

Research Article / Araştırma Makalesi

Pravastatin AMPK Yolağının ve Potasyum Kanallarının Aktivasyonu Yoluyla Sıçan Torasik Aortunu Gevşetir

Pravastatin Relaxes Rat Thoracic Aorta via Activation of AMPK Pathway and Potassium Channels

Serdar Şahintürk

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

Özet: Bu çalışma kolesterol düşürücü bir ilaç olan pravastatinin sıçan torasik aortundaki fonksiyonel etkilerini ve etki mekanizmalarını belirlemeyi amaçladı. Erkek Wistar Albino sıçanların torasik aortlarından izole edilen damar segmentleri, izole organ banyosu sistemindeki bölmelere yerleştirildi. Dinlenme gerimi 1 g olarak ayarlandı. Dengelenme sürecinden sonra torasik aorta halkaları 10^{-6} M fenilefrin ile kasıldı. Stabil bir kasılma sağlandıktan sonra damar halkalarına kümülatif (10^{-8} - 10^{-4} M) pravastatin uygulandı. Pravastatinin vazoaaktif etki mekanizmalarını belirlemek için, belirtilen deney protokolü, spesifik sinyal yolağı inhibitörleri ve potasyum kanal blokörlerinin inkübasyonundan sonra tekrarlandı. Pravastatin, önceden kasılmış sıçan torasik aort halkalarında konsantrasyona bağımlı bir gevşeme gösterdi ($p<0,001$). Endotelin çıkarılması, L-NAME uygulaması ve indometazin inkübasyonu, pravastatinin vazorelaksan etki düzeyini anlamlı ölçüde azalttı ($p<0,001$). Pravastatin kaynaklı vazorelaksasyon seviyeleri, TEA, 4-Aminopiridin, XE-991, dorsomorfin ve anandamid uygulamalarından sonra anlamlı ölçüde azaldı ($p<0,001$). Gliburid ve baryum klorür uygulamaları pravastatinin vazorelaksan etki düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ($p=1,000$). Pravastatin sıçan torasik aortunda belirgin bir vazorelaksan etkiye sahiptir. Pravastatinin vazorelaksan etkisinde sağlam endotel, nitrik oksit, prostanoidler, AMPK ve potasyum kanalları (BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V ve K_{2p} kanalları) rol oynamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Aort, Endotelyum, Kolesterol, Nitrik oksit, Potasyum

Abstract: This study aimed to determine the functional effects and mechanisms of action of pravastatin, a cholesterol-lowering drug, in rat thoracic aorta. Vessel segments isolated from the thoracic aortas of male Wistar Albino rats were placed in chambers within an isolated tissue bath system. The resting tension was set to 1 g. After an equilibration period, the thoracic aorta rings were contracted with 10^{-6} M phenylephrine. Once a steady contraction was obtained, cumulative pravastatin (10^{-8} - 10^{-4} M) was applied to the vascular rings. To identify the vasoactive effect mechanisms of pravastatin, the specified experimental protocol was repeated after incubation with specific signaling pathway inhibitors and potassium channel blockers. Pravastatin showed a concentration-dependent relaxation in precontracted rat thoracic aorta rings ($p<0.001$). The vascular relaxant effect levels of pravastatin were significantly reduced by removal of the endothelium, L-NAME application, and indomethacin incubation ($p<0.001$). Pravastatin-induced vasorelaxation levels were also significantly reduced following TEA, 4-Aminopyridine, XE-991, apamin, dorsomorphin, and anandamide administrations ($p<0.001$). However, applications of glyburide and barium chloride did not cause a statistically significant change in the vasorelaxant effect level of pravastatin ($p=1.000$). Pravastatin has a prominent vasorelaxant effect in rat thoracic aorta. Intact endothelium, nitric oxide, prostanoids, AMPK, and potassium channels (BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V , and K_{2p} channels) play a role in the vascular relaxant effect of pravastatin.

Keywords: Aort, Endothelium, Cholesterol, Nitric oxide, Potassium

ORCID ID of the author: SŞ. [0000-0002-7612-0055](https://orcid.org/0000-0002-7612-0055)

Received 18.04.2023

Accepted 16.11.2023

Online published 22.11.2023

Correspondence: Serdar ŞAHİNTÜRK – Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

e-mail : sahinturk@uludag.edu.tr

1. Giriş

Kardiyovasküler hastalıklar, dünya genelindeki ölümlerin önde gelen nedenlerinden birisidir (1). Statinler, iskemik inme, koroner arter hastalığı ve ateroskleroz gibi yaygın kardiyovasküler hastalıkların altında yatan önemli bir neden olan hiperkolesterolemi için en etkili tedavi ajanlarından biridir (2,3). Statinler, kolesterol sentezindeki hız sınırlayıcı basamak olan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzimini inhibe ederek düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol ve trigliserid seviyelerini etkili bir şekilde azaltırken yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol seviyelerini hafifçe artırırlar (2,4). Kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra, statinler aynı zamanda pleiotropik etkiler olarak bilinen birçok diğer faydalı etkiye de sahiptir (5-8). Bu etkiler, anti-inflamatuar ve antitrombotik etkiler, aterosklerotik plakların stabilitesini artırma, oksidatif stresi azaltma, endotel disfonksiyonunu iyileştirme ve nitrik oksit (NO) biyoyararlılığını artırma gibi etkileri içerir. Statinlerin bu pleiotropik etkileri, kardiyovasküler sistemi olumlu yönde etkilemektedir (5,6).

Vazorelaksasyon, statinlerin önemli bir pleiotropik etkisidir (9,10). Literatürdeki çalışmalar, bazı statin grubu ilaçların çeşitli arteriyel vasküler yataklarda vazorelaksasyona neden olduğunu bildirmiştir (11-13). Sönmez Uydes-Doğan ve ark. pravastatin, atorvastatin ve serivastatinin sıçan torasik aortunda vazorelaksan olarak etkili olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, NO sinyal yolağının ve prostanoidlerin statinlerin damar gevşetici etki mekanizmasında rol oynadığını göstermiştir (13). Yakın tarihli bir çalışmada, simvastatinin sıçan torasik aortunda vazorelaksasyonu uyardığı belirlenmiştir. NO sinyal yolağının aktivasyonunun yanı sıra, potasyum kanallarının aktivasyonu ve kalsiyum kanallarının inhibisyonu gibi mekanizmaların simvastatin kaynaklı vazorelaksasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (14). Ancak, statinlerle ilgili vazokonstriktör etki bildiren bir çalışma da vardır. Pérez-Guerrero ve ark. Simvastatinin

sıçan aortunda vazokonstriksiyona neden olduğunu ileri sürmüştür (15).

