



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2016; 30 (1): 15 - 19
http://www.fusabil.org

DeneySEL Metabolik İnhibisyon Oluşturulan İzole Sıçan Miyometriyumunda Etilen Glikol Tetraasetik Asit'in (EGTA) Kontraktıl Aktivite Üzerine Etkisi*

Sinan SARAL¹
Mete ÖZCAN²
Ahmet AYAR³

¹Recep Tayyip Erdoğan
Üniversitesi,
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon
Yüksekokulu
Rize, TÜRKİYE

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

³Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
Trabzon, TÜRKİYE

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

Gereç ve Yöntem: Erişkin gebe olmayan 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 potasyum klorür ile standardize edildi. Düzenli kasılmaların görülmesinin ardından ortama test ajanları eklenerek; kontraksiyonların frekansı, amplitüd ve kasılma gücü üzerine olan etkileri, 10 dakikalık periyotlar süresince, veriler normalize edilerek değerlendirildi. Bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde ANOVA varyans analizi testi kullanıldı.

Bulgular: Potasyum siyanid (KCN) ve 2-4 dinitrofenol'un (DNF) kontrol kaydının ardından ortama ilavesi ile kontraktıl kasılmalarda hemen başlayan belirgin bir inhibisyon meydana geldi (n=8, P<0.01). Bununla birlikte, kontrol kayıtlarının ardından ortama 1 mM etilen glikol tetraasetik asit (EGTA) ilavesi, KCN ve DNF'nin tek başına oluşturduğu inhibitör etkiyi kısmen hafifletti. Ancak, ortama EGTA ilavesine rağmen kontraktıl baskılanmanın derecesi hala anlamlı düzeyde bulundu (P<0.05).

Sonuç: Bu çalışmada, izole sıçan miyometriyumunda metabolik inhibisyona bağlı gelişen kontraktıl inhibisyonun, hücre içi serbest kalsiyum'un bağlanması (EGTA aracılı) ile kısmen hafifletilebildiği ancak önlenemediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Miyometriyum, hipoksi, EGTA, DNF, KCN

The Effect of Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA) on Isolated Rat Myometrium Contractile Activity Induced by Metabolic Inhibition

Objective: The aim of this study was to investigate the role of intracellular calcium homeostasis on contractility changes in the isolated rat myometrium due to metabolic inhibition (induced by chemical hypoxia).

Materials and Methods: 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° (pH 7.4). After manifestation of spontaneous contractions, they were equilibrated under resting tension 2,4-dinitrophenole (DNP), potassium cyanide (KCN) and ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA) 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.

Results: Adding either DNP (0.8 mM, n=8) or KCN (0.3 mM, n=8) to tissue bath caused a rapid and markedly inhibition in KCl induced myometrium contractions. Application of EGTA (1 mM) caused a decrease in inhibitory effects of metabolic stress induced by DNP and KCN, but these results were not statistically significant.

Conclusion: This study revealed that contractile inhibition due to metabolic inhibition in rats myometrium may be partially reversed but not inhibited by chelation (EGTA mediated) of the intracellular calcium.

Key Words: Myometrium, hypoxia, EGTA, DNP, KCN

Giriş

Düz kas kasılması; kan basıncının düzenlenmesi, mide-bağırsak motilitesi, ürogenital kanal hareketleri gibi pek çok fizyolojik sürecin sağlanabilmesi için gerekli homeostatik bir fonksiyondur. Uterus düz kaslarının da dahil olduğu bir çok düz kas hücresi hipoksiden hızlı ve belirgin bir şekilde etkilenir. Bu durum bir yandan kan damarlarının genişlemesine bağlı bölgesel kan akımını arttırarak dokuda koruyucu bir etki meydana getirirken diğer yandan ateroskleroz, vazospazm, serebral kanama ve uterus hareketlerinde zayıflama gibi pek çok olumsuz duruma sebebiyet

Geliş Tarihi : 27.11.2015
Kabul Tarihi : 09.08.2016

Yazışma Adresi Correspondence

Sinan SARAL
Recep Tayyip
Erdoğan Üniversitesi Fizik
Tedavi ve Rehabilitasyon
Yüksekokulu
Rize-TÜRKİYE

sinansaral61@msn.com

* Bu çalışma Sinan SARAL'ın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

verebilir (1). Miyometriyal kasılma pek çok faktör tarafından değiştirilebilen karmaşık bir süreçtir. Bu değişkenler arasında hipoksi önemli bir yer tutar (2).

