



Uğur DALAMAN ^{1, a}
Yasin GÖKÇE ^{1, b}
Filiz BASRAL ^{2, c}
Nazmi YARAŞ ^{1, d}

¹ Akdeniz Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı
Antalya, TÜRKİYE

² Akdeniz Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı
Antalya, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0001-7145-4139

^b ORCID: 0000-0002-2811-0709

^c ORCID: 0000-0001-6614-366X

^d ORCID: 0000-0002-9450-2698

Geliş Tarihi : 21.01.2020

Kabul Tarihi : 22.03.2020

Yazışma Adresi Correspondence

Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı
Antalya - TÜRKİYE

nazmiyaras@akdeniz.edu.tr

Araşidonik Asit Metaboliti 20-Hete'nin Kardiyak Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi Üzerine Akut Etkisi

Amaç: Bir araşidonik asit metaboliti olan 20-HETE özellikle kardiyovasküler sistem içerisinde apoptotik süreçlerde ve hücre kaybının gerçekleştiği durumlarda artış gösteren bir moleküldür. Ancak kardiyak doku üzerine etkileri net olarak bilinmemektedir. Bu amaçla kardiyomiyosit fizyolojisi üzerine olan etkisi elektrofizyolojik olarak incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, sıçan kalbi sol ventrikülünden enzimatik izolasyon yöntemiyle elde edilen tek kardiyomiyositlerden 20-HETE uygulaması öncesi ve sonrası olmak üzere elektrofizyolojik kayıtlar alınmıştır. 20-HETE'nin etkin dozu olan 100nM konsantrasyonu perfüzyon yardımıyla kardiyomiyositler üzerine uygulanarak, akım kenetleme yöntemiyle aksiyon potansiyeli, potansiyel kenetleme yöntemiyle Na⁺, K⁺ ve Ca²⁺ kanal akımları ölçülmüştür. Bununla birlikte sarkomerik kısalma yanıtları 20-HETE inkübasyonu sonrasında elektriksel alan uyarısı ile kaydedilmiştir.

Bulgular: 20-HETE uygulaması sonucunda frekansa bağlı olarak kısalma parametrelerinde gözlenen genlik azalmasının kaybolması yanında yüksek frekanslarda kısalma işlevini gösteremediği bulgusuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte, 20-HETE'nin aksiyon potansiyeli genliğini anlamlı oranda azalttığı tespit edilmiştir. Bu azalışa, voltaja bağlı Na⁺ kanal akımının azalması ve kinetiklerinin yavaşlaması eşlik etmektedir. Buna ilaveten I_{to} akım yoğunluğundaki azalışında aksiyon potansiyeli genliğinin azalışına katkı sağladığı tespit edilmiştir. 20-HETE inkübasyonu aksiyon potansiyeli süresine ve L-tipi Ca²⁺ kanal akımları üzerine önemli bir etkisi gözlenmemiştir.

Tartışma: Bu çalışmada, 20-HETE'nin kardiyomiyosit uyarılma-kasılma çiftlenimine önemli etkileri olduğu göstermiştir. Özellikle kasılma kinetiklerini, Ca²⁺ duyarlılığını etkileyerek azalttığı düşünülmektedir. Diğer yandan, voltaja bağlı Na⁺ kanal akımının ve kinetiklerinin etkilenmesi kalbin uyarılabilirliğine 20-HETE'nin önemli etkileri olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: 20-HETE, kardiyomiyosit, patch-clamp, uyarılma-kasılma çiftlenimi

Acute Effects of Arachidonic Acid Metabolite 20-Hete on Cardiac Excitation-Contraction Coupling

Objective: 20-HETE, which is an arachidonic acid metabolite, increases in apoptotic processes and cell loss especially in the cardiovascular system. However, its effects are currently not clarified on cardiac tissue. In order to elucidate its role in the cardiovascular system, it is aimed to examine its effect on cardiomyocyte physiology.

Materials and Methods: In the study, electrophysiological recordings were taken via 20-HETE application on single cardiomyocytes obtained by enzymatic isolation from the left ventricle of the rat heart. Action potentials were measured by current-clamp method. Then Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ channel currents were measured with voltage-clamp method. Also, sarcomeric shortening responses were recorded with electrical field stimulation after 20-HETE incubation.

Results: As a result of the 20-HETE application, the shortening amplitude decrease in the normal condition by frequency was disappeared, as well as the function of shortening at the higher frequencies. In addition, it has been determined that 20-HETE significantly reduced the action potential amplitude. This decrease is accompanied by a decrease in voltage-dependent Na⁺ channels current and slow down of their kinetics. Also, the reduction in I_{to} current density contributes to the decrease in the action potential amplitude. 20-HETE incubation did not have a significant effect on action potential duration and L-type Ca²⁺ channels current.

Conclusion: This study has shown that 20-HETE has important effects on cardiomyocyte excitation-contraction coupling. In particular, it is thought to reduce contraction kinetics by affecting Ca²⁺ sensitivity of the machinery. On the other hand, 20-HETE has important effects on the excitability of the heart.

