

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

156678

**SIÇAN MİYOMETRİYUMUNDA METABOLİK
İNHİBİSYON VE KASILABİLME: ENERJİ
KAYNAKLARI VE HÜCRESEL TAMPONLARIN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İhsan SERHATLIOĞLU

ELAZIĞ - 2004

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Halis ÖCAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ahmet AYAR

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı



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

Doç. Dr. Ahmet AYAR

Danışman



Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

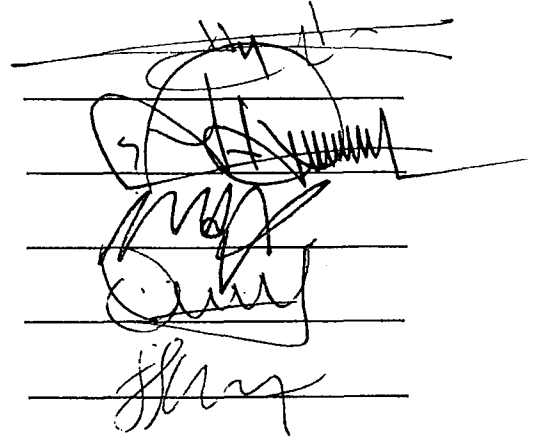
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Prof. Dr. Halis ÖCAL

Doç. Dr. Ahmet AYAR

Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK

Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU



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 yardımlarını gördüğüm Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK, Öğretim Görevlisi Sayın Mete ÖZCAN'a, doktora öğrencileri Tuğrul KUZGUN ve Ali ERSOY'a; Fizyoloji A.D. Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR, Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ, Doç. Dr. Bayram YILMAZ, ve Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU'ya; doktora öğrencileri Sinan CANPOLAT, Süleyman SANDAL, Abdullah YAŞAR, ve Muammer ASLAN'a, Araştırma Görevlileri Mehmet AYDIN, Ahmet SERTKAYA'a; yüksek lisans öğrencileri Ayşe DOĞAN, Sinan SARAL, Zafer ŞAHİN ve Mehmet ÖZER'e; Enformatik Bölümü Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan Hüseyin Balık' a; Enformatik Bölümü Okutmanları Sayın Oğuzhan ÖZDEMİR ve Fatih ERTAM' a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince manevi desteklerini hissettiğim Anabilim Dalımız eski Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. A. Baki TÜRKOĞLU'na; Üniversitemiz Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Yasemin BULUT'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	5
3. GİRİŞ	6
3.1. KASILMA MEKANİZMASI.....	7
3.2. DÜZ KAS GEVŞEME MEKANİZMALARI.....	8
3.3. MİYOMETRİYUM KASINDA UYARILABİLME	10
3.4. UTERUS KARMAŞIK BİR ORGANDIR.....	11
3.5. HİPOKSİ VE DÜZ KAS KASILMASI.....	12
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
4.1. İZOLE ORGAN BANYOSU	16
4.2. KULLANILAN SOLÜSYONLAR	17
4.3. UTERUS ŞERİTLERİNİN HAZIRLANMASI	17
4.4. DENEY PROSEDÜRÜ	18
4.5. KİMYASAL AJANLAR	19
4.6. VERİ ANALİZİ	20
5. BULGULAR.....	21
5.1. NAHCO ₃ İÇEREN KREBS SOLÜSYONU KULLANILARAK YAPILAN KAYITLARDAN KCN’NİN KASILMALARA İNHİBİTÖR ETKİSİ VE PİRUVAT UYGULAMASI.....	21
5.2. HEPES İÇEREN KREBS SOLÜSYONU KULLANILARAK YAPILAN KAYITLARDAN KCN’NİN KASILMALARA İNHİBİTÖR ETKİSİ VE PİRUVAT UYGULAMASI	25

5.3. MİYOMETRİYUM KASILMALARI ÜZERİNE KCN’NİN İNHİBİTÖR ETKİSİNDE	
POTASYUM KANALLARININ ROLÜ	29
5.3.1. <i>NaHCO₃ İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan Kayıtlarda</i>	
<i>KCN’nin Kasımlara İnhibitör Etkisinde Potasyum Kanallarının Rolü</i>	29
5.3.2. <i>HEPES İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan Kayıtlarda</i>	
<i>KCN’nin Kasımlara İnhibitör Etkisinde Potasyum Kanallarının Rolü.....</i>	33
5.3.3. <i>NaHCO₃ ve HEPES İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan</i>	
<i>Kayıtlarda KCN’nin Kasımlara İnhibitör Etkisinde ATP-Duyarlı Potasyum</i>	
<i>Kanallarının Rolü</i>	37
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
7. KAYNAKLAR	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması

Tablo 2: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması

Tablo 3: HEPES içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması

Tablo 4: HEPES içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması

Tablo 5: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması

Tablo 6: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması

Tablo 7: HEPES içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması

Tablo 8: HEPES içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması

Tablo 9: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 100 μM glibenklamid uygulaması

Tablo 10: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 100 μM glibenklamid uygulaması

Tablo 11: HEPES içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 100 µM glibenklamid uygulaması

Tablo 12: HEPES içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 100 µM glibenklamid uygulaması



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Miyometriyal izometrik kasılmaların ölçüldüğü sistem

Şekil 2: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda 0.5 mM KCN ile indüklenen inhibisyona piruvat'ın etkileri

Şekil 3: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda 1 mM KCN ile indüklenen inhibisyona piruvat'ın etkileri

Şekil 4: HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda KCN 0.5 mM ile indüklenen inhibisyona piruvat'ın etkileri

Şekil 5: HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda 1 mM KCN ile indüklenen inhibisyona piruvat'ın etkileri

Şekil 6: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda 0.5 mM KCN ile indüklenen inhibisyona TEA'un etkileri

Şekil 7: NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda 1 mM KCN ile indüklenen inhibisyona TEA'un etkileri

Şekil 8: HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda 0.5 mM KCN ile indüklenen inhibisyona TEA'un etkileri

Şekil 9: HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda 1mM KCN ile indüklenen inhibisyona TEA'un etkileri

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin tri fosfat
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CO ₂	: Karbon di oksit
H ⁺	: Hidrojen lyonu
HEPES	: (N-[2-hidroksi etil] piperazin-N'-[4-bütansülfonik asit])
K ⁺	: Potasyum iyonu
KCl	: Potasyum klorür
KCN	: Potasyum Siyanit
kDa	: kilo dalton
Mg ⁺	: Magnezyum lyonu
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
MHZK	: Miyozin Hafif Zincir Kinaz
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MV	: milivolt
Na ⁺	: Sodyum iyonu
NaCl	: Sodyum klorür
NaHO ₃	: Sodyum bikarbonat
O ₂	: Oksijen
TEA	: Tetraetilamonyum

1. ÖZET

Bu çalışmada, izole sıçan miyometriyumunda siyanürle oluşturulan metabolik stresin miyometriyum kasılmasına inhibitör etkisinde değişik pH tamponlarının, farklı enerji kaynaklarının ve iyon kanallarının rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Servikal dislokasyondan sonra, virjin erişkin Wistar 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 banyosunda asıldı. İstirahat gerimi altında spontan kontraksiyonlar gözlemlendikten sonra potasyum siyanür (KCN), piruvat, glibenklamid veya tetraetilamonyum (TEA) organ banyosuna uygulanarak izometrik kontraksiyonların frekans ve amplitütlerine olan etkileri 10 dakikalık periyotlar halinde değerlendirildi. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Wilcoxon rank testi kullanıldı.

KCN (0.5 veya 1 mM) spontan kontraksiyonları kademeli başlayan bir etkiyle NaHCO₃ içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde HEPES kullanılanlara göre çok daha belirgin düzeyde inhibe etti. Bu inhibisyon piruvat (10 mM) uygulamasıyla geri döndürülürken, ATP-duyarlı K⁺ kanal blokeri glibenklamid (100 µM) uygulaması bu inhibisyonu geri döndürmedi (n=5). İlave olarak spontan miyometriyal kontraksiyonların KCN (1 mM) ile inhibisyonu 1 mM TEA uygulanmasıyla geri döndürüldü (n=6).

Bu çalışmanın bulguları sıçan miyometriyumunda KCN ile indüklenen metabolik strese bağlı gelişen kontraktıl inhibisyonda KCN'nin çalışılan dozları için K⁺ kanallarının kısmen de olsa rol aldığını ve inhibisyonun piruvat uygulaması ile önlenebildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Miyometriyum, kasılma, piruvat, pH, TEA, KCN, glibenklamid.



2. ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the role of different pH buffers, different energy sources and role of ion channels in metabolic stress induced by KCN on contractility of myometrium.

Myometrial strips were isolated from virgin adult Wistar rats after cervical dislocation and suspended in an isolated tissue bath containing Krebs solution continuously bubbled with 95%O₂ and 5%CO₂ maintained at 37°C (pH 7.4). After manifestation of spontaneous contractions following equilibrium under resting tension potassium cyanide (KCN), pyruvate, glybenclamide or tetra ethyl ammonium (TEA) was applied to the tissue bath. The amplitude and frequency of contractions were evaluated by 10-min intervals. Wilcoxon rank test was used for statistical analysis of data.

KCN (0.5 or 1 mM) gradually inhibited the spontaneous contractions, being more effective in experiments where NaHCO₃ was used in Krebs solution instead of HEPES. This inhibition was reversed by pyruvate (10 mM) and K⁺ channel blocker TEA. Application of ATP-sensitive K⁺ channel blocker glybenclamide did not reverse KCN-induced inhibition of myometrial contractions.

In conclusion, results from this study indicates that K⁺ channels plays a role, at least partially, in KCN-induced inhibition of myometrial contractions of rat and this inhibition can be reversed by pyruvate.

Key Words: Myometrium, contraction, pyruvate, pH, TEA, KCN, glybenclamide.

3. GİRİŞ

İzole uterus dokusu 1900'lü yıllardan beri kullanılarak, uterus fizyoloji ve farmakolojisi hakkındaki mevcut bilgilerin elde edilmesinde önemli katkılar sağlamıştır. İlk defa 1906 yılında Dale tarafından nörohipofiziyel ekstraktların uterus kasılmalarına yol açtığından keşfedilmesinden beri, izole uterus dokusu (miyometriyum), bu dokunun kendi fizyolojisinin anlaşılması başta olmak üzere ve tokolitik etkiye sahip farmakolojik ajan belirlenmesi gibi klinik amaçlar dahil yaygın olarak kullanılmaktadır.

1930'lu yıllarında Kurzrok ve Lieb (Kurzrok and Lieb (1930), tarafından prostaglandinlerin keşfedilmesine yol açan bir bulgu olan insan seminal sıvısının insan uterus kasında kasılmaya yol açtığından gösterilmesi, izole uterus dokusunun farmakoloji ve geniş anlamda tıp bilimine çok önemli katkısı olmuştur (Bergström ve ark., 1968).

Düz kaslar, kan damarları, mide, barsaklar, mesane, hava yolları, penis ve klitoris kavernoza sinuslarında ve uterus gibi çeşitli içi boş organların duvarlarında bulunmaktadır. Kasıldığında kısalan düz kaslar duvarını teşkil ettiği organın luminal içeriğini ileri doğru iter. Ayrıca derideki kıllara ve lens ile irise tutunmuş düz kas demetleri de vardır. Bu düz kaslar kasıldığında ise kıllar dikleşir, gözün optik kısımlarında şekil değişikliği oluşarak ışığın retina üzerine odaklanması sağlanır.

