

# İzole Sıçan Miyometriyumunda Metabolik Stres ve Kasılabilme: Bikarbonat ve HEPES Tamponu İçeren Kayıt Solüsyonlarının Kasılma Yeteneği Üzerine Etkisi ve Potasyum Kanallarının Rolü

*METABOLIC STRESS AND THE CONTRACTILITY OF ISOLATED RAT MYOMETRIUM: ROLE OF POTASSIUM CHANNELS AND DIFFERENT CELLULAR pH BUFFERS?*

Dr. İhsan SERHATLIOĞLU,<sup>a</sup> Dr. Mete ÖZCAN,<sup>a</sup> Dr. Selim KUTLU,<sup>b</sup> Dr. Ahmet AYAR<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Biyofizik AD, <sup>b</sup>Fizyoloji AD, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, ELAZIĞ

## Özet

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

**Gereç ve Yöntemler:** Servikal dislokasyondan sonra, virjin erişkin Wistar cinsi dişi sıçanlardan miyometriyum kesitleri alınarak içerisinde 37°C'de (pH 7.4) Krebs solüsyonu bulunan ve %95 O<sub>2</sub>-%5 CO<sub>2</sub> ile sürekli gazlandırılan izole organ banyosunda asıldı. İstirahat gerimi altında spontan kontraksiyonlar gözlemdikten sonra potasyum siyanit (KCN), piruvat, glibenklamid veya tetra etil amonyum (TEA) organ banyosuna uygulanarak izometrik kontraksiyonların frekans ve amplitütlerine olan etkileri 10 dk.lık periyotlar halinde değerlendirildi. Bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde Wilcoxon rank testi kullanıldı.

**Bulgular:** KCN (0.5 mM) spontan kontraksiyonları kademeli başlayan bir etkiyle, NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde HEPES kullanılanlara göre çok daha belirgin olmak üzere inhibe etti. Bu inhibisyon piruvat (10 mM) uygulamasıyla kısmen geri döndürülürken, ATP-duyarlı K<sup>+</sup> kanal blokeri glibenklamid (100 µM) uygulaması bu inhibisyonu geri döndürmedi (n= 7). İlave olarak, spontan miyometriyal kontraksiyonların KCN (0.5 mM) ile inhibisyonu, potasyum kanal blokeri olan TEA (1 mM, n= 6) uygulanmasıyla geri döndürüldü (n= 6).

**Sonuç:** Bu çalışmanın bulguları sıçan miyometriyumunda KCN ile indüklenen metabolik strese bağlı gelişen kontraktıl inhibisyonda, KCN'nin incelenen dozları için K<sup>+</sup> kanallarının kısmen de olsa rol aldığını ve inhibisyonun piruvat uygulaması ile önlebildiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Miyometriyum; kalsiyum bağımlı potasyum kanalları

**Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007, 27:170-178**

**Geliş Tarihi/Received:** 19.07.2006 **Kabul Tarihi/Accepted:** 14.12.2006

Bu çalışmanın ön bulguları "XXXI. Ulusal Fizyoloji (Uluslararası Katılımlı) Kongresi"nde bildiri olarak sunulmuştur (27-30 Eylül 2005, Gaziantep, Bildiri Özetleri, s 261).

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Ahmet AYAR  
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Fizyoloji AD, 23119, ELAZIĞ  
aayar61@yahoo.com, aayar@firat.edu.tr

Copyright © 2007 by Türkiye Klinikleri

## Abstract

**Objective:** The aim of this study was to investigate the role of different pH buffers, cellular energy sources and role of potassium channels in potassium cyanide (KCN)-induced metabolic stress-mediated inhibition of contractility of isolated rat myometrium.

**Material and Methods:** 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% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, maintained at 37°C (pH 7.4). After the development of spontaneous contractions following equilibrium under resting tension, KCN, pyruvate, glybenclamide or tetra ethyl ammonium (TEA) was added 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.

**Results:** KCN (0.5 mM) gradually inhibited the spontaneous contractions, being more effective in experiments where NaHCO<sub>3</sub> was used in the Krebs solution instead of HEPES. This inhibition was reversed by pyruvate (10 mM), but application of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker, glybenclamide (100 µM), did not reverse the KCN-induced inhibition of myometrial contractions (n= 7). Furthermore, the inhibition of spontaneous myometrial contractions by KCN (0.5 mM, n=6) was reversed by the application of K<sup>+</sup> channel blocker TEA (1 mM, n= 6).

**Conclusion:** Results from this study indicate that K<sup>+</sup> channels play a role, at least partially, in KCN-induced inhibition of myometrial contractions of rat and this inhibition may be reversed by pyruvate.

