T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN İZOLE MEZENTER ARTERİNDE KALSİYUMSUZ ORTAMDA ELEKTRİKSEL ALAN UYARISI İLE ELDE EDİLEN KASILMALARIN MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Uzm. Ecz. Elif İnci SOMUNCUOĞLU

Farmakoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2014

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN İZOLE MEZENTER ARTERİNDE KALSİYUMSUZ ORTAMDA ELEKTRİKSEL ALAN UYARISI İLE ELDE EDİLEN KASILMALARIN MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Uzm. Ecz. Elif İnci SOMUNCUOĞLU

Farmakoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. M. Serdar UMA

ANKARA

2014

Anabilim Dalı: Farmakoloji AbD

Program: Farmakoloji Programı

Tez Başlığı: Sıçan İzole Mezenter Arterinde Kalsiyumsuz Ortamda Elektriksel Alan Uyarısı İle Elde Edilen Kasılmaların Mekanizmasının İncelenmesi

Öğrenci Adı-Soyadı: Elif İnci SOMUNCUOĞLU

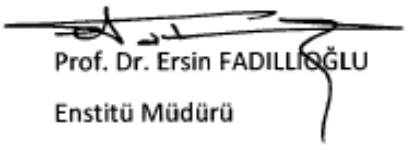
Savunma Sınavı Tarihi: 23 Haziran 2014

Bu çalışma jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU (Gazi Üniversitesi)
Tez danışmanı:	Prof. Dr. M. Serdar UMA (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. İnci ERDEMLİ (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Can PEKİNER (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Alper B. İSKİT (Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

“Yapılırken heyecan duyulmayan işler başarılamaz.”

EMERSON

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca heyecanıma ortak olan, değerli bilgileriyle bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek çalışmalarımda beni cesaretlendiren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Serdar UMA’ya,

Farmakoloji eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan değerli hocalarıma,

Bilimsel konulardaki yardımları ve manevi destekleriyle başta Dr. Ecz. Melike Hacer ÖZKAN olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve yalnız bırakmayan sevgili aileme,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Somuncuoğlu, E.İ., Sıçan İzole Mezenter Arterinde Kalsiyumsuz Ortamda Elektriksel Alan Uyarısı ile Elde Edilen Kasılmaların Mekanizmasının İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2014. Bu çalışmada, sıçan mezenter arter halkalarında elektriksel alan uyarısı (EAU)-aracılı gevşemelere L-tipi kalsiyum kanallarının (LTKK) blokajının ve ekstraselüler kalsiyumun uzaklaştırılmasının etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Fenilefrin ile ön-kasılma oluşturulmuş dokularda EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) yanıtları nifedipin (100 nM) ve tetraetilamonyum (1 mM) ile inhibe oldu. LTKK açıcısı BAY K 8644 (100 nM) yanıtları değiştirmedi. Ekstraselüler kalsiyumun uzaklaştırılması ile aynı uyarı parametrelerinde EAU frekansa-bağlı kasılmalara neden oldu. Tetrodotoksin (1 µM), kapsaisin (10 µM) ve endotelin uzaklaştırılmasının kasılmaları değiştirmemesi bu yanıtlarda nöronal- ve endotel-kaynaklı kasıcı faktörlerin rolünün olmadığını gösterdi. Ancak, BAY K 8644 (100 nM) ile yanıtların anlamlı bir şekilde artması ve nifedipin (100 nM) ile inhibe olması, LTKK aktivasyonunun esas olduğunu göstermektedir. Inositol trifosfat (IP_3) reseptör antagonisti 2-APB (100 µM) ile kasılmalar önemli ölçüde azaldı ve yüksek konsantrasyonda kafein (20 mM) ile de ortadan kalktı. Sarko/endoplazmik retikulum kalsiyum-ATPaz inhibitörleri tapsigargin (1 µM) ve siklopiazonik asit (20 µM) kasılmaları anlamlı olarak azalttı. Keza, fosfolipaz C inhibitörü U 73122 (10 µM) ve Rho kinaz inhibitörü Y 27632 (10 µM) varlığında da yanıtlar anlamlı olarak azaldı. Bu sonuçlar kalsiyumsuz ortamda EAU'nun membran depolarizasyonu yaparak LTKK aktivasyonu yoluyla depolardan IP_3-aracılı kalsiyum salıverilmesine neden olduğunu gösterir. Bu olaya "kalsiyum kanalı ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi" denir ve kasılma ile sonuçlanır. Ortamın kalsiyum durumuna bağlı olarak LTKK aktivasyonunun arteryal kasılma ya da gevşemeye neden olması, bir hücrede aynı ulağın iki zıt fizyolojik fonksiyonu yerine getirebilmesine ilişkin çarpıcı bir örnektir.

Anahtar Kelimeler: Büyük kondüktanslı kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları, elektriksel alan uyarısı, kalsiyum kanal aracılı kalsiyum salıverilmesi, L-tipi kalsiyum kanalları, sıçan mezenter arteri

ABSTRACT

Somuncuoglu, E.I., Investigation of Mechanism of the Electrical Field Stimulation-Induced Contractions in Rat Isolated Mesenteric Arteries in the Absence of Calcium, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara 2014. In the present study, we aimed to examine the effect of blockade of L-type calcium channels (LTCC) and in addition the removal of extracellular calcium, on EFS-induced relaxations in rings of rat mesenteric artery. EFS (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) applied to the tissues precontracted with phenylephrine caused relaxations which were markedly inhibited by nifedipine (100 nM) and tetraethylammonium (1 mM). Upon removal of calcium, EFS with the same stimulation parameters produced frequency-dependent transient contractions. Tetrodotoxin (1 μM), capsaicin (10 μM) and removal of endothelium did not alter these contractions suggesting that they were not neural in origin and endothelium-derived contracting factors were unlikely to be involved. However, they were markedly increased by BAY K 8644 (100 nM) and were inhibited by nifedipine (100 nM), indicating that activation of the LTCCs was essential. 2-APB (100 μM) significantly reduced, and high concentration of caffeine (20 mM) almost totally suppressed the contractions. When tissues incubated with thapsigargin (1 μM) and cyclopiazonic acid (20 μM) contractions significantly reduced as well. In the presence of U 73122 (10 μM) and Y 27632 (10 μM) responses were significantly reduced. These results suggest that in the absence of extracellular calcium EFS through membrane depolarization, evokes the opening of the LTCCs which subsequently leads to the release of calcium from internal stores via IP_3 receptors, a phenomenon known as “calcium channel-induced calcium release”, to trigger vasoconstriction. That activation of LTCCs causes arterial relaxation or contraction depending on the calcium status apparently exemplifies how the same messenger fulfils opposing physiological functions in a given cell.

Key Words: Big conductance calcium-activated potassium channels, calcium channel induced calcium release, electrical field stimulation, L-type calcium channels, rat mesenteric artery

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Vasküler Düz Kas ve Endotelde Kalsiyum Homeostazı	2
2.1.1. Vasküler Düz Kas Hücrelerine Kalsiyum Girişi	2
2.1.2. İntraselüler Kalsiyum Salıverilmesi	4
2.1.3. Endotel Hücrelerine Kalsiyum Girişi	5
2.2. Amaç	7
3. GEREÇ ve YÖNTEM	9
3.1. Mezenter Arter Halkalarının Hazırlanması	9
3.2. *In vitro* Deney Protokolü	9
3.3. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz	11
3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	12
3.5. Deneylerde Kullanılan İlaçlar	12
4. BULGULAR	13
4.1. Kalsiyum Varlığında EAU ile Oluşan Gevşeme Yanıtları	13
4.2. Kalsiyumsuz Ortamda EAU ile Oluşan Kasılma Yanıtları	16
4.3. Kalsiyumsuz Ortamda Yüksek Potasyum ile Oluşan Kasılma Yanıtları	20
5. TARTIŞMA	22
6. SONUÇ ve YORUM	28
KAYNAKLAR	29
EK-1 Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
EK-2 Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	

SİMGELER ve KISALTMALAR

2-APB	2-Aminoetil Difenilborat
1-EBIO	1-Etil-2-Benzimidazol
BK_{Ca}	Büyük Kondüktanslı Kalsiyum ile Aktive Olan Potasyum Kanalı
CPA	Siklopiazonik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EAU	Elektriksel Alan Uyarısı
EDHF	Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör
EGTA	Etilen Glikol-bis (β-aminoeter) N,N,N',N' Tetraasetik Asit
IK_{Ca}	Orta Kondüktanslı Kalsiyum ile Aktive Olan Potasyum Kanalı
IP_3	İnositol-1,4,5-Fosfat
KH	Krebs-Henseleit
LTKK	L-Tipi Kalsiyum Kanalı
PLC	Fosfolipaz C
SERCA	Sarko/Endoplazmik Retikulum Kalsiyum-ATPaz
SK_{Ca}	Küçük Kondüktanslı Kalsiyum ile Aktive Olan Potasyum Kanalı
SR	Sarkoplazmik Retikulum
TAPS	Tapsigargin
TEA	Tetraetilamonyum
TRP	Geçici Reseptör Potansiyeli
TTX	Tetrodotoksin

ŞEKİLLER

Sayfa

4.1.1. Sıçan izole mezenter arter halkalarında EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) ile elde edilen gevşeme yanıtlarına nifedipin (100 nM) ve TEA'nın (1 mM) etkisi. 13

4.1.2. Sıçan izole mezenter arter halkalarında NS 1619 ile elde edilen gevşeme yanıtlarına nifedipin (100 nM) ve TEA'nın (1 mM) etkisi. 14

4.1.3. Ekstraselüler ortamdaki kalsiyumun tamamen uzaklaştırıldığı mezenter arter halkalarında fenilefrin ön-kasılması sonrası EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) ile elde edilen frekansa bağımlı kasılma yanıtını gösteren orijinal trase. 15

4.1.4. Sıçan izole mezenter arter halkalarında EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının ekstraselüler ortamdaki kalsiyumun tamamen uzaklaştırılması sonucu kasılmaya dönmesi. 15

4.2.1. Sıçan izole mezenter arter halkalarında kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılma yanıtlarının 30 dakika ara ile tekrarlanması. 16

4.2.2. Sıçan izole mezenter arter halkalarında ekstraselüler kalsiyum uzaklaştırıldığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına BAY K 8644 (100 nM) ve nifedipin'in (100 nM) etkisi. 17

4.2.3. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına TTX (1 µM), kapsaisin (10 µM) ve endotelin etkisi. 17

4.2.4. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına IP_3 reseptör blokörü 2-APB (100 µM) ve ryanodin reseptör modülatörü kafeinin (20 mM) etkisi. 18

4.2.5. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına SERCA inhibitörleri TAPS (1 µM) ve CPA'nın (20 µM) etkisi. 19

4.2.6. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına PLC inhibitörü U 73122 (10 µM) ve Rho kinaz inhibitörü Y 27632'nin (10 µM) etkisi. 19

4.3.1. Sıçan izole mezenter arter halkalarında kalsiyumsuz ortamda BAY K 8644 (100 nM) varlığında 40 mM potasyum ile elde edilen depolarizasyona bağlı kasılma yanıtlarının 30 dakika ara ile tekrarlanması. 20

4.3.2. Sıçan izole mezenter arter halkalarında kalsiyumsuz ortamda 40 mM potasyum ile elde edilen depolarizasyona bağlı kasılma yanıtlarına BAY K 8644 (100 nM), nifedipin (100 nM), 2-APB (100 µM), kafein (20 mM), TAPS (1 µM), U 73122(10 µM) ve Y 27632'nin (10 µM) etkisi. 21

5.1. Kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılmaların hipotetik mekanizmasının şematik gösterimi. 25

1. GİRİŞ

Elektriksel alan uyarısı (EAU), ön-kasılma oluşturulmuş arter düz kasında, damarın ait olduğu bölgeye göre değişen mediyatör ve/veya mekanizmalar aracılığıyla, gevşemeye neden olur. Her ne kadar EAU ile yapılan araştırmalar temelde sinir uçlarının uyarılması sonucu lokal nörotransmitter salıverilmesi esasına dayansa da uygun stimulasyon parametreleri kullanıldığında EAU kendi başına düz kas membranını depolarize edebilmektedir. Ancak, damar düz kasının mekanik cevaplarını modüle eden iyon kanalları üzerinde EAU'nun ne şekilde etki gösterdiğine dair bilgi literatürde fazla bulunmamaktadır.

