ETİLEN GLİKOL TETRA ASETİK ASİT VE POTASYUM SİYANÜR'ÜN ETKİLERİ ...	41
5.5. KCl İLE STANDARDİZE EDİLEN MİYOMETRİYUM KASILMALARINA, DANTROLEN SODYUM VE 2-4 DİNİTROFENOL'UN ETKİLERİ.....	43
5.6. KCl İLE STANDARDİZE EDİLEN UTERUS MİYOMETRİYUMUNA, DANTROLEN SODYUM VE POTASYUM SİYANİD'İN ETKİLERİ.....	45
6.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
7.KAYNAKLAR.....	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İzole Kobay, rat ve kedi miyometriyum hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı muhtemel iyon konsantrasyonu.

Tablo 2: KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine uygulanan 0.8 mM 2,4-dinitrofenol etkisi.

Tablo 3: KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine uygulanan 0.3 mM KCN etkisi

Tablo 4: KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine uygulanan 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF'nin etkileri

Tablo 5: KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine uygulanan 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN'nin etkileri

Tablo 6: KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine uygulanan 10 µM dantrolen-Na ve 0.8 mM DNF'nin etkileri

Tablo 7: KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine uygulanan 10 µM dantrolen-Na ve 0.3 mM KCN'nin etkileri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Dantrolen sodyum'un kimyasal yapısı

Şekil 2: 2,4-dinitrofenol' un kimyasal yapısı

Şekil 3: İzole organ kayıt sistemi

Şekil 4: Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyuma 0.8 mM DNF'nin etkisi

Şekil 5: Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyuma 0.3 mM KCN'nin etkisi

Şekil 6: Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyuma 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF ilave edilerek gerçekleştirilen kayıt işlemi

Şekil 7: Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyuma 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN ilave edilerek gerçekleştirilen kayıt işlemi.

Şekil 8: Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyuma 10 μ M dantrolen-Na ve 0.8 mM DNF ilave edilerek gerçekleştirilen kayıt işlemi.

Şekil 9: Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyuma 10 μ M dantrolen-Na ve 0.3 mM KCN ilave edilerek gerçekleştirilen kayıt işlemi.

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
μM	: mikromolar
ATP	: Adenozin tri fosfat
Ca^{++}	: Kalsiyum
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
sAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
sGMP	: Siklik guanozin mono fosfat
KTKS	: Kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salınımı
Cl^-	: Klor iyonu
CO_2	: Karbon di oksit
KRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
Dantrolen-Na	: Dantrolen sodyum
DNF	: Dinitrofenol
EGTA	: Etilen glikol tetra asetik asit
FSH	: Folikül stimülan hormon
H^+	: Hidrojen iyonu
K^+	: Potasyum iyonu
Kca	: Kalsiyum bağımlı potasyum
$\text{I}_{\text{Cl-Ca}}$	: Kalsiyum bağımlı klor kanalları
KCl	: Potasyum klorür
KCN	: Potasyum siyanid
KDa	: kilo dalton
KHPO_4	: Potasyum fosfat
LH	: Lüteinizan hormon
mg	: miligram
Mg^+	: Magnezyum
MgCl_2	: Magnezyum klorür
MgSO_4	: Magnezyum sülfat
MHZ	: Miyozin hafif zincir
MHZF	: Miyozin hafif zincir fosfataz
MHZK	: Miyozin hafif zincir kinaz
ml	: mililitre
mM	: milimolar
mm-Hg	: milimetre civa
mV	: milivolt
Na^+	: Sodyum iyonu
NaHCO_3	: Sodyum bikarbonat
O_2	: Oksijen
Fcr	: Fosfokreatin
RyRs	: Riyanodin reseptörü

1.ÖZET

Bu çalışmada, izole sıçan miyometriyumunda metabolik inhibisyona (kimyasal hipoksi ile sağlanan) bağlı kontraktilite değişikliklerinde hücre içi kalsiyum homeostazisinin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

Servikal dislokasyondan sonra, virjin sprague dawley cinsi dişi sıçanlardan miyometriyum kesitleri alınarak içerisinde 37°C'de (pH 7.4) krebs solüsyonu bulunan ve % 95 O₂ - % 5 CO₂ ile sürekli gazlandırılan izole organ banyosuna asıldı. İstirahat gerimi uygulandıktan sonra kaslar 20 mM KCl ile standardize edildi. Düzenli kasılmaların görülmesinin ardından farklı gruplar halinde potasyum siyanür (KCN), dinitrofenol (DNF), dantrolen sodyum (Dantrolen-Na) ve etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) organ banyosuna uygulanarak izometrik kontraksiyonların frekans ve amplitütlerine olan etkileri 10 dakikalık periyotlar halinde değerlendirildi. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde sırasıyla ikili karşılaştırmalarda student-t testi, üçlü karşılaştırmalarda ise Kruskall-Wallis varyans analiz testi kullanıldı.

KCN (0.3 mM) ile DNF (0.8 mM)'nin kontrol kaydının ardından ortama ilave edilmesi ile kontraksiyonlarda hemen başlayan belirgin bir inhibisyon meydana geldi (n=8). 10 µM dantrolen sodyum hem KCN (0.3 mM, n=8) hem de DNF (0.8 mM, n=6)'nin inhibitör etkisini zayıflattı.

EGTA'nın 1 mM'lık konsantrasyonu ise hem KCN (0.3 mM, n=7) hem de DNF (0.8 mM, n=6) inhibitör etkisini çok düşük düzeyde azalttı. Dantrolen-Na ile EGTA'nın etkileri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında dantrolen-Na'nın oluşan inhibitör etkiyi EGTA'ya göre çok daha belirgin bir şekilde zayıflatığı görüldü.

Bu çalışmanın bulgularında, izole sıçan miyometriyumunda metabolik inhibisyona bağlı gelişen kontraktıl inhibisyonda, hücre içi Ca^{++} salınımındaki değişikliklerin rolü olduğu ve hücre içi depolardan Ca^{++} salınımının engellenmesi ile hücre içi serbest Ca^{++} 'nın bağlanması gibi uygulamaların Ca^{++} homeostazisini değiştirerek kasılmalardaki inhibitör etkinin, kısmen de olsa geri döndürülebildiği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Miyometriyum, metabolic stres, KCN, DNF, dantrolen-Na, EGTA.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the role of changes in intracellular calcium homeostasis metabolic stress (induced by chemical hypoxia) on contractility of myometrium. Myometrial strips were isolated from virgin Sprague Dawley rats after dislocation and suspended in on isolated tissue bath containing Krebs solution continuously bubbled with %95 O₂ and %5 CO₂ maintained at 37 C° de (pH 7.4). After manifestation of spontaneous contractions were equilibrated under resting tension dantrolene-Na, ethylene glycol tetra acetic acide (EGTA), dinitrophenole (DNP) and potassium cyanide (KCN) were applied to the tissue bath. The amplitude and frequency of contractions were evaluated by 10-min intervals. Student-t test was used for statically analysis of data. Adding either DNP (0.8 mM, n=8) or KCN (0.3 mM, n=8) to tissue bath caused a rapid inhibition in KCl induced myometrium contractions. Application of dantrolene-Na (10 µM) and EGTA (1 mM) caused a decrease in inhibitory effects of metabolic stress induced by KCN (0.3 mM, n=8) DNP (0.8 mM, n=6). However, statistical analysis clearly showed that dantrolene-Na has a markedly greater effect compared to EGTA on inhibitory effect of metabolic stress.

In conclusion, a result from this study indicates that Ca^{++} ion play a role, at least partially, on DNP and KCN induced inhibition of myometrial contractions of rat. However, this inhibition can be reversed by inhibition of Ca^{++} -release from intracellular stores and chelation of intracellular calcium.

Key words: myometrium, DNP, EGTA, KCN, Dantrolene-Na, metabolic stress.

3.GİRİŞ

İzole uterus dokusu 1900'lu yılların başından itibaren çeşitli kimyasal ajanların fizyolojik ve farmakolojik etkilerinin araştırılması ve klinik açıdan terapötik amaçla kullanılmalarına olanak sağlamak için çalışıla gelen bir dokudur. Bugün hala izole uterus dokusunun kendi fizyolojisinin anlaşılması ve ortaya konması noktasında birçok çalışma yürütölmektedir.

Düz kaslar vücutta iç organlara ait tek birimli ve çok birimli olmak üzere iki farklı yapıda bulunur. İç organlara ait düz kaslar kan damarları, mide, barsaklar, mesane, solunum yolları ve uterus gibi içi boş organlarda yer alırken çok birimli düz kaslar arasında bağlantı noktaları çok az gelişmiştir ve bu yapı gözün iris tabakası gibi bazı organlarda yer alır. İçi boş organların duvarlarında yer alan düz kas yapıları, organın anatomik yapısının temelini oluştururken, fizyolojik olarak fonksiyonel işlevlerini gerçekleştirir. Düz kas grubuna dahil olan uterus, sinirsel veya hormonal bir uyarı olmaksızın ritmik bir periyotta spontan olarak kasılabilir (88,22). Düz kaslar iskelet ve kalp kasından farklı karakteristik özelliklere sahiptir. Kalp ve iskelet kasında mevcut olan çizgili bantlar düz kaslarda mevcut değildir ve düz kaslar otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilirler. Düz kasların diğeri bir özelliğı de iskelet kaslarındaki gibi tek bir yöne doğru değil, dokunun presentasyonuna bakılmaksızın değişik yönlere

doğru kasılabilir olmasıdır. Bu özellik miyometriyumda doğum esnasında fetusun dışarı atılması için itici güç oluşturmaktadır (16).

Uterus histolojik olarak üç katmandan oluşur: *Tunika serosa* (perimetriyum), *tunika muskularis* (miyometriyum) ve *tunika mukosa* (endometriyum) dur. Miyometriyumun alt ve iç tabakasını oluşturan endometriyum çeşitli hormon, sitokin ve peptidlerce zengin salgılarıyla miyometriyumun kasılma işlevini düzenler (88).

3. 1. Miyometriyal kasılmalarda elektriksel aktivite

Miyometriyal membran potansiyelindeki değişiklikler, uterus aktivitesinin kontrolünde önemli role sahiptir. Miyojenik mekanizmaların temelini, miyometriyumdaki pacemaker hücrelerinin spontan depolarizasyonu oluşturur. Kardiyak kastan farklı olarak miyometriyumdaki pacemaker hücreleri anatomik olarak stabil olmayıp yerleri tam olarak belirlenememiştir. Coleman ve ark. Uterustaki pacemaker aktivitenin altında yatan iyonik olaylar ve mekanizmaların tam olarak anlaşılması noktasında yoğun çalışmalar gerçekleştirmişlerdir (57,43). Membranda meydana gelen sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+)'a karşı geçirgenlik aksiyon potansiyelinden önce gerçekleşen membran potansiyelindeki yavaş depolarizasyon sonucu meydana gelir.

Elektriksel aktivite ve pacemaker aktivitesindeki değişiklik uterusun gebelik durumu ya da farklı canlılardaki uterus türlerinde

değişiklik gösterir. Fare longitudinal kaslarında gebeliğin ilk yarısında -55 mV den -46 mV'a değişen dereceli bir depolarizasyon vardır. Sirküler kas yapılarında ise, bu değerler doğuma kadar küçük değişikliklerle devam ederek hemen hemen -45 mV seviyelerindeki bir değer ile depolarizasyon gösterirler (55). İnsan miyometriyumunda dinlenme membran potansiyeli -45 ile -50 mV arasında değişir (34)

3. 2. Uyarılabilme

Miyometriyumda uyarılabilirlik, aksiyon potansiyeli ve membran potansiyeli ile ilgilidir. Uterus düz kasları herhangi bir sinirsel uyarı olmaksızın sadece gerilme ile kasılabilir. Uterus düz kas hücrelerindeki membran potansiyeli stabil değildir. Pacemaker olarak adlandırılan bazı hücrelerde spontan bir membran depolarizasyonu meydana gelir. Sıçan miyometriyumunda Ca^{++} kanallarında gebelik boyunca bir artış olduğu ve uyarılabilirliğe karşı duyarlılıkta da yükselme söz konusudur (86,55).

Aksiyon potansiyelini hücre içerisine giren Ca^{++} tetikler ve depolarizasyon meydana gelir, ardından Ca^{++} kanallarının inaktivasyonu ve K^{+} 'un hücre dışına çıkması membranda repolarizasyonu sağlar (40). Sonuçta, uyarılabilmenin ve kasılmanın başlıca tetikleyicisi Ca^{++} kanalları yoluyla hücre içerisine Ca^{++} 'nın artışıdır. Miyometriyumda K^{+} iyon kanal aktivitesinde de değişiklik söz konusu olup uyarılabilmeyle birlikte voltaj bağımlı K^{+} kanallarında artış olduğu görülür (12). Aksiyon potansiyeli

sayısındaki artış ile gebe insan miyometriyumunun son trimestrisi esnasında negatif membran potansiyelinde (-70 mV ile -55 mV) bir azalma ile birlikte spontan kasılmanın sıklığında kademeli olarak bir artış meydana gelir.

Membran yüzeyinde bulunan kanallardan geçen akımların membranı depolarize ettiği bilinmektedir. Pacemaker hücrelerinin fonksiyonel rolünün tam olarak anlaşılması, uterusun yanında portal ven ve üretra gibi diğer düz kas yapılarındaki uyarılabilirliğin de anlaşılmasına katkıda bulunabilir (67).

3. 3. Miyometrial kasılda iyon kanallarının rolü

Uterustaki kasılmaların gebelik ve doğum esnasında kontrol edilmesi ve düzenlenmesi önemlidir. İyon kanal aktivitesinin membran yüzeyinde potansiyel değişiklikler meydana getirdiği bilinmektedir (58). Gebe uterus gebelik boyunca şekil, pozisyon ve hacim olarak değişikliğe uğrar. Bu esnada miyometriyumdaki iyon konsantrasyonunda değişiklikler meydana gelir. Yapılan çalışmalarda kobay, sıçan ve kedi izole miyometriyal hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı iyon konsantrasyonları ölçülmeye çalışmıştır. Yapılan ölçümler sonrasında muhtemel hücre içi ve hücre dışı ortalama iyon konsantrasyonları tabloda ifade edilmiştir.

