

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Sıçanlarda Vasküler Tonusun Düzenlenmesinde Potasyum Kanallarının Rolünün İncelenmesi*

Serdar ŞAHİNTÜRK, Naciye İŞBİL

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Potasyum (K^+) kanalları vasküler tonusun önemli düzenleyicileridir. Bu çalışmada K^+ kanal tiplerinin fenilefrin ile uyarılan vasküler tonus üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Wistar Albino ırkı erkek sıçanların torasik aortlarından elde edilen 4 mm uzunluğundaki vasküler halkalar izole organ banyosu sistemine yerleştirildi. Vasküler gerim 1 grama ayarlandı. K^+ kanal tiplerinin fenilefrin ile indüklenen vasküler tonus üzerindeki etkilerini belirlemek için, 1 saatlik bir dengeleme döneminden sonra aort halkalarına K^+ kanal blokörleri uygulandı. 30 dakikalık inkübasyondan sonra, vasküler halkalar 10^{-6} M fenilefrin ile kasıldı ve stabil bir kasılma elde edildi. Fenilefrin uygulamalarından önceki dönemlerdeki gerim değerleri %100 olarak kabul edildi. Fenilefrin ile elde edilen plato fazı gerim değerleri bu değer üzerinden hesaplandı. Elde edilen gerim değerleri kontrol gruplarındaki gerim değerleri ile karşılaştırıldı. Büyük iletkenli kalsiyum (Ca^{2+}) ile aktive olan K^+ kanal (BK_{Ca}) blokörü tetraetilamonyum, orta iletkenli Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanal (IK_{Ca}) blokörü TRAM-34, ATP-duyarlı K^+ kanal (K_{ATP}) blokörü gliburid, voltaj kapılı K^+ kanal (K_V) blokörü 4-Aminopiridin ve iki porlu K^+ kanal (K_{2P}) blokörü anandamid uygulamaları vasküler gerim değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden oldu. Ancak, küçük iletkenli Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanal (SK_{Ca}) blokörü apamin ve içeriye doğrultucu K^+ kanal (Kir) blokörü baryum klorür uygulamaları vasküler gerim değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Bu çalışmanın bulguları, BK_{Ca} , IK_{Ca} , K_{ATP} , K_V ve K_{2P} kanallarının fenilefrin ile indüklenen vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Öte yandan SK_{Ca} ve Kir kanallarının fenilefrin ile indüklenen vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli faktörler olmadığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Potasyum kanalları. Vasküler tonus. Torasik aort. İzole organ banyosu.

Investigation of the Role of Potassium Channels in the Regulation of Vascular Tone in Rats

ABSTRACT

Potassium (K^+) channels are important regulators of vascular tone. In this study, it was aimed to determine the effects of K^+ channel types on phenylephrine-induced vascular tone. The 4 mm length vascular rings obtained from the thoracic aortas of male Wistar Albino rats were placed in the isolated tissue bath system. Vascular tension was adjusted to 1 gram. To determine the effects of K^+ channel types on phenylephrine-induced vascular tone, K^+ channel blockers were administered to the aortic rings after a 1-hour equilibration period. After 30 min of incubation, the vascular rings were contracted with 10^{-6} M phenylephrine and a stable contraction was obtained. The tension values in the periods before the phenylephrine administrations were accepted as 100%. The plateau phase tension values obtained with phenylephrine were calculated over this value. The obtained tension values were compared with the tension values in the control groups. Large-conductance calcium (Ca^{2+})-activated K^+ channel (BK_{Ca}) blocker tetraethylammonium, intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (IK_{Ca}) channel blocker TRAM-34, ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channel blocker glyburide, voltage-gated K^+ (K_V) channel blocker 4-Aminopyridine, and two-pore domain K^+ (K_{2P}) channel blocker anandamide administrations caused a statistically significant increase in vascular tension values. However, small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK_{Ca}) channel blocker apamin and inwardly-rectifying K^+ (Kir) channel blocker barium chloride administrations did not cause a statistically significant change in vascular tension values. The findings of this study show that BK_{Ca} , IK_{Ca} , K_{ATP} , K_V , and K_{2P} channels have significant effects on the regulation of phenylephrine-induced vascular tone. On the other hand, it is suggested that SK_{Ca} and Kir channels are not important factors in the regulation of phenylephrine-induced vascular tone.

Keywords: Potassium channels. Vascular tone. Thoracic aorta. Isolated tissue bath.

Geliş Tarihi: 29.Ağustos.2022

Kabul Tarihi: 30.Kasım.2022

Dr. Serdar ŞAHİNTÜRK
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı, Nilüfer, Bursa
Tel.: 0224 295 40 22
E-posta: ssahinturk@uludag.edu.tr

* 5. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi'nde
(10-12 Mart 2022, Burdur) sözlü bildiri olarak
sunulmuştur.