Hipoksiye maruziyetin uterus dokusunun güç üretiminde belirgin bir azalma meydana getirdiği ve devamında kontraktıl aktivitenin zayıfladığı rapor edilmiştir (3-5). Potasyum siyanid'in (KCN), miyometriyum dokusunda oluşturduğu metabolik stres ile (kimyasal hipoksiye bağlı) spontan kasılmaları baskıladığı gösterilmiştir (6, 7). Bununla birlikte, KCN'nin gebe ve gebe olmayan miyometriyum preparatlarında potasyum (K^+) çıkışını uyararak kasılmaları inhibe edebileceği de ifade edilmiştir (8). Diğer yandan KCN aracılı metabolik inhibisyonun eş zamanlı olarak hem fazik kasılmaları inhibe edebileceği hem de kalsiyum transportunda değişikliğe neden olabileceği gösterilmiştir (9).

2,4-dinitrofenol (DNF), mitokondriyal depolardan kalsiyum salınımını uyarabilen ve aynı zamanda kalsiyum geri alımını baskılayarak hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu değiştirebilen bir bileşiktir. McHugh ve ark. (10) DNF'nin baziler arter düz kas hücrelerinde voltaj bağımlı kalsiyum salınımını etkileyebileceğini göstermişlerdir. DNF'nin kobay kolon düz kas hücrelerinde enerji üretimini azaltarak metabolik inhibisyon meydana getirdiği ve kasılmaları baskıladığı rapor edilmiştir (11). Perfüzyondaki azalma ya da metabolik inhibisyona bağlı bozulan düz kas hücre metabolizmasının temelinde aneorobik mekanizmanın uyarılması, pH düşüşü ve ATP metabolizmasının önemli birer etken olabileceği ifade edilmiştir (6). Bununla birlikte, fazik düz kas kasılmalarının önemli oranda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (2). Hücre içi kalsiyum seviyesindeki artış bir yandan hücre dışından hücre içerisine kalsiyum girişi ile gerçekleşirken bir yandan da düşük konsantrasyonda olmakla birlikte hücre içi depolardan sağlanır (12).

Diğer yandan, hipoksi ile oluşturulan metabolik inhibisyonun hücre içerisine aşırı kalsiyum akımı, serbest radikal ve nitrik oksit üretimini arttırarak nöronal hücre ölümlerine neden olabileceği bildirilmiştir (13, 14). Bu nedenle uterusun hipoksiye maruziyeti ile zayıflayan kontraktıl aktivitenin kalsiyum dengesi ile ilişkisinin anlaşılması önem arz etmektedir.

Bu amaçla mevcut çalışmada, metabolik inhibisyona bağlı (KCN ve DNF aracılı) hipoksinin sıçan miyometriyum dokusunda meydana getirdiği kontraktıl zayıflamanın, kalsiyum şelatör etkisi bilinen Etilen Glikol Tetraasetik asit (EGTA) varlığında önlenip önlenemediği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Sprague Dawley cinsi 32 adet yetişkin 12 haftalık, 200-250 g arası dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, 12/12 saat aydınlık/ karanlık ışık periyodunda, 23 C°'lik oda ısısında gruplar halinde plastik kafeslerde barındırıldı ve standart pelet yem ve musluk suyu ile

beslendi. Çalışmanın etik kurul onayı Fırat Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan alındı.