Keywords: 20-HETE, cardiomyocytes, patch-clamp, excitation-contraction coupling

Giriş

20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE), membran fosfolipid kaynaklı araşidonik asitten kalp ve damar sistemindeki Cytochrome P-450 ω -hydroxylase (CYP4A ve CYP4F izoformları) enziminin metabolik aktivitesi sonucu oluşturulmaktadır. 20-HETE, hem periferik vasküler tonusu hem de böbrek fonksiyonunu düzenleyerek sistemik arter basıncının kontrolünde önemli bir rol oynayan güçlü bir vazokonstriktör olarak bilinmektedir (1, 2). Bunlara ek olarak, kalp hipertrofisi ve kalp yetmezliğinde rol

aldığı gösterilmiştir. Sıçan hipertrofik kalp modelinde kardiyak mikrozom 20-HETE seviyesinin yükseldiği ortaya konmuştur (3). Diğer yandan, 20-HETE üretiminin inhibisyonu, iskemi/reperfüzyon hasarının belirgin şekilde azaltılması ve miyokard enfarktüsü boyutunun azaltılması gibi kardiyoprotektif etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (4-6). 20-HETE, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırması ve mitokondriyal fonksiyonu bozması yoluyla doğrudan kardiyomiyosit apoptozuna neden olduğu da ileri sürülmüştür (7). Ancak, kardiyomiyositlerden 20-HETE salınımını düzenleyen faktörler henüz tam olarak aydınlatılmamıştır.

Bazı patolojik durumlarda yararlı etkileri ileri sürülmüş olsa da 20-HETE çeşitli kardiyovasküler fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bir çok çalışma ile gösterilmiştir (7-9). 20-HETE'nin hipertrofik kardiyak yeniden modelleme ve kardiyak yetmezlikteki olası rolü ile ilgili mevcut bilgi hala yetersizdir. Kalp yetmezliği ile ilişkili kardiyak hipertrofi hastalarda ve hayvan modellerinde CYP4A ve 4F enzimlerinin arttığı rapor edilmiştir. Ek olarak, sıçanlarda izoproteranol ile oluşturulan kardiyak hipertrofi de CYP4A ve 4F artmıştır (3, 10). Aynı şekilde, 20-HETE seviyelerinin Angiotensin II kaynaklı hipertrofi de yüksek olduğu gösterilmiştir (11). 20-HETE oluşumunu önlemek için α -hidroksilaz inhibitörü ile ön tedavinin, kardiyak hipertrofinin gelişmesine karşı kısmen koruyucu olduğu ileri sürülmektedir (12).

Bu bulgular göz önüne alındığında, 20-HETE'nin kardiyovasküler sistem işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir aracı olduğu düşünülebilir. Ancak, son zamanlarda gerçekleştirilen bu çalışmalar yetersiz ve çelişkili bulgular sunmaktadır. Diğer yandan, 20-HETE'nin ventrikül kardiyomiyosit uyarılma kasılma çiftlenimi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmamaktadır. Dolayısıyla, çalışmamız 20-HETE'nin kalp ventrikül hücreleri üzerine etkilerini ortaya çıkarmak için elektrik alan yardımıyla uyarılan izole sıçan kardiyomiyositlerinde kısılma kinetikleri ile aksiyon potansiyeli ve ilişkili hücre zarı akımlarının voltaj ve akım kenetleme yöntemiyle incelenmesini amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem

Kardiyomiyositlerin Elde Edilmesi: Çalışmada 3 aylık erkek *Wistar* sıçanlar kullanılmıştır (Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu; Protokol No: 2013.05.03). Hayvanlar sodyum pento barbital kullanılarak (30 mg/kg vücut ağırlığı) hafif anestezi altına alınıp Langendorff sistemine aortadan bağlanmıştır. Perfüzyon çözeltisinin içeriği (mM olarak): 145 NaCl; 5 KCl; 1.2 MgSO₄; 1.4 Na₂HPO₄; 0.4 NaH₂PO₄; 5 HEPES; 10 glukoz (pH:7.4) olarak ayarlanmıştır. Kalpler perfüzyon ile yıkandıktan sonra 30-35 dakika süre ile içerisinde kollajenaz bulunan çözelti (Collagenase A type) (0.8-1 mg/ml) ile perfüze edilmiştir. Ardından doku makasla parçalanıp filtreden geçirilerek tek hücreler elde edilmiştir. Ca²⁺ derişimi final derişimi 1mM olacak şekilde aşamalı olarak

arttırılmıştır. Ölçümlerin alınması sırasında 100 nM konsantrasyonunda 20-HETE perfüzyonu gerçekleştirilmiştir.

Kısılma Parametrelerinin Ölçülmesi: Hücreler elektrot yerleştirilmiş küvet içine alınarak uyarılabilir olanlar 0.5, 1, 2 ve 4 Hz frekanslı 5 V ve 4 ms'lik elektrik alan ile uyarılmıştır. Inverted mikroskoba bağlı hızlı bir kamera yardımıyla (MyoCam, IonOptix Inc., ABD) kayıtlar alınarak dinlenme boyu, kısılma genliği, kısılma ve gevşeme sürelerinin derişimleri değerlendirilmiştir.

Aksiyon Potansiyeli Ölçümü (Akım Kenetleme Yöntemi): Kardiyomiyositler 1 Hz frekansında uyarılarak kayıt edilmiştir. Deneyde ekstraselüler ortam için içeriği (mM): NaCl 137, KCl 5.4, MgCl₂ 0.5, CaCl₂ 1.8, Hepes 11.8, glukoz 10 ve pH 7.40 olan Tyrode solüsyonu kullanılmıştır. Ayrıca, 1,5-2 MΩ dirence sahip pipetler içeriği (mM): K-aspartate 120, NaCl 10, KCl 20, K-Hepes 10, MgATP 5 ve pH 7.2 doldurulmuştur. Kaydedilen aksiyon potansiyellerinin (AP) dinlenme zar potansiyeli, genliği, depolarizasyon hızı ve repolarizasyon süresi hesaplanarak ortalama derişimleri verilmiştir.