Esansiyel hipertansiyon, ateroskleroz ve kalp yetmezliği gibi toplumda yaygın olarak görülen kardiyovasküler hastalıklar vasküler düz kasın artmış aktivitesi ile ilişkilidir. Morbidite ve mortalitenin çok önemli birer sebebi olan bu kardiyovasküler hastalıkların etkin tedavisi zor ve maliyetlidir. Yeni düz kas gevşetici ajanların keşfinin yanı sıra daha eski ilaçların düz kas gevşetici etkilerinin belirlenmesi bu hastalıkları etkili bir şekilde tedavi edebilecek yeni ilaçların bulunması için çok önemlidir. Statinlerin vasküler fonksiyonel etkileri ile ilişkili olarak daha önceki çalışmalarda elde edilen veriler oldukça sınırlı ve çelişkilidir. Ayrıca, statinlerin etki mekanizmalarında ilaç tipine bağlı olarak değişkenlik gözlemlenmiştir (10,13). Pravastatin, klinikte kullanımı olan önemli statinlerden bir tanesidir. Pravastatinin vasküler fonksiyonlar üzerindeki etkileri ve etki mekanizmaları bugüne kadar kapsamlı olarak çalışılmamıştır. Bu çalışmada, pravastatinin sıçan torasik aortundaki vasküler kontraksiyon ve relaksasyon fonksiyonları üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

Etik onay ve deney hayvanları

Bu çalışma için Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan etik onay alındı (Tarih: 07.06.2022, Sayı: 2022-08/07). Çalışmada, 250-300 gram ağırlığındaki 10 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı.

İzole organ banyosu deneyleri

Hayvanlar anestezi olmadan dekapite edildi ve torakoabdominal bölgeleri açılarak torasik aort dokuları dikkatlice izole edildi. İzole edilen torasik aort dokuları Petri kaplarında bulunan buzdolabı soğukluğundaki Krebs solüsyonu içerisine yerleştirildi. Dokuların çevresindeki periferik yağ ve bağ dokuları temizlendi.

Daha sonra 4 mm boyutunda vasküler halkalar elde edildi.

Çalışmada kullanılan Krebs solüsyonu (2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mM KH_2PO_4 , 11 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 4,8 mM KCl , 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ve 118 mM NaCl) ve %95 O_2 ve %5 CO_2 karışımı ile sürekli olarak gazlandırıldı. Sıcaklık 37°C 'de sabit tutuldu ve torasik aort halkaları 20 ml'lik banyo bölmelerindeki düzeneklere (MAY IOBS99, Commat Ltd., Ankara, Türkiye) yerleştirildi. Sistemdeki pH 7,4 olarak sabit tutuldu. Bazal vasküler gerim 1 gram olarak ayarlandıktan sonra izometrik kuvvet transdüserleri (SS12LA force transducer, BIOPAC Systems, Inc., Aero Camino, ABD) aracılığıyla vasküler gerim değerleri sürekli olarak kaydedildi. 90 dakikalık dengelenme periyodunun ardından ilaç uygulamaları yapıldı.

Torasik aort halkaları, doz-yanıt eğrilerini oluşturmak amacıyla, 10^{-6} M fenilefrin veya 60 mM potasyum klorür (KCl) uygulanarak kasıldı. Stabil bir kasılma yanıtı sağlandıktan sonra torasik aort halkalarına kümülatif olarak ön deneylerde belirlenen pravastatin konsantrasyonu (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulandı. Pravastatinin vasküler fonksiyonel etki mekanizmalarını belirlemek için spesifik sinyal yolak inhibitörleri ve potasyum kanal blokörleri kullanıldı. Bu inhibitörler ve blokörler, fenilefrinden 30 dakika önce uygulandı. 30 dakikalık inkübasyondan sonra vasküler halkalara fenilefrin (10^{-6} M) ile ön kasılma uygulandı. Stabil bir kasılma yanıtı sağlandı ve ardından kümülatif olarak pravastatin (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulandı.

Deneylerden önce endotel sağlamlığı 10^{-6} M fenilefrin ile kasılan damarlarda 10^{-6} M asetilkolin ile elde edilen gevşeme yanıtının %80'den büyük olması ile teyit edildi. Pravastatinin vazoaktif etkilerinde endotelin rolünü belirlemek için bazı damar halkalarının endotel yüzeyi hafifçe ovuldu ve endotel çıkarıldı. 10^{-6} M fenilefrin ile ön kasılmadan sonra asetilkolin (10^{-6} M) gevşeme yanıtının %10'dan az olması endotelin çıkarılmış olduğunu gösterdi.

Elde edilen vasküler gerim değerleri, izole organ banyosu sistemi (BIOPAC MP36,

Santa Barbara, CA, ABD) ile entegre bilgisayar yazılımı ile analiz edildi. Fenilefrin (10^{-6} M) kaynaklı maksimum kasılma %100 olarak kabul edildi. Bu değer üzerinden ilaç uygulamaları sonrasındaki gerim değerlerinin yüzdesi hesaplandı.

