

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

SIÇAN DUYUSAL SİNİR HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KALSİYUM-BAĞIMLI
POTASYUM KANALLARININ BİYOFİZİKSEL VE FARMAKOLOJİK
YAKLAŞIMLARLA TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

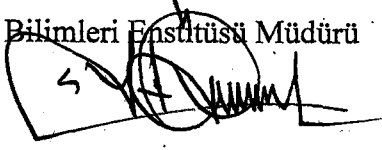
118151

K. Tuğrul KUZGUN
ELAZIĞ - 2002

ONAY SAYFASI

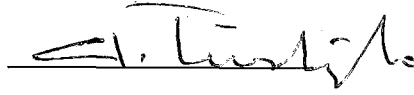
Fırat Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Prof. Dr. Halis OCAŁ

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. A. Baki TÜRKOĞLU

Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ahmet AYAR



Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

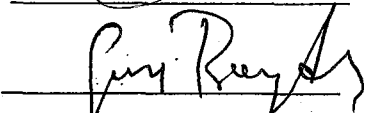
Prof. Dr. A. Baki TÜRKOĞLU



Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



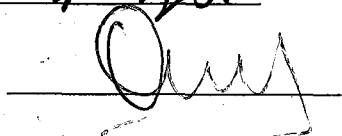
Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ.



Doç. Dr. Ahmet AYAR



Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK



KISALTMALAR LİSTESİ

μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
$[\text{Ca}]_i$	: Hücre içi serbest kalsiyum
5-HT	: Serotonin(5-hidroksi triptamin)
Ach	: Asetilkolin
ADH	: Antidiüretik hormon
ADP	: Adenozin difosfat
AgTX	: Agitoksin
AHP	: Hiperpolarize edici ard potansiyel
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BK_{Ca}	: Yüksek iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalı
Ca^{2+}	: Kalsiyum
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
cAMP	: Siklik AMP
ChTX	: Karibdotoksin
CLT	: Klotrimazol
DKG	: Dorsal kök gangliyonu
DNAz	: Deoksiribo nükleik asitaz
dTC	: d-tubokürarin
DTX	: Dentrotoksin
EGTA	: Etilen Glikol-Tetraasetikasit
GABA	: γ -aminobutirik asit
GnRH	: Ganodotropin Salıverici hormon
Gohm	: Giga ohm
G-Protein	: Guanitin Bağlayıcı Protein
H^+	: Hidrojen iyonu
HEAP	: Hiperpolarize edici ard potansiyel
IbTX	: Ayberitoksin
IK_{Ca}	: Orta iletkenlikli kalsiyum- bağımlı potasyum kanalı
InsP_3	: Inositol trifosfat

K^+	: Potasyum iyonu
K_{Ap}	: Apamin-duyarlı potasyum kanalı
K_{Ch}	: Karibdotoksin -duyarlı potasyum kanalı
KCl	: Potasyum klorür
KTK	: Kalıyotoksin
Maxi-K	: Yüksek iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalı
mg	: Miligram
Mg	: Magnezyum iyonu
mV	: milivolt
NA	: Noradrenalin
Na^+	: Sodyum iyonu
$NaHO_3$	: Sodyum bikarbonat
NGF	: Sinir büyüme faktörü
O_2	: Oksijen
pA	: Pikoamper
PKA	: Protein Kinaz A
PS	: Pikosimens
SK_{Ca}	: Düşük iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalı
SR	: Sarkoplazmik rekulum
TEA	: Tetraetilamonyum

ŞEKİL LİSTESİ

- | | |
|--|----|
| Şekil 1. Ayberiyotoksinin (30nM) aksiyon potansiyeli HEAP pik amplitüt değerine ve bu potansiyelin % 63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkisi | 48 |
| Şekil 2. Ayberiyotoksinin (50nM) aksiyon potansiyeli HEAP pik amplitüt değerine ve bu potansiyelin % 63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri | 49 |
| Şekil 3. Paksilinin (1µM) aksiyon potansiyeli HEAP pik amplitüt değerine ve bu potansiyelin % 63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri | 50 |
| Şekil 4. Paksilinin (10µM) aksiyon potansiyeli HEAP pik amplitüt değerine ve bu potansiyelin % 63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri | 51 |
| Şekil 5. Paksilinin (30µM) aksiyon potansiyeli HEAP pik amplitüt değerine ve bu potansiyelin %63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri | 52 |

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
1. ÖZET	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ	3
3.1 .Kalsiyum-bağımlı potasyum kanal alt tipleri	3
3.1.1. Yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları	4
3.1.2. İyon geçirgenliği	4
3.1.3. Kalsiyum bağlayıcı bölgelerin kapı özellikleri kalsiyum duyarlılığı ve seçiciliği	5
3.1.4. Yüksek iletkenlikli $Ca(2+)$ -bağımlı K kanallarının voltaj bağımlılığı	7
3.1.5. Düşük iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları	7
3.1.6 Orta iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları	8
3.2. Diğer kalsiyum bağımlı potasyum kanalları	8
3.3. Nöronlarda kalsiyum bağımlı potasyum kanalları	9
3.4. Hiperpolarize edici ard potansiyellerin altında yatan kalsiyum-bağımlı potasyum akımları	10
3.5. Memeli nöronlarında kalsiyum bağımlı potasyum akımları	11
3.6. Yavaş hiperpolarize edici ard potansiyel akımının yavaş zaman sabiti	16
3.7. Kalsiyum bağımlı potasyum akımının modülasyonu	17
3.8. Geçirgenlikleri ve kalsiyum duyarlılıkları	19
3.9. Yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının yapısı	20
3.10.Kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının farmakolojisi	21
3.10.1. Tremorgenik alkaloidler	24
3.10.2. Ayberiyotoksin ve karibdotoksinin potasyum kanallarını bloklama mekanizması	29
3.10.3. Ayberiyotoksinin dış yüzdeki yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalını bloklaması	30
3.11. Kalsiyum-bağımlı potasyum kanallarının fizyolojik rolleri	30
3.11.1 Kalsiyum-bağımlı potasyum kanallarının damarlarının gevşemesinde	31

rol oynaması	
3.11.2 Düşük iletkenlikli kanallar kolinerjik inhibisyona aracılık eder	31
3.11.3 Diğer fizyolojik roller	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM	34
4.1. Sıçan dorsal kök gangliyon hücrelerinin primer kültürü	34
4.1.1. Kültür solüsyonu ve kullanılan kimyasal ajanlar	34
4.1.2. Kültür vasatı	35
4.1.3 Hücre Kültürü için genel prensipler	35
4.1.4 DKG Hücre Kültürü protokolü	35
4.2. Elektrofizyoloji	38
4.2.1 Akım kenetleme deneylerinde kullanılan kayıt solüsyonları	40
4.3. İlaç uygulaması	42
4.4 Aksiyon potansiyellerinin kayıt edilmesi	43
4.5 Veri analizi	44
5. BULGULAR	46
5.1. Aksiyon potansiyellerinin kaydedilmesi	46
5.2. Aksiyon potansiyeli-ard potansiyellerinin farmakolojik ve biyofiziksel olarak tanımlanması	46
5.3 Ayberiyotoksinin hiperpolarize edici ard potansiyeller üzerine etkisi	47
5.4. Paksilinin hiperpolarize edici ard potansiyeller üzerine etkisi	49
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZGEÇMİŞ	67
9. TEŞEKKÜR	68

1. ÖZET

Bu çalışmanın amacı sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) sinir hücrelerinde paksilinin ve iberiotoksinin kalsiyum bağımlı potasyum kanallarına etkilerini belirlemektir. Sıçan dorsal kök düğümleri yeni doğan sıçanlardan diseke edilerek enzimatik ve fiziksel muamelelerle izole tek hücrelere ayrıştırıldı ve sinir büyüme faktörü içeren kültür vasatı içerisinde 37 °C de % 5 karbondioksit içeren nemli bir inkübatörde kültüre edildi. Bu hücrelerden patch kenetleme tekniğinin akım kenetleme kayıt formu kullanılarak aksiyon potansiyelleri kayıt edildi. Kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının zıtlanma potansiyelleri tespit edildi. Paksilin ve iberiotoksin hiperpolarize edici ard potansiyelleri doz bağımlı olarak anlamlı derecede inhibe etti. Bu çalışmanın sonuçları sıçan arka kök düğüm sinir hücrelerinde iberiotoksin ve paksilinin aksiyon potansiyeli ard potansiyellerini kalsiyum bağımlı potasyum kanallarını bloklayarak inhibe ettiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Aksiyon potansiyeli, paksilin, iberiotoksin, hücre kültürü, patch kenetleme, kalsiyum bağımlı potasyum kanalı.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of paxillin and iberiotoxin on calcium-activated potassium channels in cultured rat dorsal root ganglion neurones. Dorsal root ganglia were dissected out and isolated as single cells by enzymatic and physical procedures and placed in humidified incubator containing % 5 CO₂ at 37° C. Actions potentials were recorded from these cells using the whole cell current clamp mode of the patch clamp technique. Reversal potential of the calcium-activated potassium channels were determined. Application iberiotoxin and paxillin significantly inhibited afterhyperpolarisation in a dose dependent manner. Result from this study indicates that, iberiotoxin and paxillin inhibits action potential after hyperpolarisations in cultured rat dorsal root ganglia neurones by blocking calcium-activated potassium channels.

Key words: Action potential, paxillin, iberiotoxin, cell culture, patch clamp, calcium-activated potassium channel

3. GİRİŞ

3.1. Ca^{2+} -Bağımlı K^+ Kanallarının Alt Tipleri

Hücre zarının iç yüzündeki kalsiyumun membrandan potasyum akışını düzenleyebildiği ilk defa alyuvar hücrelerinde Gardos tarafından gösterilmiştir (19). Daha sonra Meech ve Strumwasser bu konuya daha direkt bir yaklaşım gerçekleştirdi ve hücreye kalsiyumun mikro enjeksiyonunun bir *Aplysia* nöronunun hücre zarını hiperpolarize edebildiğini gösterdi (41). Membranın bu cevabının zar iletkenliğindeki bir artıştan kaynaklandığı ve bu membran akımının zıtlanma potansiyeli kullanılarak yapılan çalışmalar bu akımın K^+ kanal iletkenliğinden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda bir Ca^{2+} -bağımlı K^+ iletkenliği ($G_{\text{K}(\text{Ca})}$) tanımlandı ve bu iyon kanallarının esas rolünün belki de zar iletkenliği ile hücre metabolizması arasında bir bağlantı kurmak olduğu önerildi. Patch kenetleme çalışmaları ve diğer teknikler kullanılarak hücre içi kalsiyum birkaç farklı K^+ kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir (11). Kanal iletkenliği, kalsiyuma olan duyarlılığı, voltaj bağımlılığı ve farmakolojik özellikler bu kanal ailesinin farklı alt tiplerinin ayrımı için kullanıldı. Birkaç pikosimensden birkaçyüz pikosimenslere kadar olan kanal iletkenlik sahaları kalsiyum-bağımlı potasyum kanallarını ($\text{K}_{(\text{Ca})}$) gruplandırmak için kullanılan özelliklerden biridir (11). Bu kanallar, düşük iletkenlikli (9, 10, 11) ve yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları (BK ya da maksik) (48) ve orta-iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalları (IK_{Ca}) olarak

sınıflandırılabilirler. Hücrelerde ve dokularda dağılmış bulunan bu kanallar bezlerde salgılamada, bazı nöronlarda ve kas tüpcüklerinde tekrarlamalı aksiyon potansiyeli ateşlemelerinde, hiperpolarize edici ard potansiyellerde (HEAP) önemli bir rol oynar.

3.1.1. Yüksek iletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanalları

Yüksek iletkenliklerinden dolayı, en iyi çalışılan $\text{K}_{(\text{Ca})}$ kanalları maks K^+ kanallarıdır. 100- 140 mM simetrik KCl de iletkenlikleri 130-300 pS arasında değişen bu kanallar ilk önce hem hücre zarlarında hem de planar lipid bilayerlerinde gözlemlendi. Bu kanallar nöronlarda, çizgili ve düz kasda (7, 37) endokrin ve ekzokrin bezde, böbrek tübüllerinde (21), ve koroid sinir liflerinde (17) bulunmaktadır. Bazı durumlarda maks- K kanallarının rolü net olmasa da, bu kanalların endokrin ve ekzokrin bezlerde salgılanımın ayarlanmasına katkıda bulundukları patch kenetleme çalışmaları ile gösterilmiştir (38).

3.1.2. İyon geçirgenliği

Birçok maks-K kanalı, bir gözenek için farzedilen sınır değere yakın olan yüksek bir iletkenliğe ve bununla birlikte yüksek bir katyon seçiciliğine sahiptir (30). Bu durum paradokstur çünkü yüksek bir seçicilik seçici filtreli geçirgen güçlü iyon etkileşimlerini işaret eder (49). Bu kanallar bir seçicilik dizisine sahiptir ($\text{TI}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+, \text{Na}^+, \text{Li}^+$). Na^+ ve K^+ arasındaki geçirgenlik oranı 0.01 den azdır (9). Bundan dolayı, maks- K^+ kanalları sinir ve kas hücrelerinin gecikmiş doğrultucu kanalları kadar seçicidir, fakat maks-K kanallarının iletkenliği 10 ila 50 kat daha

büyüktür. Diğer taraftan, kanal girişlerinin sabit bir negatif yük içerdiğine ilişkin delil kuvvetlenmektedir.

Bu özellikler (maks-K⁺ kanallarının çoklu iyon kanalları olması ve geçitlerinde sabit bir negatif yük içermesi) iyon iletimi mekanizmasını açıklamaya yardım eder ve maks-K kanallarının yüksek iletkenliğini izah edebildi. Düşük iyon konsantrasyonlarında iletkenlik yüksektir, çünkü kanal girişlerinde yüklerle oluşturulan negatif potansiyel katyonları toplar (38).

3.1.3 Kalsiyum bağlayıcı bölgelerin kapı özellikleri, kalsiyum duyarlılığı ve kalsiyum seçiciliği

Maksi-K⁺ kanallarının kapı kinetikleri, bir kanalın tamamen açılması için birkaç Ca²⁺ iyonunun bağlanmasını gerektirir (6). Diğer iki değerli katyonların yokluğunda, açık durum ihtimalini en iyi şekilde tanımlayan Hill katsayılarının 2 ve 4 arasında değişmesi, kanal açılması için en azından 2-4 kalsiyum iyonunun gerekli olduğuna işaret eder (6). Bununla beraber, iç taraf üzerindeki Mg²⁺ un milimolar miktarlarının varlığında Hill katsayıları 6 ya kadar artabilir ve Ca²⁺ için kanalın görünen eğiliminde bir artış gözlemlenir (22). Ca²⁺un yokluğunda, magnezyum kanalı aktive etmemektedir.

Ca²⁺ konsantrasyonundaki değişikliğe olan maksimum hassasiyet farklı hücre tiplerindeki maks-K⁺ kanallarında büyük ölçüde değişti. Bundan dolayı, memeli tükrük bezlerinde Ca²⁺un yokluğunda zar depolarizasyonun maks-K⁺ kanalının açılmasını sağlayabilir (47). Bu hücrelerde, hücre içi serbest kalsiyum ([Ca²⁺]_i) miktarındaki değişikliklere olan maksimum hassasiyet 10⁻⁸- 10⁻⁷ molar sınırındadır (44).

Ters olarak, kültür edilmiş rat kasında maksimum aktivasyon 10^{-6} - 10^{-4} molar $[Ca^{2+}]$ sahasında bulunur (6). Kromaffin hücrelerde ve ön hipofiz bezinde 10^{-8} molarlık bir $[Ca^{2+}]$ da kanal açılmaları, -20 ve -40 mV arasındaki zar potansiyellerinde görülebilir. Proteinle biçimlenmiş kanalın çevresindeki lipid tipi, Ca^{2+} duyarlılığını kontrol edebilir (44). Negatif yüklü lipidler görünen Ca^{2+} hassasiyetini artırır.

İlginç şekilde, spinal nöronlarda Ca^{2+} hassasiyeti hücre gelişimine bağlıdır. Olgunlaşmış hücrelerde yükselen $[Ca^{2+}]$ açılma ihtimalini arttırmasına karşın, genç nöronlarda Ca^{2+} hassasiyeti düşüktür ya da hiç yoktur (8). Kalsiyum hassasiyetindeki bu artış, bu hücrelerdeki aksiyon potansiyelinin Ca^{2+} -bağımlı plato evresinin kayboluşuyla ilişkilidir (44).