Voltaj Kenetleme Yöntemi: Bütün akımlar voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfigürasyonunda kaydedilmiştir. Bunun için, hücrenin gigaohm düzeyinde bir dirence oluşturacak şekilde elektrot ucuna yapışması sağlandıktan sonra (gigaseal), 900 mV'luk bir puls uygulanarak hücre zarı kırılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım derişimleri hücreler arası büyüklük derişiminden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla ölçüm yapılan hücrenin sığasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım derişimleri akım yoğunluğunun (pA/pF) voltaja göre derişimi olarak verilmiştir. Akımların zamansal derişimler üssel fonksiyona uydurulmuştur ($I/I_{max}=[1-\exp(-t/\tau)]$). Kanalların inaktivasyon derişimleri Boltzmann denkleminde uydurulmuştur ($I/I_{max}=[1+\exp(V_m-V_{1/2})/k]^{-1}$). Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Digidata 1440, Axon Inc., ABD) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen akımlar, 20 kHz'lik örnekleme hızında bilgisayar yazılımı (pClamp 10) ile kaydedilmiştir. Kayıtlar için 2-3 MΩ'luk elektrotlar kullanılırken, kenetleme sonrası giriş direncinin 5 MΩ ve altında olması sağlanmıştır.

Voltaja bağlı Na⁺ Kanal Akımının Kaydedilmesi: Na⁺ kanal akımı (I_{Na}) ölçümleri için kullanılan pipet solüsyonu (mM): 120 CsCl₂, 5 Na-ATP, 5 MgCl₂, 10 TEA, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂ ve 0.3 LiCl₂ (pH:7.2, CsOH) içeriğine sahiptir. Banyo solüsyonu olarak (mM): 120 NaCl, 10 TEA, 5 CsCl, 1 MgCl₂, 10 glukoz, 10 HEPES, 1.5 CaCl₂ ve 0.5 CdCl₂ (pH:7.4, CsOH) içeriğe sahip solüsyon perfüzyon sistemi aracılığıyla hücrenin üzerine uygulanmıştır. Kayıt protokolünde tüm kanalların aktivasyonunu sağlamak için -120 mV derişiminde 200 ms süreyle tutulmuştur. Sonra -100 mV'tan 5 mV'luk artışlarla +40 mV'a 200 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanmıştır. Tepe derişimleri ölçülüp 300 ms'den sonraki kuyruk akımları çikarılmıştır. Akım reaktivasyon protokolü -30 mV'luk

prepuls uygulandıktan sonra aynı potansiyele sahip ikinci puls uygulanmıştır. Puls arası zaman 1 ms'den başlayarak 2 ms'lik adımlarla 20 ms'ye kadar artırılmıştır. Kanalların deaktivasyon kinetiğini incelemek için -120 ile +50 mV arasında 5 mV'luk adımlarla prepuls uygulanarak ve her adımı takiben, -30 mV'a kenetlenmiştir.

L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımının Kaydedilmesi: Voltaja bağlı L-tipi Ca^{2+} kanal akımları (I_{CaL}) ölçümleri için kullanılan pipet solüsyonu (mM): 110 Cs-aspartat; 20 CsCl; 1 MgCl₂; 5 fosfokreatin-Na₂; 5 ATP-Na₂; 10 EGTA ve 5 HEPES (pH:7.4, CsOH). Kayıt için, hücreler eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli -45 mV'a kenetlenmiş, bu seviyede bir süre beklenerek I_{Na} akımları inaktif hale getirilmiştir. Sonrasında -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslara cevaplar analiz edilmiştir. Kanalların inaktivasyon durumunu gözlemek için -80 mV ile +20 mV arasında 10 mV adımlarla 200 ms süreli prepuls uygulandıktan sonra zar her defasında yine 200 ms süreyle 0 mV'a kenetlenmiştir. Reaktivasyon ise; 200 ms süreyle 0 mV'a kenetlendikten sonra aynı potansiyelde ikinci puls uygulanarak kaydedilmiştir. Puls arası süre, 50 ms adımlarla, 50 ile 500 ms arasında değiştirilerek uygulanmıştır. Kanalların inaktivasyon kinetiğini incelemek için -70 ile +60 mV'lar arasında 10 mV'luk adımlarla prepuls uygulanarak 0 mV'luk ve 500 ms süreli ikinci bir puls uygulanmıştır. Akımların reaktivasyonları da iki aşamalı bir protokole göre kaydedilmiştir: 400 ms süreyle 0 mV'a kenetlenmenin ardından 20 ms bekleyip aynı şekildeki ikinci puls uygulanmıştır. $\Delta t=20$ ms olmak üzere aynı protokol 300 ms'ye kadar uygulanarak ve her adımda ölçülen akımın tepe değeri maksimum akım değerine oranlanmıştır.

K⁺ Akımlarının Ölçümü: Akım-voltaj karakteristiği 600 ms'lik pulslar 1 s'lik aralıklarla ve 10 mV'luk basamaklar şeklinde -120 mV'tan +70 mV'a kadar 14 defa uygulanmıştır. Bu akımlar için kullanılan çözeltiler banyo için (mM): 117 NaCl; 5.4 KCl; 1.8 CaCl₂; 1.7 MgCl₂; 10 Glukoz; 10 HEPES (pH:7.4, NaOH), pipet için ise (mM): 120 KCl; 6.8 MgCl₂; 5 Na₂ATP; 5 Na-phosphocreatine; 0.4 Na₂GTP; 11 EGTA; 4.7 CaCl₂; 20 HEPES ve CdCl₂ (250 μ M) (pH:7.2, KOH) olacak şekilde hazırlanmıştır. Akımların tepe değerinden 600 ms'lik pulsun son bölümündeki akım değerleri (I_{ss}) çıkarılarak dışa doğru geçici potasyum akımı (I_o) hesaplanmıştır. Kanalların inaktivasyon kinetiğini incelemek için -70 ile +60 mV'lar arasında 10 mV'luk adımlarla prepuls uygulanarak +70 mV'luk ve 500 ms süreli ikinci bir puls uygulanmıştır. Akımların reaktivasyonları da iki aşamalı bir protokole göre kaydedilmiştir: -80 mV'taki zar potansiyeli 400 ms süreyle +70 mV'a kenetlenip tekrar başlangıç potansiyeline döndükten sonra 20 ms bekleyip aynı şekildeki ikinci puls uygulanmıştır. $\Delta t =20$ ms olmak üzere aynı protokol 300 ms'ye kadar uygulanmıştır. İlk pulsun akım değerine oranlanarak değerlendirilmiştir.

