

Research Article / Araştırma Makalesi

Kv7.1-7.5 Kanallarının Sıçan Torasik Aortundaki Apela Kaynaklı Vasorelaksasyondaki Rolü

The Role of Kv7.1-7.5 Channels in Apela-induced Vasorelaxation in the Rat Thoracic Aorta

Serdar Şahintürk

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

**Özet:** Apela yeni keşfedilen bir hormonal peptiddir. Bu çalışma, Apela'nın damar gevşetici etkilerinde Kv7.1-7.5 kanallarının rolünü sıçan torasik aort modelinde araştırmayı amaçladı. Erkek Wistar Albino sıçanlardan izole edilen 4 mm'lik torasik aort halkaları izole doku banyosu sistemindeki banyo haznelerine yerleştirildi. Dinlenim durumundaki gerim seviyesi 1 gram olarak ayarlandı. 90 dakikalık dengelenme periyodundan sonra, torasik aort halkaları fenilefrin veya potasyum klorür ile kasıldı. Stabil bir kasılma sağlandıktan sonra torasik aort halkalarına kümülatif olarak Apela ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) uygulandı. Apela'nın etki mekanizmalarını ortaya koymak için, belirtilen deney protokolü, seçici Kv7.1-7.5 kanal blokörü (XE-991; 30  $\mu$ M) varlığında tekrarlandı. Apela, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı düzeyde damar gevşetici etki gösterdi ( $p<0,001$ ). Apela'nın damar gevşetici etkisi endotelin çıkarılmasından sonra büyük ölçüde korundu. Apela'nın vazodilatör etki seviyesi sağlam veya çıkarılmış endoteli olan sıçan torasik aort halkalarına seçici Kv7.1-7.5 kanal blokörü XE-991 uygulanmasından sonra istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldı ( $p<0,001$ ). Sonuç olarak, Kv7.1-7.5 kanalları Apela'nın damar gevşetici etki mekanizmalarına katkıda bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Apela, Endotel, Potasyum, Vazodilatasyon

**Abstract:** Apela is a recently discovered hormonal peptide. This study aimed to investigate the roles of Kv7.1-7.5 channels in the vasorelaxant effects of Apela in a rat thoracic aortic model. The 4 mm thoracic aortic rings isolated from the male Wistar Albino rats were placed in the bath chambers in the isolated tissue bath system. The resting tension level was adjusted to 1 gram. After the 90 min equilibration period, the thoracic aortic rings were contracted with phenylephrine or potassium chloride. Once a stable contraction was achieved, Apela ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) was administered cumulatively to the thoracic aortic rings. To reveal the mechanisms of action of Apela, the specified experimental protocol was repeated in the presence of the selective Kv7.1-7.5 channel blocker (XE-991; 30  $\mu$ M). Apela showed a significant vasodilatory effect in a concentration-dependent manner ( $p<0.001$ ). The vasorelaxant effect of Apela was largely preserved after the removal of the endothelium. Apela's vasodilatory effect level was statistically significantly reduced ( $p<0.001$ ) after administration of the selective Kv7.1-7.5 channel blocker XE-991 in the thoracic aortic rings of rats with intact or denuded endothelium. In conclusion, Kv7.1-7.5 channels contribute to the vasorelaxant effect mechanisms of Apela.

**Keywords:** Apela, Endothelium, Potassium, Vasodilation

**ORCID ID of the authors:** SS. [0000-0002-7612-0055](https://orcid.org/0000-0002-7612-0055)

*Received* 08.03.2023

*Accepted* 17.06.2023

*Online published* 21.07.2023

**Correspondence:** Serdar ŞAHİNTÜRK- Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye  
e-mail: [ssahinturk@uludag.edu.tr](mailto:ssahinturk@uludag.edu.tr)

## 1. Giriş

Apela (Elabela/Toddler), yakın zamanda Chng ve ark. tarafından keşfedilen bir hormonal peptiddir (1). Orijinal olarak keşfedilen APJ ligandı olan Apelin'den sonra keşfedilen ikinci Apelin Reseptörü (APJ) ligandır. Çok güçlü bir pozitif inotropik etkiye sahip olan Apela, vazodilatatör ve antihipertansif özellikler gösterir. Son çalışmalar, bu önemli etkileri nedeniyle Apela'nın birçok kardiyovasküler hastalıkta, özellikle kalp yetmezliği ve artmış vazoreaktivite ile ilişkili olarak hipertansif hastalıklarda önemli bir terapötik potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir (2-4).

Potasyum ( $K^+$ ) kanallarının farklı alt tiplerinin olduğu ve bunlardan en az beş tanesinin vasküler düz kas hücrelerinde ifade edildiği bilinmektedir. Bu kanalların başlıcaları kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) ile aktiflenen  $K^+$  ( $K_{Ca}$ ), içeri doğrultucu  $K^+$  ( $K_{ir}$ ), ATP'ye duyarlı  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ), iki porlu  $K^+$  ( $K_{2p}$ ) ve voltaj kapılı  $K^+$  ( $K_v$ ) kanallarıdır. Vasküler düz kas hücrelerindeki potasyum kanallarının en büyük alt grubu  $K_v$  kanallarıdır ve bu kanallar kardiyovasküler sistemde yaygın bir ifadeye sahiptir. Bu  $K^+$  kanallarının, çeşitli kan damarlarında istirahat halindeki zar potansiyelini ve vasküler tonusu modüle ettiği ileri sürülmektedir (5).  $K_v$  kanallarının damar tonusunun düzenlenmesinde çok önemli katkısı olduğu bilinmektedir.  $K_v$  kanallarının sayısal, yapısal ve fonksiyonel değişikliklerinin kardiyak aritmi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon ve diyabet gibi patofizyolojik durumlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. KCNQ1-5 geni tarafından kodlanan  $K_v7.1-7.5$  kanalları, potasyum kanalları arasında özel bir öneme sahiptir. Bu kanallar, dinlenim membran potansiyelinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, bu kanalların kan damarlarındaki tonusun düzenlenmesine katkısı çok önemlidir (6-8).  $K_v7$  kanalları fare, sıçan ve insan gibi çeşitli türlerin vasküler sisteminde ifade edilmektedir (9-11). Literatürdeki çalışmalar,  $K_v7$  kanallarının serebral, renal ve koroner arterler dahil olmak üzere çeşitli damar yataklarındaki tonusun düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (12-14). Ayrıca  $K_v7$  kanalları, normotansif hayvanlardan elde edilen çeşitli kan damarı örneklerinde vasküler düz kas kasılma

fonksiyonlarının etkili düzenleyicileri olarak işlev görmektedir (15). Özellikle, vasküler düz kas hücrelerinde  $K_v7.1-7.5$  kanallarının ekspresyonu baskındır (16). Bu nedenle, bu çalışmada  $K_v7.1-7.5$  kanallarının Apela'nın sıçan torasik aortundaki damar gevşetici etkisine katkıda bulunup bulunmadığı ve bu etkide endotelin rol alıp almadığı araştırılmıştır.