Yazarların ORCID Bilgileri:

Serdar ŞAHİNTÜRK: 0000-0002-7612-0055
Naciye İŞBİL: 0000-0002-8792-2555

Vasküler tonus bir vasküler yapının maksimum dilate olmuş durumuyla kıyaslandığında anlık olarak kasılma derecesini tanımlamaktadır. Bir vasküler yapının uyarılmamış durumdaki yani dinlenme gerimi bazal vasküler tonus olarak ifade edilmektedir. Bununla birlikte, fizyolojik koşullar altında vasküler yapılar birçok uyarının etkisine maruz kalmaktadır. Vasküler tonus dokulardaki kan akımının düzenlenmesini sağlayan çok sayıdaki ekstresek ve intrinsek faktörün karşılıklı olarak sürekli ve karmaşık etkileşimi ile regüle edilmektedir. Ekstresek düzenleyici faktörler başlıca nöral ve hümorale etkenlerden oluşmaktadır. İntresek düzenleyici faktörlerin başlıcaları ise doku faktörleri, parakrin hormonlar, endotelial ve miyojenik mekanizmalardır^{1,2}. Nitrik oksit, atrial natriüretik peptid ve prostaglandin I₂ gibi bazı faktörler damar geriminin azalmasına ve damarın genişlemesine yani vazodilatasyona neden olurken, fenilefrin, anjiyotensin II, tromboksan A₂ ve serotonin gibi diğer bazı faktörler ise damar gerimini artırarak damarın daralmasına yani vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Öte yandan, sempatik sinir sisteminin aktivasyonu genellikle vazokonstriksiyona buna karşın hipoksi ise vazodilatasyona neden olmaktadır^{3,4}. Histamin ve bradikinin gibi bazı maddeler ise değişen koşullara göre damar gerimini artırıp vazokonstriktör veya azaltıp vazodilatatör etki gösterebilmektedir^{5,6}.

Sistemik dolaşımdaki vasküler düz kas hücrelerinin kasılma ve gevşeme fonksiyonlarının düzenlenmesinde, hormonlar, nörotransmitterler, endotelten türetilmiş faktörler ve kan basıncı gibi vazodilatatör veya vazokonstriktör yönde etki gösteren birçok uyarın arasındaki kompleks etkileşimler yer almaktadır. Tüm bu faktörlerin neden olduğu sinyaller, vasküler düz kas hücrelerinin kontraktıl fonksiyonlarının regülasyonunu sağlamaktadır^{1,2}. Bu sinyallerin nihai olarak entegrasyonu vasküler düz kas hücreleri tarafından yapılmaktadır. Böylece, kan damarlarının çapı ve kan akımına karşı gösterilen direnç belirlenmektedir. İyon kanallarının bu süreçteki rolü oldukça kritik bir öneme sahiptir. Kalsiyum (Ca²⁺) iyonu, diğer tüm kas hücrelerinde olduğu gibi, vasküler düz kas hücrelerinde de kasılmanın temel tetikleyicisi olarak işlev görmektedir⁷. Plazma zarındaki kanallardan Ca²⁺ akışı ve hücre içi depolardan Ca²⁺ salımı sitoplazmik Ca²⁺ artışının ana kaynaklarını oluşturmaktadır⁸. Ek olarak, iyonların iyon kanalları boyunca hareketi membran potansiyelini belirlemektedir. Membran potansiyeli, sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonu ile birlikte, iyon kanallarından Ca²⁺ salımını ve kasılma mekanizmasının Ca²⁺'a duyarlılığını düzenlemektedir^{9,10}. Vasküler düz kas hücrelerinin plazma membranlarında en az 5 farklı tipte potasyum (K⁺) kanalı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, depo kontrollü Ca²⁺ kanalları, en az 2 tip klor (Cl⁻) kanalı, 2 tip voltaj kapılı Ca²⁺ kanalı ve gerilerek aktive edilen katyon kanalları gibi diğer bazı iyon kanallarının da

vasküler düz kas hücreleri tarafından eksprese edildiği rapor edilmiştir. Bu iyon kanallarının tamamının vasküler tonus düzenlenmesinde rol alabildiği ileri sürülmektedir⁷⁻¹⁰.

Vasküler düz kas hücrelerinde bulunan iyon kanallarının tümü önemli olmakla birlikte, potasyum kanallarının vasküler düz kas hücrelerindeki dinlenme membran potansiyelinde ve kan damarlarındaki vasküler tonusun düzenlenmesinde kritik bir rolü vardır. Vasküler düz kas hücrelerinde eksprese edildiği bildirilen beş farklı tipte K⁺ kanalı vardır. Bunlar büyük, orta ve küçük iletkenli Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanalları (sırasıyla: BK_{Ca}, IK_{Ca} ve SK_{Ca} kanalları), voltaj kapılı K⁺ (K_V) kanalları, ATP-duyarlı K⁺ (K_{ATP}) kanalları, içeri doğrultucu K⁺ (Kir) kanalları ve iki porlu K⁺ (K_{2p}) kanallarıdır⁷⁻¹⁰. K⁺ kanallarının yapısı, sayısı, aktivitesi veya gen ekspresyonundaki değişikliklerin hipertansiyon, pulmoner arteriyel hipertansiyon, diyabet, ateroskleroz ve hiperkolesterolemi gibi birçok kardiyovasküler hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu hastalıklarda, arteriyel düz kas hücrelerinde membran potansiyelindeki anormal değişiklikler damar tonusunun artmasına ve vazokonstriktör ajanlara karşı aşırı duyarlılığa neden olabilmektedir^{11,12}. Son zamanlardaki araştırmalar, damar hastalıklarının tedavisinde terapötik fayda sağlayabilecek K⁺ kanallarının aktivatör veya inhibitörlerinin sayısını artırmayı hedeflemekte ve bu çalışmalarda birçok vazoaaktif maddenin etki mekanizmaları araştırılırken potasyum kanallarının olası rolü de sorgulanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, vasküler düz kasta yer aldığı bildirilen tüm K⁺ kanal tiplerinin sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan vasküler tonus üzerindeki etkilerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem

Etik Kurul Onayı ve Deney Hayvanları

Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alındıktan sonra çalışmaya başlandı (Tarih: 08.02.2022; Numara: 2022-02/05). Çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Birimi'nden temin edilen toplam 10 adet Wistar Albino ırkı erkek sıçan (12 haftalık) kullanıldı. Sıçanlar, her bir kafeste 4-6 adet olacak şekilde barındırıldı. Ortam sıcaklığının 22±2 °C'de sabit kalması sağlandı. Deney hayvanları, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde tutuldu. Sıçanların yem ve su alımı *ad libitum* olarak sağlandı. Deney hayvanları, Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Kılavuzu prensiplerine uygun olarak bakıldı ve çalışma süresince hayvan hakları korundu.