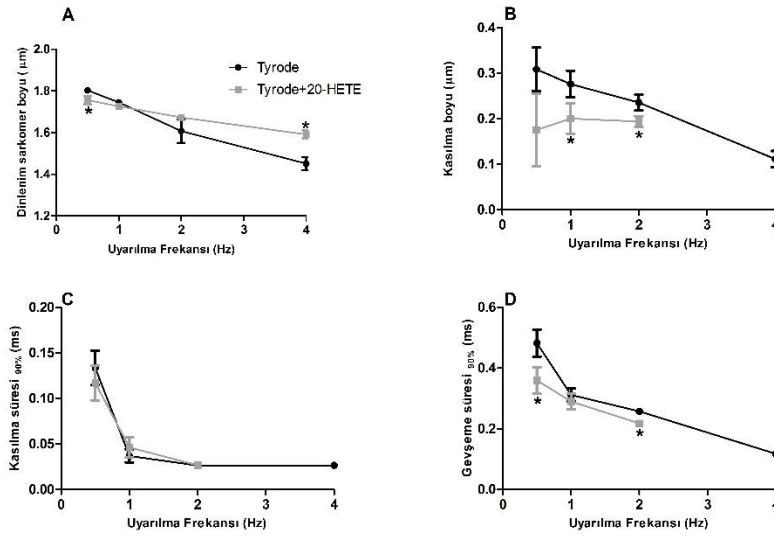
İstatistiksel Analiz: Bu çalışmada, istatistiksel karşılaştırma tekrarlı ölçüm Student's t-test analizi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular

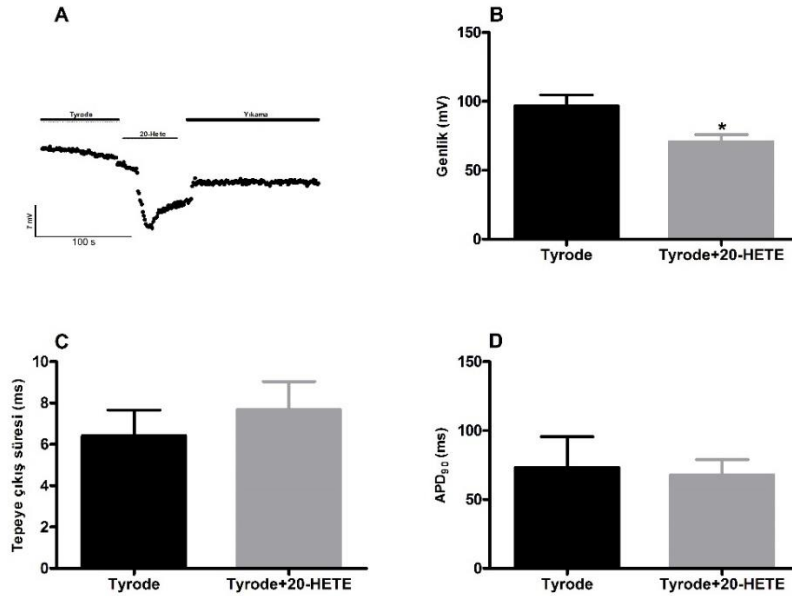
Kardiyomiyositlerin işlevsel kasılma kinetikleri, elektrik alan altında uyarımı ile sarkomer boyu kısalma parametreleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Şekil 1'de ölçülen kısalma parametrelerinin uyarı frekansına karşı ölçüm değerleri grafik olarak sunulmuştur. 20-HETE uygulaması sonrasında dinlenim durumunda kardiyomiyosit sarkomer boyları kontrol şartlarına göre 0.5 Hz uyarım altında azalmış, 4 Hz uyarımı altında yüksek bulunmuştur. Bu farklılık, kontrol şartlarında uyarı frekansı ile kısalan sarkomer boyu değişim paterninin 20-HETE uygulaması ile azalması nedeniyle olduğu görülmektedir (Şekil 1a). Kalbin sistolik işlevini değerlendirmek için kısalma parametreleri uyarım frekansına karşı gösterimi Şekil 1b'de özetlenmiştir. 20-HETE uygulaması sonrası sarkomer kısalma boyu uygulama öncesine göre ölçülebilen tüm frekanslarda anlamlı derecede düşmüştür. Aynı zamanda, kontrol koşulunda artan frekansa göre kısalma boylarında gözlenen düşüş 20-HETE uygulaması sonrası gözlenmemiştir. Diğer yandan, 4 Hz uyarım frekansında hücrelerin uyarılmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, 4 Hz frekansında uygulama sonrası veriler verilememiştir. Kısalma kinetikleri incelendiğinde kasılma sürecinde (Şekil 1c) değişim gözlenmezken, 20-HETE uygulaması sonrası gevşeme sürecinin (Şekil 1d) kısıldığı görülmüştür.