Sıçan izole mezenter arterinde yaptığımız bir çalışmada EAU'nun neden olduğu vazodilatasyonun esas olarak damar düz kasında bulunan büyük kondüktanslı kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının (BK_{Ca}) açılmasına bağlı olduğunu göstermiştik (1). Bu kanalların aktivasyonu hücre içinden potasyumun dışarı çıkmasına, buna bağlı olarak da membran potansiyelinin daha negatifleşmesine, yani hiperpolarizasyonuna neden olur. Aktive olmaları için gerekli kalsiyumu, L-tipi kalsiyum kanallarından (LTKK) hücre içine giren kalsiyumun tetiklediği bir dizi mekanizma sonucu BK_{Ca} kanalı çevresinde düzeyi yükselen lokal sitoplazmik kalsiyum karşılar, ki bunlara kalsiyum sparkı (kıvılcımlanma) adı verilir. Dolayısıyla LTKK'nın blokajı BK_{Ca} kanal aktivasyonu için gerekli lokal sitozolik kalsiyum artışını önleyebilir. Bunu test etmek için yaptığımız ön deneylerde EAU ile indüklenen gevşemelerin nifedipin varlığında önemli ölçüde inhibe olduğunu gözledik. Benzer bir yanıtın ekstraselüler kalsiyumun tamamen uzaklaştırıldığı dokularda da oluşması beklenirken, ön deneylerimizde EAU'nun frekansa bağlı kasılmalara neden olduğunu bulduk. Normal koşullarda damar düz kasının, elektriksel akımlarla depolarize edildiğinde LTKK yolu ile hücre içine giren kalsiyumun sarkoplazmik retikulumdan (SR) kalsiyum salıverilmesini tetiklemesi sonucu sitozolün genelinde yükselen kalsiyum aracılığıyla kasılma yanıtı oluşturduğu bilinmektedir. Ancak, banyo ortamında kalsiyum bulunmazken EAU'ya cevaben ortaya çıkan bu kasılmaların mekanizması bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada sıçan izole mezenter arterinde kalsiyum varlığında ve yokluğunda EAU ile oluşan yanıtların mekanizmalarını incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Düz Kas ve Endotelde Kalsiyum Homeostazı

Kalsiyum iyonu kontraktilite ve sekresyon dahil çeşitli hücresel prosesin düzenlenmesinde rol oynayan bir intraselüler ikincil ulaktır. Bu nedenle gerek endotelde gerekse düz kasta hücre içi kalsiyum düzeyi vasküler tonusun kontrolünde önemli bir yer tutar. İstirahat halinde her iki hücre tipinde de kalsiyum konsantrasyonu oldukça düşüktür (<100 nM). Sitoplazmadaki düzeyinin artması, ekstraselüler aralıktan hücre içine kalsiyumun girmesi ve/veya intraselüler organellerden kalsiyumun salıverilmesi ile gerçekleşir.

2.1.1. Vasküler Düz Kas Hücrelerine Kalsiyum Girişi

Ekstraselüler kalsiyumun damar düz kas hücresine girişi, ya voltaja-bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla ya da voltaja-bağımlı olmayan diğer kalsiyum kanalları içinden geçmek suretiyle gerçekleşir. Bu kanalların temel özellikleri aşağıda kısaca açıklanmıştır.

2.1.1.1. Voltaja-Bağımlı Kalsiyum Kanalları

LTKK veya dihidropiridine duyarlı kalsiyum kanalları diye de adlandırılır. Hemen hemen tüm damar yataklarında yaygın bir şekilde eksprese edilirler ve depolarizasyonla aktive olurlar (2, 3). Vena portanın longitudinal şeritleri gibi bazı vasküler düz kas preparatlarında istirahat membran potansiyeli yeterli eşik değere ulaştığında kendi başına aksiyon potansiyeli oluşturabilir (4, 5). Ancak arterlerin çoğunda LTKK'ların açık kalma olasılıkları bir aksiyon potansiyeli doğurmalarına yetmez, sadece eksojen bir uyaranla oluşturulan depolarizasyon sırasında uzun süreli kalsiyum girişine olanak verir. BK_{Ca} gibi fizyolojik fren mekanizmalarının varlığı membran potansiyelinin aksiyon potansiyeli oluşturması için gerekli eşik değere ulaşmasını önler (6).

Sarkolemma boyunca yerleşmiş olan LTKK'ların vasküler düz kasta baskın olarak bulunan alt tipi $Cav_{1.2}$'dir (7-9). Bu kanalların tipik özelliği düşük

konsantrasyonlarda dihidropiridin, fenilalkilamin ve benzotiazepin gibi ilaç grupları tarafından bloke olmalarıdır (10-12). Yine dihidropiridin türevi bir madde olan BAY K 8644 voltaja-bağımlı kalsiyum kanal aktivatörü diye adlandırılır ve kanalın açılmasına neden olur.

Vasküler düz kaslarda hücre içi kalsiyum homeostazında bu kanalların fizyolojik önemini göstermek için $Cav_{1.2}$ geni silinmiş fareler üretilmiş ancak 21 gün içinde bunların öldüğü bildirilmiştir (13). Bu farelerde miyojenik tonusun bozulduğu (13), fenilefrin-aracılı perfüzyon direncinin % 50 oranında kaybolduğu (13), karbakol ile indüklenmiş kasılmanın % 90 oranında azaldığı gösterilmiştir (14, 15).

2.1.1.2. Voltaja-Bağımlı Olmayan Kalsiyum Kanalları

Damar düz kas hücrelerinde voltaj değişikliğinden etkilenmeyen farklı tipte kalsiyum kanalları bulunmaktadır. Bunlar arasında **reseptöre-bağımlı (receptor-operated)** ve **depoya-bağımlı (store-operated)** kanallar sayılabilir.

Reseptöre-bağımlı kalsiyum kanalları membran potansiyelindeki değişimden bağımsız olarak, hücre membranında özel bir G proteini aracılığı ile bir reseptöre kenetlenmiş bulunan ve reseptörün kendine uyan agonist madde molekülleri tarafından aktivasyonu sonucu açılan kanallardır (16, 17). Vücutta bulunan çeşitli nörohümoral maddeler (asetilkolin, anjiyotensin II, endotelin-1, norepinefrin, serotonin, vazopresin vs.) bu reseptörlerin endojen ligandı olarak etki edebilecekleri gibi, eksojen agonistlerde aynı işlevi gösterirler. Agonistin reseptöre bağlanması kanal proteininin yapısında konformasyonel bir değişikliğe neden olarak G proteinine kenetli fosfolipaz C (PLC)'yi aktive eder ve bu yolla membran lipidlerinden olan inositol-1, 4, 5-trifosfat (IP_3) üretimi uyarılmış olur. Sentezi artan IP_3 SR membranındaki IP_3 reseptörüne bağlanarak SR'den sitoplazmaya kalsiyum salıverilmesine aracılık eder. 2-aminoetil difenilborat (2-APB) bu reseptörlerin selektif blokörüdür.

Plazma membranında bulunan **depoya-bağımlı kalsiyum kanalları** ise hücre içi kalsiyum depolarında kalsiyum konsantrasyonunun azalması ile aktive olan ve hücre dışından içine kalsiyum girişini sağlayan kanallardır (18). Bu kanalların en

önemli özelliği depolardan kalsiyum salıverilmesi sonucu sitoplazmik düzeyi yükselen kalsiyum tarafından değil, kalsiyum depolarının kendiliğinden tükenmesi ile aktive olmalarıdır (19). Deponun boşalması ile kanalın aktive olması arasındaki ilişkinin nasıl kurulduğu henüz bilinmemektedir. Bu nedenle bu kanallar aslen kalsiyuma-bağımlı kanallar değildir (19). Bu durum deneysel olarak da depoların tüketilmesini sağlayan ilaçların özellikle sarko/endoplazmik retikulum kalsiyum-ATPaz (SERCA) inhibitörleri tapsigargin (TAPS) ve siklopiazonik asit (CPA) kullanılarak da gösterilmiştir (20). Kalsiyumun sitoplazmadan depolara geri-alımından sorumlu SERCA'nın inhibisyonu SR'den kalsiyumun sızmasına ve depoların pasif olarak tüketilmesine neden olur. Bu ilaçlar reseptöre- ve depoya-bağımlı kanalların ayırt edilmesi için kullanılan ilaçlardır. Zira reseptör-aracılı kanalları aktive eden birçok agonist IP_3 oluşumuna ve buna bağlı olarak SR'den kalsiyum salıverilmesine neden olduğundan, sonuçta depolar tüketildiği için, depoya-bağımlı kanalları da uyarmış olur. Ancak SERCA inhibitörleri plazma membran reseptörlerini aktive etmeden düz kas hücrelerinde sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunu artırarak kasılmaya neden olmaktadır (21, 22, 23). Reseptöre- ve depoya-bağımlı kalsiyum kanallarının ortak özelliği voltajdan bağımsız olarak hücre içine kalsiyum girişine neden olmalarıdır. Bu özellikleri kanalların protein yapısından ileri gelmektedir. Her iki kalsiyum kanalı da geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanal ailesinin üyesidirler (21). Birçok alt tipi olan bu grup kanalların özelliği, aktivasyonlarında ısı ve pH değişimi dahil olmak üzere çok çeşitli mekanizmanın yer almasıdır. Hücre içi kalsiyum depolarının tüketilmesi bu kanalların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

2.1.2. İntraselüler Kalsiyumun Salıverilmesi

Damar düz kas hücresinde kalsiyum iyonlarını içine alan, depolayan ve gerektiğinde salıveren esas organel SR'dir. Kalsiyum, SR içinde kalsinörin adı verilen özel bir proteine bağlı şekilde depolanır. SR membranında yer alan SERCA pompası SR ile sitoplazma arasındaki kalsiyum gradiyentinin oluşmasını ve sürdürülmesini sağlar. TAPS ve CPA bu pompanın spesifik inhibitörleridir (6, 22).

Nörohümoral maddeler ya da eksojen agonistlerle hücre membranında bulunan G-proteinine-kenetli reseptörlerin uyarılması PLC'nin aktivasyonuna ve buna bağlı olarak diaçilgliserol ve IP_3 üretimine neden olur. IP_3 de, intraselüler kalsiyumun kontrolu altında, SR membranında bulunan kendi reseptörlerini aktive ederek kalsiyumun sitoplazmaya salıverilmesini tetikler. Öte yandan kalsiyum iyonunun kendisi de bir başka SR reseptörünü aktive ederek kendi salıverilmesini sağlayabilir. Kalsiyumla-indüklenen kalsiyum salıverilmesi diye adlandırılan bu olay SR membranındaki ryanodin reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı olup kalsiyum sparkı diye tanımlanan kalsiyum artışlarıdır. Sitoplazmada kalsiyum düzeyi bu reseptörlerden hangisi ile uyarıldığına bağlı olarak farklılık gösterir. IP_3 reseptörlerinin uyarılması tüm sitoplazmada yaygın bir kalsiyum artışı yaparken, ryanodin reseptörlerinin aktivasyonu reseptörün yakın çevresinde (20 nm) ani ve hızlı gelişen, lokal bir yükselmeye neden olur (6, 23, 24).

Tüm bu bilgilere ek olarak SR'nin hücre membranına çok yakın pozisyonda konuşlanmış olması da dikkate alındığında, kalsiyumun hücreye girişi ile hücre içinden salıverilmesinin, vasküler homeostazı sağlama bakımından birbirine bağlı olaylar olduğu söylenebilir.

2.1.3. Endotel Hücrelerine Kalsiyum Girişi

Endotel hücreleri voltaja-bağımlı kalsiyum kanalları veya tetrodotoksine (TTX) duyarlı sodyum kanalları gibi hızlı aktivasyon özelliği gösteren kanalları bulundurmadığından genel olarak "non-eksitabl" hücreler olarak kabul edilirler. Ancak, nitrik oksit, prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) gibi endotel fonksiyonlarının yürütülmesinde önemli role sahip maddelerin sentezinde endotelyal kalsiyum düzeyi kilit bir role sahiptir (25). Asetilkolin gibi agonistler endotel hücresinde kendi reseptörlerini uyararak hem dışarıdan içeriye kalsiyum girişini hem de hücre içi depo görevi gören organellerden IP_3'e-bağımlı kalsiyum salıverilmesini tetikleyerek endotelyal kalsiyum düzeyini yükseltirler (26, 27). Burada rol oynayan reseptöre-bağımlı kanalların ve depoya-bağımlı kanalların moleküler yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bunların da TRP kanal familyasına ait

olduklarına yönelik kanıtlar bulunmaktadır (28, 29). Sonuçta endotel içi düzeyi yükselen kalsiyum yukarıda adı geçen endotelyal otakoidlerin sentez ve/veya salıverilmesini uyararak endotel hücresinin hiperpolarizasyonuna neden olur. Bu hiperpolarizasyonun damar düz kasına aktarılmasında ve buna bağlı oluşan vazodilatasyonun altında kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının açılmasının önemli bir rolü vardır (26, 30, 31).

2.1.3.1. Kalsiyumla Aktive Olan Potasyum Kanalları

Damar düz kası hücrelerinin hiperpolarizasyonu gevşemeye neden olur. Bu olaydan esas olarak kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları aracılığı ile hücre dışına çıkan potasyum iyonu sorumludur (32).

Kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları 3'e ayrılırlar. Bunlar küçük (SK_{Ca}), orta (IK_{Ca}) kondüktanslı potasyum ve BK_{Ca} kanallarıdır (33). SK_{Ca}'lar esas olarak endotelde ve gastrointestinal kanal düz kas hücrelerinde bulunurlar. Vasküler düz kas hücrelerinde de eksprese oldukları bildirilse de burada fonksiyonel önemleri olduğuna dair kanıt yoktur (33). IK_{Ca}'lar endotelde ve non-vasküler düz kaslarda bulunan, buna karşılık damar düz kasında eksprese edilmeyen voltajdan bağımsız kanallardır (33). IK_{Ca} ve SK_{Ca} kanallarının kalsiyum ile aktive olması sonucu endotelde meydana gelen hiperpolarizasyon düz kasa doğru yayılır ve sonuçta gevşeme meydana gelir (34). Aktive olmaları için gerekli kalsiyum, reseptöre- ve depoya-bağımlı kalsiyum kanallarından veya hücre içi depolardan sağlanmaktadır (34). Bu kanalların BK_{Ca}'dan önemli bir farkı aktivasyonları için kalmoduline gereksinim duymalarıdır (34). Tetraetilamonyum (TEA) bu kanalların non-selektif blokörü iken, apamin SK_{Ca}'ların, TRAM-34 IK_{Ca}'ların selektif blokörü, 1-etil-2-benzimidazol (1-EBIO) ise her iki kanalın açıcısıdır.

BK_{Ca} ise hem intraselüler kalsiyumla hem de voltajla regüle olan kanallardır ve potasyum kanalları içinde bu özelliğe sahip tek kanaldır (33). Bu sayede sıfır kalsiyum düzeyinde bile depolarizan voltajla aktive olabilirler. 100 nM'ın üstündeki intraselüler kalsiyum konsantrasyonu da depolarizasyon olmadan

açılmaları için yeterli eşik miktardır. TEA non-selektif, iberiotoksin ise selektif bir şekilde bu kanalları bloke ederken, NS 1619 aktivatör işlevi görür. Tüm düz kas hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilirler (33). Damar düz kasının istirahat membran potansiyaline yakın değerlerde BK_{Ca}'ların açılma olasılığı çok düşük olduğundan bu potansiyelin oluşumuna katkıları minimal derecededir (35, 36). Esas işlevlerinin, kasılmanın sonlandırılmasında bir fizyolojik fren mekanizması gibi çalışmaları olduğu düşünülmektedir (37). Bu işlevin yerine getirilmesinde, SR'deki ryanodin reseptörlerinin aktivasyonu ile reseptörün hemen çevresinde (20 nm) ani ve hızlı biçimde oluşan kalsiyum sparklarının önemli rolü vardır (38-40). Bu sayede SR'ye yakın komşu pozisyonunda yer alan BK_{Ca}'ların aktive olmaları için gerekli kalsiyum temin edilmiş olur. Membranın hiperpolarize olması LTKK'ların kapanmasına ve böylece sitoplazmanın global kalsiyum miktarının düşmesine neden olarak arter düz kasının gevşemesini sağlar (38-40). Bu durumda BK_{Ca} kanallarının bir çeşit endojen LTKK blokörü gibi davrandığı söylenebilir. Damar tonusunun durumuna göre BK_{Ca} kanalları ile LTKK arasındaki etkileşimin kasılma veya gevşeme arasında denge oluşturmaya yönelik bir düzenleme olduğu ileri sürülmüştür (41). Nitekim, metabolik sendromda BK_{Ca} kanallarının fonksiyonundaki azalmaya LTKK aracılı artmış koroner vazokonstriksiyon eşlik etmektedir (42). Bunu destekleyen bir çalışmada da BK_{Ca} kanalları silinmiş farelerde arteriyal reaktivitenin göstergesi olarak LTKK fonksiyonunda artış meydana geldiği gösterilmiştir (43). Ancak, bu durumun tersi yani LTKK'ların blokajı, BK_{Ca} kanal-aracılı hiperpolarizasyonda bir şiddetlenmeye sebep olmamaktadır (43). Aksine, LTKK'nın inhibisyonu BK_{Ca} kanal aktivasyonunu azaltmaktadır (43). Buna göre BK_{Ca} kanal aktivasyonu için LTKK-aracılı kalsiyum girişinin bir ön-koşul olduğu söylenebilir.

2.2. Amaç

Ekstraselüler kalsiyuma bağımlılık açısından uyarılmış kalsiyum sparkları ile spontan oluşan sparkların farklılık gösterdiği, sıfır kalsiyumlu ortamda veya LTKK'lar farmakolojik olarak bloke edildiğinde spontan olanların devam ettiği,

buna karşılık depolarizasyonla tetiklenenlerin kaybolduğu bildirilmiştir. BK_{Ca} kanal aktivasyonu ile başlayıp vazodilatasyona kadar giden yolağın tetikleyicisi kalsiyum sparkları olduğuna göre LTKK'ları bloke etmenin veya ortamı kalsiyumsuzlaştırmanın EAU ile oluşan vazodilatör yanıtları nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bunu incelemek amacıyla yaptığımız ön deneylerde EAU-aracılı gevşemelerin nifedipinle inhibe olduğu, buna karşılık sıfır kalsiyumlu ortamda aynı stimulasyon parametrelerinde uygulanan EAU'nun kasılmalara dönüştüğü saptandı. Dolayısıyla bu çalışmada sıçan izole mezenter arterinde kalsiyum varlığında ve yokluğunda EAU ile oluşan yanıtların mekanizmalarının incelenmesi amaçlandı.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerde 250-300 g ağırlığında 6-8 haftalık Sprague Dawley cinsi erkek albino sıçanlar kullanıldı. Bu araştırma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2010/28-3 ve 2011/39-9 no'lu izinler alındı. Deneyler Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1. Mezenter Arter Halkalarının Hazırlanması

Sıçanlar karbondioksit gazı ile kısa süreli anestezi edildikten sonra karotid arterleri kanatılarak öldürüldü. Abdominal bölge orta hat üzerinden açıldı ve süperior mezenter arter izole edilerek soğuk Krebs-Henseleit (KH) çözeltisine konuldu. KH çözeltisi içinde yağ ve bağ dokusu temizlenen süperior mezenter arterin ana dalı 2-2.5 mm'lik halkalara ayrıldı. Her bir arter halkası endotel tabakasına zarar vermeyecek şekilde organ askısı yardımıyla, 37°C'de, % 95 O_2-% 5 CO_2 karışımıyla gazlandırılan KH çözeltisi içeren 5 ml'lik organ banyosuna yerleştirildi. Preparatlara deneylerin başında "1 g" bazal gerim uygulandı ve hemen ardından 100 µM fenilefrinle alfa adrenerjik reseptörlerin uyarılması sağlandı. Fenilefrin verilmesinin ardından bazal gerime dönen preparatlar 15'er dakika aralıklarla yıkanarak 45 dakika dinlendirildi. Gerimde görülen değişiklikler izometrik kuvvet transdüseri 'MAY 95-Transducer Data Acquisition System' yardımı ile bilgisayara kaydedidi.

3.2. *In vitro* Deney Protokolü

Dinlenme periyodunun ardından yapılan ön deneylerde arter halkaları 15'er dakikalık aralıklarla eş büyüklükte kasılma yanıtı elde edilene kadar 2-3 kez 60 mM KCl ile kastırıldı. KCl'nin ortamdan uzaklaştırılmasından sonra dokular 15 dakikada bir KH çözeltisi ile yıkanarak 30 dakika süre ile dinlenmeye bırakıldı. Dinlenme süresini takiben dokulardan 10 nM-100 µM fenilefrin ile kümülatif kasılma yanıtı alınarak konsantrasyon-yanıt eğrisi elde edildi. Bu eğriden maksimum kasılmanın % 60-80'ini

oluşturan konsantrasyon aralığı (1-3 µM) belirlendi. Bu değer gevşeme yanıtlarının inceleneceği dokularda ön-kasılma oluşturacak fenilefrin konsantrasyonu olarak kullanıldı.

Endotelin mekanik olarak uzaklaştırılmasının gerektiği deney gruplarında endotel tabakası, halkaların iç yüzeyine sürülen ince bir tel yardımıyla harap edildi. Fenilefrin (30-100 nM) ön-kasılması sonrası 10 µM asetilkolinin % 10 veya daha az gevşeme oluşturduğu dokular endotelsiz kabul edildi.

Dokular fenilefrin ön-kasılmasından 30 dakika önce banyo ortamına eklenen muskarinik reseptör blokörü atropin (5 µM) ve adrenerjik nöron blokörü guanetidin (5 µM) ile inkübasyona bırakıldı. Ardından fenilefrinle (1-3 µM) ön-kasılma oluşturulmuş preparatlardan EAU-aracılı (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) kümülatif gevşeme yanıtları elde edildi. Bu uyarı parametreleri daha önce bu dokuda kullandığımız ve optimum yanıt elde ettiğimiz değerlerdir (1). Yanıtlar, LTKK'nın selektif blokörü nifedipin (100 nM), verapamil (1 µM) ve kalsiyumla aktive olan potasyum kanallarının non-spesifik blokörü TEA (1 mM) varlığında tekrarlandı. Nifedipin ilavesi fenilefrin kasılmasının amplitüdünü düşürdüğünden, bu deneylerde fenilefrin konsantrasyonu 10 µM'a çıkarıldı.

Bir başka grupta ise fenilefrin ön-kasılması sonrası BK_{Ca} kanal aktivatörü NS 1619 (100 µM) ile gevşeme yanıtı alındı. Bu gevşeme yanıtı da nifedipin (100 nM) ve TEA (1 mM) varlığında tekrarlandı.

Diğer bir grup deneyde ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonu değiştirilerek aynı uyarı parametrelerinde elektriksel gevşeme yanıtları alındı. Ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonu önce yarıya (1.25 mM), daha sonra ise sıfıra indirildi. Sıfıra indirilen dokularda ön-kasılmanın amplitüdü azaldığından fenilefrin konsantrasyonu, nifedipin deneylerindeki gibi, 10 µM'a çıkarıldı. Bu koşullar altında aynı stimülasyon parametrelerinde uygulanan EAU, frekansa-bağlı kasılma yanıtları oluşturdu.

Kalsiyumsuz ortamda meydana gelen bu kasılmaların karakterinin anlaşılması için gevşeme yanıtları sırasında ortamda bulunan atropin ve guanetidin yine aynı konsantrasyonlarda banyolara eklendi. Stimülasyon parametreleri değiştirilmedi, fakat kasılmaların amplitüdü küçük olduğundan sadece 8 Hz yanıtları üzerinden

değerlendirme yapıldı. Yanıtların zaman içinde azalıp azalmadığını test etmek için EAU 30 dakika ara ile iki kez tekrarlandı.

Kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılmaların sinir kökenli olup olmadığını anlamak için sodyum kanal blokörü TTX (1 µM) ve vaniloid reseptör agonisti kapsaisin (10 µM) kullanıldı. Bu amaçla önce kalsiyumsuz ortamda EAU ile kontrol yanıtı alındı, daha sonra dokunun bu ajanlardan biriyle 30 dakika süreyle inkübe edilmesinin ardından yanıtlar tekrarlandı. Kapsaisin kullanılan deneylerde preparat bu ajanla 1 saat inkübasyonun ardından 20 dakika boyunca yıkanarak dinlendirildi.

Kalsiyumsuz ortamda meydana gelen EAU-aracılı kasılmaların mekanizmasını incelemek için mezenter arter halkalarında 100 nM BAY K 8644 varlığında alınan kasılma yanıtları, LTKK blokörü nifedipin (100 nM), IP_3 reseptör blokörü 2-APB (100 µM), ryanodin reseptör modülatörü kafein (20 mM), SERCA inhibitörleri TAPS (1 µM) ve CPA (20 µM), Rho kinaz enzim blokörü Y 27632 (10 µM) ve PLC enzim inhibitörü U 73122 (10 µM) ile inkübasyon sonrasında tekrar edildi.

EAU ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak amacıyla, bir başka deney grubunda ise kalsiyumsuz ortamda yüksek potasyum (40 mM) ile depolarizasyon yapılarak elde edilen kasılmalar 100 nM BAY K 8644 ile amplifiye edildi. Oluşan yanıtlar nifedipin (100 nM), 2-APB (100 µM), kafein (20 mM), TAPS (1 µM), U 73122 (10 µM) ve Y 27632 (10 µM) varlığında tekrar edildi. Bu deneylerde potasyum ile alınan yanıtlar *unpaired* olarak çalışıldı ve her preparatta yalnız bir maddenin etkisi incelendi.

3.3. Bulguların Sunuluşu ve İstatistiksel Analiz

Mezenter arter halkalarında gevşeme yanıtları 100 µM papaverin gevşemesinin %'si, EAU kasılma yanıtları ise 60 mM KCl kasılmasının (2.5 mM kalsiyum içeren normal KH içinde) %'si cinsinden ifade edildi. Değerler ortalama ± standart hata olarak sunuldu. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen yanıtların istatistiksel olarak anlamlılığını belirlemek için "Student's *t* test" kullanıldı. $p<0.05$ ise

ortalamalar arasındaki fark anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel hesaplamalar için Graphpad 6.0 kullanıldı.

