



**Araştırma Makalesi / Research Article**

## **Diyabet İndüklenmiş Sıçan Aortası ATP'ye Duyarlı Potasyum Kanallarının, Kir 6.1 ve Kir 6.2, Pulsu Manyetik Alan Tedavisi ile Regülasyonu**

Differential Regulation of Diabetes-Induced Rat Aorta ATP-Sensitive Potassium Channels, Kir 6.1 And Kir 6.2, by Pulsed Magnetic Field Therapy

Mehmet Bertan Yılmaz<sup>1</sup>, Işıl Öcal<sup>2</sup>, Eylül Akbal<sup>1</sup>, Tufan Mert<sup>2</sup>, Turan Tufan<sup>1</sup>, Gamze Cömertpay<sup>1</sup>, Nermin Seda Ilgaz<sup>1</sup>, Özgür Turgut<sup>1</sup>, Nur Uslu<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, ADANA

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı, ADANA

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (Cukurova Medical Journal) 2013; 38 (1):15-21.*

### **ABSTRACT**

**Purpose:** Our goal is to determine the effects of pulsed field magnetic field treatment (PMF), which has been reported to lower blood cholesterol, glucose, triglyceride levels and recover vascular defects of diabetic rats, on ATP-sensitive potassium channel subunits, Kir 6.1 and Kir 6.2, of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat aorta.

**Methods:** Diabetes was induced in rats by streptozotocin administration. Pulsed filed magnetic field treatment performed at 1,5 mT intensity on diabetic rats. Aortas were excised out and mRNAs were isolated and reverse transcribed into cDNAs. In order to evaluate mRNA expression levels, real time PCR was employed with primers specific for Kir 6.1 and Kir 6.2 mRNA.

**Results:** In our studies, pulsed filed magnetic field treatment repressed Kir 6.1 but not Kir 6.2 mRNA expression in diabetic rats.

**Conclusion:** In aorta diabetes-induced endothelial dysfunction leads to impairment in contraction-relaxation response and vascular tone, which could be recovered in part by PMF treatment. Our findings here may suggest that the positive therapeutic effect of PMF possibly act through the regulation of ATP-sensitive potassium channels, Kir 6.1 and Kir 6.2.

**Keywords:** Aorta, ATP-sensitive potassium channel, diabetes, Kir 6.1, Kir 6.2, magnetic field, rat

### **ÖZET**

**Amaç:** Normal ve streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum kolesterol, glikoz, ve trigliserid seviyelerinin normale dönmesini, damarsal hasarların giderilmesini ve özellikle aort halkalarında gevşeme yanıtının oluşmasında olumlu etkileri olan pulslu manyetik alanın (PMA) streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda ATP'ye duyarlı potasyum kanalları alt ünitelerinden olan Kir 6.1 ve Kir 6.2 üzerine olan etkilerini belirlemek bu çalışmamızın temel amacıdır.

**Yöntem:** Diyabet, sıçanlarda Streptozotosin uygulaması ile indüklendi. Diyabetik sıçanlara 1,5 mT şiddetinde pulslu manyetik alan tedavisi uygulandı. Aortları kesilerek çıkarıldı ve mRNA izole edilerek ardından cDNA haline çevrildi. mRNA ekspresyon düzeylerini belirlemek için Kir 6.1 ve Kir 6.2 mRNA'larına özgü primerler aracılığıyla real time PCR yapıldı.

**Bulgular:** Çalışmalarımızda kullanılan PMA'nın, diyabetik sıçanlarda Kir 6.1 mRNA ekspresyonunu baskımlarken ve Kir 6.2 mRNA ekspresyonunu indüklediği gözlenmiştir.