İlaçlar

Fenilefrin, asetilkolin, tetraetilamonyum (TEA; yüksek iletkenlikli Ca^{2+} -aktif edilmiş K^+ kanal blokörü), N^ω -Nitro-L-arginin metil ester (L-NAME; endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) inhibitörü), indometazin (siklooksijenaz (COX) 1/2 inhibitörü), apamin (küçük iletkenlikli Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanal blokörü), anandamid (2 porlu K^+ kanal blokörü), gliburid (ATP'ye duyarlı K^+ (K_{ATP}) kanal blokörü), 4-Aminopiridin (voltaj kapılı K^+ (K_V) kanal blokörü) dorsomorfin (adenozin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK) inhibitörü), baryum klorür (BaCl_2 ; içeri doğrultucu K^+ kanal blokörü) ve pravastatin Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, Missouri, ABD) satın alındı. Fenilefrin (10^{-6} M), asetilkolin (10^{-6} M), L-NAME (10^{-4} M), TEA (10 mM), apamin (100 nM), BaCl_2 (30 μM) ve pravastatin (10^{-8} - 10^{-4} M) distile suda çözüldü. İndometazin (5 μM), gliburid (10 μM), dorsomorfin (10 μM) ve anandamid (10 μM), dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. İlaç dozları literatürdeki çalışmalara göre belirlendi (16,17). DMSO'nun nihai konsantrasyonu, sonuçları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkilemedi. Kullanılan ilaçlar fenilefrin ile elde edilen kasılma yanıtını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkilemedi.

İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz için IBM SPSS v.23.0 paket programı (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) kullanıldı. İki bağımsız grubun istatistiksel karşılaştırması için bağımsız örneklem t-testi uygulandı. Çoklu gruplardaki karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA ve ardından Bonferroni post hoc testi uygulandı. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Sıçan torasik aortundaki pravastatin ile uyarılan vazorelaksasyon

Çalışmanın ilk aşamasında pravastatinin sıçan torasik aort halkalarındaki vasküler fonksiyonel etkileri ve bunun endotel ile ilişkisi araştırıldı. 10^{-6} M fenilefrinin neden olduğu maksimum gerim %100 olarak kabul edildi. Pravastatin (10^{-8} - 10^{-4} M) tek başına uygulandığında bazal damar gerimi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadı ($p>0,05$). Pravastatin uygulaması (10^{-8} - 10^{-4} M), fenilefrin ile önceden kasılmış sıçan torasik aortasında konsantrasyona bağımlı bir vazorelaksan etki ile sonuçlandı ($p<0,001$). Kümülatif pravastatin uygulamasından sonra ortalama gerim değeri %16,14±4,34 idi. Maksimum vazorelaksasyon seviyesi yaklaşık %84 olarak gerçekleşti (Şekil 1A). Damarların endotelinin çıkarılması, pravastatinin vazodilatör etki seviyesini önemli ölçüde azalttı. Endotelsiz damar halkalarında kümülatif pravastatin uygulamasından sonra ortalama gerim değeri %83,20±12,27 ve maksimum vazorelaksasyon seviyesi yaklaşık %17 olarak bulundu (Şekil 1B). Bu veriler, pravastatinin damar gevşetici mekanizmasının büyük ölçüde endotel bağımlı olduğuna işaret etti.

Sıçan torasik aortundaki pravastatin ile uyarılan vazorelaksasyonun mekanizmaları: Endotel ve ilişkili faktörlerin rolü

Çalışmanın bir sonraki adımı, pravastatinin vazoaaktif mekanizmalarının daha fazla araştırılmasını içeriyordu. İlk olarak, endotel aracılı mekanizmaların muhtemel etkileri araştırıldı. Pravastatinin vazodilatör etki seviyesi, NOS inhibitörü L-NAME ile inkübasyondan sonra istatistiksel anlamlı olarak azaldı (maksimum dozda $p<0,001$) (Şekil 1C). Kümülatif pravastatin uygulamasından sonra ortalama gerim değeri %59,72±7,85 idi. COX inhibitörü indometazin inkübasyonu da pravastatinin vazodilatör etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden oldu (maksimum dozda $p<0,001$) (Şekil 1D). Kümülatif pravastatin uygulamasından sonra

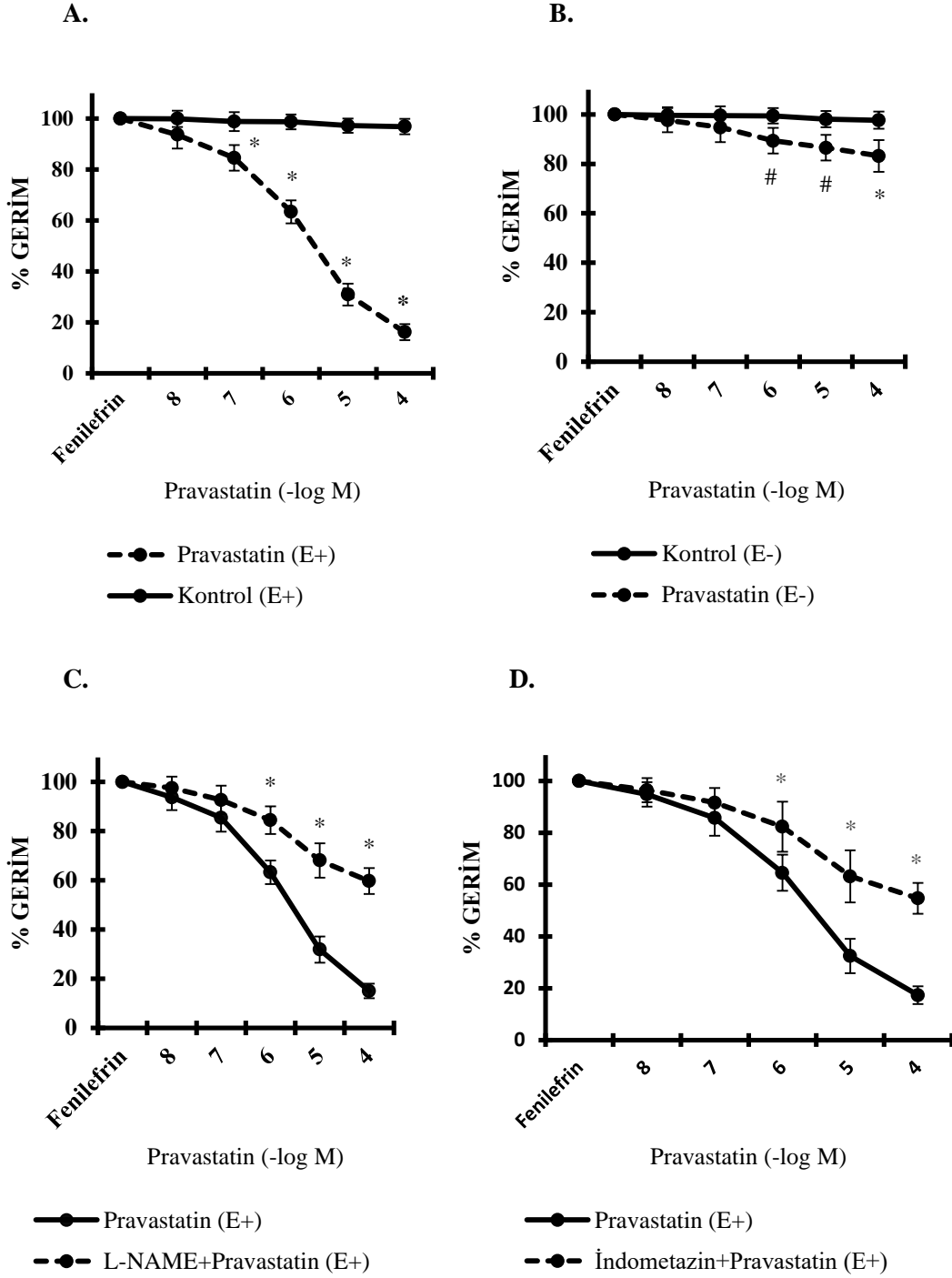
ortalama gerim değeri %54,68±6,66 idi. Bu bulgular, NO sinyal yolağının ve prostaglandinlerin pravastatin kaynaklı vazorelaksasyona dahil olduğunu gösterdi.