## 2. Gereç ve Yöntem

### *Etik Onay ve Çalışma Hayvanları*

Bu çalışma için Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Tarih: 28.09.2021; Sayı: 2021-12/08). Deneylerde, Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen Wistar Albino erkek sıçanlar (250-300 gram, 12 haftalık,  $n = 10$ ) kullanıldı. Deney hayvanlarının bakımı ve barındırılması ulusal ve uluslararası rehberlere uygun olarak sağlandı. Sıçanlar, düzenli olarak havalandırılan, sıcaklığı  $22\text{ }^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulan ve nem oranı % 40-55 olan odalarda kontrollü aydınlatma (12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık, sabah 07.00'de ışıklar açık) sağlanarak barındırıldı. Sıçanların musluk suyuna ve standart kemirgen yemine serbestçe erişmesine izin verildi. Deneyler, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Kardiyovasküler Fizyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

### *İzole Doku Banyosu Deneyleri*

Sıçanlar anestezi uygulamaksızın dekapite edildi. Torakoabdominal bölgeleri dikkatli bir şekilde açılan sıçanların torasik aortları nazikçe çıkarıldı. Eksize edilen torasik aort dokuları, soğuk Krebs solüsyonu (mM cinsinden:  $2,5\text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,2\text{ KH}_2\text{P}_4$ ,  $11\text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $25\text{ NaHCO}_3$ ,  $4,8\text{ KCl}$ ,  $1,2\text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $118\text{ NaCl}$ ) içeren Petri kaplarına yerleştirildi. Torasik aortların çevre yağ dokusu ve bağ dokusu dikkatlice temizlendi. Temizleme işleminden sonra 4 mm uzunluğunda damar halkaları hazırlandı. Elde edilen eşit uzunlukta torasik aort halkaları 4 kanallı izole doku banyosu sistemindeki (MAY IOBS99, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) çift çeperli cam banyo

haznelerine yerleştirildi. Bu işlem için cerrahi iplikler ve çelik askı aparatları kullanıldı. Rezervuarlar ve banyo hazneleri Krebs solüsyonu ile dolduruldu. Sıcak distile su, termosirkülatör kullanılarak çift çeperli sistemde sürekli olarak sirküle edildi. Bu şekilde banyo haznelerindeki doku ile temas halinde olan Krebs solüsyonunun sıcaklığı 37 °C'de sabit tutuldu. Banyo haznelerindeki Krebs solüsyonu, % 95 O<sub>2</sub>-% 5 CO<sub>2</sub> gaz karışımı ile sürekli olarak gazlandırıldı. Böylece, sistemdeki pH 7,4'te sabit tutuldu. Vasküler halkaların gerimi ilk 30 dakikadan sonra 1 grama ayarlandı. Dokularla temas halindeki Krebs solüsyonu her 10 dakikada bir yenilendi. Bu işlem dengelenme periyodu boyunca (90 dakika) devam etti. Böylece dokuların beslenmesi ve metabolik atıkların uzaklaştırılması sağlandı. Dengeleme periyodundan sonra, damar kasılmasını uyarmak için fenilefrin (10<sup>-6</sup> M) veya potasyum klorür (KCl; 60 mM) kullanıldı. Apela (10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> M), damar gerimi plato fazında stabil hale geldiğinde uygulandı. Kontrol grubunda Apela yerine eşit hacimde distile su kullanıldı. Apela'nın etki mekanizmalarını belirlemek için Kv7.1-7.5 kanal blokeri XE-991 (30 µM) ile 30 dakikalık inkübasyon uygulandı. Daha sonra, fenilefrin (10<sup>-6</sup> M) ile önceden kasılmış vasküler halkalara, plato fazında, kümülatif olarak Apela (10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> M) uygulandı. Aynı bir deney setinde damarlar fenilefrin ile uyarılmaksızın Apela (10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> M) uygulanarak bazal damar tonusu üzerindeki Apela ile uyarılan fonksiyonel etkiler araştırıldı.

Damar halkalarındaki gerim değişimlerini belirlemek için izometrik kuvvet transdüserleri (*SS12LA force transducer, BIOPAC Systems, Inc. Aero Camino, ABD*) kullanıldı. Ortaya çıkan vasküler gerim değişiklikleri bilgisayar yazılımı (*BIOPAC MP36, Santa Barbara, CA, ABD*) aracılığıyla kaydedildi. 10<sup>-6</sup> M fenilefrin ile oluşturulan plato faz gerim değeri % 100 olarak kabul edildi. 10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> M Apela uygulamasının torasik aort halkalarında oluşturduğu damar gerim değişiklikleri bu değer üzerinden hesaplandı.

Endotel bütünlüğünün kontrolü fenilefrin (10<sup>-6</sup> M) ile önceden kasılmış damarların asetilkolin

(10<sup>-6</sup> M) ile gevşetilmesiyle yapıldı. Asetilkoline yanıt olarak % 80'den daha büyük bir gevşeme tepkisine sahip damarların endoteli sağlam (E+) olarak kabul edildi. Bazı deney gruplarında endoteli çıkarılmış damar halkaları kullanıldı. Bu amaçla torasik aort halkalarının iç yüzeyi bir kürdan ile hafifçe ovuldu. Bu vasküler halkalar daha sonra fenilefrin (10<sup>-6</sup> M) ile kasıldı. Asetilkolin (10<sup>-6</sup> M) ile elde edilen gevşeme yanıtının % 10'dan az olması endotelin sağlam olmadığını (E-) gösterdi. Bu çalışmadaki tüm deneysel işlemler daha önceki çalışmalarda açıklandığı gibi yapıldı (15,17).