Bazı +2 yüklü katyonlar rat kas hücre zarından alınan maks-K kanallarının agonistleri olarak çalışılmıştır. İç yüzdeki Ca^{2+} 'ın yokluğunda, bu iyonların kanal aktivasyonundaki etkinlikleri $Cd^{2+} > Sr^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Co^{2+}$ dır ve kadyimun. kanal aktivasyonunda Ca^{2+} dan 100 kat daha az etkilidir. Kanalı aktive eden kabiliyetin katyon hacmine bağlıdır, sadece 0.072 nm (Co^{2+}) den daha büyük 0.113 nm (Sr^{2+}) den daha küçük çaplı katyonlar kanalı aktive edebilir ayrıca maks- K kanallarının Ca^{2+} -bağlayıcı bölgeleri, kalmodulin ve troponin C gibi kalsiyum-bağlayıcı proteinlere benzer (44). Ca^{2+} 'un mevcudiyetinde, bazı +2 değerli katyonlar, iskelet kası maks- K kanalının Ca^{2+} aktivasyonunu kuvvetlendirir (22). Cd^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ve Ni^{2+} Ca^{2+} aktivasyon eğrisi için Hill katsayısını arttırdı. Özellikle Ni^{2+} , Mg^{2+} için aynı etkiye sahiptir (22). Nikelin kendisi bir kanal aktivatörü değildir, fakat Ca^{2+} un açılma

ihtimalini artırma yeteneğini kuvvetlenir, işte bu sonuçlar kanal aktivasyonunu kontrol eden bir iç modülatör bölgenin varlığını işaret eder (44).

3. 1. 4. Yüksek İletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanallarının Voltaj Bağımlılığı

Maksi- K^+ kanalları voltaj bağımlıdır. Bu kanalların açık olma ihtimalleri, kas hücre kültürlerinde (6.) kromafin hücrelerinde, iskelet kaslarındaki kanallarda 11-15 mV arasında yaklaşık 2.7 kat artar, hipofiz hücre sırasında ve düz kasda 9 mV da yine yaklaşık 2.7 kat artar (23)

3. 1. 5. Düşük İletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanalları

SK kanalları, simetrik 140 mM KCl mevcudiyetinde 80 pS'den daha düşük iletkenliklere sahip $\text{K}_{(\text{Ca})}$ kanallarıdır. Kültür edilmiş rat iskelet kasında, 4 ve 12 pS lik iletkenliklere sahip SK kanalları bulunmaktadır (9). Burada bulunan her iki SK_{Ca} kanalı da Ca^{2+} a birlikte bulunduğu maksi- K^+ kanallarından daha fazla duyarlıdır ve bundan dolayı Ca^{2+} un daha düşük milimolar konsantrasyonlarıyla aktive edilebilir. 12 pS lik kanal aslında voltaj-bağımsızdır, K^+ için çok seçicidir, ve tetraetilamonyum (TEA) ile de bloklanamaz (38). Bu SK kanalı kas iççiklerinde hiperpolarize edici ard potansiyelleri açıklamak için gerekli özelliklere sahiptir. Rat kasında bulunmuş 9- 14 pS lik bir iletme sahip olan bir SK kanalı Ca^{2+} a çok hassastır, fakat TEA ile bloklanır (36). Aplysia nöronları 35-pS'lik bir SK kanalına sahiptir. Sıfır mV da ve bir mikromolar Ca^{2+} da kanalın açık olma ihtimali (P_o) 0.86 dır ve bu P_o 44 mV

depolarizasyonla yaklaşık 2.7 kat artar ve kanal aktivitesi 2-5 mM dış kaynaklı TEA ile tamamen bloklandı.

3.1.6 Orta İletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanalları

Orta iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalları (IK_{Ca}), tahminen 30 pS'lik tek kanal iletkenliğine sahiptir, bu kanalların negatif dinlenim zar potansiyellerinde aktif olduğu düşünülür ve bu kanallar gerime duyarsızdır, ayrıca kalsiyuma olan duyarlılığı zar potansiyeline bağlı değildir (28, 29). Orta iletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarının Slack ve Slo alt ünitelerinin teşekkülünden oluştuğu bilindi. Bunların tam farmakolojik özellikleri, tek başına her iki alt ünitenin farmakolojik özelliklerine uymaz. Bu kanalların bazı bölgelerde iletkenliğinin 70pS e kadar çıktığı görülmüştür. Çeşitli nöronlarda, bu kanalların CTX veya TEA, ya da her ikisiyle bloklandığı görülür (51).

3.2. Diğer Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalları

Daha önceden Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarının sınıflandırılmasının üç farklı tip içerdiği belirtilmişti (14, 38). Yüksek iletkenlikli (100-250 pS) Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalları ki bunlar karibdotoksinin nanomolar konsantrasyonlarıyla inhibe edilir (6). Düşük iletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalları (<80 pS) bunlar da apaminin nanomolar konsantrasyonlarıyla inhibe edilirler (9). Bu ailenin üçüncü bir sınıfı 18-60pS iletkenliklere sahip orta-iletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarıdır ki bunlarda nanomolar konsantrasyondaki karibdotoksin ile inhibe edilmektedirler (25).

K_{Ap} kanalları, düşük iletkenlikli apamin- duyarlı SK kanallarına benzer özelliklere sahiptir (38). K_{Ch} kanalları ise 18 pS lik bir iletkenliğe sahiptir, bu değer ise hem düşük iletkenlikli hem de orta iletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarına uygun düşmektedir. Bununla birlikte, K_{Ch} kanalları SK kanallarından farklı olarak, apaminle inhibe edilmez ve karibdotoksine incelenmiş IK kanallarından yüzlerce kez daha az duyarlıdır (14). Bundan dolayı, K_{Ch} kanalları açık bir şekilde BK ve SK kanallarından farklıdır aynı şekilde farmakolojik olarak incelenmiş IK kanallarından da farklıdır. K_{Ch} kanalları iç zar yüzündeki $[Ca^{2+}]$ daki 0.1-1 μM lık bir artışla aktive edilirken K_{Ap} kanalları yalnızca 0.5 μM dan büyük bir $[Ca^{2+}]$ ile aktive edilir. K_{Ch} kanallarının ayrıca rat aortunun endotheliumundaki ACh-uyarımli hiperpolarizasyona karıştığı da tahmin edilmektedir(40).

3.3. Nöronlarda Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanalları

Birçok nöronda, aksiyon potansiyellerini birkaç saniye sürebilen bir hiperpolarizasyon izler. Bu hiperpolarize edici ard potansiyel bazı fazlara sahiptir. Bu fazların her biri, K^+ kanallarının farklı tiplerinin aktivasyonu ile oluşur. Hemen izleyen aksiyon potansiyelinde, hızlı bir hiperpolarizasyon vardır. Bu hiperpolarizasyon 1-10 ms arasında sürer ve başlıca voltaj kapılı K^+ akımlarının aktivasyonundan kaynaklandı. Bazı nöronlarda, hızlı bir Ca^{2+} -bağımlı K^+ akımı da bu unsura iştirak eder. İzleyen hızlı hiperpolarizasyonda uzamış bir faz bulunabildi. Bu faz birkaç yüz milisaniyeden birkaç saniyeye kadar sürebildi. İşte bu faz, aksiyon potansiyeli sırasındaki ikincil Ca^{2+} girişinden kaynaklanan Ca^{2+} -bağımlı K^+ iletiminin aktivasyonundan dolayıdır. Bu daha yavaş faz genellikle hiperpolarize

edici ard potansiyel (HEAP) olarak adlandırıldı. HEAP in başlıca iki fonksiyonu vardı. Nöronun ateşleme frekansını sınırlar ve aksiyon potansiyeli-frekans uyum fenomeninin oluşumundan sorumludur.

Memeli sinir sistemlerinde, beyin kesitlerinde ve periferik gangliyanın nöronlarında HEAP çalışılmış ve bu hücrelerde tek veya çok yönlü aksiyon potansiyellerini izleyerek oluşan HEAP'ler iki ana tipe ayrılabilirler (51, 53). İlk tip aksiyon potansiyelini izleyerek nispeten hızlı bir başlangıca sahiptir ve elli ile birkaç yüz milisaniye arasında sürer. Diğer tip (ki bu tek aksiyon potansiyelinden sonra sık görülmez) yavaş yükselen bir faza sahiptir ve birkaç saniye sürer. Bu iki HEAP bazen orta ve yavaş HEAP olarak isimlendirildi. Bazı nöronlarda, her iki tip HEAP görülebilirken, bazı nöronlarda yalnız bir tip mevcuttur. Ca^{2+} -bağımlı akımın hiperpolarizasyonun her üç fazını oluşturduğu açıktı.

3.4. Hiperpolarize Edici Ard Potansiyellerin Altında Yatan Ca^{2+} -bağımlı K^+ Akımları

Voltaj-kenet çalışmaları, hiperpolarize edici ard potansiyellerin altında yatan akımların iki farklı tipe ayrılabilirliğini göstermişti. Birinci akım aksiyon potansiyelini izleyerek hızlı bir şekilde (1-5 ms) zirve değerine ulaşır, ve 100-200 ms lik bir zaman sabitiyle eksponansiyel bir şekilde zayıflar (51, 53). Bu akım zar potansiyeline duyarsızdır ve hücre dışı TEA'un düşük milimolar konsantrasyonlarıyla bloklanamaz; bununla beraber, bu akım apamin ile bloklanır (51, 53).

Akımın diğeri tipi, birkaç yüz milisaniyelik bir zaman sabitiyle bir pik yapar ve 1-2 sn lik bir zaman sabitiyle zayıflar (52, 53). Bu akım da zar potansiyeline duyarsızdır ve yine TEA ile bloklanmaz, fakat, öncekinden farklı olarak apamine duyarsızdır. Bu akım, bir takım nörotransmitterlerle amplitüdde zayıflatıldı. Bu daha yavaş akımın apamine duyarsızlığı yetersiz apamin girişiyle izah edilemez, çünkü akımın her iki tipi bazı nöronlarda bir arada mevcuttur (52, 53). Hippokampal ve olfaktör nöronlarda, bu daha yavaş akıma da I_{HEAP} denildi (44,114) otonomik nöronlarda bu akım $\delta_{K(Ca)}$ (53) ve kortikal nöronlarda sHEAP olarak adlandırıldı. Bu akımın aktivasyonu apamine duyarsız HEAP ye sebep olur (53). Akımın bu iki tipi arasındaki fark sık oluşturulmamasıdır, her ikisi kısmen I_{HEAP} olarak verildi. İki akım kinetik ve farmakolojik kriterlere göre kolayca ayrılabilmesi için, apamine duyarlı akımı I_{HEAP} olarak, apamine duyarsız akıma da sI_{HEAP} dendi.

3.5. Memeli Nöronlarında Ca^{2+} -bağımlı K^+ Akımları

Orta iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalları (IK_{Ca}), tahminen 30 pS lik tek kanal iletkenliğine sahiptir, bu kanalların negatif dinlenim zar potansiyellerinde aktif olduğu düşünülür ve bu kanallar gerilime duyarsızdır ayrıca $[Ca^{2+}]$ a olan duyarlılığı zar potansiyeline bağlı değildir (28, 29). Bunların tam farmakolojik özellikleri, tek başına her iki alt ünitenin farmakolojik özelliklerine uymaz. Bu kanalların bazı bölgelerde iletkenliğinin 70pS e kadar çıktığı görülmüştür. Çeşitli nöronlarda, bu kanalların CTX veya TEA, ya da her ikisiyle bloklandığı görülür (52, 53, 54).

BK_{Ca} kanalları, yüksek, bölünmez üniter bir iletkenliğe sahiptir, gerilime duyarlı ve TEA'nın milimolar mertebesindeki konsantrasyonlarıyla bloklanır (11). Bu kanalların bazıları ayrıca karibdotoksin (CTX) ile de bloklanır (49). İstirahat membran potansiyeline yakın zar potansiyellerinde (-50 mv dan -70 mv a kadar), bu kanalların aktivasyonu için 1-10 mikromolar Ca²⁺ iyonuna ihtiyaç vardır. BK_{Ca} kanallarının aktivasyonuna karşılık gelen makroskobik akım incelendi I_c şeklinde adlandırıldı (46). Fonksiyonel olarak, I_c nin aktivasyonu aksiyon potansiyeli repolarizasyonuna ve hızlı hiperpolarizasyona katkıda bulunur ve I_c nin TEA ya da CTX ile bloklanması aksiyon potansiyeli repolarizasyonunu yavaşlatır ayrıca hızlı hiperpolarizasyonu zayıflatır. Bu kanallar HEAP oluşumuna katılmamaktadı. BK_{Ca} kanalları büyük moleküler dokulara sahiptir ayrıca voltaj-bağımlı K⁺ kanallarına biraz sınırlı benzerlik göstermesi, BK_{Ca} ve voltaj-bağımlı K⁺ kanallarının yapısal olarak ilişkili olduklarına işaret eder.

Tezat bir şekilde, SK_{Ca} kanalları daha düşük bir tek kanal iletkenliğine sahiptir (5-20 pS), zar potansiyeline duyarsızdır ve nispeten TEA da duyarsızdır . SK_{Ca} kanalları 100-400 nanomolar Ca²⁺ ile aktif olur, ve bundan dolayı SK_{Ca} kanalları negatif zar potansiyellerinde Ca²⁺ iyonuna BK_{Ca} kanallarından çok daha fazla duyarlıdır (52, 53). SK_{Ca} kanalları CTX ile etkilenmez, fakat apamin ve dTC nin yüksek konsantrasyonlarıyla bloklanır (14). Bu kanallar, önce kas hücrelerinde teşhis edildi ve çeşitli uyarılır ve uyarılmaz hücrelerde bulundu ve bu hücrelerin çoğunda , bu kanallar nörotransmitter ya da hormon hareketinin bir sonucu olarak aktive edildi. SK_{Ca} kanallarının aktivasyonunun aksiyon potansiyelleri sırasındaki içeri Ca²⁺ akışını izleyen HEAP in altında yattığı varsayılır (30).

HEAP in altında yatan akımların voltaja duyarsız olması ve TEA ya da CTX in düşük konsantrasyonlarıyla bloklanamıyor olmasından dolayı, HEAP lerin BK_{Ca} kanalları vasıtasıyla oluşturulamıyacağı açıktı.

Apamine duyarlı I_{HEAP} nin biyofizik ve farmakolojik profilinin SK_{Ca} kanallarının profiline çok benzerdir: her ikisi voltaja duyarsızdır ve TEA un düşük konsantrasyonlarıyla bloklanamaz, fakat her ikisi de apamin ile bloklanır (30). Bundan dolayı, SK_{Ca} kanallarının aktivasyonu şüphesiz bu akım için sorumludur.

I_{HEAP} 1-5 ms içinde maksimum değerine ulaştığı için, aktif K^+ kanallarının içeri K^+ akışının olduğu noktaya yakın yerleşmiş olabileceği zaman zaman tartışılmıştı. Örneğin, sitoplazmadaki Ca^{2+} un difüzyon katsayısı $18 \text{ mikrometre}^2 \text{sn}^{-1}$ olarak alınırsa ve yalnız iki boyutta difüzyon düşünüldüğünde, Ca^{2+} iyonları 5ms içinde giriş noktalarından çoğunda takriben 0.5 mikrometre yayılabilir (30). Bundan dolayı, voltaja-bağımlı kapı hareketleri olan Ca^{2+} kanallarının hangi tipinin bu akımı aktif etmek için Ca^{2+} sağladığını sormak uygundur.

Voltaj-kapılı kalsiyum kanalları, biyofizik ve farmakolojik duyarlılıklarının temelinde altı büyük gruba ayrılabilir. Bunlar N, L, P, Q, T ve resistant ya da R tipi kanallardır (62). Kalsiyum kanallarının farklı tiplerinin, farklı kalsiyum bağımlı potasyum akımlarını aktive edebildiği ihtimali ağırlıklıdır (53).

Birçok çalışma kalsiyum ve potasyum kanalları arasındaki eşlenimi incelemek için iki özelliği kullandı: (i) farklı kalsiyum bağımlı potasyum kanalları çeşitli geçici olayların altında yatar (aksiyon potansiyeli repolarizasyonu ve hiperpolarize eddici ard

potansiyel); ve (ii) birçok farklı kalsiyum kanalı, bir takım farklı farmakolojik ajanlarla bloklanır (30).

Nöronların muhtelif bir alanında, N-tipi kalsiyum kanal bloörlerinin ilavesi apamin-duyarlı HEAP in altında yatan kanalların aktivasyonundaki bir azalmayla sonuçlanır. N-tipi kanalların bloklanması ayrıca BK kanallarının aktivasyonunu ve aksiyon potansiyeli repolarizasyonunu bloklaması nöronal uyarılabilirliğin düzenlenmesinde kalsiyum kanalının tek bir sınıfının çok yönlü rol oynayabildiğini önermektedir (52, 54).