	Hücre dışı	Hücre içi	Hücre dışı Hücre içi
Na ⁺	137 mmol/L	40 mmol/L	3.4
Ca ⁺²	1.5 mmol/L	0.13 µmol/L	10 ⁴
K ⁺	6 mmol/L	169 mmol/L	0.03
Cl ⁻	134 mmol/L	65 mmol/L	2.1

Tablo 1. Kobay, rat ve kedi izole miyometriyum hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı muhtemel iyon konsantrasyonu (4).

Aksiyon potansiyeli esnasındaki Ca⁺⁺ girişi, voltaj kapılı kanallar vasıtasıyla gerçekleşir. Voltaj kapılı Ca⁺⁺ kanalları spontan pacemaker aktiviteyle yada hormonal ve nöronal uyarı ile açılır. Dolayısıyla voltaj kapılı Ca⁺⁺ kanalları, uterus kasılması için gerekli olan güç üretiminde kritik rol oynar. Kontraktil aktivite yüksek derecede hücre dışı Ca⁺⁺ konsantrasyonuna bağlıdır. Aksiyon potansiyelindeki ateşlemenin ardından L-tipi voltaj duyarlı Ca⁺⁺ kanallarının açılmasıyla depolarizasyon meydana gelir. Ca⁺⁺ kanal blokörleri selektif olarak miyometriyum kasılmalarını inhibe eder (43). Son yıllarda içe doğru Ca⁺⁺ akımları insan miyometriyumunda gösterilmiştir (84).

Ca^{++} kanal inaktivasyonu hem Ca^{++} konsantrasyonuna hem de membran potansiyeline bağlıdır. Yapılan çalışmalar kanal inaktivasyonlarının L-tipi Ca^{++} kanalları aracılığıyla daha belirgin olarak gerçekleştiğini göstermiştir (31). Gebe uterus; voltaj kapılı, Ca^{++} duyarlı ve ATP'ye duyarlı kanallarında dahil olduğu çeşitli K^+ kanallarına sahiptir (42). Uterusta bu iyon konsantrasyonu ve dağılımı gebe ve gebe olmayan dönemlere göre farklılık gösterir. Uterus kontraktilesinin kontrolü için K^+ kanallarının aktivitesi büyük önem taşır. Miyometriyal kasılmanın bütünü değerlendirildiğinde gevşeme periyodunun artmış K^+ iletkenliği ve K^+ kanal aktivitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Song ve ark. hormonal şartlara bağımlı miyometriyal hücrelerde üç farklı K^+ kanal alt tipi belirlemişlerdir (42).

Düz kaslarda kalsiyum bağımlı Cl^- kanallarının ($\text{I}_{\text{Cl-Ca}}$) protein yapıda 4 izoformu tespit edilmiştir. $\text{I}_{\text{Cl-Ca}}$ kanallarının düz kas hücrelerinde spontan kontraktıl aktivitedeki elektiriksel olayların ve pacemaker aktivitenin düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (67). $\text{I}_{\text{Cl-Ca}}$ kanallarının uterus kasılmalarındaki rolü çok az bilinmekle beraber bu kanallar ile ilgili insan miyometriyum hücrelerinde henüz bir çalışma gerçekleştirilmemiştir (38). Na^+ kanallarının da uterus kontraksiyonlarına katkıda bulunduğu dair deliller vardır (62).

3. 4. Gap kavşakları

Uterustaki pacemaker hücrelerinin bulunduğu bölgeleri tetikleyen aksiyon potansiyelleri, tüm dokuların kasılmasına aracılık etmek için uterusu boylu boyunca yayılabilmelidir. Uterustaki gap kavşaklarının bu oluşuma imkan veren miyometriyal hücreler arasında düşük rezistanslı yollar olduğu düşünülür. Gap kavşakları membran proteinlerinden oluşmuştur ve gebeliğin son dönemlerinde sayılarında artış olduğu tespit edilmiştir (11). Miyometriyumdaki hücreler arası iletişimin hızlı artışın nedeni tam olarak ortaya konamamakla birlikte hidrojenin (H^+) ve Ca^{++} 'nın gap kavşaklarının iletkenliğini değiştirebildikleri düşünülmektedir (68).

3. 5. Düz kas kasılmasının düzenlenmesi

Düz kaslarda kontraktıl aktivite iki ana başlıkta incelenebilir; İlk olarak fazik kontraksiyonlar ki orada kasılma ve gevşeme siklusu meydana gelir. İkincisi ise tonik kasılmalardır onlarda da var olan kontraktıl gücün düzeyi korunur. Fazik kasılmalar hücre membranındaki elektriksel uyarılabilirliğe bağlıdır. Uyarı aksiyon potansiyelinin üretimine neden olur. Oluşan potansiyel gap kavşaklar yoluyla diğer hücrelere yayılır. Depolarize olan hücreler agonistlerin varlığında IP_3 'ün indüklediği SR'den Ca^{++} salınımına neden olur ve L-tipi kalsiyum kanalları yoluyla Ca^{++} girişi ile sonlanır (73,16,)

Tonik düz kaslarda spontan aksiyon potansiyeli üretimi ve nörohormonal agonistlerle Ca^{++} 'nın girişi sonrasında güçte bir artış gözlenmez. Elektriksel aktivite, $[Ca^{++}]_i$ ve güç arasındaki ilişki düz kaslarda tam olarak ortaya konamamıştır ancak bu üç parametrenin ölçümleri son yıllarda yapılabilmektedir (8). $[Ca^{++}]_i$ 'nin yükselmesi, kalmodulin ile miyozin hafif zincir kinaz'ında aktive olmasına neden olur.

Miyometriyumda yer alan miyozin hafif zincir kinazın diğer düz kaslardaki miyozin hafif zincir kinazın ile benzer olduğu gösterilmiştir (3). İn vitro miyozin hafif zincir kinaz; sAMP, sGMP bağımlı kinazlar, kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz II ve protein kinaz C'nde dahil olduğu birkaç protein kinazla fosforsuzlaştırılır (72). Hem sAMP bağımlı protein kinaz hemde Ca^{++} -kalmodulin bağımlı protein kinaz II' nin fosforilasyonu in vitro miyozin hafif zincir kinazın yarı aktivasyonu için gereken Ca^{++} -Kalmodulin kompleksinde bir artışa yol açar (82,60).

Miyozin hafif zincir kinazın artışı miyozin hafif zincirlerini (MHZ) fosforiller ve daha sonra aktin, çapraz köprü oluşumunu sağlamak için miyozin ATPaz'ı aktive eder. Miyozin hafif zincir'in fosforilasyonu kasılmanın başlamasının en önemli belirleyicilerdendir. Kasılma periyodu esnasında MHZ'nin fosforilasyon düzeyi sıklıkla azalır ve güç, yavaş bir şekilde aktin ve miyozin' in oluşturduğu çapraz köprü ile korunur. Spontan kasılmalarda myozinin siklik fosforilasyonu ve defosforilasyonun

olduğu gösterilmiştir (36). Csabina ve ark. yaptıkları bir çalışmada karbakol veya oksitosin ile ortaya çıkan kontraktıl aktivitenin başlangıç fazının hafif zincir fosforilasyonu ile ilişkili olduğu göstermişlerdir (15).

Kasılmanın sonunda $[Ca^{++}]_i$ seviyesindeki değişiklik; Na^+-Ca^{++} değiştiricisinin iştiraki ile olur. Hücre içi kalsiyum Ca-ATPaz yoluyla, SR ve mitokondri gibi hücre içi organellerin rolleri ile primer olarak azalır. $[Ca^{++}]_i$ 'nin azalması MHZF'nin etkinliğini arttırır Böylece MHZF 20 kilo daltonluk (kDa) miyozin hafif zincirlerinin (MHZ) defosforilasyonunu gerçekleştirir. Defosforile olan miyozin başları Ca^{++} iyon konsantrasyonu azalmış olmasına rağmen bir süre daha aktine bağlı kalabilirler. Böylece az enerji harcanmasına karşılık kasılmanın daha uzun süre muhafazası mümkün olabilir (24,74).

3. 6. Hücre içi Ca^{++} depoları ve Ca^{++} salınımı

Hücre içi Ca^{++} depolarındaki bazal Ca^{++} seviyesi, miyometriyal kasılabilirliğin oluşabilmesi yönünden büyük önem arz eder. İstirahat durumunda stoplazmadaki serbest kalsiyum derişimi yaklaşık 100 nmol/L düzeyinde tutulur. Stoplazma dışındaki kalsiyum seviyesi içeriden yaklaşık 12000 kat daha fazladır (24). Dolayısıyla içe yönelik elektriksel ve derişimsel bir farklanma bulunur. Eğer uterus Ca^{++} olmadığı bir çözeltiye konulursa spontan aktivite zamanla kaybolur. Bu esnada uterus agonistlerin çözeltiye eklenmesi Ca^{++} ve kasılma gücünde küçük ve geçici

bir artış meydana getirir (47). Bu geçici artış hücre içi Ca^{++} deposu olan sarkoplazmik retikulumdan Ca^{++} salınımının gerçekleştiğinin de bir göstergesidir. SR'den Ca^{++} salınımı uterus düz kasının uyarılmasında en önemli mekanizmalardan biridir (70).

Ca^{++} , inositol tri fosfat (IP_3) tarafından veya kendi kendine salınabilir (kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesi). Agonist G-protein kenetli reseptöre bağlandığında ve fosfatidil inositol'un hidrolizini uyardığında IP_3 düzeyi artar. İnternal Ca^{++} deposu olan SR'nin kapasitesi ve rolünün yetişkin miyometriyumunda daha büyük olduğu düşünülmektedir. Ayrıca SR' deki Ca^{++} seviyesinin ölçümü son yıllarda gerçekleştirilmiştir. (53).

Hücre dışı Ca^{++} girişinin yokluğunda agonistlerin uygulanması sitozolik Ca^{++} 'yı arttırırken luminal Ca^{++} 'yı azaltır. Miyometriyum dokusunda IP_3 standardize edilen Ca^{++} salınımı üzerinde kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salınımı (KTKS)'nin etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur (51).

Miyometriyumun IP_3 'e duyarlılığı, diğer düz kas birimine dahil olan vasküler düz kaslardan daha azdır (39). Hücre içi potansiyel Ca^{++} kaynaklarından bir diğeri sarkolemmaya bağlı Ca^{++} dır. Membrana bağlı Ca^{++} kasılma için gerekli $[Ca^{++}]_i$ artışına katkıda bulunabilir. Grover ve ark.

plazma membranı üzerinde intracelular Ca^{++} bağlanma yerlerinin yüksek affinite ile pH'ya bağımlı olduğunu göstermişlerdir (28).

Hücre dışı Ca^{++} sarkolemmaya; 1) Ca^{++} nın hücre içersine pasif sızması yoluyla, 2) Voltaj duyarlı Ca^{++} kanalları yoluyla, 3) Reseptör duyarlı kalsiyum kanalları gibi çeşitli yollarla girebilir. Son iki veri farmakokinetik bağlanma açısından önem arz edip uterustaki kasılmanın sürdürülebilmesi açısından önemlidir (9). Ca^{++} stoplazmadan sarkolemmal Ca-ATPaz pompasıyla uzaklaştırılabilir. Ca-ATPaz pompası, yaklaşık 130.000 ile 150.000 molekül ağırlığına sahip polipeptid yapıdaki enzimlerdir. Mitokondri düz kaslarda yüksek kapasiteli düşük affineteli Ca^{++} depolama yeridir. Mitokondrial fonksiyonları etkileyen birkaç çeşit ajan Ca^{++} salınımını değiştirebilir. Ca^{++} salınımı kısmen mitokondrial uptake mekanizmalarıyla düzenlenmektedir.

Düz kas, kalp kası ve yavaş iskelet kasındaki SR Ca-ATPaz aktivitesi çok benzerdir (90). Miyometriyum normal aktivasyon formunda iken hücreden Ca^{++} u uzaklaştıran bir Na^{+} - Ca^{++} değiştiricisine sahiptir. Bu Na^{+} - Ca^{++} kompleksinin vasküler düz kas yapılarında fizyolojik şartlarda katkılarının küçük olduğu bilinmektedir. Eggermont ve ark. yapmış olduğu çalışmada sığır pulmoner arterlerinin plazma membranındaki SR'de Ca-ATPaz aktivitesinin Na^{+} - Ca^{++} mekanizmasından daha aktif rol oynadığını göstermişlerdir (21).

3.7. Hücre içi depolardan Ca^{++} salınımı, IP_3 ve G proteinleri

Uterin düz kas kasılması primer olarak ekstraselüler Ca^{++} varlığına bağlı olduğundan reseptör aktiviteli kanallar yoluyla hücreye Ca^{++} girişi gerçekleşir, sonrasında voltaj bağımlı kanallardan hücre içerisine giren Ca^{++} kasılma için gerekli olan $[Ca^{++}]_i$ seviyesini attırır (88,23,45). Hücre içi depolardan Ca^{++} salınımının önemi IP_3 'ü uyarmasıdır. Agonist reseptöre bağlandıktan sonra G proteinine bağlanır bu kompleks fosfoinositidaz C'yi IP_3 ve diaçilgliserole hidrolize eder. IP_3 sarkoplazmik retikulumdan Ca^{++} salınımına neden olur. G proteinlerinin gebeliğin ilerleyen dönemlerinde fonksiyonel aktivitesinde değişikliklerin olduğu ve kobay miyometriyum kasında gebeliğin son dönemlerinde hem G proteini hemde fosfoinositid hidrolizi arasındaki bağlanmada belirgin bir baskılanma olduğu rapor edilmiştir (45).