Düz kaslar iskelet ve kalp kaslarında bulunan çizgili bantları ihtiva etmezler ve otonom sinir sistemi tarafından innerve edilirler. Düz kasların kasılabilirliği hormonlar, otokrin ve parakrin ajanlarla diğer lokal kimyasal

sinyallerle sağlanır. Yük ve boyutta meydana gelen değişikliklere bağlı olarak düz kas hücreleri tonik veya fazik kasılmalar gösterir. Özofagus, mesane ve uterus gibi bazı düz kaslar daha çok gevşemiş halde bulunurlar ve volüm artışına bağlı gerilme ve/veya nöronal stimulasyonla kasılırlar. Sfinkterler ve damar düz kas hücreleri tonik olarak kasılırlar. Uyarı ne olursa olsun, düz kas hücrelerinde kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) kasılmayı başlatır. Aktin ve miyozin molekülleri arasındaki çapraz köprü oluşma siklusu kasılmanın gücünün oluşumunu sağlar.

Bu çalışmanın giriş bölümünde genel esasları sunulacak düz kas kasılma ve gevşeme mekanizmasıyla ilgili güncel araştırma sonuçlarının da yer aldığı kitap ve detaylı güncel derlemeler mevcuttur (2, 12, 23, 25).

3.1. Kasılma Mekanizması

Vücutta düz kas kasılması, kontraktıl proteinler olan aktin ve miyozinin reseptör aracılı veya mekanik bir uyarıyla aktive edilmesi sonucu gerçekleşir. Aksiyon potansiyeli ateşlemesine bağlı veya plazma membranı gerime duyarlı iyon kanallarının aktivasyonu sonucu membran elektriksel potansiyelinde değişme gerçekleşmesi kasılmayı tetikleyebilir. Kasılmanın gerçekleşebilmesi yani aktin ve miyozin moleküllerinin etkileşmesi için; miyozinin 20-kilo daltonluk (kDa) zincirinin miyozin hafif zincir kinaz (MHZK) tarafından mutlaka fosforile edilmesi gerekir. Miyozin-ATPaz aktivitesi ile adenosin trifosfat (ATP) dan sağlanan enerji ile aktin ve miyozin arasında çapraz köprü oluşma siklusu sağlanarak kasılma gerçekleştirilir. Düz kaslarda kontraktıl aktivite esas olarak miyozin hafif zincirinin fosforilasyon durumu tarafından kontrol edilir. Bazı düz kas

hücrelerinde miyozin hafif zincirinin fosforilasyonu eksternal bir stimulus olmaksızın düşük bir düzeyde devam eder; bu aktivite sonucu ortaya çıkan ve şiddeti değişebilen bu duruma düz kasların tonusu denir.

Uterusun düz kaslardan oluşan kısmını teşkil eden miyometriyumun aktivitesi, genelde türe bağımlı olarak etki eden pek çok ajan tarafından modüle edilmektedir.

Uterus kasının kasılma ve gevşeme mekanizması pek çok derlemenin konusu olmuş; bu konuda çok sayıda bilimsel orijinal araştırmaları bulunan Liverpool Üniversitesi öğretim üyelerinden Suzan Wray tarafından detaylı olarak ele alınmıştır (39, 40)

Bunlara ilave olarak kalsiyum kanal blokerleri (17), ATP duyarlı K^+ kanalı açıcılar (8), Ca^{2+} bağımlı K^+ kanal açıcıları (26), nitrik oksit (4) ve bir polipeptid hormon olan relaksin (16) miyometriyum gevşemesine yol açmaktadır. İlave olarak melatonin, antibakteriyel etkisinden bağımsız bir mekanizmayla eritromisin ve fosfodiesteraz inhibitörü sildenafil sitrat gibi çeşitli grup ajanların da miyometriyumu gevşetici etkileri kendi laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalarla da gösterilmiştir (1, 7).

3.2. Düz Kas Gevşeme Mekanizmaları

Düz kas gevşemesi ya kasıcı uyarıların etkilerinin ortadan kaldırılması ya da kontraktıl mekanizmada direk bir inhibisyon sağlayan bir maddenin etkisi ile gerçekleşir (ör., bir vazodilatör olarak nitrik oksit). Sebep olan faktör ne olursa olsun, gevşeme için hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun azalması ve miyozin hafif zincir fosfataz aktivitesinin artmış olması gerekir (31). Kalsiyum birikmesi ya da uzaklaştırmasından

sorumlu mekanizmalarla miyozin hafif zincir fosfataz aktivitesini değiştiren faktörler anormal düz kas cevaplarının oluşmasına yol açabilir.

Düz kaslarda kasılmayı başlatan Ca^{2+} düzeyinde meydana gelen bir azalma düz kasların gevşemesine yol açar. Hücre içi serbest kalsiyumun uzaklaştırılmasında rol alan çeşitli mekanizmalar arasında kalsiyumun sarkoplazmik retikuluma geri alınması ve plazma membranı aracılığı ile hücre dışına atılma da yer alır. Sarkoplazmik retikuluma kalsiyum alınması ATP gerektirir (38). Sarkoplazmik retikular Ca-Mg-ATPaz fosforile olduğunda iki kalsiyum iyonuna bağlanarak bunların luminal yüze geçerek sitoplazmaya salıverilmesine yol açar. ATPaz'ın katalitik bölgesine bağlanan Mg^{2+} bu enzimin aktivasyonu için şarttır. Vanadat, tapsigarjin, siklopiazonik asit gibi çeşitli farmakolojik ajanlar bu sarkoplazmik retikular Ca-Mg-ATPazı inhibe ederler. Sarkoplazmada bulunan kalsiyum bağlayan proteinler de hücre içi serbest kalsiyum düzeyinin azaltılmasına katkıda bulunurlar. Kalsekuestrin ile kalretikulinin düz kaslarda sarkoplazmik retikular kalsiyumu bağladığı son yıllarda gösterilmiştir.

Plazma membranında bulunan Ca-Mg-ATPazlar da hücre içi kalsiyumu uzaklaştıran bir başka mekanizmadır. Bu enzim, kalmodulinle bağlanarak plazma membranında yer alan Ca^{2+} pompasını uyarabilen bir oto-inhibitör bölgeye sahip olma özelliği ile kendisinin sarkoplazmik analogundan farklılık arz eder.

Plazma membranında yer alan Na^+/Ca^{2+} değiş tokuş pompası da hücre içi Ca^{2+} düzeyinin azaltılmasına katkıda bulunan bir başka mekanizmadır. Hücre içi serbest Ca^{2+} düzeyi ile yakından alakalı,

kalsiyuma düşük affiniteli bu pompa amilorid ve kinidin gibi farmakolojik ajanlarla bloklanabilir.

Plazma membranında yer alan reseptör-bağımlı ve voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları da hücreye kalsiyum girişine aracılık ederek düz kas kasılmasında önemli rol oynarlar. Bu kanalların inhibisyonu da düz kas gevşemesine sebep olur. Dihidropiridinler, fenilalkilmaninler ve benzodiazepinler gibi kalsiyum kanal blokerleri, hücre dışından kalsiyum girişini önleyerek düz kas kasılmasını inhibe ederler (38, 40).

3.3. Miyometriyum Kasında Uyarılabilme

Miyometriyumda hangi hücrelerin pacemaker hücreler olduğu ya da her hücrenin pace aktivitesi olup olmadığı hala bilinmemektedir. Çünkü uterusu pace maker hücreler midede olduğu gibi anatomik olarak farklı veya belli bir bölgede yer alan hücreler değildir. İlave olarak spontan kontraksiyonların başlatıcısı pacemaker aktivitenin iyonik temeli de bilinmemektedir.

Doğuma yakın dönemde miyometriyumda iyon kanalı ekspresyonunda değişiklik olup olmadığı çeşitli araştırmalarla incelenmiş; insan miyometriyumunda gebelik süresince Ca^{2+} kanallarının ekspresyonu bakımından hiçbir değişme olmadığı, sıçan miyometriyumunda ise gebelik boyunca bu kanalların yoğunluğunda artma olduğu tespit edilmiştir (24). Potasyum kanal yoğunluğunda kesinlikle değişme olduğu; kalsiyum bağımlı K kanallarından, voltaj bağımlı K kanallarına doğru geçişin olduğu bildirilmiştir (9).

Miyometriyal hücrelerin depolarizasyonu sonucu membran voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasına ve en azından sıçan miyometriyumunda L tipi membran kalsiyum kanallarının açıldığı tek başına bütün kalsiyum girişinden sorumlu olduğu açıktır. İnsan miyometriyumunda görevi net olarak bilinmemekle birlikte T-tipi kalsiyum kanallarının da mevcut olduğu bilinmektedir (42).

Ancak, miyometriyal hücrelerde spontan kontraksiyonların başlamasını tetikleyen uyarı sistemi ve uyarıların özellikleri hakkında yeterli bilgi mevcut değildir.

3.4. Uterus Karmaşık Bir Organdır

Memeli uterus dokusu 3 katmandan meydana gelmektedir: Luminal yüzeyde yer alan endometriyum, ortada yer alan kas tabakası miyometriyum ve en dışta yer alan seroza.

İmplantasyonun gerçekleştiği kısım olan endometriyum türlere göre farklılık arz eder ve kalınlığı menstrual döneme göre değişiklik gösteren bu katman gebelikte çok sayıda kan damarı dallanması ile oldukça kalınlaşır. Çeşitli hücre tiplerinden oluşan bu katman prostanoidler (13) platelet aktive edici faktör (18) ve endotelin (21) gibi kendisine komşu olan düz kas tabakasında kasılmalara yol açabilen çeşitli maddeleri sentezlemektedir

Miyometriyum kasılma ve güç oluşturulmasından sorumlu kısım olup enine ve boyuna olmak üzere 2 kas katmanı içermektedir. Enine (sirküler) kaslar endometriyum ile uzunlamasına (longitudinal) kas tabakası arasında olup longitudinal kas tabakası ise serozaya komşudur. Uzunlamasına kasların kasılması uterus hornlarının boyunun kısılmasına

yol arken, sirküler kasların kasılması lümenin daralmasına yol açar. Belli aralıklarla iki tabaka lifleri birbiri ile kesişebilir ve bu bölgeler kan damarları ile sinir terminalleri bakımından zengindir. Belli türlerde birbirinden kolaylıkla ayrılabilen iki tabakanın, sıçan uterusu için ayrımı zordur. Uzunlamasına alınan kas kesitleri ile longitudinal kas tabakasının kasılabilirliği belirgin olarak incelenebildiğinden bu tez çalışmasında tam kalınlıkta uterus kesitleri asılmakla beraber uzunlamasına kas tabakasının kasılmaları incelenmiştir (19).

Seroza tabakasının kasılmanın fizyoloji ya da farmakolojisini etkilediğine dair hiçbir veri bulunmamaktadır. Uzaklaştırılması kas dokusuna hasar meydana gelme riski taşıdığından bu tabaka da literatürde yer alan sıçan miyometriyum kesitlerinde olduğu gibi uzaklaştırılmamıştır.

3.5. Hipoksi ve Düz Kas Kasılması

Vct dokularının normal fonksiyonlarını yerine getirmesi için yeterli düzeyde kan perfüzyonu sağlanması gerekir. Beyin gibi bazı dokular perfüzyonun aksamasından hızla olumsuz etkilenirken, deri ve gastrointestinal kanal dokularının perfüzyon azalmasına bağlı hipoksiye karşı daha dirençli olduğu bilinmektedir. Düz kaslar yavaş bir metabolizma hızına sahip olduklarından belli bir periyottaki anoksik duruma karşı dirençli oldukları düşünülmektedir. Düz kaslar, aktiviteleri, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından önemli farklılıklar arz etmektedir ve anoksik duruma dayanırlıkları bakımından farklılıklar arz ederler. *In vitro* alışma sonuçları, uterus (37) ve mesane (36) düz kaslarının anoksik

ortamda hızla kasılma gücünü kaybettiklerini göstermiştir. Uterus kontraksiyonları uterusun perfüzyonuna şiddetli derecede bağımlıdır. Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir *in vivo* çalışmayla hipoksi sonucunda uterus kontraksiyonlarının hızla ortadan kalktığı gösterilmiştir (11, 14). Bu durum doğum esnasında uterusun şiddetli kasılmaları sonucunda kendini besleyen damarlarda meydana getirdiği baskı sonucu takip eden kasılmaların ve doğum eyleminin etkilenebileceği klinik önemi olan bir gerçeği yansıtmaktadır.