### İlaçlar

Apela (Elabela-32), Tocris'ten (Abingdon, Birleşik Krallık) temin edildi. Diğer kimyasallar ve ilaçlar Sigma Aldrich'ten (St Louis, MO, ABD) satın alındı. Apela (10<sup>-10</sup>-10<sup>-6</sup> M), fenilefrin (10<sup>-6</sup> M), KCl (60 mM), asetilkolin (10<sup>-6</sup> M) ve XE-991 (30 µM) dozları literatüre göre belirlendi. (15,17,18). İlaçlar kullanım talimatları dikkate alınarak hazırlandı. Apela, fenilefrin ve asetilkolin distile suda çözüldü. XE-991 (Kv7.1-7.5 kanal bloker) DMSO içerisinde çözüldü. Krebs solüsyonundaki nihai DMSO konsantrasyonu % 0,1'i geçmedi. Belirtilen konsantrasyondaki DMSO, torasik aort halkalarının kasılmasını veya gevşemesini anlamlı olarak etkilemedi.

### İstatistiksel analiz

Çalışmanın başında GPower 3.1 ile güç analizi yapılmış ve örneklem büyüklüğü hesaplandı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS v.23.0 paket programı (*SPSS Inc., Chicago, IL, 10 USA*) kullanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Apela ile uyarılan vasküler gevşeme yanıtları, fenilefrin (10<sup>-6</sup> M) kaynaklı plato fazı kasılmasının yüzdesi olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için *one way ANOVA* testi kullanıldı. *Post hoc* test olarak *Bonferroni* testi tercih edildi.

### 3.Bulgular

**Apela'nın sıçan torasik aort halkalarındaki bazal gerim üzerindeki etkisi ve fenilefrin ile kasılmış damarlardaki vazorelaksan etkisi**

Apela ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) bazal gerim değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ( $p = 1,000$ ) (Şekil 1). Apela, fenilefrin ile önceden kasılmış endoteli sağlam sıçan torasik aortunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde damar gevşetici etki gösterdi ( $10^{-6}$  M'lik konsantrasyonda  $p = 0,000$ ). Maksimum gevşeme seviyesi yaklaşık % 60 olarak bulundu (Şekil 2A-B). Apela'nın vazorelaksan etki düzeyinin, KCl ile önceden kasılmış endoteli sağlam sıçan torasik aortunda büyük ölçüde azaldığı belirlendi. Maksimum gevşeme seviyesi yaklaşık % 12 olarak belirlendi (Şekil 3). Elde edilen veriler Apela'nın vazorelaksan etkisinde potasyum kanal aktivasyonunun önemli bir role sahip olduğunu düşündürdü.

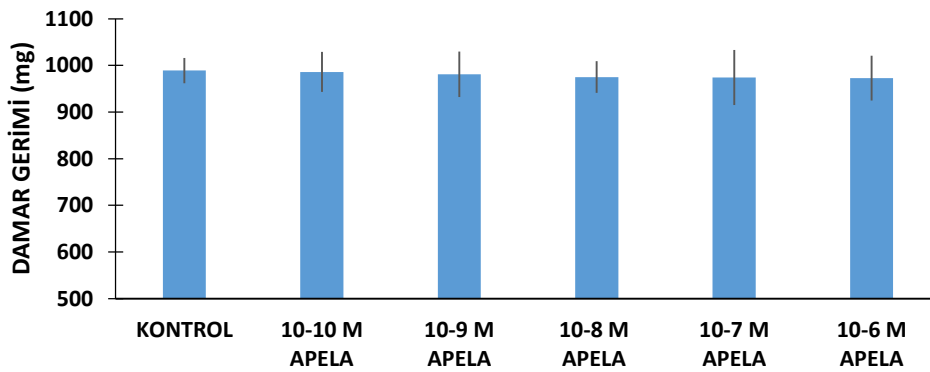
#### **Apela'nın sıçan torasik aort halkalarındaki damar gevşetici etkisinde endotelin rolü**

Apela (E-) grubundaki yüzde gerim değerleri, kontrol (E-) grubundaki yüzde gerim değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $10^{-6}$  M'lik konsantrasyonda  $p = 0,000$ ). Vasküler endotelin çıkarılması, Apela'nın vazorelaksan etki seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir

şekilde, yaklaşık % 42'ye kadar, azalttı (Şekil 4). Bu bulgu, Apela'nın damar gevşetici etkisinde endotel bağımlı ve endotelden bağımsız mekanizmaların rol oynadığını gösterdi. Bununla birlikte, Apela'nın damar gevşetici etki seviyesi, endotelin çıkarılmasından sonra büyük ölçüde korundu. Bu nedenle, Apela kaynaklı vasküler gevşemede endotelden bağımsız mekanizmaların rolünün, endotel bağımlı mekanizmalara kıyasla daha yüksek olduğu düşünüldü.

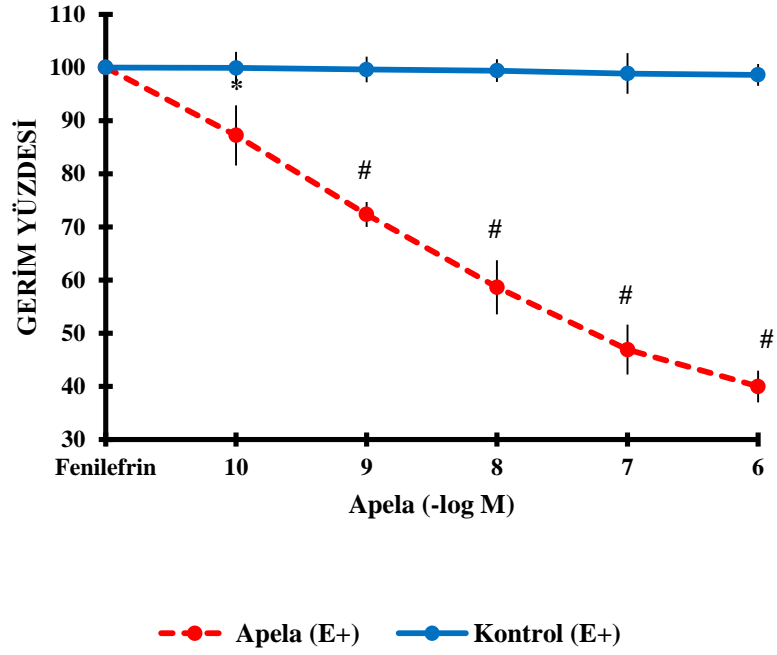
#### **Apela'nın damar gevşetici etki mekanizmasında Kv7 kanallarının katkısı**

XE-991+Apela (E+ ve E-) gruplarındaki yüzde gerim değerleri, vehicle (DMSO+Apela) (E+ ve E-) gruplarındaki yüzde gerim değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $10^{-6}$  M'lik konsantrasyonda ( $p = 0,000$ )). Kv7.1-7.5 kanal blokajından sonra Apela'nın sıçan torasik aortundaki vazorelaksan etki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı (Şekil 5A-B ve Şekil 6). Bu bulgular, Kv7.1-7.5 kanallarının Apela'nın vasküler düz kas gevşetici etkisinde önemli bir rol oynadığını gösterdi.