3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

KH çözeltisi (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; $MgSO_4$, 1.2; $CaCl_2$, 2.5; KH_2PO_4, 1.2; $NaHCO_3$, 25; Glukoz, 11.1.

40 ve 60 mM KCl içeren KH çözeltileri KCl'ün eş molar konsantrasyonda NaCl ile yer değiştirilmesiyle hazırlandı. 1.25 mM kalsiyum içeren KH çözeltisi $CaCl_2$'nin eş molar konsantrasyonda $MgSO_4$ ile yer değiştirilmesiyle hazırlandı. Kalsiyumsuz ortam, $CaCl_2$'nin eş molar konsantrasyonda (2.5 mM) $MgSO_4$ ile yer değiştirilmesiyle hazırlandı. Çözeltiye şelasyon etkisi olan 100 µM etilen glikol-bis (β-aminoeter) N,N,N',N'-tetraasetik asit (EGTA) 5 M KOH içerisinde ilave edildi ve çözeltinin pH'sı derişik HCl ile 7.4'e ayarlandı.

3.5. Deneylerde Kullanılan İlaçlar

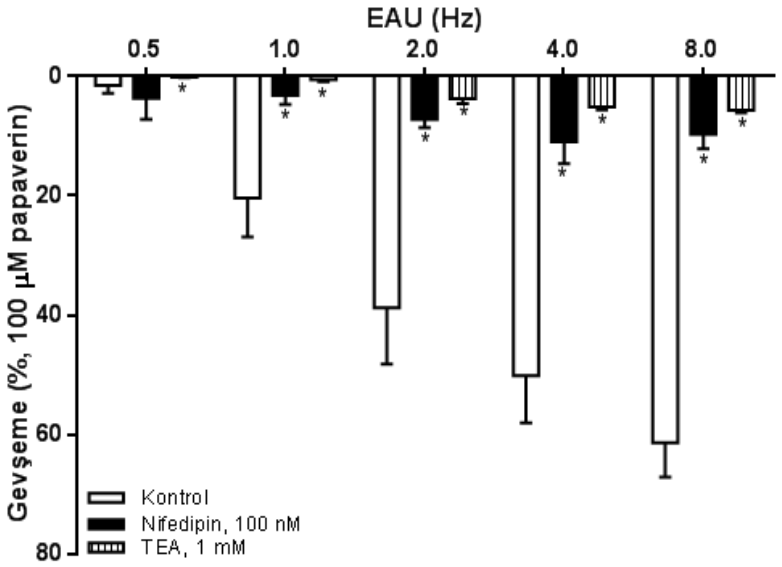
2-APB, atropin sülfat, BAY K 8644 hidroklorür, EGTA, fenilefrin hidroklorür, guanetidin monosülfat, kafein, kapsaisin, nifedipin, NS 1619, papaverin hidroklorür, CPA, TAPS, TTX, TEA, U 73122, verapamil hidroklorür ve Y 27632 Sigma Chemical Co. (St. Louis MO)'dan temin edildi. Atropin sülfat, fenilefrin hidroklorür, guanetidin monosülfat, kafein, papaverin hidroklorür ve Y 27632 distile suda; 2-APB, kapsaisin, nifedipin, NS 1619, CPA, TAPS, TEA, TTX ve U 73122 dimetilsülfoksitte (DMSO); BAY K 8644 ve verapamil hidroklorür etanolde; EGTA ise 5 M KOH'te çözüldü.

4. BULGULAR

4.1. Kalsiyum Varlığında EAU ile Oluşan Gevşeme Yanıtları

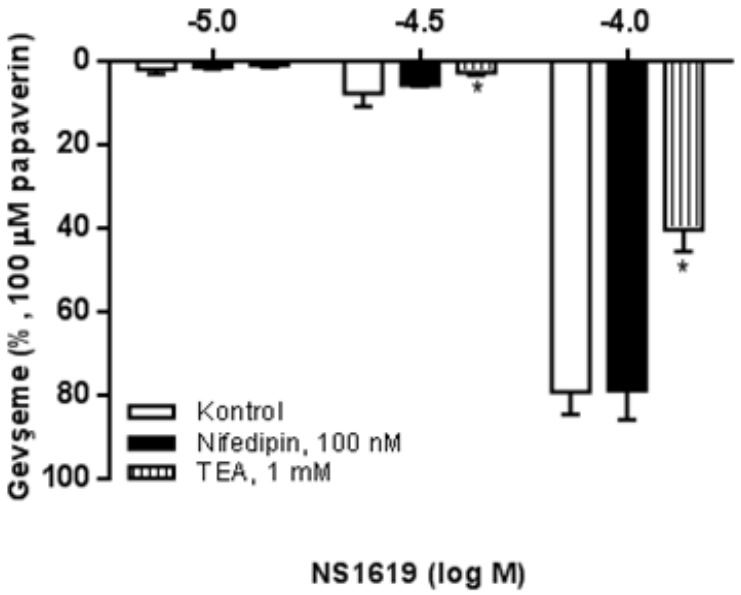
Daha önce yaptığımız çalışmada endoteli uzaklaştırılmış ve ön-kasılma oluşturulmuş sıçan mezenter arter halkalarında atropin ve guanetidin varlığında EAU'nun, iberiotoksin'le tamamen bloke olan frekansa-bağlı gevşemelere neden olduğunu göstermiştik (1).

Bu çalışmada da öncelikle nifedipin'in (100nM) bu yanıtları ne şekilde etkilediğini inceledik. Nifedipin elektriksel uyarıya bağlı gevşemeleri anlamlı olarak inhibe etti. BK_{Ca} kanallarının non-selektif blokörü TEA (1 mM) varlığında gevşemeler yine anlamlı olarak azaldı. Bu azalma nifedipin ve TEA için sırasıyla maksimum yanıtın alındığı 8 Hz'de % 9.7 ± 2.4 ve % 5.6 ± 0.4 olarak bulundu (kontrol yanıt % 61.3 ± 5.8) (Şekil 4.1.1.). Verapamil de (1 µM) nifedipin gibi yanıtlarda anlamlı azalma yaptı (8 Hz için; kontrol % 60.7 ± 4.0, verapamil % 27.7 ± 6.7 %). LTKK açıcısı BAY K 8644 gevşemelerde herhangi bir artış oluşturmadı.



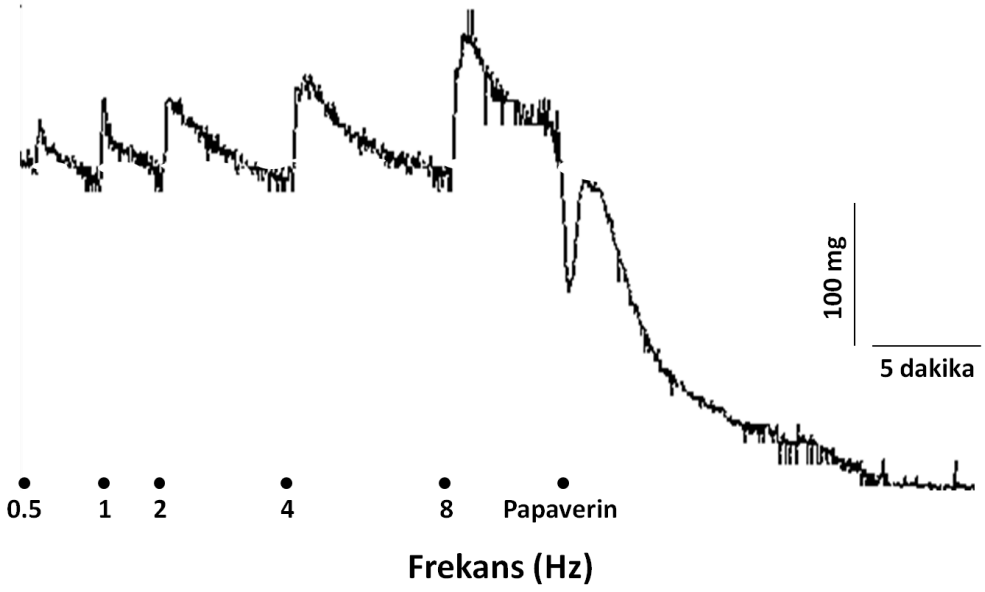
Şekil 4.1.1. Sıçan izole mezenter arter halkalarında EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) ile elde edilen gevşeme yanıtlarına nifedipin (100 nM) ve TEA'nın (1 mM) etkisi. Değerler papaverin (100 µM) gevşemesinin yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (* kontrole göre anlamlı olarak farklıdır, $p<0.05$, n=6).

BK_{Ca} kanal açıcısı NS 1619 (10-100 µM) maksimum % 79.2 ± 5.4 oranında gevşemeye neden oldu. Bu yanıt TEA (1 mM) varlığında anlamlı bir şekilde azalırken, nifedipin ile inkübasyondan etkilenmedi (Şekil 4.1.2.). Bu sonuç EAU'nun neden olduğu gevşemelerin nifedipin tarafından önlenmesinin BK_{Ca} kanal inhibisyonuna bağlı olmadığını göstermiş oldu.

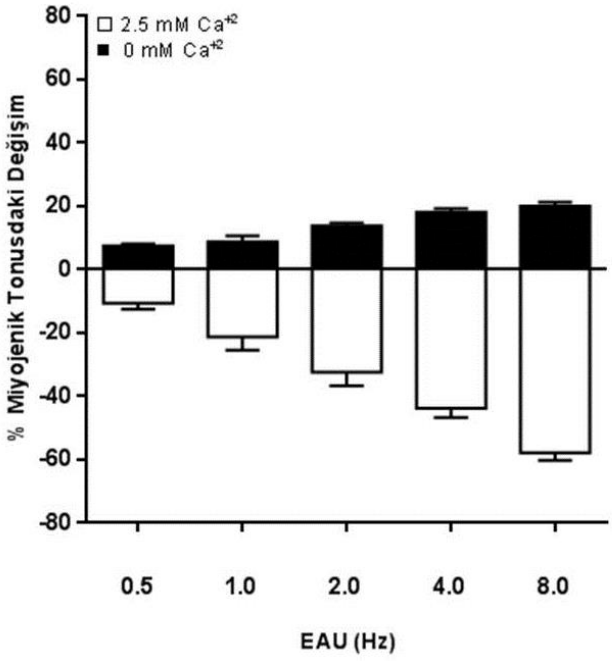


Şekil 4.1.2. Sıçan izole mezenter arter halkalarında NS 1619 ile elde edilen gevşeme yanıtlarına nifedipin (100 nM) ve TEA'nın (1 mM) etkisi. Değerler papaverin (100 µM) gevşemesinin yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (* kontrole göre anlamlı olarak farklıdır, p<0.05, n=6).

EAU-aracılı gevşemelere ekstrasüler kalsiyumun etkisini incelemek amacıyla KH çözeltisindeki kalsiyum konsantrasyonu yarıya düşürüldüğünde (1.25 mM) yanıtlar anlamlı olarak azalırken sıfıra indirildiğinde aynı stimulasyon parametrelerinde frekansa-bağlı kasılma yanıtlarına döndüğü gözlendi (Şekil 4.1.3. ve Şekil 4.1.4.).



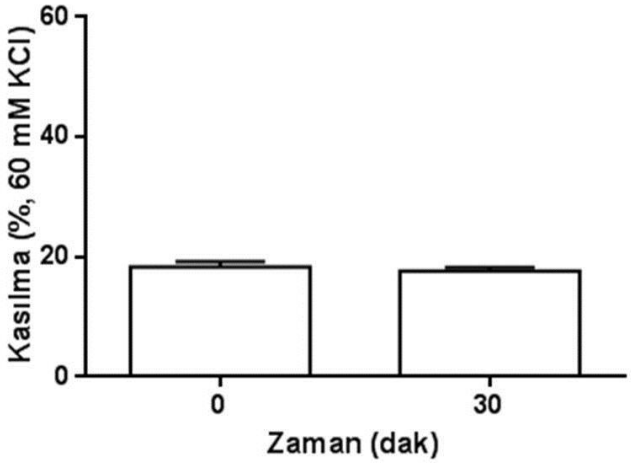
Şekil 4.1.3. Ekstraselüler ortamdaki kalsiyumun tamamen uzaklaştırıldığı mezenter arter halkalarında fenilefrin ön-kasılması sonrası EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) ile elde edilen frekansa bağımlı kasılma yanıtını gösteren orijinal trase.



Şekil 4.1.4. Sıçan izole mezenter arter halkalarında EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 0.5-8 Hz) ile elde edilen gevşeme yanıtlarının ekstraselüler ortamdaki kalsiyumun tamamen uzaklaştırılması sonucu kasılmaya dönmesi (n=6).