**Key Words:** Myometrium; intermediate-conductance calcium-activated potassium channels

Vücüt dokularının normal fonksiyonlarını yerine getirmesi için yeterli düzeyde perfüzyonun sağlanması gerekir. Beyin gibi bazı dokular perfüzyonun aksamasından hızla olumsuz etkilenirken, deri ve gastrointestinal kanal dokularının perfüzyon azalmasına bağlı olarak

gelişen hipoksiye karşı daha dirençli olduğu bilinmektedir. Düz kaslar, düşük bir metabolizma hızına sahip olduklarından belli bir periyottaki anoksik duruma karşı dirençli oldukları düşünülmektedir. Aktiviteleri, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından önemli farklılıklar arz eden düz kaslar, anoksik duruma dayanırlıkları bakımından da farklılıklar gösterir. İn vitro çalışma sonuçları, uterus ve mesane düz kaslarının anoksik ortamlarda kasılma güçlerini hızla kaybettiklerini göstermiştir.<sup>1,2</sup>

Uterus kontraksiyonları, uterusun perfüzyonuna şiddetli derecede bağımlıdır.<sup>3,4</sup> Gene sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda hipoksi sonucunda uterus kontraksiyonlarının hızla ortadan kalktığı gösterilmiştir.<sup>4,5</sup> Bu durum, doğum esnasında uterusun şiddetli kasılmalarına bağlı olarak kendini besleyen damarlarda meydana getirdiği oklüzyon sonucu, takip eden kasılmaların ve doğum eyleminin etkilenebileceği, klinik önemi olan bir gerçeği yansıtmaktadır.<sup>6</sup>

Uterus dokusuna in vivo olarak kan akımının azalması, anaerobik metabolizmanın uyarılması, adenozin trifosfat (ATP) gibi bazı metabolitlerde değişme ve pH'nın düşmesi gibi metabolik sonuçların ortaya çıkmasına yol açar. Bunlar da direkt veya indirekt olarak uterus kasılabilirliğini etkiler; örneğin hücre içi pH düşmesi sonucu insan ve sıçan miyometriyum kasılmasının inhibe olduğu gösterilmiştir.<sup>7,8</sup>

Yukarıda bahsedilen çalışmaların bulguları, 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, KCN uygulaması ile doku hipoksisi oluşturularak uterus dokusunda in vitro ortamda deneyler gerçekleştirildi.

### Gereç ve Yöntemler

Çalışmada farklı pH tamponları içeren Krebs çözeltileri kullanılarak 2 ayrı seri deney gerçekleştirilmiştir. Kullanılan her iki solüsyon da literatür-

de izole sıçan miyometriyum kasılmalarının kayıt edilmesinde kullanılmış bir içerikteydi.<sup>9</sup>

NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu (mM/L): NaCl, 154; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KCl, 5.4; CaCl<sub>2</sub>, 2; ve glikoz 11.5; NaHCO<sub>3</sub>, 23.8.

HEPES (sülfonik asit N-(hidroksi-2-etil)-piperazin N'-2-etan) içeren Krebs solüsyonu: (mM/L): NaCl, 154; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KCl, 5.4; CaCl<sub>2</sub>, 2; ve glikoz 11.5; HEPES, 10.

Bidistile, de-iyonize su kullanılarak her gün taze olarak hazırlanan Krebs solüsyonunun pH'sı ölçülerek gerektiğinde 7.4'e ayarlandı.

Çalışma protokolü, yerel Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmada kullanılan miyometriyum şartları standart koşullarda yetiştirilen Wistar cinsi yetişkin virjin dişi sıçanlardan elde edildi. Servikal dislokasyondan sonra sıçanlardan izole edilen uterus kornularından 10 x 2.5 x 2 mm boyutlarında kesitler hazırlandı. Kesitlerin alt ucu ipek bir iplikle organ banyosunun alt kısmına, üst ucu ise gene bir ipekle izometrik güç çevirgecine sabitlenerek, içerisinde %95 O<sub>2</sub>-%5 CO<sub>2</sub> ile sürekli gazlandırılan Krebs solüsyonu bulunan izole organ banyosunda vertikal olarak 1 gramlık bir istirahat gerimi altında asıldı ve miyometriyum kesiti bu istirahat gerimine adapte olmak üzere 30 dk. beklendi. 30 dk.lık denge döneminin sonunda kesitin asılı olduğu organ banyosuna 60 mM potasyum klorür (KCl) uygulanarak kasılmalar indüklendi; bu uygulamanın bir amacı da miyometriyum kesitlerini ilave olarak uyararak denge ve standardizasyon sağlamaktı. KCl uygulamasına kasılma cevabı vermeyen kaslar deneyden uzaklaştırıldı. KCl uygulaması 1 dk. süreyle gerçekleştirildi ve takip eden 10 dk. içerisinde kesit 3 defa daha taze Krebs solüsyonu ile yıkanarak KCl'nin etkisi giderildi.

Çalışmada toplam 32 sıçandan kesitler izole edildi; 3 sıçandan izole edilen kesitlerde spontan kasılma gözlenmediği, 1 sıçandan izole edilen kesitlerde ise düzensiz spontan kasılmalar olduğu için bu 4 sıçandan izole edilen kesitler çalışma kapsamından çıkarıldı. Her bir sıçandan aynı amaçlı deneyler için sadece bir kesit kullanıldı.

Takip eden 10 dk.lık kayıt periyodu kontrol dönemi olarak kabul edildi. Kontrol periyodunun sonunda banyoya potasyum siyanür (KCN 0.5 mM) uygulanarak kasılmalar 10 dk. daha kayıt edildi. KCN uygulamasından sonra ise deney protokolüne göre enerji kaynağı olarak piruvat (10 mM), seçici olmayan potasyum kanal blokeri TEA (1 mM) veya ATP duyarlı potasyum kanal blokeri glibenklamid (100 µM) uygulanarak 10 dk. daha kayıt alındı.