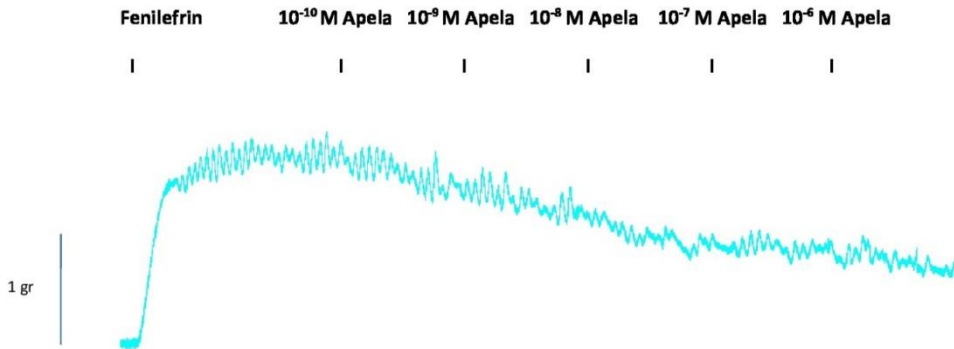


**Şekil 1.** Apela'nın bazal damar gerimi üzerindeki etkisi. Veriler damar geriminin orjinal değerleridir ve ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her grupta  $n = 8$ .