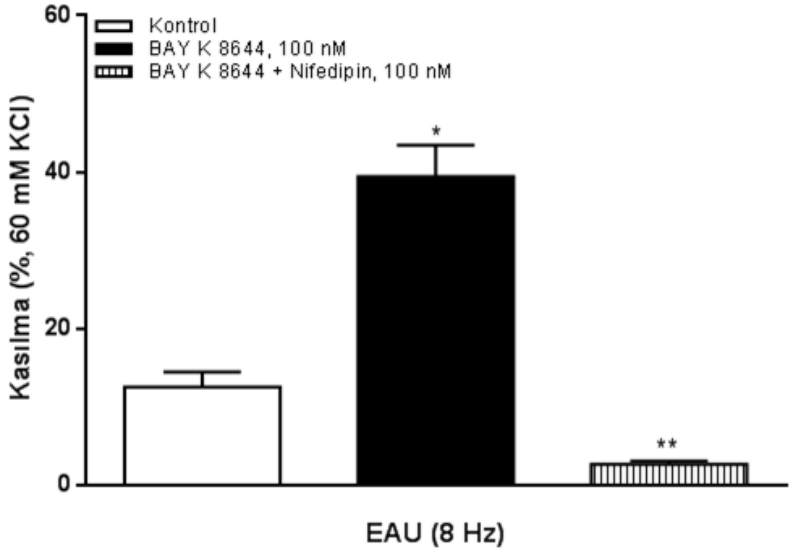
4.2. Kalsiyumsuz Ortamda EAU ile Oluşan Kasılma Yanıtları

EAU (30 V, 0.3 ms, 5 s, 8 Hz)-aracılı kasılmaların hızlı başladığı ve 5-10 dakika içinde pre-kontraksiyon düzeyine döndüğü görüldü. 8 Hz frekansta alınan maksimum yanıt 60 mM KCl kasılmasının % 15.5 ± 3.7'si kadar oldu. 8 Hz'den daha aşağı frekanslardaki kasılmaların boyu küçük olduğundan sadece 8 Hz yanıtları üzerinden değerlendirme yapıldı. Ayrıca, fenilefrin'in intraselüler depolardan kalsiyum salıverme özelliği nedeniyle sonuçlarımızı etkileme olasılığı bulunduğundan deneyler ön-kasılma oluşturulmamış preparatlarda yani bazal tonus üzerinden sürdürüldü. Bazal tonus düzeyinde dokuların 8 Hz uyarıya verdiği yanıtlar, ön-kasılmalı arterlerinkinden anlamlı bir farklılık göstermedi (% 18.3 ± 0.9). Bu koşullar altında 30 dakika ara ile uygulanan EAU'nun tekrarlanabilir kasılmalar oluşturduğu görüldü (% 17.6 ± 0.6) (Şekil 4.2.1.).



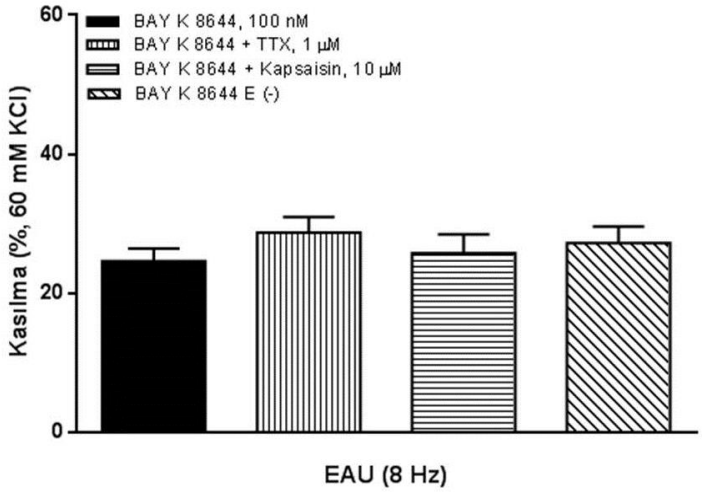
Şekil 4.2.1. Sıçan izole mezenter arter halkalarında kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılma yanıtlarının 30 dakika ara ile tekrarlanması (n=6).

Mezenter arter halkalarının LTKK açıcısı BAY K 8644 (100 nM) ile inkübasyonu EAU-aracılı kasılmaları anlamlı olarak potansiyalize ettiği (% 39.4 ± 4.0) ve bu artmış yanıtın nifedipin (100 nM) varlığında belirgin bir biçimde bloke olduğu gözlendi (Şekil 4.2.2.). BAY K 8644'ün kendisi bazal tonusta herhangi bir değişiklik oluşturmadı. Kasılma boyunu büyütmenin sağladığı ölçüm kolaylığı nedeniyle sonraki deneylerde 8 Hz'lik elektriksel uyarılar BAY K 8644 varlığında uygulandı.



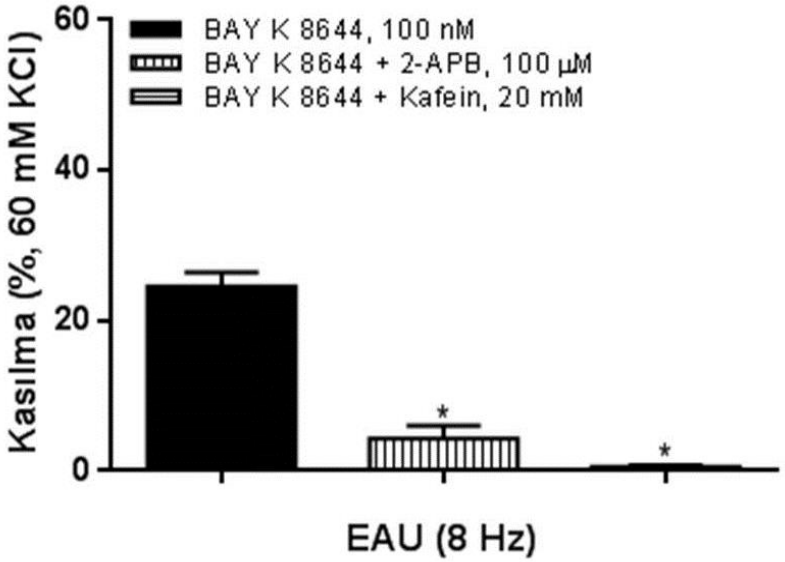
Şekil 4.2.2. Sıçan izole mezenter arter halkalarında ekstraselüler kalsiyum uzaklaştırıldığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına BAY K 8644 (100 nM) ve nifedipin'in (100 nM) etkisi. Değerler KCl (60 mM) kasılmasının yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (* kontrole göre anlamlı olarak farklıdır, ** BAY K 8644'e göre anlamlı olarak farklıdır, p<0.05, n=6).

Kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılma yanıtları endoteli uzaklaştırılmış dokularda değişmedi (Şekil 4.2.3.). Benzer şekilde sodyum kanal blokörü TTX (1 µM) ve duyusal sinir uçlarının boşaltılmasını sağlayan kapsaisin (10 µM) varlığında da yanıtlarda kontrole göre anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.2.3.).



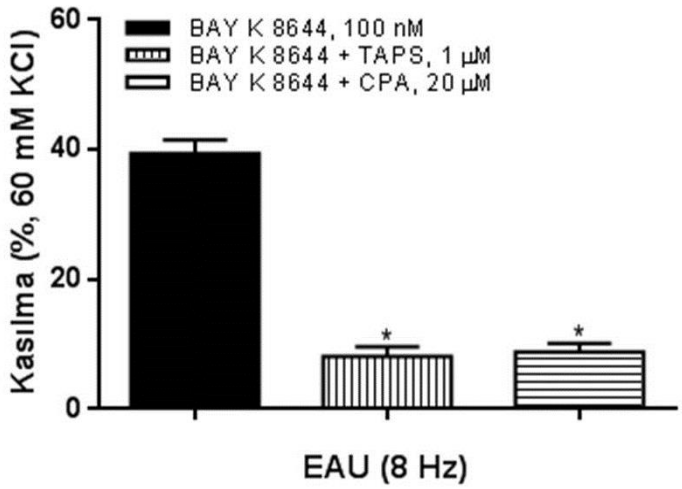
Şekil 4.2.3. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına TTX (1 µM), kapsaisin (10 µM) ve endotelin etkisi. Değerler KCl (60 mM) kasılmasının yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (n=6).

Daha sonra kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılmaların IP_3 reseptör blokörü 2-APB (100 µM) ve ryanodin reseptörleri aracılığıyla SR'yi tüketen kafein (20 mM) ile inkübasyondan nasıl etkilendiği test edildi. 2-APB varlığında yanıt anlamlı olarak azalırken (% 4.32 ± 1.72), kafein inkübasyonu tamamen ortadan kaldırdı (% 0.5 ± 0.2) (Şekil 4.2.4.).



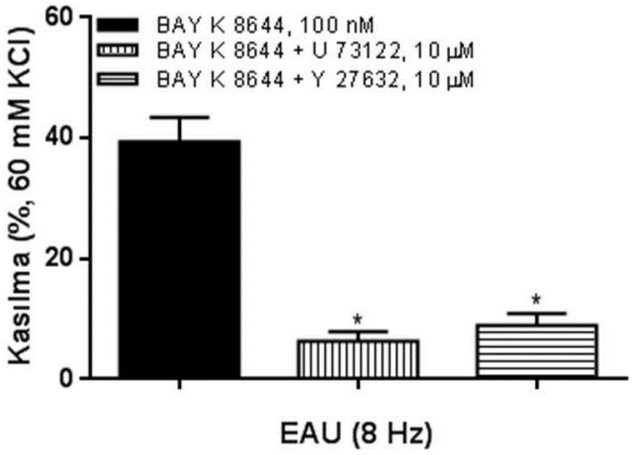
Şekil 4.2.4. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına IP_3 reseptör blokörü 2-APB (100 µM) ve ryanodin reseptör modülatörü kafeinin (20 mM) etkisi. Değerler KCl (60 mM) kasılmasının yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (* BAY K 8644'e göre anlamlı olarak farklıdır, $p<0.05$, n=6).

SR'deki kalsiyum pompasının rolünü incelemek amacıyla mezenter arter halkaları TAPS (1 µM) ve CPA (20 µM) ile inkübe edildi. Her ikisi de anlamlı olarak yanıtları azalttı (TAPS ile % 8.10 ± 1.52, CPA ile % 8.82 ± 1.33, kontrol % 39.41 ± 2.03) (Şekil 4.2.5.).



Şekil 4.2.5. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına SERCA inhibitörleri TAPS (1 µM) ve CPA'nın (20 µM) etkisi. Değerler KCl (60 mM) kasılmasının yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (* BAY K 8644'e göre anlamlı olarak farklıdır, p<0.05, n=6).

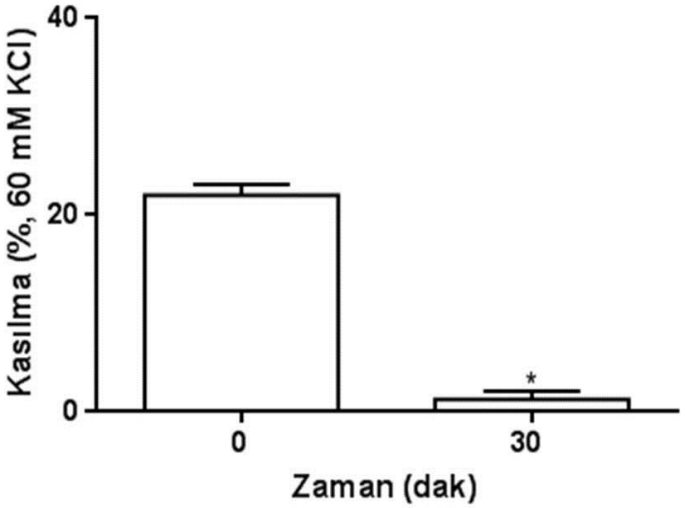
Kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılmalarda IP_3 yolağının rolü olup olmadığını test etmek amacıyla dokular PLC inhibitörü U 73122 (10 µM) ve Rho kinaz inhibitörü Y 27632 (10 µM) ile inkübe edildi. Yanıtların kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulundu (U 73122 için % 6.32 ± 1.58, Y 27632 için % 8.99 ± 1.91) (Şekil 4.2.6.).



Şekil 4.2.6. Sıçan izole mezenter arter halkalarında BAY K 8644 (100 nM) varlığında EAU ile elde edilen kasılma yanıtlarına PLC inhibitörü U 73122 (10 µM) ve Rho kinaz inhibitörü Y 27632'nin (10 µM) etkisi. Değerler KCl (60 mM) kasılmasının yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (* BAY K 8644'e göre anlamlı olarak farklıdır, p<0.05, n=6).

