



Kaselerin İskemik ve Non-iskemik Sıçan Kalp

Kaselerinde İncelenmesi

PROJE NO: EÜBAP n TSA-10-3264

Proje Yöneticisi: Prof. Dr. Nurcan Dursun

Araştırmacılar: Prof. Dr. Cem Süer

Haziran 2011

KAYSERİ



ONAY

Bu projenin kabulü Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun 08.05.2019 tarih ve 100/2019 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / 08 / 2019 .

EÜBAP Komisyonu Başkanı

Mühür ve imza



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Özet	4
Abstract	4
Kısaltmalar ve Simgeler	5
Tablo ve Ekil Listesi	6
Giriş	7
Genel Bilgiler	8
Miyokard iskemisinde kalp hücresinde olu an de iliklikler	8
ATP-duyar l Potasyum Kanallar	10
Patch-Clamp genel bilgi	12
Yöntem ve Gereçler	13
Ventriküler kardiyomiyositlerin izolasyonu	14
Patch-Clamp Recordings (uygun de il??)	14
Veri analizi	15
Bulgular	16
Miyosit kapasitans e (C_m).	16
iskemik ve kontrol kalplerinden elde edilen kardiyomiyositlerde farklı voltaj kalıplarına karşı olarak whole-cell yaklaşımla elde edilmi örnek hücre K iyon akımlar	16
Tartışma	24
Kaynaklar	28

Özet

Amaç: Sunulan çalışmada iskekiye baklı olarak hasar görmü ve görmemi seçan kalplerinden izole edilen kalp kas hücrelerinin ATP-duyarlı potasyum(K) kanal akınlarını karılaştırmak amaçlanmıştır. Böylece iskekiye baklı olarak oluşan metabolik değilikliklerin, kalp kas hücrelerinde oluşturacağı elektrokimyasal dengesizlikte ATP-duyarlı potasyum kanal (K_{ATP}) proteinlerinin rolü araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada 10 adet 200-250 g ağırlığında Wistar Cinsi erkek seçan kullanıldı. Miyokard iskemisi, deney grubu olarak seçilen bel seçana sol inen koroner arter dalı 5 dk süreyle bası uygulanarak gerçekleştirildi. Hemen sonra hızlı kalp çıkartıldı ve Langendorff apereyine yerleştirilerek kardiyomiyositler izole edildi. ATP- duyarlı Potasyum akınları hipoksiye maruz kalmı ve kalmamı hücrelerden değilik voltaj protokolleri kullanarak whole-cell yöntemi ile kayı edildi. Kayı lar bir patch-clamp yükselteci, uygun yazılım ve analiz sistemi kullanılarak alındı. Kaydedilen iyon akınının glibenklamid ile ortadan kaldırılması ile bu akının ATP-duyarlı potasyum akını olduğu doğrulandı. Na kanal aktivitesi membran voltajı ile inhibe edildi. Akın sinyalleri pClamp yazılımı ile (Axon Ins) yükseltildi (20 - 200 mV/pA), 1kHz düşük banda filtrelendi ve 5 kHzde rakamsallaştırıldı. Veriler pClamp yazılımı ile analiz edildi.

Bulgular: İskemik (n=5 hücre) ve non iskemik (n=5 hücre) kalplerden izole edilen miyositlerin hücre kapasitansları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Değilik voltaj protokolları kullanarak kaydedilen ATP duyarlı K kanal akınlarının istatistiksel analizi grup içi (membran potansiyeli) ve gruplar arasında anlamlı bir etki ortaya koydu.

Sonuç: Sonuçlarımız iskemik hücrelerde I_{Ktot} akınlarının kontrol hücrelerine göre farklı olmadı. İK_{ATP} akınlarının anlamlı derecede artışı göstermektedir.

Abstract

Purpose: It was aimed to compare ATP sensitive K currents in ischemic and nonischemic cardiomyocytes which are isolated from rats' heart. Therefore role of ATP sensitive K channels (K_{ATP}) in electrochemical imbalance during ischemia was investigated.

Materials and Methods: Male Wistar rats (8-10 weeks old, weight 200-250 g) were obtained from Erciyes University Clinical and Experimental Research Center, Kayseri, Turkey. All animal experiments were performed in accordance with the Guide *Animal Care* Committee of Erciyes University. The rats were anaesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg). After anaesthesia, the left coronary descending artery (LAD) was ligated to create a rat MI model in five rats. Ischemia procedure was not applied to control rats. Five minutes after ligation, the rat heart was excised and retrogradely perfused on a Langendorff apparatus and ventricular myocytes isolated. ATP sensitive potassium currents were recorded from ischemic and non-ischemic cells using whole-cell method. Sodium channel activity was blocked by depolarisation of the cell membrane. Recording currents were amplified (20 - 200 mV/pA) by patch-clamp amplifier, filtered in 1kHz low-pass, digitalized at 5kHz and stored for offline analysis. Analysis was performed using pClamp software.

Results: There was no significant difference between ischemic (n=5) and non ischemic (n=5) cell when cell capacitance was compared. Statistical analysis of currents intensities via ATP sensitive K channels resulted in significant main effects within group (voltage) and between groups (ischemic v.s. nonischemic cell).

Conclusion: Our results showed that I_{Ktot} currents in ischemic cells were not differ from nonischemic cells however I_{KATP} currents were significantly increased.

ATP: Adenozin 3'-trifosfat

ADP: Adenozin difosfat

AMP: Adenozin monoifosfat

K_{ATP} : ATP-duyarlı potasyum kanalları

CGRP; Calcitonin gene related peptide

NADH₂; nicotinamide - adenine dinukleotid (redükte)

NAD; nicotinamide - adenine dinukleotid

Na: Sodyum

Ca: Kalsiyum

K: Potasyum

Mg: Magnezyum

Tablo ve Ėekil Listesi

Ėekil 1. -70 mV'dan bağlayıp 10 mV'duk adėnlarla oluğan voltaj değerlerinde 200 ms sėreyle kėskaėlanmasė sėrasėnda kayėlanan K iyon akėnlarė A: kontrol ve B: iskemik kalpten izole edilen miyositlerden elde edilmiğtir.	18
Ėekil 2. Biri iskemik, diğeri kontrol kalbinden izole edilen iki miyositten elde edilen voltaj-akėn grafikleri.	18
Ėekil 3. Na akėnlarėnėn inaktive edildiği voltaj protokolėnde, membranėn -100 mV'dan bağlayarak 10 mV'duk adėnlarla depolarizasyonuna karėė oluğan Katp akėnlarė Bu akėnlar glibenklamid uygulamasė ile ortadan kaldėrėlmėėtė. Kontrol hėcre (ėstte) ve iskemik hėcre (altta).....	20,20
Ėekil 4. K iyon akėnlarėnėn inaktivasyon protokolė.....	21
Ėekil 5. Katp iyon akėnlarėnėn inaktivasyon protokolė.	23

Giriş

ATP-duyarlı potasyum kanalları ilk kez Noma tarafından tanımlanmıştır (1). Bu çalışmada Noma özel K^+ kanallarının hücre içi ATP derişimi 1mM'dan daha çok olduğunda bloklandıklarını ve dışa yönelen iletkenliğin, ATP-duyarlı olmayan içe-dokrultmalı potasyum kanallarından çok daha büyük olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu kanalların AMP'ye duyarlı olmadıklarını ve ADP'ye ATP'den daha az duyarlı olduğunu da bildirmiştir. Daha sonra pek çok araştırmacı başka hücre türlerinde de benzer kanalların bulunduğunu bildirmişlerdir (2, 3).