Kalsiyum-bağımlı potasyum kanallarının aktivasyonu üzerinde L-tipi kalsiyum kanallarının bloklanma etkisi, N-tipi kalsiyum kanallarının bloklanmasını izleyerek görülen etkiden çok farklıdır. Sempatik nöronlarda, L-tipi kanalların bloklanması aksiyon potansiyeli repolarizasyonunu yavaşlatması L-tipi kalsiyum kanallarının bloklanmasının BK-tipi kanallarının aktivasyonunu zayıflattığı savıyla tutarlıdır. Diğer nöron tiplerinde, L-tipi kanalın bloklanması aksiyon potansiyeli repolarizasyonu üzerinde az bir etkiye sahipti hatta bazen tamamen etkisizdi. P-tipi kanalların bloklanmasının sI_{HEAP} nin altında yatan apamin-dirençli kanalları ya da SK-tipi kanalları blokladığı gösterilmişti (61).

Çeşitli hücrelerde voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla, Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarının eşlenimi saptandı. Vagal nöronlarda, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanallarının eşleştiği tespit edilmiştir. SCG nöronlarda, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanalları eşleniktir. Lumbar sempatik zincirde, N-tipi voltaj-

kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanalları eşleniktir. Otic nöronunda, N-tipi voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanalları anatomik açıdan bitişiktir. Trigeminal nöronunda, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanalları bitişiktir. Nucleus basalisde, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanalıyla SK_{Ca} kanalları biebirlere yakın yerleşmiştir (61). Lamprey spinalde, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanallarının bitişik olduğu görülmüştür. Hypoglossal nöronunda, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanallarının bitişik olduğu saptanmıştır. CA1 piramidal nöronunda, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla SK_{Ca} kanalları bitişiktir. Neokortikal piramidal nöronunda, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla sI_{AHP} kanalları eşleşmiştir. Bazı sempatik sinir terminallerinde, N-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla BK_{Ca} kanallarının bitişik olduğu saptanmıştır. Bazı sempatik nöronlarda, L-tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarıyla BK_{Ca} kanalları eşleşmiştir. Bu örnekler çoğaltılabildi. Çeşitli nöron tiplerinde P, Q; T ve R tipi voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarının çeşitli Ca^{2+} -bağımlı K^{+} kanallarıyla anotomik açıdan eşlenik olduğu izlenmiştir (52).

Voltaj-bağımlı kanallar vasıtasıyla içeri doğru gerçekleşen kalsiyum akışının, ve SK kanalları (9) gibi iyon kanallarının aktivasyonuna neden olduğu kesindir. Ayrıca bu kanallar, zar iletkenliğini artırarak ve zar potansiyelini hiperpolarize ederek uyarılabilirliği zayıflatırlar (52).

Apamine duyarsız sI_{HEAP} nin altında yatan kanalın kimliği sık sık bir karışıklık kaynağıddi. Bu akıma zaman zaman I_{HEAP} denildiği için, bu akıma SK_{Ca} kanallarının karıştığı farzedildi (30).. Bununla beraber, sI_{HEAP} in TEA nın ya da apaminin düşük

konsantrasyonlarıyla bloklanmadığından, ne BK_{Ca} nede SK_{Ca} kanalı bu akımın özelliklerini izah edebilir ve bu akımın halen kullanışlı farmakolojik blöörleri yoktur (52).Kültür edilmiş hippokampal nöronlardaki tek kanal çalışmaları TEA ya ve apamine duyarsız olan ve 19 pS'lik bir iletkenliğe sahip olan bir Ca^{2+} -bağımlı K^+ teşhis etti, işte bu kanalın sI_{HEAP} ye aracılık edebileceği önerildi. Yine de sI_{HEAP} de bu kanalın röli saptanamamıştı.

SI_{HEAP} in altında yatan kanal tüm hücre akımı gürültü analizi yoluyla doğrudan tanımlandı. Bu kanal, SK_{Ca} kanallarının iletkenliğine yakın olan 5-7 pS'lik üniter bir iletkenliğe sahiptir, bundan dolayı bu kanal apamin bağlayıcı bölgesi eksik olan bir SK_{Ca} kanalı olabilir (51).

3.6. Yavaş Hiperpolarize Edici Ard Potansiyel Akımının Yavaş Zaman Sabiti

SI_{HEAP} nin önemli özelliği yavaş aktivasyonu ve zayıflamasıdır. İçeri kalsiyum akışını izleyerek, 100-300 ms'lik bir zaman sabitiyle maksimum değerine ulaşır ve sonra neredeyse 1s'lik bir zaman sabitiyle zayıflar. Bu yavaş zaman kinetikleri için bazı açıklamalar getirildi.

- a) sI_{HEAP} in yavaş zaman sabiti kalsiyumla uyarılmış kalsiyum salınımından dolayı olabildi. Bu mekanizmanın duysal vagal nöronlar için doğru olduğu gözükür.
- b) sI_{HEAP} nin altında yatan kanallar, kalsiyumun dışında bir ikinci mesajcı gerektirebildi.

c) Bir diğer ihtimalde, sI_{HEAP} nin yavaş aktivasyonu kalsiyumun sI_{HEAP} yi aktive etmesini sağlayan kalsiyum kanallarının gecikmiş kolaylaştırmasından dolayı olabilir.

d) K^+ kanalları, içeri Ca^{2+} akışının gerçekleştiği noktadan biraz mesafelidir.

Ancak uzak bir bölgeye Ca^{2+} un basit difüzyonu sI_{HEAP} in zaman sabitini izah etmek için yeterli değildir.

Bu özelliklerden özellikle kalsiyumla uyarılmış kalsiyum salınımı bazı hücrelerde gösterilmişti. Ancak her birinin kendine göre bazı eksiklikleri vardır.

3. 7. Ca^{2+} -bağımlı K^+ Akımlarının Modülasyonu

sI_{HEAP} in karakteristik özelliği kendisinin yavaş zaman sabiti ve nörotransmitterlerle modülasyonudur. Fonksiyonel olarak, sI_{HEAP} in bloklanması aksiyon potansiyeli-frekans uyumunu zayıflatır ve nöronun uyarılabilirliğini arttırdı. Ayrıca, hem tek kanal çalışmaları hem de tüm hücre çalışmaları bu akımın hücre içi ikinci mesajcılarla ve pinacidil ve cromakalim gibi K^+ kanal açıcılarıyla modüle edilebildiğini göstermiştir, diğer K^+ kanal tiplerinin bu ajanlarla etkilenmemesine karşın sAMP, isoprenaline, ve forskolinin rat aortundaki kültür edilmiş hücrelerde Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalının açılma ihtimalini arttırması sAMP-bağımlı fosforilasyonun bu kanalların aktivasyonuna karışabileceğini işaret ediyor. Noradrenaline, serotonin (5-HT), Ach ve glutamat hepsi G- proteini-bağılı reseptörler vasıtasıyla sI_{HEAP} yi bloklar. Bu nörotransmitterler içeri Ca^{2+} akışını etkilemediği için, modülasyon bölgesinin Ca^{2+} akışı yönünde, belkide kanalda ya da yakın ilgili bir proteinde olabileceği düşünülür (52). Monoaminler için, ikinci haberci sistemin cAMP ve sonraki protein kinaz A (PKA) nın aktivasyonu olduğu

açıktır. Diğer transmitterler tarafından kullanılan ikinci haberci yolları bilinmezliğini korurken, asetilkolinin Ca^{2+} -kalmodülün kinaz II nin aktivasyonu ile etki ettiği önerildi (43). Modülasyon için hedefin kanal açılma ihtimali olduğu açıktı. I_{HEAP} nin doğrudan modülasyonu rapor edilmedi, I_{HEAP} ve sI_{HEAP} nin birlikte bulunduğu nöronlarda bile, sI_{HEAP} modüle edilirken I_{HEAP} etkiden uzaktı. BK_{Ca} kanallarının PKA ile modüle edildiği çok iyi bilindi.

Hem tek-kanal hemde tüm-hücre çalışmaları önermiştir ki; $I_{\text{K(Ca)}}$, nörotransmitterlerle ya da hücre içi ikinci mesajcılarla, ve pinacidil ve cromakalim gibi varsayılan K^+ kanal açıcılarıyla modüle edilebilir. Diğer K^+ kanal tiplerinin bu ajanlarla etkilenmemesine karşın sAMP, isoprenaline ve forskolinin rat aortunda kültür edilmiş hücrelerde $I_{\text{K(Ca)}}$ nin açılma ihtimalini arttırması, sAMP-bağımlı fosforilasyonun bu kanalların aktivasyonuna karışmış olabileceğini işaret ediyor (51,52).

Hücre dışı işaretler bazı $\text{K}_{\text{(Ca)}}$ kanallarının aktivitesini modüle edebildi. Asetilkolin gözyaşı hücrelerindeki bir maks- K kanalı vasıtasıyla sürekli bir hiperpolarizasyona sebep olur (57). İnozitol trifosfat (InsP_3) ın Ca^{2+} -bağımlı K^+ akımında geçici bir artışa sebep olduğu ve bu akımdaki sürekli bir artışın yalnızca InsP_3 ve tetrakisfosfat (InsP_4) ün gözyaşı bezlerindeki acinar hücrelerin iç çevresinde birlikte bulunduğu gösterildi (43). Bu sonuçlar yine bu hücrelerde Ca^{2+} girişini regüle eden haberciler ile ilgili olarak delil sağlar, bundan dolayı $\text{K}_{\text{(Ca)}}$ kanal aktivitesi InsP_3 ve InsP_4 ün birlikte tesiriyle oluşur; bu bileşikler belkide diğer dış bezlerde de $\text{K}_{\text{(Ca)}}$ akımlarını regüle eden habercilerdir (44). Forskolin bir adenylate cyclase aktivatörüdür ve ADH, cAMP-aracılı vasıtalı yollarla böbrek distal tübçüklerine tesir eder. Bundan dolayı, böbrek

hücrelerindeki maksî- K kanallarının bir cAMP-bağımlı yöntem vasıtasıyla modüle edilebildiği sanılmaktadır.

3.8. Geçirgenlikleri ve Kalsiyum Duyarlılıkları

$I_{K(Ca)}$, K^+ için çok yüksek bir seçicilik sergiler. Artı bir değerli katyonlar için bir geçirgenlik serisi tespit edildi ve buna göre bu kanalların artı bir değerli iyonlar için büyükten küçüğe geçirgenlik sıralaması $Tl^+ > K^+ > Rb^+ > NH_4^+ \gg Cs^+ > Na^+ > Li^+$ olduğu tespit edildi (63). Bu seçicilik sıralamasının Ca^{2+} -bağımlı K^+ akımının kaydedildiği hücre tipinden bağımsız olduğu gözükür (2).

Bununla beraber, $[Ca^{2+}]$ a olan hassasiyet farklı hücre tiplerindeki K^+ kanalları arasında önemli şekilde değişti. Kültür edilmiş rat iskelet kasında (6). Ca^{2+} -bağımlı K^+ akımını aktive etmek için gerekli $[Ca^{2+}]$ 1 mikromolardan yüksek olmalıdır, kromafin (chromaffin) hücrelerdeyse kanal açılması için gerekli $[Ca^{2+}]$ eşiği 0.01 mikromolardır. Bununla beraber, görünen kalsiyum duyarlılığı Mg^{2+} ile çoğaltılabilir (22), Mg^{2+} kanal açılma ihtimalini arttırdı. Bu K^+ kanallarının aktivasyonu için iki ila dört Ca^{2+} iyonu gereklidir (63). Birçok hücre tipinde, hem Ba^{2+} hemde TEA Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarını bloklatabilir (63). $[Ca^{2+}]$ daki artışlar içeri yönlü transmembran Ca^{2+} akışından, hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımından ya da her ikisinden kaynaklanabilir ve sonuç olarak $I_{K(Ca)}$, sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{2+} salınımına sebep olan ajanlarla olduğu kadar I_{Ca} yı aktive etmek için yeterince büyük olan depolarizasyonlarla da aktive edilebilir (2). Ayrıca kafeinin 10 milimoları SR salınımından kaynaklanan $[Ca^{2+}]$ daki bir artış sebebiyle kanalın aktivitesini geçici olarak artırır (2).

3.9. Yüksek İletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanallarının Yapısı

Maksi-K kanallarının α -alt ünitesinin topolojisi altı transmembran bölgesi ve bir gözenek bölgesi yapısıyla voltaj-kapılı K^+ kanallarının topolojisine benzemektedir. Ayrıca bu α alt ünitelerinin dört tane daha transmembran segmenti olduğu düşünülür. β alt ünitesi ise iki hidrofobik transmembran alanına, bir büyük hücre dışı alana ve iki kısa hücre içi N ve C sınır alanına sahiptir. İki glycosylation bölgesi hücre dışı bölgede yerleşmiştir, ki bu Lys rezidüleri ChTX e çarpaz bağlanma için potansiyel bir bölgedir. Sitoplazmik N- sınırında bir protein kinaz A fosforilasyon bölgesi vardır.

Na^+ ve Ca^{2+} kanalları gibi bir takım voltaj-kapılı iyon kanalları farklı alt ünitelerin heteromultimerleridir, ancak bazen tek bir α alt ünitesi fonksiyonel homomerik kanalları oluşturabilmektedir. Bu durum voltaj-bağımlı K^+ kanalı için doğrudur, bu kanalda büyük α alt ünitesi kanalı oluşturmak için yeterlidir (51, 52).

Yüksek iletkenlikli, Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalları, negatif potansiyellerde hücre zarını stabilize ederek sinir, kas ve diğer hücrelerin uyarılabilirliğini regüle etmede önemli bir rol oynar (44).

α alt üniteleri kendi başlarına fonksiyonel kanalları oluşturmak için tetramer olarak birleşebilirken, β alt üniteleri kendi başlarına birleşemezler. Ancak β alt üniteleri α alt üniteleriyle 1: 1 stoichiometry bir şekilde birleşebilir ki bu α alt ünitelerinin görünen Ca^{2+} duyarlılığını 10 kat artırır. Nitekim düz kasda BK kanallarına olan artmış Ca^{2+} duyarlılığının büyük ölçüde katkıda bulunan β alt ünitelerinin varlığıdır.

Bazı incelemelerde BK_{Ca} kanallarının, kanal fonksiyonunu birçok önemli yönden regüle eden β yardımcı alt üniteleriyle beraber, iyon kanalı gözeneginin oluşumuna iştirak eden dört özdeş α alt ünitesi peptidinden oluştuğunu göstermiştir.

3.10. Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanalı Farmakolojisi

Potasyum kanalları, hemen hemen her dokuda bulunan proteinlerin muhtelif bir ailesidirs. Bu kanalların fonksiyonu, depolarize olmuş hücreler için bir repolarizasyon yolu sağlayarak ya da dinlenim plazma zar potansiyelini kurarak hücrelerin elektriksel uyarılabilirliğini idare etmektir (33). Biyofizik ve farmakolojik sınıflandırmalara bağlı olarak K^+ kanallarının adedi çoktur, fakat bu sınıflama, bu kanalların zar potansiyelindeki değişikliklerle (voltaj-kapılı), ya da küçük moleküllerle etkileşip etkileşmediğine (ligand-kapılı) ve bu suretle aktive edilip edilmediğine göre K^+ kanalları gruplandırılması basitleştirilebildi. Fizyolojik olarak, en ilginç K^+ kanallarından biri yüksek iletkenlikli kalsiyum-bağımlı K^+ (maks-K) kanalıdır. Bu maks-K kanalları hem plazma zar depolarizasyonu ile hem de kanalın iç yüzeyine mikromolar mertebede kalsiyum iyonlarının bağlanmasıyla aktive edilir (44). Bu kanalların 200 pS üzerindeki yüksek iletkenliklerine ek olarak, diğer bir özelliği K^+ için belirgin iyonik seçiciliğidir ve maks-K kanalları hem elektriksel açıdan uyarılabilir hem de uyarılmaz hücrelerde mevcuttur (33). Yine bu kanallar, nöroendokrin dokulardan transmitter salınımı ile birlikte vasküler, havayolu, rahim ve diğer tip düz kaslarda uyarılma-kasılma bağlantısı sürecini düzenler, uyarımsız hücrelerde sıvı salgılanımını ve hücre hacmini ve hücre hacmini düzenler ayrıca hücre çoğalmasını

bile kontrol edebilir (33). Farklı dokularda, bu kanallar kendi zar reseptörleri vasıtasıyla dış kaynaklı ligandlar tarafından modüle edilirler, düzenleyici mekanizmaların fosforilasyon, GTP-bağlayıcı proteinlerle etkileşim ya da hücre içi ikinci mesajcılarla doğrudan modülasyon olduğu teşhis edilmiştir. Maksi- K^+ kanallarının moleküler farmakolojisinin gelişimi büyük ölçüde Miller ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla kolaylaştı bu çalışmaya göre ham akrep (*Leiurus quinquestratus*) zehiri iskelet kası t-tübüllerindeki maks- K kanallarını bloklamaktadır. İnhibitör edici aktivite, karipdotoksin (ChTX) olarak isimlendirilen akrep venomunun küçük bir peptid unsurundan dolayıdır, bu peptid sonradan açığa kavuşturuldu ve bu peptidin tam birincil yapısı anlaşıldı(31,42).