Uterus dokusuna *in vivo* olarak kan akımının azalması, anaerobik metabolizmanın uyarılması, ATP gibi bazı metabolitlerde değişme ve pH'nın düşmesi gibi metabolik sonuçların ortaya çıkmasına yol açar. Bunlar da direk veya indirek olarak uterus kasılabilirliğini etkiler. Örneğin hücre içi pH düşmesi sonucu insan ve sıçan miyometriyum kasılmasının inhibe olduğu gösterilmiştir (15, 27).

Yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçları, hipoksi sonucunda uterus kasılmasının baskılandığını açıkça ve fikir birliği içerisinde ortaya koymaktadır. Ancak hipoksi sonucunda kasılma gücünde meydana gelen kaybın mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için inhibisyona aracılık eden iyonik mekanizmalar ile pH, enerji kaynakları olarak fosfokreatin ve inorganik fosfatlar hakkında daha detaylı bilgi elde etmek amacıyla, potasyum siyanür (KCN) uygulaması ile kimyasal doku hipoksisi oluşturularak uterus dokusunda *in vitro* ortamda deneyler gerçekleştirildi. İzole sıçan miyometriyumunda siyanürle oluşturulan metabolik stresin

miyometrium kasılmasına inhibitör etkisinde değişik pH tamponlarının, farklı düzeylerdeki glikozun ve K^+ kanallarının rolü araştırıldı.

Piruvatın milimolar konsantrasyonları sitoplazmik redoks potansiyelini azaltarak ($[NADH_s]/[NAD^+_s]$) ve hücrel fosforilasyon potansiyelinin devamını sağlayarak ($[ATP]/[ADP][P_i]$) metabolik stres esnasında hücrel fonksiyonu artırır.

Siyanür zehirlenmesi esnasında, oksijen kullanımında meydana gelen düşme sitosolik redoks oranında artmaya sebep olur (laktat/piruvat $[NADH_c]/[NAD^+_c]$), ATP depoları tükenir, hücrel fosforilasyon potansiyeli düşer ve hücre enerji kaynağı ve kullanımı kaybolur. $[NADH_c]/[NAD^+_c]$ oranında piruvatla sağlanan düşme, gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz/fosfogliserat kinaz sistemi aracılığı ile fosforilasyon potansiyeli ($[ATP]/[ADP][P_i]$) ile sitoplazmik redoks durumu arasında kenet sağlayarak hücrel fosforilasyon potansiyelinde artmaya sebep olur (30).

Piruvatın oksidatif metabolizma üzerine ikinci bir pozitif etkisi de ATP ve mitokondrial NADH oluşumunu uyarmasıdır. Hepsinden önemlisi, fosforilasyon potansiyeli olup; bu da fizyolojik, metabolik veya patolojik uyarılara cevap verebilen $[ATP]/[ADP][P_i]$ 'nin metabolik oranının termodinamik karşılığıdır (6, 30). Vital enzim ve iyon pompası fonksiyonları sitosolik fosforilasyon potansiyeli ile çok yakın bir ilişki içindedir (22). Bundan dolayı iskemik stresten derlenmede $[ATP]/[ADP][P_i]$ oranının fizyolojik sınırlar içerisinde tutulması son derece önemlidir. Dışardan piruvat sağlanmasının hem kalp hem de damar düz kaslarında mitokondrial NADH ve oksijen kullanımı ile fosforilasyon potansiyelini

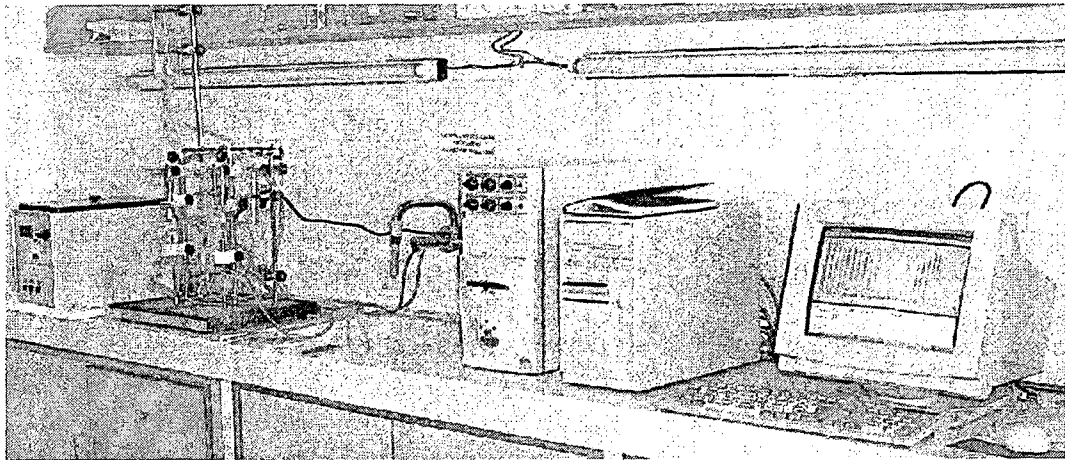
artırdığı tespit edilmiştir (3, 6, 30). Bununla birlikte piruvat sisteminin diğer bir düz kas olan miyometriyumda ve *in vitro* ortamlarda etkili olup olmadığı bilinmemektedir. KCN ile sağlanan metabolik inhibisyonda dışardan verilecek piruvatın, yukarıda bahsedilen mekanizmalar aracılığı ile kasılmalar üzerine olası etkisi araştırıldı.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. İzole Organ Banyosu

Bu sistem, uterus şeritlerinin yerleştirildiği hazne, çözelti bulunan depo, depo ve hazneler arasında Krebs çözeltisinin akmasını ve boşaltımı sağlayan iletim hortumlarıyla, izometrik güç dönüştürücüden oluşmaktadır (Şekil 1) Tüm sistem ceket tarzındaki yapısı sayesinde, termostatlı dolaşım pompasından sağlanan 37°C'deki distile suyla dışarıdan ısıtılmaktadır. %95 O₂ ve %5 CO₂ gaz karışımıyla izole organ banyosunun içinde yer alan Krebs solüsyonu sürekli gazlandırıldı. İzometrik güç dönüştürücüsü (MAY IOBS 99), miyometriyum şeridinde meydana gelen kasılmayla oluşan gücü biyoelektriksel potansiyellere dönüştürmektedir. Elde edilen biyoelektriksel potansiyeller de amplifikatöre aktararak amplifiye edilmekte ve oradan analog/dijital dönüştürücü ara birim vasıtasıyla bilgisayar ortamına aktararak kayıt edilmektedir. Veriler Biopac 10.0 programının bulunduğu bilgisayar ortamına kaydedilmektedir.



Şekil 1. Miyometriyal izometrik kasılmaların ölçüldüğü sistem

4.2. Kullanılan Solüsyonlar

Çalışmada farklı pH tamponları içeren iki farklı Krebs solüsyonu kullanıldı. Kullanılan her iki solüsyon da literatürde izole sıçan miyometriyum kasılmalarının kayıt edilmesinde kullanılmış içeriğe sahipti.

NaHCO₃ içeren Krebs solüsyonu (mM/L): NaCl, 154; MgSO₄, 1.2; KCl, 5.4; CaCl₂, 2; ve dekstroze 11.5; NaHCO₃, 23.8.

HEPES (sulfonik asit N-(hidroksi-2-etil)-piperazin N'-2-etan) içeren Krebs solüsyonu: (mM/L): NaCl, 154; MgSO₄, 1.2; KCl, 5.4; CaCl₂, 2; ve dekstroze 11.5; HEPES, 10.

Bidistile, de-iyonize su kullanılarak her gün taze olarak hazırlanan Krebs solüsyonunun pH'nı ölçülerek gerektiğinde 7.4'e ayarlandı. Solüsyon hazırlanırken kalsiyum klörür ve magnezyum klörür ayrı ayrı çözüldükten sonra toplam çözeltiye ilave edildi. Solüsyon hazırlama esnasında ilave dilen kimyasal içeriğin tamamen çözünmesini sağlamak ve çökmeyi önlemek için solüsyon sürekli çalkalandı.

4.3. Uterus Şeritlerinin Hazırlanması

Çalışmada Wistar cinsi yetişkin virjin dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık ortamda, oda ısısında plastik kafeslerde dörderli gruplar şeklinde tutuldu. Standart pelet sıçan yemleriyle beslendi ve musluk suyu verildi. 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

koyuldu. Uterus hornunun antimezenterik kenarı longitudinal istikamette düzgünce açıldı. 2X10 milimetre boyutlarında longitudinal yönde uterus şeritleri kesildi. Şeritlerin her iki ucundan ipek iplerle bağlanarak bir ucu içinde Krebs çözeltisi bulunan haznenin tabanına sabitlendi. Diğer ucu ise yine ipek iplikle izometrik güç dönüştürücüsüne bağlandı.

4.4. Deney Prosedürü

Sıçanlardan izole edilen uterus hornlarından 10X2X1 milimetre boyutlarında kesitler hazırlandı. Her bir sıçandan aynı amaçlı deneyler için sadece bir kesit kullanıldı. Kesitlerin alt ucu ipek bir iplikle organ banyosunun alt kısmına üst ucu ise gene bir ipek ile izometrik güç çevirgecine sabitlenerek organ banyosunda vertikal olarak asıldı.

Deneye başlamadan izometrik güç çevirgecine 1 gramlık bir ağırlık asılarak bilgisayarda yazılım sisteminde gözlenen değer belirlendi ve sistem 1 gramlık gerimi göstermek üzere kalibre edildi. Daha sonra izometrik güç çevirgeci ile bağlantılı mikro oynatıcı hareket ettirilerek asılan miyometriyum kesitine 1 gramlık bir istirahat gerimi uygulandı ve miyometriyum kesiti bu istirahat gerimine adapte olmak üzere 30 dakika beklendi. Bu esnada her 10 dakikada bir miyometriyum kesiti taze Krebs solüsyonu ile yıkandı. 30 dakikalık denge döneminin sonunda kesitin asılı olduğu organ banyosuna 60 mM KCl uygulanarak kasılmalar indüklendi; bu uygulamanın bir amacı da miyometriyum kesitlerini ilave olarak uyararak denge ve standardizasyon sağlamaktır. KCl uygulamasına kasılma cevabı vermeyen kaslar deneyden çıkarıldı. KCl uygulaması 1

dakika süreyle gerçekleştirildi ve takip eden 10 dakika içerisinde kesit 3 defa daha taze Krebs solüsyonu ile yıkanarak KCl' ün etkisi giderildi.

Bu denge işlemlerinden sonra yazılım programında daha önce gözlenmekte olan kasılmalar kayıt edilmeye başlandı. Takip eden 10 dakikalık periyot kontrol dönemi olarak kabul edildi. Kontrol periyodunun sonunda banyoya potasyum siyanür (KCN 0.5 ve 1 mM) uygulanarak kasılmalar 10 dakika daha kayıt edildi. KCN uygulamasından sonra ise deney protokolüne göre enerji kaynağı olarak piruvat (10 mM), seçici olmayan potasyum kanal blokeri tetraetilamonyum (TEA, 1 mM) veya ATP duyarlı potasyum kanal blokeri glibenklamid uygulanarak 10 dakika daha kayıt alındı.

Kasılmaların amplitüt ve frekansları 10'ar dakikalık periyotlar halinde değerlendirildi. Kasılmaların amplitütleri miligram (mg) cinsinden, frekansları ise kasılma sayısı (kasılma sayısı/10dakika) olarak hesaplandı. Kasılma gücü karşılaştırmasında ise 10 dakikalık periyotlarda kasılma eğrileri altında kalan alan hesaplanarak karşılaştırmalar % olarak yapıldı.