3.8. Riyanodin ve kafein duyarlı reseptörler

Riyanodin reseptörleri (RYRs) hızlı ve düzenli Ca^{++} salınımı için özelleşmiş intraselüler Ca^{++} kanallarıdır ve çizgili kasta eksitasyon-kontraksiyon bağlanması için gereklidir (23). Memeli dokularında üç farklı RYR izoformu tanımlanmıştır. RYR1 iskelet kasında, RYR2 kalp kasında ve RYR3 izoformu da beyin'in de dahil olduğu diğer dokularda düşük düzeylerde üretilir. RYR kanalları, intraselüler depolardan Ca^{++} salınımı ile kontrol edilen çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik hücre

süreçlerinde kritik rol oynarlar ve hücre düzenlenmesi için potansiyel farmakolojik hedefleri temsil ederler (50). Tavşan ince barsak ve mide düz kas hücrelerinde yapılan çalışmalar RYR duyarlı depoların Ca^{++} salınımını ana kaynağı olduğu göstermiştir (6,45).

Kafein ve rıyanodin kolon sirküler düz kaslarında Ca^{++} homeostazisini değiştirir. Bu bulgu kolon düz kas yapısında rıyanodin duyarlı intraselüler Ca^{++} duyarlı havuzların varlığını gösterir (65). Çizgili kaslardaki SR'de kafeine duyarlı kanallar vardır ve bunlar portal ven ve kolon gibi bazı düz kaslarda gösterilmiştir. Kafein etkisini hücre içi Ca^{++} deposu olan SR'yi etkileyerek meydana getirir.

Serbest Ca^{++} solüsyonunun kafein ile indüklenmesi sadece $[Ca^{++}]_i$ 'de geçici bir artış meydana getirir. Kafein gebe rat uterusunda dahili depolardan Ca^{++} salınımını tetikleyemez dolayısıyla kasılma meydana gelmez (66). Mide düz kas hücrelerinde kafein hem $[Ca^{++}]_i$ 'yi hemde nonselektif katyonları aktive eder (29).

3.9. Miyometriyal aktiviteyi düzenleyen nöronal ve hormonal faktörler

Miyometriyal aktivitenin kontrolü birçok nöronal ve hormonal faktör tarafından düzenlenmektedir. Yıllardan beri uterusun otonom innervasyonu bilinmesine rağmen nöronal kontrol mekanizmalarının anlaşılması hormonal kontrol mekanizmalara oranla daha zayıf kalmıştır.

Postganklionik lifler uterin duvarı damar yapıları boyunca devam ederek miyometriyum ve endometriyumunu innerve eder.

Uterusta dört tip adrenerjik reseptör bulunur (α_1 , β_1 , α_2 , β_2). Uterusta α_1 reseptörleri kasılmaları, β_2 reseptörleri'de gevşemeyi sağlar. Reseptörlerin sayısı hormonal düzeye bağlı olarak değişebilir. Parasempatik innervasyonun miyometriyumdaki motor aktivitenin düzenlenmesindeki rolünün düşük olduğu bilinmektedir. Muskarinik stimülasyon IP_3 'ü ve Ca^{++} 'nın konsantrasyonunu arttırarak stimülasyon sağlar. Buradaki kasılma için hücre dışından kalsiyum girişine ihtiyaç duyulur. Kasılmaların ve doğumun sinirsel aktivite olmadan da gerçekleşebileceği kanıtlanmıştır (10).

Uterustaki hormonal denge kasılmaların kontrolü ve düzenlenmesi için büyük önem taşır. Miyometriyum aktivitesinin kontrolü başta steroid yapıdaki östrojen ve progesteron olmak üzere birçok hormon tarafından düzenlenir. Progesteron gebelik boyunca uterusta voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarının oluşmasını engelleyerek hücreye aşırı Ca^{++} girişini önler (22).

Östrojen kasılma proteinlerinin ve uterus kasılması için zorunlu olan regülatör enzimlerin sentezi için gereklidir. Östrojen miyometriyumdaki hücreler arası iletişimi sağlayan gap kavşakların yapımını arttırırken α adrenerjik ajanların reseptör düzeylerinde artışa yol açması ile Ca^{++} kanallarının membranda düzenlenmesini de sağlar (59).

Prostoglandinler ve östrojenlerin yanı sıra oksitosin miyometriyum kasılmalarının frekans, şiddet ve sürelerinde artışa neden olur. Oksitosin, kalsiyum içermeyen in vitro izole uterus dokusunda amplitüdü düşük olmasına rağmen uzun süre kasılmaya neden olur (49). Kortikotropin salgılatıcı hormon (KRH) gebelik sürecinde sAMP'nin oluşumunu uyarak kasılmaların düzenlenmesine katkıda bulunur (26). Relaksin, miyometriyum hücrelerinde sAMP sentezini uyarak gevşemeye neden olur. Folikül stimulan hormon (FSH) sAMP aktivitesi üzerinden uterusun gevşemesine neden olduğu bilinmektedir.

Pineal bezden salgılanan melatonin hormonu gebe veya gebe olmayan ratların miyometriyumlarında spontan veya oksitosin ile standardize edilen kasılmaları inhibe eder (1). Progesteron in vitro miyometriyum kasılmasını azaltır ve miyometriyal gap kavşaklarının oluşumunu inhibe eder. Progesteron gebelik sürecinde kalsiyum kanal aktivitesinde azalma meydana getirir (25). Endotelin ve Lüteinizan hormon (LH) gibi birçok hormon miyometriyal kasılmaların düzenlenmesinde rol oynar.

3. 10. Kan akımı ve uterin kasılması

Doğum esnasında insan uterusundaki kasılmalar güçlüdür. 100 mmHg'lık intra uterin basınç genellikle değişkendir. Kasılma esnasındaki gücün uterusu besleyen kan damarları üzerindeki basıncı arttıracak ve

bu damarları tıkayabileceği açıktır. Koyunlarda yapılan deneysel çalışmalar, kasılma esnasında uterusu perfüze eden kan damarlarındaki kan akım hızının azaldığı sonucunu ortaya koymuştur (76). Kan akım hızının azalmasıyla birlikte dokuların oksijene olan ihtiyacı artar. Dokuların belirli bir süre O₂'den yoksun kalması güçte de bir azalma meydana getirir. Oksijen (O₂) desteğinin ya da pH'da ki değişikliklerin uterusu meydana gelen güç üretiminin oluşumunda fonksiyonel olarak rol aldığı bilinmektedir. Uterus damarları oluşan hipoksiyi takiben ya da hipoksi esnasında gevşemez (47).

Uterusun da dahil olduğu düz kaslarda çizgili kaslardan daha düşük oranda fosfokreatin [Fcr] ve [ATP] olduğu bulunmuştur (46). Uterustaki [ATP] ve [Fcr] konsantrasyonları sırasıyla 1.8 ve 3 mM çizgili kaslarda ise 7 ile 25 mM' dır. [Fcr] ve [ATP] uterusu gebelik esnasında artar, doğumdan sonra azalır. Uterusta [ATP] üretimi ağırlıklı olarak oksidatif fosforilasyonla olur, bu yollar bloklandığında [ATP] seviyesi azalır (89).

3. 11. Hipoksinin Düz Kas Kasılması Üzerine Olan Etkileri

Hipoksinin düz kaslarda ateroskleroz, vasospazm, serebral kanama ve uterus patolojilerinin'de dahil olduğu bazı disfonksiyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Her bir düz kas ünitesi hipoksiye farklı duyarlılıkta cevap verir. Düz kaslar diğer kas tiplerine göre hipoksiden daha az

etkilenmelerine rağmen hipoksi sonucunda düz kaslarda kasılma mekanizmasının değiştiği bilinmektedir (79). Deney hayvanlarından elde edilen izole sıçan miyometriyumunda yapılan hipoksi çalışmalarında, hipoksinin Ca^{++} 'nın hücre içi seviyesinde değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (87). Geçici olarak Ca^{++} seviyesindeki düşme kasılma için gerekli olan gücünde azalmasına neden olur, azalan güç kasılmanın amplitüd ve süresinde bir düşüş ile sonuçlanır. Düz kaslarda yaklaşık olarak -45 mV olan istirahat membran potansiyeli K^+ , Ca^{++} ve Cl^- kanal aktivitesinin dengesine bağlıdır ki bu hipoksi esnasında değişebilir.

Düz kas kontraksiyonunun düzenlenmesi için gerekli olan K^+ , ATP, O_2 , ve Ca^{++} 'nın hipoksi esnasında modülatör etkilerinde fonksiyonel değişikliklerin olduğu ortaya konulmuştur (30). Fizyolojik olarak uterus $[pH_i]$ 'sındaki değişiklikler uterus aktivitesindeki artışa, hipoksiye, solunum eforuna ve asit-baz dengesizliğine bağlı olabilir. Uterin $[pH_i]$ ölçümleri ilk kez Dawson ve Wray tarafından yapılmıştır (17). Doğum sonrasında uterus pH'sında azalma meydana gelir. Bu azalma doğumda uterin aktivitesinden çok endokrin değişikliklere bağlı olarak oluşur. pH'nın azalması gebe ve gebe olmayan rat uterusunda spontan kasılmaları baskılar (80).

Hipoksi ile birlikte SR'dan Ca^{++} salınımı azalmaktadır. Bu esnada Ca^{++} hücre içine akışında bir azalma meydana gelir, hipoksinin diğer düz

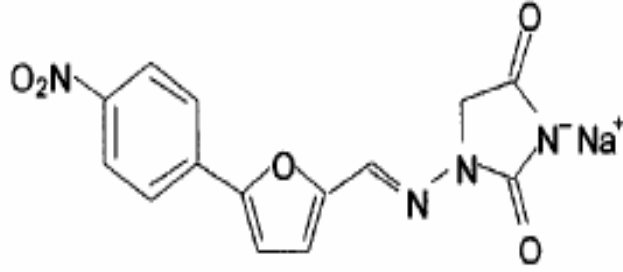
kaslarda L-tipi kalsiyum kanal akımını inhibe ettiği rapor edilmiştir (64). Hipoksi esnasında [ATP] ve pH'nın azalmasında, Mg^{+} yükselmesi, $[P_i]$ 'nin artışı ve değişmiş hücre içi redoks halinde meydana gelen farklılıkların rolü olduğu düşünülmektedir (35).

Uterus düz kaslarının oksidatif fosforilasyonun siyanür (KCN) ya da dinitrofenol (DNF) ile inhibe edilmesi, hücre içi pH, ATP ve fosfokreatin (Fcr) seviyelerinde belirgin bir azalma şekillendirirken, inorganik fosfat (P_i) seviyesinde artışla sonuçlanır (85). Çalışmalar, ATP, fosfokreatin ve inorganik fosfat seviyesindeki değişikliklerin uterus kontraktilitesi üzerindeki etkilerinin küçük miktarlarda olduğunu göstermiştir (14).

KCN ile oluşturulan metabolik inhibisyon sonucu meydana gelen anoksik durum uterus kontraksiyonlarını inhibe etmektedir. Sonuçta KCN'nin yada diğer hipoksi meydana getiren metabolik inhibitör ajanların uterus miyometriyumundaki kasılmaları baskılayabileceği açıktır. Miyometriyumda herhangi bir kimyasal ajana bağlı olmaksızın doğum esnasında meydana gelebilecek bir uterus torsiyonu beraberinde uterusu besleyecek damarların perfüzyon yapısının da bozulmasını getirir. Bu esnada hipoksi durumu meydana gelir. Dolayısıyla hipoksi ile kasılmalar arasındaki bu fonksiyonel etkileşim klinik yönden de büyük önem taşır.

3. 12 Dantrolen sodyum

Dantrolen, çizgili kasları kas düzeyindeki primer etkisiyle gevşeten *hidantoin* türevi bir kimyasaldır. Kas gevşetici etkisinin mekanizması ve etki yeri bakımından santral etkili kas gevşeticilerden ve nöromüsküler bloke edicilerden ayrılır. Kendine özgü bir spazmolitik etkisi vardır. Kimyasal yapısı aşağıda gösterilmiştir.



dantrolen sodyum

Şekil 1 Dantrolen sodyum'un kimyasal yapısı

Transvers tübül (T-tübül) membranına yayılan depolarizasyonun sarkoplazmik retikulumu etkilemesi ile (transvers tübül- sarkoplazmik retikulum kenetini) SR' dan Ca^{++} salınımını inhibe olur (41). Düz kaslarda dantrolen-Na çalışmaları kobay ileumu ve vas deferens'inde in vitro olarak yapılmıştır. Dantrolen dönüşümsüz olarak ileumda; KCl, histamin, asetil kolin ve elektriksel uyarıya olan gerilme cevaplarını azaltır (27). Bu

etki söz konusu kenetteki ryanodin reseptörlerinin (RyR-1) aktive edilmesini engellemesine bağlıdır. Kas son plağına ve kas hücre membranının diğer bölgelerine etkisi yoktur; membran depolarizasyonunu bozmaz, normal kontraktıl yanıt aktivatör Ca^{++} 'nın sarkomerin SR'sindeki depolardan salınmasını kapsar.

3.13. Etilenglikol tetraasetik asid (EGTA)

Etilenglikol tetraasetik asid (EGTA) şelatör bir moleküldür. EGTA +2 değerlikli katyonlarla şelasyon yaparak katyonları bağlar. Takaaki ve ark. yaptıkları çalışmalarda EGTA'nın düz kaslarda Ca^{++} 'nın indüklediğı kasılmaları inhibe ettiğı (Ca^{++} tetiklemeli Ca^{++} salıverilmesi), Ca^{++} 'dan bağımsız kasılmaları inhibe etmediğini göstermişlerdir. EGTA'nın hücre içi Ca^{++} 'yı bağladığı ve Ca^{++} 'nın etkisini önlediğı rapor edilmiştir (44).

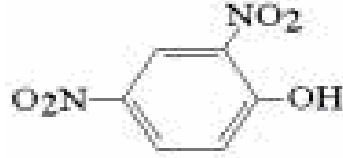
3.14. 2,4-dinitrofenol (DNF)

2,4-dinitrofenol kenet çözücü olarak en sık kullanılan kimyasal bileşiktir. Etki mekanizmasında, solunum zincirindeki oksidasyonu fosforlamadan zar üzerinden hidrojen sızmasına izin vererek elektrokimyasal proton gradyentinin çökmesine neden olur (63).