Sıçan torasik aortundaki pravastatin ile uyarılan vazorelaksasyonun mekanizmaları: Potasyum kanallarının rolü

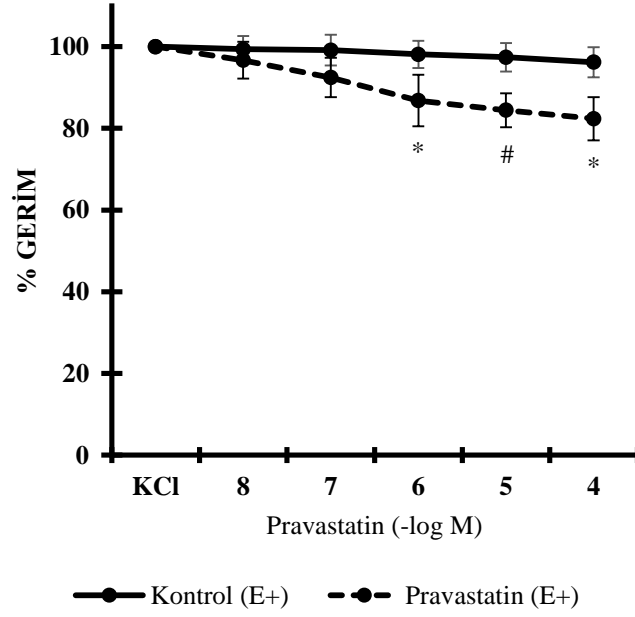
Pravastatinin damar gevşetici etki seviyesinin, potasyum klorür (60 mM) ile önceden kasılmış damar halkalarında önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Kümülatif pravastatin uygulamasından sonra ortalama gerim değeri %82,36±11,31 idi ve potasyum klorür ile önceden kasılmış damar halkalarındaki maksimum gevşeme seviyesi yaklaşık %18 olarak bulundu (Şekil 2). Bu veri potasyum kanal aktivasyonunun pravastatinin vazorelaksan etki mekanizmasına dahil olduğunu gösterdi. TEA, 4-Aminopiridin, apamin ve anandamid sıçan torasik aortundaki pravastatinin vasküler gevşetici etkisinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden oldu (tüm gruplarda maksimum dozda p değerleri $<0,001$) (Şekil 3A-D). Bunun aksine, gliburid ve $BaCl_2$ pravastatin kaynaklı vazorelaksasyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe neden olmadı (tüm gruplarda $p=1,000$). Bu bulgular, potasyum kanal aktivasyonunun (BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V ve K_{2p} kanalları) pravastatinin damar gevşetici etkilerinde rol oynadığını gösterdi.

Sıçan torasik aortundaki pravastatin ile uyarılan vazorelaksasyonun mekanizmaları: AMPK sinyal yolağının rolü

Son olarak AMPK sinyal yolağının pravastatinin vazorelaksan etkisine dahil olup olmadığı araştırıldı. AMPK inhibitörü dorsomorfin, kümülatif pravastatin uygulamasından sonra ortalama %56,48±8,32'lik bir gerim değeri ile pravastatinin vazodilatör etki seviyesini önemli ölçüde azalttı (maksimum dozda $p<0,001$) (Şekil 4). Bu veri, AMPK sinyal yolağının pravastatin kaynaklı vazorelaksasyona katkıda bulunduğunu gösterdi.

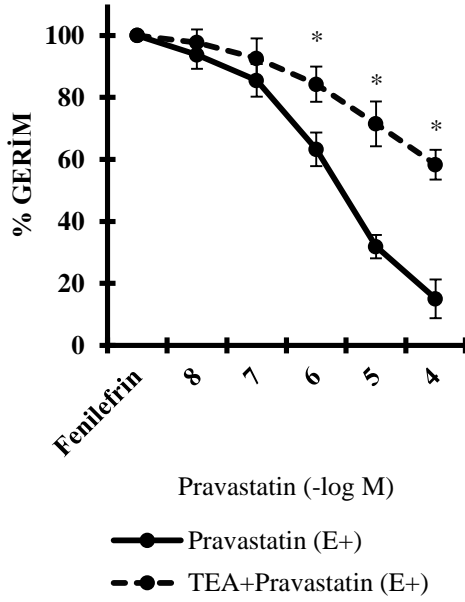


Şekil 1: A. Endoteli sağlam (E+) sıçan torasik aortunda pravastatinin konsantrasyona bağımlı damar gevşetici etkisi. B. Endoteli çıkarılmış (E-) sıçan torasik aortunda pravastatinin konsantrasyona bağımlı damar gevşetici etkisi. C. L-NAME inkübasyonunun pravastatin aracılı vazorelaksasyon üzerindeki etkisi. D. İndometazin inkübasyonunun pravastatin aracılı vazorelaksasyon üzerindeki etkisi. Her grupta n=8. #: p<0,05. *: p<0,001. E+: Endoteli sağlam. E-: Endoteli çıkarılmış.