Çalışmada aşağıda formülasyonu verilen Krebs solüsyonu kullanıldı. Kullanılan Krebs solüsyonunun içeriği belirtildiği şekliyle [(mM/L); NaCl 120, MgSO₄ 1.2, KCl 4.6, CaCl₂ 1.5, Glikoz 11, KHPO₄ 1.2, NaHCO₃ 20] hazırlanmıştır. Bidistile, de-iyonize su kullanılarak her gün taze olarak hazırlanan Krebs solüsyonunun pH'sı pH 7.4'e ayarlandı. Solüsyon hazırlanırken magnezyum klorür ve kalsiyum klorür ayrı ayrı çözüldükten sonra toplan çözeltiye ilave edildi. Solüsyon, içerisindeki iyon konsantrasyonunun tamamen homojenize olması ve çökmenin engellenmesi için sürekli çalkalandı.

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). İlave olarak, izometrik güç çevirgecine bir gramlık bir ağırlık asılarak miyometriyum kesitine istirahat gerimi uygulandı ve kesit bu istirahat gerimine adapte olmak üzere 60 dakika beklendi. Bu esnada haznenin içerisi sürekli %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırıldı. Devamında 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. KCl uygulamasına kasılma cevabı vermeyen kaslar deney protokolünden çıkarıldı (n=3).

Bu çalışmada, KCl ile standardize edilen kaslarda bir saatlik zaman periyodundan ardından kayıt işlemine geçildi. 10 dakika kontrol kaydı alındı ve devamında ardından hazneye aşağıdaki deney protokollerinde gösterildiği şekliyle kimyasal ajanlar [DNF (2,4-Dinitrofenol, Merck, Almanya), KCN (Potasyum Siyanid, Sigma), EGTA (Etilen Glikol Tetra Asetik Asit, Sigma)] eklendi.

- 1. Protokol (n=8):** Kontrol + DNF (0.8 mM) uygulanan grup.
- 2. Protokol (n=6):** Kontrol + EGTA (1 mM) + DNF (0.8 mM) uygulanan grup.
- 3. Protokol, (n=8):** Kontrol + KCN (0.3 mM) uygulanan grup.
- 4. Protokol, (n=7):** Kontrol + EGTA (1 mM) + KCN (0.3 mM) uygulanan grup.

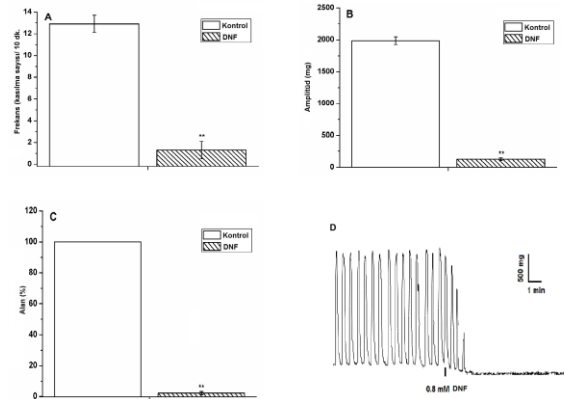
Kasılmaların amplitüt, frekans ve kasılma eğrisi altında kalan alanları 10'ar dakikalık zaman periyotları şeklinde değerlendirildi. Kasılmaların frekansları kasılma sayısı/10 dakika cinsinden hesaplandı. Kasılmaların amplitütleri miligram (mg) cinsinden hesaplanmış olup

alan ise; 10 dakikalık zaman dilimindeki kasılma eğrisi altında kalan alanların % değerleri alınarak hesaplandı.

Bütün veriler ortalama \pm standart hata (Mean \pm SEM) olarak verildi. İstatistiksel değerlendirme ve grafik çizimlerinde sırasıyla SPSS ve Origin istatistik programı kullanıldı. Amplitüd ve frekans değerlerinin ikili karşılaştırmaları için Student's t-testi, üçlü karşılaştırmalar için ise Kruskal-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.