Bilindiği gibi ardışık amino asid dizilimlerinde büyük bir benzerlik vardı. ChTX, bir bloklanmış N- sınırlı, üç disülfid köprülü ve fizyolojik pH da +5 net yüklü 37 amino asitli bir proteindir. ChTX in kimliği üç boyutlu faz teknikleri kullanılarak teyit edildi ve aynı türden olan diğer yapay peptidlerle benzer özelliklere sahip olduğu gözlemlendi (31). Yapay ChTX, bu peptiddeki üç disülfid bağlantısının (Cys₇₋₂₈, Cys₁₃₋₃₃ ve Cys₁₇₋₃₅) tayini için kullanılmıştır ve iki- boyutlu NMR teknikleri kullanılarak, ChTX in üç anti-paralel β tabakasının bir yüzüne sahip olduğu gösterildi ki bu anti-paralel β tabakaları 10-18 rezidüden oluşmuş bir heliks bölgesine disülfid köprüleriyle bağlantılıdır (31, 32). Ek olarak, biyolojik olarak aktif ChTX biosentetik tekniklerle oluşturulabildi. ChTX in biyosentezi birçok mutant ürününü sağlar ki bu ürünler, hangi toksin rezidüsünün maks- K kanal gözenegiyile temas ettiğini belirleme için faydalı ve kullanışlıdır. ChTX in maks-K kanallarını bloklama mekanizması geniş bir şekilde incelendi, ChTX iyon iletim yolunu fizyolojik olarak tıkamak için basit bir bimoleküler

reyaksiyon yoluyla kanalın dış girişine bağlandı. ChTX bağlanması negatif olarak yüklenmiş rezidülerle elektrostatik bir etkileşimle oluşur ve rezidüler kanalın dış gözenek kısmını biçimlendirdi. Lys₁₁, Glu₁₂, Arg₁₉, His₂₁, Lys₃₁ ve Lys₃₂ rezidülerindeki değişimler toksin aktivitesi üzerinde az etkiye sahiptir, potansiyeldeki kayıp aslında ChTX ayrışma oranlarındaki artışlardandı. Lys₂₇ nin kanalın iç ağzından iyon iletim yoluna giren K⁺ ve peptid arasındaki etkileşim için sorumlu rezidü olması önemlidir. Bu tip çalışmalar, maks- K kanalına ChTX in bağlanması için önemli olan 37 rezidünün 8 ini teşhis etmişti. Bu rezidüler, tahminen peptidin dış yüzünün 25 % ini kaplar ve ChTX in üç anti-paralel β kenarı ile tertip edilen yüzey üzerindeki üçgensel bir alanın. maks- K kanalı üzerindeki tamamlayıcı bir yüzeye bağlandığı tahmin edilmektedir (31). Peptid, tetramerik bir kompleks olduğu beklenen bazı kanal altünitelerini bağlayabilen bir alanla yakın temas yapmaktadır ve bu etkileşim dış gözenegin tıkanmasıyla iyon iletimini bloklar.

Bundan başka, bir dış gözenek blokörü olarak işleyen TEA iyonu 130 mikromolarlık bir K_i ile [¹²⁵I]ChTX bağlanmasını inhibe eder. Akrep zehirinden elde edilen ve iberitoksin (IbTX) olarak isimlendirilen bir peptidin kimliği açıklığa kavuşturulmuş ve tanımlanmıştır (3). TX 37 aminoasitlik bir peptiddir ChTX ile 68% lik bir benzeşim gösterir . IbTX, ChTX den daha az pozitif olarak yüklenmiştir ve maks-K kanalları için oldukça seçicidir; bunun dışında IbTX diğer ChTX- duyarlı kanallar üzerinde etkisizdir. IbTX ve ChTX ile maks-K kanalı bloklanması mekanizması benzerdir, IbTX in kanaldan ayrılması daha yavaş gelişmektedir, ve bu durum uzun bloklanma zamanlarıyla sonuçlanır. IbTX biyosentez ile olduğu kadar, kimyasal sentez ile de üretildi ve peptidin eriyik yapısı NMR tekniği ile tayin edildi.

IbTX in omurga teşekkülü ChTX için kaydedilen omurga şekliyle neredeyse özdeşir ve IbTX, bugüne kadar tanımlanmış en tesirli ve seçici maksı-K kanalı peptid blöködür. Yine bilinmektedirki maksı-K kanalı aktivitesi iyonik homeostasiyi etkiliyebilmektedir. Bundan dolayı, β -adrenoseptör agonistlerinin ve ajanlarının, trakeal düz kası gevşeten hücre içi sGMP yi yükselttikleri mekanizmanın bir kısmının maksı-K (yüksek iletkenlikli) kanallarının aktivasyonundan dolayı olduğu gözükmeğedir çünkü ChTX ve IbTX fonksiyonel olarak bu gevşetici cevapları antagonize edebilir (3).

Tesirli nonpeptidyl maksı-K kanal blökölerinin birinci serisi tremorgenic indol alkaloidlerinin bir ailesidir bu familya [125 I]ChTX bağlanması görüntülenmesiyle keşfedildi.

3.10.1.Tremorgenik Alkaloidler

Tremorgenik mikotoksinler, omurgalı hayvanlarda aralıklı ya da devamlı istemsiz titremeleri sağlayan Claviceps, Aspergillus, Penicillium tipi mantarlarla oluşturulan metabolitlerdir. Bu ajanlar kimyasal benzerliklere bağlı olarak dört gruba ayrılabilir : paspalitrem, penitrem, fumitremorgin-verruculogen, and tryptoquivaline yapısal sınıfları (56). Yukarıdaki sınıflardaki bütün tremorgenler triptofan dan alınmış bir indol parçaya müştereken sahiptirler, ayrıca bu gruplara dahil kimyasal olarak ilişkili bazı metabolitler vardır ki bunlar tremorgenic değildir örneğin paspaline, paspalicine ve cyclopiazonic asit. Mikotoksinlerin sebep olduğu zehirlenmeler esnasında gözlenen klinik belirtiler aktivite azalması, aşırı duyarlılığın izlediği hareketsizlik, konvulsiyonlar, kas titreşimi, ataksia ve tetanik nöbetlerdir (16).

Bununla beraber, ölüm nadiren oluşur, ve bu belirtiler hayvan toksik kaynaktan uzaklaştırılırsa tersine çevrilebilir karakterdedir ayrıca tremorgenik mikotoksinler lipofilik moleküllerdir ve bu moleküller kan- beyin bariyerini geçebilir hatta merkezi sinir sistemine sızabilirler (56). Fungal tremorgenlerin hangi mekanizmayla tesir ettiği iyi bir şekilde tanımlanmış değildir, biyokimyasal ve klinik çalışmalar göstermektedir ki bu bileşikler nörotransmitter salınımını etkilemektedir (56). Penitrem A, serebrokortikal sinaplardan glutamatın, γ -aminobutrik asid (GABA) ve aspartatın kendiliğinden salınımını artırır ancak bu arada spinal kortdan ya da medullary synaptosome lerden aynı salgılatımı yapamamaktadır. Verruculogen de ayrıca kendiliğinden glutamat ve aspartat salınımını artırır (56). Kobay hayvanlarının ince bağırsaklarının son bölümünden oluşan prepatlarda, paksilin, penitrem B ve verruculogen elektriksel alan uyarımından dolayı oluşan kasılma cevaplarında bir artışa sebep olur ve bu etkinin presinaptik sinir terminallerinden asetilkolinin salınımını artırdığına hükmedildi.

Bu alkaloidlerin kanal bloklama güçlerinin aslında tremorgenic olup olmamalarıyla da ilgisi direkt yoktur, örneğin paksilin tremorgenicdir bununla birlikte bir maksik- K^+ kanal blokörü olarak paspalisin'den daha az tesirlidir (56). Diğer tremorgenic mikotoksinler Penitrem A, Verruculogen, Paspalitrem A, paxilline, Paspalitrem C, Aflatremdir.

Paspalitrem A, Paspalitrem C, Penitrem A, aflatrem ve paspalinine gibi ajanlar [125]ChTX bağlanmasının konsantrasyona-bağımlı inhibisyonuna neden oldu ayrıca bu bileşiklerin en tesirlisi aflatremdir, ve paspalitrem C, penitrem A ise [125]ChTX bağlanmasının en zayıf inhibitörleridir. Paksilin ve verruculogen konsantrasyon

bağımlı bir şekilde [125 I]ChTX bağlanmasını arttırdı, paspalicine ise [125 I]ChTX bağlanmasında paksilin ya da verruculogen den daha az bir artışa sebep oldu, bunların dışında paspalinine ve paspalitrem A [125 I]ChTX bağlanmasını zayıf bir şekilde inhibe etti, bu gözlem ChTX bağlanmasının modülasyonunun çok muhtemelen allosterik bir mekanizmayla vuku bulduğunun işaretidir, ancak cyclopiazonic asidin toksin bağlanması üzerinde gözlemlenmiş etkisi yoktur. Yine rat beyin zarlarına ChTX bağlanması maksi-K kanallarından farklı olan voltaj-bağımlı potasyum kanallarıyla toksinin etkileşimi sonucunu yansıtır.

İçinde maksi-K kanallarının bulunduğu kesilmiş zar yamasının iç yüzüne 10 nM paspalitrem C nin uygulanması 2 dakika içinde kanalların neredeyse tamamen bloklanmasına sebep olmaktadır, 10 nM paksilinin tatbiki ise yama daki maksi-K kanallarının hızlı bir şekilde bloğuna sebep oluyor, ilginç olan ise bu iki bileşiğin [125 I]ChTX bağlanması üzerinde zıt etkileri olmasına rağmen her ikisi maksi-K kanallarının tesirli inhibitörleriydi.

Yukarıdaki belirtilen indol diterpenelerinin maksi-K kanallarını bloklama kuvvetleri kıyaslandığı zaman, paksilin bu şartlar altında en zayıf blökor olduğu görülür. Şimdi bu unsurlardan paksilin, verruculogen ve paspalicine [125 I]ChTX bağlanmasını arttırırlar bu bileşiklerin, maksi-K kanallarını bloklamada [125 I]ChTX bağlanmasını inhibe eden bileşiklerden daha az tesirli olduğu gözükür (56). Bu muhtemel görünmemektedir çünkü paksilin tremorgenik olmasına rağmen bir maksi-K kanal blökorü olarak paspalicine'den daha az tesirlidir, bundan dolayı maksi-K

kanallarının bloklanmasının bu bileşiklerin tremorgenik etkileriyle bir ilişkisi olmayabilir

Paksilinin C-16 daki karbonil grubunun azalması paksilin-16 β -ol ve paksilin-16 α -ol adlı iki adet stereoizomer verdi. Bu bileşiklerin hiçbirisi sığır aortik düz kas zarlarında 100 μ M lara kadar olan konsantrasyonlarda, maksik-K kanallarına [125 I]ChTX bağlanmasında hiçbir etkiye sahip değildi, ve yine bunların maksik-K kanalı inhibitörleri olarak aktivitesi paksiline kıyasla düşüktü. Paksilinden bir oksijen eksiltip bir amino grubu eklendiğinde paksilinamin sentezlenir ve bu analog bağlanma reaksiyonları üzerinde etkisizdi (56).

Karibdotoksin (ChTX), yalnızca kanalın dış tarafına ve gözeneğe girişe yakın bir yere bağlandığında maksik-K kanallarını bloklar. Farklı olarak indol alkaloidleri kanalın hem iç hem de dış yüzüne tatbik edildiğinde maksik-K kanallarını bloklar (56).

Paspalitrem A, paspalitrem C, aflatrem, penitrem A ve paspalinine gibi çeşitli indol diterpene 'leri toksin bağlanmasını inhibe eder, bu arada yapısal olarak ilişkili üç unsur, paksilin, verruculogen ve paspalicine konsantrasyon-bağımlı bir tarzda [125 I]ChTX bağlanmasını uyarır, bu etkiler indol diterpeneleri için söz konusu bir bağlayıcı bölge ile kanalın dışyüzündeki ChTX reseptörü arasındaki allosterik bir etkileşimden dolayıdır. İndol diterpenelerinin hepsi tesirli kanal blokörleridir. İndol alkaloidleri maksik-K kanalları için oldukça seçidir, çünkü bu alkaloidler μ M konsantrasyonlarda diğer K^+ , Ca^{2+} veya Na^+ kanalları üzerinde etki sahibi değillerdir.

İlginç olarak, paspalinine bir dehidroksi analogu olan tremorgenik aktivite noksanlığı bulunan paspalicine de ayrıca tesirli bir kanal blokörüdür.

Karibdotoksin, akrep zehirinden ayrılmış bir protein olup 4.3 Kda lık bir polipeptiddir bu polipeptid birçok Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalını inhibe ettiği gibi voltaj-kapılı K^+ kanallarını da inhibe eder. Örneğin ChTX, nöroendokrindokuların bazı tiplerinde, vasküler düz kas ve iskelet kasında bulunan yüksek iletkenlikli, Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalının dış yüzünde etkileşime girer ve iyon iletim yolu boyunca K^+ akışına müdahale ederek kanal aktivitesini bloklar. Bunlara ek olarak, ChTX Aplysia nöronlarında tanımlanmış 35 pS lik bir Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalını, lymphocytelerde bulunan bir voltaj-bağımlı K^+ kanalını da bloklar, bununla beraber bu toksin Na^+ kanallarını, L ya da T- tipi Ca^{2+} kanallarını etkilememektedir.

KTX de akrep zehirinden arıtılır ve 37 aminoasit içeren 4-Kdaltonluk tek bir polipeptid zinciri olduğu düşünüldü. Ancak daha sonra C-sınırında ek bir Lys teşhis edildiği için tabi KTX in 38 aa uzunluğunda olduğu düşünülür (53). KTX, yapısındaki aminoasit dizileri benzeşimi açısından karibdotoksin ile %44 lük, Iberiyotoksin ile %44 lük, ve noksiyustoksin/noxiustoxin ile de % 52 lik bir benzeşim gösterir (13).

Apamin ve scyllatoxin, nöronal ve diğer hücrelerin düşük iletkenlikli K^+ kanallarının inhibitörleri olarak bilinir ayrıca düşük ve orta tesirli ^{125}I -ChTXin bağlanımının en azından bir kısmını bozar (13).

Bu toksinlerin düşük iyonik şiddet şartlarında tesirliliklerinin sıralaması ChTX> StK> MgTX> KTX> IbTX şeklidedir (53). KTX in inhibitor olarak tesiri ChTX in tesirinden daha düşüktür.

3.10.2. Iberiotksin ve Karibdotoksinin Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanallarını Bloklama Mekanizması

Iberiotksin (IbTX) akrep zehirinden elde edilen 37 amino asitlik bir polipeptiddir Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarını özellikle de yüksek iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalının tesirli bir blöörüdür (27, 32).

Son zamanlarda ChTX in ve IbTX in NMR analizleri iki toksinin benzer aminoasit dizileri içerdiğini göstermiştir. Yüksek ardışık benzeşim ve ChTX ile IbTX için benzer üç boyutlu yapılar, bu iki toksinin maks-K kanalının bloğu için benzer mekanizmalar sergileyebileceğini düşündürür (32).

İskelet kasındaki maks-K kanalının ChTX ile bloğu üzerindeki mekanik çalışmalar, ChTX in gözeneğin hücre dışına bakan ağzına bağlanarak ve tıkayarak potasyum iyonu iletimini blokladığını gösterir.

Kanal üzerindeki bölgeye ChTX in yaklaşımı, kanalın dış ağzına yakın bir şekilde yerleşen negatif yüklü karboksilatlar ve ChTX üzerindeki pozitif olarak yüklü amino asitler arasındaki elektrostatik etkileşimlerle kolaylaştırılır. Kanaldan ChTX in ayrılması muhtemelen kovalent olmayan etkileşimlerle belirlendi. Bununla beraber, ChTX için ayrışma oranı depolarize edici zar potansiyelleriyle ve hücre içi yüzdeki

kanal gözenegine giren potasyum iyonlarının artan konsantrasyonlarıyla çoğalır. ChTX de bulunan yedi adet pozitif yüklü rezidünün altısı IbTX de korunmuştur.