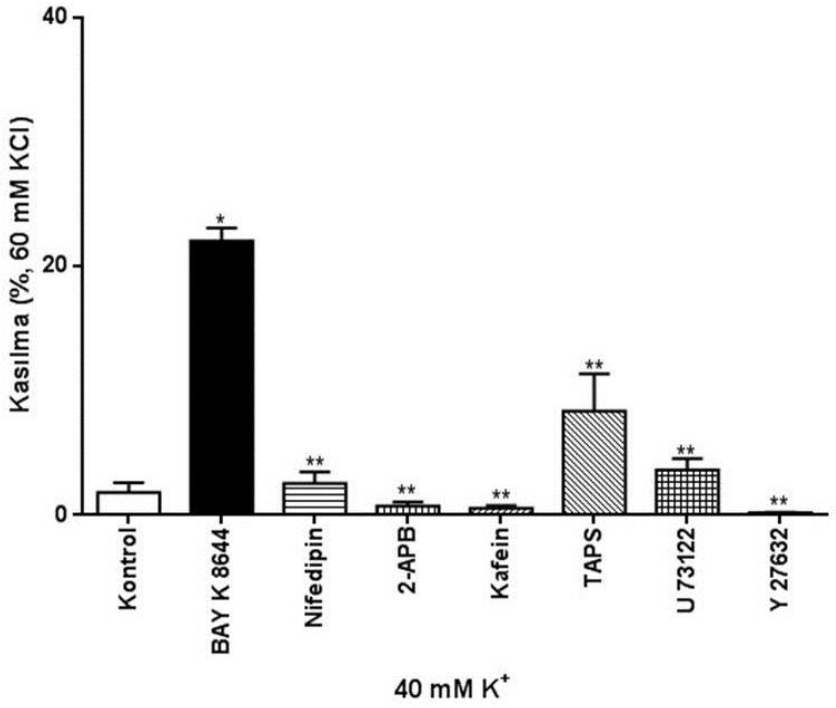
4.3. Kalsiyumsuz Ortamda Yüksek Potasyum ile Oluşan Kasılma Yanıtları

Kalsiyumsuz ortamda elde ettiğimiz EAU-aracılı kasılmaların, düz kas hücre membranının başka bir yöntemle depolarizasyonuna bağlı kasılmalarla benzerliğini/farklılığını ortaya koymak için mezenter arter halkalarının 40 mM potasyuma verdiği yanıtlar incelendi. Oluşan kasılmaların amplitüdü küçük olduğundan (% 1.83 ± 0.77) bunlar da 100 nM BAY K 8644 ile potansiyalize edildi (% 22.01 ± 1.08). Daha sonra 30 dakika ara ile tekrarlandığında kasılmanın belirgin şekilde baskılandığı görüldü (% 1.2 ± 0.8) (Şekil 4.3.1.).



Şekil 4.3.1. Sıçan izole mezenter arter halkalarında kalsiyumsuz ortamda BAY K 8644 (100 nM) varlığında 40 mM potasyum ile elde edilen depolarizasyona bağlı kasılma yanıtlarının 30 dakika ara ile tekrarlanması. Değerler KCl (60 mM) kasılmasının yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (*BAY K 8644'e göre anlamlı olarak farklıdır, $p<0.05$, n=6).

Kalsiyumsuz ortamda BAY K 8644 varlığında 40 mM potasyum ile oluşan kasılma yanıtları nifedipin (100 nM) tarafından bloke edildi. Benzer şekilde 2-APB (100 µM), kafein (20 mM), TAPS (1 µM), U 73122 (10 µM) ve Y 27632 (10 µM) ile inkübe edilen dokularda da kalsiyumsuz ortamda elde edilen 40 mM potasyum-aracılı kasılmalar anlamlı olarak azaldı (Şekil 4.3.2.).



Şekil 4.3.2. Sıçan izole mezenter arter halkalarında kalsiyumsuz ortamda 40 mM potasyum ile elde edilen depolarizasyona bağlı kasılma yanıtlarına BAY K 8644 (100 nM), nifedipin (100 nM), 2-APB (100 µM), kafein (20 µM), TAPS (1 µM), U 73122 (10 µM) ve Y 27632'nin (10 µM) etkisi. Değerler KCl (60 mM) kasılmasının yüzdesi cinsinden ifade edildi ve ortalama ± standart hata olarak verildi (* kontrole göre anlamlı olarak farklıdır, ** BAY K 8644'e göre anlamlı olarak farklıdır, p<0.05, n=6).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz ilk önemli bulgu sıçan mezenter arterinde LTKK'ların blokajı ile hücre içine kalsiyum girişinin kısıtlanmasının EAU ile elde edilen gevşeme yanıtlarını inhibe etmesi olmuştur. Bu sonuç, LTKK'nın inhibisyonunun her zaman vazodilatasyon lehine çalışan bir mekanizma olmayabileceğinin işareti sayılabilir.

Daha önce yaptığımız çalışmada sıçan izole mezenter arterinde EAU-aracılı gevşemenin büyük oranda düz kastaki BK_{Ca} kanallarının aktivasyonuna bağlı olduğunu göstermiştik (1). BK_{Ca} kanallarının aktivasyonu için sitozoldeki kalsiyum konsantrasyonunun artması gerekir. Bu artışı sağlayan, LTKK'dan hücreye giren kalsiyumun bir dizi mekanizmayı tetiklemesi sonucu oluşan kalsiyum sparklarıdır. Normalde çizgili kas ve kalp kasında olduğu gibi damar düz kasında da hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki global bir artış kasılmaya neden olur. Oysa kalsiyum sparkları, BK_{Ca} kanalları aracılığıyla membranı hiperpolarize ederek LTKK'nın kapanmasına ve böylece sitozol genelinde kalsiyum konsantrasyonunun düşmesini sağlayarak gevşemeye neden olur (39). Böylece LTKK aracılığı ile hücre içine giren kalsiyum bir taraftan sitoplazma genelinde kalsiyum artışı yaparak kasılmayı tetiklerken, bir taraftan da -damar tonusunun durumuna bağlı olarak- kalsiyum sparklarının amplitüdünü ve frekansını artırarak hiperpolarizasyonu indükler. Bu olay çalışmamızda EAU-aracılı gevşeme yanıtlarının nifedipin tarafından inhibe edilmesini açıklayabilir. Nifedipin'in bu etkisinin direk olarak BK_{Ca} kanalını bloke etmesine bağlı olma ihtimali yoktur, zira bu kanalların açıcısı NS 1619 ile indüklenen gevşemeler nifedipin'den etkilenmemiştir. Ayrıca kobay kohlear arterinde gösterildiği üzere endotelyal SK_{Ca} ve/veya IK_{Ca} kanallarının nifedipin tarafından bloke edilme olasılığı da bu çalışma için geçerli değildir (44), zira deneylerimiz endoteli harap edilmiş arterlerde yapılmıştır. Buna karşılık verapamil'in de nifedipin gibi inhibisyon yapması LTKK'nın EAU-aracılı gevşemeden sorumlu asıl kanal olduğunu güçlendirmektedir. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız BK_{Ca} aracılı gevşemelerin LTKK blokajı ile önlendiğinin gösterildiği ilk çalışmadır. Bizi destekleyen bir araştırmada sıçan koroner dolaşımında

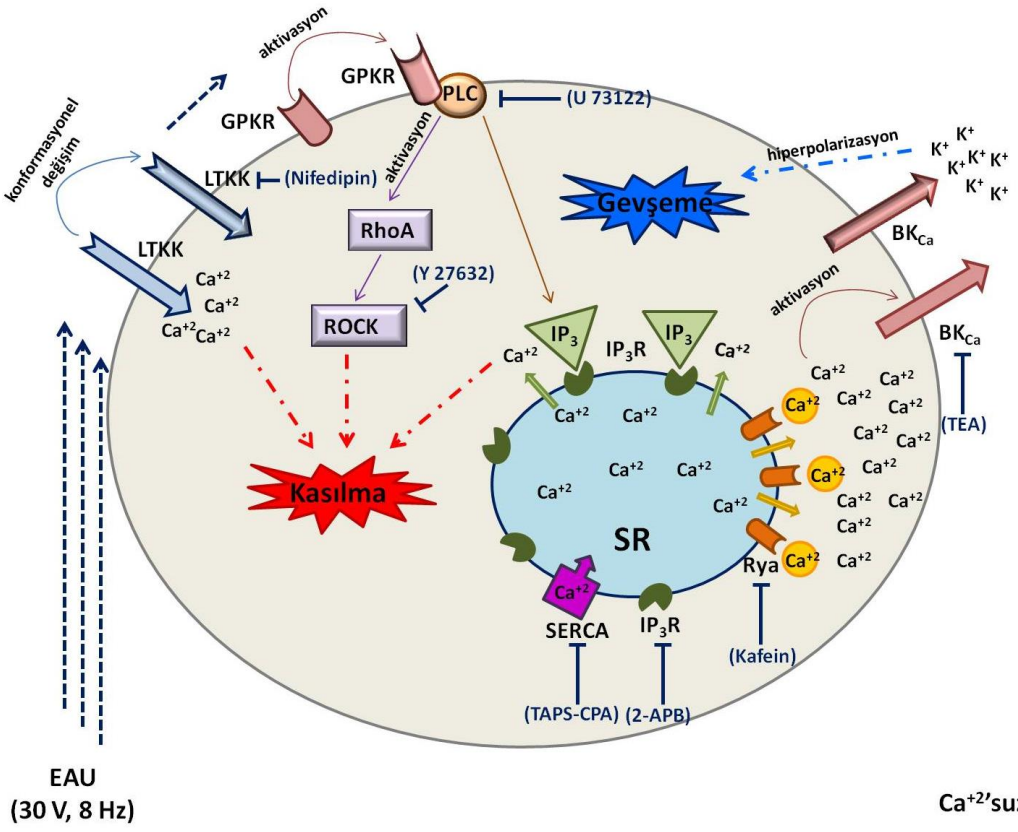
hiperpolarizasyon-aracılı vazodilatasyonun nifedipin ile azaltıldığı bildirilmiştir (45). Bunun herhangi bir patofizyolojik anlamı olup olmadığını henüz bilmiyoruz. Ancak, ilaç etkileşimi açısından önem taşıyabilir. Şöyleki; LTKK blokörleri, birlikte verilmeleri halinde BK_{Ca} kanal açıcılarının etkinliğinde azalmaya neden olabilir.

Diğer taraftan, BAY K 8644 varlığında EAU-aracılı gevşeme yanıtlarının artmaması bizim için beklenmedik bir sonuç olmuştur (data verilmedi). Bunun nedeni EAU'nun membranı depolarize ederek hücre içine kalsiyum girişini sağlaması olabilir, zira BAY K 8644 istirahat membran potansiyelini değiştirmeden LTKK'yı aktive etmektedir (46). Sıçan serebral arterinde yapılan bir çalışmada BAY K 8644'ün spark frekansını yaklaşık iki kat artırdığı gösterilmiş ancak bu artışın gevşeme ile ilişkisine dair herhangi bir kanıt sunulmamıştır (39).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz ikinci önemli bulgu ise banyo ortamından kalsiyumun uzaklaştırılmasının EAU-aracılı gevşemeleri aynı stimülasyon parametrelerinde frekansa bağlı kasılmalara dönüştürmesidir. Bu da bizim için beklenmedik bir bulgu idi çünkü amacımız ekstraselüler kalsiyumu uzaklaştırarak EAU gevşeme yanıtlarında nifedipin'in yaptığı gibi bir inhibisyon oluşturmak ve böylece hücre içine kalsiyum girişi engellendiğinde BK_{Ca} kanal aktivasyonunun bozulduğu savını güçlendirmekti. Kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılmaların sinir aracılı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla ortama nöronal sodyum kanal blokörü TTX eklendiğinde kasılmaların değişmediği görüldü. Bazı C-grubu primer aferent sinir liflerinde TTX'e dirençli sodyum kanallarının bulunması nedeniyle (47) uyguladığımız elektriksel uyarıların TTX'e rağmen duyusal sinirleri aktive etme olasılığı vardır. Bu nedenle çalışmamızda, EAU'nun neden olduğu kasılma yanıtı üzerine kapsaisin'in etkisi de incelendi. Duyusal sinir ucunda vaniloid tip reseptörleri aktive ederek nöropeptit salıverilmesine ve ardından bu sinirlerde desensitizasyona neden olan kapsaisin'in de (48, 49) yanıtları etkilememesi sıçan izole mezenter arter halkalarında kalsiyumsuz ortamda elektriksel uyarıyla elde edilen kasılmaların sinir aracılı olmadığını güçlendirdi. Yanıtlarda endotel kökenli kasıcı ajanların da bir rolünün olmadığı söylenebilir zira endoteli hasarlanmış dokularda kasılmalar değişmedi. Kasılma amplitüdünün düşük olması sebebiyle ortama eklenen LTKK