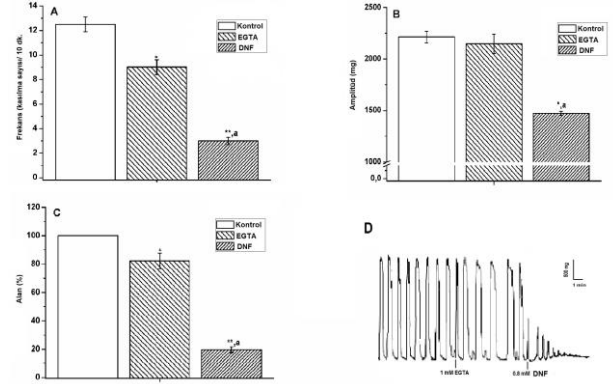
Bulgular

KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına DNF'nin 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 (Şekil 1).



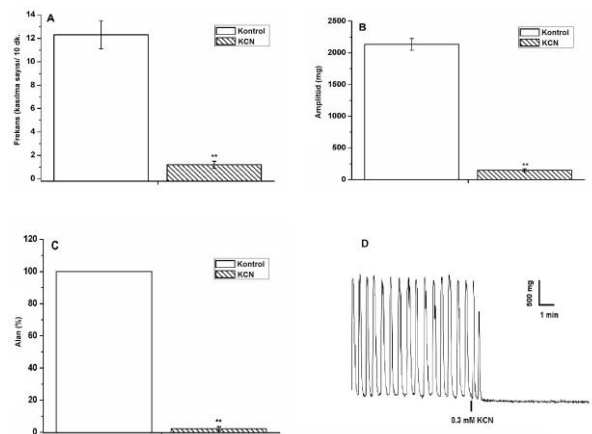
Şekil 1. KCl ile standardize edilen, krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; **A)** Kontrol ve 0.8 mM DNF uygulanması sonrası oluşan ortalama frekans değerleri. **B)** Kontrol ve 0.8 mM DNF uygulanması sonrası oluşan ortalama amplitüd değerleri. **C)** Kontrol ve 0.8 mM DNF uygulanması sonrası oluşan kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri. **D)** Kontrol ve 0.8 mM DNF'nin kasılmalara olan etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitütü göstermektedir (n=8, ** $P < 0.01$).

KCl ile standardize edilen, krebs solüsyonu içerisindeki miyometriyuma EGTA ve DNF'nin etkileri: Bu deney grubunda EGTA varlığında DNF'nin miyometriyum kasılmaları üzerine etkileri incelendi. Kontrol ile karşılaştırıldığında 1 mM EGTA kasılmaların frekans ve eğri altında kalan alan değerlerinde bir azalma meydana getirirken (Şekil 2A, 2C, $*P < 0.05$) amplitütlerinde istatistiksel bir anlamlılık oluşturmadı (Şekil 2B, $P > 0.05$). Bununla birlikte, kontrol ile karşılaştırıldığında DNF uygulanan grupların tüm değerlerinde (frekans, eğri altında kalan alan ve amplitüd) istatistiksel bir azalma gözlemlendi (Şekil 2, ** $P < 0.01$).



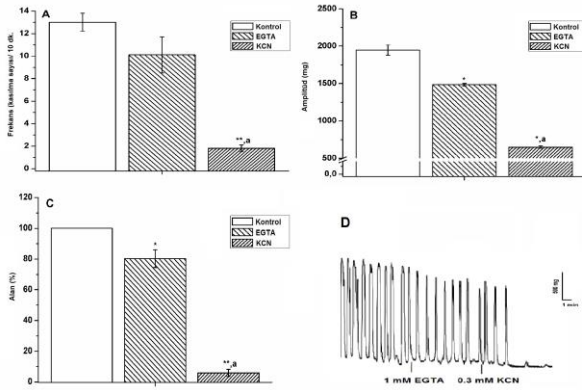
Şekil 2. KCl ile standardize edilerek gerçekleştirilen miyometriyum kayıtlarında; **A)** Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF uygulanması sonrası oluşan ortalama frekans değerleri. **B)** Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF uygulanması sonrası oluşan ortalama amplitüd değerleri. **C)** Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.8 mM DNF uygulanması sonrası oluşan kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri. **D)** 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).

KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına KCN'nin 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 anlamlı bir azalma gösterdi (Şekil 3, ** $P < 0.01$).