4.5. Kimyasal Ajanlar

Bu tez çalışmasında Krebs solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan bütün kimyasallar analitik saflık düzeyindeydi (Sigma, Desisenhofen, Almanya). KCN (Sigma) ve piruvat (Pyruvic Acid, Sigma) Krebs solüsyonunda hazırlandı. Glibenklamid ise dimetil formamid (DMF) içerisinde çözüldükten sonra Krebs solüsyonunda istenen konsantrasyonlara sulandırıldı. DMF kullanılan konsantrasyonda sıçan miyometriyum kasılmalarına anlamlı bir etki göstermemekteydi (1).

4.6. Veri Analizi

Bütün veriler ortalama $\pm$ standart hata (Mean $\pm$ SEM) olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmelerde "SPSS 10.0 for Windows" istatistik paket programı kullanıldı. Amplitüt ve frekans değerlerinin istatistiksel değerlendirmelerinde non-parametrik Wilcoxon Signed Rank testi kullanıldı, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.



5. BULGULAR

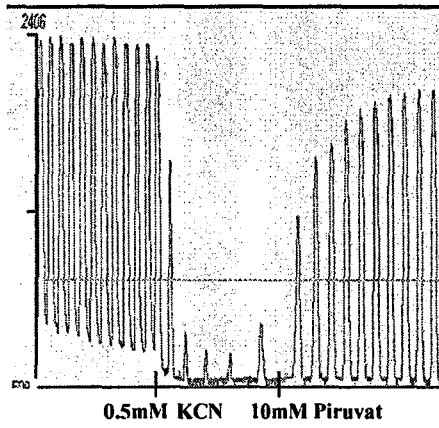
5.1. NaHCO₃ İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan Kayıtlarda KCN'nin Kasımlara İnhibitör Etkisi ve Piruvat Uygulaması

NaHCO₃ içeren Krebs solüsyonu kullanılan kayıt koşullarında spontan kontraksiyonlarda 0.5 mM KCN uygulaması ile inhibisyon meydana geldi ($p<0.05$, Şekil 2A). Şekil 2A'da da görüldüğü gibi 0.5 mM KCN uygulaması kısa bir süre içerisinde amplitütlerde ($p<0.05$) ve eğri altında kalan alanda ($p<0.05$) anlamlı bir inhibisyon meydana getirdi. KCN uygulama periyotunda oldukça küçük amplitütlü ve anlamlı ölçüde azalmış ($p<0.05$) frekansta birkaç minyatür kasılma gözlemlendi (Tablo1).

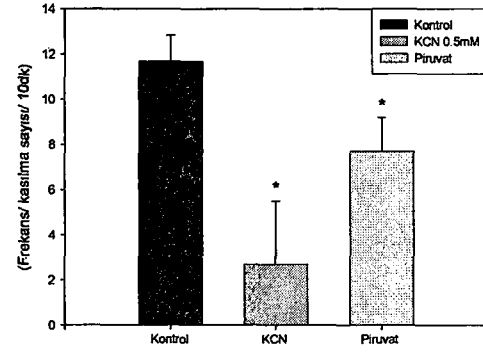
Daha sonra bu inhibisyonun 10 mM piruvat uygulaması ile ortadan kalkıp kalmadığı incelendi. Piruvat uygulaması KCN oluşturduğu inhibisyonu kasılmaların hem amplitüt hem de frekans değerleri bakımından anlamlı düzeyde ortadan kaldırdı ($p<0.05$). Kontrol kayıtları ile piruvatla geri döndürülen spontan kasılma kayıtlarının ortalama değerleri arasında frekans ve amplitüt bakımından farklılık varken (Şekil 2 B-C, Tablo 1), alan bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 2 D). Bu da piruvatın KCN ile indüklenen inhibisyonu belirgin olarak geri döndürdüğünü göstermektedir.

Tablo 1. NaHCO₃ Krebs solüsyonunda 0.5 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=7, * $p<0.05$).

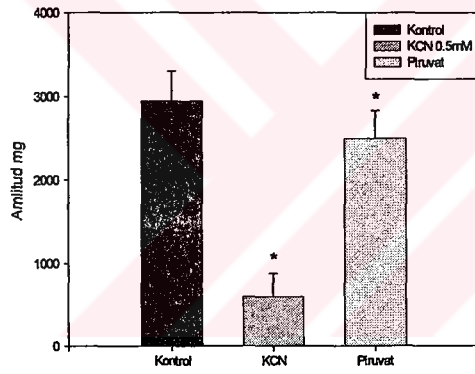
	Kontrol	KCN (0.5 mM)	Piruvat (10 mM)
Frekans	11.7±0.4	2.7±1*	7.7±0.5*
Amplitüt	2952±345	601±274*	2500±332*
Alan	1052±97	138±67*	1040±116



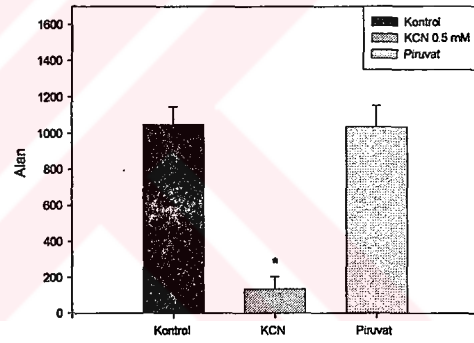
A



B



C



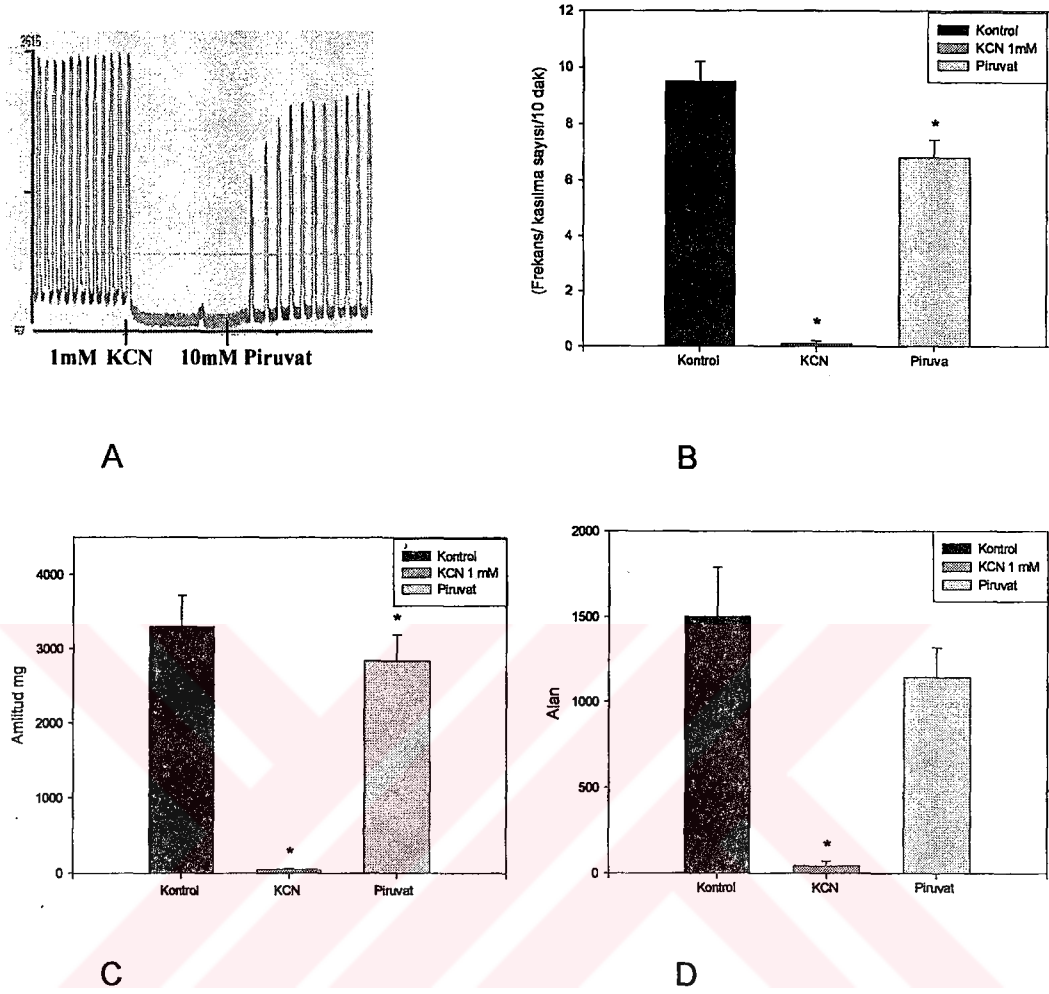
D

Şekil 2. NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) 0.5 mM KCN'nin kasılmalara etkisi ile ardından uygulanan piruvatın (10 mM) etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitütü göstermektedir (n=7). B) Kontrol, 0.5 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 0.5 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. D) Kontrol, 0.5 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (*p<0.05).

Miyometriyum spontan kasılmalarında KCN'nin 0.5 mM'lık düşük konsantrasyonu ile meydana gelen inhibisyonun piruvat uygulaması ile geri döndürülmesi bulgusu, KCN'nin bu dokunun canlılığını değil kasılabilme mekanizmasını etkilediğini ortaya koymaktadır. İlave deneylerde gene NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak KCN'nin yüksek konsantrasyonu (1 mM) ile kasılmalar üzerinde meydana gelecek inhibisyonda piruvatın etkisi incelendi. 1 mM KCN uygulandığında spontan kasılmaları tam anlamıyla inhibe etti ($p<0.05$, Şekil 3A). 10 mM piruvat uygulaması KCN'nin oluşturduğu inhibisyonu ortadan kaldırdı ($p<0.05$, Tablo 2). 0.5 mM KCN uygulaması için elde edilen bulgulara benzer şekilde, kontrol kayıtları ile piruvatla geri döndürülen spontan kasılma kayıtları arasında frekans ve amplitüt bakımından farklılık varken (Şekil 3 B-C), alan bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 3 D).

Tablo 2. NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri ($n=7$, $*p<0.05$).

	Kontrol	KCN (1 mM)	Piruvat (10 mM)
Frekans	9.5 ± 0.7	$0\pm0^*$	$6.8\pm0.6^*$
Amplitüt	3309 ± 413	$0\pm0^*$	$2846\pm352^*$
Alan	1503 ± 288	$0\pm0^*$	1145 ± 174



Şekil 3. NaHCO_3 içeren krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) 1 mM KCN'nin kasımlara etkisi ile ardından uygulanan piruvatın (10 mM) etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitüdü göstermektedir (n=7). B) Kontrol, 1 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 1 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. D) Kontrol, 1 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (*p<0.05).

5.2. HEPES İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan Kayıtlarda KCN'nin Kasımlara İnhibitör Etkisi ve Piruvat Uygulaması

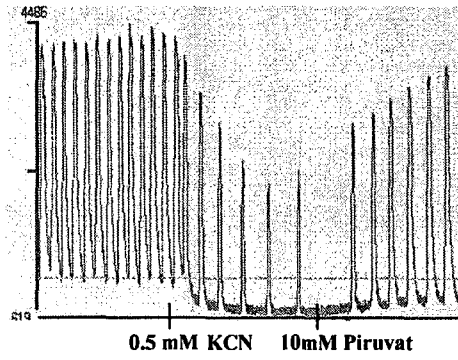
Bu kısım deneylerde Krebs solüsyonunda pH tamponu olarak HEPES kullanılarak; KCN'nin miyometriyum kontraksiyonu üzerine farklı bir pH tamponunun olası etkisi incelendi.

0.5 mM KCN uygulaması HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda da spontan miyometriyumun kontraksiyonlarını frekans ve amplitüt yönünden anlamlı ölçüde inhibe etti ($p<0.05$, Tablo 3). Ancak 0.5 mM KCN uygulaması NaHCO_3 'lı Krebs solüsyonu kullanılan deneylerde HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılanlara göre daha zayıf bir inhibisyon meydana getirdi.