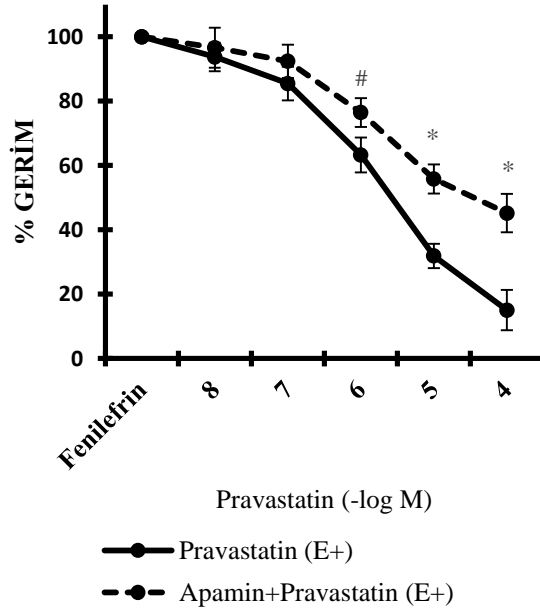


Şekil 2: Pravastatinin yüksek potasyum kasılması üzerine etkisi. n=8. *: p<0,05. #: p<0,01. KCl: potasyum klorür. E+: Endoteli sağlam.

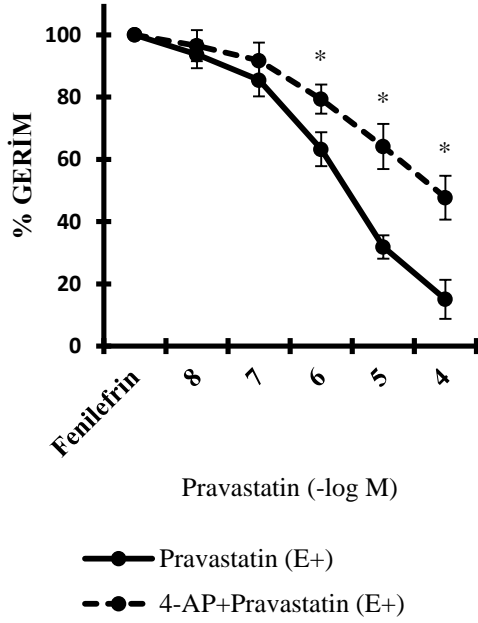
A.



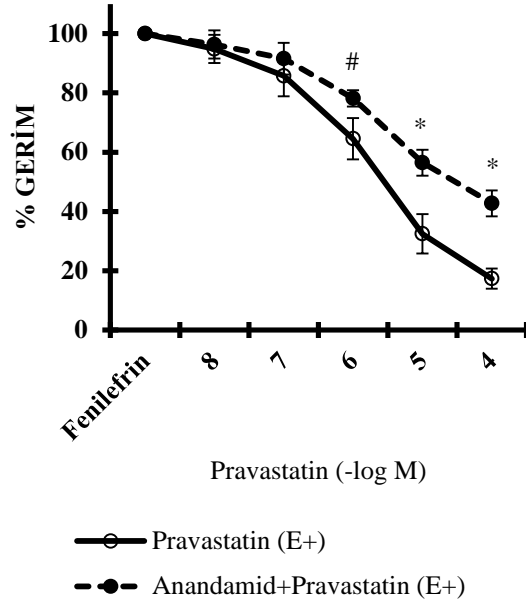
B.



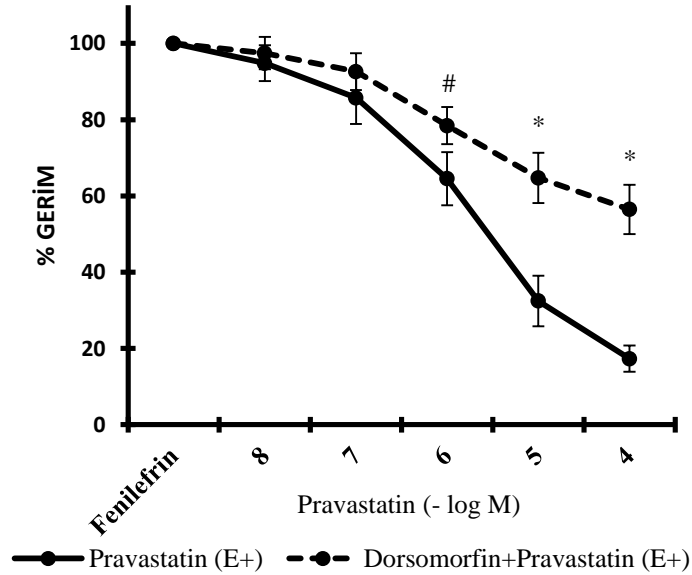
C.



D.



Şekil 3: A. TEA inkübasyonunun pravastatin aracılı vazorelaksasyon üzerindeki etkisi. B. Apamin inkübasyonunun pravastatin aracılı vazorelaksasyon üzerindeki etkisi. C. 4-Aminopiridin inkübasyonunun pravastatin aracılı vazorelaksasyon üzerindeki etkisi. D. Anandamid inkübasyonunun pravastatin aracılı vazorelaksasyon üzerindeki etkisi. n=8. *: p<0,01. #: p<0,001. E+: endoteli sağlam. TEA: tetracilamonyum. 4-AP: 4-Aminopyridine.