Şekil 3. KCl ile standardize edilen, Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda; **A)** Kontrol ve 0.3 mM KCN'nin uygulanması sonrası oluşan ortalama frekans değerleri. **B)** Kontrol ve 0.3 mM KCN uygulanması sonrası oluşan ortalama amplitüd değerleri. **C)** Kontrol ve 0.3 mM KCN uygulanması sonrası oluşan kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri. **D)** Kontrol ve 0.3 mM KCN'nin kasılmalara olan etkilerini gösteren orijinal trase, yatay eksen zamanı, dikey eksen ise amplitütü göstermektedir (n=8).

KCl ile standardize edilen miyometriyum kasılmalarına EGTA ve KCN'in etkileri: Bu deney protokolünde 1 mM EGTA varlığında 0.3 mM KCN'nin kasılmalara olan etkisi incelendi. Kontrol ile karşılaştırıldığında 1 mM EGTA kasılmaların frekansında herhangi bir anlamlılık oluşturmazken (Şekil 4A, $P>0.05$) amplitüd ve kasılma eğrisi altında kalan alan değerlerinde ise istatistiksel bir azalma gözlemlendi ($P<0.05$). Bununla birlikte, kontrol ile karşılaştırıldığında KCN uygulanan grupların tüm değerlerinde (frekans, eğri altında kalan alan ve amplitüd) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4, $**P<0.01$).



Şekil 4. KCl standardize edilerek gerçekleştirilen miyometriyum kayıtlarında; **A)** Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN uygulanması sonrası oluşan ortalama frekans değerleri. **B)** Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN uygulanması sonrası oluşan ortalama amplitüd değerleri. **C)** Kontrol, 1 mM EGTA ve 0.3 mM KCN uygulanması sonrası oluşan kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan değerleri. **D)** 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 amplitüdünü göstermektedir (n=7).

Tartışma

Bu çalışmanın bulguları izole sıçan miyometriyumunda DNF ve KCN ile oluşturulan metabolik stresin miyometriyum kontraksiyonlarını doza bağlı olarak inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Şekil 1-3). Aynı zamanda bu ajanların inhibitör etkilerinin EGTA'nın varlığında kısmen önlenemediği ancak istatistik verilerde kasılmalarındaki azalmanın hâla anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 2-4). Bu bulgu hipoksi esnasında hücre içi kalsiyum depolarının, kasılmalarındaki kalsiyum homeostazisinin kontrolünde daha etkin rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Düz kas hücrelerinde hücre içi iyonize kalsiyumun ikincil haberci rolü ve etkisi tartışmasız olarak kabul edilmektedir. Kalsiyum iyon konsantrasyonu düz kasların kasılmasında önemli rol oynamakla birlikte, metabolik stres esnasında hücre içi kalsiyum miktarlarında olası artış ve bu artışın kasılmalarda meydana getirdiği değişikliklerin tam olarak anlaşılması muhtemel fizyopatolojik mekanizmaların açıklanabilmesi açısından önem taşımaktadır.