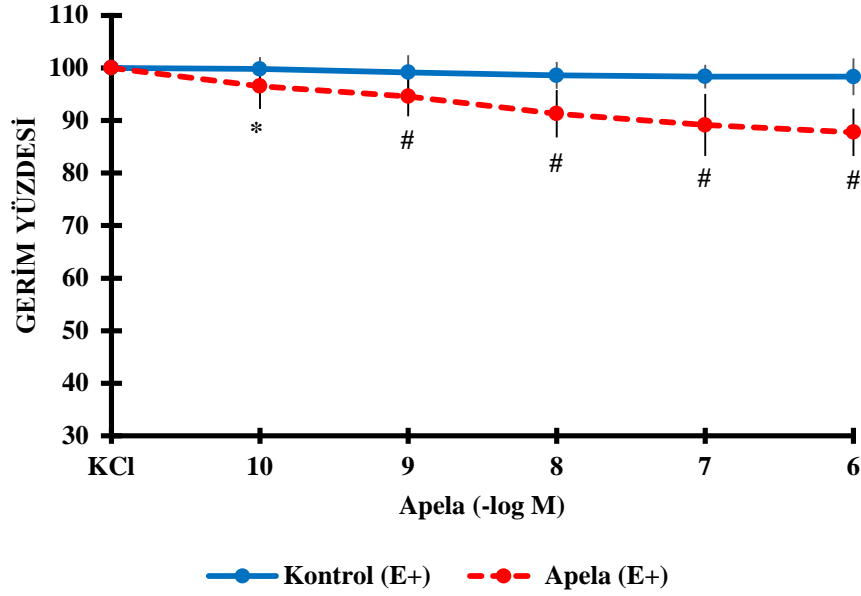
A



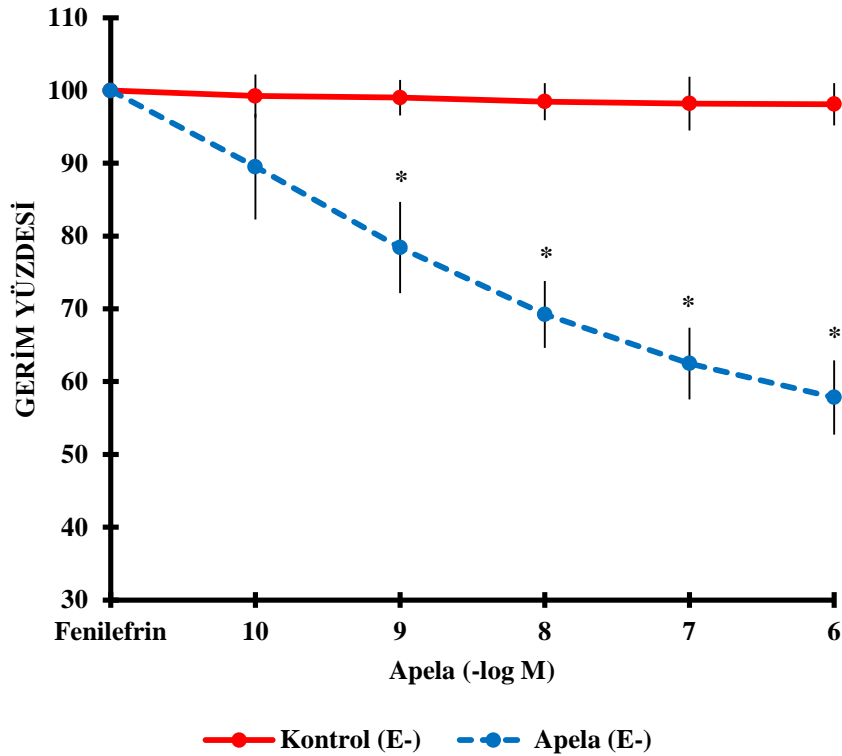
B



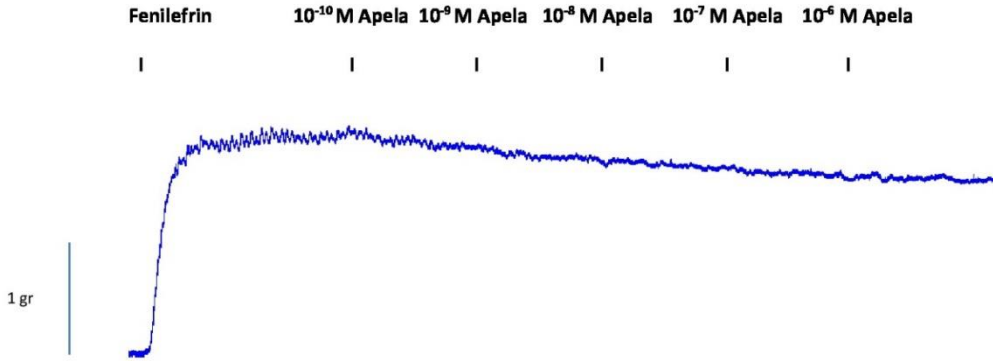
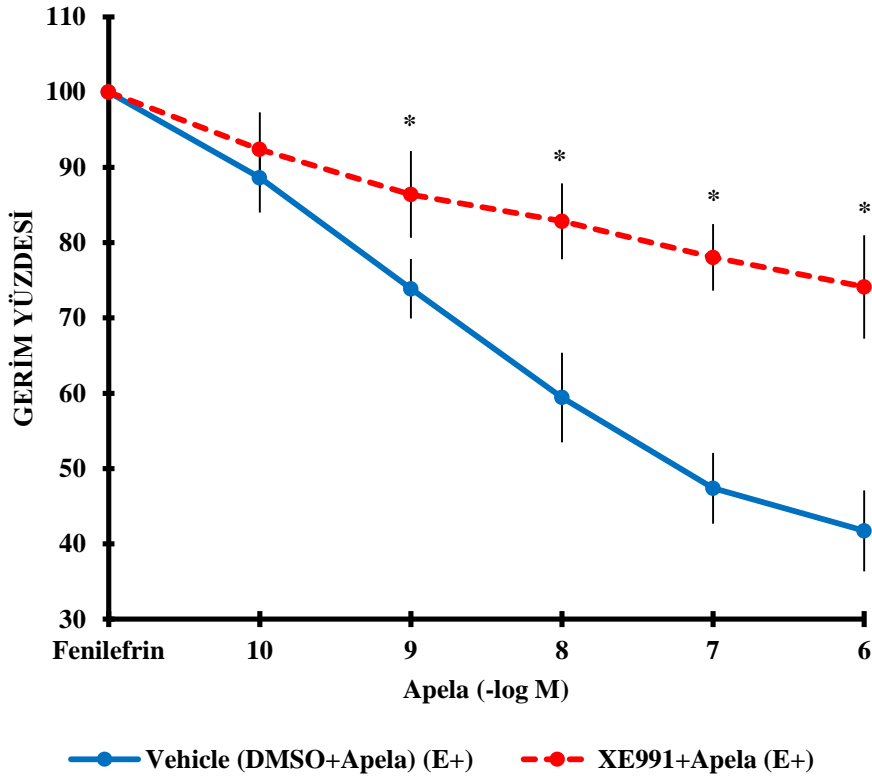
**Şekil 2. A.** Fenilefrin ile önceden kasılmış endoteli sağlam (E+) sıçan torasik aort halkalarında Apela kaynaklı vazorelaksan aktivite. Apela (E+) grubunda yüzde gerim değerleri kontrol (E+) grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Veriler fenilefrin kaynaklı plato faz geriminin yüzdesi olarak ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Her grupta n = 8. \*: p < 0,01. #: p < 0,001. **B.** Orijinal trase.



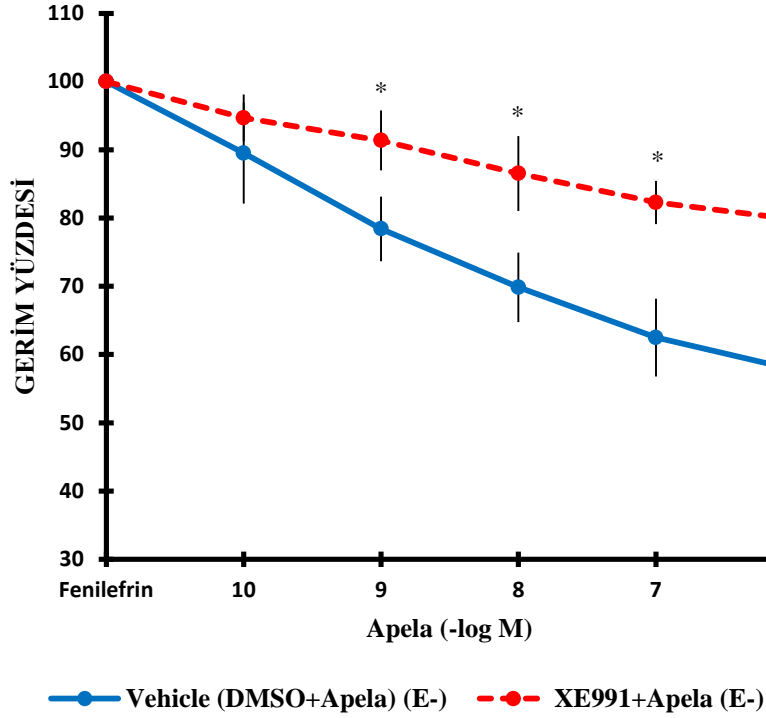
**Şekil 3:** Potasyum klorür (KCl) ile önceden kasılmış endoteli sağlam (E+) sıçan torasik aort halkalarında Apela kaynaklı vazorelaksan aktivite. Apela'nın vazorelaksan etki seviyesi, KCl ile önceden kasılmış endoteli sağlam sıçan torasik aortunda büyük ölçüde azalmıştır. Bu bulgular potasyum kanallarının Apela kaynaklı vazorelaksan etkide rol oynadığını göstermiştir. Veriler fenilefrin kaynaklı plato faz geriminin yüzdesi olarak ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Her grupta n = 8. \*: p < 0,05. #: p < 0,001.



**Şekil 4:** Fenilefrin ile önceden kasılmış sıçan torasik aort halkalarında endotelin çıkarılmasının Apela'nın damar gevşetici aktivitesi üzerindeki etkisi. Apela (E-) grubundaki yüzde gerim değerleri kontrol (E-) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Veriler fenilefrin kaynaklı plato geriminin yüzdesi olarak ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Her grupta n = 8. \*: p < 0,001.



**Şekil 5: A.** Kv7.1-7.5 kanal blokerinin, fenilefrin ile önceden kasılmış endoteli sağlam (E+) sıçan torasik aort halkalarında Apela'nın damar gevşetici aktivitesi üzerindeki etkisi. Yüzde gerim değerleri XE-991+Apela (E+) grubunda *vehicle* (DMSO+Apela) (E+) grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Veriler fenilefrin kaynaklı plato geriminin yüzdesi olarak ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Her grupta n = 8. \*: p < 0,001. **B.** Orijinal trase.



**Şekil 6.** Kv7.1-7.5 kanal blokerinin, fenilefrin ile önceden kasılmış endoteli çıkarılmış (E-) sıçan torasik aort halkalarında Apela'nın damar gevşetici aktivitesi üzerindeki etkisi. Yüzde gerim değerleri XE-991+Apela (E-) grubunda *vehicle* (DMSO+Apela) (E-) grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Veriler, fenilefrin kaynaklı plato geriminin yüzdesi olarak ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Her grupta n = 8. \*: p < 0,001.