DNF dokularda metabolizma hızını arttırır. Hipoksi esnasında sirkulatör etki ve solunum zincirindeki değişiklikler belirgin olarak artar. DNF hücre içerisinde ATP sentezini doza bağılı olarak inhibe eden bir

maddedir ve elektron transfer zincirinde fosforilasyonu inhibe ederken elektron taşınmasını artırır.

Sonuçta, ATP/ADP oranı azalır. DNF'nin varlığında elektron transferi devam eder ancak ATP sentezlenemez bu nedenle oksidasyon devam eder fakat oksidatif fosforilasyon mekanizmasının inhibe olduğu görülür. 2,4- dinitrofenol'un kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir.



2,4-dinitrofenol

Şekil 2. 2,4-dinitrofenol'un kimyasal yapısı

3.15. Potasyum siyanid (KCN)

Dokular için son derece toksik bir maddedir. KCN dokularda enzimatik aktiviteleri değiştirerek oksidatif fosforilasyon mekanizmasını bozmaktadır. Dokularda metabolik inhibisyonun sonucu hipoksi tablosu meydana getirerek dokuların oksijenizasyonuna engel olur. KCN solunum

zincirinde yer alan sitokrom oksidaz enzimini *sitokrom b* ve *sitokrom c* arasında inhibe eder. Sitokrom oksidaz oksidatif fosforilasyonun son basamağını katalize eden bir enzimdir. Bu enzim oksijeni indirgeyerek ATP üretimini arttırır (37). Mitokondrial bir enzim olan sitokrom oksidazın siyanür tarafından inhibe edilmesi ATP düzeyinde azalma meydana getirir. (18)

KCN hücre içerisinde aneorobik metabolizmanın etkisiyle ATP/ADP oranında azalmaya neden olur, bu azalma sonuçta Ca^{++} homeostazisi gibi enerji bağımlı süreçleri değiştirir. Nörotransmitter salınımındaki değişiklikler ile birlikte Ca^{++} regülasyonunun bozulması, elektriksel aktiviteyi değiştirebilir (56).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1.İzole organ banyo sistemi

Bu sistem, uterustan hazırlanan şeritlerin yerleştirildiği hazne, Krebs çözeltisi bulunan depo, depo ve hazneler arasında Krebs çözeltisinin akmasını ve boşaltılmasını sağlayan iletim hortumlarıyla, izometrik güç dönüştürücüden oluşmaktadır (Çalışkan Cam Teknik, Ankara (şekil 1)).

Bu sistemin çift çeperli yapısı gereği termostatlı dolaşım pompasından sağlanan 37°C'deki distile suyla dışarıdan ısıtılmaktadır. İzole organ banyosu içerisinde yer alan Krebs solüsyonu %95 O₂ ve %5 CO₂ oranındaki gaz konsantrasyonu ile sürekli olarak gazlandırıldı.

İzometrik güç dönüştürücüsü (MAY IOBS 99 Ankara, Türkiye), Miyometriyum şeridinde meydana gelen kasılma ile oluşan gücü biyoelektriksel potansiyellere dönüştürmektedir. Elde edilen elektriksel potansiyeller de amplifikatöre aktararak amplifiye edilmekte ve analog /dijital dönüştürücü ara birim sayesinde bilgisayar ortamına aktararak kayıt elde edilmektedir. Elde edilen değerler Biopac 10.0 veri analizi ile bilgisayar ortamında kayıt edilmektedir. Bahsedilen kayıt düzeneği aşağıdaki resimde gösterilmiştir.



Şekil 3. İzole organ kayıt sistemi

4.2.Kullanılan solüsyonlar

Çalışmada uygun şartlarda hazırlanan Krebs solüsyonu kullanıldı. Kullanılan Krebs solüsyonunun formülasyonu (mM/L); NaCl 120, MgSO₄ 1.2, KCl 4.6, CaCl₂ 1.5, Glikoz 11, KHPO₄ 1.2, NaHCO₃ 20 olarak hazırlandı. Bidistile, de-iyonize su kullanılarak her gün taze olarak hazırlanan Krebs solüsyonunun pH'sı ölçülerek gerektiğinde ortofosforik asit ilave edilerek 7.4' e ayarlandı. Solüsyon hazırlanırken magnezyum klorür ve kalsiyum klorür ayrı ayrı çözündükten sonra toplam çözeltiye ilave edildi. Solüsyon, içerisindeki iyon konsantrasyonun tamamen homojenize olması ve çökmenin engellenmesi için sürekli çalkalandı.

4.3.Miyometriyum şeritlerinin hazırlanması

Çalışmada Sprague Dawley cinsi yetişkin 12 haftalık, 200- 250 gr arası dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saatlik karanlık ışık periyodunda, 23 C°' lik oda ısısında plastik kafeslerde beşerli gruplar halinde tutuldu. Hayvanlar standart pelet yem ve musluk suyu ile beslendi.

Servikal dislokasyondan sonra sıçanların karın bölgeleri açıldı. Barsaklar ve diğer karın içi organları ekarte edilerek ovaryumlar ve uterus gövdesi arasında kalan iki uterus hornu dikkatlice kesildi ve içinde Krebs çözeltisi bulunan petri kutusuna konuldu. Uterus hornunun antimezenterik kenarı longitudinal istikamette düzgünce açıldı. Açılan uterus hornularından tüm uterus katmanlarını içeren 1X0.1X0.1 cm boyutlarında kesitler alınarak uterus longitudinal olarak şeritlere ayrıldı. Şeritler her iki ucundan ipek ipliklerle bağlanarak bir ucu içinde Krebs çözeltisi bulunan haznenin tabanına, diğer ucu ise yine ipek iplik kullanılarak izometrik güç çevirgecine sabitlenip organ banyosuna vertikal olarak asıldı (MAY, Commat Ltd., Ankara).

4.4.Deney Prosedürü

Deneye başlamadan izometrik güç çevirgecine bir gramlık bir ağırlık asılarak bilgisayarda yazılım sisteminde gözlenen değerler belirlendi ve sistem bir gramlık gerimi göstermek üzere kalibre edildi.

Daha sonra izometrik güç çevirgeci ile bağlantılı mikro oynatıcı hareket ettirilerek asılan miyometriyum kesitine bir gramlık bir istirahat gerimi uygulandı ve miyometriyum kesiti bu istirahat gerimine adapte olmak üzere 60 dakika beklendi. Bu esnada her 10 dakikalık periyotta miyometriyum kesiti taze Krebs solüsyonu ile yıkandı. 20 dakikalık denge döneminin sonunda şeritlerin bulunduğu hazneye 20 ve 30 mM Potasyum klorür (KCl) uygulanarak kasılmalar standardize edildi; miyometriyum şeritlerini KCl ile indüklemenin amacı miyometriyum kasılmalarına ilave güç sağlayarak kasılmanın denge ve standardizasyonu sağlamaktır. KCl uygulamasına kasılma cevabı vermeyen kaslar deney protokolünden çıkarıldı.

Denge işlemleri sağlandıktan sonra belirli zaman periyodunda farklı deney protokolleri uygulanması amacıyla içerisinde Krebs solüsyonu bulunan hazneye kimyasal ajanlar ilave edildi. İzometrik güç çevirgeciyle monitörize edilen miyometriyum kasılmaları kayıt altına alındı.

Bu çalışmada uygulanan deney protokolleri aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır.

1.protokol, (n=8): Kontrol+ 2,4-dinitrofenol (DNF, 0.8 mM) uygulanan grup.

2. protokol, (n=8): Kontrol + Potasyum Siyanür (KCN, 0.3 mM)

uygulanan grup

3. protokol, (n=6): Kontrol + Etilen Glikol Tetra Asetik Asit (EGTA,

1 mM) + 2,4-dinitrofenol (DNF, 0.8 mM) uygulanan grup.

4. protokol, (n=7): Kontrol + Etilen Glikol Tetra Asetik Asit (EGTA,

1 mM) + potasyum siyanür (KCN, 0.3 mM) uygulanan grup.

5. protokol, (n=6): Kontrol + Dantrolen (dantrolen-Na 10µM) + 2,4-

dinitrofenol (DNF, 0.8 mM) uygulanan grup.

6. protokol, (n=8): Kontrol + Dantrolen (dantrolen-Na 10µM) +

potasyum siyanür (KCN, 0.3 mM) uygulanan grup.

1. protokol: KCl ile standardize edilen kaslarda bir saatlik zaman periyodundan sonra kayıt işlemine geçildi. 10 dakika kontrol kaydı alındı ardından hazneye 0.8 mM DNF ilave edildi ve 10 dakika sonra kayıt sona erdirildi.

2. protokol: KCl ile standardizasyonu sağlanan kaslarda bir saatlik zaman periyodundan sonra kayıt işlemine geçildi. İlk 10 dakika kontrol kaydı

alındı, ardından ortama 0.3 mM KCN ilave edilerek 10 dakika daha beklendi ve kayıt sonlandırıldı.

3. protokol: KCl ile standardize edilen kaslarda bir saatlik zaman periyodundan sonra kayıt işlemine geçildi. İlk 10 dakikada kontrol kaydı alındı, izleyen 10 dakikalık periyotta ortama 1 mM EGTA ilave edildi ve kayıt işlemine devam edildi . Ardından son 10 dakikalık zaman diliminde ise ortama 0.8 mM DNF ilave edilerek kayıt işlemi sonlandırıldı.

4. protokol KCl ile standardize edilen kaslarda bir saatlik zaman periyodundan sonra kayıt işlemine geçildi. Miyometriyumdan on dakikalık kontrol kaydı alındı. Alınan 10 dakikalık kayıttan sonra haznedeki solüsyona 1 mM EGTA ilave edildi ve 10 dakika daha kayıt alındı. Hemen ardından ortama 0.3 mM KCN ilave edildi ve 10 dakika sonra işlemi sonlandırıldı.

5. protokol: KCl ile standardize edilen kaslarda bir saatlik zaman periyodundan sonra kayıt işlemine geçildi. İlk 10 dakikada kontrol kaydı alınıp ardından hazneye 10 μ M dantrolen-Na ilave edildi ve 10 dakika kayıt alındı. Dantrolen-Na varlığında alınan kaydın ardından ortama 0.8 mM DNF ilave edildi ve 10 dakika daha kayıt alınarak protokol sonlandırıldı.

6. protokol: Bu deney protokolünde KCl ile standardize edilen kaslarda bir saatlik zaman periyodundan sonra kayıt işlemine geçildi. 10 dakika

süresince kontrol kaydı alındı ardından Krebs solüsyonunun bulunduğu hazneye 10 μ M dantrolen-Na ilave edildi. 10 dakikalık kayıt sonrasında ortama 0.3 mM KCN ilave edilip deney protokolü 10 dakika sonra sona erdirildi.

Kasılmaların amplitüt, frekans ve kasılma eğrisi altında kalan alanları 10'ar dakikalık zaman periyotları şeklinde değerlendirildi. Kasılmaların frekansları kasılma sayısı/10 dakika cinsinden hesaplandı. Kasılmaların amplitütleri miligram (mg) cinsinden hesaplanmış olup alan ise; 10 dakikalık zaman dilimindeki kasılma eğrisi altında kalan alanların % değerleri alınarak hesaplandı.

4.5.Kimyasal ajanlar:

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere hazırlanan Krebs solüsyonunun içeriğindeki tüm kimyasallar analitik saflık düzeyindeydi (Sigma, Desisenhofen, Almanya). Deney protokolüne dahil olan diğer kimyasallar; 2-4 DNF (2,4-Dinitrofenol, Merck, Almanya), KCN (Potasyum Siyanür, Sigma), (Dantrolen sodyum, Sigma), EGTA (Etilen Glikol Tetra Asetik Asit, Sigma), olmak üzere, bi-distile de-iyonize su içinde çözündürülerek istenilen konsantrasyonlarda miyometriyum şeridinin olduğu hazneye ilave edildi. Kimyasalların distile su içindeki çözünürlüğünü arttırmak için hazırlanan karışım karıştırıcıda sürekli çalkalandı.

4.6 Veri Analizi

Bütün veriler ortalama $\pm$ standart hata (Mean $\pm$ SEM) olarak verildi. İstatistiksel değerlendirme ve grafik çizimlerinde sırasıyla SPSS 10.0 ve orgin 5.0 istatistik programı kullanıldı. Amplitüd ve frekans değerlerinin ikili karşılaştırılmaları için student's t testi, üçlü karşılaştırmaları için ise Kruskall-Wallis varyans analiz testi kullanıldı. Kasılma eğrisi altında kalan alanlar yüzde birim olarak hesaplandı. Anlamlılık düzeyi bakımından $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

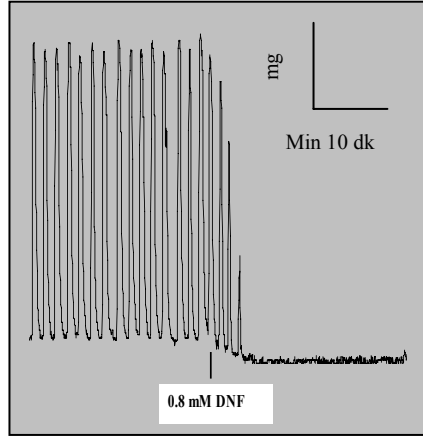
5. BULGULAR

5.1. KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına dinitrofenol'un (DNF) etkisi

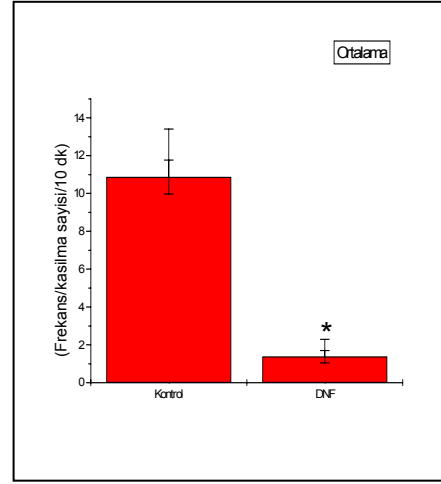
Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyum şeritleri KCl ile standardize edildi. Kasılmaların standardizasyonu sağlandıktan sonra kayıt işlemine geçildi, elde edilen 10 dakikalık kontrol kaydının ardından ortama 0.8 mM DNF ilave edildi. DNF ilavesi sonrasında kasılmaların, frekans, amplitüd ve eğri altında kalan alan değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi (* $p < 0.05$, Şekil 4).