Şekil 4: Dorsomorfin inkübasyonunun pravastatin aracılı vazorelaksasyon üzerindeki etkisi. n=8. #: p<0,01. *: p<0,001. E+: Endoteli sağlam.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma, pravastatinin ön kasılma uygulanmış sıçan torasik aortunda gevşemeye neden olduğunu göstermiştir. Pravastatinin damar gevşetici etkisine büyük ölçüde endotele bağımlı mekanizmaların aracılık ettiği belirlenmiştir. Ayrıca sunulan çalışma, pravastatinin damar gevşetici etkisinin, NO sinyal yolağı, prostanoidler, AMPK sinyal yolağı ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunan çeşitli potasyum kanal alt tiplerinin aktivasyonu gibi kompleks mekanizmalarla meydana geldiğini göstermiştir.

Literatürdeki son çalışmalar, statinlerin çok çeşitli pleiotropik etkilerinin olduğunu düşündürmektedir (5,8). Bu etkilerin en önemlilerinden birisi statinler tarafından vasküler düz kas kasılma-gevşeme yanıtlarının düzenlenmesidir (9,10). Statinlerin vazoaktif etkileri ile ilişkili çalışmaların birinde, simvastatinin sıçan torasik aortunda kontraksiyona neden olduğu bildirilmiş olup, simvastatinin indüklediği vasküler kontraksiyonun endotelin uzaklaştırılması ve NO sentezinin inhibisyonu ile arttığı saptanmıştır (15). Öte yandan, birçok statinin vasküler düz kasın gevşemesini indüklediği öne sürülmüştür (9,10,13). Önceki çalışmalarda atorvastatin, serivastatin, lovastatin, pravastatin, fluvastatin ve rosuvastatin gibi bazı statinlerin sıçan torasik aortu ve mezenterik arteri gibi çeşitli damarlarda düz kas gevşemesini uyardığı bildirilmiştir (9-13). Bu çalışmalar, pravastatin kaynaklı vazorelaksasyonun altında yatan mekanizmalar olarak NO sinyal yolağını ve prostanoidleri vurgulamaktadır. Ancak daha önceki çalışmalar, vasküler düz kas hücrelerinde eksprese edilen tüm potasyum kanal alt tiplerinin pravastatin aracılı vazorelaksasyondaki rolünü kapsamlı bir şekilde araştırmamıştır. Ayrıca, pravastatin aracılı vazorelaksasyonda AMPK sinyal yolağının aktivasyonunun rolünü araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut araştırmanın bulguları, pravastatin ile indüklenen vazorelaksasyonun, NO sinyal yolağı, prostanoidlerin aktivasyonu gibi endotel ilişkili mekanizmaların ve AMPK sinyal yolağının uyarılmasının yanı sıra

BK_{Ca}, SK_{Ca}, K_V ve K_{2p} gibi çeşitli potasyum kanallarının aktivasyonu yoluyla meydana geldiğini ilk kez göstermiştir.

Pravastatinin fenilefrin ile önceden kasılmış vasküler halkalara kümülatif olarak uygulanması önemli düzeyde bir damar gevşetici etki sağlamıştır. Bu damar örneklerindeki maksimum gevşeme seviyesi yaklaşık % 84 olarak bulunmuştur. Endotelin çıkarılmasından sonra pravastatinin indüklediği damar gevşetici etki büyük ölçüde azalmıştır. Endotelden arındırılmış vasküler halkalarda yaklaşık % 17'lik bir maksimal vazorelaksan düzeyi belirlenmiştir. Bu bulgu, pravastatin aracılı sıçan torasik aort gevşemesinin büyük ölçüde endotele bağımlı mekanizmalar aracılığıyla meydana geldiğini göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda statinlerin vasküler fonksiyonel etkilerine ve etki mekanizmalarına dair çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Statinlerin izole damarlarda gevşemeye neden olduğu büyük ölçüde kabul görmüşse de, bu etkinin endotele bağımlılığı konusunda farklı bulgular elde edilmiştir. Örneğin, lovastatin ve fluvastatinin endotelden bağımsız mekanizmalarla etki gösterdiği öne sürülmüştür (10,12). Bunun aksine, atorvastatin, pravastatin ve serivastatinin ise büyük ölçüde endotele bağımlı mekanizmalarla etki gösterdiği bildirilmiştir (13). Bazı araştırmacılar serivastatinin sıçan aortundaki damar gevşetici etkisinin endotelden bağımsız olduğu öne sürerken, bazıları bu etkinin endotele bağımlı olduğunu rapor etmiştir (10,13). Sunulan çalışmanın verileri, pravastatin aracılı sıçan torasik aort gevşemesinin büyük ölçüde endotele bağımlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuç daha önceki pravastatin ile ilişkili verilerle tutarlılık göstermektedir. Bununla birlikte, daha önceki bir çalışmada endotelin uzaklaştırılması sonrasında pravastatinin vasküler gevşetici etkisi yaklaşık olarak yarısı düzeyine inmiştir (13). Sunulan çalışma ise vazorelaksasyon seviyesindeki düşüşün daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu sonuç pravastatinin vazorelaksan etkisindeki endotele

bağımlılığın çok daha büyük oranda olduğunu düşündürmektedir.

Pravastatin aracılı vazorelaksasyonun endotelial bağımlılığını gösterdikten sonra, endotel kaynaklı faktörlerin, özellikle eNOS/NO sinyal yolağı ve vazorelaksasyona aracılık ettiği bilinen prostasiklin gibi prostanooidlerin muhtemel rolleri araştırılmıştır (18). Önceki çalışmalarda, NO sinyal yolağı ve prostaglandinlerin sıçan aortundaki pravastatin, atorvastatin, serivastatin, simvastatin ve rosuvastatin gibi ilaçların vazodilatör etkilerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (9,11,13). Mevcut çalışmada, sırasıyla NO sinyal yolağı ve prostanooidlerin katkısını değerlendirmek için eNOS inhibitörü L-NAME ve COX 1/2 inhibitörü indometazin kullanılmıştır. L-NAME inkübasyonundan sonra pravastatin kaynaklı vazorelaksasyonun maksimum seviyesi yaklaşık % 40 olarak belirlenmiştir. Pravastatinin maksimum damar gevşetici etki seviyesi, indometazin inkübasyonundan sonra yaklaşık % 45 olacak şekilde azalmıştır. Bu çalışmanın bulguları, hem NO sinyal yolağının hem de prostanooidlerin pravastatin aracılı vazorelaksasyona katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, NO sinyal yolağının inhibisyonunun etkisinin hafifçe daha yüksek olmasına karşın her iki inhibitörün etki düzeyleri benzerlik göstermiştir. Sönmez Uydeş-Doğan ve ark.'ın çalışmasında da benzer bir etki gözlenmiştir (13). Bu araştırmacılar mevcut çalışmadan farklı olarak inhibitörleri kombine olarak da uygulamış ve bu durumda inhibitör etki düzeyinin arttığını rapor etmiştir.