İzole Organ Banyosu Deneyleri

Sıçanlar, anestezi uygulanmadan, dekapitasyon yöntemi ile feda edildi. Torakoabdominal bölgeleri, aşağıdan yukarıya doğru dikkatli bir şekilde eksiz

Vasküler Tonus ve Potasyum Kanalları

edilen sıçanların torasik aortları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Torasik aort dokuları, içerisinde soğuk Krebs solüsyonu bulunan Petri kaplarına yerleştirildi. Perivasküler dokulardan dikkatli ve nazik bir şekilde arındırılan damarlardan 4 mm uzunluğunda vasküler halkalar hazırlandı. Bir sıçanın torasik aortundan 4 adet vasküler halka elde edildi. Her bir damar halkası n=1 olarak kabul edildi. Vasküler halkalar, izole organ banyosu sistemindeki (MAY IOBS99, Commat Ltd., Ankara) 20 mL'lik cam banyo haznelere, çelik damar asma aparatları ve cerrahi iplik kullanılarak, cerrahi ipliklerin konumu dikey konumda olacak şekilde yerleştirildi. Rezervuarlar ve banyo hazneleri, damar halkalarının beslenmesini sağlayacak olan Krebs solüsyonu (mM: 2,5 CaCl₂ × 2 H₂O, 118 NaCl, 4,8 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 11 C₆H₁₂O₆ × H₂O, 25 NaHCO₃, 1,2 MgSO₄ × 7 H₂O) ile dolduruldu. Dokuların maruz kaldığı sıcaklık, çift çeperli sistemde sürekli olarak dolaşan sıcak distile su vasıtasıyla, 37 °C olacak şekilde sabit tutuldu. Krebs solüsyonu içerisindeki dokular %95 O₂-%5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli olarak gazlandırıldı ve bu şekilde ortam pH'ı 7,4 olarak ayarlandı. İlk 30 dakikalık sürenin sonrasında dinlenme gerimi 1 gram olarak ayarlandı. Daha sonra dokuların metabolik ve fizyolojik olarak dengelenmesi için 1 saat daha beklendi. Tüm bu süreç boyunca, banyo haznelerindeki Krebs solüsyonu, metabolik son ürünlerin uzaklaştırılması ve içerik konsantrasyonunun yeterli düzeyde tutulabilmesi amacıyla her 10 dakikada bir yenilendi. Vasküler halkalardaki gerim değişiklikleri izometrik kuvvet transdüserleri (MAY FDT05, Commat Ltd., Ankara) ile tespit edildi. Elde edilen gerim değerleri bilgisayar yazılımı (BIOPAC MP36, Santa Barbara, CA, USA) ile kaydedildi ve sonrasında bu verilerin analizleri yapıldı.

Dengelenme periyodu sonrasında, dinlenme durumundaki damar halkalarından 10 dakikalık süredeki gerim değerlerinin kaydı alındı. Bu süreçteki ortalama gerim değeri %100 olarak kabul edildi. Sonrasında her bir grup için ayrı ayrı potasyum kanal blokörleri, vasküler fonksiyonel çalışmalarda etkinlikleri gösterilmiş olan dozlarda uygulandı⁹⁻¹³. Blokörlerin etkilerini tam olarak gösterebilmeleri için 30 dakika beklendi ve sonrasında damar halkaları 10⁻⁶ M fenilefrin ile kasılarak plato durumundaki damar gerimlerinin kaydı alındı. Kontrol gruplarında potasyum kanal blokörü uygulanmaksızın 10⁻⁶ M fenilefrin uygulandı ve plato durumundaki vasküler gerim değerleri kaydedildi. Plato gerim değerlerinin yüzdesi dinlenme durumundaki yüzde gerim değerleri (%100) üzerinden hesaplandı. Her bir gruptaki deneyler aynı deney hayvanından elde edilen damar halkaları kullanılarak tamamlandı. Her bir deney hayvanından 4 adet damar halkası elde edildi. Damar halkaları yıkılarak tekrar kullanıldı. Bu şekilde her bir grup için 8 damar halkası (n=8) sağlandı. Kontrol grupları ile karşılaştırılarak, potasyum kanallarının

blokajının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan vasküler tonus yüzde gerim değerleri üzerindeki etkisi belirlendi.

Deney grupları şu şekilde oluşturuldu;