3.10.3. Iberitoksinin Dış Yüzdeki Yüksek İletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanalını Bloklaması

IbTX yalnızca kanalın dış tarafına tatbik edildiğinde maksi-K kanalı vasıtasıyla oluşan akımların akışını bloklar, kanal kapı hareketleriyle ilişkili hızlı açılma ve kapanma geçişleri milisaniyelik zamanlarda olur , örneğin hücre içi tarafa 50nM IbTX ilave edilmesi kanalın açık durum olasılığı üzerinde önemsenebilecek bir etkiye sahip değildir bununla birlikte hücre dışı bölgeye 10nM IbTX in sonraki ilavesi uzun, iletilimsiz sönük periyotların oluşumuna neden olmaktadır bu sönük periyotların ortalama süresi 18 daki civarındadır, bloklanma etkisi hücre dışı eriyikten IbTX in uzaklaştırılmasıyla bozulabilmektedir, bu bilginin en basit yorumu bu sessiz periyotların kanalın dış yüzündeki bir bölgeye IbTX in bağlanması durumudur. Ayrıca yapılan incelemeler toksinin kanalın açık olduğu zamanlar üzerinde etkisiz olduğunu göstermektedir (32).

3.11. Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanallarının Fizyolojik Roller

Endotel tabaka, kan basıncı kontrolü, damarsal oluşum, ve kan damarlarının oluşumu gibi çeşitli vasküler fonksiyonlarda merkezi bir rol oynar. Endothelial fonksiyonun kontrolünde, iyon kanalları devreye girmektedir. İyon kanalları bu kontrolü endothelial zar potansiyelini ve sıvısal uyarıma cevaptaki Ca^{2+} homeostasisini regüle ederek yapmakta, anahtar bir rol oynamaktadır (1). Özellikle, Ca^{2+} -bağımlı K^+ (K_{Ca})

kanallarının sıvısal uyarıma cevaptaki endotelial hiperpolarizasyona aracılık ettiği düşünülmektedir. Endotelial hiperpolarizasyon Ca^{2+} girişi için elektrokimyasal sürdürücü etki sağlar ki bu Ca^{2+} girişi damar genişletici faktörlerin Ca^{2+} -bağımlı sentezinde önemlidir.

Sonuç olarak endotheldeki Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanalı fonksiyonu ve Ca^{2+} homeostasisinin, angiyojenesisin regülasyonunda bir rol oynadığı kuvvetle önerilmektedir. Ayrıca orta-iletkenlikli K_{Ca} kanallarının, T lenfositlerinde, insan fibroblastlarında çoğalmayı ve mitogenik hücre büyümesini regüle ettiği bilinmektedir.

3.11.1. Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanallarının Damarların Gevşemesinde Rol Oynaması

Sikluksijenus yoluyla araşidonik asidin metabolizmasından oluşan prostaglandinler bir takım muhtelif biyolojik süreçlere karışırlar, bunlar arasında inflammasyon, trombosit fonksiyonu ve damarsal düz kas tonunun regülasyonu da dahildir. Bu yolun başlıca ürünlerinden biri prostasiklidir, prostasiklin damarsal tonusun ve trombosit agregasyonunun güçlü bir inhibitörüdür.

3.11.2. Düşük İletkenlikli Ca^{2+} -bağımlı K^+ Kanalları Kolinerjik

İnhibisyona Aracılık Eder

Piliç efferent terminalinde asetilkolin salınması, bir kalsiyum-bağımlı potasyum akımının aktivasyonundan dolayı tüy hücre zarının hiperpolarizasyonu ile sonuçlanır. Piliç iştme tüy hücrelerinde kolinerjik inhibisyona neden olan ACh-uyarımli potasyum

akımı için BK kanallarının sorumlu olduğu önerildi. Bununla birlikte, bu öneri memeli kıl hücrelerindeki bulgularla ihtilaflıdır, bu hücrelerdeki ACh cevabının apamin ile inhibe edilmesi akla SK tipi kanalı getiriyor. İçeri kalsiyum akışı, ACh-kapılı reseptör kanalı vasıtasıyla efferent inhibisyonu sürer.

Sonuç olarak, işitme tüy hücrelerindeki BK kanalları ChTX ile bloklanır, ancak $I_{K(ACh)}$ akımını taşıyan kanallarsa apaminle bloklanır, Cs^+ iyonu BK akımlarını bloklamakta fakat işitme tüy hücrelerindeki $I_{K(ACh)}$ akımını bloklamamaktadır, tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında $I_{K(ACh)}$ için sorumlu olan kanalların SK kanalları olduğu ihtimali oldukça yüksektir ayrıca bu SK kanallarının piliç işitme tüy hücrelerinde kolinerjik inhibisyona aracılık ettiği de görülmüştür.

3.11.3. Diğer Fizyolojik Roller

Fare AtT20 kortikotroplarındaki yüksek iletkenlikli kalsiyum ve voltaj-bağımlı potasyum kanalları ACTH salgılanımının regülasyonunda çok önemli bir rol oynar (15).

Farelerde yapılan çalışmalarda SK_{Ca} kanalları, arı venomundan elde edilen bir nörotoksin olan apaminle bloklandı. Bu kanalların bloklanması farede hafıza ve öğrenmeyi kolaylaştırdı. SK kanallarının epinefrinin salınım oranını kontrole de karıştığı ve hafızayla, öğrenmeyi modüle ettiği önceden yapılan çalışmalarla da tespit edilmiştir.

Fare AtT20 kortikotrop yüksek iletkenlikli kalsiyum-bağımlı potasyum kanalları ACTH salgılanımının regülasyonunda esaslı bir rol oynar. Burada uyarıcı nöropeptid CRH tesirli bir şekilde BK kanallarını inhibe eder, bunu da BK kanal kompleksinin protein kinaz A (PKA)-vasıtalı fosforilasyon yoluyla yapmaktadır.

BK_{Ca} kanallarının zar potansiyelini ve ve küçük arterlerin dinlenim çapını regüle ettiğine dair kuvvetli deliller mevcuttur (12).



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Hücrelerinin Primer Kültürü

Bu çalışmada kullanılan hücre içi elektrofizyolojik kayıtların yapılabilmesi ve elde edilen bulguların güvenilir ve sağlıklı olabilmesi için hücreler ile temas eden elektrotların mekanik stabilitesi son derece önem arzeder. *In vivo* şartlarda mekanik stabilite sağlanmasının zorluğu, çalışmacıları fizyolojik koşulların azami oranda örneklendiği ortamlarda saklanan izole doku ve hücrelerde çalışmaya yöneltmiştir. Bununla beraber hücre düzeyindeki çalışmalar, patofizyolojik ve fizyolojik mekanizmaların hücresel düzeyde ortaya çıkarılmasına da imkan sağlar.

Mevcut çalışmada, sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) hücreleri izole tek hücreler halinde elde edilerek elektrofizyolojik kayıtlarda kullanılmak için, enzimsel ve mekanik işlemlere tabi tutuldu.

DKG hücrelerinin primer kültürleri Forda ve Kelly (1985) tarafından geliştirilen ve aşağıda açıklanan metode göre gerçekleştirildi (18).

4.1.1. Kültür Solüsyonlar ve Kullanılan Kimyasal Ajanlar

Bu maksatla içeriği aşağıda verilen kültür vasatı ve enzimatik ayrıştırma maksadıyla kollegenaz, tripsin, DNaz ve sinir büyütme faktörü kullanılmıştı. Primer

hücre kültürü yapılmasına uygun olan bütün bu ajanlar ticari olarak Sigma firmasından temin edilmiştir.

4.1.2. Kültür Vasatı

100 mililitrelik kültür vasatları aşağıdaki solüsyonları içermektedir

1 ml Penisilin/ Streptomisin (ICN, İngiltere)

120 mg NaHCO₃ (Sigma)

10 ml modifiye edilmiş Dulbeco medyumunu (Gibco Laboratuvarlar, İngiltere)

10 ml at serumu (Sigma)

Bu içerikli karışım distile su ilave edilerek 100 mililitreye tamamlandı ve ardından filtreden süzülerek sterilize edildi. pH'sı kontrol edilerek kullanım anına kadar +4°Cde saklandı.

4.1.3.Hücre Kültürü için Genel Prensipler

Sıçan DKG hücrelerinin primer kültürlerinin yapımı ve bu kültüre hücrelerin saklanmaları sırasında kontaminasyon durumlarına karşı gerekli asepsi kurallarına uyuldu. Bu maksatla diseksiyon ve enzimatik ayrıştırma işlemleri sabit akımlı güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi (Klas I, Laminar Flow, Ankara). Bunun dışında kullanılan bütün gereç ve solüsyonlar ya steril olarak sağlandı ya da uygun şekilde sterilize edildi.

4.1.4. DKG Hücre Kültürü Protokolü

% 70' lik etanolde tutulan cam lameller (Sigma, Almanya) kültür yapımından bir gün önce etanolden çıkarıldı ve sabit akımlı güvenlik kabini içinde steril bir kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Bundan sonra 100µl poly-L-ornitin (Sigma; 25 mg/ml stok solüsyon) 10ml' lik distile suya ilave edildi ve oluşan bu sıvı çapı 50mm olan steril bir petri kutusuna boşaltıldı. Kuruyan lameller alevden hızla geçirildi ve bu poly-L- ornitin içeren sıvıya yerleştirilerek 37°C'de % 95 oksijen, % 5 karbon dioksit ihtiva eden inkübatörde (Heraus, Almanya) bir gece bekletildi. Ertesi gün lameller inkübatörden alındı ve Laminar flow içerisinde steril su ile yıkandı. Her bir lamel üzerine 100µl laminin (Sigma) ilave edilmek suretiyle kültür tablası inkübatöre kaldırıldı. Aynı gün kültür vasatıda hazırlanarak 10ml fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS) ile birlikte bir kısım kültür medyumunu da (~ 40 ml) steril bir plastik tüp içinde inkübatöre yerleştirildi. Diseksiyon cerrahi seti ile birlikte diseksiyon mikroskobu dezenfekte edilerek sabit akımlı güvenlik kabinine alındı.

İki günlük Wistar sıçan yavruları (Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyomedikal Araştırma Ünitesinden temin edilerek) dekapitasyonla öldürülmek suretiyle yayvan bir petri kutusuna yerleştirildi.

Uygun bir makasla vertebral kolonun ayrıldı, bunun ardından kaudal uçtan başlayarak boyuna kadar spinal kolonun içi yaylı küçük bir makasla açıldı. Petri kutularına yerleştirilmiş PBS ile bu izole spinal kolon üç defa yıkandı. Ardından bütün dorsal kök gangliyonları mikroskop altında forsepslerle hassas bir şekilde izole edilip küçük bir petri kutusu içindeki kültür vasadına yerleştirildi.

DKG gövdeleri disekse edilip petri kutusunda toplandıktan sonra, hassas yuvarlak hareketlerle petri kutusu sallandı ve böylece tüm gangliyonların bir araya toplanması sağlandıktan sonra kültür medyumunu bir pastör pipeti ile çekilerek 900 µl ılık (37°C de inkübe edilmiş) kültür vasatı ile 100 µl kollagenaz (Sigma, 0.125 %) ilave edilip hafif bir şekilde çalkalandı ve 13 dakika süreyle inkübatöre kaldırıldı. Sürenin bitiminde hücre, solüsyon ve enzim karışımı inkübatörden alınarak hızla PBS ile üç defa yıkandı. Bundan sonra 100 µl tripsin (Sigma, 0.25%) ve 900 µl PBS eklenerek hafif bir şekilde çalkalandı ve 6 dakika boyunca inkübe edilirdi, ardından steril plastik tübe aktararak 15 ml ılık kültür vasatı ilave edilerek üç defa yıkandı. Ardından 900 µl kültür medyumunu ve 100 µl DNaz enzimi (Sigma) ilave edilip ucu daratılmış steril bir pastör pipetine hızlı bir şekilde çekilip boşaltılarak gangliyonlar mekanik olarak tek hücrelere ayrıştırıldı. Hemen ardından hücre kültür vasatı süspansiyonu kültür vasatı ilave edilip 5 ml' ye tamamlandı.

Bir gün önce lamellerin poly-L-ornitinle inkübe edildiği petri kutusuna boşaltılarak 2-3 saat inkübe edildi. Ön inkübasyondan amaç; ölü hücreler ve non-nöronal dokuların uzaklaştırılmasıdır. 2-3 saatlik ön inkübasyonun bitiminde içinde hücrelerin bulunduğu petri kutusu inkübatörden alındı, üstlerindeki sıvının önemli bir kısmı Pastör pipetiyle uzaklaştırılır ve petri kutusunun dibine yapışmış olan hücreler 1ml'lik taze ılık kültür vasatıyla yıkanarak solüsyona alındı. Petri kutusu mikroskop altında iyice incelenerek bütün hücrelerin uzaklaştırıldığı kontrol edildi. Nöronal olmayan hücreler daha sıkı yapışacağından petri kutusunun tabanında kalır ve elimine edildi. Hemen ardından hücre süspansiyonuna ılık kültür vasatı eklenir ve 2.4 ml'ye tamamlandı. Son inkübasyon için daha önceden lamininle kaplanan lamellerin

bulunduğu küçük petri kutuları inkübatörden alınarak laminin içeren sıvının büyük bir kısmı lamellerden uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonu barındıran solüsyona 240µl sinir büyütmeye faktörü (NGF) ilave edildi ve her lamele 200µl hücre içeren bu solüsyondan ekildi ve bir akşam için inkübatöre kaldırıldı, ertesi sabah her bir petri kutusuna 1.5 ml NGF ihtiva eden (10 µl/petri kutusu) ılık kültür vasatı ilave edildi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. İzleyen 5-7 günde petri kutularındaki 1-5 ml kültür vasatı çekilerek NGF (10 µl NGF / petri kutusu) içeren yeni kültür vasatı ilave edildi. DKG hücreleri 24 saat sonra elektrofizyolojik kayıtlar için kullanılmaya başlandı.

4.2. Elektrofizyoloji

Tezdeki bütün deneyler tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği ile gerçekleştirildi (26). Pipet ucu ile hücre membranı arasında yüksek dirençli bir mühür oluşturulur, ardından negatif basınçla hücre zarı hasara uğratarak tüm hücre diyaliz patch kenetleme biçimi oluşturuldu. Bu şekilde hücre sitoplazması ile pipet içeriği arasında sürekli temas temin edildi. Bu konfigürasyonun oluşturulmasında sadece negatif basınç uygulaması yapılmaz bunun yanında bazı hücrelerde kısa süreli yüksek amplitüdlü negatif akım enjeksiyonları, “ zapping”, ile mühür bölgesinde zar hasara uğrattıldı. Unutulmaması gereken bir husus tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi (20-23 ° C). İster voltaj kenetleme deneyleri olsun ya da akım kenetleme deneyleri olsun hepsi Axoclamp- 2B (Axon Instruments, ABD) patch kenetleme amplifikatörü ile amplifikatörün sırasıyla current clamp mode veya discontinuous single electrode voltage clamp (dSEVC) modu kullanılarak gerçekleştirildi. Elektrofizyolojik kayıt yapılan DKG hücreleri düşük volümlü (< 1 ml) bir ekstraselüler kayıt

solüsyonunda tutuldu. Düşük volümden dolayı pipet kapasitansı sınırlıydı. Düşük dirençli patch pipetleri Pyrex borosilicat cam çubuklardan (1.4 / 1.6 mm dış çap, 0.8 / 1.0 mm olan iç çapı içerisinde 0.15 mm fibril içeren, Plowden and Thompson Ltd, Dial Glass Works) pipet çekici ile çekildi (Sutter Inst, ABD). Direnç değerleri 3-7 M-ohm arasında değişen pipetler hücre içi patch pipet solüsyonu ile doldurulur. Pipetler yalnızca bir hücreden kayıt için kullanıldı. Hücre dışı ve hücre içi solüsyonlar 0.2 µm delik büyüklüğüne sahip filtrelerden süzüldü. Hamilton şırıngasıyla pipetler patch pipet solüsyonuyla doldurulur, en önemli noktaysa pipet içerisinde ve pipet tutucu içerisinde herhangi bir hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Pipet tutucu (HL-1-17 pipette holder, Axon Instruments, ABD) 1 M KCI ile dolduruldu ve CV-4 1/100 headstage (Axon Instruments, ABD) içerisine yerleştirildi. Pipet tutucunun kenarında mühür oluşturma sırasında negatif basınç uygulanmasıyla ilgili kısım bir silikon hortumla 1ml'lik bir şırıngaya bağlandı. Bu headstage, pipeti sağa sola, ileri-geri ve aşağı- yukarı hassas hareket ettirmeye yarayan üç boyutlu bir mikromanipulatöre (NarashigeMX-3L, Japonya) monte edildi. Mikromanipulatörler, ters mikroskop mekanik stabiliteyi sağlamak gayesiyle titreşimsiz bir elektrofizyolojik masa (Intracel, UK) üzerine yerleştirildi. Elektrofizyolojik masa ve üzerindeki aletler, elektriksel gürültüyü azaltmak gayesiyle Faraday kafesi aracılığıyla topraklandı. Elektrotlar ile amplifikatörler arasındaki elektriksel kontak, Ag-AgCl elektrotu, pipet tutucu içerisindeki kablo ve KCI banyosu ile sağlandı. Ekstraselüler kayıt solüsyonu ile KCI banyosu arasındaki kontak ise agar KCI köprüsü ile sağlanır (3 % agar içeren borosilikat cam tüp 1 M KCI içerisinde hazırlandı ve kullanımda olmadığı zaman sürekli olarak bu solüsyonda saklandı).