#### 4. Tartışma

Apela oldukça önemli kardiyovasküler patofizyolojik özelliklere sahip olup damar gevşetici ve pozitif inotropik etkiler sergileyen endojen bir peptiddir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Apela'nın vazodilatatör, miyokard kontraktilesini arttırıcı ve antihipertansif etki düzeylerinin orjinal olarak keşfedilen APJ ligandı Apelin'den daha yüksek olduğu gösterilmiştir (19). Perjes ve ark. (20), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2'nin (ERK 1/2) aktivasyonunun, Apela'nın pozitif inotropik etki mekanizmalarına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Apela'nın kardiyovasküler sistem üzerinde başka yararlı etkileri de vardır. Renin-anjiyotensin sisteminin antagonizasyonunu sağlayan Apela'nın bu etkisinin kardiyak hipertrofi ve kardiyak fibrozis gibi birçok patolojik durumun inhibisyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür (21). Öte yandan, Apela'nın vasküler fonksiyonel etkileri ve etki mekanizmaları henüz yeterince çalışılmamıştır. Bu konudaki veriler oldukça sınırlıdır. Çeşitli çalışmalarda, Apela'nın periferik uygulamasının hipotansif

bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinde Apela ve analoglarının sıçanlarda arteriyel kan basıncını düşürdüğü bildirilmiştir (22). Başka bir çalışmada Apela'nın ekzojen uygulanmasından sonra hipertansiyonda iyileşme gözlenmiştir (23). Son zamanlarda, esansiyel hipertansiyon hastalarında yapılan bir çalışmada, düşük plazma Apela seviyeleri belirlenmiştir. Bu çalışmada, hastaların plazma Apela düzeylerinin sistolik ve diyastolik kan basıncı ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (24). Perjes ve ark. (20) tarafından *Langendorff* perfüze kalp modelinin kullanıldığı bir çalışmada Apela'nın sıçanlarda koroner vazodilatasyona neden olduğunu bildirmiştir. Wang ve ark. (25), Apela'nın U46619 ile önceden kasılmış fare aort halkalarında endotel bağımlı ve endotelden bağımsız mekanizmalarla vazorelaksasyona neden olduğunu belirlemiştir. Bu araştırmacılar, Apela kaynaklı vazorelaksasyon düzeyinin maksimum % 73,7 seviyesinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca, endotelial nitrik oksit sentaz/nitrik oksit



(eNOS/NO) sinyal yolağının Apela aracılı vazorelaksan etkide rol oynamadığı ve Apela'nın vazorelaksan etki seviyesinin endotelin çıkarılması sonucunda yaklaşık % 20 oranında azaldığı sonucuna varmışlardır. Bu sonuçlar, Apela'nın damar gevşetici etkisine endotel bağımlı ve endotelden bağımsız mekanizmaların aracılık ettiğini göstermektedir. Öte yandan, Apelin ile karşılaştırıldığında Apela'nın damar gevşetici etkisinin endotelyal bağımlılık düzeyi çok daha düşüktür. Sunulan çalışmada, önceki çalışmalardan farklı olarak antihipertansif ilaçların geliştirilmesi için gerekli ön verilerin elde edildiği çalışmalarda altın standart deneysel model olarak kabul edilen sıçan torasik aort modeli kullanılmıştır. Bu deneysel modelde Apela'nın damar gevşetici etkisinin oldukça belirgin olduğu sonucuna ulaşılmıştır.  $10^{-6}$  M'lik en yüksek konsantrasyonda Apela'nın yaklaşık % 60 oranında vazorelaksasyon sağladığı gözlenmiştir. Endotelin çıkarılmasından sonra, Apela kaynaklı vazorelaksasyon seviyesi yaklaşık % 42'ye düşmüştür. Bu veriler, Apela'nın sıçan torasik aortunda endotel bağımlı ve endotelden bağımsız mekanizmalarla damar gevşetici etki sağladığını göstermektedir.

Daha önceki çalışmalarda Apela'nın vasküler fonksiyonel etki mekanizmaları tüm yönleriyle ortaya konulamamıştır. Perjes ve ark. (20), ERK 1/2 aktivasyonunun, Apela aracılı miyokardiyal kontraktıl performans artırıcı etkiye dahil olmasına rağmen, Apela'nın neden olduğu vazorelaksasyona katkıda bulunmadığını rapor etmiştir. Wang ve ark. (25), Apelin'in vazorelaksan etkisinde yer alan eNOS/NO sinyal yolağının, Apela kaynaklı vazorelaksasyonda yer almadığını göstermiştir. Apela'nın vasküler fonksiyonel etki mekanizmaları ile ilgili çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Bu nedenle, sunulan çalışmanın bir sonraki aşamasında Apela ile uyarılan vazorelaksasyona aracılık eden mekanizmaların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, vasküler fonksiyonların düzenlenmesindeki kritik önemi nedeni ile Kv 7.1-7.5 kanallarının olası rolü araştırılmıştır. Literatürdeki çalışmalar, potasyum kanallarının sayısı, yapısı, gen ekspresyonu ve aktivitesi gibi çeşitli faktörlerin değişmesi sonucu kardiyovasküler

patolojilerin ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Yukarıda belirtilen potasyum kanallarındaki fonksiyonel değişikliklere pulmoner arteriyel hipertansiyon, ateroskleroz, periferik arter hastalığı, septik şok, diyabet, hipertansiyon ve hiperkolesterolemi gibi birçok kardiyovasküler hastalık eşlik edebilmektedir (26,27). Potasyum kanallarındaki fonksiyonel değişikliklerden sonra arteriyel düz kas hücrelerinin zar potansiyellerinde anormal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu durumun bir sonucu olarak, kan damarlarının tonusunda artış ve vazokonstriktif ajanların neden olduğu artmış kontraktıl yanıt meydana gelebilmektedir. Bu nedenle, potasyum kanalları üzerinde düzenleyici etki gösteren yeni ajanların, kardiyovasküler ve periferik arter hastalıkları gibi tedavisi güç birçok hastalıkta önemli bir terapötik potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir. Güncel çalışmalar, potasyum kanal fonksiyonlarını düzenleyen ilaçların sayısını arttırmayı ve vazoreaktivite artışı ile ilişkili hastalıklarda tedavi seçeneklerini arttırmayı amaçlamaktadır.