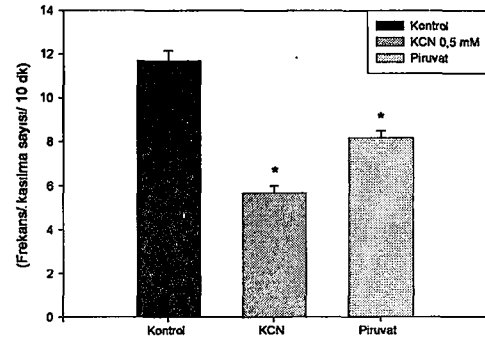
İnhibe olan bu kasımlara 10 mM piruvat uygulaması, KCN oluşturduğu inhibisyonu ortadan kaldırdı. NaHCO_3 kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlara benzer şekilde kontrol kayıtları ile piruvatla geri döndürülen spontan kasılma kayıtları arasında frekans ve amplitüt ortalama değeri bakımından hala farklılık varken (Şekil 4 B-C), alan bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4 D).

Tablo 3. HEPES içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değeri ($n=7$, $*p<0.05$).

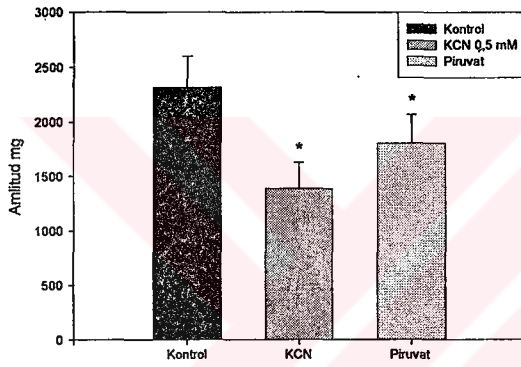
	Kontrol	KCN (0.5 mM)	Piruvat (10 mM)
Frekans	11.8 ± 0.46	$5.7\pm0.3^*$	$8.2\pm0.3^*$
Amplitüt	2320 ± 279	$1392\pm233^*$	$1809\pm259^*$
Alan	1324 ± 130	$398\pm68^*$	1250 ± 113



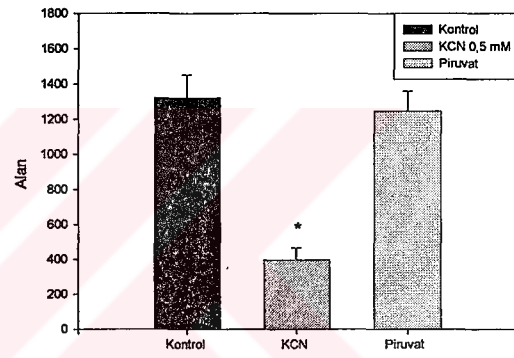
A



B



C



D

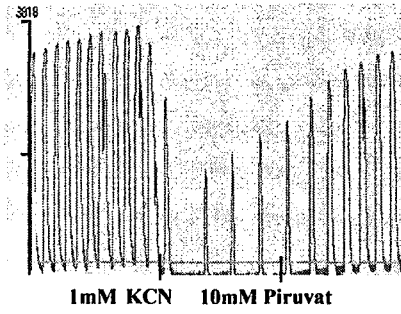
Şekil 4. HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) 0.5 mM KCN'nin kasılmalara etkisi ile ardından uygulanan piruvatın (10 mM) etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitüdü göstermektedir (n=7). B) Kontrol, 0.5 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 0.5 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. D) Kontrol, 0.5 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (*p<0.05).

1 mM KCN uygulaması HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda da spontan miyometriyumun kontraksiyonlarını frekans ve amplitüt yönünden anlamlı ölçüde inhibe etti ($p<0.05$, Tablo 4). Ancak 1 mM KCN uygulaması NaHCO_3 'lı Krebs solüsyonu kullanılan deneylerde HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılanlara göre daha zayıf bir inhibisyon meydana getirdi.

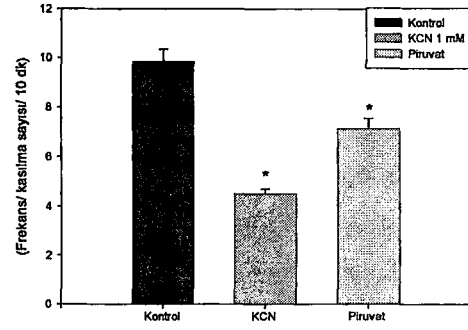
Inhibe olan bu kasılmalara 10 mM piruvat uygulaması, KCN' nin oluşturduğu inhibisyonu ortadan kaldırdı. NaHCO_3 kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlara benzer şekilde kontrol kayıtları ile piruvatla geri döndürülen spontan kasılma kayıtları arasında frekans ve amplitüt ortalama değerleri bakımından hala farklılık varken (Şekil 5 B-C), alan bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 5 D).

Tablo 4. HEPES içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri ($n=7$, $*p<0.05$).

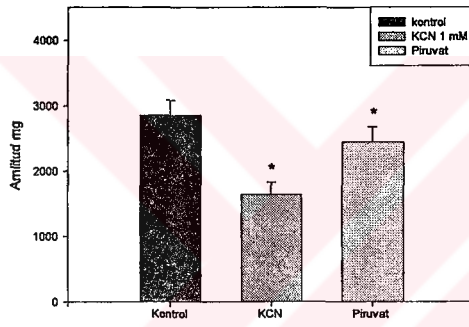
	Kontrol	KCN (1 mM)	Piruvat (10 mM)
Frekans	$9,85\pm0.5$	$4.5\pm0.2^*$	$7.14\pm0.4^*$
Amplitüt	2859 ± 226	$1641\pm188^*$	$2449\pm236^*$
Alan	1691 ± 141	$549\pm91^*$	1330 ± 139



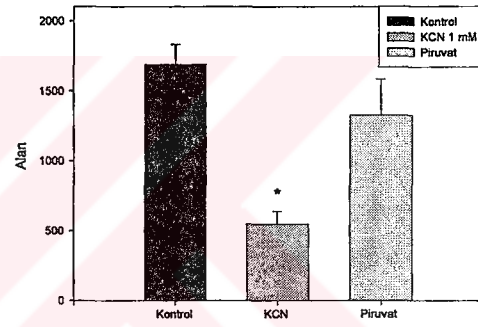
A



B



C



D

Şekil 5. HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) 1 mM KCN'nin kasılmalara etkisi ile ardından uygulanan piruvatın (10 mM) etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitüdünü göstermektedir (n=7). B) Kontrol, 1 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 1 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında ortalama amplitüd değerleri. D) Kontrol, 1 mM KCN ve Piruvat uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (*p<0.05).

5.3. Miyometriyum Kasılmaları Üzerine KCN'nin İnhibitör Etkisinde Potasyum Kanallarının Rolü

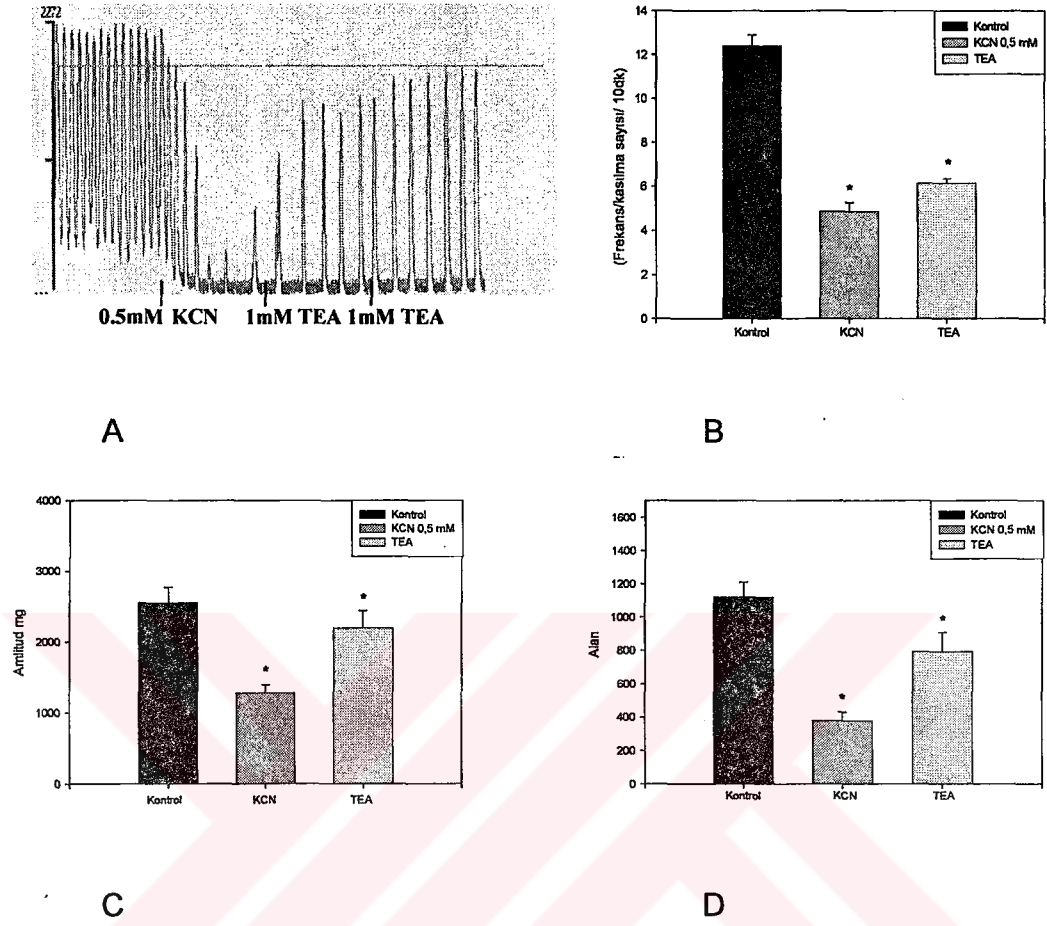
Spontan kasılmalar gözlenen miyometriyum kesitlerine KCN uygulaması kasılmaları inhibe etmekte; ancak bu inhibisyonun farklı bir enerji kaynağı olan piruvat ile geri döndürülebilmesi bulgusu, KCN'nin miyometriyum kasılmalarında inhibitör etkisinde potasyum kanallarının açılmasına bağlı membran hiperpolarizasyonunun olası rolünü akla getirdi. İlave deneylerde seçici olmayan potasyum kanal blokeri TEA kullanılarak bu inhibisyonda K^+ kanallarının olası rolü farmakolojik olarak incelendi.

5.3.1. NaHCO_3 İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan Kayıtlarda KCN'nin Kasımlara İnhibitör Etkisinde Potasyum Kanallarının Rolü

Bu amaçla; NaHCO_3 içeren krebs solüsyonu kullanılan kayıtlarda KCN 0.5 mM uygulanarak spontan kontraksiyonlar inhibe edildi ve KCN uygulama periyodu sonunda TEA (1mM) uygulandı. TEA oluşan inhibisyonu geri döndürdü ($p<0.05$, Tablo 5). Ancak spontan kontraksiyonlarla kıyaslandığında, TEA uygulaması sonrasında ortalama frekans, amplitüt ve kasılma eğrisi altında kalan alan bakımından anlamlı düzeyde daha düşük kasılmalar elde edildi ($p<0.05$, Şekil 6 B-C-D).

Tablo 5: NaHCO_3 'lı Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri ($n=7$, $*p<0.05$).