	Kontrol	DNF (0.8 mM)
Frekans (kasılma sayısı/10 dk.)	10.9±0.8	1.3±0.8*
Amplitüd (mg)	1985±56	131±20*
Alan (%)	100	2.21*

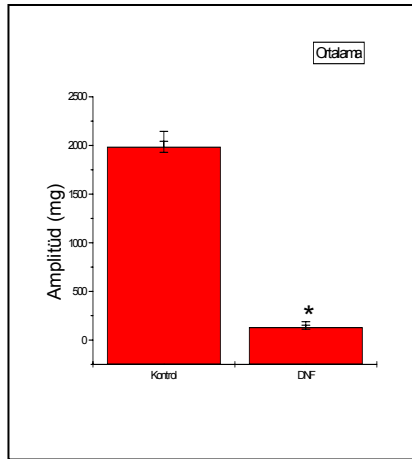
Tablo 2. KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine 0.8 mM 2,4-dinitrofenol uygulanması ile elde edilen frekans (kasılma sayısı/10 dakika), amplitüd (mg) ve kasılma eğrisi altında kalan alanların (%) ortalama ve standart hata değerleri (n=8, * $p < 0.05$)



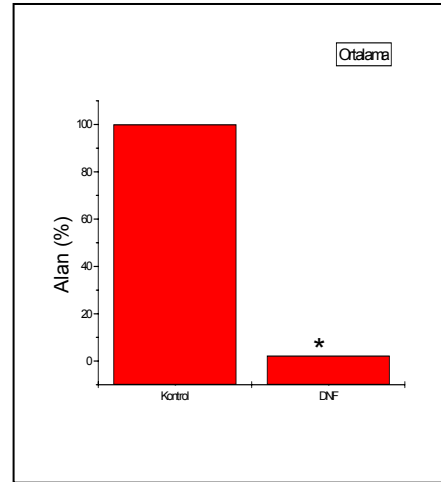
A



B



C



D

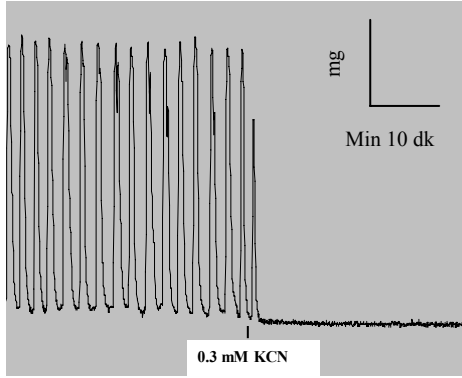
Şekil 4. KCl ile standardize edilen, krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) Kontrol ve 0.8 mM DNF'nin kasılmalara olan etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitüdünü göstermektedir (n=8). B) Kontrol ve 0.8 mM DNF uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol ve 0.8 mM DNF uygulanması esnasında ortalama amplitüd değerleri. D) Kontrol ve 0.8 mM DNF uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri.

5.2 KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına Potasyum siyanid'in (KCN) etkisi

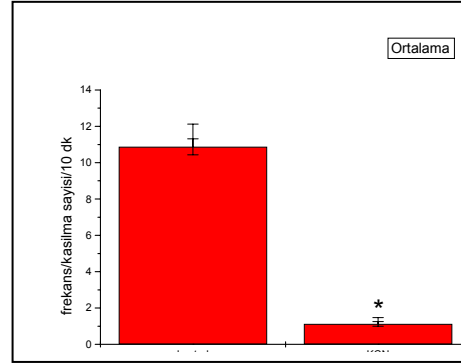
Krebs solüsyonu içerisinde yer alan miyometriyum kasılmaları KCl ile standardize edildi ve 10 dakikalık kontrol kaydının ardından ortama 0.3 mM KCN ilave edildi. KCN ilavesi sonrasında kasılmaların frekans, amplitüd ve kasılma eğrisi altında kalan alan değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gösterdi (* $p < 0.05$).

	Kontrol	KCN(0.3 mM)
Frekans (kasılma sayısı/10 dk.)	10.3±1.2	1.2±0.3*
Amplitüd (mg)	2135±93	149±24*
Alan (%)	100	2.23*

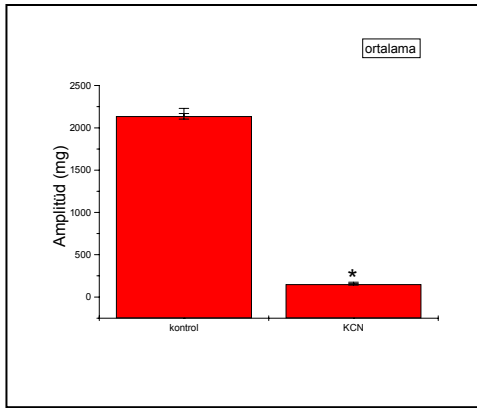
Tablo 3. KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine 0.3 mM KCN uygulanması ile elde edilen frekans, amplitüd ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=8, * $p < 0.05$)



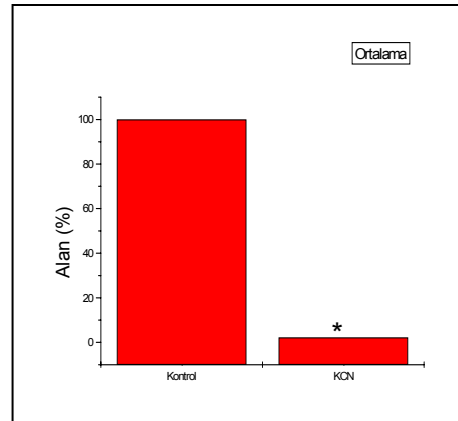
A



B



C



D

Şekil 5: KCl ile standardize edilen, Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) Kontrol ve 0.3 mM KCN' nin kasılmalara olan etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitüdünü göstermektedir (n=8). B) Kontrol ve 0.3 mM KCN'nin uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol ve 0.3 mM KCN uygulanması esnasında ortalama amplitüd değerleri. D) Kontrol ve 0.3 mM KCN uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri.

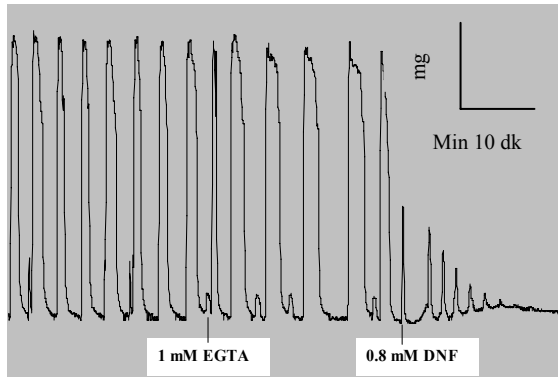
5.3. KCl standardize edilen, krebs solüsyonu içerisindeki miyometriyuma etilen glikol tetra asetikasid (EGTA) ve 2,4-dinitrofenol'un (DNF) etkileri

Bu deney gurubunda EGTA varlığında DNF'nin miyometriyum kasılmaları üzerindeki etkileri incelendi. 1 mM EGTA'nın içerisinde krebs solüsyonu bulunan hazneye uygulanmasıyla, doz bağımlı olarak kasılmaların frekans ve eğri altında kalan alan değerlerinde azalma varken (*P<0.05) kasılmaların amplitüdlerinde istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmedi (Şekil 6.C-D, Tablo 4).

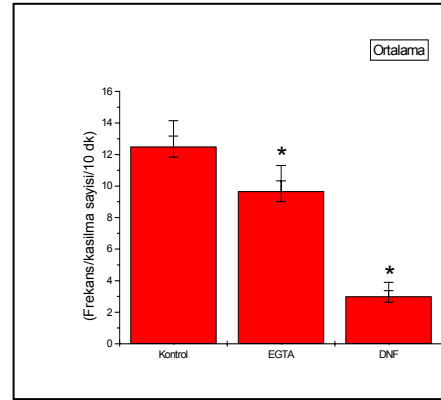
Kasılmaların 1 mM EGTA ile muamele edilmelerinin ardından ortama 0.8 mM'lık DNF ilave edildi. DNF uygulamasından sonra frekans, amplitüt ve kasılma eğrisi altında kalan alan değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gözlemlendi (Tablo 4)

	Kontrol	EGTA (1 mM)	DNF (0.8 mM)
Frekans(kasılma sayısı/10 dk.)	12.5±0.6	9±0.6*	3±0.3*
Amplitüd (mg)	2215±56	2148±95	1473±20*
Alan (%)	100	82.2*	19.7*

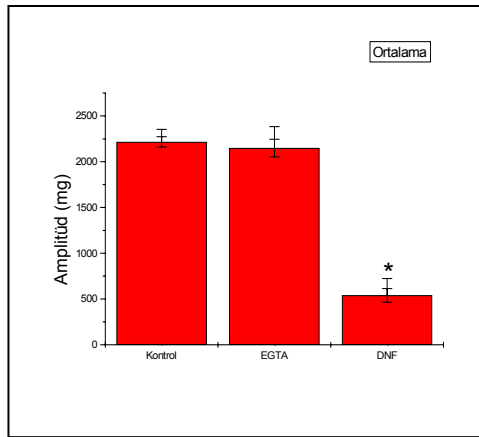
Tablo 4. KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF uygulanması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=6, *p<0.05)



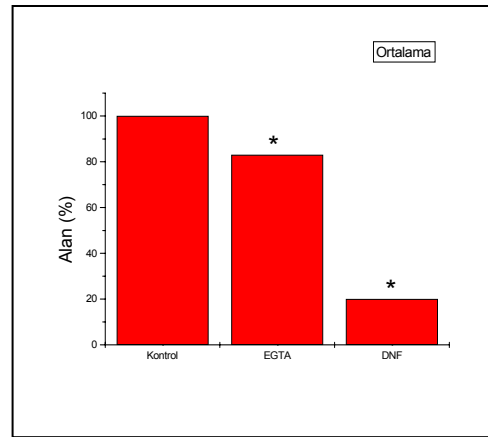
A



B



C



D

Şekil 6. . KCl standardize edilerek gerçekleştirilen miyometriyum kayıtlarında; A) Kontrol, 1 mM EGTA'nın kasılmalara etkisi ile ardından uygulanan 0.8 mM DNF'nin etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitütü göstermektedir (n=6). B) Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF uygulanması esnasında ortalama amplitüd değerleri. D) Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri.

5.4. KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına etilen

glikol tetra asetikasid (EGTA) ve potasyum siyanür'ün (KCN) etkileri

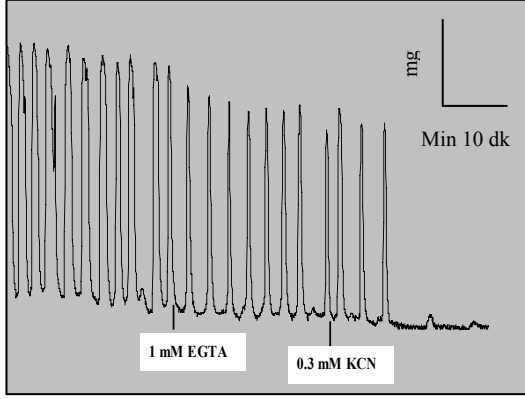
Bu deney gurubunda EGTA varlığında KCN'nin kasılmalara olan etkisi incelendi.

1 mM EGTA uygulanması sonucu elde edilen kasılmaların frekansında bir anlamlılık yoktu. Amplitüd ve kasılma eğrisi altında kalan alan değerlerinde ise EGTA'ya bağlı olarak istatistiksel bir azalma gözlemlendi (* $p < 0.05$ Şekil 7 C-D).

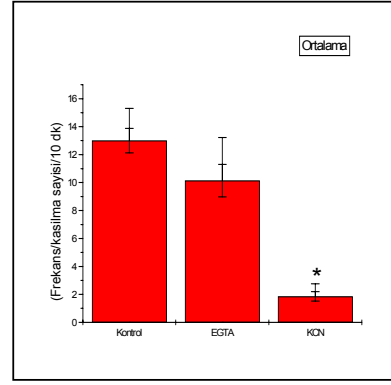
Kasılmalara 1mM EGTA uygulanmasının ardından 0.3 mM KCN uygulanması kasılmaların frekans, amplitüt ve kasılma eğrisi altında kalan alan değerlerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı. ($p < 0.01$), Tablo 5)

	Kontrol	EGTA (1 mM)	KCN (0.3 mM)
Frekans (kasılma sayısı/10 dk.)	13±0.8	10.1±1.6*	1.8±0.3*
Amplitüd (mg)	1946±67	1486±15	648±17*
Alan (%)	100	80.3	5.91*

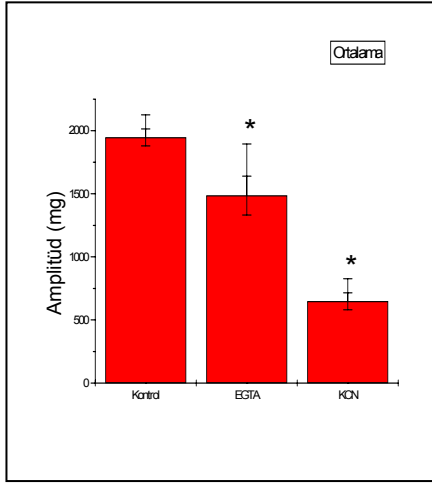
Tablo 5. KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN'nin uygulanması ile elde edilen frekans, amplitüt ve eğri altında kalan alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=7, * $p < 0.05$).