açıcısı BAY K 8644 yanıtların belirgin şekilde artmasını sağladı. BAY K 8644'ün kendisinin bazal gerimde bir değişiklik yapmaması, buna karşılık EAU ile indüklenen kasılmaları potansiyalize etmesi bu ajanın LTKK'yı membran potansiyelini değiştirmeden açtığını düşündürmektedir. Nitekim, tavşan pulmoner arterinde yapılan bir çalışmada BAY K 8644'ün membran potansiyelini değiştirmeden kanalı aktive ettiği gösterilmiştir (46). Kalsiyumsuz ortamda EAU-aracılı kasılmaların nifedipin ile bloke olması, bu yanıtlarda da LTKK'nın rol oynadığını göstermektedir. Böyle bir etki ilk kez sıçan basiler arter miyositlerinde gösterilmiş, ancak o çalışmada kalsiyumsuz ortamda kasılma bizimkinden farklı olarak yüksek potasyum ile sağlanmıştır (50). Daha sonra bu olay yeni bir eksitasyon-kontraksiyon kenedi olarak yorumlanmış ve "kalsiyum kanalı ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi" diye isimlendirilmiştir (50). Mekanizması kısaca, ekstraselüler kalsiyum yokluğunda LTKK'da meydana gelen voltaja bağlı bir konformasyonel değişim sonucu G-proteininin aktive olması ve IP_3 üretiminin uyarılması şeklinde açıklanmaktadır (51). IP_3'de bilindiği gibi SR membranında bulunan kendi reseptörünü aktive ederek sitoplazmaya kalsiyum salıverilmesine neden olur. Böylece LTKK'lar üzerinden hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artmakta ve kasılma meydana gelmektedir (51). Bu yeni eksitasyon-kontraksiyon kenedinin daha sonra domuz ve insan koroner arter miyositlerinde de varlığı gösterilmiştir (52). Çalışmamızda EAU-aracılı kasılmalarda da bu kenedin rol oynadığına dair güçlü ipuçları vardır. Bunlardan biri BAY K 8644 ile büyüyen kasılmaların nifedipin'le bloke olması, bir diğeri de IP_3 reseptör blokörü 2-APB'nin ve kafein'in yanıtları inhibe etmesidir. Oysa basiler arter miyositlerinde yüksek potasyum aracılı kasılmaların 2-APB varlığında inhibe olduğu, kafein ile değişmediği bildirilmiştir (50). Kafein düşük konsantrasyonda (<5 mM) ryanodin reseptörlerini uyarırken yüksek konsantrasyonda güçlü bir şekilde kalsiyum salıvererek SR'nin tükenmesine neden olur. Bizim deneylerimizde kafein 20 mM, diğer çalışmada ise 5 mM olarak kullanılmıştır. İki yanıt arasındaki farklılığın kullanılan kafein konsantrasyonundan ileri geldiği söylenebilir. Nitekim yüksek potasyum ile yaptığımız deneylerde aynı miktar kafein kasılmayı ortadan kaldırmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar SR'de depolanan kalsiyumun EAU-aracılı kasılmadaki önemini

göstermektedir. Sitoplazmaya salıverilen kalsiyum SR üzerinde bulunan SERCA aracılığı ile geri alınır. TAPS ve CPA bu pompayı LTKK'yı etkilemeden selektif olarak inhibe eden ajanlardır ve bunlarla inkübasyon yanıtlarda anlamlı bir düşüş meydana getirmiştir. EAU-aracılı kasılmaların PLC'nin selektif inhibitörü U 73122 varlığında azalması ise LTKK'ların konformasyonel değişime uğrayarak IP_3 yolağını tetiklediği iddiasını desteklemektedir. Bu iddiayı ortaya atanlar daha sonra RhoA/ROCK yolağının da buna eklemlendiğini ileri sürmüşlerdir (53). Nitekim bizim çalışmamızda da Rho kinaz inhibitörü Y 27632 varlığında yanıtların inhibe olması, EAU-aracılı kasılmaların da aynı yolağı kullandığını kanıtlamaktadır. LTKK aktivasyonu ile başlayan bu yolağın şematize edilmiş şekli aşağıda verilmiştir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Kalsiyumsuz ortamda elde edilen EAU-aracılı kasılmaların hipotetik mekanizmasının şematik gösterimi.

Mezenter arter halkaları kalsiyumsuz ortamda EAU yerine yüksek potasyum ile depolarize edildiğinde, yine BAY K 8644 ile amplifiye olan kasılmalar elde edildi. Bu yanıtlar EAU kasılmalarını azaltan bütün ilaçlar tarafından benzer şekilde inhibe oldu. Bu bulgu, kalsiyumsuz ortamda damar düz kas membranı ne şekilde depolarize edilirse edilsin kasılmaya giden yolağın değişmediğini gösteriyor. Aralarındaki tek fark yüksek potasyum ile elde edilen yanıtların tekrarlanamamasıdır. Hücre içi kalsiyum ölçümü yapma olanağımız bulunmadığından sadece fonksiyonel yanıtlar üzerinden bu farklılığı açıklamak mümkün değildir.

Bu çalışma EAU'nun da yüksek potasyum gibi kalsiyum kanalı ile indüklenen kalsiyum salıverilmesini tetiklediğini gösteren ilk çalışmadır. BAY K 8644, EAU-aracılı yanıtları büyütürken kendisi tek başına kasılma oluşturmamaktadır. Bu durumun BAY K 8644'ün membran potansiyelini etkilemeden direk kalsiyum kanalını açmasından ileri geldiği sanılmaktadır. Öte yandan sıçan basiler arterinde kalsiyumsuz ortamda bir diğer LTKK açıcısı olan FPL-64176'nın kendisinin de kasılmaya neden olduğu bildirilmiştir (52). Bu farklılık FPL-64176'nın kanal içinde bağlandığı yerin BAY K 8644'ün bağlandığı bölgeden ayrı olmasından kaynaklanabilir (54).

Öte yandan reseptöre- ve/veya depoya- bağımlı kalsiyum kanalları gibi voltajdan bağımsız kalsiyum kanallarının da EAU-aracılı kasılmalardan sorumlu olabileceği akla gelebilir. Bunlardan reseptöre-bağımlı kalsiyum kanallarının rolünün olması pek mümkün görülmemektedir zira deneylerimizde bu kanalları aktive edebilecek bir reseptör agonisti kullanılmamıştır. Diğer olasılığa gelince; her ne kadar 2-APB'nin 25 μM'ın üstündeki konsantrasyonlarda depoya-bağımlı kalsiyum kanallarını inhibe etme kapasitesi olsa bile (55, 56) bu kanalların EAU'nun etkisine karışmış olması zordur, zira ekstraselüler kalsiyum yokluğunda fonksiyonlarını devam ettirdiklerine dair literatürde bir kanıt yoktur (56). Ayrıca, deney koşullarımızda nifedipin inkübasyonu sonrasında geride kalan kasılmanın çok az olması da LTKK dışındaki diğer kanalların bu yanıtın oluşmasına önemli bir katkıda bulunmadıklarını desteklemektedir.

Kalsiyum kanalı ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinin fizyolojik/patolojik önemi bilinmemektedir. Hipoksik koşullarda memeli koroner arterinde bu

mekanizma-aracılı kasılmaların azalması, hipokside meydana gelen vazodilatasyona katkıda bulunduğunun iddia edilmesine yol açmıştır (52). Ayrıca LTKK geni silinmiş farelerin aortalarında bu mekanizmanın ortadan kalkması, LTKK'nın intraselüler sinyal yolaklarıyla bağlantılı yeni bir fonksiyonel rolünün olduğuna işaret edebilir (57). Bununla birlikte, kalsiyum kanalı ile indüklenen kalsiyum salıverilmesinin mekanizmasının aydınlatılacağı ve eksitasyon-kasılma kenedi ile ilişkisinin gösterileceği yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Sürtünme stresine (shear stress) veya EAU'ya maruz kalmış hücrelerin benzer reaksiyonlar göstermesi nedeniyle (58, 59), önceki çalışmamızda EAU'nun sürtünme stresinin vasküler reaktivite üzerindeki etkisinin araştırılmasında uygun bir araç olabileceğini ileri sürmüştük (1). Kan akımının pulsatil doğasından kaynaklanan damar duvarının gerilmesi, vasküler düz kaslarda meydana gelen bir diğer mekanik uyarandır. Gerimin hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesine neden olarak sitozoldeki kalsiyum konsantrasyonunu artırdığına dair literatürde kanıtlar vardır (60-62). Ayrıca gerimin, bizim bulgularımıza benzer şekilde, non vasküler düz kaslarda hücre içine kalsiyum girişine gerek duymadan depolardan kalsiyum salıverdirdiği de gösterilmiştir (63). Bu nedenlerle EAU'nun mekanik stresin vasküler miyojenik tonus üzerindeki etkisinin incelenmesinde uygun bir deneysel araç olabileceği dikkate alınmalıdır.

6. SONUÇ ve YORUM

Bu çalışmada ön-kasılma oluşturulmuş sıçan izole mezenter arterlerinde EAU ile elde edilen gevşeme yanıtlarının ortamdan kalsiyum uzaklaştırıldığında kasılmaya dönüştüğü ve her iki yanıtın da LTKK'nın aktive olması ile meydana geldiği bulundu. İlginç olarak, bu kanalları bloke eden nifedipin, verapamil gibi ilaçların, normalde antihipertansif amaçla kullanılmalarına karşın, farklı bir mekanizma ile vazodilatasyon yapan EAU'nun bu etkisini ortadan kaldırdığı görüldü. Bu sonuç, LTKK inhibisyonu ile damarlarda her zaman gevşemeye yönelik bir etkinin oluşmayabileceğinin akılda bulundurulması gerektiğini gösteriyor.

Çalışmamızda, ekstraselüler kalsiyum yokluğunda elde edilen EAU-aracılı kasılmaların "kalsiyum kanalı ile indüklenen kalsiyum salıverilmesi" diye tanımlanan yeni bir eksitasyon-kontraksiyon kenedi yolu ile gerçekleştiğine ilişkin açık kanıtlar vardır. Böylece, ilk kez yüksek potasyum ile depolarize edilmiş damarlarda gösterilmiş olan bu olayın EAU ile de tetiklendiği ortaya konmuştur. Bunun fizyolojik ya da patolojik anlamı henüz bilinmemektedir. Ancak, kalsiyumun damar düz kasının mekanik yanıtlarında oynadığı rolün sanılandan daha karmaşık mekanizmalar ve/veya yolaklar üzerinden yürüdüğüne ilişkin ipuçları taşımaktadır. Ayrıca, eğer EAU'nun sürtünme stresi olayına model olma varsayımı doğru ise, sürtünme stresinin de bu mekanizmayı tetiklediğinin gösterilmesi olayın fizyolojik öneminin anlaşılmasına önemli bir katkı yapabilir. Sonuçta bu çalışma ortamın kalsiyum durumuna bağlı olarak LTKK aktivasyonunun arteryal kasılmaya ya da gevşemeye neden olmasını sağlayarak, bir hücrede aynı ulağın iki zıt fizyolojik fonksiyonu yerine getirebilmesine ilişkin çarpıcı bir örnek oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

1. Ozkan, M.H.,Uma, S. (2009) Does endothelium-derived hyperpolarizing factor play a role in endothelium-dependent component of electrical field stimulation-induced vasorelaxation of rat mesenteric arterial rings? *Journal of cardiovascular pharmacology*, 53 (1), 30-37.
2. Morita, H., Cousins, H., Onoue, H., Ito, Y.,Inoue, R. (1999) Predominant distribution of nifedipine-insensitive, high voltage-activated Ca^{2+} channels in the terminal mesenteric artery of guinea pig. *Circulation research*, 85 (7), 596-605.
3. Triggle, D.J. (1997) Cardiovascular T-type calcium channels: physiological and pharmacological significance. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*, 15 (5), S9-15.
4. Feletou, M., Hoeffner, U.,Vanhoutte, P.M. (1989) Endothelium-dependent relaxing factors do not affect the smooth muscle of portal-mesenteric veins. *Blood vessels*, 26 (1), 21-32.
5. Ito, Y.,Kuriyama, H. (1971) Membrane properties of the smooth-muscle fibres of the guinea-pig portal vein. *The Journal of physiology*, 214 (3), 427-441.
6. Sanders, K.M. (2001) Signal transduction in smooth muscle - Invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of applied physiology*, 91 (3), 1438-1449.
7. Koch, W.J., Ellinor, P.T.,Schwartz, A. (1990) Cdna Cloning of a Dihydropyridine-Sensitive Calcium-Channel from Rat Aorta - Evidence for the Existence of Alternatively Spliced Forms. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (29), 17786-17791.
8. Navedo, M.F., Amberg, G.C., Westenbroek, R.E., Sinnegger-Brauns, M.J., Catterall, W.A., Striessnig, J. ve diğerleri. (2007) Ca(v)1.3 channels produce persistent calcium sparklets, but Ca(v)1.2 channels are responsible for sparklets in mouse arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293 (3), H1359-H1370.