1. Tetraetilamonyum (TEA) (1 mM) grubu: Bir adet sıçandan izole edilen torasik aort dokusundan 4 adet damar halkası elde edildi. Damar halkaları 4 kanallı izole organ banyosu sistemine yerleştirildi. Dengelenme periyodu sonrasında damarlara 1 mM TEA uygulandı. 30 dakika sonra damarlar 10⁻⁶ M fenilefrin ile kasıldı. Plato fazındaki gerim değerleri belirlendi. Kontrol grubunda 1 mM TEA uygulaması yapılmaksızın damarlar 10⁻⁶ M fenilefrin ile kasıldı. Plato fazındaki gerim değerleri belirlendi. Damarlar 3 kez yıkandı ve ilaçlar uzaklaştırıldı. Dengelenme periyodu yineleni ve damarlara aynı deneysel prosedür tekrar uygulandı. Bu şekilde n=8 sağlandı.
2. Tetraetilamonyum (10 mM) grubu: Yukarıda belirtilen protokol 10 mM TEA kullanılarak uygulandı.
3. Tetraetilamonyum (30 mM) grubu: Yukarıda belirtilen protokol 30 mM TEA kullanılarak uygulandı.
4. TRAM-34 grubu: Yukarıda belirtilen protokol 18 nM TRAM-34 kullanılarak uygulandı.
5. Apamin grubu: Yukarıda belirtilen protokol 100 nM apamin kullanılarak uygulandı.
6. Gliburid grubu: Yukarıda belirtilen protokol 10 µM gliburid kullanılarak uygulandı.
7. 4-Aminopiridin (4-AP) grubu: Yukarıda belirtilen protokol 1 mM 4-AP kullanılarak uygulandı.
8. Baryum klorür (BaCl₂) grubu: Yukarıda belirtilen protokol 30 µM BaCl₂ kullanılarak uygulandı.
9. Anandamid grubu: Yukarıda belirtilen protokol 10 µM anandamid kullanılarak uygulandı.

İlaçlar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler ve ilaçlar Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) firmasından temin edildi. İlaçlar kullanım talimatlarına göre hazırlandı. Buna göre; büyük iletkenli Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanal blokörü tetraetilamonyum (TEA), voltaj kapılı K⁺ kanal blokörü 4-Aminopiridin (4-AP), orta iletkenli Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanal blokörü TRAM-34, küçük iletkenli Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanal blokörü apamin, içeri doğrultucu K⁺ kanal blokörü baryum klorür (BaCl₂) ve fenilefrin distile su içerisinde çözüldü. ATP-duyarlı K⁺ kanal blokörü gliburid ve iki porlu K⁺ kanal blokörü anandamid ise dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Krebs çözeltisindeki son DMSO konsantrasyonu % 0,1'i geçmedi. DMSO vasküler düz kas kasılmasını veya gevşemesini anlamlı düzeyde etkilemedi.

İstatistiksel Analiz

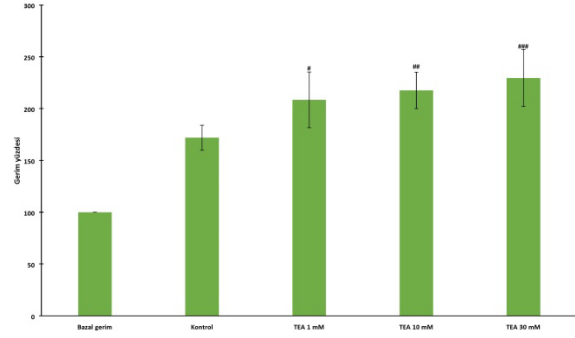
Bağımsız ortalamaların karşılaştırılması için Cohen d istatistiği kullanılarak gruplar arasındaki farkın büyüklüğü hesaplandı ve etki büyüklüğü 0,30 olarak belirlendi. Çalışmanın gücü 0,80 ve alfa değeri 0,05 iken, gerekli minimum örneklem büyüklüğü grup başına n=5 olarak tahmin edildi. Güç analizi GPower 3.1 ile yapıldı. İstatistiksel analiz için IBM SPSS v.23.0 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanıldı. Elde edilen veriler, fenilefrin uygulamasından önceki 10 dakikalık periyotta elde edilen ortalama bazal gerim değerlerinin yüzdesi olarak ortalama±standart sapma şeklinde ifade edildi. İkili grupların karşılaştırılmaları için bağımsız örneklem t testi uygulandı. Çoklu grupların karşılaştırılmaları için tek yönlü varyans analizi ve ikili karşılaştırmalar için Bonferroni testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

Bulgular

Büyük iletkenli kalsiyum ile aktiflenen potasyum kanal blokörü TEA'nın 1 mM, 10 mM ve 30 mM olmak üzere 3 farklı dozda uygulanması sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan yüzde gerim değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışa neden oldu (1 mM dozda p=0,015; 10 mM dozda p=0,002 ve 30 mM dozda p<0,001) (Şekil 1). Orta iletkenli kalsiyum ile aktiflenen potasyum kanal blokörü TRAM-34, K_{ATP} kanal blokörü gliburid, K_V kanal blokörü 4-AP ve K_{2P} blokörü anandamid uygulamaları sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan yüzde gerim değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışa neden oldu (sırasıyla: p=0,015, p=0,020, p<0,001, p=0,001) (Şekil 2, Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 7). Küçük iletkenli kalsiyum ile aktiflenen potasyum kanal blokörü apamin ve içeri doğrultucu potasyum kanal blokörü BaCl₂ uygulamaları sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan yüzde gerim değerlerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkilemedi (sırasıyla: p=0,483, p=0,794) (Şekil 3 ve Şekil 6) (Tablo I).

Tablo I. Çalışma grupları ve elde edilen veriler.

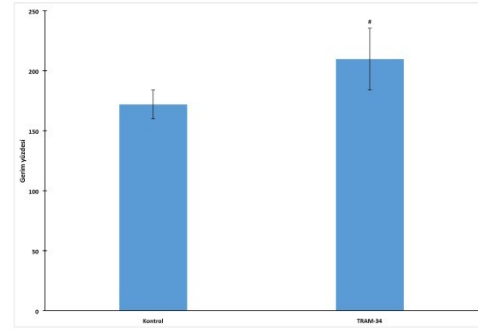
GRUPLAR	ORTALAMA	STANDART SAPMA
Kontrol	171,88	12,06
Tetraetilamonyum (1 mM)	208,38	26,86
Tetraetilamonyum (10 mM)	217,5	17,54
Tetraetilamonyum (30 mM)	229,5	27,52
TRAM-34	209,63	25,78
Apamin	165,63	15,05
Gliburid	194,13	14,64
4-Aminopiridin	202,5	26,03
Baryum klorür	174,5	18,81
Anandamid	196,13	18,56



Şekil 1:

Büyük iletkenli kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan damar gerimi üzerindeki etkisi.