KCN'nin uterusun kontraktıl aktivitesinde fazık kasılmaları hızlı ve belirgin bir şekilde zayıflatıldığı gösterilmiştir (3). Bu çalışmada, miyometriyum kasılmalarında KCN'ye bağlı gelişen inhibitör etkinin KCN'nin ortamdaki uzaklaştırılmasını takiben 5-10 dakika içerisinde kademeli olarak geri döndüğü gözlemlendi (data gösterilmemiştir). Bu geri dönüşüm mekanizmasında KCN'nin mitokondri üzerindeki enerji metabolizmasını bozucu etkisinin ortadan kalkması ve bunun sonucunda [ATP]i seviyesinin normal fizyolojik değerlerine ulaşmasının rolünün önemli olabileceği düşünülmüştür. Monir ve ark. (15) tarafından yapılan bir çalışmada, kimyasal aracılı metabolik stres oluşturulan dokulardan KCN'nin uzaklaştırılmasının kasılmalarda kısmen de olsa bir geri dönüş sağladığı gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada, gebe uterus dokusundan elde edilen miyometriyal hücrede, dış ortam pH'sı sabit tutulmak koşuluyla hücre içi ortamın asitleştirilmesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre içi kalsiyum akımını önemli oranda baskıladığı rapor edilmiştir (16). İzole neonatal sıçan karotid tip I hücrelerinde hipoksinin membran depolarizasyonu ve voltaj kapılı kalsiyum girişi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (17). Bu çalışmada, KCN aracılı metabolik inhibisyon oluşturulmadan hemen önce ortama EGTA ilavesinin kasılmalarındaki inhibitör etkiyi hafiflettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4). Her ne kadar çalışmamızda hücre içi kalsiyum seviyesi ölçülmemiş olsa da ortaya çıkan bu etki yukarıdaki araştırmalar da dikkate alındığında EGTA'nın hücre içi kalsiyum bağlayıcı etkisinin bir sonucu olabileceği şeklinde düşünülmüştür.

Alekseev ve ark. (18) tarafından yapılan bir çalışmada DNF'nin kardiyak düz kas hücrelerinde membranın potasyum geçirgenliğini değiştirerek hücre içi ATP seviyesini azalttığı rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise (19) DNF'nin hücre dışı kalsiyum konsantrasyonundan bağımsız olarak sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu bifazik olarak arttırdığı gösterilmiştir. Başlangıç fazındaki sitozolik kalsiyum artışının mitokondriyal depolarizasyonu takiben mitokondriden salınan kalsiyum artışının bir sonucu olduğu şeklinde ifade edilmiştir. Mevcut çalışmada DNF'nin miyometriyal dokudaki kontrol kaydının ardından ortama ilavesinin, kasılmaların frekans ve amplitüdlerinde hızlı ve belirgin bir azalma meydana getirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 1). Benzer sonuçlar elde edilen farklı bir çalışmada, kobay kolon düz kas hücrelerinde DNF'nin hücre enerji üretimini baskılayarak metabolik stres aracılı kontraktıl aktiviteyi baskıladığı rapor edilmiştir (11). Bu sonuçlara ilave olarak, tavşan idrar kesesinden elde edilen düz kas şeritlerinde asetilkolin (10-50 µg/mL) ile oluşturulan kontrol yanıtının ardından ortama DNF ilavesinin kontraktıl yanıtı zayıflatıldığı tespit edilmiştir (20). Mevcut çalışmanın bulguları, DNF'nin oluşturduğu kontraktıl baskılanmanın EGTA aracılığı ile kısmen de olsa hafiflediğini ancak bunun istatistiksel anlamlı olmadığını göstermiştir (Şekil 2). Bu sonuçların aksine farklı bir çalışmada asetilkolin indüklü erişkin olmayan sıçan miyometriyum kontraksiyonlarının iyodoasetik asit ile hızlı bir şekilde baskılandığı ancak D-glikoz varlığında

DNF'nin kontraktıl aktivitenin devamında kısmen etkili olduğu gösterilmiştir (21).

Sonuç olarak, bu çalışmada KCN ve DNF aracılı metabolik stres esnasında miyometriyum kasılmalarında meydana gelen inhibitör etkinin derecesi (Şekil 1, 3), kalsiyum şelatör etkisi olan EGTA ilavesine oranla çok daha belirgindi (Şekil 2, 4). Oksidatif fosforilasyon bloğu olmasına rağmen miyometriyumdaki kasılmaların zayıf

da olsa devam etmesi ortama EGTA ilavesinin hücre içi kalsiyum seviyesinin düzenlenmesinde önemli etken olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, EGTA'nın bu inhibitör etkiyi kısmen de olsa hafifletmesinin mekanizmasının açıklanabilmesi için diğer bazı parametrelerin de (hipoksik şartlarda K^+ iyon dengesi ve pHi konsantrasyonu gibi.) dikkate alınması ve ilave araştırmalar yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