K_{ATP} kanalları karakteristik olarak hücre içi ATP derişiminin azalması veya ADP düzeylerinin yükselmesi ile; hücre içi ADP/ATP oranının değılmesi sonucu aktive olurlar (4). Bu kanallar, adlarından da anlaşılacağı gibi hücre içi ATP konsantrasyonu arttıkça kapanırlar (5). Hücre içi ATP düzeyinin azaldıkça zaman, açdan potasyum kanallarından hücre dışına potasyum çıkar ve membranın hiperpolarizasyonuna neden olur (6). Bu nedenle bu kanallar hücre metabolizması ile membran uyardabilirliği arasında bağlantıyı sağlayan ve metabolizmadaki değıliklikleri, membran potansiyeline dolayısıyla hücrenin elektriksel aktivitesine illevsel olarak bağlayan proteinlerdir (7).

K_{ATP} kanalları pankreas beta hücrelerinden insulin salınmadan damar tonusunun kontrolüne kadar, pek çok fizyolojik süreci etkiler. Bu kanallar pankreatik hücrelerden glukoz ile uyardan insulin salınması için gereklidir; hipoglisemiye bağlı olarak pankreatik alfa hücrelerinden glukagon salınmasının inhibisyonuna katkı sağlarlar ve iskelet kasına glukoz alınması karaciğerden glukoz salınması ve beslenme davranışının belirlenmesiyle

CGRP veya adenozin gibi bazı agonistlerin K_{ATP} kanallar n  aktive ederek hiperpolarizasyona ve gev emeye neden olduğu; K_{ATP} kanal a   dar n n da benzer cevaba neden olduğu g sterilmi tir. Norepinefrin, serotonin ve nöropeptid Y gibi nörotransmitterler ve anjiyotensin II ve endotelini 1 gibi vazokonstriktör ajanların ise **KATP kanal n ** inhibe ederek depolarizasyon ve kas lmaya neden olduğu g sterilmi tir (9).

Yapılan  al  malar, K_{ATP} kanallar n n iskemi/reperfüzyon zedelenmesine kar   koruyucu rolü olabileceğini göstermektedir (10). Bu koruyucu etkinin K_{ATP} kanal proteininin sitozolik havuzundan membran havuzuna transloke olması ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar vardır (11). Buna rağmen, hücre membranında yer alan KATP kanal aktivitesinin iskemiye bağlı olarak de il p de il medi i, hakkında yeteri kadar  al  ma yoktur. Sunulan çalışmada iskemiye bağlı olarak hasar görümlü ve g r mem i s  an kalplerinden izole edilecek kalp kas  hücrelerinin ATP-duyarlı Potasyum kanal ak nlar n  kar  alt rmak ve iskemiye bağlı olarak olu an metabolik de il liklerin, kalp kas hücrelerinde olu turaca   elektrokimyasal dengesizlikte ATP-duyarlıpotasyum kanal proteinlerinin rolünü incelemektir.

Genel Bilgiler

Miyokard iskemisinde kalp hücresinde olu an de il likler

Miyokardiyal iskemi, arteriyal kan ak n  miyokard n  illevini idame ettirmesi için gerekenin altına d  t   nde ortaya çıkar.  skemi baskın enerji kaynağı olarak

rsiz kan akımından dolayı oluşan hipoksiyi ifade eder. Aynı zamanda yüksek ürünleri dokudan uzaklaştıramaz.

Miyokardiyal hücrede ATP üretimi için üç önemli yol vardır: (1) Sitozolde glukozun piruvata glikolitik yolla ile ATP üretimi, (2) GTP yolu ile sitrat siklusunda mitokondriyal ATP üretimi ve (3) Sitokromlar, ATPaz ve ATP/ADP translokaz yolu ile mitokondriyal iç membranda ATP üretimi (12).

Reperfüzyon dokuya olan kan akımını yeniden sağlandığı süreci tanımlar. İskemik zedelenme bir oklüzyon döneminden sonra arteriyal kan akımının illemin düzelmesi ile beraber olup olmadığına bakılarak değerlendirilir. Örneğin 15 dk süreyle iskemiye maruz bırakılan papiller kas hücreleri geri gönlümlü bir biçimde zedelenirler ve 2 dk süreyle yeniden kanlanmayla takiben illevlerin performansı aynı hayvanın noniskemik sol ventrikül miyokardından yapısal ve kimyasal tekniklerle ayırt edilemez. Ancak iskemik periyodun uzaması ile doku hücrelerinde geri dönüşümsüz değişiklikler olmaya başlar. Geri-dönüşümsüz olarak hasarlanmış bir hücre normal fizyolojik ortam yeniden sağlansa bile yaşamını sürdüremez. Örneğin bu tür hücreler belirgin hücresel ölüm gösterirler, çoğu parçalanmaya yakındır ve bu tür kardiyomiyositler amorf mitokondrial matriks cisimcikleri içerirler. Uzun süreli iskemiye bakılarak kardiyomiyositlerin plazma membranları zedelenir, katabolitlerin artmasına bakılarak intrasellüler ozmolarite artar; intrasellüler Na, Cl ve Ca içeriği yükselir. Uzun süreli miyokardiyal iskemi hücresel glikojenin ve ATP kaynaklarının tükenmesine de neden olur. Metabolik aktiviteleri idame ettirebilmek için kardiyak ATP üretim yolu değişir. Kardiyomiyositler normal koşullarda metabolik ihtiyaçlarını aerobik yollardan

çok anaerobik kaynaklar kullanılır. Bunun bir sonucu olarak sitrat döngüsü ve glikolitik yollar, ayrıca yüksek NADH_2/NAD oranı tarafından inhibe olan gliseraldehid fosfat dehidrogenaz enzimi nedeni ile inhibe edilir. Anaerobik metabolizmalar aerobik metabolizmaya göre daha az ATP ürettiği için, bu üretimin karşılayacağı illevisel düzelme süresi sınırlı olur (13).

ATP-duyarlı Potasyum Kanalları

K_{ATP} kanalları 1983 yılında Noma (1) domuz ventrikül miyositlerinden hazırlanan membran yamalarında tarafından bulunmuştur. Bu kanallar düşük mikromolar konsantrasyonlardaki ATP tarafından inhibe edilirler ve ATP seviyesi düşüncü açılır (4). Bu kanalların miyokardiyal metabolizmaya membran elektriksel aktivitesine kenetledikleri ve açmaları halinde (düşük ATP) içsel bir kalp-koruyucu mekanizma oluşturdıkları ileri sürülmüştür (1, 4). K_{ATP} kanalları iskemi-reperfüzyon hasarında anahtar bir rol oynarlar (14). Glibenklamid ve Na 5-hidroksidekonat gibi K_{ATP} kanal antagonistleri iskemik hasarı artırırken ve K_{ATP} kanal açıcı aprikalimin iskemik hasarı azaltır (15).

İki ayrı K_{ATP} popülasyonu vardır: Mitokondrial membranın iç yüzünde olanlar ve sarkolemma üzerinde olanlar. Her ne kadar sarkolemmal K_{ATP} kanallarının açılmasının aksiyon potansiyelini kısaltıp kontraktileti baskılayarak miyokardı koruduğunu göstermiş olsa da (16) BMS-180448 (17) ve cromakalim (18), adli iki K_{ATP} kanal açıcı aksiyon potansiyel süresini kıltirmeden miyokardı korudu. Ayrıca K_{ATP} kanal açıcılar ve miyokardiyal koruma uyarılma özelliği olmayan kardiyomiyositlerde

K_{ATP} kanal açılması ile oluşan korumada aksiyon potansiyelinde ksalmanın bir etmen olamayacağını dölündürmektedir.

Yeni bulgular korumada sarkolemmal değil mitokondrial K_{ATP} kanallarının rolü olduğunu dölündürmektedir. Diazoksit selektif bir mitokondriyal kanal açıcıdır ve miyokardiyal koruma yapar (20). Diazoksit ile indüklenen koruma, sarkolemmal K_{ATP} kanallarının illevsel durumundan bağımsızdır (21) ve mitokondrial K_{ATP} kanal blokerleri koruyucu etkiyi ortadan kaldırır (22).