Önceki çalışmalar, Kv7 kanallarının çeşitli vazoaktif maddelerin vasküler fonksiyonel etki mekanizmalarına katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür. Chadha ve ark. (12), sıçan mezenterik arteri, sıçan pulmoner arteri ve sıçan torasik aort örneklerinde Kv7 kanallarının bulunduğunu ve vasküler fonksiyonel etkilere katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Diğer bir çalışmada, Martelli ve ark. (28), Kv7 kanal aktivasyonunun sıçan aortunda endojen bir transmitter olan hidrojen sülfürün damar gevşetici etki mekanizmasında yer aldığını belirlemiştir. Başka bir çalışmada, Stott ve ark. (29), sıçan aortunda natriüretik peptit kaynaklı vazorelaksasyonda Kv7 kanallarının önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Literatürdeki veriler, damar gevşetici etkilere aracılık etmede Kv7 kanallarının önemine işaret etmektedir. Sunulan çalışma da bu doğrultuda olup, Apela'nın vasküler fonksiyonel etkilerinde Kv7.1-7.5 kanallarının olası rolüne odaklanmıştır.

Vasküler düz kas kasılması, artan hücre içi kalsiyumun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Hücre içi kalsiyum artışı

sonucunda aktin-miyosin etkileşimi ve çapraz köprü oluşumu uyarılmaktadır. Çeşitli potasyum kanallarının, özellikle voltaj kapılı potasyum kanallarının fizyolojik aktiviteleri, vasküler düz kas hücrelerindeki zar potansiyeli ve vasküler tonusunun ana düzenleyicileridir. Kv kanallarının aktivitesi, L tipi kalsiyum kanallarının açılıp kapanmasını modüle etmektedir. Bu nedenle, Kv kanallarının hücre içi kalsiyum konsantrasyonu üzerinde önemli bir etkisi vardır. Kv kanallarının aktivasyonundan sonra, voltaj kapılı kalsiyum kanalları bloke edilmektedir. Sonuç olarak, hücre içi kalsiyum akışı azalmakta ve vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon meydana gelmektedir. Bunun neticesinde vasküler düz kas gevşemektedir. Kv kanallarının inhibisyonu ise ters mekanizmayı uyararak vasküler düz kasta kasılmaya neden olmaktadır (5). Bu nedenle, çalışmanın bu adımı, Kv7.1-7.5 kanallarının Apela tarafından indüklenen konsantrasyon bağımlı vazorelaksasyon yanıtlarındaki potansiyel rolü araştırıldı. Elde edilen bulgular, Apela'nın vazorelaksan etki seviyesinin, 30 dakikalık Kv7.1-7.5 kanal blokleri XE-991 inkübasyonu ile önemli ölçüde azaldığını ortaya koydu. Bu bulgu, Kv7.1-7.5 kanallarının Apela kaynaklı vazorelaksasyona aracılık ettiğini göstermektedir. XE-991'in neden olduğu bu blokajın hem endoteli sağlam hem de endoteli çıkarılmış damar örneklerinde mevcut olduğu belirlendi. Böylece, bu çalışmada Apela kaynaklı vazorelaksasyona aracılık eden mekanizmalar hakkında yeni ve önemli bir bulgu elde edilmiş ve Kv7.1-7.5 kanallarının katkısı belirlenmiştir.

Kv7 kanalları, kardiyovasküler fonksiyonların ve kardiyovasküler dokuların düzenlenmesinde yer alan bölgelerde bulunan merkezi sinir sistemi nöronlarında yaygın olarak ifade edilmektedir. Bu nedenle, bu kanalların kardiyovasküler patolojiler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular, Kv7 kanallarının kemirgen ve insan kan damarlarında meydana gelen düz kas kasılma mekanizmasının önemli düzenleyicileri olduğunu göstermektedir. Önceki birkaç çalışmanın sonuçları, Kv7 kanallarının çeşitli kardiyovasküler hastalıklarla yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Birkaç çalışma,

spontan hipertansif sıçanların farklı arterlerindeki Kv7 kanallarının *down* regülasyonunu bildirmiştir. Jepps ve ark. (30), Kv7 kanal aktivitesinin ve ekspresyonunun baskılanmasının hipertansiyon gelişimi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacılar, Kv7 kanal aktivitesinin azalmasından sonra, arteriyel tonusta hipertansiyon ile kendini gösteren progresif bir artışın meydana geldiğini göstermiştir. Bu nedenle, azalan Kv7 kanal aktivasyonunun toplam periferik direncin artmasına katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Başka bir çalışmada, Kv7 kanallarını hedef alan yeni tedavi yöntemlerinin pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde önemli bir alternatif olabileceği belirtilmiştir. Kv7 kanallarının pulmoner arteriyel hipertansiyon gelişiminin başlangıcında pulmoner arter tonusunun kontrolünde önemli bir role sahip olduğu öne sürülmüştür. Çeşitli hayvan türlerinde yapılan daha sonraki çalışmalar bu fikri desteklemekte ve Kv7 kanallarını aktive eden ajanların pulmoner arteriyel hipertansiyon gelişimini önleyebileceğini ve hatta tersine çevirebileceğini göstermektedir (16). Öte yandan, Kv7 kanallarının fizyolojik aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerin, kardiyovasküler hastalıkların önemli bir nedeni olan diyabet ile de ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, hiperglisemi ile sol koroner arterdeki Kv7 kanal aktivitesi ve ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmacılar, Kv7 kanallarında belirtilen değişikliklerin bir sonucu olarak sol koroner arterde vazorelaksasyon yanıtında azalma meydana geldiğini ileri sürmüştür (13). Tüm bu verilerin yanı sıra, güçlü pozitif inotropik, damar gevşetici ve Kv7 kanal aktivasyonunu uyarıcı özellikleri göz önüne alındığında, Apela'nın kardiyovasküler hastalık modellerinde önemli iyileştirici etkiler sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, Apela kaynaklı vazorelaksasyonda Kv7.1-7.5 kanallarının rolü ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışma, Apela'nın sıçan torasik aort modelinde damar gevşetici etki sergilediğini göstermektedir. Apela aracılı vazorelaksasyon düzeyi oldukça yüksektir. Apela'nın damar gevşetici etkisi, endotele bağımlı ve

endotelden bağımsız mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Apela'nın damar gevşetici etkisine endotelden bağımsız mekanizmaların katkısının, endotel bağımlı mekanizmalardan daha fazla olduğu görülmektedir. Kv 7.1-7.5 kanalları, endotele bağımlı ve endotelden bağımsız koşullarda,