**Sonuç:** PMA tedavisi aortda diyabete bağlı olarak ortaya çıkan endotel hasarlar ile ilişkilendirilmiş kasılma-gevşeme yanıtı ve vasküler tonda oluşan fonksiyon bozukluklarının kısmen iyileştirilmesini sağlar. Bizim buradaki bulgularımız, PMA'nın pozitif tedavi edici etkisini ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının üzerinden gerçekleştirdiğini önermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Streptozosin, PMA, KATP, Kir 6.1, Kir 6.2

## GİRİŞ

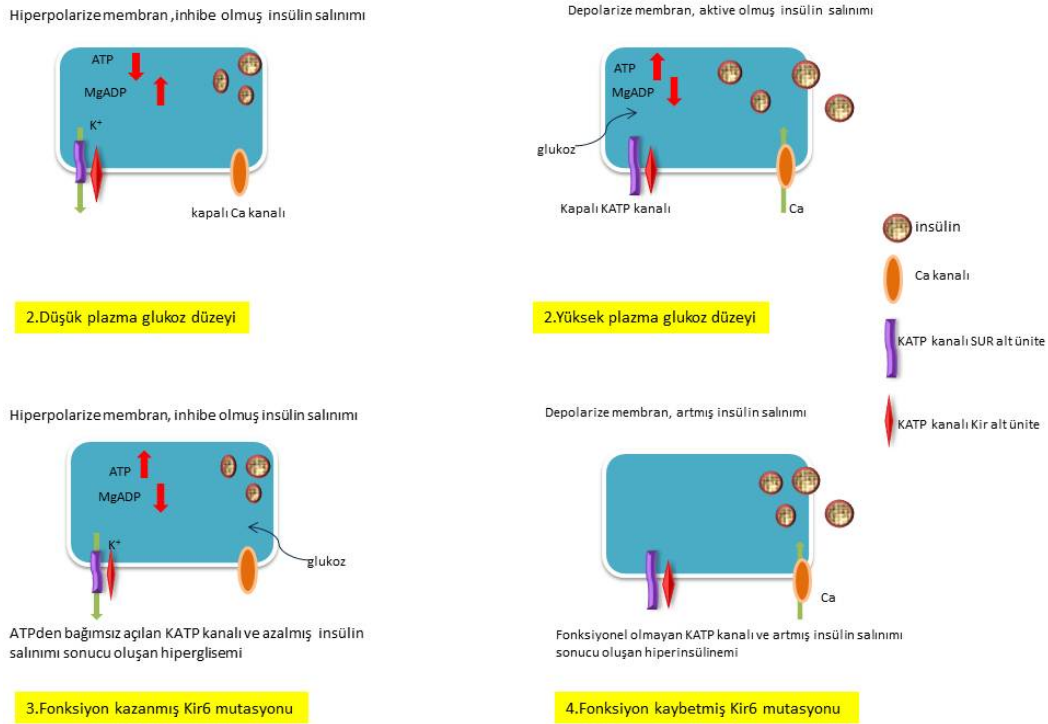
Diabetes mellitus sıklıkla yalnızca diyabet olarak adlandırılan, genellikle kalıtsal ve çevresel etkenlerin birleşimi ile oluşan ve kan glukoz seviyesinin aşırı oranda yükselmesiyle (hiperglisemi) karakterize metabolik bir bozukluktur. Diyabet genel itibarıyla insülin salgılanmasında ki yetersizlik ya da insülinin etkisinde ki bir bozukluk sonucunda ortaya çıkan yüksek kan şekerinin yol açtığı birkaç grup hastalığı tanımlamak için kullanılan ortak bir terim olarak da kullanılmaktadır. Yüksek kan şekerinin, kan damarları ve arterler içinde yağ birikimini arttırıp düz kas hücre duvarlarını olumsuz şekilde etkilediği belirtilmiş olup özellikle bu tip damarların gevşeme yanıtında defektler olduğu ifade edilmiştir<sup>1-3</sup>.