	Kontrol	KCN (0.5 mM)	TEA (1 mM)
Frekans	12.42±0.48	4.85±0.4*	6.14±0.2*
Amplitüt	2556±219	1284±114*	2204±237*
Alan	1121±89	379±51*	793±115*

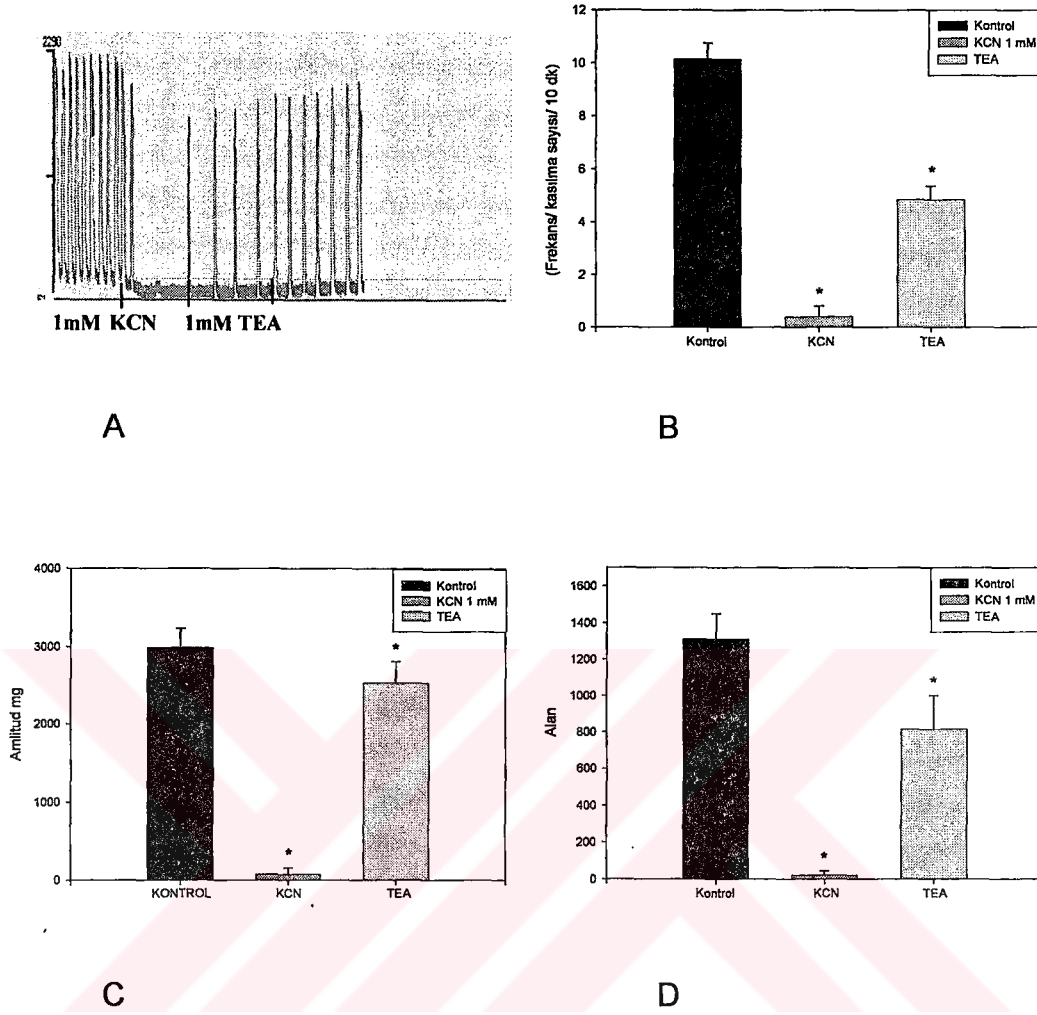


Şekil 6. NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) 0.5 mM KCN'nin kasılmalara etkisi ile ardından uygulanan TEA'un (1 mM) etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitüdü göstermektedir (n=7). B) Kontrol, 0.5 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 0.5 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. D) Kontrol, 0.5 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (*p<0.05).

İlave olarak 1 mM KCN uygulaması ile elde edilen inhibisyon ve buna 1 mM TEA oluşturduğu cevap incelendi (Şekil 7). 1 mM TEA, KCN'nin oluşturduğu inhibisyonu anlamlı düzeyde geriye döndürmektedir. Ancak spontan kontraksiyonlarla karşılaştırıldığında frekans, amplitüt ve alan bakımından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük kasılmalar elde edilmektedir ($p<0.05$, Şekil 7 B-C-D, Tablo 6)

Tablo 6. NaHCO₃ içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=7, * $p<0.05$).

	Kontrol	KCN (1 mM)	TEA (1mM)
Frekans	10.14±0.6	0.4±0.4*	4.85±0.5*
Amplitüt	2990±249	78.85±78.85*	2536±272*
Alan	1312±138	21.7±21.7*	815±185*



Şekil 7. NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; A) 1 mM KCN'nin kasılmalara etkisi ile ardından uygulanan TEA'un (1 mM) etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitüdü göstermektedir (n=7). B) Kontrol, 1 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. C) Kontrol, 1 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. D) Kontrol, 1 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (* $p < 0.05$).

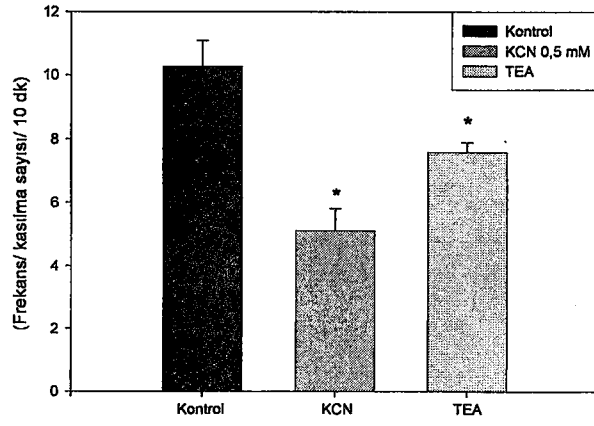
5.3.2. HEPES İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan Kayıtlarda KCN'nin Kasımlara İnhibitör Etkisinde Potasyum Kanallarının Rolü

Daha sonra, bir önceki deneyler HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanarak tekrarlandı. 0.5 mM KCN HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanarak gerçekleştirilen kayıtlarda da spontan miyometriyum kasılmalarını anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlendi. Ancak, HEPES kullanılan kayıt koşullarında 0.5 mM KCN uygulaması NaHCO₃ içeren Krebs solüsyonuna göre daha düşük oranda inhibisyon meydana getirdi.

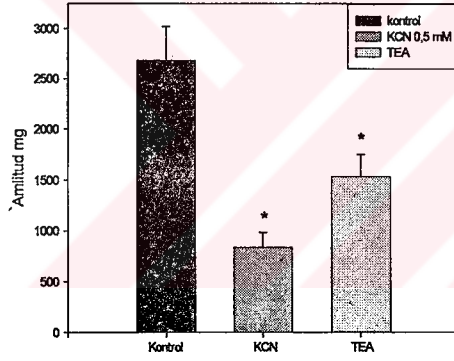
1 mM TEA uygulaması KCN oluşturduğu inhibisyonu geri döndürdü ($p < 0.05$, Tablo 7). Ancak, bu geri döndürme tam bir geri döndürme değildi çünkü; kontrol spontan kasılma kayıtları ile TEA geri döndürdüğü kasılmalar arasında frekans, amplitüt ve alan bakımından farklılık bulunmaktadır ($P < 0.05$, Şekil 8 A-B-C).

Tablo 7. HEPES içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değeri (n=6, * $p < 0.05$).

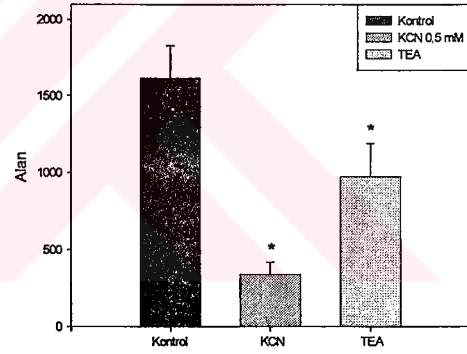
	Kontrol	KCN (0.5 mM)	TEA (1 mM)
Frekans	10.18±0.8	5.28±0.7*	7.6±0.3*
Amplitüt	2685±334	841±141*	1533±217*
Alan	1616±212	342±77*	974±213*



A



B



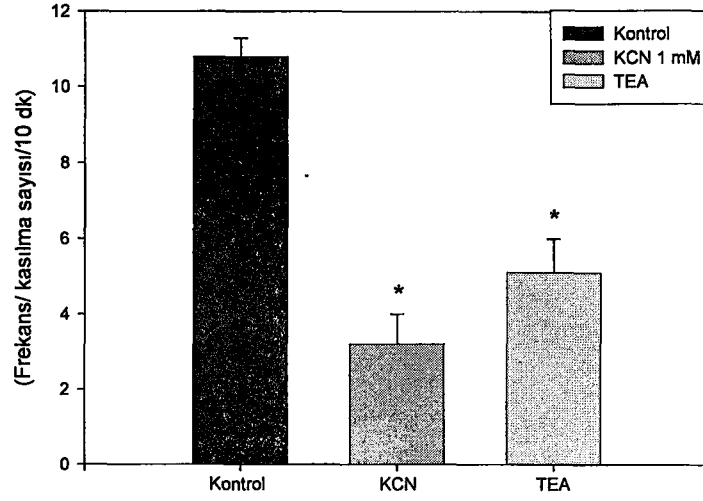
C

Şekil 8. HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda KCN ile indüklenen inhibisyona TEA'un etkileri (n=6); A) Kontrol, 0.5 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri. B) Kontrol, 0.5 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. C) Kontrol, 0.5 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (*p<0.05).

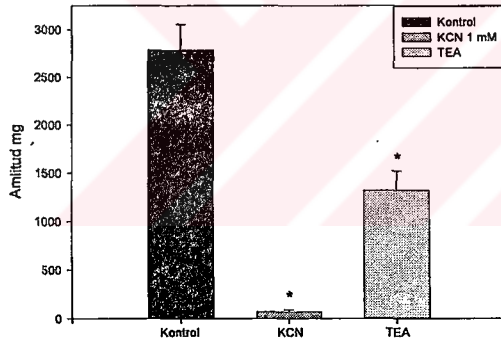
Bu uygulamaları takiben 1 mM KCN uygulanarak TEA'nın etkileri incelendi. 1 mM KCN spontan kasılmaları anlamlı ölçüde baskılamaktadır ($p<0.05$, Tablo 8). Ancak 1 mM KCN uygulaması NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonunda yaklaşık olarak %97 oranında inhibisyon meydana getirirken HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanıldığında bu oran %60'a düşmektedir. İnhibe olan bu kasılmalara 1 mM TEA uygulaması oluşan inhibisyonu ortadan kaldırdı ($p<0.05$). Ancak, kontrol kayıtları ile TEA geri döndürülen spontan kasılma kayıtları arasında frekans ve amplitüt bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (Şekil 9 A-B-C).

Tablo 8. HEPES içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri ($n=6$, $*p<0.05$).

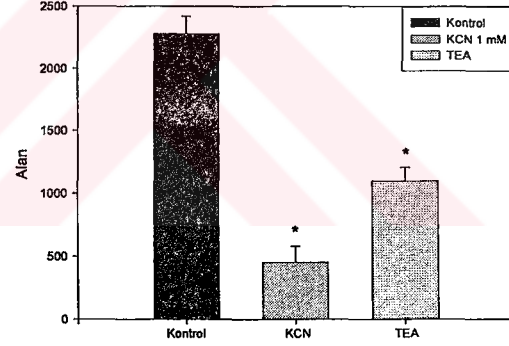
	Kontrol	KCN (1 mM)	TEA (1 mM)
Frekans	10.78 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.8*	5.1 $\pm$ 0.9*
Amplitüt	2785 $\pm$ 272	7.07 $\pm$ 1.97*	1325 $\pm$ 200*
Alan	2284 $\pm$ 136	452 $\pm$ 130*	1100 $\pm$ 108*



A



B



C

Şekil 9. HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda KCN ile indüklenen inhibisyona TEA'un etkileri; A) Kontrol, 1 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama frekans değerleri (n=6). B) Kontrol, 1 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında ortalama amplitüt değerleri. C) Kontrol, 1 mM KCN ve TEA uygulanması esnasında kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri (*p<0.05).