Apela aracılı vazorelaksasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmanın verileri ve önceki çalışmalar göz önüne alındığında, Apela'nın artmış vazoreaktivite nedeniyle oluşan hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklarda terapötik potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B. ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev Cell*. 2013;27:672–80.
2. Read C, Nyimamu D, Williams TL, et al. International union of basic and clinical pharmacology. cvii. structure and pharmacology of the apelin receptor with a recommendation that elabela/toddler is a second endogenous peptide ligand. *Pharmacol Rev*. 2019;71:467–502.
3. Zhang Y, Wang Y, Lou Y, et al. Elabela, a newly discovered APJ ligand: Similarities and differences with Apelin. *Peptides*. 2018;109:23–32.
4. Zhou M, Wu Y. Effects and signaling pathways of Elabela in the cardiovascular system. *Peptides*. 2021;27:170674.
5. Jackson WF. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. *Adv Pharmacol*. 2018;78:89–144.
6. Bubolz AH, Li H, Wu Q, Liu Y. Enhanced oxidative stress impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel function in small coronary arteries of diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1873–80.
7. Cox RH, Fromme SJ, Folander KL, Swanson RJ. Voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in arteries of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2008;21:213.
8. Fosmo AL, Skraastad ØB. The Kv7 channel and cardiovascular risk factors. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:75.
9. Mills TA, Greenwood SL, Devlin G, et al. Activation of Kv7 channels stimulates vasodilatation of human placental chorionic plate arteries. *Placenta*. 2015;36:638–44.
10. Schleifenbaum J, Köhn C, Voblova N, et al. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J Hypertens*. 2010;28:1875–82.
11. Zhong XZ, Harhun MI, Olesen SP, et al. Participation of KCNQ (Kv7) potassium channels in myogenic control of cerebral arterial diameter. *J Physiol*. 2010;588:3277–93.
12. Chadha PS, Zunke F, Davis AJ, et al. Pharmacological dissection of Kv7.1 channels in systemic and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2012;166:1377–87.
13. Morales-Cano D, Moreno L, Barreira B, et al. Kv7 channels critically determine coronary artery reactivity: left-right differences and down-regulation by hyperglycemia. *Cardiovasc Res*. 2015;106:98–108.
14. Chadha PS, Zunke F, Zhu HL, et al. Reduced KCNQ4-encoded voltage-dependent potassium channel activity underlies impaired beta-adrenoceptor-mediated relaxation of renal arteries in hypertension. *Hypertension*. 2012;59:877–84.
15. Wang N, Kuczmanski A, Dubrovskaya G, Gollasch M. Palmitic acid methyl ester and its relation to control of tone of human visceral arteries and rat aortas by perivascular adipose tissue. *Front Physiol*. 2018;9:583.
16. Mondéjar-Parreño G, Barreira B, Callejo M, et al. Uncovered contribution of kv7 channels to pulmonary vascular tone in pulmonary arterial hypertension. *Hypertension*. 2020;76:1134–46.
17. Nurulloğlu-Atalık KE, Kutlu S, Solak H, Özen-Koca R. Cilostazol enhances atorvastatin-induced vasodilation of female rat aorta during aging. *Physiol Int*. 2017;104:226–34.
18. Sousa-Brito HL, Arruda-Barbosa L, Vasconcelos-Silva AA, et al. Vasorelaxant effect of trans-4-chloro-β-nitrostyrene, a synthetic nitroderivative, in rat thoracic aorta. *Fundam Clin Pharmacol*. 2021;35:331–40.
19. Yang P, Read C, Kuc RE, et al. Elabela/toddler is an endogenous agonist of the apelin APJ receptor in the adult cardiovascular system, and exogenous administration of the peptide compensates for the downregulation of its expression in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2017;135:1160–73.
20. Perjés Á, Kilpiö T, Ulvila J, et al. Characterization of apela, a novel endogenous ligand of apelin receptor, in the adult heart. *Basic Res Cardiol*. 2016;111:2.
21. Xu C. The Elabela in hypertension, cardiovascular disease, renal disease, and preeclampsia: an update. *J Hypertens*. 2021;39:12–22.
22. Murza A, Sainsily X, Coquerel D, et al. Discovery and structure-activity relationship of a bioactive fragment of ELABELA that modulates vascular and cardiac functions. *J Med Chem*. 2016;59:2962–72.

23. Ho L, van Dijk M, Chye STJ, et al. ELABELA deficiency promotes preeclampsia and cardiovascular malformations in mice. *Science*. 2017;357:707-13.
24. Li Y, Yang X, Ouyang S, et al. Declined circulating Elabela levels in patients with essential hypertension and its association with impaired vascular function: a preliminary study. *Clin Exp Hypertens*. 2020;42:239-43.
25. Wang Z, Yu D, Wang M, et al. Elabela-apelin receptor signaling pathway is functional in mammalian systems. *Sci Rep*. 2015;5:8170.
26. Baranowska M, Kozłowska H, Korbut A, Malinowska B. Potassium channels in blood vessels: 10 their role in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007;61:596-605.
27. Cheng J, Wen J, Wang N, Wang C, Xu Q, Yang Y. Ion channels and vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:e146-56.
28. Martelli A, Testai L, Breschi MC, et al. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol Res*. 2013;70:27-34.
29. Stott JB, Barrese V, Jepps TA, Leighton EV, Greenwood IA. Contribution of kv7 channels to natriuretic peptide mediated vasodilation in normal and hypertensive rats. *Hypertension*. 2015;65:676-82.
30. Jepps TA, Chadha PS, Davis AJ, Harhun MI, Cockerill GW, Olesen SP, et al. Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. *Circulation*. 2011;124:602-11

#### **Etik Bilgiler**

**Etik Kurul Onayı:** Çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan tarafından onaylanmıştır (Karar no: 2021-12/08, Tarih: 28.09.2021).

**Onam:** Bu çalışma hayvan deneyidir.

**Telif Hakkı Devir Formu:** Tüm yazarlar tarafından Telif Hakkı Devir Formu imzalanmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Hakem değerlendirmesinden geçmiştir.

**Yazar Katkı Oranları:** Fikir/kavram: SŞ Tasarım: SŞ Veri Toplama: SŞ Veri İşleme: SŞ Analiz/Yorum: SŞ Literatür taraması: SŞ Yazma: SŞ

**Çıkar Çatışması Bildirimi:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Destek ve Teşekkür Beyanı:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.