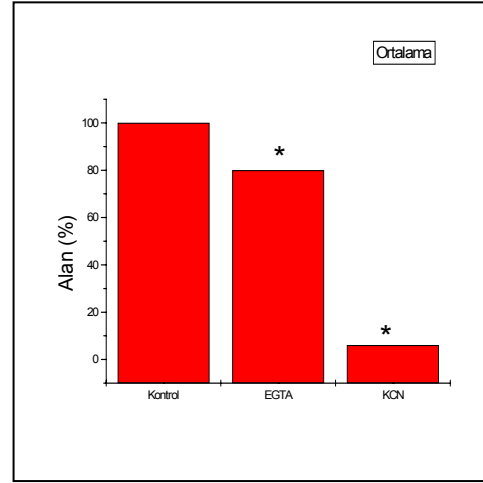
A



B



C



D

Şekil 7. KCl standardize edilerek gerçekleştirilen miyometriyum kayıtlarında; A)kontrol, 1 mM EGTA'nın kasılmalara etkisi ile ardından uygulanan 0.3 mM'lık KCN'nin etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitütü göstermektedir (n=7). B) Kontrol, 1 mM EGTA ve KCN (0.3 mM) uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN uygulanması esnasında ortalama amplitüd değerleri. D) Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri.

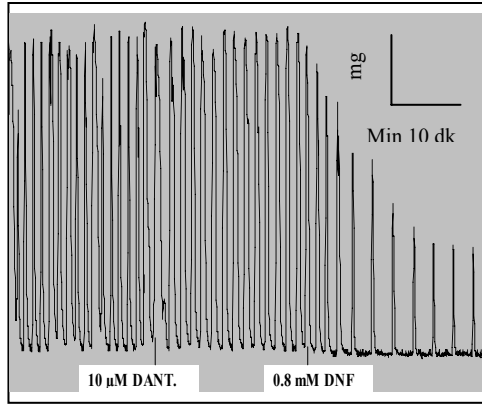
5.5 KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına, dantrolen sodyum (Dantrolen-Na) ve 2-4 dinitrofenol'un (DNF) etkileri

Bu deney gurubunda, Krebs solüsyonu içerisinde KCl ile indüklenmiş miyometriyum kasılmalarına 10 dakikalık kontrol kaydının ardından 10 μ M'lık dantrolen-Na ilave edildi. İlave edilen dantrolen-Na kasılmaların frekansını ve amplitüd'ünü istatistiksel olarak değıştirmezen eğri altında kalan alan değęerlerini istatistiksel anlamlılık düzeyinde azalttı ($p<0.05$).

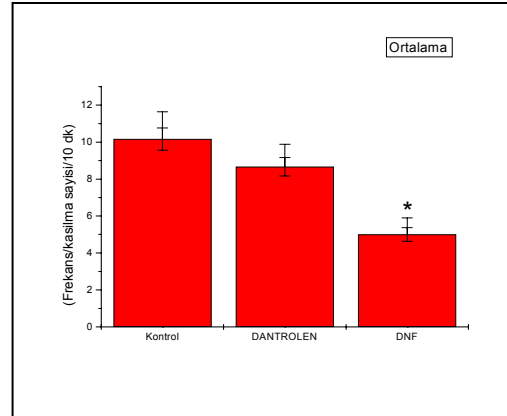
Dantrolen-Na uygulanması sonrasında ortama 0.8 mM'lık DNF ilave edildi. DNF, dantrolen-Na varlığında kasılmaların frekans, amplitüt ve eğri altında kalan alan değęerlerini anlamlı olarak azalttı (* $p<0.05$, Şekil 8. B-C-D)

	Kontrol	Dantrolen-Na (10 μ M)	DNF (0.8 mM)
Frekans(kasılma sayısı/10 dk.)	10.1 $\pm$ 0.6	9 $\pm$ 0.6	5 $\pm$ 0.3*
Amplitüd (mg)	2183 $\pm$ 43	2056 $\pm$ 65	954 $\pm$ 12*
Alan (%)	100	76.2	30.28*

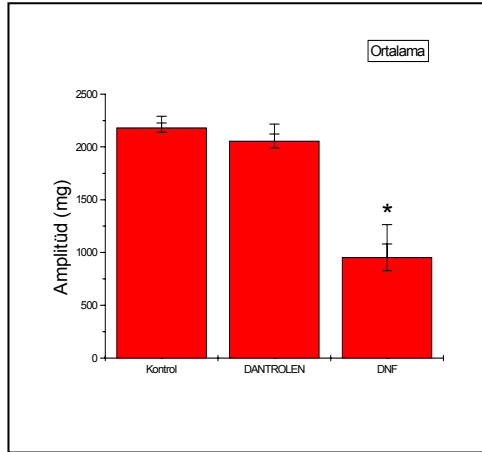
Tablo 6. KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine 10 μ M dantrolen-Na ve 0.8 mM DNF uygulanması ile elde edilen frekans, amplitüt ve eğri altında kalan alanların ortalama ve standart hata değęerleri (n=6, * $p<0.05$).



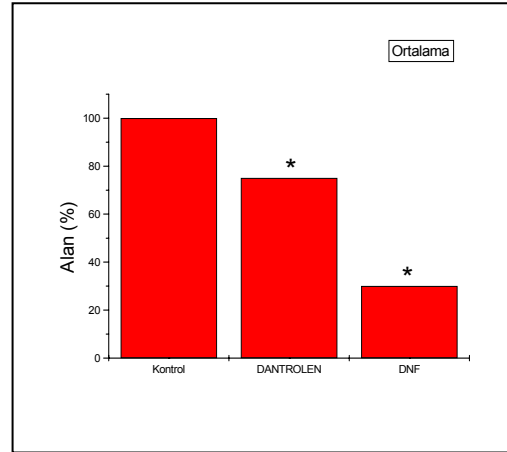
A



B



C



D

Şekil 8. KCl standardize edilerek gerçekleştirilen miyometriyum kayıtlarında; A) Kontrol, 10 μ M dantrolen-Na'nın kasımlara olan etkisi ve ardından uygulanan DNF'nin (0.8 mM) etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitütü göstermektedir (n=6). B) Kontrol, 10 μ M dantrolen-Na ve 0.8 mM DNF'nin uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 10 μ M dantrolen sodyum ve 0.8 mM DNF'nin uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. D) Kontrol, 10 μ M dantrolen-Na ve 0.8 mM DNF'nin uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri.

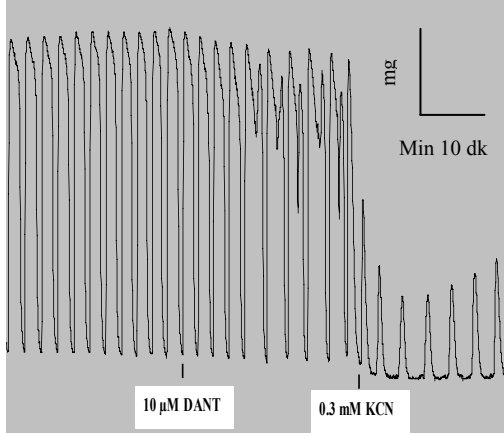
5.6. KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına, dantrolen sodyum (Dantrolen-Na) ve potasyum siyanid'in (KCN) etkileri

Krebs solüsyonu içerisinde KCl ile indüklenmiş miyometriyum kasılmalarına, 10 μ M dantrolen-Na uygulanması. 10 dakikalık periyot boyunca kasılmaların frekans sayılarında ve amplitüd'lerinde istatistiksel yönden farklılık gözlenmedi. Eğri altında kalan alan değerlerinde ise istatistiksel olarak inhibisyon gözlemlendi (*p<0.05)

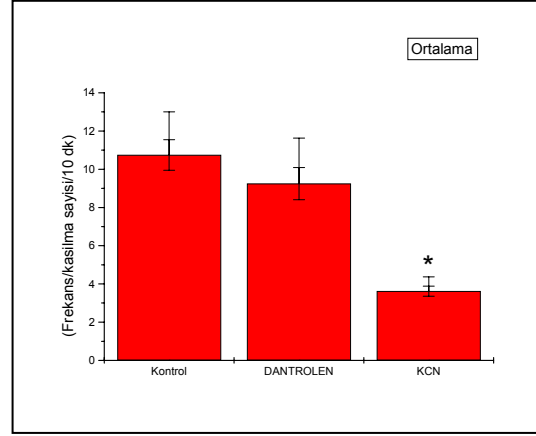
Dantrolen-Na ilavesinden sonra ortama 0.3 mM KCN ilave edildi. KCN'nin uygulanması, dantrolen-Na ilavesi ile alınan kayıtlara oranla kasılmaları anlamlı olarak inhibe etti (*p<0.05). Kontrol kayıtları ile karşılaştırıldığında, KCN kasılmaların frekans, amplitüt ve eğri altında kalan değerlerinde belirgin bir azalma meydana getirdi (n=8, *p<0.05).

	Kontrol	Dantrolen (10 μ M)	KCN(0.3mM)
Frekans(kasılma sayısı/10 dk.)	10.7 $\pm$ 0,7	9 $\pm$ 0.8	4.5 $\pm$ 0,3*
Amplitüd (mg)	2490 $\pm$ 16	2241 $\pm$ 43	1473 $\pm$ 11*
Alan (%)	100	73.2*	31.4*

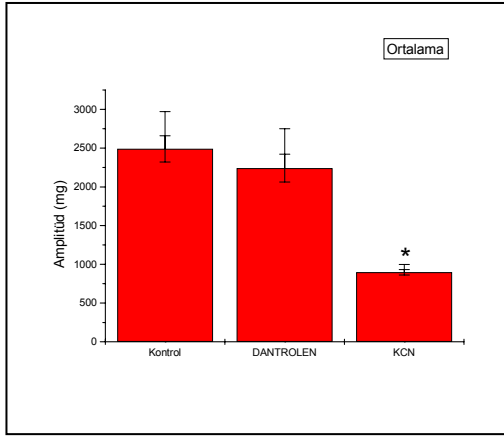
Tablo 7. KCl ile standardize edilen miyometriyum şeritlerine 10 μ M dantrolen sodyum ve 0.3 mM KCN uygulanması ile elde edilen frekans, amplitüt ve eğri altında kalan alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=8, *p<0.05)



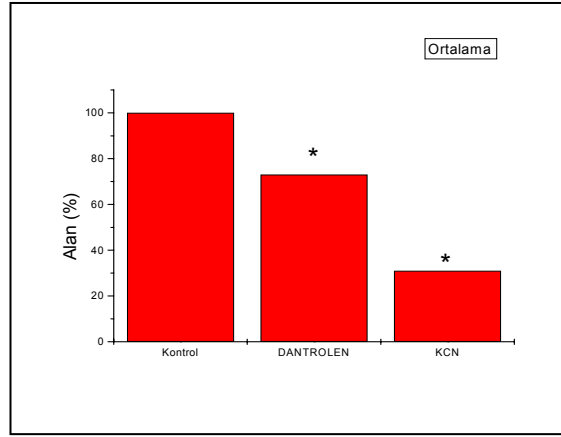
A



B



C



D

Şekil 9. KCl standardize edilerek gerçekleştirilen miyometriyum kayıtlarında; A) Kontrol, 10 µM dantrolen sodyum'un kasılmalara olan etkisinin ardından 0.3 mM KCN'nin etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitütü göstermektedir (n=8). B) Kontrol, 10 µM dantrolen sodyum ve 0.3 mM KCN uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 10 µM dantrolen sodyum ve 0.3 mM uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. D) Kontrol, 10 µM dantrolen sodyum ve 0.3 mM KCN uygulanması esnasında eğri altında kalan ortalama alan değerleri.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın bulguları izole sıçan miyometriyumunda potasyum siyanür ve 2,4-dinitrofenol ile oluşturulan metabolik stresin miyometriyum kontraksiyonlarını doza bağlı olarak inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Aynı zamanda bu ajanların inhibitör etkilerinin hücre içi depolardan Ca^{++} salınımını engelleyen dantrolen sodyum ve hücre içi Ca^{++} şelatörü olan EGTA'nın varlığında kısmen önlenebildiği ancak istatistik verilerde kasılmalarındaki azalmanın hâla anlamlı olduğu görülmüştür. İlave olarak EGTA uygulamasıyla elde edilen kasılmalarda KCN ve 2,4-DNF ile oluşturulan kimyasal hipoksinin inhibisyon derecesi, dantrolen sodyum uygulanması sonrasında oluşan inhibisyonlardan daha güçlü olduğu bulgusu elde edildi. Bu bulgu hipoksi esnasında hücre içi Ca^{++} depolarının, kasılmalarındaki Ca^{++} homeostazisinin kontrolünde daha etkin rol oynadığını düşündürmüştür.

Düz kas hücrelerinde hücre içi iyonize kalsiyumun ikincil haberci rolü ve etkisi tartışmasız olarak kabul edilmektedir. Ca^{++} iyon konsantrasyonu düz kasların kasılmasında önemli rol oynamakla birlikte, metabolik stres esnasında hücre içi Ca^{++} miktarlarında olası artış ve bu artışın kasılmalarda meydana getirdiği değişikliklerin tam olarak anlaşılması ve buradaki Ca^{++} 'nın rolünün ortaya konması çok önemlidir (2). Bu amaçla hücre içi Ca^{++} 'da ne gibi değişikliklerin meydana geldiğini

değerlendirmek önemlidir, çünkü bu parametre normal şartlar altında kasılmaların gücünü belirleyen en önemli parametredir. ATP, fosfokreatin ve inorganik fosfatlardaki diğer değişikliklerin uterus kasılması üzerindeki etkilerinin sadece küçük seviyelerde olduğu daha önce yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur (14).

Düz kaslarda metabolik stres veya inhibisyonun kasılabilmeyi olumsuz yönde ve hızlı bir zaman skalasında etkilediği bilinmektedir. Doğum eylemi sırasında aktif kasılmaları ile önemli fonksiyon gösteren uterus düz kasında metabolik inhibisyonla oluşan kasılma defektinin mekanizmasının anlaşılması bu durumun tedavisine yönelik önemli yaklaşımlar geliştirmeye olanak sağlayabilir.