Bir diğer selektif sarkolemmal Katp kanal blokeri HMR1883'ün diazoksitin yaptığı miyokardiyal korumayı ortadan kaldırmaması da mitokondriyal Katp kanallarının rolü olduğuna dair düşünceleri desteklemiştir (23). Ancak mitokondrial Katp kanallarının açılmasının membran deP, matrix ılıması, ATP sentezinde yavaşlama ve hızlanma solunuma yol açması nedeni ile, bu kanalların açılmasının nasıl olup da koruyucu etki yaptığı açık değildir.

Her ne kadar mitokondrial Katp kanalları miyokardiyal koruma yoluındaki sinyalleme kaskadı ile ilgilidirler ve son bulgular bir tetikleyici olduklarını dölündürmektedir (24).

Pain ve arkadaşları (25) izole tavılan kalbini 5 dk süreyle diazoksit maruz bırakmışlar ve koruma durumunun diazoksit yandıktan sonra 30 dakika süreyle koruma durumunun devam ettiğini bildirmişlerdir. Bu bulgu tetikleyici bir etkinin varlığına ilaret eder. Üstelik 5-HD bu korumanın etkisini ortadan kaldırmıştır. Bu

arının korumanın son ürünleri olmadıkları bunun yerine bu kanalların iskemiden önce açılmasını koruma kaskadına tetikleyen ve kinazları aktive eden bir etkisi olduğunu gösterir.

KATP kanalları kardiyomiyositlerden başka (26) beyin (27, 28), pankreas (29), iskelet kası (30) ve damar düz kasında (31) da bulunur.

Katp kanalları 2 ayrı alt birimden yapılmış hetero-oktomerik komplekslerdir. (32). Kanal deliği dört Kir6.X alt ünitesinden yapılmıştır ve bunlar içe rektifiye edici K kanal ailesinin üyeleridir. Kanal deliğine ilave olarak dört sülfonilüre reseptör alt birimi (SUR) kanal kapanmasını regüle eder (32).

Kir kanalları akıntı içe doğru daha iyi geçirme yeteneği olan kanallardır. Ekodan daha büyük membran potansiyeli değerlerinde K iyonları elektrokimyasal gradyanlarının etkisiyle hücre dışına çıkarlar. Mg gibi diğer bazı iyonlar ve spermin gibi poliaminler de bu kanallardan dışa akarak blokolarlar ve içe doğrultma sağlarlar. Ekodan daha düşük membran potansiyellerinde K iyonları hücre içine akar (33).

Patch-Clamp genel bilgi

Voltaj clamp tekniği ilk kez Cole tarafından 1949'da tanımlanmıştır. 1952 yılında Hodgkin, Huxley ve Katz tarafından geliştirilmiştir. Hodgkin ve Huxley voltaj clamp tekniği ile 1963 yılında Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülü almışlardır. Hodgkin ve Huxley bu teknik sayesinde voltaj kapalı sodyum ve potasyum kanallarının, zar

iletkenliklerini saptamaları ve bu değerlerden de

aksiyon potansiyelinin genliğini (voltajın amplitüdü) ve zamansal yapışın matematiksel olarak türetebilmişlerdir. Patch klamp tekniği ile hücre zarının küçük bir bölgesinin iki tarafı arasındaki potansiyel farkın istenilen bir değerde sabit tutarak, zarın bu parçası içinde yer alabilecek iyon kanallarının yoğunluklarını (birim alandaki sayılarını), iletkenliklerini ve çeliitli koşullardaki davranışlarını araştırmak mümkündür. Ayrıca patch klamp tekniği ile sadece voltajla aktive edilen iyon kanalları değil, aynı zamanda ligandlarla (kimyasallarla) aktive edilen iyon kanalları da araştırılabilmektedir.

Yöntem ve Gereçler

Araştırmada 10 adet 200±250 g ağırlığında Wistar Cinsi erkek seçan kullanıldı. Seçanlar ketamin (40 mg/kg, im) ve xylazine (5 mg/kg, im) ile anestezi edildikten sonra intübe edildi ve bir respiratöre (Harvard Rodent Ventilator model 683) bağlanarak ventile edildi. Cerrahi asepsi ilkelerine uyularak 4ncü interkostal aralıktan sol torakotomi açıldı. Sol inen koroner arter dâle bulunarak bir ipek stur vasıtası ile belirginleştirildi. Daha sonra, deney grubuna (n=5) damar çeperi üzerine yerleştirilen bir plastik aparey vasıtasıyla damar dâardan bası uygulanarak tam olarak kapatıldı ve 30 dakika sonra kanlanma yeniden sağılandı. Kontrol grubunda aynı prosedür damar basışı yapılmadan uygulandı. Yeterli bir iskeminin olup olumadığı bu sırada kayıılan EKGde ST segmentinin izlenmesi ile yapıldı.

Ventriküler kardiyomiyositlerin izolasyonu

Otuz dakikalık uygulamadan hemen sonra hızlı kalp kanüle edilerek çıkartıldı ve Langendorff apereyine yerleştirilerek koroner arterler vasıtasıyla Ca^{2+} ösüz (%100 BSA ile) bir solüsyon kullanılarak geriye doğru perfüze edildi (Bu solüsyonun içeriği, mM olarak: 145 NaCl, 5 KCl, 1.2 $MgSO_4$, 1.4 Na_2HPO_4 , 0.4 NaH_2PO_4 , 5 HEPES, 20 Taurin ve 10 glukoz, pH 7.4). Temizleme maksatlı bu perfüzyonu takiben aynı solüsyon içerisine ilave edilen kollajenaz (1 mg/mL, Tip 4) ile 30 dakika daha perfüzyona devam edildi. Perfüzyon tamamlandıktan sonra Sol ventrikül küçük parçalara ayrıldı ve bir naylon mehseden geçirildi. Ardından ayrılmış miyositler kollajenazsız bir solüsyonda yıkandı ve Ca^{2+} ün dereceli bir şekilde artarak solüsyonlara sırasıyla yerleştirildi. Son solüsyondaki Ca^{2+} iyon konsantrasyonu 1,3 mM olacaktı. Daha sonra hücreler patch-clamp deneyleri başlayana kadar kısa süre bu solüsyon içinde bekletildi.

Patch-Clamp (pClamp) Kayıtları

ATP- duyarlı Potasyum akımları izole edilen hipoksiye maruz kalmış ve kalmamış hücrelerden whole-cell yöntemi ile kayıtları edildi. Bu amaçla kullanılacak pipetler 1,5 mm dış çaplı boroskilat ile kaplanmış pipetlerden çekilerek hazırlandı ve bu pipetlerin içi pipet solüsyonu ile dolduruldu. Pipet solüsyonunun içeriği mM olarak KCl 140, $MgATP$ 2.0, $MgCl_2$ 1.0, HEPES 10, EGTA 5 ve GTP 0.1 den oluşacak şekilde; pH ise 7.3'e ayarlandı. Doldurulmuş pipetlerin rezistansı 2.0-4.0 MΩ arasında ise kayıtlar için kullanıldı aksi halde yeni pipet çekilerek hazırlandı. Hücreler mM olarak Aspartat 110, NaCl 135, KCl 5.4, $MgCl_2$ 1.0, $CaCl_2$ 1.0, NaH_2PO_4 0.33,

ıran, pHö 7.4ö e ayarlanmı banyo solusyonuna yerletirildi. ATP-duyarlı potasyum kanal aktivitesinin kaydı için pipet solüsyonuna 0,25mM ATP eklendikten sonra, solüsyon içeriği iletken bir elektrod ile öheadstageöe bağlandı. Kayıtlar bir patch-clamp yükselteci, uygun yazılım ve analiz sistemi kullanılarak alındı. Akım kaydı sırasında membran potansiyeli -40 mV değerinde tutuldu ve kaydedilen akımın glibenklamid- duyarlı olup olmadı dikkate alındı.