Kasılmada yukarıda bahsedilen değişikliklerin olması uyarılma-kasılma çiftlenimi çerçevesinin bir diğer ayağı olan uyarılma kısmının incelenmesi gerekliliğini doğurmuştur. 20-HETE'nin AP üzerine olan etkisine bakıldığında, tepeye çıkış süresi ve repolarizasyon süresi bakımından bir etkisinin olmadığı bulgusuna ulaşılmıştır (Şekil 2c ve 2d). Bununla birlikte AP genliği (Tyrode: 96.64±8.06 mV, Tyrode+20-HETE: 70.81±4.99mV) üzerine azaltıcı bir etkisi olduğu ölçülmüştür (Şekil 2b). 20-HETE uygulaması bitirilip banyo solüsyonu ile yıkama yapıldığında ise genlik parametresinin başlangıç düzeyine ulaşamasa da arttığı gözlenmektedir (Şekil 2a).

AP üzerine olan etkilerini açıklayabilmek adına I_{Na} ve kinetikleri ölçüldüğünde 20-HETE'nin akım yoğunluğunu azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3a). Maksimum akım yoğunluğunu gözlemlediğimiz potansiyeller için; Tyrode: 57.01 pA/pF'den Tyrode+20-HETE: 43.81 pA/pF'ye kadar azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır. I_{Na} kinetikleri incelendiğinde, 20-HETE uygulaması sonucunda deaktivasyon kinetiğinin daha negatif potansiyellere kaymasından dolayı kanalın daha erken bir şekilde kapanacağı (Şekil 3b ve Tablo 1), bununla birlikte 20-HETE uygulaması ile reaktivasyon kinetiğinin uzadığı, dolayısıyla kanalın daha geç açılacağı bulgusuna ulaşılmıştır (Şekil 3c ve Tablo 1).



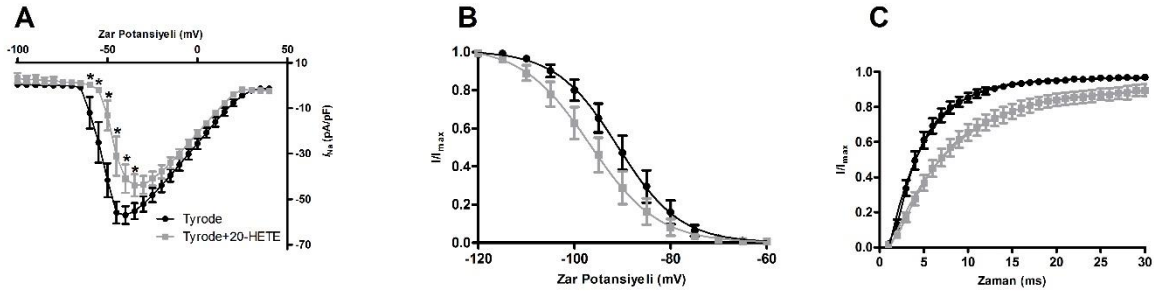
Şekil 1. 20-HETE'nin sarkomerik kılalma parametreleri üzerine etkisi. Uyarılma frekansına bağlı olarak: **a)** dinlenme sarkomer boyu, **b)** kasılma boyu, **c)** % 90 kasılma süresi ve **d)** % 90 gevşeme süresi parametrelerini göstermektedir. *Uygulama öncesi ile karşılaştırıldığında ($P \leq 0.005$).



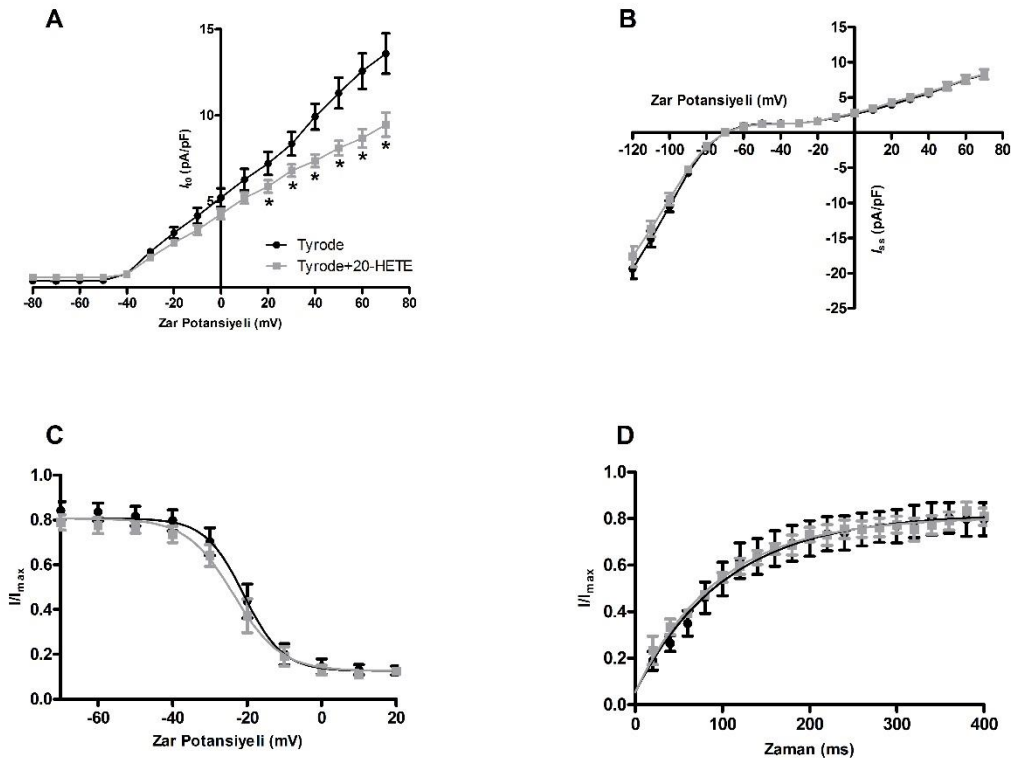
Şekil 2. 20-HETE'nin kardiyak aksiyon potansiyeli üzerine etkisi. 1 Hz uyarılma frekansında meydana gelen aksiyon potansiyelinin **a)** genlik parametresinin zamana bağlı değişimi, **b)** AP genlik değerleri, **c)** tepeye çıkış süresi ve **d)** repolarizasyon süresini göstermektedir. * Uygulama öncesi ile karşılaştırıldığında ($P \leq 0.005$). APD₉₀: Aksiyon potansiyeli repolarizasyon süresinin %90'lık süresi.