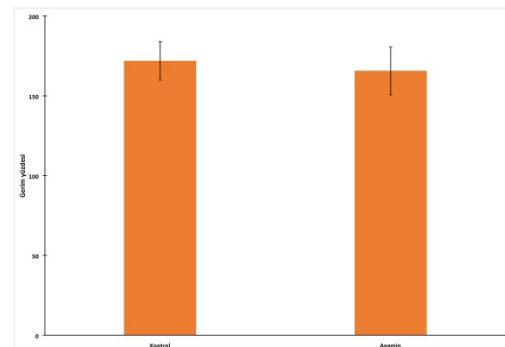
Her bir grupta n=8. #: p<0,05. ##: p<0,01. ###: p<0,001. TEA: Tetraetilamonyum; büyük iletkenli Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanal blokörü.



Şekil 2:

Orta iletkenli kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan damar gerimi üzerindeki etkisi.

Her bir grupta n=8. #: p<0,05. TRAM-34: Orta iletkenli Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanal blokörü.

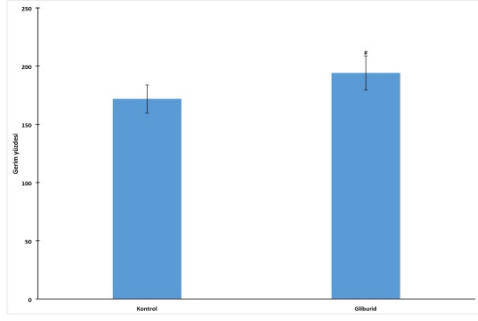


Şekil 3:

Küçük iletkenli kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan damar gerimi üzerindeki etkisi.

Her bir grupta n=8.

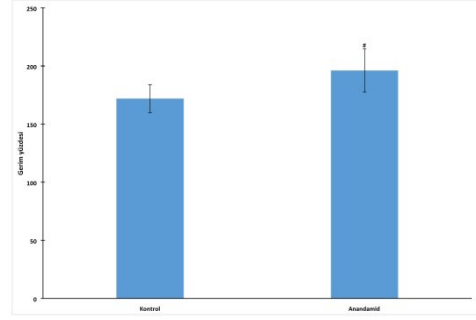
Vasküler Tonus ve Potasyum Kanalları



Şekil 4:

ATP-duyarlı potasyum kanallarının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan damar gerimi üzerindeki etkisi.

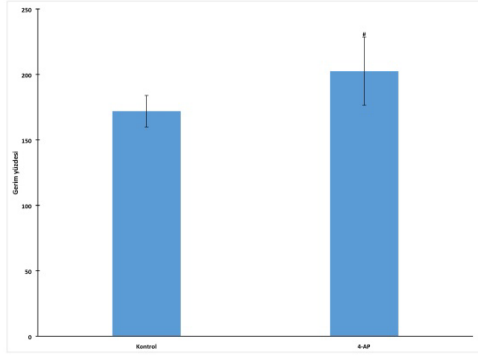
Her bir grupta n=8. #: p<0,001.



Şekil 7:

İki porlu potasyum kanallarının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan damar gerimi üzerindeki etkisi.

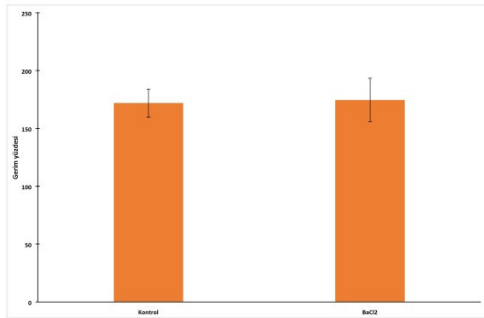
Her bir grupta n=8. #: p<0,01.



Şekil 5:

Voltaj kapılı potasyum kanallarının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan damar gerimi üzerindeki etkisi.

Her bir grupta n=8. #: p<0,05. 4-AP: 4-Aminopiridin; voltaj kapılı K⁺ kanal blokörü.



Şekil 6:

İçeri doğrultucu potasyum kanallarının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan damar gerimi üzerindeki etkisi.

Her bir grupta n=8. #: p<0,05. BaCl₂: Baryum klorür; içeri doğrultucu K⁺ kanal blokörü.

Tartışma ve Sonuç

Hücrelerdeki membran potansiyelinin düzenlenmesinde birçok iyon kanalı rol almakla birlikte, potasyum kanallarından hücre dışına potasyum iyon akışı membran potansiyelinin belirlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu kritik öneminden dolayı, potasyum kanalları vasküler tonus düzenlenmesine oldukça etkin bir katkı sağlamaktadır^{7,8}. Potasyum kanallarının aktivasyonu sonrasında hiperpolarizasyon meydana gelmektedir. Öte yandan, potasyum kanallarının inhibe olması ise depolarizasyon ile sonuçlanmaktadır. Potasyum kanallarının bu aktiviteleri neticesinde, voltaj kapılı kalsiyum kanallarının açılıp kapanması kontrol edilmektedir. Bu durum, potasyum kanallarının vasküler tonus üzerinde düzenleyici bir faktör olarak işlev görmesini sağlamaktadır⁷⁻¹⁰.