Bu çalışmada kullanılan her iki metabolik inhibitör maddenin kasılmaların frekans, amplitüd ve eğri altında kalan alan değerlerini azaltması yada inhibe etmesi daha önce yapılan hipoksi çalışmalarıyla uyum göstermektedir (52). Siyanid ve 2,4-dinitrofenol ile oksidatif fosforilasyonun bloklanması rat ve tavşan izole uterus dokularında gösterilmiştir (46).

Hipoksi esnasında kan damarlarının gevşemesi bölgeye kan akımının artışına ve/veya metabolik stres esnasında ATP tüketimin azalmasına neden olur. Bu durumda hipoksi ile meydana gelen inhibisyon, organizmada koruyucu bir etki meydana getirirken, serebral

kanama, ateroskleroz ve vazospazm gibi bazı patolojilerin de dahil olduğu klinik disfonksiyonlara neden olabilir (79).

Gebe uterus dokusundan elde edilen izole miyometriyumda metabolik inhibisyona bağlı gelişen asitleşmenin, Ca^{++} akımında bir azalma meydana getirdiği (69) ve böylelikle de intraselüler $[Ca^{++}]_i$ seviyesinin düşmesine sebep olduğu bilinmektedir (78).

Daha önce yapılan bazı çalışmalar siyanid ile oluşturulan ve/veya vücutta bir patolojiye bağlı olarak meydana gelen gerçek hipoksinin rat uterusunda dahil olduğu düz kaslarda çok benzer değışiklikler yaptığını göstermiştir. İlaveten insan miyometriyumu üzerinde hipoksinin etkisinin belli düzenlemeler ile siyanid ile yapılan hipoksi çalışmalarıyla elde edilen verilerle karşılaştırılabileceği önemle düşünülmüştür. Siyanid ile hipoksi oluşturulması uterus (20), mide (33) ve portal venin de (77) dahil olduğu bazı fazik düz kaslarda gösterilmiştir. Ayrıca hipoksi esnasında Ca^{++} daki geçici azalma güçteki bir azalmayı da beraberinde getirir (79). Bazı düz kaslarda dışa doğru K^+ akımındaki artış ve içe yönelik Ca^{++} akımındaki azalma, metabolik inhibitör olan siyanid varlığında gösterilmiştir (52). Hipokside, $[ATP]$ 'de düşme , $[ADP]$ 'de artma ve tek başına hücre içi pH'da bir azalma düz kas hücrelerinin hiperpolarizasyonuna ve kanalların açılmasına yol açacaktır. Mevcut çalışmada inhibisyonun iyon kanalları ile alakalı mekanizmasının

aydınlatılmasına yönelik girişimler çok kapsamlı olarak yapılmamakla birlikte elde edilen inhibisyonun daha yoğun olarak K^+ ve Ca^{++} kanallarının aktivitesine bağlı olduğu yapılan çalışmalarda göz önüne alarak ifade edilebilir.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara, KCN'ye bağlı olarak inhibe olan miyometriyum kasılmalarının, ortamdan KCN'nin uzaklaştırılmasını takiben 5-10 dakika içerisinde kademeli olarak geri döndüğü gözlemlendi. Bu geri dönüşüm mekanizmasında KCN'nin mitokondri üzerindeki enerji metabolizmasını bozucu etkisinin bu ajanın ortamdan uzaklaştırılmasına bağlı olarak ortadan kalktığını ve bunun sonucunda $[ATP]_i$ seviyesinin normal fizyolojik değerlerine ulaşmasının rolünün önemli olduğunu düşünülebilir. Dokulardan KCN'nin uzaklaştırılmasını takiben kasılmaların kısmen de olsa geri döndüğü Monir ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (52). Ayrıca bu bulgu dokunun tamamen ölmediğini, kasılmanın geriye dönebilir bir şekilde inhibe olduğunu göstermektedir. Hem asidoz hemde hipoksinin membran depolarizasyonu ve voltaj kapılı Ca^{++} girişi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (7).

Metabolik inhibisyon (KCN ile sağlanan) sonucu oksidatif fosforilasyonda meydana gelen değişikliklere bağlı olarak $[ATP]_i$ seviyesinde düşüş olduğu gösterilmiştir (17). Siyanid varlığında artmış K^+ çıkışı uyarılmayı daha da zorlaştırarak dokuyu hiperpolarize eder. Bu

mekanizma siyanid ile görülen kasılmaların frekansındaki azalmanın nedeni olarak açıklanabilir. Siyanidin depolarize olmuş dokularda gücün düşmesine sebep olması, membran yüzey depolarizasyonun ötesinde, $[Ca^{++}]_i$ ve miyoflamentlerin Ca^{++} 'a duyarlılığında farklılık meydana getirdiğini düşündürmektedir. Hipoksi, oksidatif fosforilasyonu inhibe eder ve böylece hücre içerisindeki metabolit düzeyi değişir, bu değişime $[ATP]_i$ 'de azalma ve inorganik fosfat seviyesindeki yükselme de dahildir. Aneorobik glikolizis mekanizmasının uyarılması sonrasında asitleşme meydana gelir. Bu iki durumun gücün azalmasına olan katkılarının önemli olduğu düşünülmektedir (14).

Bu tez çalışmasında KCN benzeri metabolik inhibitör etkisi olan DNF ile yapılan hipoksi çalışmalarında, DNF'nin miyometriyum kasılmaları üzerinde inhibitör bir etkisinin varlığı daha önce yapılan çalışmalar ile uyum göstermektedir. KCl ile standardize edilmiş uterus miyometriyumunda kontrol kayıt döneminin ardından ortama ilave edilen DNF'nin kasılmaları hemen başlayan bir etki ile inhibe ettiği gözlemlendi. Bu konuda yapılan bir çalışma tavşanlardan izole edilen kolon düz kaslarının, DNF'ye bağlı fosforilaz aktivitesini değiştirdiğini ortaya koymuştur. Aynı çalışmada düz kaslarda Ca^{++} deposu olarak görev yapan mitokondriden DNF'ye bağlı olarak Ca^{++} salınımında bir azalma olduğu gösterilmiştir (60) DNF'nin gerek hücre içi depolardan Ca^{++} salınımını

provake etmesi (5) gerekse ters moddaki Na-Ca değiştokuşunu uyardığı bilinmektedir (64).

Mitokondrial inhibitörlerin hem mitokondrial hemde mitokondrial olmayan depolardan Ca^{++} salınımına neden olduğu rapor edilmiştir (19). Sonuçta bazı hücrelerde DNF, depolarize potansiyelde voltaj bağımlı içe doğru bir akımı aktive edebilir. Bu içe yönelik akımın nedeninin net olarak ortaya konamaması ile birlikte DNF'nin arteryel düz kaslarda L tipi Ca^{++} akımının voltaj aktivasyonu arasında kaymayla hiperpolarizasyona sebep olduğu rapor edilmiştir (48).

Hipoksinin Cl^- ve K^+ kanalları üzerindeki etkisinin az miktarda olduğu bilinmektedir ancak hipoksinin K^+ kanalları üzerindeki etkisinin membran potansiyelini değiştirebileceği bundan dolayı L-tipi Ca^{++} kanallarından Ca^{++} geçişinin baskılanabileceği düşünölmektedir. Aynı zamanda hipoksinin Ca^{++} kanalları üzerinde direkt etkisinin olması da muhtemeldir. Hem Ca^{++} akımı üzerinde hipoksinin direkt etkileri hemde düşük pH'nın gap kavşakların iletkenliğini inhibe etmesi gibi parametreler Ca^{++} akımlarının azalmasına yönelik mekanizmalar olarak görölebilir (83).

Düz kaslarda rıyanodin duyarlı depolardan Ca^{++} tetiklemeli Ca^{++} salıverilmesinin varlığı ortaya konulmuştur (32).

Dantrolen, hücre içi depolardan Ca^{++} salıverilmesini bloklayan bir ajandır

(13). Bu çalışmada hipoksinin hücre içi Ca^{++} 'da meydana getirdiği değişikliklerin ortaya konmasına katkıda bulunmak için kimyasal doku hipoksisi esnasında dantrolenin Ca^{++} depolarından Ca^{++} salınımında meydana getirdiği muhtemel değişiklikler incelendi.

Çalışmada kullanılan dantrolenin dozu kasılmalarda inhibisyon meydana getirmeyecek şekilde doz cevap eğrisi oluşturularak elde edildi. Dantrolen sodyumun 10 μ M dozda KCl ile standardize edilmiş kasılmaları inhibe etmediğini Ayar ve ark. tarafından daha önce yapılan bir çalışma ile ortaya konulmuştur (2) . Bu bulgu bu çalışmada elde edilen verilerle uyum içerisindedir.

Hücre içi Ca^{++} şelatörü olan EGTA'nın daha önce yapılan çalışmalarda yüksek dozlarının kasılmaları ve gücü azalttığı ortaya konmuştur. Kasılmalarındaki gücün azalması, her ne kadar EGTA'nın Ca^{++} 'yı bağlamasıyla gerçekleşiyor olsa da MHZK'yı inhibe etmez. Dolayısıyla kasılmalarındaki gücün korunması aktin ve miyozin komponentlerinin yavaş ayrılmasına bağlı olabilir (71).

Metabolik stres esnasında miyometriyum kasılmalarında meydana gelen inhibitör etkinin derecesi, hücre içi Ca^{++} bağlayan EGTA ve SR'den Ca^{++} salınımını bloklayan dantrolen sodyum ilavesine oranla istatistiksel veriler göz önüne alındığında çok daha belirgindi. Oksidatif fosforilasyon bloğu olmasına rağmen miyometriyumdaki kasılmaların zayıf da olsa

devam etmesi hücre içerisindeki Ca^{++} homeostazisinin rolünün ve etkinliğinin çok yüksek olduğunu göstermiştir. Bir kısım araştırmacılar kalpte hipoksi esnasında hücre içerisinde serbest Ca^{++} düzeyinin arttığını ve buna bağlı olarak artan Ca^{++} 'nın kalsiyum duyarlı potasyum kanallarını (K_{Ca}) aktive ettiğini ortaya koymuştur. Bu veriyi miyometriyum düz kas hücreleriyle kıyasladığımızda artan K_{Ca} 'nın membranı hiperpolarize ederek kasılmaları inhibe etmesi bir başka olasılık olarak düşünülebilir (61). EGTA'nın ve dantrolen'in bu inhibisyonun etkinliğini nasıl zayıflattığını açıklamak konusunda ilave çalışmaların yapılması gerektiğini ve diğer parametrelerin (Hipoksik şartlarda K^+ iyon dengesi ve pH_i konsantrasyonu) değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular, metabolik stres esnasında uterus kasılmalarında hücre içi Ca^{++} 'nın aktif olarak rol alabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle hipoksida Ca^{++} 'nın rolünün iyi anlaşılması, hipoksiye bağlı gelişebilecek patolojilerin tedavisine klinik yaklaşımlar getirebileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Ayar A, Kutlu S, Yilmaz B, Kelestimur H. (2001). Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro *Neuro Endocrinol.* 22: 199-207
2. Ayar A, Tuğ N. (2001). Dantrolen sodyumun izole sıçan miyometriyumunda agonistlerle standardize edilen kasılmalara inhibitör etkisi *Fırat Tıp dergisi.* 2-3
3. Barany K, Csabina S, de Lanerolle P, Barany M. (1987). Evidence for isoforms of the phosphorylatable myosin light chain in rat uterus. *Biochim Biophys Acta.* 911: 369-71.
4. Barbara M. Sanborn. (2000). Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium *J Soc Gynecol Investig* 7: 4–11.
5. Biscoe TJ, Duchen MR. (1990). Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. *Am J Physiol.* 258: 271-8.
6. Bitar KN, Bradford P, Putney JW Jr, Makhlouf GM. (1986). Cytosolic calcium during contraction of isolated mammalian gastric muscle cells. *Science.* 232: 1143-5
7. Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. (1994). Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. *J Physiol.* 476: 423-8
8. Burdyga T, Wray S. (1997). Simultaneous measurements of electrical activity, intracellular $[Ca^{2+}]$ and force in intact smooth muscle. *Pflugers Arch.* 435: 182-4
9. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* (1987) 56: 395-433
10. Cohen T J ,Vivat V, Heilman C, Legrand C, Maltier JP. (1991). Regulation by progesterone of the high affinity state of myometrial β adrenergic receptor and of adenylat cyclase activity in the pregnant rat.*J Mol Endocrinol.* 6: 137-145
11. Cole WC, Garfield RE, Kirkaldy JS. (1985). Gap junctions and direct intercellular communication between rat uterine smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 249: C20-31

12. Coleman H. A., Hart J. D. E., Mary A. Tonta and Helena C. Parkington. (2000). Changes in the mechanisms involved in uterine contractions during pregnancy in guinea pigs J Physiol . 523: 785—798
13. Conte-Camerino D, Lograno MD, Siro-Brigiani G, Megna G. (1983). Dantrolene sodium: stimulatory and depressant effects on the contractility of guinea-pig uterus in vitro. Eur J Pharmacol. 92: 291-4.
14. Crichton CA, Taggart MJ, Wray S, Smith GL. (1993). Effects of pH and inorganic phosphate on force production in alpha-toxin-permeabilized isolated rat uterine smooth muscle. J Physiol. 465: 629- 45
15. Csabina S, Barany M, Barany K. (1987). Comparison of myosin light chain phosphorylation in uterine and arterial smooth muscles Comp Biochem Physiol B. 87: 271-7
16. Cunningham FG,MJcDonald, FC, Gant NF,Levano KJ, Gillstarp LC, Hankins GDV, Clarck SI. (2001). Williams Obstetric 21.baskı Appleton& Lange, Connecticut A.B.D.
17. Dawson MJ, Wray S. (1985). The effects of pregnancy and parturition on phosphorus metabolites in rat uterus studied by ³¹P nuclear magnetic resonance. J Physiol. 368: 19-31
18. Delhumeau G., Cruzmendoza A. M. and Lojero C. G. (1994). Protection of Cytochrome c oxidase against cyanide Inhibition by pyruvate and α -ketoglutarate: Effect of Aeration *in Vitro* Toxicology and Applied Pharmacology 126: 2345-351
19. Duchen MR, Valdeolmillos M, O'Neill SC, Eisner DA. (1990). Effects of metabolic blockade on the regulation of intracellular calcium in dissociated mouse sensory neurones. J Physiol. 424: 411-26
20. Earley L, Wray S. (1993). Effects of hypoxia on force produced by agonists and depolarization and arising spontaneously in the rat uterus. J Reprod Fertil. 99: 539-44
21. Eggermont JA, Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Casteels R. (1988). Ca^{++} transport ATPases of vascular smooth muscle Circ Res. 62: 266-78
22. Fomin V P, Cox B E, Word R A. (1999). Effect of progesterone on intracelular Ca^{++} homeostasis in human myometriyal smooth muscle cells. Am J Physiology 276: C 379- 385