DKG nöronları elektrofizyolojik kayıt için inkübatörden alındıklarında kayıttan önce 5 dk aralarla hücre dışı kayıt solüsyonuyla üç defa yıkandı. Tüm hücre diyaliz modunun sağlanmasının ardından, akım kenetleme deneylerinde dinlenim zar potansiyeli ölçüldü ve akım enjeksiyonu ile zar potansiyeliyle arzu edilen zar potansiyeline tutuldu.

4.2.1. Akım Kenetleme Deneylerinde Kullanılan Kayıt Solüsyonları

Membran potansiyeli, giriş direnci, aksiyon potansiyelleri ve aksiyon potansiyelleri ard potansiyelleriyle alakalı deneylerde hücrenin iyonik dengesi genelde değiştirilmeyerek fizyolojik şartlar ve homeostazis azami derecede taklit edildi. Bu sebeple **patch pipeti solüsyonu:**

140 mM KCl,
1 mM MgCl₂,
0.1 mM CaCl₂,
10 mM HEPES,
1 mM ATP,
1.1 mM EGTA .

TRIS kullanılarak pH 7.4, osmolarite ise sukroz ilavesiyle 310 mOsm/ litreye ayarlandı.

Hücre dışı kayıt solüsyonuysa:

3 mM KCl,
130 mM NaCl,
2 mM CaCl₂,

0.6 mM $MgCl_2$,

1 mM $NaHCO_3$,

10mM HEPES,

5mM glukoz içerdi.

NaOH kullanılarak pH 7.4'e ve sukroz ilave edilerek osmolarite 310-320 mOsm/litreye ayarlandı.

Akım kenedi deneyleri için KCl içeren hücre içi kayıt solüsyonları ve NaCl içeren hücre dışı kayıt solüsyonları kullanıldı. Hücrelerin dinlenim zar potansiyellerinin ölçülmesinden sonra hücreler asgari 5 dakika bu zar potansiyelinde tutulur ve aksiyon potansiyeli depolarize akım enjeksiyonu ile aktive edildi. Depolarize edici ard potansiyele sahip hücreler (daha önce aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyellerinden ($I_{K(Ca)}$) akımlarının sorumlu olduğu tespit edilmiştir) $-40 / -120$ mV arasında 10mV'luk aralıklarla tutularak aksiyon potansiyelleri aktive edildi. Bu şekilde elde edilecek aksiyon potansiyeli ard potansiyellerinin zıtlanma potansiyeli hesaplandı, hesaplanan bu değer Cl^- ve K^+ kanallarının hücre içi ve hücre dışı solüsyonlardaki konsantrasyon değerlerine göre Nerst denkleminde hesaplanan zıtlanma potansiyelleriyle karşılaştırıldı.

Zıtlanma potansiyelleri membran iletkenliğinin iyonik temelini biyofiziksel olarak belirlenebilmesi için sık bir şekilde kullanılan bir yöntemdir. Bu maksatla Nernst denklemi kullanılmaktadır.

Nerst denkleminde göre aşağıdaki parametreler göz önünde bulundurularak hesaplama yapıldı.

$$E = (RT) / (ZF) \ln (C_d / C_i).$$

$$R \text{ (Genel gaz sabiti)} = 8.3143 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

$$F \text{ (Faraday sabiti)} = 96500 \text{ C mol}^{-1}$$

$$T \text{ (Mutlak sıcaklık)} = (273 + ^\circ\text{C}) \text{ K}$$

$$Z = \text{İyon değeri}$$

$$C_d = \text{Hücre dışı molar konsantrasyon}$$

$$C_i = \text{Hücre içi molar konsantrasyon}$$

4.3. İlaç Uygulaması

Çalışmada hücre dışı ilaç uygulaması ile kaydedilen elektrofizyolojik verilerin farmakolojik yaklaşımlarla açıklanmasını sağlanması amaçlandı. DKG hücrelerine hücre dışı ilaç uygulaması, hücre dışı mikropfüzyonla sağlandı.

İlaçların hücre dışı mikropfüzyonu ucu genişletilmiş bir patch pipeti vasıtasıyla düşük basınçlı mikroenjeksiyonla sağlandı. Pipetler Hamilton şırıngası (Hamilton Company, İsviçre) ile hücre dışı kayıt solüsyonunda hazırlanmış olan paksilin ve iberitoksinin arzu edilen konsantrasyonu ile dolduruldu. İlaç uygulama pipetinin ucu temiz bir metal yüzeye hafifçe dokundurularak kırılır ve ilaç akımını sağlamak için yaklaşık 10 μm çap elde edildi. İlaçla dolu olan pipet tutucu mikromanipülatöre yerleştirilerek (WPI, ABD), basınç süresi ve şiddeti ayarlanabilen basınç kaynağına (Pneumatic Pump, WPI, ABD) silikon tüp aracılığıyla bağlandı. Kayıt alınan hücreden kontrol verileri elde edildikten sonra ilaç uygulamak için kullanılacak

pipeti mikroskop altında mikromanipulator vasıtasıyla hücre dışı kayıt solüsyonuna daldırılarak ilgili hücrenin 50-100 μm uzağına yerleştirildi. İlacın ayrı ayrı her bir tatbikinden sonra hücre dışı kayıt solüsyonu birkaç kez taze solüsyon ile değiştirilmek suretiyle hücreler yıkandı ve bundan sonraki kayıtlar aynı lamelin uzak noktalarındaki hücrelerden sağlandı.

Ca^{2+} -bağımlı K^+ kanallarının sorumlu olduğu aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyellere yeni geliştirilen paksilinin ve iberitoksinin çeşitli konsantrasyonları uygulandı.

4.4. Aksiyon potansiyellerinin kayıt edilmesi

Lamel üzerinde yer alan DKG hücrelerinden kayıt için seçilen hücre ters mikroskopun (Nikon, Japonya) görüntü alanının ortasına yerleştirildi. Daha sonra pipet solüsyonu ile doldurulmuş patch pipeti mikromanipulator (Narishige, Japonya) aracılığı ile önce kayıt solüsyonu içerisine ve kademeli olarak ta hücre üzerine yerleştirildi. Patch kenetleme amplifikatörü Axoclamp 2B (Axon Instruments, ABD) süresi ve frekansı Digitimer D4030 (İngiltere) stimulus programlayıcısı ile kontrol edilen elektrik dalgaları ile eksternal olarak tetiklendi. 10 pA hiperpolarize edici akım (1 Hz, 100 ms süreli) uygulaması ve elektrojenik potansiyelin ölçülmesi ile pipet direnci belirlendi. Bu esnada voltaj defleksiyonunu gidermek için uygulanan akım amplifikatörden okunarak pipet direnci belirlendi. Bu esnada voltaj defleksiyonu giderilinceye kadar rezistans kompanzasyonu uygulandı ve voltaj defleksiyonunu gidermek için uygulanan akım amplifikatörden okunarak pipet direnci mega ohm olarak belirlendi. Bu çalışmada

direnci 3-7 mega ohm arasında değişen pipetler kullanıldı. Daha sonra osiloskop ekranında voltaj gözlenene kadar pipet dikkatle aşağıya indirildi. Pipet ucu ile hücre yüzeyi arasındaki fiziksel temas direncin arttığıının belirtisi olarak yaklaşık 0.5mV luk bir defleksiyon gösterdi. Mühür oluşması için pipet tutucuya silikon bir hortumla bağlı bir enjektörle çok hafif bir negatif basınç uygulandı. Birkaç dakika içerisinde 5-15 giga ohm'luk mühürler gelişti. Osiloskop 20-50mV / division'a ayarlanarak mühür rezistansı takip edildi, membranı zedelememek için uygulanan akımın şiddeti -50 pA ile sınırlandırıldı. Tüm hücre diyaliz kayıt formuna geçildikten sonra akım kenedi modunda pipet ve hücre kapasitans kompanzasyonu uygulandı. Tüm hücre diyaliz formunun gerçekleştirilmesi için genelde hafif ilave negatif basınç uygulaması yapıldı. Akım kenedi kayıt modunda önce istirahat membran potansiyeli ölçüldü ve voltaj injeksiyonu ile membran potansiyeli istenilen gerilim değerinde tutulur. Amplifikatör çıkışları osiloskop üzerinde görüntülendi (Hameg PM3305, 35MHz, two channel oscilloscope) ve pClamp 7 (Axon Instruments, ABD) programı ile kişisel bilgisayara kayıt edilerek analiz edildi.

4.5. Veri Analizi

Elektrofizyolojik veriler deney sırasında bilgisayarın hafızasına kayıt edildi ve daha sonra analiz edildi. Analizlerin yapılması için pCLAMP 7.0 (Axon Inst, ABD) analiz programı kullanıldı. 1kHz frekansında digitalize edildi (Digidata 1200, Axon Inst, ABD) ve bilgisayar hafızasında kayıt edildi.

Akım kenetleme şartlarında aksiyon potansiyeli eşik değeri, pik amplitüt, aksiyon potansiyelinin süresi ve ard potansiyellerin (hiperpolarize edici) amplitüt ve bu

gerilimlerin istirahat membran potansiyellerine dönme zamanı ölçülerek değerlendirildi. Kayıt değerleri daha sonra yazdırıldı (Hewlett Packard).

Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata (mean+SEM) olarak sunuldu. İstatiksel analiz ve grafikler Microcal Origin programı (Versiyon 5 Microcal Software Inc, Data Analysis and Technical Graphics, Northampton, USA) kullanılarak Student's *t* testi veya tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. Aksiyon Potansiyellerinin Kaydedilmesi: KCl-esaslı patch pipet solüsyonu kullanılarak dorsal kök gangliyon (DKG) hücrelerine tüm hücre diyaliz patch kenetleme yönteminin akım kenedi modunda hücrelerden kayıtlar alındı.

Hücrelerin akım kenetlemenin ardından 5 dakika süre ile sabit İMP'ne sahip olduğu belirlendikten sonra ($< \pm 3\text{mV}$ 'luk değişiklikler), aksiyon potansiyelleri aktive edilerek aksiyon potansiyelleri ile ilgili değerler ve ard potansiyelleri belirlendi. Çalışılan hücrelerden hiperpolarize edici ard potansiyele sahip olanların ortalama İMP - $54.2 \pm 0.8\text{ mV}$ ($n= 28$) olarak belirlendi. Toplam 42 hücrenin 14 tanesinde (% 33) depolarize edici ard potansiyeli (DAP), 28 tanesinde (% 67) hiperpolarize edici ard potansiyelinin (HAP) mevcudiyeti gözlemlendi.

5.2. Aksiyon Potansiyeli-Ard Potansiyellerinin Farmakolojik ve Biyofiziksel Olarak Tanımlanması:

İMP'den aktive edilen aksiyon potansiyellerinin sahip olduğu ard potansiyeller belirlendikten sonra devamlı voltaj enjeksiyonu ile hücreler -50 ile -120 mV arasında kenetlenerek aksiyon potansiyelleri aktive edildi ve ard potansiyellerden amplitütleri kullanılarak bu ard potansiyellerden sorumlu iyon kanalları bu potansiyellerin zıtlanma potansiyelleri olarak tespit edildi. Çalışmada kullanılan solüsyonların iyon dengesinden yararlanarak Nernst denkleminde hesaplanan zıtlanma potansiyelleri ile voltaj/akım ilişkisinden elde edilen zıtlanma potansiyelleri sonuçları karşılaştırıldığında; depolarize

edici ard potansiyellerin kalsiyum bağımlı klor, $I_{Cl(Ca)}$, hiperpolarize edici ard potansiyellerin ise kalsiyum bağımlı potasyum kanal akımları, $I_{K(Ca)}$, olduğu belirlendi.

Hiperpolarize edici ard potansiyellerinin amplitütleri membranın depolarizasyonu ile zayıfladı ve -75 mV'dan itibaren daha depolarize ard potansiyellerin göstererek zıtladı ve bu zıtlanma potansiyeli deney koşullarımız için (kullanılan kayıt solüsyonlarının iyon konsantrasyonu) Nernst denklemi kullanılarak hesaplanan potasyum denge potansiyeli olan -97 mV'a yakındı.

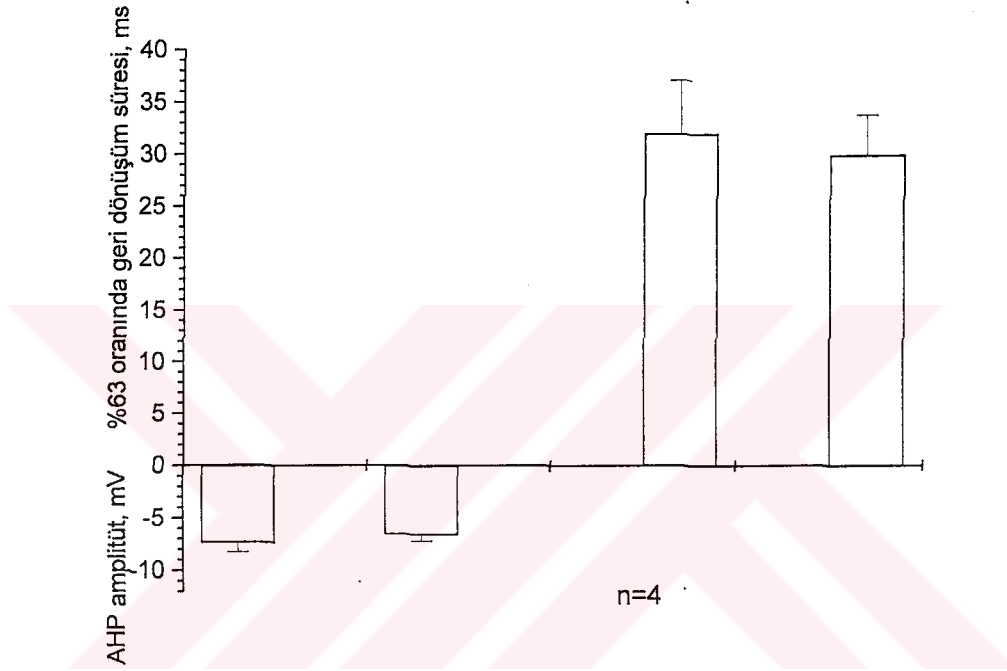
Hiperpolarize edici ard potansiyeline sahip hücrelere niflumik asit uygulanması bu ard potansiyellerin ne pik amplitüdünü (kontrol -11.5 ± 1.8 mV, $n=4$; niflumik asit -10.9 ± 1.2 mV, $n=4$) ve ne de geriye dönüşümünü (%63 oranında) etkilemedi, (kontrol; 19 ± 5 ms, $n=4$, 18 ± 5 ms, $n=4$).

5.3. İberiotoksinin hiperpolarize edici ard potansiyeller üzerine etkisi:

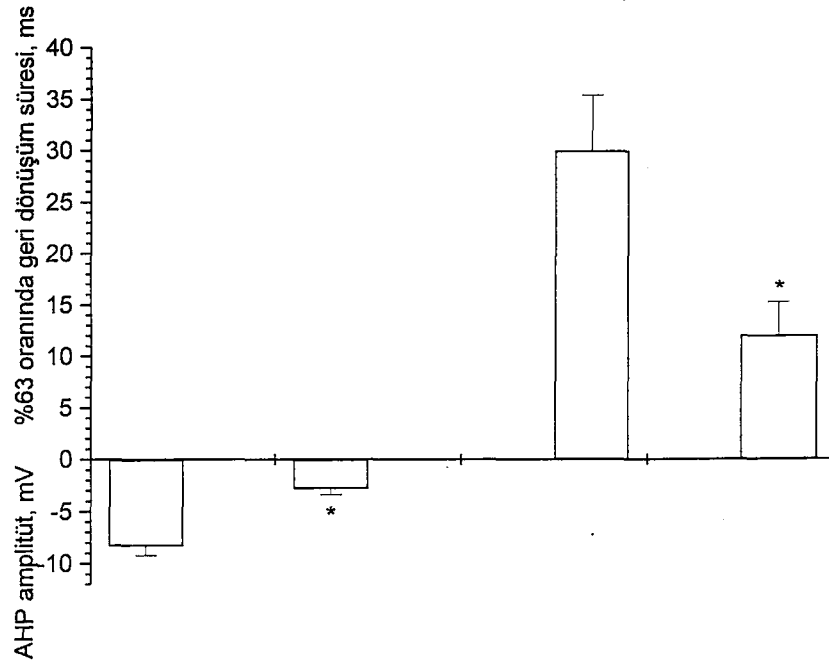
Hiperpolarize edici ard potansiyeller üzerine yeni geliştirilen $I_{K(Ca)}$ kanal blokörü iberiotoksinin etkilerini belirlemek amacıyla sırasıyla 10, 30 ve 50 nM iberiotoksin uygulandı. İberiotoksinin 10 μ M konsantrasyonu aksiyon potansiyelini de etkileyerek süresini belirgin olarak uzattı ($n=3$) ve bu esnada gerçekleşen aşırı Ca^{2+} girişi büyük depolarize ard potansiyellerin ortaya çıkmasına sebep oldu ve bu durum etkinin yorumunu zorlaştırdığı için ajanın bu dozu yüksek kabul edilerek kullanılmadı.