Potasyum kanallarının aktivasyonunun vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona neden olduğu ve hücre içine kalsiyum girişini inhibe ederek düz kas gevşemesine neden olduğu bilinmektedir (19,20). Son yıllarda yapılan çalışmalarda da potasyum kanal aktivasyonunun vazodilatör maddelerin etki mekanizmasında kritik rol oynadığı bildirilmektedir (21,22). Bu nedenle, vasküler düz kas hücrelerinde yer aldığı bildirilen beş potasyum kanalı alt tipinin (K_{ATP} , K_V , K_{2p} , Kir ve K_{Ca}) pravastatin aracılı vazorelaksasyona katılıp

katılmadığı araştırılmıştır. Damarların seçici potasyum kanal blokörleri ile 30 dakikalık inkübasyonlarını takiben vazorelaksasyon üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. BK_{Ca} kanal blokörü TEA, SK_{Ca} kanal blokörü apamin, K_V kanal blokörü 4-AP ve K_{2p} kanal blokörü anandamid ile inkübasyondan sonra pravastatinin damar gevşetici etki düzeyinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, damar gevşetici etki, Kir kanal blokörü $BaCl_2$ ve K_{ATP} kanal blokörü gliburid uygulamasından anlamlı düzeyde etkilenmemiştir. Bu nedenle, mevcut verilerle, pravastatinin vazodilatör etkilerine aracılık eden potasyum kanal alt tiplerinin BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V ve K_{2p} kanalları olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Önceki çalışmalar, statinlerin vazodilatör etkilerine potasyum kanallarının katkısı hakkında sınırlı ve çelişkili veriler sağlamıştır. Sönmez Uydeş-Doğan ve ark. sıçan torasik aortunda pravastatin, atorvastatin ve serivastatinin vazorelaksan etkilerinin endotele bağımlı, NO aracılı ve prostanooidlerle ilişkili olduğunu bildirdikleri çalışmalarında, K_{ATP} kanallarının pravastatin ve atorvastatin aracılı vazorelaksasyon ile ilişkili olmadığını, ancak serivastatin aracılı vazorelaksasyonda rol oynadığını bulmuştur (13). Buna karşılık, sunulan çalışma potasyum kanallarının pravastatin kaynaklı vazorelaksasyondaki rolünü daha kapsamlı bir şekilde araştırmıştır ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunan K_{ATP} kanalları dışındaki diğer potasyum kanal alt tiplerinin bazılarının pravastatinin vazorelaksan etkisine dahil olduğunu belirleyen ilk çalışma olmuştur. Önceki çalışmayla benzer olarak K_{ATP} kanallarının gliburid ile blokajı pravastatinin indüklediği vazorelaksan etki düzeyini değiştirmemiştir. Öte yandan, BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V , ve K_{2p} kanallarının blokajı ile pravastatinin vazorelaksan etkisi önemli ölçüde bloke olmuştur. Mukai ve ark. serivastatinin K_V kanallarını aktive ederek sıçan aortunu gevşettiğini öne sürmüşlerdir (10). Daha sonraki bir çalışmada ise rosuvastatinin kafeterya tarzı diyet uygulanan sıçanların aortunda endotel, NO, prostaglandinler, K_{Ca} kanalları ve K_V kanalları yoluyla damar gevşemesine neden olduğu bildirilmiştir (9). Bu veriler, farklı statinlerin farklı potasyum kanalı alt tiplerini

aktive edebileceğini göstermektedir. Mevcut çalışmanın bulguları Mukai ve ark.'ın çalışmasının sonuçlarıyla kısmen tutarlı olsa da, rosuvastatinin etki mekanizmasından farklı olarak pravastatin aracılı vazorelaksasyona K_{2p} kanallarının ve AMPK sinyal yolağının da katkısının olduğu ilk kez mevcut çalışmada elde edilen verilerdir.

AMPK aktivasyonunun damar gevşemesi üzerinde yararlı etkileri olduğu düşünülmektedir. Metformin ve beta-lapakon gibi bazı etken maddelerin düz kas gevşetici etkilerinde AMPK sinyal yolağı anahtar rol oynamaktadır (23-25). Statinlerin patofizyolojik etkilerinde AMPK fosforilasyonunun önemli olduğu bildirilmiştir (26,27). Atorvastatin kullanılarak yapılan bir çalışmada statinlerin in vivo ve in vitro olarak eNOS fosforilasyonunu ve AMPK fosforilasyonu yoluyla NO üretimini uyardığı belirlenmiştir (27). Bu veriler, statinlerin vasküler fonksiyonel etkilerinin, AMPK sinyal yolağı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmada, AMPK sinyal yolağının pravastatin kaynaklı vazorelaksasyondaki rolünü araştırmak için AMPK inhibitörü dorsomorfin inkübasyonu uygulanmıştır. 30 dakikalık dorsomorfin inkübasyonundan sonra, pravastatinin vasküler düz kas gevşetici etki seviyesinde önemli düzeyde azalma saptanmıştır. Bu bulgular, AMPK'nin pravastatinin vazoaktif etkilerine de katkıda bulunan diğer bir sinyal yolağı olduğunu düşündürmektedir. Bildiğimiz kadarıyla bu, AMPK'nin statinlerin vasküler fonksiyonel etki mekanizmalarındaki rolünü gösteren ilk çalışmadır.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları pravastatinin sıçan torasik aortunda önemli düzeyde vazorelaksasyona neden olduğunu göstermektedir. Nitrik oksit sinyal yolağı ve prostanoidler gibi endotele bağımlı faktörlerin yanı sıra AMPK sinyal yolağı da pravastatinin vasküler düz kas gevşetici etkisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V ve K_{2p} gibi potasyum kanallarının bazı alt tiplerinin aktivasyonu pravastatinin damar gevşetici etkisine katkıda bulunmaktadır. Sunulan çalışmanın bulguları, pravastatinin kolesterol düşürücü etkisinin yanı sıra