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

Kontrol dönemi olarak kabul edilen ilaç uygulama öncesi kayıt dönemi %100 kabul edilerek karşılaştırmalar yapıldı.

İlave olarak farklı pH tamponu (NaHCO<sub>3</sub> ve HEPES) içeren solüsyonlar kullanılarak yapılan kayıtlarda KCN'nin kasılma parametreleri üzerine etkileri karşılaştırıldı. Bu kapsamda, şeritler arasında kasılma parametreleri bakımından farklılıkları gidermek için, ortalama amplitüd, frekans ve eğri altında kalan alan verileri normalize edildi.

#### İstatistiksel analiz

Bütün veriler ortalama ± standart hata (Mean ± SEM) olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmelerde "SPSS 10.0 for Windows" istatistiksel paket programı kullanıldı. Amplitüd ve frekans değerlerinin istatistiksel değerlendirmelerinde non-

parametrik 'Wilcoxon Signed Rank' testi kullanıldı. p< 0.05 anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

### NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda KCN'nin kasımlara inhibitör etkisi ve piruvat uygulaması

NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılan kayıt koşullarında, spontan kontraksiyonlarda 0.5 mM KCN uygulaması ile inhibisyon meydana geldi (p< 0.05, Tablo 1). Şekil 1A'da da görüldüğü gibi 0.5 mM KCN uygulaması kısa bir süre içerisinde amplitütlerde (p< 0.05) ve eğri altında kalan alanda anlamlı (p< 0.05) bir inhibisyon meydana getirdi. KCN uygulama periyotunda oldukça küçük amplitütlü ve anlamlı ölçüde azalmış (p< 0.05) frekansta birkaç minyatür kasılma gözlemlendi (Tablo 1).

Daha sonra 10 mM piruvat uygulaması KCN'nin oluşturduğu inhibisyonu, kasılmaların hem amplitüd 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 amplitüd bakımından hala farklılık varken, kasılma eğrisi altında kalan alan bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (Şekil 1 B-D, Tablo 1).

### HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda KCN'nin kasımlara inhibitör etkisi ve piruvat uygulaması

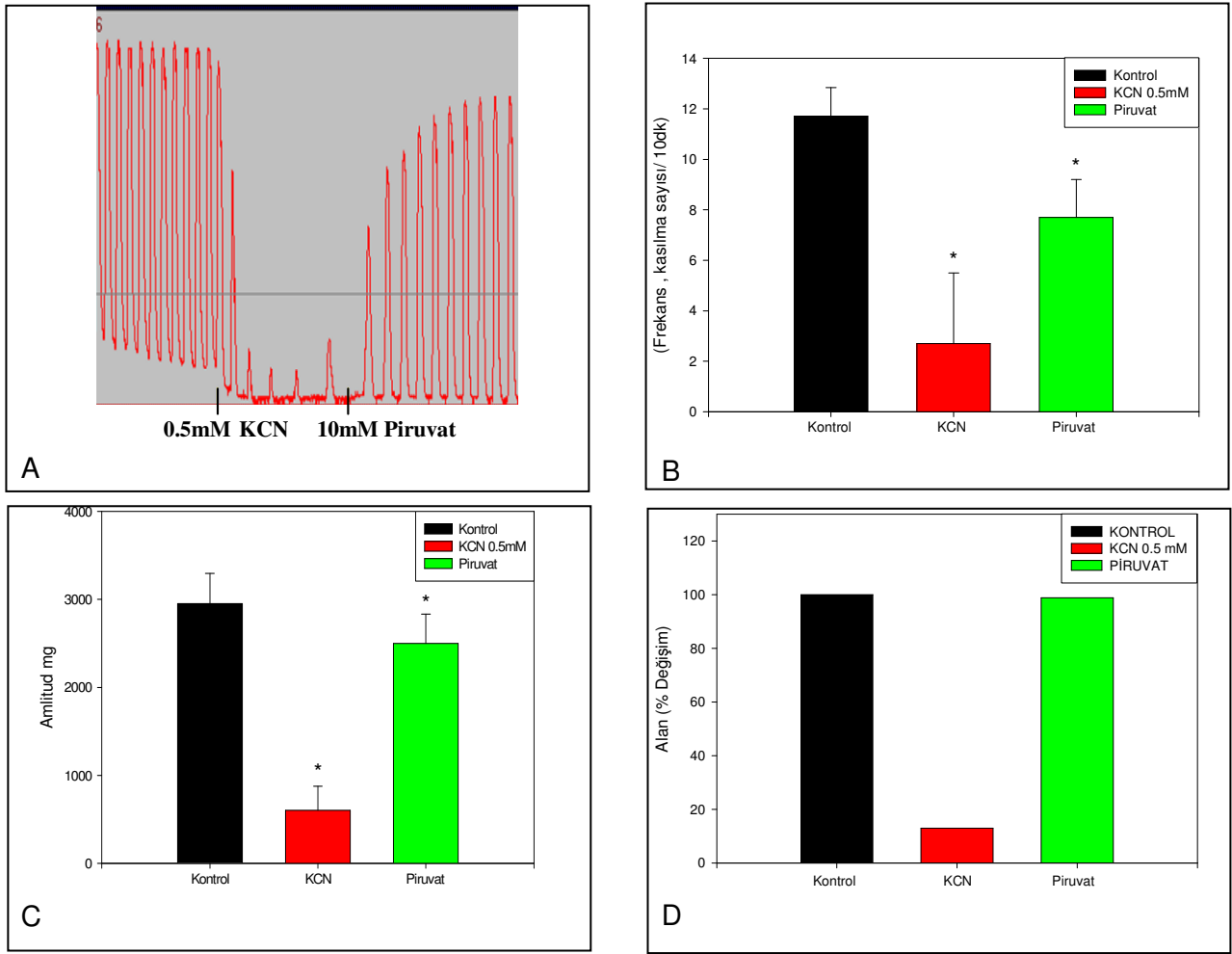
Bu kısım deneylerde Krebs solüsyonunda pH tamponu olarak HEPES kullanılarak; KCN'nin