Güncel araştırmalar, yaygın kardiyovasküler hastalıklarının tedavisinde terapötik faydalar sağlayabilecek K⁺ kanallarının işlevini aktive edebilen veya inhibe edebilen vazoaaktif ajanların sayısını artırmayı amaçlamaktadır. Apelin çok önemli kardiyovasküler etkiler sergileyen, pozitif inotropik ve vazorelaksan etkileri oldukça güçlü olan endojen bir hormonal peptiddir. Bu maddenin sıçan koroner arterindeki vazorelaksan etkisini ortaya koyan bir çalışmada, endotel bağımlı olarak nitrik oksit ve BK_{Ca} kanal aktivasyonunun önemli bir rolü olduğu belirlenmiştir¹³. Apelinin sıçan serebral arterindeki fonksiyonel etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada ise BK_{Ca} kanallarının inaktive edildiği ve sonuçta nitrik oksit aracılı gevşemenin azaldığı rapor edilmiştir¹⁴. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada, aristotelinin sıçan torasik aortunda vazodilatör etkiye sahip olduğu ve bu etkiye K⁺ kanal aktivasyonunun dahil olduğu gösterilmiştir. Non-selektif ve selektif K⁺ kanal blokerlerinin kullanıldığı bu çalışmada, endoteli sağlam torasik aort

halkalarında aristotelin tarafından oluşturulan vazodilatör etki seviyesinin K^+ kanal blokerleri ile inkübasyondan sonra önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bu araştırmacılar, aristotelin ile uyarılan vazorelaksasyona K_{ir} , K_{ATP} , K_V ve K_{Ca} kanallarının katkıda bulunduğunu belirlemişlerdir¹⁵. Üzüm, çilek ve şarap gibi çok sayıda bitki bazlı yiyecek ve içecekte bulunan bir stilbenoid olan resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben)'ün sıçan torasik aortundaki vazorelaksan etkisine K_V , K_{ir} ve K_{ATP} kanallarının aracılık ettiğinin gösterildiği güncel bir çalışmada, resveratrolün bu etkisinin endotel bağımlı ve endotelden bağımsız mekanizmalarla meydana geldiği belirlenmiştir. Bu çalışmada, resveratrolün etki mekanizmalarında K^+ kanal aktivasyonunun da rolü olduğu gösterilmiştir. Endoteli sağlam torasik aort halkalarının seçici olmayan ve seçici K^+ kanal blokörleri (TEA, 4-AP, gliburid ve $BaCl_2$) ile inkübasyonundan sonra, resveratrolün vazorelaksan etki düzeyinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Çalışmanın bulguları, K_{Ca} , K_V , K_{ATP} ve K_{ir} kanallarının resveratrol kaynaklı vazorelaksan etkiye katkıda bulunduğunu göstermektedir¹⁶. Başka bir güncel çalışmada ise koroner arter örneklerinde turuncgillerde bulunan bir flavonoid olan diosmetinin vazoaaktif etkileri araştırılmış ve K_V kanalları aracılığı ile vazorelaksasyona neden olduğu bildirilmiştir¹⁷. Bu sonuçlar göstermektedir ki vazoaaktif maddelerin etki mekanizmalarında, özellikle vazorelaksan etkilerini sergilemelerinde, potasyum kanal aktivasyonunun rolü oldukça önemlidir. Bununla birlikte, K^+ kanal inhibisyonu sonucunda vazorelaksan etkinin azaltılması da söz konusu olabilmektedir.

Potasyum kanallarının kardiyak aritmi, hipertansiyon, epilepsi, Alzheimer hastalığı, tip 2 diyabetes mellitus, serebral iskemik inme ve yaşa bağlı işitme kaybı gibi hastalıklarda patofizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir¹⁸⁻²¹. K^+ kanallarının, çeşitli hastalık modellerinde etkileri incelenen ve tıbbi olarak kullanıma potansiyeli olan bazı bitkilerin kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu çalışmalardan birinde, bir stilben bileşiği olan polidatinin, sıçan miyokardiyal iskemi/reperfüzyon modelinde kardiyoprotektif bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Polidatin, kalp hızını ve enfarktüs boyutunu azaltırken, bu etki, seçici olarak mitokondriyal K_{ATP} kanallarını bloke eden 5-hidroksidekanoat (5-HD) ve protein kinaz C (PKC) inhibitörleri (chelerythrine ve GF109203X) ile tersine çevrilmiştir. Bununla birlikte, polidatin tarafından kreatin fosfokinaz ve laktat dehidrojenaz salımındaki azalma 5-HD, chelerythrine veya GF109203X varlığında ortadan kaldırılmıştır. Bu sonuçlar, polidatinin kardiyoprotektif etkilerinin, kardiyoprotektif etki için öne sürülen bir mekanizma olan serbest radikal süpürme aktivitesi dışında, farklı bir mekanizma olarak PKC- K^+ _{ATP} sinyal yolağının aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmekte-