5.3.3. NaHCO₃ ve HEPES İçeren Krebs Solüsyonu Kullanılarak Yapılan Kayıtlarda KCN'nin Kasılmalara İnhibitör Etkisinde ATP-Duyarlı Potasyum Kanallarının Rolü

Bu uygulamaları takiben NaHCO₃ ve HEPES içeren krebs solusyonuna 0.5 mM ve 1 mM KCN uygulanarak, KCN'ün oluşturduğu metabolik inhibisyonda ATP-duyarlı potasyum kanallarının rolü incelendi. Bu amaçla ATP-duyarlı potasyum kanal blokeri olan glibenklamid uygulaması yapıldı. Glibenklamid KCN oluşturduğu metabolik inhibisyonu etkilemediği tespit edildi ($p<0.05$, Tablo 9, 10, 11, 12). KCN uygulaması ile glibenklamid kayıtları arasında frekans, amplitüt ve alan bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır.

Tablo 9. NaHCO₃ içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda 0.5 mM KCN ve 100 µM glibenklamid uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=5, * $p<0.05$).

	Kontrol	KCN (0.5 mM)	Glibenklamid (100 µM)
Frekans	12.06±0.53	5.05±0.4*	5.22±0.2*
Amplitüt	2438±242	1315±121*	1324±237*
Alan	1121±89	427±49*	431±51*

Tablo 10. NaHCO₃ içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 100 µM glibenklamid uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=5, * $p<0.05$).

	Kontrol	KCN (1 mM)	Glibenklamid (100 µM)
Frekans	10.24±0.6	0.55±0.4*	0.85±0.5*
Amplitüt	2984±249	88.85±68.22*	92.3±62*
Alan	1322±142	34.7±21.7*	42.4±18.5*

Tablo 11 HEPES içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN ve 100 µM glibenklamid uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=5, *p<0.05).

	Kontrol	KCN (0.5 mM)	Glibenklamid (100 µM)
Frekans	10.22±0.7	5.28±0.7*	5.36±0.9*
Amplitüt	2785±344	861±121*	899±117*
Alan	1723±264	355±76*	374±83*

Tablo 12. HEPES içeren Krebs solüsyonuna 1 mM KCN ve 100 µM glibenklamid uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüt ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n=5, *p<0.05).

	Kontrol	KCN (1 mM)	Glibenklamid (100 µM)
Frekans	10.54±0.5	3.3±0.7*	3.6±0.7*
Amplitüt	2864±287	7.92±1.89*	8.25±2.43*
Alan	2432±143	466±120*	488±108*

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın bulguları izole sıçan miyometriyumunda oksidatif fosforilasyonun potasyum siyanürle inhibisyonunun spontan miyometriyal kontraksiyonlarını doza bağlı olarak inhibe ettiğini; bu inhibisyonunu piruvat ve spesifik olmayan potasyum kanal blokeri TEA ile ortadan kaldırıldığını ancak ATP-duyarlı potasyum kanal blokeri olan glibenklamid ile önlenemediğini göstermektedir. İlave olarak, pH tamponu olarak NaHCO_3 içeren Krebs solüsyonunda alınan kasılma kayıtlarında HEPES kullanılan solüsyonlarda alınanlara göre KCN ile kasılmaların daha fazla inhibe olduğu saptandı. Ancak, KCN ile oluşturulan inhibisyonun piruvat ile ortadan kaldırılması yönünden HEPES ve NaHCO_3 arasında belirgin bir fark tespit edilemedi.

Düz kaslar kan damarları, mide, barsaklar, mesane, hava yolları, penis ve klitoris kavernoza sinuslarında ve uterus gibi çeşitli içi boş organların duvarlarında bulunmaktadır. Kasıldığında kısalan düz kaslar duvarını teşkil ettiği organın luminal içeriğini ileri doğru iter. Ayrıca derideki kıllara ve lens ile irise tutunmuş düz kas demetleri de vardır. Bu düz kaslar kasıldığında ise kıllar dikleşir, gözün optik kısımlarında şekil değişikliği oluşarak ışığın retina üzerine odaklanması sağlanır.

Düz kaslar iskelet ve kalp kaslarında bulunan çizgili bantları ihtiva etmezler ve otonom sinir sistemi tarafından innerve edilirler. Düz kasların kasılabilirliği hormonlar, otokrin ve parakrin ajanlarla diğer lokal kimyasal sinyallerle sağlanır. Yük ve boyutta meydana gelen değişikliklere bağlı olarak düz kas hücreleri tonik veya fazik kasılmalar gösterir. Özefagus,

mesane ve uterus gibi bazı düz kaslar daha çok gevşemiş halde bulunurlar ve volüm artışına bağlı gerilme ve/veya nöronal stimulasyonla kasılırlar. Sfinkterler ve damar düz kas hücreleri tonik olarak kasılırlar. Uyaran ne olursa olsun, düz kas hücrelerinde kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) kasılmayı başlatır ve aktin ve miyozin molekülleri arasındaki çapraz köprü oluşma siklusu kasılmanın gücünün oluşumunu sağlar.

Pek çok düz kas gibi miyometriyum da hipoksiden hızla etkilenir. Kan damarlarının gevşemesi sonucu hipoksik bölgeye daha fazla kan perfüzyonu sağlanması veya metabolik stres esnasında ATP'nin tüketiminin azalması gibi durumlarda hipoksiye bağlı düz kas kontraktilesinde meydana gelen baskılanma organizmayı koruyucu bir etki olabileceği gibi (18) ateroskleroz, vazospazm ve serebral kanama ile uterus distonisi gibi durumlarda belirgin bir disfonksiyona neden olur. Doğum eylemi için uterusun fazik kontraksiyonlarının yeterli bir sürede ve güçte sağlanması son derece önemlidir. İnsan ve büyükbaş hayvanlarda doğum eylemi esnasında aktif doku kasılmasının uterus kan damarlarına basınç yapması sonucu kan akımının azaldığı bilinmektedir (22). Perfüzyonda meydana gelecek azalma aktif olan bu dokuya oksijen ve glikoz sağlanmasını ve ATP sunumunu azaltacaktır.

ATP duyarlı potasyum kanalları (K(ATP)) pek çok düz kas gibi uterus kasında da mevcut olup, bu kanallar fizyolojik ATP düzeylerinde ($\approx 10-100 \mu M$) kapalıdır ve ATP düzeyinde düşüş sonucu aktive olurlar (38). Hipoksi durumunda ATP düzeyinde meydana gelen düşme, ADP düzeyinde artma (hücre içi pH düşüşünün yanında), bu kanalların açılması

sonucu membran hiperpolarizasyonu ve kasılmanın baskılanmasına yol açabilir (37). Ancak bu çalışmada siyanürle indüklenen spontan kontraksiyonların inhibisyonu K(ATP) kanal blokeri glibenklamid ile ortadan kaldırılamadı. Her ne kadar glibenklamidin benzer çalışmalarda kullanılan konsantrasyonları uygulandıysa da; bu durum deneylerde kullanılan doz için geçerli olup, daha yüksek konsantrasyonlarda farklı sonuçlar gözlenebilir.

Ayrıca hipoksi esnasında hücre içerisinde serbest kalsiyum düzeyinin arttığı bilindiğinden bu kalsiyumun, kalsiyum duyarlı potasyum kanallarını aktive ederek membran hiperpolarizasyonu sonucu spontan kasılmaları inhibe edebileceği bir başka olasılıktır (29).

Her kontraksiyon esnasında uterusu hipoksinin olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur (5). Kasılan kas liflerinin miyometriyum içerisinde yer alan kan damarlarına baskı uygulaması sonucu miyometriyuma kan akımı ve dolayısı ile oksijen sunumu azalmaktadır. Diğer düz kaslarda, her ne kadar aracılık eden mekanizma net olarak aydınlatılamamışsa da hipoksinin kasılabilmeyi etkilediği bilinmektedir (33). Hayvan uteruslarında birkaç hipoksi (metabolik inhibisyon) çalışması mevcutsa da (11, 34, 35) insan uterusunda hipoksi çalışması literatürde bulunmamaktadır. Deney hayvanlarından elde edilen veriler, hipoksinin insan uterusunda kasılma üzerine belirgin bir inhibitör etkisi olacağını vurgulamaktadır. Bu durumun önemli bir klinik problem ve fizyolojik mücadele alanı olan etiyolojisi bilinmeyen uterus atonisine (disfonksiyonel doğum) önemli katkı sağlayan bir faktör olacağı düşünülebilir.

Bundan dolayı, hipoksi ve metabolik inhibisyonun etkileri ile bu durumun kasılabilme üzerine olumsuz etkilerinden korunma yollarının bilinmesi önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalar, ATP, fosfokreatin ve inorganik fosfatların uterin kasılma üzerine çok az bir katkısının olduğunu ortaya koymaktadır (10, 39).

Hipoksinin diğer tip düz kaslarda L tipi kalsiyum kanallarından kalsiyum girişini inhibe ettiği bildirilmiştir (12).

Hücre içi pH değerinde çok küçük değişimler bile, uterus düz kas kasılmasını belirgin olarak etkilemektedir. Asidizasyon kasılmaları inhibe ederken, alkalinizasyon kasılmaları artırır. Gene gebeliğin son haftalarına doğru uterusta hafif bir alkalinizasyon meydana geldiği ve bu durumun uterus kasılmasında bu dönemde meydana gelen artıştan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (28).

Bu sebeple bu tez çalışmasında farklı pH tamponları olarak NaHCO_3 ve HEPES kullanılarak metabolik inhibisyonu önlemedeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Siyanür uygulaması fazik miyometriyum kasılmalarında hemen başlayan bir inhibisyon meydana getirdi. Tam bir inhibisyon olmaması ve düşük amplitüt ve frekansta da olsa kasılmaların meydana gelmesi bu durumun rigor mortise benzer bir durum olmadığını göstermektedir. Zaten, önceki çalışmalar, miyozin hafif zincir fosforilasyonunun siyanürden etkilenmediğini göstermiştir (35). Kalsiyumun mitokondrilere geri alınımının siyanürle belirgin olarak sekteye uğratıldığı bilinmektedir (29). Gene önceki çalışmalara göre, siyanürle meydana gelen inhibisyonda ATP'nin

kritik bir seviyenin altına düşmesinin esas sebep olma ihtimali düşüktür (32). Daha ziyade hücrel uyarılabilmenin ortadan kalkmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Uyarılabilme ve kasılma için membran depolarizasyonu ve kalsiyum girişi mutlak gereklidir. Hücreye kalsiyum girişindeki düşüş muhtemelen, hipoksiye bağlı olarak K^+ kanallarının açılması ve daha da düşük ihtimalle hipoksiye bağlı kalsiyum kanallarının direk inhibisyonuna bağlıdır.

Bu çalışmada K^+ kanallarını TEA ile bloklanması, KCN ile oluşan inhibisyonu geri döndürdü. Bu bulgu sıçan miyometriyumunda KCN ile indüklenen metabolik inhibisyonda K^+ kanallarının rol aldığını göstermektedir. Ancak, aktiviteleri sitoplazmik ATP düzeyine bağlı olan (fizyolojik ATP düzeylerinde kapalı olup ATP düzeyinde düşüş olduğunda aktive olan K^+ kanal tipi) ATP duyarlı K^+ kanallarının spesifik blokeri glibenklamidin KCN ile inhibisyonu geri döndürememesi bulgusu, bu inhibisyonda literatürle uyumlu olarak ATP düzeyinde belirgin düşüşün belirleyici rol oynamadığını desteklemektedir (32). Farklı ve daha etkili bir pH tamponu olan HEPES ile KCN'nin indüklediği kasılmaların inhibisyonunun daha etkin olarak önlenmesi bulgusu; KCN ile metabolik inhibisyonla hücre içi pH değerinde belirgin bir inhibisyon gerçekleştiğini vurgulamaktadır ki; bu durum siyanürün hücre içi pH değerini düşürdüğünü belirten çalışmalarla uyumludur (34, 39).