**Tablo 1.** NaHCO<sub>3</sub> ve HEPES içeren Krebs solüsyonunda asılı miyometriyum kesitlerine 0.5 mM KCN ve 10 mM piruvat uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüd ve alanların, ortalama ve standart hata değerleri (n= 7).

	NaHCO <sub>3</sub> İçeren Krebs Solüsyonu			HEPES İçeren Krebs Solüsyonu		
	Kontrol	KCN	Piruvat	Kontrol	KCN	Piruvat
Frekans	11.7 ± 0.4	2.7 ± 1 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.5*	11.8 ± 0.46	5.7 ± 0.3 <sup>#</sup>	8.2 ± 0.3 <sup>#</sup>
Amplitüd	2952 ± 345	601 ± 274*	2500 ± 332*	2320 ± 279	1392 ± 233 <sup>#</sup>	1809 ± 259 <sup>#</sup>
Alan	100 ± 00	11.1 ± 5.17	98.3 ± 4.64	100 ± 00	29.97 ± 3.76 <sup>#</sup>	95.51 ± 3.58

\* Kontrol grubuna göre p< 0.01 (NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılan protokoller için),

<sup>#</sup> Kontrol grubuna göre p< 0.01 (HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılan protokoller için).



**Şekil 1.** NaHCO<sub>3</sub> 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 amplitüdünü göstermektedir (n= 7). Kontrol koşulları, KCN ve piruvat uygulanması esnasında ortalama frekans (B), amplitüd (C) ve kasılma eğrisi altında kalan ortalama alan (D) değerleri. \*p< 0.05

miyometriyum kontraksiyonu üzerine farklı bir pH tamponunun olası etkisi incelendi.

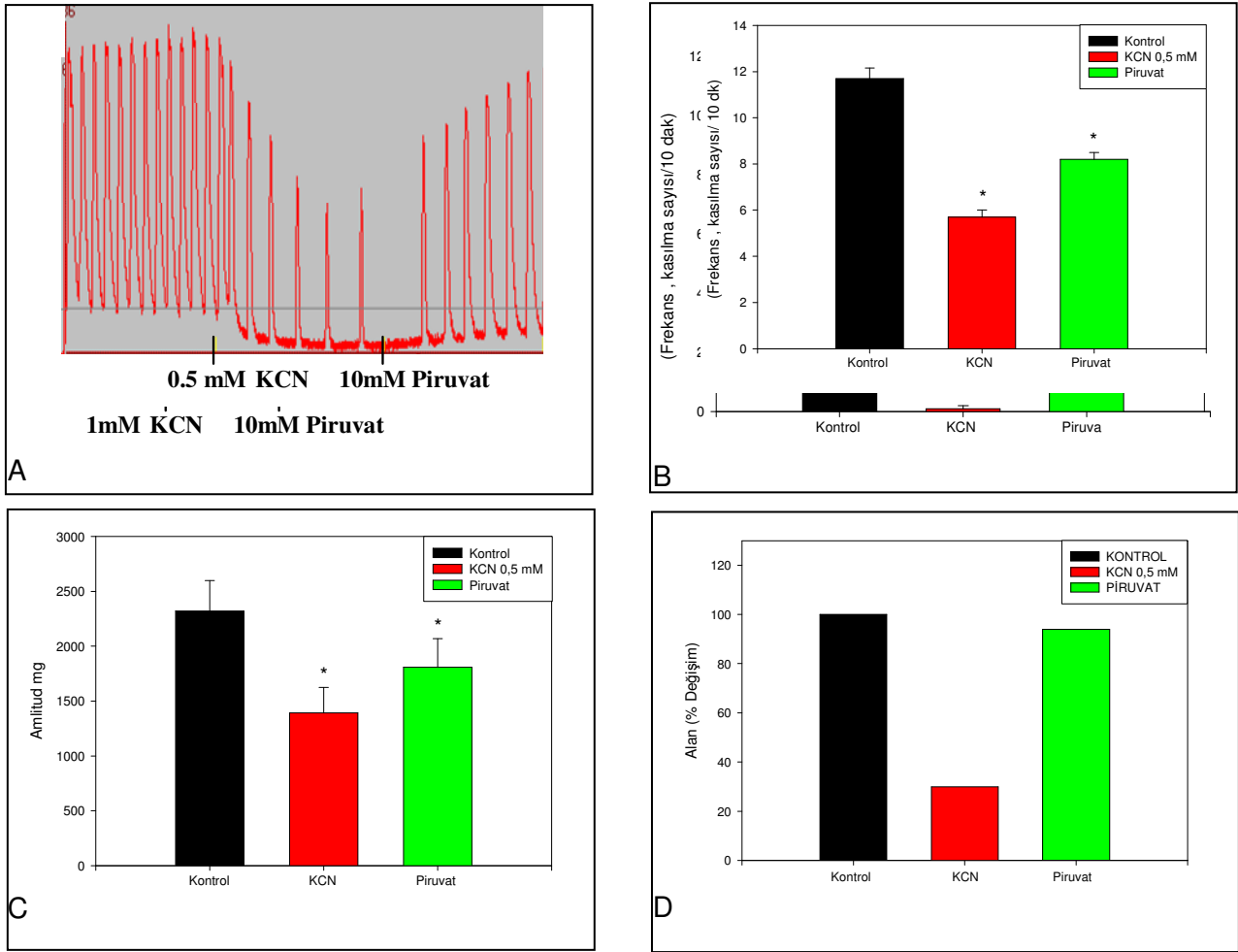
0.5 mM KCN uygulaması HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda da spontan miyometriyumun kontraksiyonlarını frekans ve amplitüd yönünden anlamlı ölçüde inhibe etti (p< 0.05, Tablo 1, Şekil 2). Ancak 0.5 mM KCN uygulaması NaHCO<sub>3</sub>'lü Krebs solüsyonu kullanılan deneylerde HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılanlara göre daha zayıf bir inhibisyon meydana getirdi.