dir²². *Acanthospermum hispidum*'dan elde edilen etanolde çözünen fraksiyonların (ESAH), normotansif sıçanlarda hipotansif bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu etkinin N-omega-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; endotelial nitrik oksit sentaz inhibitörü), metilen mavisi (siklik guanozin monofosfat inhibitörü) veya TEA ile ön muameleye tabi tutulan deney hayvanlarında ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bu bulgular, nitrik oksit/siklik guanozin monofosfat/ K^+ kanal sinyal yolağının ESAH'ın hipotansif tepkisine katkıda bulunduğunu göstermektedir²³. Bu çalışmalar, potasyum kanallarının, kardiyovasküler hastalıklarda faydalı etkiler sağlayabilecek etken maddelerin etki mekanizmalarında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Potasyum kanallarının önemli bir alt tipi olan BK_{Ca} kanalları çoğu hücrede bulunmaktadır. Bu kanallar, hücre içi Ca^{2+} artışı ve membran depolarizasyonu ile aktive edilmektedir. Arterlerde bulunan BK_{Ca} kanallarının aktivitesinin istirahat membran potansiyeline katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir. Bu kanalların iberiotoxin ve TEA gibi blokörler ile inhibe edilmesi membran depolarizasyonuna ve vazokonstriksiyona yol açmaktadır. BK_{Ca} kanallarının, sarkoplazmik retikulumdan ryanodin kanal reseptörleri yoluyla salınan Ca^{2+} aracılığıyla sarkolemmal Ca^{2+} miktarındaki fokal artışlara bağlı olarak vasküler tonusun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. BK_{Ca} kanallarının yanı sıra IK_{Ca} ve SK_{Ca} kanalları da vasküler tonus regülasyonuna katkıda bulunabilmektedir⁷⁻¹⁰. Bu nedenle çalışmamızda her üç kalsiyum etki aktive olan potasyum kanal alt tipinin selektif blokörleri kullanılarak sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan vasküler tonus üzerindeki etkileri araştırılmış ve yüzde gerim değerlerine etkileri belirlenmiştir. BK_{Ca} ve IK_{Ca} kanal blokörlerinin sıçan torasik aort yüzde gerim değerlerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı, buna karşın SK_{Ca} kanal blokörünün yüzde gerim değerlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının büyük ve orta iletkenli alt tiplerinin vasküler tonus regülasyonunda daha büyük bir öneme sahip olduğunu göstermektedir.

Vasküler düz kas hücreleri tarafından eksprese edilen başka bir yaygın K^+ kanalı sınıfı K_V kanallarıdır ve bu kanallar 4-Aminopiridin tarafından bloke edilmektedir²⁴. Bu kanalların aktivasyonu için 30 mV'lik önemli bir eşik potansiyeli gerekmektedir. Bu düzeydeki bir membran depolarizasyonu K_V kanallarını aktive etmektedir. Farklı türlerdeki deneklerden elde edilen çeşitli arterler ve arteriollerden izole edilmiş vasküler düz kas hücrelerinde yapılan çalışmalarda ulaşılan sonuçlar, K_V kanallarının dinlenme membran potansiyelinin

Vasküler Tonus ve Potasyum Kanalları

belirlenmesi ve vasküler tonusun regülasyonuna önemli düzeyde katkı sağlayabileceğine dair veriler sağlamıştır. K_V kanalları, hem vazorelaksasyona hem de vazokonstriksiyona neden olan efektör maddelerin etki mekanizmalarında rol alabilmektedir. Siklik adenozin monofosfat sinyal kaskadı aracılığıyla etkinlik gösteren vazodilatatör etkili maddeler K_V kanallarını açabilmektedir. Vazokonstriktör etkili maddeler ise, yüksek hücre içi Ca^{2+} ve protein kinaz C yolaklarının dahil olduğu mekanizmalarla bu kanalların kapanmasına neden olabilmektedir⁷⁻¹⁰. Fare aortunun kullanıldığı güncel bir çalışmada, K_V kanallarının aktivatörü olan retigabinin endotelden bağımsız vazorelaksasyona neden olduğu rapor edilmiştir²⁵. 4-AP, vasküler fonksiyonel çalışmalarda efektör maddelerin etki mekanizmalarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir voltaj kapılı potasyum kanal blokörüdür²⁶. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, 4-AP uygulamasının sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan vasküler tonus yüzde gerim değerlerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı göstermektedir. Elde ettiğimiz bu sonuç, K_V kanallarının vasküler tonus regülasyonunda önemli bir faktör olduğu görüşünü sıçan torasik aort modelinde destekler niteliktedir.

K_{ATP} kanalları, hücrel metabolizma ve membran uyarılabilirliği arasında fonksiyonel bir bağlantı kurmaktadır. K_{ATP} kanallarının inhibisyonu, çeşitli vasküler düz kas tiplerinde depolarizasyona ve ardından vasküler düz kasın kasılmasına neden olmaktadır^{7-10,27}. Vasküler fonksiyonel etkilere aracılık edebilen diğer önemli K^+ kanal tipleri K_{IR} ve K_{2P} kanallarıdır²⁸⁻³⁰. Bazı arteriyel düz kas hücrelerinde K_{IR} kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar negatif membran potansiyelinde daha aktiftir. Depolarizan faktörlerin yokluğunda arterlerdeki membran potansiyelini düzenlemektedirler^{28,29}. K_{IR} kanallarından farklı olarak K_V ve BK_{Ca} kanalları membran depolarizasyonunda daha aktiftir^{28,29}. Vasküler fonksiyonel etkilerdeki önemleri nedeni ile çalışmamızda bu potasyum kanallarının fenilefrin ile uyarılan vasküler tonus üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, ATP-duyarlı potasyum kanal blokörü gliburid ve iki porlu potasyum kanal blokörü anandamid uygulamalarının sonucunda sıçan torasik aortundaki fenilefrin ile uyarılan yüzde gerim değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğunu göstermektedir. Buna karşın, içeri doğrultucu potasyum kanal blokajı sonrasında fenilefrin ile uyarılan vasküler gerim değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Sonuçlarımız K_{ATP} ve K_{2P} kanallarının sıçan torasik aortunda vasküler tonus regülasyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Elde ettiğimiz tüm bulgular dikkate alındığında, çalışmamız potasyum kanallarının vasküler tonus regülasyonuna olan katkılarını, önemli ve yaygın

Kabul görmüş bir deneysel model olan sıçan torasik aort modelinde ortaya koymaktadır. Sıçan torasik aort modeli, vasküler fonksiyonel çalışmalarda özellikle antihipertansif ilaç geliştirme çalışmaları için ön verilerin elde edildiği vazorelaksan madde etki mekanizmalarının ortaya konulmasında oldukça önemli olan ve altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir¹². Bu nedenle, verilerimiz vazoaktif maddelerin etki mekanizmaları araştırılırken potasyum kanallarının mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiğini düşündürmektedir. Özellikle büyük ve orta iletkenli kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalları, ATP-duyarlı potasyum kanalları, voltaj kapılı potasyum kanalları ve iki porlu potasyum kanalları vasküler tonus düzenlenmesine fizyolojik ve patolojik koşullarda önemli katkılar sağlayabilir.