1. Taggart MJ, Wray S. Hypoxia and smooth muscle function: Key regulatory events during metabolic stress. *J Physiol* 1998; 509: 315-325.
2. Arakawa TK, Mlynarczyk M, Kaushal KM, Zhang L, Ducsay CA. Long-term hypoxia alters calcium regulation in near-term ovine myometrium. *Biol Reprod* 2004; 71: 156-162.
3. Wray S, Duggins K, Iles R, Nyman L, Osman V. The effects of metabolic inhibition and acidification on force production in the rat uterus. *Exp Physiol* 1992; 77: 307-319.
4. Harrison N, Larcombe-McDouall JB, Earley L, Wray S. An in vivo study of the effects of ischemia on uterine contraction, intracellular pH and metabolites in the rat. *J Physiol* 1994; 476: 349-354.
5. Taggart MJ, Wray S. The effect of metabolic inhibition on rat uterine intracellular pH and its role in contractile failure. *Pflugers Arch* 1995; 430: 125-131.
6. Serhatlioğlu İ, Ozcan M, Kutlu S, Ayar A. İzole sıçan miyometriyumunda metabolik stres ve kasılabilme: bikarbonat ve hepes tamponu içeren kayıtlı solüsyonlarının kasılma yeteneği üzerine etkisi ve potasyum kanallarının rolü. *J Int Med Sci* 2007; 27: 170-178.
7. Ozcan M, Alcın E, Kuzgun T, Ayar A. İzole sıçan miyometriyumunda metabolik inhibisyona bağlı kontraktıl baskılanmada fosfokreatin/kreatin kinaz enerji sisteminin rolünün incelenmesi. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları Dergisi* 2008; 7: 78-83.
8. Heaton RC, Wray S, Eisner DA. Effects of metabolic inhibition and changes of intracellular pH on potassium permeability and contraction of rat uterus. *J Physiol* 1993; 465: 43-56.
9. Taggart MJ, Menice CB, Morgan KG, Wray S. Effect of metabolic inhibition on intracellular Ca^{2+} , phosphorylation of myosin regulatory light chain and force in rat smooth muscle. *J Physiol* 1997; 499: 485-496.
10. McHugh D, Beech DJ. Modulation of Ca^{2+} channel activity by ATP metabolism and internal Mg^{2+} in guinea-pig basilar artery smooth muscle cells. *J Physiol* 1999; 492: 359-376.
11. Born GV, Bulbring E. The effect of 2:4-dinitrophenol (DNP) on the smooth muscle of the guinea-pig's taenia coli. *J Physiol* 1955; 127: 626-635.
12. Otaibi MA. The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. *Calcium Signaling* 2014; 2: 70-75.
13. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989; 29: 365-402.
14. Olney JW. Excitotoxicity and N-methyl-D-aspartate receptors. *Drug Dev Res* 1989; 17: 299-319.
15. Monir BE, Pierce SJ, Kupittayanant S, Shmygol A, Wray S. The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium. *BJOG*. 2003; 110: 1050-1056.
16. Shmygol AV, Smith RD, Taggart MJ, Wray S, Eisner DA. Changes of pH affect calcium currents but not outward potassium currents in rat myometrial cells. *Pflugers Arch* 1995; 431: 135-137.
17. Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. *J Physiol* 1994; 476: 423-428.
18. Alekseev AE, Gomez LA, Aleksandrova LA, Brady PA, Terzic A. Opening of cardiac sarcolemmal KATP channels by dinitrophenol separate from metabolic inhibition. *J Membr Biol* 1997; 157: 203-214.
19. Hudman D, Rainbow RD, Lawrence CL, Standen NB. The origin of calcium overload in rat cardiac myocytes following metabolic inhibition with 2,4-dinitrophenol. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 859-871.
20. Paton DM. Effects of metabolic inhibitors on contraction of rabbit detrusor muscle. *Br J Pharmac* 1968; 34: 493-498.
21. Paton DM. Cation and metabolic requirements for retention of metaminalol by rat uterine horns. *Br J Pharmac* 1968; 33: 277-286.