İberiotoksinin 10 nM konsantrasyonu aksiyon potansiyelinin kendisi etkilenmedi ve hiperpolarize edici ard potansiyeller üzerinde daha güvenilir sonuçların ortaya çıkmasını sağladı. İberiotoksin (30 nM) hiperpolarize edici ard potansiyellerinin

pik değerini anlamlı olmamakla birlikte azaltırken ($n=4$, Şekil 1); 50 nM iberiotoksin hem hiperpolarize edici ard potansiyel pik amplitüt değerini hem de %63 oranında geri dönüşüm süresini anlamlı derecede azalttı, (kontrol $-8.3\pm0.9\text{mV}$ ve $30\pm5.4\text{ms}$; iberiotoksin $-2.8\pm0.6\text{mV}$, $12\pm3.2\text{ms}$, $n=5$, $p<0.05$, Şekil 3).



Şekil 1. 30 nM iberiotoksinin aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyeli pik amplitüt değerini ve bu potansiyelin %63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri, AHP: hiperpolarize edici ard potansiyel, mV: mili volt, ms: milisaniye

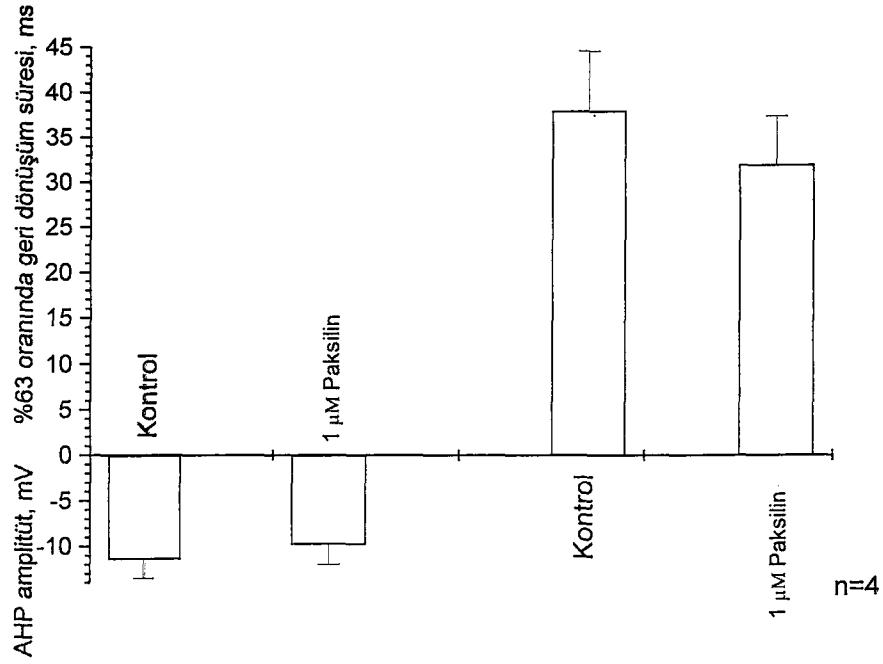


Şekil 2. 50 nM iberiotoksinin aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyeli pik amplitüt değerini ve bu potansiyelin %63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri, AHP: hiperpolarize edici ard potansiyel, mV: mili volt, ms: milisaniye, *: $p<0.05$.

5.4. Paksilinin hiperpolarize edici ard potansiyeller üzerine etkisi:

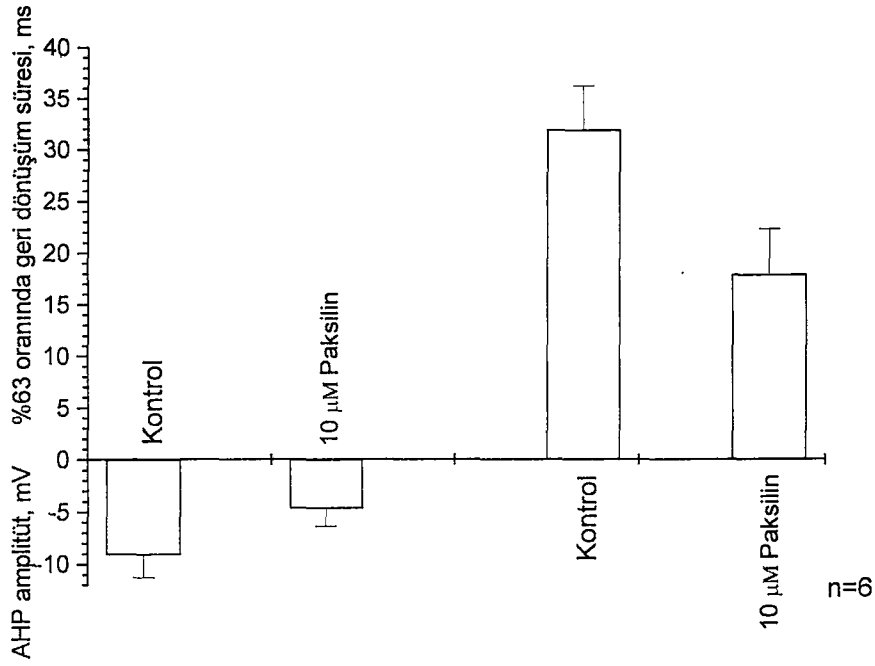
İlave deneylerde hiperpolarize edici ard potansiyeller üzerine paksilinin etkileri bu ajanın 1, 10 ve 30 μM konsantrasyonları kullanılarak araştırıldı.

1 μM paksilin uygulaması kontrol şartlarında -11.4 ± 2.1 olan ortalama amplitüt değerini -9.8 ± 2.2 değerine inhibe etti; fakat bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($n=4$, $p>0.05$, Şekil 2). Paksilinin bu konsantrasyonu hiperpolarize edici ard potansiyellerin %63 oranında geri dönüşüm süresini de anlamlı düzeyde etkilemedi, (kontrol $38 \pm 6.6\text{ms}$; paksilin $32 \pm 5.4\text{ms}$, $n=4$, $p<0.05$).



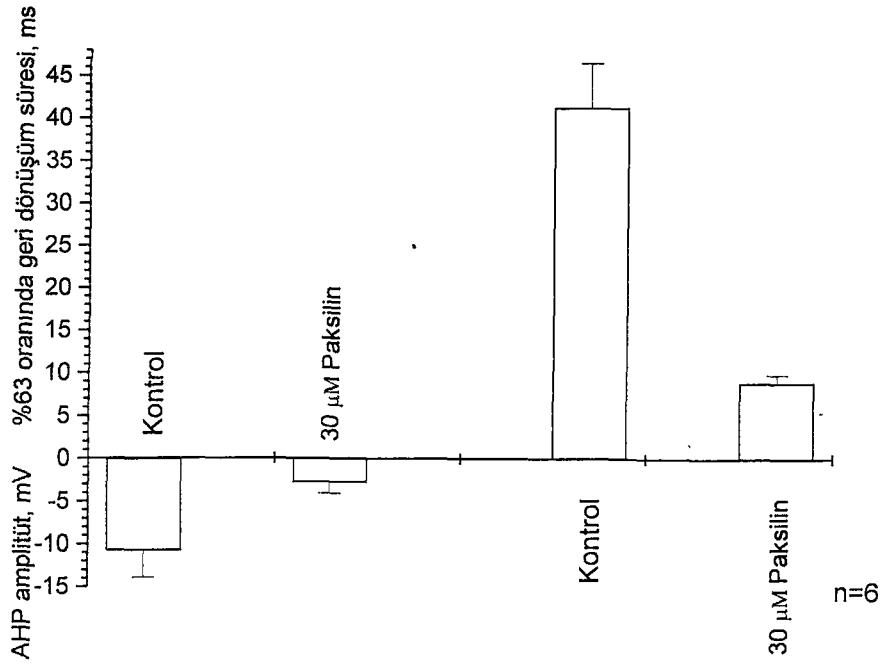
Şekil 3. 1 μ M paksilinin aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyeli pik amplitüt değerini ve bu potansiyelin %63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri, AHP: hiperpolarize edici ard potansiyel, mV: mili volt, ms: milisaniye

10 μ M paksilin uygulaması kontrol şartlarında -9.1 ± 2.2 olan ortalama amplitüt değerini -4.7 ± 1.7 değerine inhibe etti ($n=6$, $p<0.05$, Şekil 4). Paksilinin bu konsantrasyonu hiperpolarize edici ard potansiyellerin %63 oranında geri dönüşüm süresini de anlamlı düzeyde azalttı, (kontrol 32 ± 4.3 ms; paksilin 18 ± 4.4 ms, $n=6$, $p<0.05$).



Şekil 4. 10 µM paksilinin aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyeli pik amplitüt değerini ve bu potansiyelin %63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri, AHP: hiperpolarize edici ard potansiyel, mV: mili volt, ms: milisaniye

30 µM paksilin uygulaması kontrol şartlarında -10.8 ± 3.1 olan ortalama amplitüt değerini -2.8 ± 1.3 değerine inhibe etti ($n= 6$, $p<0.05$, Şekil 6). Paksilinin bu konsantrasyonu hiperpolarize edici ard potansiyellerin %63 oranında geri dönüşüm süresini de anlamlı düzeyde azalttı (kontrol 41.4 ± 5.2 ms; paksilin 9 ± 0.9 ms, $n=6$, $p<0.05$).



Şekil 5. 30 µM paksilinin aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyeli pik amplitüt değerini ve bu potansiyelin %63 oranında geri dönüşüm süresi üzerine etkileri, AHP: hiperpolarize edici ard potansiyel, mV: mili volt, ms: milisaniye

6.TARTIŞMA VE SONUÇ:

Nöronlarda özellikle tekrarlayan aksiyon potansiyeli esnasında hücre içine önemli miktarlarda kalsiyum girişinin gerçekleştiği daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. En yaygın hücre içi ikincil habercilerden biri olan kalsiyumun hücre içine girişi ve hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu artışı nöronlarda hücre içi uyarılabilirliğin kontrolü, gen ekspresyonu, nörotransmitter salınması, enzim aktivasyonu, ve kalsiyum bağımlı iyon kanallarının aktivasyonunun da yer aldığı pek çok hücre içi olayda rol oynar (42, 59). Dinlenme halinde kalsiyum hücre içi ve hücre dışı kısımlarda bulunur ve hücreler için dinlenme halindeki seviyeleri bu hücre içi sinyalleşmelerde rol oynamaz. Ekstraselüler kalsiyum (ekstraselüler vücut sıvıları ve plazmadaki) bağlı ve serbest (iyonize) kalsiyum şeklinde bulunur. Sitoplazmik kalsiyum sinyalleri hücre içi serbest kalsiyum düzeyindeki artışa bağlı olarak ortaya çıkar. Hücre içi serbest kalsiyum düzeyi ise ya hücre dışından voltaj ya da ligand kapılı membran kalsiyum kanalları aracılığı ile Ca^{2+} girişi ya da hücre içi kalsiyum depolarından Ca^{2+} salınması ile gerçekleşir (42). Daha sonra artan bu kalsiyum ya aktif mekanizmalarla hücre dışına atılır ya da hücre içi kalsiyum depolarına geri alınarak hücre içi kalsiyum homeostazisi sağlanır (42). Böylece hücre içi Ca^{2+} depoları hem kalsiyum düzeylerinde artışta kalsiyum kaynağı olarak hem de Ca^{2+} sinyallerinin sonlanmasında Ca^{2+} homeostazisi organeli olarak görev yaparlar. Hücre içi kalsiyum depolarının farmakolojisi ve fizyolojik rolleri çeşitli derlemelerde ele alınmıştır (34, 60) ve bu çalışma voltaj bağımlı kalsiyum kanalları üzerine pineal hormon melatoninin etkilerinin araştırılmasını konu aldığından hücre içi kalsiyum depoları konusunda detaya girilmeyecektir. Ayrıca sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) hücrelerine ryanodin, kafein (4), sifingolipidler (5), sikkik ADP riboz gibi ajanlara duyarlı hücre içi kalsiyum

depolarının varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmada üzerinde çalışılan hiperpolarize edici ard potansiyeller bu hücrelerde gerçekleştiği bilinen (4) kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesi sonucunda artan hücre içi serbest kalsiyuma bağlı olarak potasyum kanallarının aktive olması sonucu ortaya çıkmaktadır. Hücre içi serbest kalsiyum düzeylerinde voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılması sonucu meydana gelen artışın akut etkilerine ilaveden çeşitli kalsiyum bağımlı enzimatik olaylar aktive olur. Kalsiyumun bu yavaş etkileri arasında sinaptik plastisite, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, nöronal gelişme, öğrenme ve hafıza gibi son derece önemli mekanizmaların yer aldığı bildirilmiştir (20).

Çalışmada, sıçan dorsal kök gangliyon sinir hücrelerinde hiperpolarize edici ard potansiyellerden sorumlu iyon kanal akımının kalsiyum bağımlı potasyum kanal blokerleri ve temel hücresel biyofiziksel yaklaşım olan zıtlanma potansiyeli çalışmaları ile belirlenmesi amaçlanmış ve bu biyofiziksel ve farmakolojik yaklaşımlarla bu iyon kanallarının kalsiyum bağımlı potasyum kanal akımlarının olduğu daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak tespit edilmiştir (30, 52).

Yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları omurgalıların sinir sisteminde ve düz kaslar ve epitel doku gibi diğer dokularda bulunmaktadır (52). Bu potasyum kanal tipinin aksiyon potansiyeli esnasında aktive olduğu ve aralarında hipokampus nöronlarının da yer aldığı pek çok nöron tipinde aksiyon potansiyeli repolarize edici fazını kontrol ederek aksiyon potansiyeli ateşleme sıklığını belirledikleri bilinmektedir (53, 58)

Hiperpolarize ve depolarize ard potansiyeller KTKS sonucu ortaya çıkmaktadır. KTKS nöronal uyarılabilmenin kontrolü yanında, lokal sinyallerin amplifikasyonunda önem taşımaktadır. KTKS sonucu aktive olan hiperpolarize ard potansiyellerden sorumlu $I_{K(Ca)}$ kanallarının farmakolojisinin belirlenmesi bu bakımlardan önem taşımaktadır.

Başlıca üç alt gruba ayrılan kalsiyum bağımlı potasyum kanalları aksiyon potansiyellerinin şekillenmesinde rol oynayarak ve ateşleme paternlerini kontrol ederek nöronal fonksiyonlarda önemli roller oynar (52). Yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazı esnasında aktive olarak hızlı hiperpolarize edici ard potansiyelleri (C akımı olarak da adlandırılmaktadırlar, 30, 35), düşük iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları ise tek ya da bir grup aksiyon potansiyelinden sonra aktive olur ve orta süreli hiperpolarize edici ard potansiyellere katkıda bulunur (49), üçüncü grup düşük iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları yavaş hiperpolarize edici ard potansiyellerin oluşumunda rol oynar

Düşük iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanallarının aksine düşük ve orta iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları karibdotoksin ve iberiotoksin gibi selektif kalsiyum bağımlı potasyum kanal blokörleri ile farmakolojik olarak bloklanarak tanımlanabilirler (30).

Hiperpolarize edici ard potansiyellerin ortaya çıkmasında rol oynayan $I_{K(Ca)}$ kanallarının TEA dirençli olduğu fakat apamin ile bloklendiği daha önceki çalışmalarla ortaya konmuştur (30). Bu çalışmada ise iberiotoksinin hiperpolarize ard potansiyellerinin %63 oranında geriye dönüşüm zamanını hızlandırması bu ard

potansiyelin yavaş $I_{K(Ca)}$ kanallarının sorumlu olduğu kısmını baskıladığını göstermektedir.