Kaydedilen iyon akımının glibenklamid ile ortadan kaldırılması ile, bu akımın ATP-duyarlı potasyum akımı olduğu doğrulandı. Na kanal aktivitesini inhibe etmek için tetradotoksin kullanıldı.

Akım sinyalleri pClamp yazılımı ile (Axon Ins) yükseltildi (20 ñ 200 mV/pA), 1kHz düşük banda filtrelendi ve 5 kHzöde rakamsallaştırıldı. Pipet potansiyel 100 mVöda tutuldu. Veriler pClamp yazılımı ile analiz edildi.

Veri analizi

ıstatistik SPSS paket programı kullanılarak yapıldı. Ortalama akımlar arasındaki farklılıklar, grup (iskemi ve kontrol) ve grup içi faktör (membran potansiyeli) dikkate alınarak tekrarlayan ölçümlerle ANOVA testi kullanılarak yapıldı. 0.05öden küçük p değerleri anlamlı kabul edildi..

Bulgular

Miyosit kapasitans (C_m) .

İskemik ve non iskemik kalplerden izole edilen miyositlerin hücre kapasitansları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Mann-Whitney U test; $p > 0.05$). Hücre hacmi hakkında bilgi veren membran kapasitans değeri ortalaması iskemik kardiyomiyositler için 146 ± 13.7 pF ($n = 5$) ve kontrol kalplerinden izole edilen kardiyomiyositler için 164 ± 14.9 pF ($n=5$) olarak bulundu.

İskemik ve kontrol kalplerinden elde edilen kardiyomiyositlerde farklı voltaj kalıplarına karşı olarak whole-cell yaklaşımla elde edilmiş örnek hücre K⁺ iyon akımları

Şekil 1'de -70 mV'dan başlayıp 10 mV'duk adımlarla oluşan voltaj değerlerinde 200 ms süreyle keskinleşmesi sırasında kaydedilen K iyon akımları bir kontrol (a) ve bir iskemik (b) kalbinden izole edilen miyositlerde gösterilmiştir. Şekilden de fark edilebileceği gibi iskemik hücredeki K iyon akımının büyüklüğü, kontrol hücresine göre daha düşüktür. İstatistiksel analiz için her membran potansiyeli değerine karşı olarak K akım genlikleri tekrarlayan ölçümlerle ANOVA testine tabi tutulmuştur. Maksimum



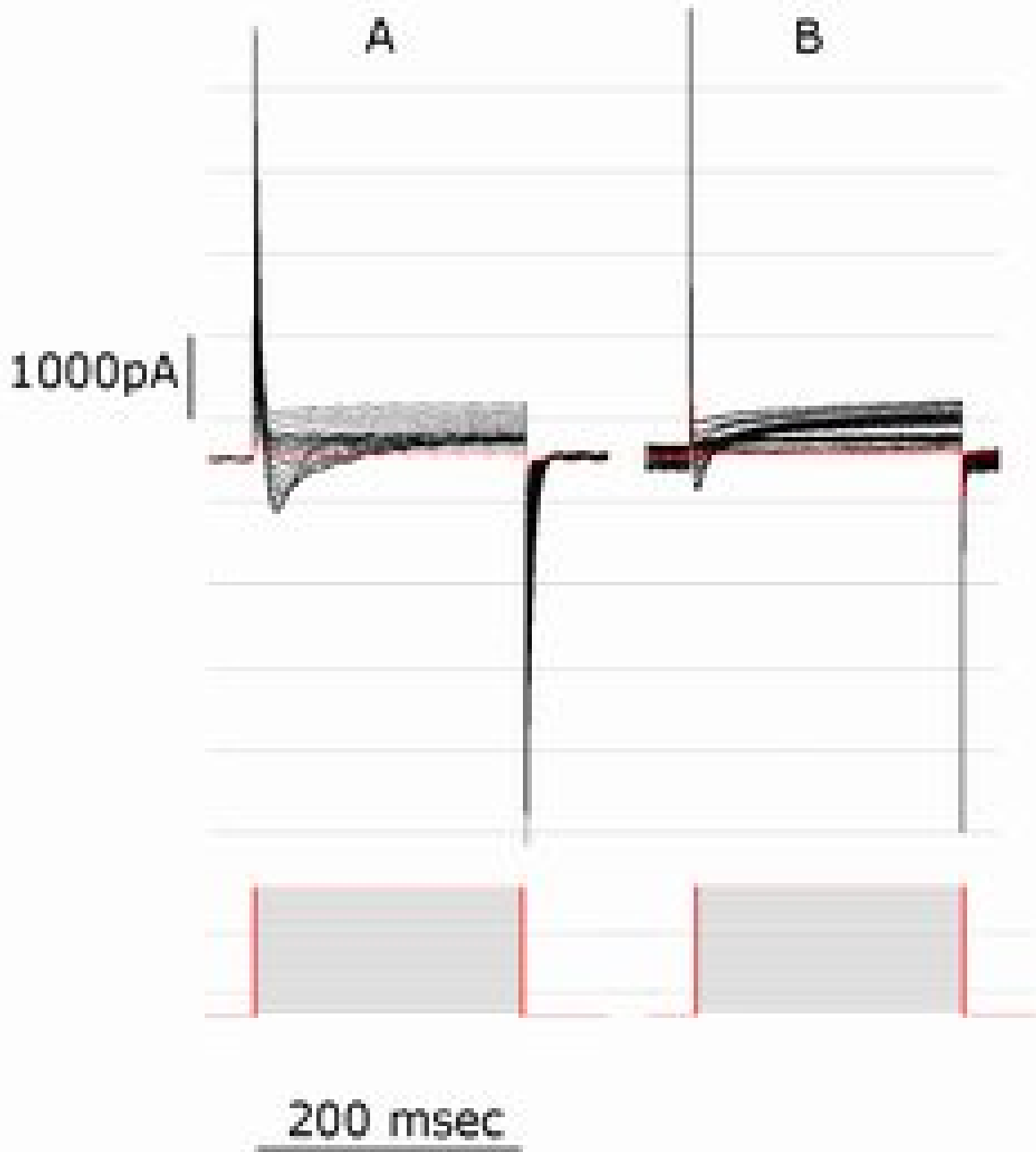
PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ortalama 5846 ± 456 pA, kontrol hücreleri için