Etik Kurul Onay Bilgisi

Onaylayan Kurul: Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Onay Tarihi: 08.02.2022

Karar No: 2022-02/05

Araştırmacı Katkı Beyanı

Fikir ve tasarım: S.Ş., N.İ.; Veri toplama ve işleme: S.Ş.; Analiz ve verilerin yorumlanması: S.Ş., N.İ.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: S.Ş., N.İ.

Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu makalede yer alan çalışmalar Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nın imkanları ile gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Griffith TM. Modulation of blood flow and tissue perfusion by endothelium-derived relaxing factor. *Exp Physiol* 1994;79(6):873-913.
2. Bagher P and Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;202(3):271-84.
3. Klabunde RE, (eds). *Cardiovascular Physiology Concepts*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2021.
4. Klabunde RE, (eds). *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
5. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL, (eds). *Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi*. 24. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2015.
6. Hall JE, (eds). *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*. 13. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2017.
7. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol* 2017;7(2):485-581.
8. Jackson WF. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Adv Pharmacol* 2018;78:89-144.
9. Emre M. Potasyum İyon Kanallarının Yapısı ve Genel Özellikleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2020;29(4):276-90.
10. Dogan MF, Yildiz O, Arslan SO, Ulusoy KG. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundam Clin Pharmacol* 2019;33:504-23.

11. Baranowska M, Kozłowska H, Korbut A, Malinowska B. Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw* 2007;61:596–605.
12. Hald BO, Jacobsen JCB, Braunstein TH, et al. BK_{Ca} and K_V channels limit conducted vasomotor responses in rat mesenteric terminal arterioles. *Pflug Arch Eur J Physiol* 2012;463:279–95.
13. Mughal A, Sun C, O'Rourke ST. Activation of large conductance, calcium-activated potassium channels by nitric oxide mediates apelin-induced relaxation of isolated rat coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2018;366:265-73.
14. Mughal A, Sun C, O'Rourke ST. Apelin reduces nitric oxide-induced relaxation of cerebral arteries by inhibiting activation of large-conductance, calcium-activated K⁺ channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 2018;71(4):223-32.
15. Romero F, Palacios J, Jofré I, et al. Aristoteline, an Indole-Alkaloid, Induces Relaxation by Activating Potassium Channels and Blocking Calcium Channels in Isolated Rat Aorta. *Molecules* 2019;24(15):2748.
16. Tan CS, Loh YC, Tew WY, Yam MF. Vasorelaxant effect of 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) and its underlying mechanism. *Inflammopharmacology* 2020;28(4):869-75.
17. Ahmad T, Shah AJ, Khan T, Roberts R. Mechanism underlying the vasodilation induced by diosmetin in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol* 2020;884:173400.
18. Tian C, Zhu R, Zhu L, et al. Potassium Channels: Structures, Diseases, and Modulators. *Chem Biol Drug Des* 2014;83(1):1–26.
19. Singh S, Agarwal P, Ravichandiran V. Two-Pore Domain Potassium Channel in Neurological Disorders. *J Membr Biol* 2021;254(4):367–80.
20. Burg S, Attali B. Targeting of Potassium Channels in Cardiac Arrhythmias. *Trends Pharmacol Sci* 2021;42(6):491–506.
21. Szeto V, Chen NH, Sun HS, Feng ZP. The role of K_{ATP} channels in cerebral ischemic stroke and diabetes. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39:683–94.
22. Miao Q, Wang S, Miao S, et al. Cardioprotective Effect of Polydatin against Ischemia/reperfusion Injury: Roles of Protein Kinase C and Mito K(ATP) Activation. *Phytomedicine* 2011;19(1):8–12.
23. Tirloni CAS, Livero FADR, Palozi RAC, et al. Ethnopharmacological Investigations of the Cardio-Renal Properties of a Native Species from the Region of Pantanal, State of Mato Grosso Do Sul, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2017;206:125–34.
24. Nieves-Cintrón M, Syed AU, Nystoriak MA, Navedo MF. Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders. *Microcirculation* 2018;25(1):10.1111/micc.12423.
25. Namgoong H, Chaeun C, Lee S. The K_v7 channel activator, retigabine, induces vasorelaxation via an endothelial-independent pathway in male mouse aorta. *J Exerc Nutrition Biochem* 2018;22(3):51-5.
26. Khammy MM, Kim S, Bentzen BH, et al. 4-Aminopyridine: a pan voltage-gated potassium channel inhibitor that enhances K_v 7.4 currents and inhibits noradrenaline-mediated contraction of rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* 2018;175(3):501-16.
27. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 2008;44(2):65-81.
28. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
29. Tajada S, Cidrad P, Moreno-Domínguez A, Pérez-García MT, López-López JR. High blood pressure associates with the remodelling of inward rectifier K⁺ channels in mice mesenteric vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 2012;590(23):6075-91.
30. Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 2004;142(1):192-202.