İberiotoksinin yüksek dozlarda (10 μ M) aksiyon potansiyeli süresini etkilemesi bu ajanın potasyum kanallarını bloklamasına bağlıdır, bunun sonucunda aksiyon potansiyeli pik değeri, süresi etkilenmekte ve bu uzun süren AP esnasında aşırı miktarda Ca^{2+} girişi depolarize ard potansiyellerin ortaya çıkmasını sağlamakta ve apaminin ard potansiyeller üzerindeki etkisini yorumlaması zor bir duruma sokmaktadır.

Toplam 42 hücrenin 14 tanesinde (% 33) depolarize edici ard potansiyeli (DAP), 28 tanesinde (% 67) hiperpolarize edici ard potansiyelinin (HAP) mevcudiyeti gözlemlendi.

Çalışmada kullanılan iberiotoksin ve paksilinin konsantrasyonları daha önce bu ajnaları kullanılan çalışmalarda kullanılan dozlarla uyumludur (45)

Paksilinin sıçan dorsal kök ganglion sinir hücre kültürlerinde aksiyon potansiyeli hiperpolarize edici ard potansiyellerini bloklaması bulgusu; duyuşal hücreler olan bu hücrelerde ilk defa elde edilen bir bulgudur. Yüksek dozlarda non-spesifik etkiyle voltaj bağımlı potasyum kanallarını bloklayarak aksiyon potansiyeli süresini etkilemesi ve suda iyi çözünmemesi bu ajanın önemli dezavantajıdır. Ajanlar dimetil formamid içerisinde çözöldü. Kontrol çalışması yapılmamış olmakla birlikte klorotoksinin çözünmesinde kullanılan DMF'in depolarize edici ard potansiyellere inhibitör etkisinin olması düşünölmemektedir. %0.03 konsantrasyonlarda DMF'nin sıçan dorsal kök gangliyon hücrelerinde gerek tüm hücre diyaliz membran potansiyelleri gerekse yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanallarına anlamlı bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (4).

Kalsiyum bağımlı potasyum kanalları membran depolarizasyonuna ve hücre içi serbest kalsiyum miktarındaki artışa bağlı olarak active olduklarından dolayı bu iyon kanallarının voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığı ile bu hücrelere kalsiyum girişini ve bu hücrelerden nörotransmitter salıverilmesi ile bu hücrelerin uyruilabilmesinin kontrolünde rol oynadıkları sanılmaktadır. Hipokampus nöronlarında yapılan yeni bir çalışmada bu iyon kanallarının sadece nöronal uyarılabilmeyi kontrol etmekle kalmayıp aynı zamanda hücreye artmış kalsiyum girişı ve depolarizasyon esnasında aktif glutamaterjik presinaptik bölgelerde kontrol görevi üstlendiklerini göstermektedir. Bu özellikleri dolayısı ile bu kanalların epileptik ataklar ve beyin iskemisi gibi aşırı depolarizasyon ve kontrolsüz kalsiyum girişı esnalarında “acil fren” görevi üstlendikleri ileri sürülmektedir (24, 39).

Bu iyon kanallarının açılması membranı potasyum denge potansiyelie doğru yönelterek hiperpolarize edeceğinden; bu kanalları bloklayan ajanların (bu çalışmada test edilen paksilin ve iberiotoksin) direk ya da indirek olarak hücre uyarılması ile bu hücrelerde nörotransmitter salıverilmesini artırabileceğı düşünölmektedir. Bundan dolayı yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalların açılması hücreleri eksitotoksik ataklara karşı korumaktadır. Hipokampal nöronlarda yapılan bir çalışmada iberiotoksin ve paksilin uygulanmasının iskemi sonrası hasarı artırdığı ortaya konmuştur (50).

Dorsal kök gangliyon nöronları duyuşal nöronlar olup başta ağrı iletiminde rol oynamaktadırlar. Daha önceki bir çalışmada sıçan DKG nöronlarında etanolün yüksek iletkenlikli potasyum kanallarının aktivasyonuna yol açarak aanaljezik etki meydana getirdiğı gösterilmiştir (55). Daha çok küçük tip DKG nöronlarının A-delta ve C lifleri

ile alakalı olduğu ve nosisepsiyonda rol aldığı bildirilmekle beraber mevcut çalışmada DKG hücreleri arasında alt tiplendirme yapılmadı.

Çalışmada elde edilen aksiyon potansiyeli ard potansiyellerinin $\cong$ %33 ADP ve $\cong$ % 67 AHP oranında dağılım göstermesi sıçan DKG hücrelerinde daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir (4). Çalışmamızda elde edilen zıtlanma potansiyelleri ile Nernst denkleminden hesaplanan denge potansiyelleri arasındaki farkın aynı anda mevcut fakat egemen olmayan diğer membran kanalı iletkenliklerine bağlı olduğu sanılmaktadır. Bazı hücrelerde her iki tip ard potansiyelinin birlikte bulunması; kayıt koşullarımızın fizyolojik koşulları maksimum oranda taklit etmesinden (hiçbir iyon kanalı geçirgenliğinin bloklanmamış olması) dolayı ile anlaşılır olmasına rağmen farmakolojik ajanların etkisinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Fakat voltaj kenetleme çalışmaları istene iyon kanalını farmakolojik olarak izole edip çalışmayı mümkün kılabilir. Daha kesin ifadeler için kalsiyum şelatörleri de kullanılarak voltaj kenetleme ve tek kanal akımı ve hücre içi Ca^{2+} imaj çalışmaları faydalı olacaktır.

Ayrıca iberiotoksinin düşük dozları ile karibdotoksinin sadece hiperpolarize ard potansiyellerine sahip hücrelere birlikte uygulanması bu ard potansiyellerin oluşmasında rol oynayan iyonik mekanizmanın daha iyi tanınmasını sağlayacak farmakolojik yaklaşım olacaktır

7. KAYNAKLAR

1. Adams DJ, Barakeh J, Laskey R, vanBreemen C. (1989). Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J*; 3: 2389-2400.
2. Akbarali H, Nakajima T, Wyse DG, Giles W. (1990). Ca^{2+} -activated K^{+} currents in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*; 68: 1489-1494.
3. Alvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem*; 265: 11083-11090.
4. Ayar A, Scott RH (1999). The actions of ryanodine on Ca^{2+} -activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol*; 359: 81-91.
5. Ayar A, Thatcher N, Zehavi U, Trentham DR, Scott RH. (1998). Mobilization of intracellular calcium by intracellular photolysis of dihydrosphingosine in cultured rat sensory neurones. *Acta Biochimica Polonica*; 45: 311-326.
6. Barret JN, Magleby KL, Pallota BS. (1982). Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Physiol*; 331: 211-230.
7. Benham CD, Bolton TB, Lang KJ, Takewaki T. (1985). The mechanisms of action of Ba^{2+} and TEA on single Ca^{2+} -activated K^{+} channels in arterial and intestinal smooth muscle cell membrane. *Pflügers Arch*; 403: 120-127.

8. Blair LA, Dionne VE. (1985). Developmental acquisition of Ca^{2+} -sensitivity by K^+ channels in spinal neurons. *Nature*; 315: 329-331.
9. Blatz AL, Magleby KL. (1987). Calcium-activated potassium channels. *Trends Neurosci*; 10: 463-467.
10. Blatz AL, Magleby KL. (1986). Single apamin-blocked Ca-activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature*; 323: 718-720.
11. Bontems F, Gilquin B, Roumestand C, Menez A, Toma F. (1992). Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochemistry*; 31: 7756-7764.
12. Brock JA, Cunnane TC. (1995). Effects of Ca^{2+} and K^+ channel blockers on nerve impulses recorded from postganglionic sympathetic nerve terminals. *J Physiol*; 489: 389-402.
13. Brugnara C, DeFranceschi L, Alper SL. (1993). Ca^{2+} -activated K^+ transport of human and rabbit erythrocytes: Comparison of binding and transport inhibition by scorpion toxins. *J Biol Chem*; 268: 8760-8768.
14. Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH. (1989). Toxins in the characterisation of potassium channels. *Trends in Neurosciences*; 12: 59-65.
15. Clapp LH, Turcato S, Hall S, Baloch M. (1998). Evidence that Ca^{2+} -activated K^+ channels play a major role in mediating the vascular effects of iloprost and cicaprost. *Eur J Pharmacol*; 356: 215-224.
16. Cole WC, Sanders KM. (1989). G proteins mediate suppression of Ca^{2+} -activated K^+ current by acetylcholine in smooth muscle cells. *Am J Physiol*; 257: 596-600.

17. Constanti A, Sim JA. (1987). Calcium-dependent potassium conductance in guinea-pig olfactory cortex neurones in vitro. *J Physiol*; 387: 173-194.
18. Forda SR, Kelly JS. (1985). The possible modulation of the development of rat dorsal root ganglion neurons by the presence of 5-HT containing neurones of the brainstem in dissociated cell culture. *Dev Brain Res* 22: 55-65.
19. Gardos G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*; 30: 653-654
20. Ghosh A, Greenberg ME (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*; 268: 239-247.
21. Gittter AH, Beyenbach KW, Chadwick CW, Gross P, Minuth WW, Fromter E. (1987). High-conductance K^+ channels in apical membranes of principal cells cultured from rabbit renal cortical collecting duct. *Pflügers Arch*; 408: 282-290.
22. Golowash J, Kirwood A, Miller C. (1986). Allosteric effects of Mg^{2+} on the gating of Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *J Exp Biol*; 124: 5-13.
23. Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI. (2001). Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist*; 7: 166-177.
24. Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA, Frantz SW, Heman K, Hibbard JR, Huston K, Johnson G, Krishnan BS, Kinney GG, Lombardo LA, Meanwell NA, Myers RA, Moon SL, Ortiz A, Pajor L. (2001). Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. *Nat Med* 7; 471-477.

25. Grygorzky, R, Schwarz W. (1983). Properties of the Ca^{2+} -activated K^{+} conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique. *Cell Calcium*; 4: 499-510.
26. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; 391: 85-100.
27. Hans-Günther K, McManus OB, Lee SH. (1994). Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels *Biochemistry*; 33: 5819-5828.
28. Hay M, Kunze DL. (1994). An intermediate conductance calcium-activated potassium channel in rat visceral sensory afferent neurons. *Neuroscience Letters*; 167: 179-182.
29. Hay M, Kunze DL. (1994). Calcium-activated potassium channels in rat visceral sensory afferents. *Brain Res* 1994; 639: 333-336.
30. Hille B. (1994). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Mass: Sinauer, 184-188.
31. Kaczorowski GJ, Garcia ML. (1999). Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol*; 3: 448-458.
32. Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB, Garcia ML. (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *Bioenerg Biomembr* 1996; 28: 255-267.
33. Knaus HG, Folander K, Garcia-Calvo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith M, Swanson R. (1994). Primary sequence and immunological characterization

- of β -subunit of high conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel from smooth muscle. *J Biol Chem*; 269: 17274-17278.
34. Kostyuk P, Verkhratsky A. (1994). Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*; 63: 381-404.
 35. Lancaster B, Nicoll RA. (1987). Properties of two calciumactivated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *Journal of Physiology* 389, 187-203.
 36. Lang DG, Ritchie AK. (1988). Pharmacological sensitivities of large and small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Biophys J*; 53: 144-147.
 37. Latorre R, Alvarez O. (1988). Ion conduction in ion channels: Some inferences about their gross structure. *Commun Cell Mol Biophys*; 28: 126-134.
 38. Latorre R, Miller C. (1983). Conductance and selectivity in potassium channels *J Membr Biol*; 71: 11-30.
 39. Lawson K. (1996). Potassium channel activation: a potential therapeutic approach? *Pharmacol Ther* 70, 39-63.
 40. Marchenko SM, Sage SO. (1996). Calcium-activated potassium channels in the endothelium of intact rat aorta. *J Physiol* 1996; 492: 53-60.
 41. Meech RW, Strumwasser F. (1970). Intracellular calcium injection activates potassium conductance in *Aplysia* nerve cells. *Fed Proc*; 29: 834a.
 42. Miller RJ. (1991). The control of neuronal Ca^{2+} homeostasis. *Prog Neurobiol*; 37: 255-285.
 43. Morris AP, Gallacher DV, Irvine RF, Petersen OH. (1987). Synergism of inositol trisphosphate and tetrakisphosphate in activating Ca^{++} -dependent K^{+} channels. *Nature*; 330: 653-655.

44. Oberhauser A, Alvarez O, Latorre R. (1988). Activation by divalent cations of a Ca^{2+} -activated K^+ channel from skeletal muscle membrane. *J Gen Physiol*; 92: 67-86.
45. Pedarzani P, Kulik A, Muller M, Ballanyi K, Stocker M. (2000). Molecular determinants of Ca^{2+} -dependent K^+ channel function in rat dorsal vagal neurones. *J Physiol*; 527: 283-290.
46. Pennefather P, Lancaster B, Adams PR, Nicoll RA. (1985). Two distinct Ca^{2+} -dependent K^+ currents in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*; 82: 3040-3044.
47. Petersen OH, Maruyama Y. (1984). Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature*; 307: 693-696 .
48. Ramon L, Andreas O, Pedro L, Osvaldo A. (1989). Varieties of Calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol*; 51: 385-399.
49. Reinhart PH, Chung S, Levitan IB. (1989). A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. *Neuron* 1989; 2: 1031-1041.
50. Rundelín-Pran E, Haug FM, Storm JF, Ottersen P (2002). BK channel activity determines the extent of cell degeneration after oxygen and glucose deprivation: A study in organotypical hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 112, 277-288.
51. Sah P, Davies P. (2000). Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. *Clinical and Experimental Pharmacology*; 27: 657-663.
52. Sah P, Louise Faber ES. (2002). Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol*; 66: 345-353.

53. Sah P. (1995). Different calcium channels are coupled to potassium channels with distinct physiological roles in vagal neurons. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*; 1995; 260: 105-111.
54. Sah P. (1996). Ca^{2+} -activated K^{+} currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci*; 19: 150-154.
55. Scholz, A, Grub M, Vogel W. (1998). Properties and functions of calciumactivated K^{+} channels in small neurones of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *J Physiol*; 513: 55-69.
56. Selala MI, Laekeman GM, Loenders B, Musuku A, Herman AG, Schepens P. In vitro effects of tremorgenic mycotoxins. *J Nat Prod* 1991; 54: 207-212.
57. Trautman A, Marty A. (1984). Activation of Ca-dependent K channels by carbamoylcholine in rat lacrimal glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 611-615.
58. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8, 321-329.
59. Verkhratsky AJ, Petersen OH (1998). Neuronal calcium stores. *Cell Calcium* 24: 333-343.
60. Villa A, Meldolesi J. (1994). The control of Ca^{2+} homeostasis: role of intracellular rapidly exchanging Ca^{2+} stores. *Cell Biol Int*; 18: 301-307.
61. Wikström MA, Manira A. (1998). Calcium influx through N-and P/Q-type channels activate apamin-sensitive calcium-dependent potassium channels generating the late afterhyperpolarization in Lamprey spinal neurons. *Eur J Neurosci*; 10: 1528-1532.

62. Yamakage M, Namiki A. (2002). Calcium channels-basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth*; 49: 151-164.
63. Yellen G. (1987). Permeation in potassium channels: implications for channel structure. *Annu Rev Biophysc Chem* 16: 227-246.



8. ÖZGEÇMİŞ

Elazığ ilinde 01.08.1977 tarihinde doğdum. İlköğretimimi sırasıyla Elazığ, Adapazarı ve Erzurumda tamamladım. Ortaokula Afyonda başladıktan sonra, Elazığ Atatürk orta okulundan mezun oldum. Elazığ Mehmet Akif Ersoy lisesinden 1994 yılında mezun olduktan sonra, aynı yıl içinde başladığım Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Elektrik-Elektronik Mühendisliğinden 1998 yılı sonunda mezun oldum. Daha sonra Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik anabilim dalında yüksek lisansa başladım. Halen devam etmekteyim



9.TEŞEKKÜR

Projenin gerçekleşmesi noktasında ihtiyaç duyulan mali desteği sağladığı için Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu'na (FÜNAF- 458) teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitime başladığım günden itibaren ve tezimin hazırlık ve gelişim safhalarında her türlü moral ve bilgi desteklerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet AYAR'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı bir borç bilirim.

Tez çalışmamda moral desteklerini hiç eksik etmeyen Biyofizik Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Abdölbaki TÖRKÖĞLU'na ve öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK'e, Fizyoloji Anabilim Dalı üyesi Prof. Dr. Gıyaseddin BAYDAŞ'a ve yine aynı anabilim dalı üyeleri Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU, araştırma görevlileri Sinan CANPOLAT, Süleyman SANDAL'a ve tezimin her aşamasında her türlü yardım ve yol gösterici rehberliklerini benden eksik etmeyen Biyofizik Anabilim Dalı doktora öğrencisi değerli abim Mete ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Y.C. TÖRKÖĞRETİM KURULU
BAKÖNATİSYON BAŞKANLIĞI