vazorelaksasyona neden olarak hiperlipidemiye eşlik edebilen hipertansiyon, ateroskleroz ve kalp yetmezliği gibi hastalıklarda yararlı etkiler sağlayabileceğini düşündürmektedir. Daha ileri düzeyde klinik çalışmalarla elde edilen veriler desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Mendis S, Graham I, Narula J. Addressing the global burden of cardiovascular diseases; need for scalable and sustainable frameworks. *Glob Heart*. 2022;17(1):48.
2. Abdul-Rahman T, Bukhari SMA, Herrera EC, et al. Lipid lowering therapy: an era beyond statins. *Curr Probl Cardiol*. 2022;47(12):101342.
3. Vagelos PR. Are prescription drug prices high? *Science*. 1991;252(5009):1080-4.
4. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292(5519):1160-4.
5. Okyay K. Pleiotropic effects of statins: new evidences. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*. 2021;49(7):533-5.
6. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circ Res*. 2017;120(1):229-43. Erratum in: *Circ Res*. 2018;123(8):e20.
7. Razavi AC, Mehta A, Sperling LS. Statin therapy for the primary prevention of cardiovascular disease: pros. *Atherosclerosis*. 2022;356:41-5.
8. Wasim R, Ansari TM, Ahsan F, et al. Pleiotropic benefits of statins in cardiovascular diseases. *Drug Res (Stuttg)*. 2022;72(9):477-86.
9. López-Canales JS, Lozano-Cuenca J, López-Canales OA, et al. Pharmacological characterization of mechanisms involved in the vasorelaxation produced by rosuvastatin in aortic rings from rats with a cafeteria-style diet. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(6):653-61.
10. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, et al. Acute vasodilator effects of HMG-CoA reductase inhibitors: involvement of PI3-kinase/Akt pathway and Kv channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;42(1):118-24.
11. Alvarez De Sotomayor M, Herrera MD, Marhuenda E, Andriantsitohaina R. Characterization of endothelial factors involved in the vasodilatory effect of simvastatin in aorta and small mesenteric artery of the rat. *Br J Pharmacol*. 2000;131(6):1179-87.
12. Bravo L, Herrera MD, Marhuenda E, Perez-Guerrero C. Cardiovascular effects of lovastatin in normotensive and

- spontaneously hypertensive rats. *Gen Pharmacol.* 1998;30(3):331-6.
13. Sonmez Uydes-Dogan B, Topal G, et al. Relaxant effects of pravastatin, atorvastatin and cerivastatin on isolated rat aortic rings. *Life Sci.* 2005;76(15):1771-86.
 14. Verma K, Shukla R, Dwivedi J, Paliwal S, Sharma S. New insights on mode of action of vasorelaxant activity of simvastatin. *Inflammopharmacology.* 2023;31(3):1279-1288.
 15. Pérez-Guerrero C, Alvarez de Sotomayor M, Herrera MD, Marhuenda E. Endothelium modulates contractile response to simvastatin in rat aorta. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2000;55(1-2):121-4.
 16. Sahinturk S. Metformin relaxes rat thoracic aorta via nitric oxide, AMPK, potassium channels, and PKC. *Iran J Basic Med Sci.* 2023;26(9):1030-40.
 17. Şahintürk S. Kv7.1-7.5 Kanallarının Sıçan Torasik Aortundaki Apela Kaynaklı Vasorelaksasyondaki Rolü. *Osmangazi Tıp Dergisi.* 2023;45(5):639-50.
 18. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.* 2008;93(1):141-7.
 19. Jackson WF. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. *Adv Pharmacol.* 2017;78:89-144.
 20. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol.* 2017;7(2):485-581.
 21. Tan CS, Loh YC, Tew WY, Yam MF. Vasorelaxant effect of 3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) and its underlying mechanism. *Inflammopharmacology.* 2020;28(4):869-75.
 22. Ulusoy KG, Dogan MF, Cam SA, Arslan SO, Yildiz O. Propofol relaxes isolated rat aorta through BKCa activation. *Ann Vasc Surg.* 2019;60:397-406.
 23. Shirwany NA, Zou MH. AMPK in cardiovascular health and disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(9):1075-84.
 24. Bae JH, Kim JW, Kweon GR, et al. Corpus cavernosal smooth muscle relaxation effect of a novel AMPK activator, beta-lapachone. *J Sex Med.* 2011;8(8):2205-14.
 25. Sung JY, Choi HC. Metformin-induced AMP-activated protein kinase activation regulates phenylephrine-mediated contraction of rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;421(3):599-604.
 26. Dehnavi S, Kiani A, Sadeghi M, et al. Targeting AMPK by statins: a potential therapeutic approach. *Drugs.* 2021;81(8):923-33.
 27. Sun W, Lee TS, Zhu M, et al. Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Circulation.* 2006;114(24):2655-62

Etik Bilgiler

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Tarih: 07.06.2022, Sayı: 2022-08/07)

Onam: Bu çalışma hayvan deneyi çalışmasıdır.

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

Hakem Değerlendirmesi: Hakem değerlendirmesinden geçmiştir.

Yazar Katkı Oranları: Cerrahi işlemler ve ilaç uygulamaları: SŞ. Konsept: SŞ. Dizayn: SŞ. Veri toplama ve işleme: SŞ. Analiz: SŞ. Literatür taraması: SŞ. Yazım: SŞ.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Destek ve Teşekkür Beyanı: Bu çalışma için finansal destek alınmamıştır. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.