AP repolarizasyon evresinin ilk kısmında (Faz 1) etkili I_{to} genliklerinde (Tyrode: 13.59 pA/pF, Tyrode+20-HETE: 9.47 pA/pF) azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.A). Diğer yandan, I_{to} kinetikleri üzerine 20-HETE'nin bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4c, 4d ve Tablo 1). Bununla birlikte, dinlenme zar potansiyelini ve AP repolarizasyon süresini doğrudan belirleyen I_{ss} yoğunluğu ve içe doğrultucu K^+ akımı yoğunluğu (I_{K1}) üzerine 20-HETE uygulamasının bir etkisinin olmadığı

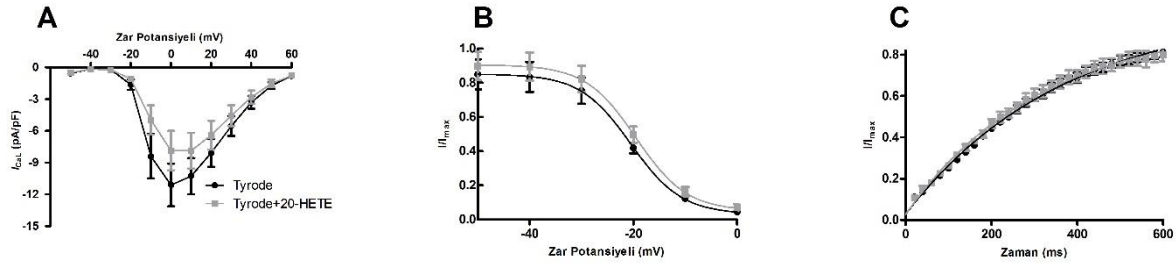
tespit edilmiştir (Şekil 4.B). Şekil 4B'de görülen I-V karakteristiğinin -120 ve -50 mV arasında bulunan akım yoğunluğu değerleri I_{K1} hakkında bilgi vermektedir. I_{CaL} yoğunluğu genliklerinde 20-HETE I_{CaL} yoğunluğu genliklerinde bir azalışa neden olsa da bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 5a). Bunun yanı sıra 20-HETE'nin kanal kinetikleri üzerine ise hiçbir etkisi olmadığı bulgusuna ulaşılmıştır. (Şekil 5b, 5c ve Tablo 1).



Şekil 3. 20-HETE'nin voltaja bağımlı Na^+ kanal akım yoğunluğu (I_{Na}) ve kanal kinetikleri üzerine etkisi. **a)** voltaja bağımlı Na^+ kanalından ölçülen akım yoğunluğu-voltaj karakteristiği, **b)** potansiyel bağımlı kanal kinetiği olan deaktivasyon ve **c)** zaman bağımlı kanal kinetiği olan reaktivasyon parametrelerini göstermektedir. *Uygulama öncesi ile karşılaştırıldığında ($P \leq 0.005$). b ve c şekillerinde gösterilen deaktivasyon ve reaktivasyon kinetiklerinin matematiksel fit eğrilerinden hesaplanan LogEC_{50} ve zaman sabiti değerleri Tablo 1'de verilmiştir. I_{Na} (pA/pF): Voltaja-bağımlı Na^+ kanalından ölçülen Na^+ akım yoğunluğu.



Şekil 4. 20-HETE'nin voltaja bağımlı K^+ kanal akım (I_{to} ve I_{ss}) yoğunluğu ve kanal kinetikleri üzerine etkisi. **a)** voltaja bağımlı K^+ kanalından ölçülen geçici dışa doğru K^+ akım yoğunluğu-voltaj karakteristiği, **b)** voltaja bağımlı K^+ kanalından ölçülen düzgün kararlı K^+ akım yoğunluğu-voltaj karakteristiği **c)** potansiyel bağımlı kanal kinetiği olan deaktivasyon ve **d)** zaman bağımlı kanal kinetiği olan reaktivasyon parametrelerini göstermektedir. *Uygulama öncesi ile karşılaştırıldığında ($P \leq 0.005$). c ve d şekillerinde gösterilen deaktivasyon ve reaktivasyon kinetiklerinin matematiksel fit eğrilerinden hesaplanan LogEC_{50} ve zaman sabiti değerleri Tablo 1'de verilmiştir. I_{to} (pA/pF): Voltaja-bağımlı K^+ kanalından ölçülen dışarı doğrultucu geçici K^+ akım yoğunluğu, I_{ss} (pA/pF): Voltaja-bağımlı K^+ kanalından ölçülen düzgün kararlı K^+ akım yoğunluğu. İçeri doğrultucu K^+ akımı (I_{K1}), I_{ss} eğrisinin içerisindeki -120 ile -50 mV arasındaki veriler hesaplanarak değerlendirilmiştir.