İnhibe olan bu kasılmalara 10 mM piruvat uygulaması, KCN oluşturduğu inhibisyonu ortadan kaldırdı. NaHCO<sub>3</sub> kullanılarak gerçekleştirilen ka-

yıtlara benzer şekilde kontrol kayıtları ile piruvatla geri döndürülen spontan kasılma kayıtları arasında frekans ve amplitüd ortalama değerleri bakımından hala farklılık varken (Şekil 2 B, C), alan bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 2 D).

### NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda KCN'nin kasılmalara inhibitör etkisinde potasyum kanallarının rolü

Bu amaçla; NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılan kayıtlarda KCN 0.5 mM uygulanarak spontan kontraksiyonlar inhibe edildi ve KCN uygulama periyodu sonunda TEA (1 mM) uygulandı. TEA oluşan inhibisyonu geri döndürdü (p<



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

0.05, Tablo 2, n= 10). Ancak spontan kontraksiyonlarla kıyaslandığında, TEA uygulaması sonrasında ortalama frekans, amplitüd ve kasılma eğrisi altında kalan alan bakımından anlamlı düzeyde daha düşük kasılmalar elde edildi (p< 0.05).

### HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda KCN'nin kasımlara inhibitör etkisinde potasyum kanallarının rolü?

Daha sonra, bir önceki deneyler HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanarak tekrarlandı. 0.5 mM

KCN HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kayıtlarda da spontan miyometriyum kasılmalarını anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlendi. Ancak, HEPES kullanılan kayıt koşullarında 0.5 mM KCN uygulaması NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonuna göre daha düşük oranda inhibisyon meydana getirdi.

1 mM TEA uygulaması KCN oluşturduğu inhibisyonu geri döndürdü (p< 0.05, Tablo 2, n= 10). Ancak, bu geri döndürme tam bir geri döndürme değildi çünkü kontrol spontan kasılma kayıtları ile TEA geri döndürdüğü kasılmalar

**Tablo 2.** NaHCO<sub>3</sub> ve HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen protokollerde; 0.5 mM KCN ve 1 mM TEA uygulaması ile elde edilen frekans, amplitüd ve alanların ortalama ve standart hata değerleri.

	NaHCO <sub>3</sub> İçeren Krebs Solüsyonu			HEPES İçeren Krebs Solüsyonu		
	Kontrol	KCN	TEA	Kontrol	KCN	TEA
Frekans	12.4 ± 0.5	4.9 ± 0.4*	6.1 ± 0.2*	10.2 ± 0.8	5.3 ± 0.7 <sup>#</sup>	7.6 ± 0.3 <sup>#</sup>
Amplitüd	2556 ± 22	1284 ± 12*	2204 ± 24*	2685 ± 334	841 ± 141 <sup>#</sup>	1533 ± 217 <sup>#</sup>
Alan	100 ± 0	33.18 ± 2.48*	69.7 ± 6.12*	100 ± 0	21.66 ± 3.2 <sup>#</sup>	60.2 ± 6.4 <sup>#</sup>

\* Kontrol grubuna göre p< 0.01 (NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılan protokoller için),

<sup>#</sup>: Kontrol grubuna göre p< 0.01 (HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılan protokoller için).

**Tablo 3.** NaHCO<sub>3</sub> ve HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda 0.5 mM KCN ve 100 µM glibenklamid uygulaması sonrası frekans, amplitüd ve alanların ortalama ve standart hata değerleri (n= 5).

	NaHCO <sub>3</sub> İçeren Krebs Solüsyonu			HEPES İçeren Krebs Solüsyonu		
	Kontrol	KCN	Glibenklamid	Kontrol	KCN	Glibenklamid
Frekans	12.1 ± 0.5	5.1 ± 0.4*	5.2 ± 0.2*	10.2 ± 0.7	5.3 ± 0.7 <sup>#</sup>	5.4 ± 0.9 <sup>#</sup>
Amplitüd	2438 ± 242	1315 ± 121*	1324 ± 237*	2785 ± 344	861 ± 121 <sup>#</sup>	899 ± 117 <sup>#</sup>
Alan	1121 ± 89	427 ± 49*	431 ± 51*	1723 ± 264	355 ± 76 <sup>#</sup>	374 ± 83 <sup>#</sup>

\* Kontrol grubuna göre p< 0.01 (NaHCO<sub>3</sub> içeren Krebs solüsyonu kullanılan protokoller için),

<sup>#</sup>: Kontrol grubuna göre p< 0.01 (HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılan protokoller için).

arasında frekans, amplitüd ve alan bakımından anlamlı farklılık bulunmaktadır (p< 0.05).

### NaHCO<sub>3</sub> ve HEPES içeren Krebs solüsyonu kullanılarak yapılan kayıtlarda KCN'nin kasılmalara inhibitör etkisinde ATP-duyarlı potasyum kanallarının rolü?

Bu deneylerde, NaHCO<sub>3</sub> ve HEPES içeren Krebs solüsyonuna 0.5 mM KCN uygulanarak, KCN'nin oluşturduğu metabolik inhibisyonda ATP-duyarlı potasyum kanallarının rolü incelendi. Her iki solüsyon için de glibenklamid KCN oluşturduğu metabolik inhibisyonu ortadan kaldırmadığı; KCN uygulaması ile glibenklamid kayıtları arasında frekans, amplitüd ve alan bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı tespit edildi (p> 0.05, Tablo 3, n= 7 her bir protokol için).

### KCN'nin kasılmalara inhibitör etkisi üzerine Krebs solüsyonu içerisindeki farklı pH tamponlarının etkisi

Bu amaçla, yukarıdaki protokollerdeki veriler, şeritler arası değişkenlikleri gidermek amacıyla normalize edilip, Krebs solüsyonunda NaHCO<sub>3</sub> ile HEPES kullanılarak gerçekleştirilen deneylere ait ortalama amplitüd, frekans ve alan değerleri, KCN uygulamasını takip eden ajan (piruvat, TEA veya glibenklamid) etkisi dikkate alınmaksızın, sadece kontrol dönemine göre KCN'nin etkisini incelemek üzere birlikte değerlendirildi.

KCN uygulaması, NaHCO<sub>3</sub> içeren solüsyonların kullanıldığı kayıt koşullarında HEPES kullanılanlara göre ortalama frekans (kontrol: %100; KCN (NaHCO<sub>3</sub>): %35.2 ± 3.8, KCN (HEPES): %52.8 ± 3.3, p= 0.001, n= 21), amplitüd (kontrol: %100; KCN (NaHCO<sub>3</sub>): %29.4 ± 2.5, KCN

(HEPES):  $40.6 \pm 3.3$ ,  $p= 0.009$ ,  $n=21$ ) ve kasılma eğrisi altında kalan alan (kontrol: %100; KCN ( $\text{NaHCO}_3$ ):  $14.6 \pm 1.2$ , KCN (HEPES):  $24.0 \pm 1.7$ ,  $p= 0.0001$ ,  $n= 21$ ) bakımından daha güçlü bir şekilde inhibe etti.

### Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmanın bulguları izole sıçan miyometriyumunda oksidatif fosforilasyonun potasyum siyanürle inhibisyonunun spontan miyometriyal kontraksiyonları baskıladığını; bu inhibisyonunu piruvat ve spesifik olmayan potasyum kanal blokeri TEA ile ortadan kaldırdığını ancak ATP-duyarlı potasyum kanal blokeri glibenklamid ile önlenemediğini göstermektedir. İlave olarak, pH tamponu olarak  $\text{NaHCO}_3$  içeren Krebs solüsyonunda alınan kasılma kayıtlarında HEPES kullanılan solüsyonlarda alınanlara göre KCN ile kasılmaların belirgin olarak daha fazla inhibe olduğu tespit edildi. Ancak, KCN ile oluşturulan inhibisyonun piruvat ile ortadan kaldırılması yönünden HEPES ve  $\text{NaHCO}_3$  arasında belirgin bir fark tespit edilemedi.

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 ateroskleroz, vazospazm ve serebral kanama ile uterus distonisi gibi durumlarda belirgin bir disfonksiyona neden olur.<sup>1,10,11</sup> 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.<sup>11</sup> 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 ( $\approx 10 - 100 \mu\text{M}$ ) kapalıdır ve ATP düzeyinde düşüş sonucu

aktive olurlar.<sup>1,12</sup> 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.<sup>11-13</sup> Ancak bu çalışmada spontan kontraksiyonların siyanürle 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 bu tip kanal blokerinin de etkisi 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.<sup>13,14</sup>

Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir in vivo çalışmada hipoksi sonucunda uterus kontraksiyonlarının hızla ortadan kalktığı gösterilmiştir.<sup>7,8</sup> Bu durum doğum esnasında uterusun şiddetli kasılmaları sonucunda kendini besleyen damarlarda meydana getirdiği oklüzyon sonucu, takip eden kasılmaların ve doğum eyleminin etkilenebileceği klinik önemi olan bir gerçeği yansıtmaktadır. Her kontraksiyon esnasında uterusunda hipoksinin olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur.<sup>7</sup> Kasılan kas liflerinin miyometriyum içerisinde yer alan kan damarlarına baskı uygulaması sonucu miyometriyuma kan akımı ve dolayısıyla oksijen sunumu azalmaktadır. Diğer düz kaslarda, aracılık eden mekanizma net olarak aydınlatılamamışsa da hipoksinin kasılabilmeyi etkilediği bilinmektedir.<sup>15</sup> Hayvan uteruslarında birkaç hipoksi (metabolik inhibisyon) çalışması mevcutsa da insan uterusunda hipoksi çalışması literatürde bulunmamaktadır.<sup>3,4,6,16</sup> 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 etiyojisi 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 uterus kasılma üzerine çok az bir katkısının olduğunu ortaya koymaktadır.<sup>17,18</sup>

Hücre içi pH değerinde çok küçük değişimler bile, uterus düz kas kasılmasını belirgin olarak etkilemektedir. Asidizasyon kasılmaları inhibe ederken, alkalinizasyon kasılabilirliği artırır.<sup>19</sup> Gene gebeliğin son haftalarına doğru uterus hafif bir alkalinizasyon meydana geldiği ve bu durumun uterus kasılmasında bu dönemde meydana gelen artıştan sorumlu olabileceği düşünülmektedir.<sup>20</sup> Bu nedenlerle bu çalışmada farklı pH tamponları olarak NaHCO<sub>3</sub> ve HEPES kullanılarak metabolik inhibisyonu önlemedeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Bu çalışmada K<sup>+</sup> kanallarının TEA ile bloklanması, KCN ile oluşan inhibisyonu geri döndürdü. Bu bulgu sıçan miyometriyumunda KCN ile indüklenen metabolik inhibisyonda K<sup>+</sup> kanallarının rol aldığını göstermektedir. Ancak, aktiviteleri sitooplazmik ATP düzeyine bağlı olan (fizyolojik ATP düzeylerinde kapalı olup, ATP düzeyinde düşüş olduğunda aktive olan K<sup>+</sup> kanal tipi) ATP duyarlı K<sup>+</sup> kanallarının spesifik blokeri glibenklamidin KCN ile inhibisyonu geri döndürememesi bulgusu, bu inhibisyonda literatürle uyumlu olarak ATP düzeyinde belirgin düşüşün belirleyici rol oynamadığını desteklemektedir.<sup>3,17,21,22</sup> 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.<sup>17,22</sup>

Gerçekleştiği beklenen bu asidifikasyon tartışmasız bir şekilde fazik kontraksiyonları inhibe edecektir. Bu çalışmada direkt kanıt elde edilememekle birlikte bu asidifikasyon miyometriyumda hücre içi kalsiyum artışlarını inhibe ederek bu inhibisyonu gerçekleştirecektir. Hakkında delil

elde edilen K<sup>+</sup> kanallarının bu inhibisyona katkısı da membran hiperpolarizasyonu yolu ile kalsiyum girişinin azaltılması olabilir. Farklı pH tamponlarının kısmen de olsa bu inhibisyonu önleyebilmesi bulgusu bu hipotezle uyumludur.

Oksidatif metabolizmanın önemli bir ara substratı olan piruvatın, kalp kasılması üzerine pozitif inotropik etkiye sahip olduğu ve hem in vivo hem de in vitro koşullarda kalp enerji kaynaklarını arttırıcı etkiye sahip olduğu ve kalpte iskemiye bağlı hasara karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir.<sup>23-25</sup> Bu çalışmada 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 kullanımını literatürde yer almadığından bu bulgu ancak kalp kası ile karşılaştırılabilir.

Her ne kadar piruvat uygulaması ile K<sup>+</sup> kanal aktivasyonu arasında direkt bir kanıt elde edilemediyse de, piruvat K<sup>+</sup> kanal aktivitesinde azalmaya yol açmış olabilir. Piruvatın asidozis durumunun devam etmesini önleyerek K<sup>+</sup> kanallarının açılmasını önleyebilme olasılığı mevcuttur. İlave olarak piruvatın mitokondriye girişi 2 H<sup>+</sup> iyonu ko-transportunu gerektirdiğinden bu hidrojen iyonlarının piruvatın oksidasyonu ile karbondioksit ve su oluşumu esnasında uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Aynı zamanda piruvat, ATP'nin termodinamik durumunu güçlendirir, sitrik asit siklusunu stimüle eder, mitokondriyal NADH ve oksijen tüketimini artırır.<sup>26</sup> 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 hücrel enerji kaynaklarını aktive etmesi ve K<sup>+</sup> kanallarının aktivasyonunu önlemesi gibi etkilerinin aracılık ettiği sanılmaktadır.<sup>26,27</sup>

İlave olarak, ekzojen verilen piruvatın bir başka muhtemel faydalı etkisi de miyometriyal sitooplazmada redoks potansiyelinde değişikliğe yol açmasıdır. Domuz karotis arterinde dışardan verilen 10 mM piruvat sitooplazmik laktat/piruvat ora-



nında olumlu yönde değişikliğe sebep olduğu ve maksimum kasılma cevaplarında artmaya yol açtığı belirlenmiştir.<sup>26</sup> Eğer bu durum miyometriyumda da geçerli ise, KCN ile indüklenen kasılma inhibisyonunun piruvatla geri döndürülmesinde de rol oynamış olma olasılığı düşünülebilir.

Sonuç olarak, siyanürle indüklenen metabolik inhibisyonun sıçan miyometriyal kontraktilitesini 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 düşünülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. 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;77:307-19.
2. Thomas PJ, Fry CH. The effects of cellular hypoxia on contraction and extracellular ion accumulation in isolated human detrusor smooth muscle. *J Urol* 1996;155:726-31.
3. Earley L, Wray S. Effects of hypoxia on force produced by agonists and depolarization and arising spontaneously in the rat uterus. *J Reprod Fertil* 1993;99:539-44.
4. Larcombe-McDouall JB, Harrison N, Wray S. The in vivo relationship between blood flow, contractions, pH and metabolites in the rat uterus. *Pflugers Arch* 1998;435:810-7.
5. Harrison N, Larcombe-McDouall JB, Earley L, Wray S. An in vivo study of the effects of ischaemia on uterine contraction, intracellular pH and metabolites in the rat. *J Physiol* 1994;476:349-54.
6. Monir-Bishty E, Pierce SJ, Kupittayanant S, Shmygol A, Wray S. The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium. *BJOG* 2003;110:1050-6.
7. Harrison N, Larcombe-McDouall JB, Wray S. A <sup>31</sup>P NMR investigation into the effects of repeated vascular occlusion on uterine metabolites, intracellular pH and force, in vivo. *NMR Biomed* 1995;8:28-32.
8. Parratt J, Taggart M, Wray S. Abolition of contractions in the myometrium by acidification in vitro. *Lancet* 1994;344:717-8.
9. Ayar A, Kutlu S, Yilmaz B, Kelestimur H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuro Endocrinol Lett* 2001;22:199-207.
10. Wray S, Kupittayanant S, Shmygol A, Smith RD, Burdyga T. The physiological basis of uterine contractility: A short review. *Exp Physiol* 2001;86:239-46.
11. Wray S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J Physiol* 1993;264(1 Pt 1):C1-18.
12. Rodrigo GC, Standen NB. ATP-sensitive potassium channels. *Curr Pharm Des* 2005;11:1915-40.
13. Pettersson G. Activation of phosphorylase by anoxia and dinitrophenol in rabbit colon smooth muscle: Relation to release of calcium from mitochondria. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1983;52:335-40.
14. Pearce WJ. Mechanisms of hypoxic cerebral vasodilatation. *Pharmacol Ther* 1995;65:75-91.
15. Taggart MJ, Wray S. Hypoxia and smooth muscle function: Key regulatory events during metabolic stress. *J Physiol* 1998;509(Pt 2):315-25.
16. Taggart MJ, Sheader EA, Walker SD, Naderali EK, Moore S, Wray S. External alkalization decreases intracellular  $Ca^{++}$  and spontaneous contractions in pregnant rat myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:959-63.
17. Wray S. The effects of metabolic inhibition on uterine metabolism and intracellular pH in the rat. *J Physiol* 1990;423:411-23.
18. Crichton CA, Taggart MJ, Wray S, Smith GL. Effects of pH and inorganic phosphate on force production in alpha-toxin-permeabilized isolated rat uterine smooth muscle. *J Physiol* 1993;465:629-45.
19. Quenby S, Pierce SJ, Brigham S, Wray S. Dysfunctional labor and myometrial lactic acidosis. *Obstet Gynecol* 2004;103:718-23.
20. Parratt JR, Taggart MJ, Wray S. Changes in intracellular pH close to term and their possible significance to labour. *Pflugers Arch* 1995;430:1012-4.
21. Taggart MJ, Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J Physiol* 1998;511(Pt 1):133-44.
22. Taggart MJ, Wray S. The effect of metabolic inhibition on rat uterine intracellular pH and its role in contractile failure. *Pflugers Arch* 1995;430:125-31.
23. Bunger R, Swindall B, Brodie D, Zdunek D, Stiegler H, Walter G. Pyruvate attenuation of hypoxia damage in isolated working guinea-pig heart. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:423-38.
24. Yanos J, Patti MJ, Stanko RT. Hemodynamic effects of intravenous pyruvate in the intact, anesthetized dog. *Crit Care Med* 1994;22:844-50.
25. Taylor MD, Grand TJ, Cohen JE, et al. Ethyl pyruvate enhances ATP levels, reduces oxidative stress and preserves cardiac function in a rat model of off-pump coronary bypass. *Heart Lung Circ* 2005;14:25-31.
26. Barron JT, Gu L, Parrillo JE. Cytoplasmic redox potential affects energetics and contractile reactivity of vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2225-32.
27. Lorenz JN, Paul RJ. Dependence of  $Ca^{2+}$  channel currents on endogenous and exogenous sources of ATP in portal vein smooth muscle. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 2):H987-94.