23. Franzini-Armstrong C., F. Protasi. (1997). R Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions *Physiol. Rev.* 77: 699-729,
24. Ganong WF (1995) .Review of medical physiology .A Simon & Schuster Co San Francisco
25. Garfield RE, Saade G, Buhimschi C, Buhimschi I, Shi L, Shi SQ, Chwalisz K. (1998). Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod Update.* 4: 673-95.
26. Grammatopoulos D, Stirrat GM, Williams SA, Hillhouse EW. (1996). The biological activity of the corticotropin-releasing hormone receptor-adenylate cyclase complex in human myometrium is reduced at the end of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 745-51
27. Graves S, Dretchen KL, Kruger GO. (1978) Dantrolene sodium: effects on smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 29-35
28. Grover AK, Kwan CY, Daniel EE. (1982). Ca^{++} dependence of calcium uptake by rat myometrium plasma membrane-enriched fraction. *Am J Physiol.* 242: C278-82.
29. Guerrero A, Fay FS, Singer JJ. (1994). Caffeine activates a Ca^{++} permeable, nonselective cation channel in smooth muscle cells. *J Gen Physiol.* 104: 375-94.
30. Harrison N, Larcombe-McDouall JB, Earley L, Wray S. (1994). An in vivo study of the effects of ischaemia on uterine contraction, intracellular pH and metabolites in the rat. *J Physiol.* 476: 349-54.
31. Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F. (1998). Myosin light chain phosphatase: Subunit composition, interactions and regulation. *J Musc Res Cell Res.* 19: 325–41
32. Hua SY, Liu C, Lu FM, Nohmi M, Kuba K. (2000). Modes of propagation of $Ca(2+)$ -induced Ca^{2+} release in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Cell Calcium.* 27: 195-204
33. Huang SM, Chowdhury JU, Kobayashi K, Tomita T. . (1993). Inhibitory effects of cyanide on mechanical and electrical activities in the circular muscle of gastric antrum of guinea-pig stomach. *Jpn J Physiol.* 43: 229-38
34. Inoue Y, Nakao K, Okabe K, Izumi H, Kanda S, Kitamura K, Kuriyama H. (1990). Some electrical properties of human pregnant myometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 162: 1090-8

35. Ishida Y, Honda H, Watanabe TX. (1992). Ca^{++} release from isolated sarcoplasmic reticulum of guinea-pig psoas muscle induced by $\text{K}(+)$ -channel blockers. *Br J Pharmacol.* 106: 764-5
36. Janis RA, Moats-Staats BM, Gualtieri RT. (1980). Protein phosphorylation during spontaneous contraction of smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 96: 265-70
37. Johnson JD, Meisenheimer TL, Isom GE. (1986). Cyanide-induced neurotoxicity: role of neuronal calcium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 84: 464-9
38. Jones K, Shmygol A, Kupittayanant S, Wray S. (2004). Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes. *Pflugers Arch.* 448: 36-43
39. Kanmura Y, Missiaen L, Casteels R. (1988). Properties of intracellular calcium stores in pregnant rat myometrium. *Br J Pharmacol.* 95: 284-90
40. Kawarabayashi T, Ikeda M, Sugimori H, Nakano H. (1986). Spontaneous electrical activity and effects of noradrenaline on pregnant human myometrium recorded by the single sucrose-gap method. *Acta Physiol Hung.* 67: 71- 82.
41. Kayaalp S.O. (2002). *Tıbbi farmakoloji Hacettepe TAŞ.* 10.Edition. 822-23
42. Khan R, Mathroo-Ball B, Arilkumaran S, Ashford MLJ. (2001). Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol.* 86: 255–64
43. Kihira M, Matsuzawa K, Tokuno H, Tomita T. (1990). Effects of calmodulin antagonists on calcium-activated potassium channels in pregnant rat myometrium. *Br J Pharmacol.* 100: 353–9
44. Kimiko Y, Takaaki S, Norihiko O, Hideki N, Akira K, and Ando J. Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca^{2+} influx into pulmonary artery endothelial cells *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H793-H803, 2003
45. Kuemmerle J. F., Murthy K. S and Makhoul G. M. , (1994). Agonist-activated, ryanodine-sensitive, IP_3 -insensitive Ca^{++} release channels in longitudinal muscle of intestine *Am J Physiol Cell Physiol.* 266: C1421-C1431
46. Kushmerick MJ, Dillon PF, Meyer RA, Brown TR, Krisanda JM, Sweeney HL. (1986). ^{31}P NMR spectroscopy, chemical analysis, and free Mg^{++} of rabbit bladder and uterine smooth muscle. *J Biol Chem.* 261: 14420-9

47. Makowski EL, Hertz RH, Meschia G. (1973). Effects of acute maternal hypoxia and hyperoxia on the blood flow to the pregnant uterus. *Am J Obstet Gynecol.* 115: 624-31
48. McHugh D, Beech DJ. (1996). Modulation of Ca^{++} channel activity by ATP metabolism and internal Mg^{++} in guinea-pig basilar artery smooth muscle cells. *J Physiol.* 492: 359-76.
49. McKillen K, Thornton S, Taylor CW (1999) Oxytocin increases the $[Ca^{++}]_i$ sensitivity of human myometrium during the falling phase of phasic contractions. *Am J Physiol.* 276: E345-51.
50. Michael J. Berridge Martin D. Bootman & Peter Lipp. (1998). Calcium - a life and death signal *Nature.* 395: 645 - 648
51. Molnar M, Hertelendy F. (1990). Regulation of intracellular free calcium in human myometrial cells by prostaglandin F_2 alpha: comparison with oxytocin. *J Clin Endocrinol Metab.* 71: 1243-50
52. Monir, S.J., Kupittayanant S. Shmygol, A, Wray S. (2003). The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 110: 1050–1056
53. Noble K and Wray S. (2002). The role of the sarcoplasmic reticulum in neonatal uterine smooth muscle: enhanced role compared to adult rat *Journal of Physiology.* 545: 557- 566
54. Okashiro T, Tokuno H, Fukumitsu T, Hayashi H, Tomita T. (1992). Effects of intracellular ATP on calcium current in freshly dispersed single cells of guinea-pig portal vein. *Exp Physiol.* 77: 719-31
55. Osa T. (1974). An interaction between the electrical activities of longitudinal and circular smooth muscles of pregnant mouse uterus. *Jpn J Physiol.* 24: 189-202.,
56. Özaydın S. (1998). Siyanürün sitokrom oksidaz üzerine olan etkilerinin araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Farmakoloji anabilim dalı, Doktora Tezi
57. Parkington HC, Coleman HA. (1988). Ionic mechanisms underlying action potentials in myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 15: 657-65
58. Petersen OH. (1992). Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J Physiol.* 448: 1–51

59. Petrocelli T, Lye SJ. (1993). Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin -43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133: 284-90.
60. Pettersson G. (1984). Influence of anoxia and dinitrophenol on Ca^{++} efflux and phosphorylase a activity in rabbit colon smooth muscle. *Acta Pharmacol Toxicol* 54: 15-21
61. Piper HM, Noll T, Siegmund B. (1994). Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovasc Res.* 1-15
62. Putney JW, McKay RR. (1999). Capacitative calcium entry channels. *BioEssays*;21:38 –46.
63. Robert K M, Darly K G, peter A M, Wictor W R. Harperin biyokimyası 24.baskı 1996: 135-6
64. Rocher A, Obeso A, Gonzalez C, Herreros B. (1991). Ionic mechanisms for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells. *J Physiol.* 433: 533-48.
65. Sato K., Sanders K. M, Gerthoffer W. T and. Publicover N. G. (1994). Sources of calcium utilized in cholinergic responses in canine colonic smooth muscle *Am J Physiol Cell Physiol.* 267: C1666-C1673.
66. Savineau JP, Mironneau J. (1990). Caffeine acting on pregnant rat myometrium: analysis of its relaxant action and its failure to release Ca^{++} from intracellular stores. *Br J Pharmacol.* 99: 261-6.
67. Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, Thornbury KD,McHale NG. (2000). Specialised pacemaking cells in the rabbit urethra. *J Physiol.* 526: 359–366
68. Shmigol AV, Eisner DA, Wray S. (1999). The role of the sarcoplasmic reticulum as a calcium sink in uterine smooth muscle cells.*J Physiol Lond.* 520: 153–63
69. Shmigol AV, Smith RD, Taggart MJ, Wray S, Eisner DA. (1995). Changes of pH affect calcium currents but not outward potassium currents in rat myometrial cells. *Pflugers Arch.* 431: 135-7
70. Shmygol A, Wray S. (2005). Modulation of agonist-induced Ca^{++} release by SR Ca^{++} load: direct SR and cytosolic Ca^{++} measurements in rat uterine myocytes *Cell Calcium.* 37: 215–223

71. Smith GL, Crichton CA. (1993). Ca-EGTA affects the relationship between $[Ca^{++}]$ and tension in alpha-toxin permeabilized rat anococcygeus smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 76-84
72. Smith L, Stull JT. (2000). Myosin light chain kinase binding to actin filaments. *FEBS Lett.* 1;480: 298-300
73. Somlyo AP, Somlyo AV. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 372: 231-6.
74. Somlyo AV, Khromov AS, Webb MR, Ferenczi MA, Trentham DR, He ZH, Sheng S, Shao Z, Somlyo AP. (2004). Smooth muscle myosin: regulation and properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359: 1921- 30
75. Song M, Zhu N, Olcese R, Barila B, Toro L, Stefani E. (1999). Hormonal control of protein expression and mRNA levels of the MaxiK channel alpha subunit in myometrium. *FEBS Lett.* 460: 427-32.
76. Sunderji SG, El Badry A, Poore ER, Figueroa JP, Nathanielsz PW. . (1984). The effect of myometrial contractures on uterine blood flow in the pregnant sheep at 114 to 140 days' gestation measured by the 4-aminoantipyrine equilibrium diffusion technique. *Am J Obstet Gynecol.* 149: 408-12
77. Sward K, Josefsson M, Lydrup ML, Hellstrand P. (1993). Effects of metabolic inhibition on cytoplasmic calcium and contraction in smooth muscle of rat portal vein *Acta Physiol Scand.* 148: 265-72.
78. Taggart MJ, Menice CB, Morgan KG, Wray S. (1997). Effect of metabolic inhibition on intracellular Ca^{++} , phosphorylation of myosin regulatory light chain and force in rat smooth muscle. *J Physiol.* 499: 485-96
79. Taggart MJ, Wray S. (1998). Hypoxia and smooth muscle function: key regulatory events during metabolic stress. *J Physiol.* 509: 315-25
80. Taggart, M.J and S.Wray. (1992). The relation between intracellular pH (pH_i) and force in isolated rat uterus :simultaneous measurements of pH_i and force *J.physiol.* 452:232
81. Tanfin, Z., O.Gourea, O. Milligan, and S Harbon . (1991) Charecterization of G proteins in rat myometrium.A differantial modulation of $G_{i2\alpha}$ and $G_{i3\alpha}$ during gestation. *FEBS lett.*278:4-8
82. Tang DC, Stull JT, Kubota Y, Kamm KE. (1992). Regulation of the Ca^{++} dependence of smooth muscle contraction *J Biol Chem.* 267:11839-45

83. Turin L, Warner AE. . (1980). Intracellular pH in early *Xenopus* embryos: its effect on current flow between blastomeres. *J Physiol.* 300: 489-504.
84. Vedernikowv YP, Mayes M, Moore E, Gei A, Saade G, GarfieldRE. (2000). The effects of pregnancy and smooth muscle contractility on cervical distensibility in the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 182: 905–8
85. Wray S, Duggins K, Iles R, Nyman L, Osman V. (1992). The effects of metabolic inhibition and acidification on force production in the rat uterus. *Exp Physiol.* 77: 307-19
86. Wray S, K. Jones, , S. Kupittayanant, , Y. Li, A. Matthew, ,E. Monir-Bishty, , K. Noble, S. J. Pierce, S. Quenby, andA. V. Shmygol. (2003). Calcium Signaling and Uterine Contractility*J Soc Gynecol Investig.* 10: 252– 64
87. Wray S, Kupittayanant S, Shmygol A, Smith RD, Burdyga T. (2001). The physiological basis of uterine contractility: a short review. *Exp Physiol.* 86: 239-46
88. Wray S, Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am .J. Physiol.* 264: C1-C18, 1993
89. Wray S. (1990). The effects of metabolic inhibition on uterine metabolism and intracellular pH in the rat. *J Physiol.* 423: 411-23
90. Wuytack F, Kanmura Y, Eggermont JA, Raeymaekers L, Verbist J, Hartweg D, Gietzen K, Casteels R. (1989). Smooth muscle expresses a cardiac/slow muscle isoform of the Ca²⁺-transport ATPase in its endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 257: 117-23

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Trabzon ili Of ilçesinde doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi Of ilçesinde tamamladım. 1996 yılında Trabzon lisesi'nden mezun oldum. 1998 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldum. 2003 yılı Eylül döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programında yüksek lisans eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.