Şekil 5. 20-HETE'nin voltaja bağımlı Ca^{2+} kanal akım (I_{CaL}) yoğunluğu ve kanal kinetikleri üzerine etkisi. **a)** voltaja bağımlı Ca^{2+} kanalından ölçülen akım yoğunluğu-voltaj karakteristiği. **b)** potansiyel bağımlı kanal kinetiği olan deaktivasyon ve **c)** zaman bağımlı kanal kinetiği olan reaktivasyon parametrelerini göstermektedir. *Uygulama öncesi ile karşılaştırıldığında ($P \leq 0.005$). b ve c şekillerinde gösterilen deaktivasyon ve reaktivasyon kinetiklerinin matematiksel fit eğrilerinden hesaplanan LogEC50 ve zaman sabiti değerleri Tablo 1'de verilmiştir. I_{CaL} (pA/pF): Voltaja-bağımlı Ca^{2+} kanalından ölçülen L-tipi Ca^{2+} akım yoğunluğu.

Tablo 1. 20-HETE uygulaması öncesi (tyrode) ve 20-HETE uygulaması sonrası (tyrode+20-HETE) voltaja bağımlı Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} kanal akımları deaktivasyon ve reaktivasyon parametreleri

Akım	Deaktivasyon (LogEC50)		Reaktivasyon (Zaman Sabiti)	
	Tyrode (mV)	Tyrode + 20-HETE (mV)	Tyrode (1/s)	Tyrode+20-HETE (1/s)
I_{Na}	90.95±0.78	96.76±1.11 *	0.2446±0.0091	0.1414±0.0098 *
I_{K}	22.64±1.09	25.04±1.17	0.0105±0.0022	0.0095±0.0012
I_{CaL}	20.46±1.47	19.47±1.43	0.0027±0.0002	0.0032±0.0003

*Uygulama öncesi ile karşılaştırıldığında ($p \leq 0.005$). I_{Na} : voltaja-bağımlı Na^+ kanal akım yoğunluğu, I_{K} : voltaja-bağımlı K^+ kanal akım yoğunluğu, I_{CaL} : voltaja-bağımlı Ca^{2+} kanal akım yoğunluğu.

Tartışma

Araşidonik asit'in fizyolojik olarak aktif metabolitlerinden olan 20-HETE vasküler sistemi üzerine etkilerini inceleyen birçok araştırmaya konu olmasına karşın kardiyomyosit işlevine yönelik araştırmalar kısıtlı düzeyde kalmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli kardiyovasküler patolojiler de koruyucu yönde etkisi bildirilirken (13, 14), hastalıkların patogenezinde rol aldığı gibi etkiler de raporlanmıştır (7, 15).

Bu çalışma, 20-HETE'nin kardiyomyosit uyarılma-kasılma çiftlenimi üzerine etkilerinin ilk kanıtlarını sunmaktadır. 20-HETE hem kasılma hem de uyarılma parametrelerine akut inkübasyon ile önemli etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu yargıya, elektrik alan altında gözlenen kasılma parametreleri ve voltaj kenetleme ile kaydedilen akımların sonuçları incelendiğinde ulaşılmaktadır. Ancak, bu etkilerin tümünü açıklamak ve karşılaştırabilmek için literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Sıçan kalbi miyositlerinde kasılma parametre sonuçlarında ilk göze çarpan verinin 20-HETE perfüzyonu sonucu 4 Hz frekansında uyarıma cevabın oluşmamasıdır (Şekil 1). Uygulama sonrası I_{Na} kinetiklerinde gözlenen ciddi değişim (Şekil 3) sonucu frekansın artması ile AP oluşumunun sekteye uğraması olarak açıklayabiliriz. İnaktivasyonun negatif zar potansiyellerine kayması ve ek olarak reaktivasyon kinetiğinin yavaşlaması (Şekil 3b ve c, Tablo 1) Na^+

kanallarının yeniden aktivasyonunu geciktirecektir. Bunun da belirli frekanslarda ardışık AP oluşumunu engelleyeceği düşünülmektedir. Bu bulguların yanında, dinlenme sarkomer boyu ve kısalma genliklerinde görülen frekansa bağlı azalmanın (Şekil 1a ve b) 20-HETE uygulaması sonucu kaybolması dikkat çeken bir durumdur. Bu olgu kasılma makinesinde Ca^{2+} duyarlılığında gerçekleşen azalmanın sonucu olarak değerlendirilebilir. Aynı zamanda gevşeme süresinde görülen yavaşlama bu olguyu desteklemektedir. Diğer yandan, I_{CaL} yoğunluğunda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, gözlenen azalmanın geçici hücre içi cevaplarında azalmaya yol açacağı göz önüne alınmalıdır. Dolayısıyla, kalbin sempatik uyarım altında savaş ya da kaç cevabını etkileyerek adaptif mekanizmanın oluşmasını engelleyecektir.

20-HETE'nin kasılma parametrelerinde gözlenen olumsuzlukları yanında, AP genliğini azaltıcı yönde olduğu bilgisi de bulgularımız arasındadır (Şekil 2a ve b). AP'yi bu şekilde etkileyebilecek durumda I_{Na} ve I_K değişiklikleri ile olabileceği literatürde birçok defa gösterilmiştir. I_{Na} 'nın akım yoğunluğunda ki azalış AP genliğini etkileyen temel faktördür (Şekil 3a). Bu durum iki şekilde olabilmektedir; açılabilir voltaja-bağımlı kanal sayısında azalma veya kanal kinetiklerinde yavaşlama. Ölçümlerimiz sonucunda reaktivasyon kinetiğinin uzadığı ve deaktivasyon kinetiği eğrisinin de daha negatif potansiyele doğru yönlendiği bulgularına ulaştık. Reaktivasyon kinetiğinin uzaması kanalın

yeniden aktive olabilmesi için daha uzun sürenin geçmesi gerektiğini ve maksimum geçirgenliğe daha geç gelebileceğini göstermektedir. Öte yandan deaktivasyon kinetiğinin daha negatif potansiyele kayması da kanalın daha erken inaktivasyon durumuna girebileceğini söylemektedir. Dolayısıyla kanal daha kısa süre açık kalabilecektir. Bu verilerin yanında I_{to} akım genliklerinde gözlenen azalma da hücre içerisindeki pozitif yük sayısının artmasına neden olacağından, iyon dengesini değiştirecek ve hücre içerisine doğru Na^+ girişinde azalama gözlenecektir. Na^+ 'da AP genliğinin oluşmasında ki başat iyon olmasından dolayı da AP genliğinde düşme gözlenecektir. AP repolarizasyon süresinde bir değişimin olmaması da elde edilen veriler ışığında açıklanabilir bir durum olarak değerlendirilebilir. I_{to} yoğunluğunda ki azalmanın dışında; kinetiğinin, I_{ss} ve I_{K1} yoğunluklarında bir değişiminin olmaması ve görece I_{CaL} yoğunluğunda gözlenen azalma AP repolarizasyon süresinde bir farklılığın gözlemlenmemesinin altında yatan nedenlerdir. Diğer yandan, I_{CaL} yoğunluğunda gözlediğimiz 20-HETE etkisini karşılaştırabileceğimiz çalışmada (16) bu akımın arttığı yönünde bulgular

sunulmuştur. Ancak, bu çalışmada kontrol koşullarında elde edilen I_{CaL} 'nin çok düşük (200 pA) olması nedeniyle 20-HETE perfüzyonun bu akımları artırmış gibi görüldüğü düşünülmektedir. Bu nedenle, çalışmamızın sonucunda ulaştığımız yargının daha gerçekçi veriler sunduğunu düşünmekteyiz.

Kardiyak elektrofizyoloji üzerine 20-HETE'nin etkilerini ortaya koyan çalışmaların hem çelişkili hem de yeterli sayıda olmaması bu konunun tek bir yöne doğru yoğun bir şekilde incelenmesini zorlaştırmaktadır. Ancak bu çalışmada, 20-HETE'nin kardiyomiyositlerin hem uyarılma hem de kasılma işlevleri üzerine etkisini bütünsel bir şekilde ele alarak literatüre önemli katkı sunmaktadır. Diğer yandan, hücre boyutunda ve akut olarak gerçekleştirilen çalışmamızın sonuçlarının tüm sistem ve uzun süreli etkilerini bu sonuçlardan elde etmek hatalı olacaktır. Bu nedenle, 20-HETE'nin kardiyak doku üzerine etkisinin elektrofizyolojik ve moleküler olarak daha kapsamlı çalışmalarla incelenmesi bir bütünlük çerçevesinde molekülün fizyolojik etkileri daha net bir şekilde ortaya konulabilecektir.

Kaynaklar

- Sun CW, Alonso-Galicia M, Taheri MR, et al. Nitric oxide-20-hydroxyeicosatetraenoic acid interaction in the regulation of K^+ channel activity and vascular tone in renal arterioles. *Circ Res* 1998; 83: 1069-1079.
- Ito O, Nakamura Y, Tan L, et al. Expression of cytochrome P-450 4 enzymes in the kidney and liver: regulation by PPAR and species-difference between rat and human. *Mol Cell Biochem* 2006; 284: 141-148.
- Zordoky BN, Aboutabl ME, El-Kadi AO. Modulation of cytochrome P450 gene expression and arachidonic acid metabolism during isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 2277-2286.
- Lv X, Wan J, Yang J, et al. Cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibition reduces cardiomyocyte apoptosis via activation of ERK1/2 signaling in rat myocardial ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2008; 596: 118-126.
- Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism, *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 273-283.
- Gross ER, Nithipatikom K, Hsu AK, et al. Cytochrome P450 omega-hydroxylase inhibition reduces infarct size during reperfusion via the sarcolemmal KATP channel. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 1245-1249.
- Bao Y, Wang X, Li W, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid induces apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes through mitochondrial-dependent pathways. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57: 294-301.
- Certikova Chabova V, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, et al. Combined inhibition of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation and of epoxyeicosatrienoic acids degradation attenuates hypertension and hypertension-induced end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. *Clin Sci (Lond)* 2010; 118: 617-632.
- Yousif MH, Benter IF, Roma RJ. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid play a role in the enhanced cardiac dysfunction in diabetic rats following ischaemic reperfusion injury. *Auton Autacoid Pharmacol* 2009; 29: 33-41.
- Althurwi HN, Maayah ZH, Elshenawy OH, El-Kadi AO. Early changes in cytochrome P450s and their associated arachidonic acid metabolites play a crucial role in the initiation of cardiac hypertrophy induced by isoproterenol. *Drug Metab Dispos* 2015; 43: 1254-1266.
- Elkhatali S, El-Sherbeni AA, Elshenawy OH, Abdelhamid G, El-Kadi AO. 19-Hydroxyeicosatetraenoic acid and isoniazid protect against angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 289: 550-559.
- Alsaad AM, Zordoky BN, Tse MM, El-Kadi AO. Role of cytochrome P450-mediated arachidonic acid metabolites in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Drug Metab Rev* 2013; 45: 173-195.
- Bodiga S, Zhang R, Jacobs DE, et al. Protective actions of epoxyeicosatrienoic acid: dual targeting of cardiovascular PI3K and KATP channels. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 978-988.
- Bodiga S, Gruenloh SK, Gao Y, et al. 20-HETE-induced nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells is mediated by NADPH oxidase, H₂O₂, and PI3-kinase/Akt. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298: L564-574.
- Baines CP, Molkenin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 47-62.
- Zheng Q, Han Y, Bao Y, et al. 20-HETE increases NADPH oxidase-derived ROS production and stimulates the L-type Ca^{2+} channel via a PKC-dependent mechanism in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299: 1109-1117.