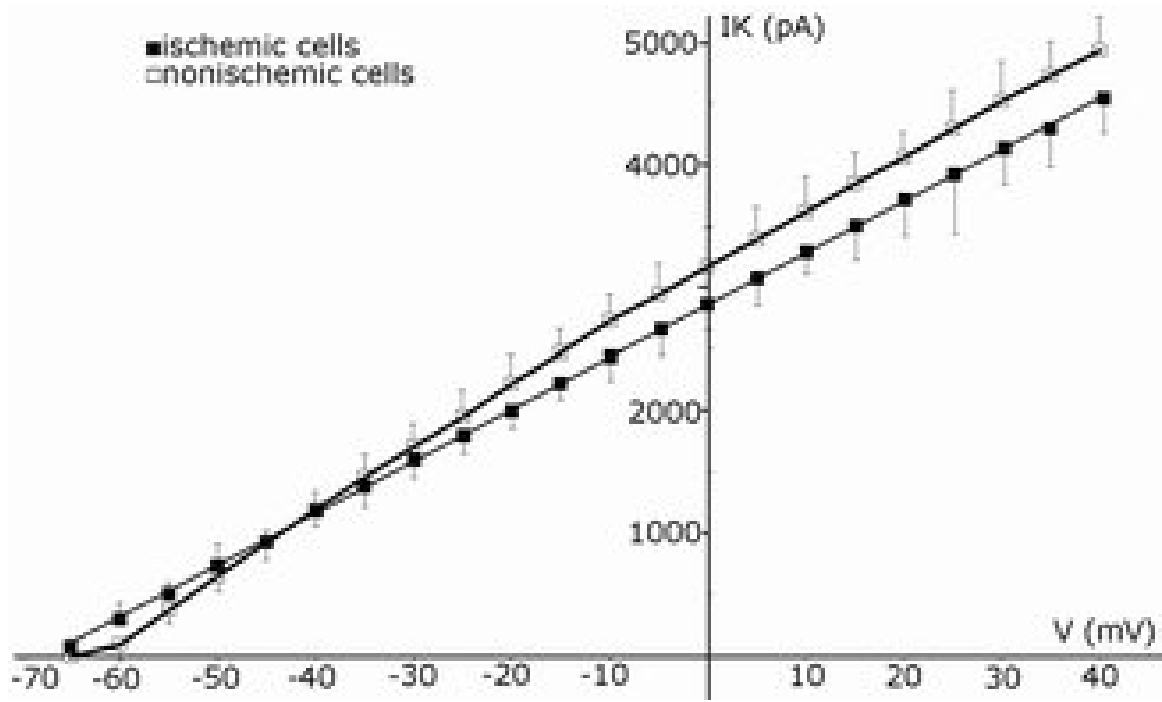
5943 ± 515 pA olarak bulundu. İstatistiksel analiz anlamlı bir grup içi (membran potansiyeli) olduğunu göstermiş ancak gruplar arasında anlamlı bir etki bulunmamıştır.



Vđuk adđmlarla oluğan voltaj değerlerinde 200 ms

süreyile kışkađlanmasđ sırasında kayđlanan K iyon akđmlarđ A: kontrol ve B: iskemik kalpten izole edilen miyositlerden elde edilmiğtir.

Biri iskemik, diğer ki kontrol kalbinden izole edilen iki miyositte elde edilen voltaj-akđm grafikleri Ėekil 2de gösterilmiğtir. Aynı membran potansiyelinin iskemik hücrede, kontrol değerinden daha az K akđmđoluđturduđu görülebilmektedir.



Ėekil 2. Biri iskemik, diğer ki kontrol kalbinden izole edilen iki miyositte elde edilen voltaj-akđm grafikleri.

Ėekil 3de membran potansiyelinin önce -40 mVđ kışkağlanarak Na akđmlarđnđ inaktive edildiği, sonra membranđ -100 mVđdan bağlayarak 10 mVđuk adđmlarla depolarize edildiği voltaj protokolünün uygulanmasđna yanđ olarak kontrol (üstte) ve

birer kardiyomiyositten kayđlanan Katp kanal akėnlarė gėrőlmektedir. Maksimum akėn deęeri kontrol hőcrelerinde 1918 ± 213 pA, iskemik kalp hőcrelerinde ise 2254 ± 312 pA olarak ۆlčőldő. İstatistiksel analiz iskemik Katp akėn yoęunluęunun iskemik kalp hőcrelerinde, kontrole gėre yőksek olduęunu (Man-Whitney U test, $dF=7$; $U=4,37$; $p<0.05$) ortaya koydu.

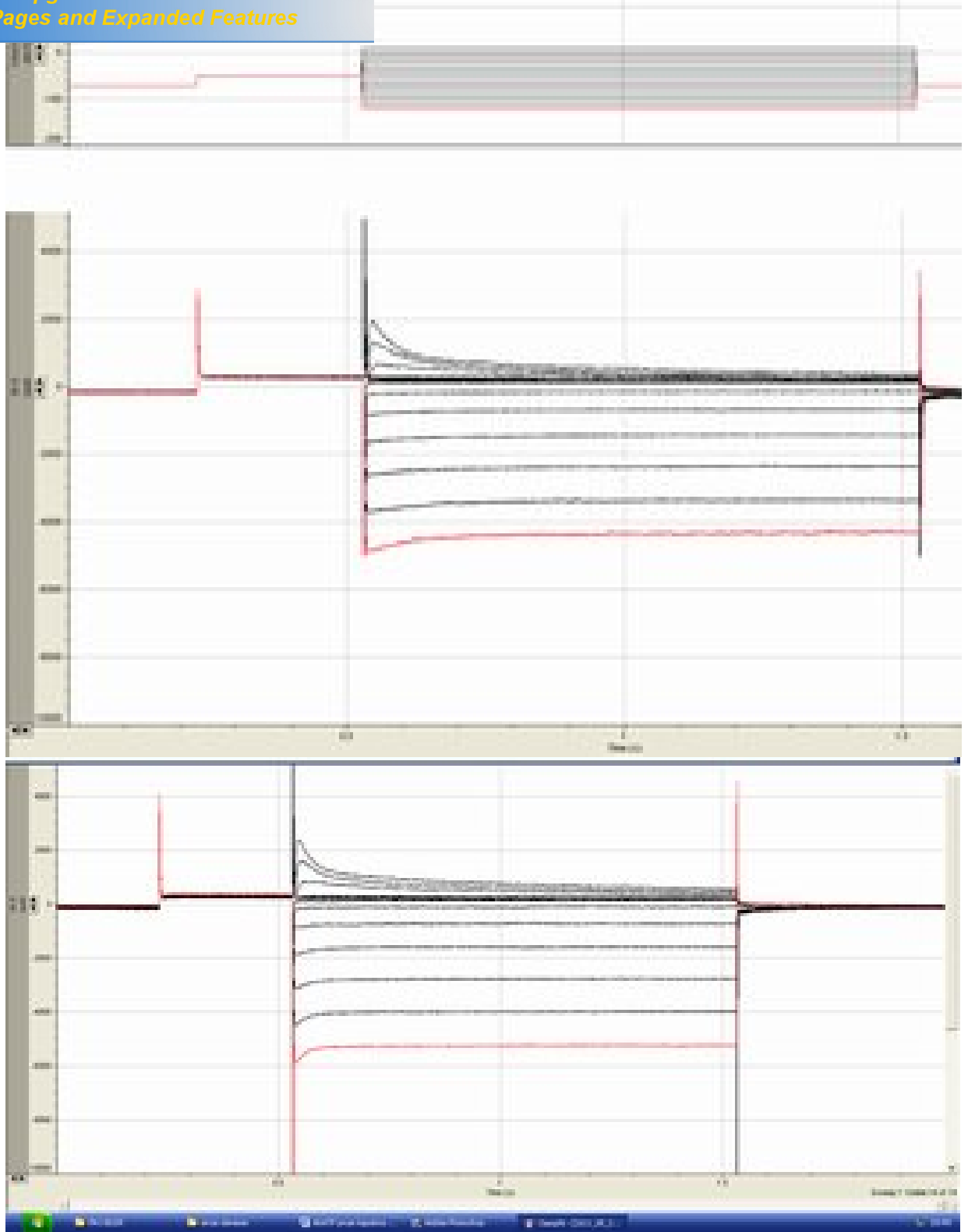
Ėlekil 4őde toplam K iyon akėnlarėnėn inaktivasyonunu kayđlamak ięin kullandėan protokelle elde edilen akėn grafikleri bir kontrol (őst) ve bir iskemik (alt) ۆrnek hőcrede gėsterilmiřtir. Maksimum inaktivasyon akėmė kontrol grubu ięin 2012 ± 284 pA ve hipoksik hőcreler ięin 2084 ± 277 pA olarak ۆlčőldő. İnaktivasyon protokolő ile elde edilen akėmlarėn iki grup arasėndaki istatistiksel karđđalıtėmasė anlamlėdeęildi.



PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



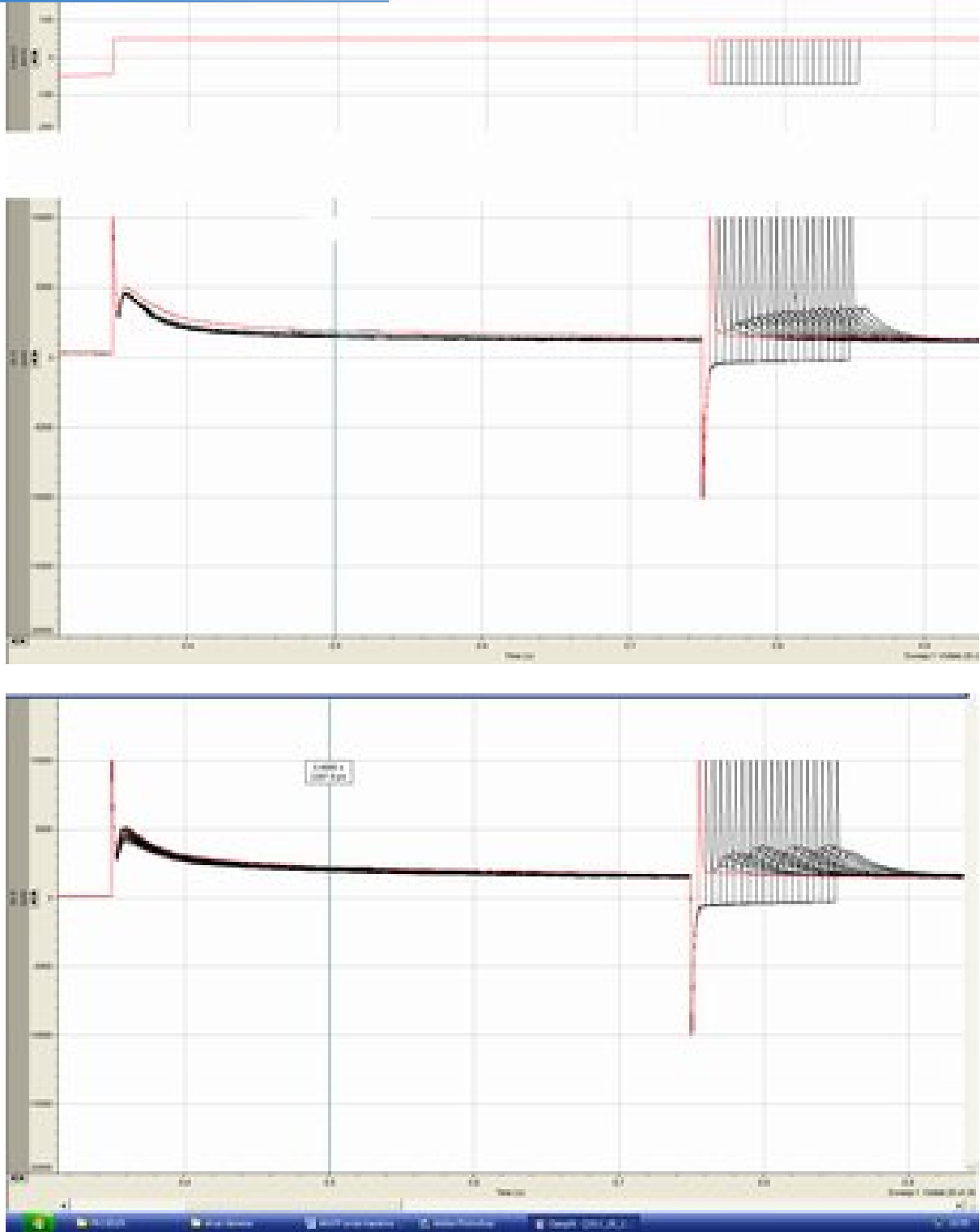
İlekil 3. Na akınların inaktive edildiği voltaj protokolünde, membran -100 mV'dan bağlayarak 10 mV'duk adınlarla depolarizasyonuna karė oluğan Katp akınlarė Bu akınlar glibenklamid uygulamasė ile ortadan kaldırılmığtır. Kontrol hücresi (üstte) ve iskemik hücre (altta).



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Şekil 4. K iyon akımlarının inaktivasyon protokolü.

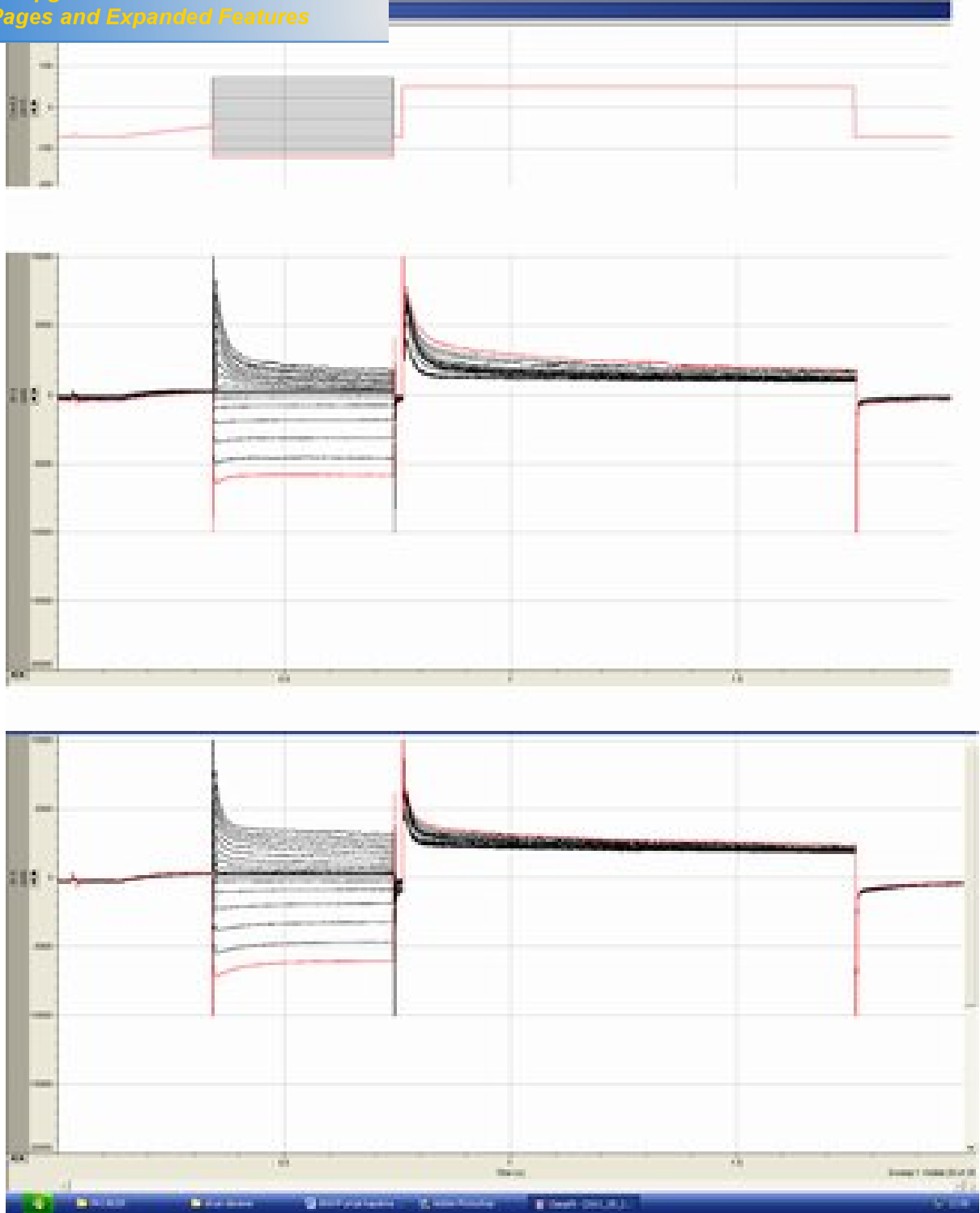
arının inaktivasyonunu kayıtlamak için kullanılan protokelle elde edilen akın grafikleri bir kontrol (üst) ve bir iskemik (alt) örnek hücrede gösterilmiştir. Katp kanallarının maksimum inaktivasyon akını kontrol hücreleri için 7656 ± 668 pA iskemik hücreler için 7443 ± 376 pA bulundu. İnaktivasyon protokolü ile elde edilen akınların iki grup arasındaki istatistiksel karşılaştırılması anlamlı değildir.



PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Şekil 5. K_{ATP} iyon akımlarının inaktivasyon protokolü.

Tartışma

Sunulan çalışmada iskemik ve non iskemik seçan kardiyomyositlerinin potasyum akımlarının (IK) karıđalıttırılmasđ yapılmığtır. Sonuçlarımız iskemik hücrelerde IKtot akımlarının kontrol hücrelerine göre farklı olmadığını ama IKatp akımlarının anlamlı derecede artığını göstermektedir. Bu bulgu anoksik koğullarda yapılan benzer çalışmalardan elde edilenler ile benzerdir (34, 35). Ayrıca bazı çalışmalar yeniden oksijenlendirilen kardiyomyositlerin K iyon akımlarının normal kalplerle karığalıttırıldığında bir farklılık göstermediğini de ortaya koymuştur. Literatürdeki benzer çalışmalar ile desteklenen bulgularımız bize Katp kanal aktivitesinin hücrelerin oksijenlenme durumu ile düzenlenebileceğini dđlündürmektedir.

Hipoksik veya iskemik koğullarda açıldđđı bildirilen üç tip K kanalı vardı. Bunlardan ikisi aralıdonik asit ile aktive edilir (36) iletkenlikleri 160 ve 68 pS (140 mM[Ki].kadardı ve zaman sabiti 1ms'nin üzerindedir. Diğer kanal ise hücre içi Na artığı ile aktive olur ve bunun iletkenliği yaklağık 200 pS (150 mM Ko) kadardı (37). Pipet solüsyonu ATP içeriği, elde edilecek akımın yoğunluğu açısından önemlidir. Örneğin Belles, Hescheler ve Trube (38) IKatp akımlarının pipette ATP yokken 20 dakika sonra, 3mM ATP varken ise 48 dakika sonra beklemeyi takiben geliğtiğini bildirdiler. Bizim deneylerimizde pipet solüsyonları ATP içermiyordu ve Katp kayıtları whole-cell konfigürasyonunda ortalama 18 dakika bekledikten sonra alındı. Bu durum

yo ve pipet solüsyonlarındaki substrat düzeylerinin literatürde kullanılanlarla benzer olduğunu düüündürmektedir.

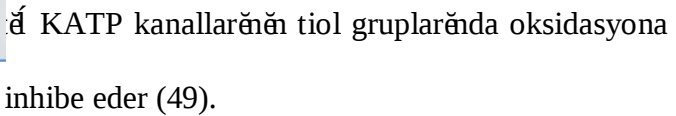
Çalđmamızda patch clamp kayđları sırasında banyo ortamında hipoksi ya da anoksi uygulanmamığtır. Kardiyak hipoksi in vivo koğullarda yarım saat boyunca uygulanmığ ve iskemik kalpten izole edilen hücreler, banyo ortamında whole-cell konfigürasyonda çalđılmıđtır. Hücre izolasyon tekniğinin balarışe saklam bir kalbin hücrelerinin ayrđtđđyor olmasına bakanlığdır. Biz deney grubu olarak iskemi uygulanan kalbin hücrelerini izole etmek durumunda olduğumuz için, deney grubundan whole-cell konfigüreasyonuna dayanabilecek morfolojide hücre izole etmekte zorlandığ. Ancak dört seçen birer kardiyomiyositinden kayđ alınabilmesi nedeni ile, kontrol grubunda da dört hücrenin çalđımasėyeterli bulundu.

Miyokardiyositlerde hücre içi ATPnin homojen dađımadėđına dair bulgular bulunmaktadır. İskeminin bálılamasından sadece onlarca saniye sonra K çđđđartar (39). Bu çđđ kşmen glibenklamide duyarlığdır (40) ama bu dönemde hücre içi ATP 3-5 mMđđ normal düzeyindedir (41). Bu değer eksize patchlarda kanalların yarımaksimal inhibisyonu için gereken ATP konsantrasyonunun yaklađđ 2 katđđdır (42). Saklam hücreler ve eksize edilmiğ patchlerde Katp kanal duyarlıđđkların aynė olacađđ dikkate alınşsa bu durum total ATP konsantrasyonunun Katp kanal regölasyonu için uygun olmadėđınė ama lokal ATP konsantrasyonlaınė kanal aktivitesinin düzenlenmesinde daha yakın bir etki göstereceğini düüündürür.

nde kardiyomiyositlerde ATP üretiminin düşmesi beklenir. Katp kanallarının kapalı tutulması için birkaç mmHg'den fazla oksijen basıncı yeterli olduğu bilinmektedir. Çalışmamızın sonuçları iskemik hücrelerde daha fazla Katp iyon akışı oluştuğunu gösterdiğinden, deney modelimizde uygulanan hipoksinin bu kanalların açılmasına yetecek maddede olduğu düşünülebilir.

Patolojik koşullardan veya iskemiden sonra kardiyomiyosit ATP içeriği miyokardiyal disfonksiyondan dolayı azalır. (43). Azalmış ATP içeriği iskemik hasardan sonra gözlenen illeusel değişikliklere katkıda bulunur çünkü ATP, ATPaz ve özellikle KATP kanallarıyla ilgili olmak üzere pek çok enzim ve proteinin aktivitesini düzenler (44). Azalmış ATP/ADP oranı ile aktive olan KATP kanalları kardiyomiyosit içerisine Ca akışının durdurulması ve aksiyon potansiyelinin ve kasılmanın süresinin önlenmesi ve böylece kalp kontraktürünün önlenmesi veya azaltılması için önemlidir (45). İskemide Kardiyomiyosit KATP kanalları düzenleyici tiol gruplarının oksidasyonu sonucu azalmış ATP/ADP oranına duyarlılıklarını kaybedebilirler (46). Tiol gruplarının oksidasyonu serbest radikallerin yüksek oranda varlıklarının sonucu olur (47). Bu nedenlerle iskemi sırasında Katp kanalları kalsiyum akışını sürdürme yeteneğini kaybeder ve aksiyon potansiyeli süresi uzar ve kardiyak kontraktür meydana gelir

Membran KATP kanalları hiperpolarizasyonu tetikler bu da voltaj bağımlı Ca kanalları vasıtasıyla Ca girişini azaltır ve böylece kardiyomiyosit AP süresini artırır. İskemide bu mekanizmanın değişmesi aksiyon potansiyeli süresinin uzamasına ve kalp hızında azalmaya ve kardiyak illeusün progresif azalmasına neden olur. Özellikle



Sonuç olarak, bu çalışmada in vivo uygulanan iskemi modeli altında izole edilen kardiyomiyositlerde total K iyon akınlarının değilmediği ama Katp kalan akınlarının artmış bulunmuştur. Katp akınları glibenklamid uygulaması ile ortadan kaldırılmıştır. Artan Katp iyon akınının, iskemiye adaptif bir yanıt oluşturmak üzere hücre membranına transloke olan kanal proteinlerinin sonucu olduğunu düşünmekteyiz. Bununla birlikte mekanizmayı açıklayacak moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Kaynaklar

1. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. Nature. 1983; 305 (5930):147-58.
2. Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. Annu Rev Physiol. 1998;60: 667-687.
3. Babenko AP, Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. Physiol Rev. 1998; 78: 227-245.
4. Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. Prog Biophys Mol Biol. 2003;81(2):133-176.
5. Rajashree R, Koster JC, Markova KP, Nichols CG, Hofmann PA. Contractility and ischemic response of hearts from transgenic mice with altered sarcolemmal K(ATP) channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;283(2):H584-H590.
6. Hu K, Li GR, Nattel S. Adenosine-induced activation of ATP-sensitive K⁺ channels in excised membrane patches is mediated by PKC. Am J Physiol. 1999;276(2 Pt 2):H488-H495.

Crawford RM, Jovanovic A. Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal KATP channels. *FASEB J.* 2004;18(9):1046–1048.

8. McTaggart JS, Clark RH, Ashcroft FM. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *J Physiol.* 2010 Jun 21.

9. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.* 1997; 77(4):1165–1232.

10. Grover GJ. Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;24 Suppl 4:S18–27.

11. Budas GR, Jovanovic S, Crawford RM, Jovanovic A. Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal KATP channels. *FASEB J.* 2004;18(9):1046–8. Epub 2004 Apr 14.

12. Kameyama M, Kakei M, Sato R, Shibasaki T, Matsuda H, Irisawa H. Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature.* 1984; 309(5966):354–6.

Huisamen B, du Toit EF, Moolman JA. Protection

of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc J Afr.* 2009;20(1):43–51.

14. Lefer DJ, Nichols CG, Coetzee WA. Sulfonylurea receptor 1 subunits of ATP-sensitive potassium channels and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med.* 2009;19(2):61–7.

15. Okorie MI, Bhavsar DD, Ridout D, Charakida M, Deanfield JE, Loukogeorgakis SP, Macallister RJ. Postconditioning protects against human endothelial ischaemia-reperfusion injury via subtype-specific KATP channel activation and is mimicked by inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Eur Heart J.* 2011;32(10):1266–74.

16. Gross ER, Nithipatikom K, Hsu AK, Peart JN, Falck JR, Campbell WB, Gross GJ. Cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibition reduces infarct size during reperfusion via the sarcolemmal KATP channel. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(6):1245–9.

17. Grover GJ. The role of ATP-sensitive potassium channels in myocardial ischemia: pharmacology and implications for the future. *EXS* 1996;76: 313–24.

18. Simões C, Svensjö E, Bouskela E. Effects of cromakalim and glibenclamide on arteriolar and venular diameters and macromolecular leakage in the microcirculation during ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39(3):340–6.

19. Quast U, Guillon JM, Cavero I. Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res.* 1994; 28(6):805–10.
20. Budas GR, Jovanovic S, Crawford RM, Jovanovic A. Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal KATP channels. *FASEB J.* 2004; 18(9):1046–8.
21. Mozaffari MS, Schaffer SW. Effect of pressure overload on cardioprotection of mitochondrial KATP channels and GSK-3 β : interaction with the MPT pore. *Am J Hypertens.* 2008; 21(5):570–5.
22. Budas GR, Jovanovic S, Crawford RM, Jovanovic A. Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal KATP channels.. *FASEB J.* 2004;18(9):1046–8.
23. Toyoda Y, Levitsky S, McCully JD . Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhances cardioprotective protection. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(4):1281–8.
24. Chen M, Zhou JJ, Kam KW, Qi JS, Yan WY, Wu S, Wong TM. Roles of KATP channels in delayed cardioprotection and intracellular Ca²⁺ in the rat heart as revealed by kappa-opioid receptor stimulation with U50488H. *Br J Pharmacol.* 2003; 140(4):750–8.

25. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 2000; 87(6):460–6.
26. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* 1983; 305(5930):147–8.
27. Ashford ML, Boden PR, Treherne JM. Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 1990; 415(4):479–83.
28. Ohno-Shosaku T, Yamamoto C. Identification of an ATP-sensitive K⁺ channel in rat cultured cortical neurons. *Pflugers Arch.* 1992; 422(3):260–6.
29. Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984; 311:271–3.
30. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature.* 1985; 316(6030):736–8.
31. Masuzawa K, Asano M, Matsuda T, Imaizumi Y, Watanabe M. Possible involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the relaxant response of dog middle cerebral artery to cromakalim. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 255(2):818–25.

32. Bryan J, Aguilar-Bryan L. Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1461(2):285–303.
33. Kurata HT, Phillips LR, Rose T, Loussouarn G, Herlitze S, Fritzenschaft H, Enkvetchakul D, Nichols CG, Baukrowitz T. Molecular basis of inward rectification: polyamine interaction sites located by combined channel and ligand mutagenesis. *J Gen Physiol*. 2004; 124(5):541–554.
34. Benndorf K, Bollmann G, Friedrich M, Hirche H. Anoxia induces time-independent K⁺ current through KATP channels in isolated heart cells of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)*. 1992; 454: 339–357.
35. Knopp A, Thierfelder S, Doepner B, Benndorf K. Mitochondria are the main ATP source for a cytosolic pool controlling the activity of ATP-sensitive K⁺ channels in mouse cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2001; 52: 236–245.
36. Kim D, Clapham DE. Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science* 1989; 244, 1174–1176.
37. Kameyama M, Kakei M, Sato R, Shibasaki T, Matsuda H, Irisawa H. Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature*. 1984;309(5966):354-6.

38. Changes of membrane currents in cardiac cells induced by long whole-cell recordings and tolbutamide. *Pflugers Arch.* 1987; 409(6):582-8.

39. Hirche H, Franz C, Bös L, Bissig R, Lang R, Schramm M. Myocardial extracellular K^+ and H^+ increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary artery occlusion in pigs. *J Mol Cell Cardiol.* 1980;12(6):579-93.

40. Wilde AA, Escande D, Schumacher CA, Thuringer D, Mestre M, Fiolet JW, Janse MJ. Potassium accumulation in the globally ischemic mammalian heart. A role for the ATP-sensitive potassium channel. *Circ Res.* 1990;67(4):835-43.

41. Weiss J, Hiltbrand B. Functional compartmentation of glycolytic versus oxidative metabolism in isolated rabbit heart. *J Clin Invest.* 1985; 75(2):436-47.

42. Lederer WJ, Nichols CG. Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K^+ channels in isolated membrane patches. *J Physiol.* 1989; 419:193-211.

43. Jennings RB, Steenbergen C Jr. Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol.* 1985; 47: 727-49.

44. Noma A, Shibasaki T. Membrane current through adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol.* 1985; 363:463-80.

45. Miki T, Seino S. Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. J Mol Cell Cardiol. 2005; 38(6):917-25.
46. Tricarico D, Wagner R, Mallamaci R, Conte Camerino D. Cysteine restores the activity of ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle fibers of aged rats. Ann N Y Acad Sci. 1994;717:244-52.
47. Droge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants Experimental Gerontology 2002, 37: 1333-45.
48. Harman D. Free-radical theory of aging - consequences of mitochondrial aging. AGE. 1983; 6(3): 86-94
49. Coetzee WA, Nakamura TY, Faivre JF. Effects of thiol-modifying agents on K-ATP channels in guinea-pig ventricular cells. American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology. 1995; 269(5): H1625-H1633.
50. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. Nature 1983; 305(5930): 147-8
51. Kakei M, Noma A, Shibasaki T. Properties of Adenosine-Triphosphate-regulated Potassium Channels in Guinea-Pig Ventricular cells. Journal of Physiology-London 1985; 363: 441-462.

52. Seino S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:337-62

53. Kajioka S, Oike M, Kitamura K. Nicorandil opens a calcium-dependent potassium channel in smooth muscle cells of the rat portal vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 254:905-913.

54. Kajioka S, Kitamura K, Kuriyama H. Guanosine diphosphate activates an adenosine 5'-triphosphate-sensitive K⁺ channel in the rabbit portal vein. *J. Physiol.* 1991; 444:397-418.

55. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* 1991 Jul 18;352(6332):244-7.