Kardiovasküler hastalıklar diyabette en sık rastlanan komplikasyon grubunu teşkil eder. Bu komplikasyonlar diyabetli hastaların mortalitelerinin artmasına da neden olmaktadır. Diyabetteki temel tedavi yaklaşımı bu komplikasyonların ortadan kaldırılarak mortalite oranının düşürülmesine yöneliktir. Daha önce yapılmış çalışmalar, ATP'ye duyarlı potasyum ( $K^+$ ) kanalları ve Kir isimli alt ünitelerinin kardiovasküler dokuların işlevleri üzerinde düzenleyici olarak rol oynadıklarını göstermiştir. Bu kanalların uyarılması vazodilatasyona neden olurken, inhibisyonu insülin salınımını arttırmaktadır. Moleküler biyoloji ve elektrofizyolojik çalışmalar bu kanalların çalışma prensipleri hakkında bilgiler verse de, diyabetin kardiovasküler komplikasyonların da ki rolleri halen çok açık değildir<sup>4</sup>. Yüksek kan şekerinin damar endotelinde hasara neden olarak çeşitli mediatörlerin salınmasına ve ATP'ye duyarlı  $K^+$  kanalları ile Kir isimli alt üniteleri aracılığıyla vazokonstriksiyona neden olarak gevşeme yanıtında bozukluğa yol açtığı bilinmektedir. Yakın

zamanda bazı araştırmacılar diyabetin gevşeme yanıtı üzerine oluşturduğu bu olumsuz etkilerin pulslu manyetik alan (PMA) uygulamasıyla giderilebileceğini ortaya koymuşlardır<sup>5</sup>. Düz kas hücrelerinde özellikle gevşeme yanıtının oluşmasında düzenleyici rol oynadığı belirtilen hücre elemanlarından en önemlisi ATP'ye duyarlı potasyum kanallarıdır. Bu kanallar 4 Kir6 ve 4 SUR alt ünitelerinden oluşan kompleks bir oktamerik yapıya sahiptir. Kir6 alt ünitelerinin içeriye doğru geri pompalama aktivitesi vardır. Kir 6 iki alt izoforma sahiptir; Kir6.1, vasküler düz kas hücrelerinde bulunurken Kir6.2 farklı dokularda da bulunabilir. ATP'nin Kir6 ünitesine bağlanması KATP kanalının kapanmasına neden olur<sup>5-7</sup>. Birçok dokuda anahtar rol oynayan ATP duyarlı  $K^+$  kanallarının fonksiyonları hücre içi ATP miktarına göre düzenlenir bu yüzden isimleri ATP duyarlı şeklinde ifade edilir. Bu kanallar pankreas beta hücrelerinde glukozu bağımlı olarak insülin salınımını düzenler ve tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan sülfonilüre grubu ilaçlar için hedef olarak hizmet eder. Hücresel metabolizmanın yavaşlaması bu kanalları açar, potasyum dışarı atılır ve hücre membranında hiperpolarizasyon oluşarak elektriksel aktivite baskılanır. Metabolizmanın artması durumunda ise kanallar kapanır, hücre membranında depolarizasyon oluşur ve hücre uyarılabilir hale gelir (Şekil 1). KATP kanalı mutasyonu olan hastalar, genetiği değiştirilmiş ya da kimyasal ajanlarla model oluşturulmuş deney hayvanları, izole hücreler ve dokular üzerinde yapılan çalışmalar bu kanalların birçok önemli olayda fizyolojik rolleri olduğunu göstermiştir; pankreas beta hücrelerinden insülin salınımı ve alfa hücrelerinden glukagon salınımı ile kan şekerini düzenlerken, somatostatin ve GLP-1 gibi hormonların salınımında da rol almaktadırlar<sup>6-9</sup>.

Normal ve streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum kolesterol, glikoz, ve trigliserid seviyelerinin normale dönmesini, damarsal hasarların giderilmesi ve özellikle aort

halkalarında gevşeme yanıtının oluşmasında olumlu etkileri olan PMA'nın ATP'ye duyarlı potasyum kanalları alt ünitelerinden olan Kir 6.1 ve Kir 6.2 üzerine olan etkilerini belirlemek bu çalışmamızın temel amacıdır.



**Şekil 1.** KATP kanalları insülin sekresyonunda glukoz metabolizmasını bağlar. Glukoz GLUT-2 aracılığıyla hücreye girer, glikolitik ve mitokondriyal metabolizma hücrede ATP miktarı artarken MgADP miktarı azalır. Bunun sonucunda KATP kanalları kapanır, membran depolarize olur, voltaj bağımlı Ca kanalları açılır ve insülin salınımı başlar

## MATERYAL ve METOD

Etik kurallara uygunluğu ve deneysel protokolleri Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışmamızda Çukurova Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezinden temin edilen, ağırlıkları 250-300 gr. arasında değişen Wistar Albino 30 erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar klima kontrolü olan, 12 saatlik aydınlık ve karanlık

döngüsü altında, su ve gıda kontrollerinin yapıldığı bir odada muhafaza edilmiştir.

Sıçanlarda deneysel diyabet olgusu streptozotosinin (STZ; 45 mg/kg) kuyruk venine intravenöz olarak enjekte edilmesiyle oluşturuldu. Diyabetin kontrol grubu için sıçanlara STZ ile aynı hacimde serum fizyolojik (SF) intravenöz olarak

enjekte edildi. STZ enjeksiyonundan yaklaşık 48 saat sonra kan serum glikoz değerleri glukometre ile ölçüldü (Accutrend GCT, Roche, Mannheim, Germany). Kan örnekleri kuyruk veninden alındı ve 300 mg/dl kan glukoz değeri diyabet tanısı için minumum seviye olarak kabul edildi<sup>11</sup>. Sıçanlar 6 hafta süresince 1,5 mT şiddetinde pulslu manyetik alanın etkisine bırakıldı. Sonrasında sıçan aortları dikkatli bir şekilde kesilerek çıkarıldı ve trizol (İnvitrogen) kullanılarak mRNA'ları izole edildi sonrasında super script III (Reverse transkriptaz) kiti (İnvitrogen) ile bu mRNA'lar cDNA haline çevrildi.

Kir 6.1 ve Kir 6.2 genlerine özgü primer çiftleri (Primer dizileri tablo-1'de verilmektedir.) ve SYBR-green (Applied biosystems) PCR karışımı kullanarak kullanılarak Real time PCR yapıldı. Reaksiyon hacmi 25 µl, reaksiyon koşulları ise 50°C 2 dakika, 95°C 10 dakika, sonrasında 40 döngü 95°C 15 saniye - 60°C 1 dakika olarak uygulandı. Tüm RNA örneklerine ait ekspresyon düzeyleri endojen kontrol olarak kullanılan gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ile normalize edildi.

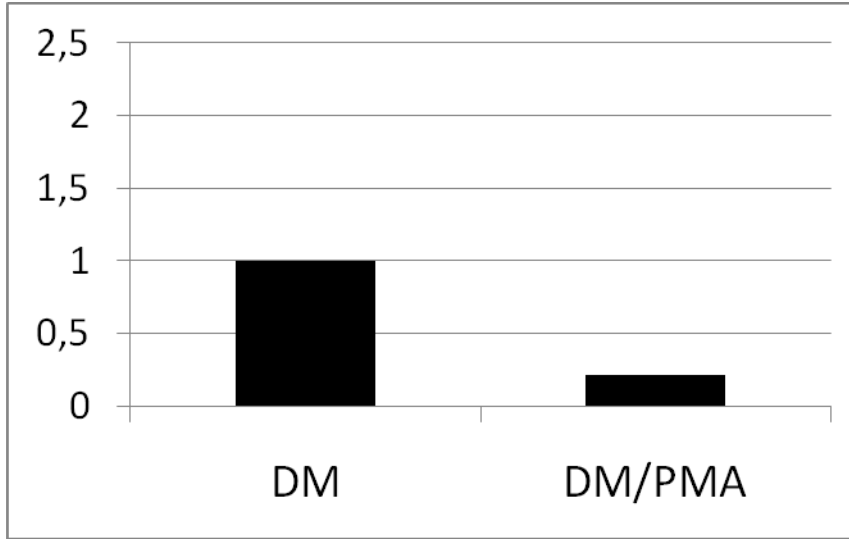
**Tablo 1. Kullanılan primer dizileri**

Kir 6.1 sıçan forward:	5'-CATAGCTCATCGGGTTCACACCATT-3'
Kir 6.1 sıçan reverse:	5'-GCATCGAGACACAGGTGCTGTTGT-3'
Kir 6.2 sıçan forward:	5'-AGCTGGCTGCTCTTCGCTATCA-3'
Kir 6.2 sıçan reverse:	5'-CCCTCCAAACCCAATGGTCACT-3'
GAPDH sıçan forward:	5'-TCTACCCACGGCAAGTTCAAT-3'
GAPDH sıçan reverse:	5'-ACCCCATTTGATGTTAGCGG-3'

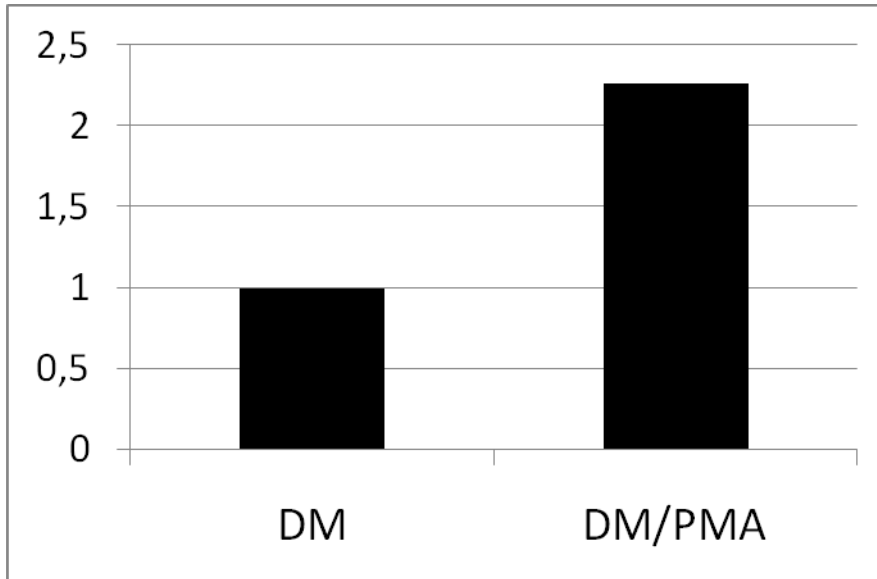
## BULGULAR

STZ-indüklenmiş diyabetik sıçan modellerinde ki aorta halkaları gevşeme yanıtının oluşmasında önemli etkiye sahip PMA ile ATP'ye duyarlı potasyum kanallarından Kir 6.1 ve Kir 6.2

mRNA ekspresyonunun birbirleriyle ilişkili olabileceğine dair bulgular elde edildi. Kir 6.1 mRNA ekspresyonunun diyabetik sıçanlarda PMA etkisiyle baskılanırken ve Kir 6.2 mRNA ekspresyonunun indüklediği gözlenmiştir (Şekil 2-3).



**Şekil 2.** Pulsu manyetik alanın diyabetik sıçan aortası Kir 6.1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi. 6.1 mRNA ekspresyon seviyelerinin katlı değişimi (Sonuçlar GAPDH'e göre normalize edilmiştir)



**Şekil 3.** Pulsu manyetik alanın diyabetik sıçan aortası Kir 6.2 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi, Kir 6.2 mRNA ekspresyon seviyelerinin katlı değişimi (Sonuçlar GAPDH'e göre normalize edilmiştir.)

### TARTIŞMA

İnsülin salınımının gerçekleştiği beta hücrelerinin elektrik direnci KATP kanallarına bağlıdır. Bu kanalların aktivitesi diyabet açısından

oldukça kritik öneme sahiptir. Kanalın aktif olması diyabete neden olurken çeşitli faktörlerle inaktive edilmesi diyabet tedavisine katkı sağlamaktadır. Bu kanalların aktivitesinin azaltılması insülin

sekresyonunu arttırırken, endotel hücrelerinde meydana gelen değişiklikler ile de diyabetin kardiovasküler yan etkilerinin ortadan kalkmasına katkıda bulunacaktır. Ayrıca, KATP kanalı genlerinde gözlenen mutasyonlar neonatal diyabet, hiperinsülinemi ve dilate kardiomyopatiye gibi patolojilere neden olmaktadır<sup>1-3</sup>.

Pulsu manyetik alanın biyolojik sistemler üzerine olan etkisi birçok güncel çalışmada araştırılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar da PMA ile KATP kanalları uyarılarak bu kanalların bulunduğu dokulardaki mevcut patolojilerin tedavi edilebileceği gösterilmiştir. İnvaziv olmayan ve farmakolojik ilaçlar gibi herhangi bir yan etki oluşturmayan bu yöntem; diyabet ve kardiovasküler etkilerinin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunacaktır. Tüm dünyada 100 milyonun üzerinde diyabetli insan olduğu düşünülmekte olup, diyabetteki tedavi yaklaşımlarında semptomatik bulguların düzeltilmesinden ileriye gidilememiştir, dolayısıyla bu durum diyabetli hastaların yaşam standartlarının yükselmesine büyük ve kalıcı bir katkı sağlayamamaktadır<sup>6-8</sup>.

PMA tedavisi aortta diyabete bağlı olarak ortaya çıkan endotel hasarlar ile ilişkilendirilmiş kasılma-gevşeme yanıtı ve vasküler tonda oluşan fonksiyon bozukluklarının kısmen giderilmesini sağlayabilmektedir<sup>7-8</sup>. ATP-duyarlı potasyum kanalları farklı dokularda farklı alt ünit kompozisyonlarına sahip olmakta ve dolayısıyla doku spesifik olarak regüle edilebilmektedirler. Ayrıca, farklı alt ünitlerin farklı şekillerde regüle edildiğinde gösterilmiştir. Bunların yanında sıçan aortası Kir6.1 ve Kir 6.2 ekspresyonları diyabetli ve sağlıklı olgularda farklılık göstermemektedir<sup>10-11</sup>. Fakat ilginç olarak buradaki bulgularımız, PMA'nın pozitif tedavi edici etkisini ATP'ye duyarlı potasyum kanalları alt ünitleri üzerinden gerçekleştirdiğini, özellikle insülin bağımsız ortamlarda bu etkinin daha yoğun olarak ortaya çıktığı önerilebilir.

Ülkemizde de görülme sıklığı oldukça yüksek olan bu hastalığın tedavisi için oldukça büyük bütçeler ayrılmaktadır. Uyguladığımız PMA yöntemi temel alınarak yapılacak çalışmalar ile yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilecek böylelikle diyabetin mortalite oranları ve maliyetinde büyük bir azalma sağlanabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Casares S and Brumeanu TD . Insights into the pathogenesis of type 1 diabetes: a hint for novel immunospecific therapies. *Curr Mol Med.* 2001; 1: 357-78.
2. Grant PJ . Diabetes and vascular disease research: a new beginning. *Diab Vasc Dis Res.* 2009; 6: 61.
3. Creager M, Lüscher T. Diabetes and vascular disease pathophysiology, clinical consequences and medical therapy part 1. *Circulation.* 2003;108:1527-32.
4. Grant PJ . Diabetes mellitus and vascular disease: targeting cardiometabolic risk. *Diab Vasc Dis Res.* 2008; 5: 7-8.
5. Ashcroft F, ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion, *J. Clin. Invest.* 2005; 115:2047-58.
6. Mulhern M and Docherty J. Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta. 1997.
7. Mert T, Gunay I, and Ocal I Neurobiological effects of pulsed magnetic field on diabetes-induced neuropathy. *Bioelectromagnetics.* 31: 39-47.
8. Mert T, Gunay I, Ocal I, Guzel I, Inal T, Sencar L, Polat S. Macrophage depletion delays progression of neuropathic pain in diabetic animals. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 2009; 379:445-52.
9. Newsholme P, Brennan L, Rubi B, and Maechler P . New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2005; 108: 185-94.
10. Teramoto N . Physiological roles of ATP-sensitive K+ channels in smooth muscle. *J Physiol.* 2006; 572: 617-24.
11. Farzaneh T and Tinker A . Differences in the mechanism of metabolic regulation of ATP-sensitive K+ channels containing Kir6.1 and Kir6.2 subunits. *Cardiovasc Res.* 2008; 79: 621-31.

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:**

Dr. Mehmet Bertan Yılmaz  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Balcalı/ ADANA  
e-mail: mehmetbertanyilmaz@gmail.com

geliş tarihi/received :10.08.2012  
kabul tarihi/accepted:;17.09.2012