Gerçekleştiği beklenen bu asidifikasyon tartışmasız bir şekilde fazik kontraksiyonları inhibe edecektir. Bu çalışmada direk kanıt elde edilememekle birlikte bu asidifikasyon miyometriyumda hücre içi kalsiyum

artışlarını baskılıyarak bu inhibisyonu gerçekleştirecektir. Hakkında delil elde edilen K^+ kanallarının bu inhibisyona katkısı da membran hiperpolarizasyonu yolu ile kalsiyum girişinin azaltılmasıdır. Gene farklı pH tamponlarının kısmen de olsa bu inhibisyonu önleyebilmesi bulgusu bu hipotezle uyumludur.

Oksidatif metabolizmanın önemli bir ara substratı olan piruvatın, kalp kasılması üzerinde pozitif inotropik etki oluşturduğu *in vivo* ve *in vitro* koşullarda kalp enerji kaynaklarını artırdığı ve kalpte iskemiye bağlı hasara karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir (6, 41). Çalışmamızda KCN ile indüklenen metabolik stres sonrası, piruvatla kasılmaların yeniden etkin olarak başlaması bulgusu bahsedilen bu kalp çalışmasının bulgularıyla uyumludur. Sıçan miyometriyumunda hipoksi sonrası meydana gelen kontraktıl baskılanmaya karşı piruvat kullanımı literatürde yer almadığından bu bulgu ancak kalp kasi ile karşılaştırılabildi.

Her ne kadar piruvat uygulaması ile K^+ kanal aktivasyonu arasında direkt bir delil elde edilmediyse de, piruvat K^+ kanal aktivitesinde azalmaya yol açmış olabilir. Piruvat asidozis durumunun devam etmesini önleyerek K^+ kanallarının açılmasını önleyebilme olasılığı mevcuttur. İlave olarak piruvatın mitokondriye girişı 2 H^+ iyonu ko-transportunu gerektirdiğinden bu hidrojen iyonlarının piruvatın oksidasyonu ile karbondioksit ve su oluşumu esnasında uzaklaştırılması sağlanmaktadır. İlave olarak piruvat, ATP'nin termodinamik durumunu güçlendirir, sitrik asit siklusunu stimule eder, mitokondriyal NADH ve oksijen tüketimini artırır (3, 20). Miyometriyumda glikolitik ATP primer enerji kaynağı olmakla beraber;

piruvatın vasküler düz kaslarda olduğu gibi piruvatın KCN ile indüklenen hipokontraktıl durumu geri döndürmesi; asidozisi önlemesi, oksidatif metabolizmayı ve hücresele enerji kaynaklarını aktive etmesi ve K^+ kanallarının aktivasyonunu önlemesi gibi etkilerinin aracılık ettiğı sanılmaktadır.

İlave olarak, eksojen verilen piruvatın bir başka muhtemel faydalı etkisi de miyometriyal sitoplazmada redoks potansiyelinde değışikliğe yol açmasıdır. Domuz karotis arterinde dışardan verilen 10 mM piruvatın sitoplazmik laktat/piruvat oranında olumlu yönde değışikliğe sebep olduğu ve maksimum kasılma cevaplarında artmaya yol açtığı belirlenmiştir (3). Eğer bu durum miyometriyumda da geçerli ise, KCN ile indüklenen kasılma inhibisyonunun piruvatla geri döndürölmesinde de rol oynamış olma olasılığı düşünöllebilir.

Sonuç olarak siyanürle metabolik inhibisyonun sıçan miyometriyal kontraktılitesini inhibe etmesinde daha önce bildirilen Ca^{2+} homeostazis mekanizmaları ile hücre içi inorganik fosfat artışı gibi faktörlerin kombine etkisinin yanında K^+ kanallarının da kısmen rol aldığı düşünöllelmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Ayar A, Kutlu S, Yilmaz B, Kelestimur H. (2001). Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuroendocrinol Lett.* 22:199-207.
2. Barany M. (1996). *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. San Diego, CA: Academic.
3. Baron J, Gu L, Parrillo J. (1997). Cytoplasmic redox potential affects energetics and contractile reactivity of vascular smooth muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29: 2225-2232.
4. Bradley KK, Buxton IL, Barber JE, McGaw T, Bradley ME. (1998). Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism. *Am J Physiol.* 275:C1668-73.
5. Brar HS, Platt LD , DeVore GR. (1988). Qualitative assessment of maternal uterine and fetal umbilical artery blood flow and resistance in laboring patients by Doppler velocimetry. *Am J Obstet Gynecol.* 158: 952-956.
6. Bungler R, Swindall B, Brodie D, Zdunek D, Stiegler H, Walter G. (1986). Pyruvate attenuation of hypoxia damage in isolated working guinea-pig heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18: 423-438.
7. Celik H, Ayar A, Sapmaz E. (2001). Effects of erythromycin on stretch-induced contractile activity of isolated myometrium from pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 80: 697-701.
8. Cheuk JM, Hollingsworth M, Hughes SJ, Piper IT, Maresh MJ. (1993). Inhibition of contractions of the isolated human myometrium by potassium channel openers. *Am J Obstet Gynecol.* 168:953-60.
9. Coleman HA, Hart JD, Tonta MA, Parkington HC. (2000). Changes in the mechanisms involved in uterine contractions during pregnancy in guinea-pigs. *J Physiol.* 523: 785-98.
10. Crichton CA, Taggart MJ, Wray S, Smith GL. (1993). The effects of pH and inorganic phosphate on force production in a-toxin permeabilized isolated rat uterine smooth muscle. *J Physiol (Lond)* 465: 629-645.
11. Earley L, Wray S, (1993). The effects of hypoxia on force produced by agonists and depolarization arising spontaneously in the rat uterus. *J Reprod Fer.* 539-544
12. Ganitkevich V, Hasse V, Pfitzer G. (2002). Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent regulation of smooth muscle contraction. *J Muscle Res Cell Motil.* 23:47-52.

13. Harper MJ, Alecozay AA, Kasamo M. Prostaglandin (1991). (PG) release from human and rabbit endometrial glandular epithelial and stromal cell cultures in vitro. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 21B:819-22.
14. 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.
15. Harrison N, Larcombe-McDouall JB, Wray S. (1995). A ³¹P NMR investigation into the effects of repeated vascular occlusion on uterine metabolites, intracellular pH and force, in vivo. *NMR Biomed.* 8(1):28-32.
16. Hughes SJ, Hollingsworth M. (1996). The lack of a role for potassium channel opening in the action of relaxin in the rat isolated uterus; a comparison with levromakalim and salbutamol. *Br J Pharmacol.* 117(7):1435-42.
17. Kaya T, Cetin A, Cetin M, Sarioglu Y. (1998). Effects of nimodipine and isradipine on endothelin-1-induced contraction of pregnant rat myometrium. *Eur J Pharmacol.* 346(1):65-9.
18. Kudolo GB, Yang YQ, Chen DB, Jones MA, Harper MJ. (1995). Differential metabolism of exogenous platelet-activating factor by glandular epithelial and stromal cells of rabbit endometrium. *J Reprod Fertil.* 105(2): 315-24.
19. Kyojuka M, Crankshaw J, Daniel EE. (1987). Calcium channels in isolated cells and strips of longitudinal muscle of rat myometrium. *Can J Physiol Pharmacol.* 65: 1976-81.
20. Lorenz J, Paul R. (1997). Dependence of Ca²⁺-channel currents on endogenous and exogenous sources of ATP in portal vein smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 272: H987-H994.
21. Maggi M, Vannelli GB, Peri A, Brandi ML, Fantoni G, Giannini S, Torrisi C, Guardabasso V, Barni T, Toscano V, et al. (1991). Immunolocalization, binding, and biological activity of endothelin in rabbit uterus: effect of ovarian steroids. *Am J Physiol.* 260(2 Pt 1): E292-305.
22. Mallet R T, Bunker R. (1994). Energetic modulation of cardiac inotropism and sarcoplasmic reticular Ca²⁺ uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1224: 22-32.
23. Meiss RA. (1997). Mechanics of smooth muscle contraction. In: *Cellular Aspects of Smooth Muscle Function*, edited. New York: Cambridge Univ. Press. 169–201.
24. Mershon JL, Mikala G, Schwartz A. (1994). Changes in the expression of the L-type voltage-dependent calcium channel during pregnancy and parturition in the rat. *Biol Reprod.* 51: 993-9.

25. Morano I. J. (2003). Tuning smooth muscle contraction by molecular motors. *Mol Med.* 81(8):481-7.
26. Okawa T, Vedernikov YP, Saade GR, Longo M, Olson GL, Chwalisz K, Garfield RE. (1999). Roles of potassium channels and nitric oxide in modulation of uterine contractions in rat pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* Sep.181(3):649-55.
27. Parratt J, Taggart M, Wray S. (1994). Abolition of contractions in the myometrium by acidification in vitro. *Lancet.* 10; 344: 717-8.
28. Parratt JR, Taggart MJ, Wray S. (1995). Changes in intracellular pH close to term and their possible significance to labour. *Pflugers Arch.* 430(6): 1012-4.
29. Piper HM, Noll T, Siegmund B. (1994). Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovasc Res.* 28: 1–15.
30. Scholz TD, Laughlin MR, Balaban RS, Kupriyanov VV, Heineman FW. (1995). Effect of substrate on mitochondrial NADH, cytosolic redox state, and phosphorylated compounds in isolated hearts. *Am. J. Physiol.* 268: H82-H91.
31. Somlyo AP, Wu X, Lalker LA, and Somlyo AV. (1999). Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 134: 201–234.
32. Taggart MJ, Wray S. (1998). Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J Physiol (Lond)* 133–144.
33. Taggart MJ, Wray S. (1998). Hypoxia and smooth muscle function: key regulatory events during metabolic stress. *J Physiol (Lond)* 509:315–325.
34. Taggart MJ, Wray S. (1995). The effect of metabolic inhibition on rat uterine intracellular pH and its role in contractile failure. *Pflugers Arch* 430:125–131.
35. Taggart MJ, Shearer EA, Walker SD, Naderali EK, Moore S, Wray S. (1997). External alkalization decreases intracellular $[Ca^{2+}]$ and spontaneous contractions in pregnant rat myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 177: 959–963.
36. Thomas PJ, Fry CH. (1996). The effects of cellular hypoxia on contraction and extracellular ion accumulation in isolated human detrusor smooth muscle. *J Urol.* 155: 726-31.
37. 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.

38. 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.
39. Wray S, (1990). The effects of metabolic inhibition on uterine metabolism and intracellular pH in the rat. *J Physiol (Lond).* 423: 411–423.
40. Wray S. (1993). Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J Physiol.* 264:C1-18.
41. Yanos J, Patti M, Stanko R. (1994). Hemodynamic effects of intravenous pyruvate in the intact, anesthetized dog. *Crit. Care Med.* 22: 844-850.
42. Young RC, Smith LH, McLaren MD. (1993). T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol.* 169: 785-92.



ÖZGEÇMİŞ

05.07.1978 yılında Elazığ İlinde doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi Malatya' da tamamladım. Lise eğitimimin bir kısmını Malatya Lisesi' nde aldıktan sonra Elazığ Mehmet Akif Ersoy Lisesi' nden mezun oldum. 1996 yılında Fırat Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Bilgisayar Öğretmenliğini kazandım. 2000 yılında Teknik Bilgisayar Öğretmeni olarak mezun oldum. 2001 yılı güz dönemi Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen Fırat Üniversitesi Enformatik Bölümü' de Bilgisayar Okutmanı olarak görev yapmaktayım.