9. Zhang, J., Berra-Romani, R., Sinnegger-Brauns, M.J., Striessnig, J., Blaustein, M.P.,Matteson, D.R. (2007) Role of Ca(v)1.2 L-type $Ca^{(2+)}$ channels in vascular tone: effects of nifedipine and $Mg^{(2+)}$. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292 (1), H415-H425.
10. Reuter, H. (1979) Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annual review of physiology*, 41, 413-424.
11. Reuter, H. (1983) Calcium-Channel Modulation by Neurotransmitters, Enzymes and Drugs. *Nature*, 301 (5901), 569-574.
12. Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R.,Fox, A.P. (1988) Multiple Types of Neuronal Calcium Channels and Their Selective Modulation. *Trends in Neurosciences*, 11 (10), 431-438.
13. Moosmang, S., Schulla, V., Welling, A., Feil, R., Feil, S., Wegener, J.W. ve diğerleri. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *The EMBO journal*, 22 (22), 6027-6034.
14. Huster, M., Frei, E., Hofmann, F.,Wegener, J.W. (2010) A complex of Ca(V)1.2/PKC is involved in muscarinic signaling in smooth muscle. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24 (8), 2651-2659.
15. Wegener, J.W., Schulla, V., Lee, T.S., Koller, A., Feil, S., Feil, R. ve diğerleri. (2004) An essential role of Cav1.2 L-type calcium channel for urinary bladder function. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18 (10), 1159-1161.
16. Bolton, T.B. (1979) Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiological reviews*, 59 (3), 606-718.
17. Van Breemen, C., Aaronson, P.,Loutzenhiser, R. (1978) Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. *Pharmacological reviews*, 30 (2), 167-208.
18. Putney, J.W., Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7 (1), 1-12.

19. Guibert, C., Ducret, T.,Savineau, J.P. (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Progress in biophysics and molecular biology*, 98 (1), 10-23.
20. Gonzalez De La Fuente, P., Savineau, J.P.,Marthan, R. (1995) Control of pulmonary vascular smooth muscle tone by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump blockers: thapsigargin and cyclopiazonic acid. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 429 (5), 617-624.
21. McFadzean, I.,Gibson, A. (2002) The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 135 (1), 1-13.
22. Kuriyama, H., Kitamura, K.,Nabata, H. (1995) Pharmacological and Physiological Significance of Ion Channels and Factors That Modulate Them in Vascular Tissues. *Pharmacological reviews*, 47 (3), 387-573.
23. Boittin, F.X., Dipp, M., Kinnear, N.P., Galione, A.,Evans, A.M. (2003) Vasodilation by the calcium-mobilizing messenger cyclic ADP-ribose. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (11), 9602-9608.
24. Jaggar, J.H., Porter, V.A., Lederer, W.J.,Nelson, M.T. (2000) Calcium sparks in smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 278 (2), C235-C256.
25. Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M.,Weston, A.H. (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23 (8), 374-380.
26. Busse, R., Fichtner, H., Luckhoff, A.,Kohlhardt, M. (1988) Hyperpolarization and Increased Free Calcium in Acetylcholine-Stimulated Endothelial-Cells. *American Journal of Physiology*, 255 (4), H965-H969.
27. Wang, X., Lau, F., Li, L., Yoshikawa, A.,van Breemen, C. (1995) Acetylcholine-sensitive intracellular Ca^{2+} store in fresh endothelial cells and evidence for ryanodine receptors. *Circulation research*, 77 (1), 37-42.
28. Cioffi, D.L., Wu, S.,Stevens, T. (2003) On the endothelial cell I(SOC). *Cell Calcium*, 33 (5-6), 323-336.

29. Plant, T.D.,Schaefer, M. (2003) TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca^{2+}-permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*, 33 (5-6), 441-450.
30. Marchenko, S.M.,Sage, S.O. (1993) Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in intact rat aorta. *The Journal of physiology*, 462, 735-751.
31. Sakai, T. (1990) Acetylcholine induces Ca-dependent K currents in rabbit endothelial cells. *Japanese journal of pharmacology*, 53 (2), 235-246.
32. Nelson, M.T.,Quayle, J.M. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology*, 268 (4 Pt 1), C799-822.
33. Feletou, M. (2009) Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*, 156 (4), 545-562.
34. Fanger, C.M., Ghanshani, S., Logsdon, N.J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J. ve diğerleri. (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance K_{Ca} channel, IK_{Ca1}. *The Journal of biological chemistry*, 274 (9), 5746-5754.
35. Quignard, J.F., Chataigneau, T., Corriu, C., Edwards, G., Weston, A., Feletou, M. ve diğerleri. (2002) Endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in carotid artery of guinea pig: role of lipoxygenase. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 40 (3), 467-477.
36. Quignard, J.F., Feletou, M., Edwards, G., Duhault, J., Weston, A.H.,Vanhoutte, P.M. (2000) Role of endothelial cell hyperpolarization in EDHF-mediated responses in the guinea-pig carotid artery. *British Journal of Pharmacology*, 129 (6), 1103-1112.
37. Ledoux, J., Werner, M.E., Brayden, J.E.,Nelson, M.T. (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*, 21, 69-78.
38. Bychkov, R., Gollasch, M., Ried, C., Luft, F.C.,Haller, H. (1997) Regulation of spontaneous transient outward potassium currents in human coronary arteries. *Circulation*, 95 (2), 503-510.

39. Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J. ve diğerleri. (1995) Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*, 270 (5236), 633-637.
40. Perez, G.J., Bonev, A.D., Patlak, J.B.,Nelson, M.T. (1999) Functional coupling of ryanodine receptors to K_{Ca} channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *The Journal of general physiology*, 113 (2), 229-238.
41. Wu, R.S.,Marx, S.O. (2010) The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: alpha- and beta-subunits. *Kidney international*, 78 (10), 963-974.
42. Borbouse, L., Dick, G.M., Asano, S., Bender, S.B., Dincer, U.D., Payne, G.A. ve diğerleri. (2009) Impaired function of coronary BK_{Ca} channels in metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297 (5), H1629-H1637.
43. Xu, H., Garver, H., Galligan, J.J.,Fink, G.D. (2010) Large Conductance Ca^{2+}-Activated K^{+}Channel (a)over-cap1-Subunit Knockout Mice are not Hypertensive. *Hypertension*, 56 (5), E125-E126.
44. Jiang, Z.G., Shi, X.R., Guan, B.C., Zhao, H.,Yang, Y.Q. (2007) Dihydropyridines inhibit acetylcholine-induced hyperpolarization in cochlear artery via blockade of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320 (2), 544-551.
45. Fulton, D., McGiff, J.C.,Quilley, J. (1994) Role of K^{+} channels in the vasodilator response to bradykinin in the rat heart. *British Journal of Pharmacology*, 113 (3), 954-958.
46. Ousterhout, J.M.,Sperelakis, N. (1987) Effect of Bay K-8644 on Tetraethylammonium-Induced Excitability of the Rabbit Pulmonary-Artery. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 65 (5), 828-833.
47. Akopian, A.N., Sivilotti, L.,Wood, J.N. (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, 379 (6562), 257-262.

48. Kaufman, M.P., Iwamoto, G.A., Longhurst, J.C.,Mitchell, J.H. (1982) Effects of capsaicin and bradykinin on afferent fibers with ending in skeletal muscle. *Circulation research*, 50 (1), 133-139.
49. Holzer, P. (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological reviews*, 43 (2), 143-201.
50. del Valle-Rodriguez, A., Lopez-Barneo, J.,Urena, J. (2003) Ca^{2+} channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca^{2+} influx. *The EMBO journal*, 22 (17), 4337-4345.
51. Urena, J., del Valle-Rodriguez, A.,Lopez-Barneo, J. (2007) Metabotropic Ca^{2+} channel-induced calcium release in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*, 42 (4-5), 513-520.
52. Calderon-Sanchez, E., Fernandez-Tenorio, M., Ordonez, A., Lopez-Barneo, J.,Urena, J. (2009) Hypoxia inhibits vasoconstriction induced by metabotropic Ca^{2+} channel-induced Ca^{2+} release in mammalian coronary arteries. *Cardiovascular research*, 82 (1), 115-124.
53. Fernandez-Tenorio, M., Porras-Gonzalez, C., Castellano, A., Del Valle-Rodriguez, A., Lopez-Barneo, J.,Urena, J. (2011) Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca^{2+} channels: new mechanism for depolarization-evoked mammalian arterial contraction. *Circulation research*, 108 (11), 1348-1357.
54. Rampe, D.,Lacerda, A.E. (1991) A New Site for the Activation of Cardiac Calcium Channels Defined by the Nondihydropyridine Fpl-64176. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259 (3), 982-987.
55. Bootman, M.D., Collins, T.J., Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J.,Peppiatt, C.M. (2002) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of $InsP_3$-induced Ca^{2+} release. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16 (10), 1145-1150.
56. Putney, J.W. (2010) Pharmacology of store-operated calcium channels. *Molecular interventions*, 10 (4), 209-218.

57. Fernandez-Tenorio, M., Gonzalez-Rodriguez, P., Porras, C., Castellano, A., Moosmang, S., Hofmann, F. ve diğerleri. (2010) Short communication: genetic ablation of L-type Ca^{2+} channels abolishes depolarization-induced Ca^{2+} release in arterial smooth muscle. *Circulation research*, 106 (7), 1285-1289.
58. Zhao, M., Bai, H., Wang, E., Forrester, J.V.,McCaig, C.D. (2004) Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *Journal of cell science*, 117 (Pt 3), 397-405.
59. Tzima, E., del Pozo, M.A., Shattil, S.J., Chien, S.,Schwartz, M.A. (2001) Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *The EMBO journal*, 20 (17), 4639-4647.
60. Davis, M.J., Donovitz, J.A.,Hood, J.D. (1992) Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *The American journal of physiology*, 262 (4 Pt 1), C1083-1088.
61. Mohanty, M.J.,Li, X. (2002) Stretch-induced $Ca^{(2+)}$ release via an IP(3)-insensitive $Ca^{(2+)}$ channel. *American journal of physiology. Cell physiology*, 283 (2), C456-462.
62. Nakayama, K.,Tanaka, Y. (1993) Stretch-induced contraction and Ca^{2+} mobilization in vascular smooth muscle. *Biological signals*, 2 (5), 241-252.
63. Ji, G., Barsotti, R.J., Feldman, M.E.,Kotlikoff, M.I. (2002) Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *The Journal of general physiology*, 119 (6), 533-544.

EK-1

TEZ ÇALIŞMASI İLE İLGİLİ BİLDİRİLER ve YAYINLAR

Bildiriler:

Ozkan MH, **Ozturk EI**, Uma S. Electrical field stimulation mediates Ca^{2+} release from intracellular stores via activation of l-type Ca^{2+} channels in the absence of extracellular Ca^{2+}. Joint meeting of the British Microcirculation Society and The Microcirculatory Society, 4^{th}-6^{th} July, 2012 Oxford, UK.

Ozturk EI, Ozkan MH, Uma S. Sıçan mezenter arterinde kalsiyumsuz ortamda elektriksel alan uyarısı ile elde edilen kasılmalar Ca^{+2} kanal-aracılı Ca^{+2} salıverilmesine bağlıdır; portal hipertansif sıçanlarda bu kasılmalar azalır. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 19-22 Ekim 2011 Eskişehir**,** Türkiye.

Yayınlar:

Ozkan MH, **Ozturk EI**, Uma S. Electrical field stimulation (EFS)-induced relaxations turn into contractions upon removal of extracellular calcium in rat mesenteric artery. Pharmacological Research, 2013 April, 70(1):60-65.

EK-2

TEZ ÇALIŞMASI İLE İLGİLİ ETİK KURUL İZİNLERİ

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 51

24 Mayıs 2010

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	:	14.05.2010 (CUMA)
TOPLANTI SAYISI	:	2010/5
DOSYA KAYIT NUMARASI	:	2010/28
KARAR NUMARASI	:	2010/28-3
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	:	Prof. Dr. Serdar Uma
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	:	Dr. Melike Hacer Özkan Akyüz
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:	Uzm. Ecz. E. İnci Öztürk, Tekn. Erdoğan Aksay
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	:	30 adet Sprague-Dawley sıçan
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	:	12 ay

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi FarmakolojiAnabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Serdar Uma'nın yürütücüsü olduğu 2010/28 dosya numaralı ve ***"Sıçan Mezenter Arterinde Kalsiyumsuz Ortamda Elektriksel Alan Uyarısı (EAU) ile Elde Edilen Kasılmaların Mekanizmasının İncelenmesi"*** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0640
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

21 Temmuz 2011

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 62

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	:	05.07.2011 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	:	2011/4
DOSYA KAYIT NUMARASI	:	2011/39
KARAR NUMARASI	:	2011/39-9
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	:	Prof. Dr. Serdar Uma
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	:	Dr. Melike Hacer Özkan, Uzm. Ecz. Elif İnci Öztürk
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:	Erdoğan Aksay, Mehmet Zorlu
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	:	24 adet Sprague Dawley sıçan
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	:	6 ay

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Serdar Uma'nın yürütücüsü olduğu 2011/39 dosya numaralı ve ***"Kısmi Portal Ven Ligasyonu ile Portal Hipertansiyon Oluşturulmuş Sıçanların İzole Süperior Mezenter Arter Halkalarında Elektriksel Alan Uyarısı (EAU) ile Elde Edilen Gevşemelerin ve Kalsiyumsuz Ortamdaki Kasılmaların İncelenmesi İçin Pilot Çalışma"*** isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı