

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze,
Katedra Fyziologie živočichů

bakalárska práca

**Úloha draslíkových kanálov v regulácii
tonusu hladkého svalstva ciev**

Michal Bencze

2009

Vedúci bakalárskej práce:

MUDr. Josef Zicha, DrSc. (odd. Experimentální hypertenze, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha, Česká republika)

Konzultant:

Mgr. Mária Pintérová (odd. Experimentální hypertenze, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha, Česká republika)

Pod'akovanie

Ďakujem svojmu školiteľovi *MUDr. Josefovi Zichovi, DrSc.* za cenné rady ohľadne obsahu a formy mojej bakalárskej práce. Ďalej ďakujem svojej konzultantke *Mgr. Márii Pintérovej* za pomoc pri konečnej úprave práce a jazykovú korekciu.

Abstrakt

Draslíkové kanály majú poprednú úlohu v regulácii membránového potenciálu buniek hladkého svalu ciev. Membránový potenciál má priamy vplyv na cievny tonus. V hladkom svali ciev poznáme štyri druhy draslíkových kanálov. Napäťovo-ovládané K^+ kanály (K_V) sú schopné reagovať na depolarizáciu svojím otvorením. Vápnikom-aktivované K^+ kanály (K_{Ca}) z rovnakej génovej rodiny sú aktivovateľné nie len napätím, ale aj zvýšenou koncentráciou intracelulárneho Ca^{2+} . Dohnútra-usmerňujúce K^+ kanály (K_{IR}) svojou zvyšujúcou sa von smerujúcou vodivosťou v negatívnych hodnotách amplifikujú draslíkový prúd a pôsobia ako senzor zvýšenej K^+ koncentrácie v extracelulárnom priestore. Prepojenie medzi metabolizmom a membránovým potenciálom vytvárajú ATP-senzitívne K^+ kanály (K_{ATP}). Funkcia K^+ kanálov je dôležitá aj v endoteli, ktorý uvoľňuje množstvo vazodilatačných a vazokonstriktorových látok. Abnormálna expresia K^+ kanálov sa vo veľkej miere podieľa na remodelácii ciev počas hypertenzie.

In smooth muscle cells, potassium channels play an important role in the regulation of the membrane potential of smooth muscle cells, which is closely related to vascular tone. Four different types of K^+ channels have been described in vascular smooth muscle cells. Voltage-gated K^+ channels (K_V), which can be open by depolarization. Calcium-activated potassium channels (K_{Ca}), from the same gene family, are voltage dependent, and can be activated also by elevated concentration of intracellular Ca^{2+} . Inward rectifying channels (K_{IR}) display negative slope conductance. These channels amplify potassium flow and function as an extracellular K^+ sensor. ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) channels provide a link between cell metabolism and membrane potential. Function of K^+ channels is also important in endothelium, which produces many vasodilators and vasoconstrictors. Abnormal expression profile of K^+ channels is part of vascular cell membrane remodeling.

Kľúčové slová

napäťovo-ovládané K^+ kanály (K_V), vápnikom-aktivované K^+ kanály (K_{Ca}), dovnútra-usmerňujúce K^+ kanály (K_{IR}), ATP-senzitívne K^+ kanály (K_{ATP}), endotelium, bunky hladkého svalu ciev, remodelácia K^+ kanálov, hypertenzia

Obsah

1. Úvod	6
2. Bunkové mechanizmy regulácie cievneho tonusu	7
2.1 Mechanizmus kontrakcie bunky hladkého svalu	7
2.2 Typy vápnikovej signalizácie	8
2.3 Funkcia endotelu	10
3. K⁺ kanály v hladkom svale ciev.....	11
3.1 Vysoko vodivostné vápnikom-aktivované K ⁺ kanály	13
3.2 Napät'ovo-ovládané K ⁺ kanály	14
3.3 Dovnútra-usmerňujúce K ⁺ kanály	15
3.4 ATP-senzitívne K ⁺ kanály	16
3.5 K ₂ P K ⁺ kanály	17
4. K⁺ kanály v endoteli ciev	18
5. Remodelácia K⁺ kanálov pri hypertenzii	19
6. Záver	21
Zoznam skratiek	22
Zoznam použitej literatúry	23

1. Úvod

Fyziologická funkcia draslíkových kanálov v hladkom svali ciev má zásadný význam pre reguláciu cievneho tonusu. Tieto kanály sa uplatňujú aj pri proliferácii a apoptóze. Významné sú tiež zmeny ich vlastností počas starnutia organizmu. Mojm cieľom je na nasledujúcich stranách zhrnúť dostupné informácie o jednotlivých kanáloch v hladkom svali a endoteli ciev. V hlavnej časti práce sa budem venovať ich funkcii a základným vlastnostiam pri regulácii cievneho tonusu. Táto práca by mala ďalej slúžiť ako odrazový mostík pre výskum EDHF (Endothelium-Derived Hypertension Factor), ktorému by som sa chcel venovať v diplomovej práci. Jeho pôsobenie sa pokúsim načrtnúť v 2. kapitole, v časti venovanej endotelu.

Pri výskume kanálov sa využívajú rôzne inhibítory. Množstvo z nich nemá terapeutický potenciál, ale sú užitočným nástrojom pre štúdium funkcie kanálov. Preto sa im snažím v jednotlivých kapitolách venovať zvýšenú pozornosť. Môže ísť o prírodné toxíny alebo umelo pripravené látky. Využiť sa dajú na stanovenie prítomnosti jednotlivých kanálových rodín v tkanivách, alebo môžu byť využité na vytvorenie predstavy o štruktúre daných kanálov.

Pri patologických situáciách, ako je hypertenzia, arteroskleróza, diabetes a chronická pľúcna hypoxia dochádza k zmene molekulárnej štruktúry a teda aj k zmene vlastností jednotlivých kanálov. Keďže túto prácu píšem na Oddelení experimentálnej hypertenzie a komplikácie spojené s hypertenziou sú hlavná príčina úmrtí súvisiacimi so srdcovo-cievnyimi ochoreniami, záverom by som rád zhrnul akým spôsobom sa vlastnosti draslíkových kanálov môžu meniť pri remodelácii membrány hladkého svalu počas hypertenzie.

2. Bunkové mechanizmy regulácie cievneho tonusu

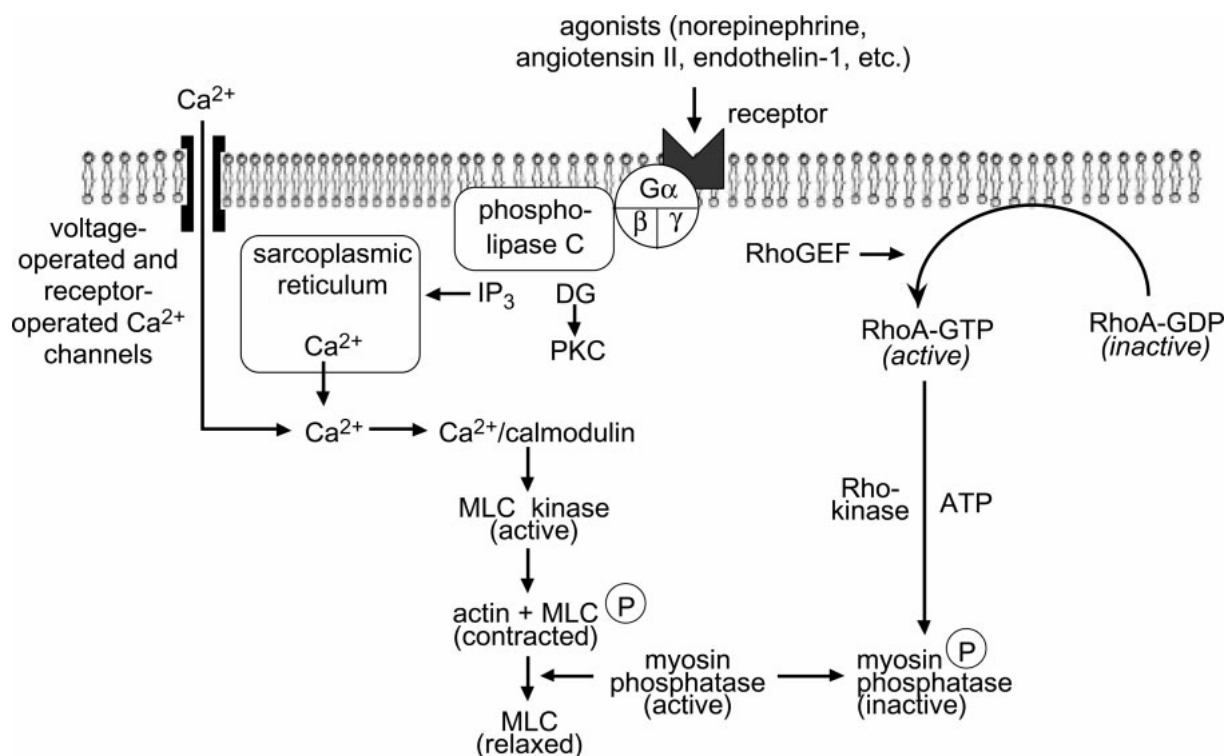
Steny väčších ciev sa skladajú z troch vrstiev. Prvá je tunica adventitia - vláknitý vonkajší obal. Druhá sa volá tunica media - prostredná vrstva, skladajúca sa z cirkulárnych a pozdĺžnych buniek hladkého svalstva. Bunky hladkého svalstva v tejto vrstve obklopujú, alebo sú vmiešané medzi elastínové a kolagénne vlákna. Posledná, vnútroná vrstva najbližšie k lumen je tunica intima. Skladá sa z elastínových vlákien a endotelových buniek (Eckert et al., 2001). Endotel vystiela lumen všetkých ciev. Kapiláry tvorí iba jediná vrstva týchto buniek, obklopená vrstvou elastínových a kolagénnych vlákien.

2.1 Mechanizmus kontrakcie bunky hladkého svala

Cievna kontrakcia prebieha tak, že vazokonstrikčný stimulus spôsobí nárast intracelulárnej koncentrácie vápnika ($[Ca^{2+}]_i$). Ca^{2+} sa kombinuje s kyslým proteínom kalmodulínom (CaM), ktorý sa tým konformačne mení. Tento komplex – $4Ca^{2+}$ -CaM sa viaže na kinázu ľahkého reťazca myozínu (MLCK), čím ju aktivuje. MLCK katalyzuje transfér fosfátovej skupiny z adenosín trifosfátu na regulačný 20-kD ľahký reťazec myozínu (MLC). Táto fosforylácia umožňuje aktiváciu myozín adenosín trifosfatázy (ATPáza) aktínom (obrázok 1.) (Akata 2007). To vedie k zvýšenej hydrolyze ATP a energia uvoľnená z tejto reakcie umožňuje molekulárnu interakciu myozínu s aktínom (Webb 2003). Je to základný proces pre tvorbu kontrakcie bunky hladkého svala (Arner et al., 1999).

Zmena sily kontrakcie počas konštantnej hladiny $[Ca^{2+}]_i$ môže byť spôsobená stimuláciou receptorov v plazmatickej membráne. Túto zmenu spôsobuje rozdielna fosforylácia MLC prostredníctvom myozín fosfatázy (Akata 2007). Receptorom aktivované G proteíny pôsobia na myozín fosfatázu priamo aktivovaním enzýmovej kaskády alebo cez druhých poslov. Regulačne na ňu pôsobí napríklad Rho/Rho kináza alebo proteínkináza C (PKC) a (Somlyo et al., 2000). Rho/Rho kináza priamo fosforyluje myozín fosfatázu a tým inhibuje jej katalitickú aktivitu. Fosforylácia MLC narastá a zvyšuje sa teda kontrakcia. Rho/Rho kinázu môže aktivovať kyselina arachidónová (Akata 2007). PKC zvyšuje myofilamentárnu citlivosť k Ca^{2+} , čo má opäť za následok zvýšenie sily kontrakcie (Horowitz et al., 1996).

Relaxácia bunky hladkého svala vyžaduje zníženú $[Ca^{2+}]_i$ a zvýšenú aktivitu myozín fosfatázy (Webb 2003).



Obr. 1. Regulácia kontrakcie hladkého svalu. MLC, ľahký reťazec myozínu; IP₃, inozitol trifosfát; DG, diacylglycerol; PKC, proteínkináza C; ATP, adenozíntrifosfát (upravené podľa Webb 2003).

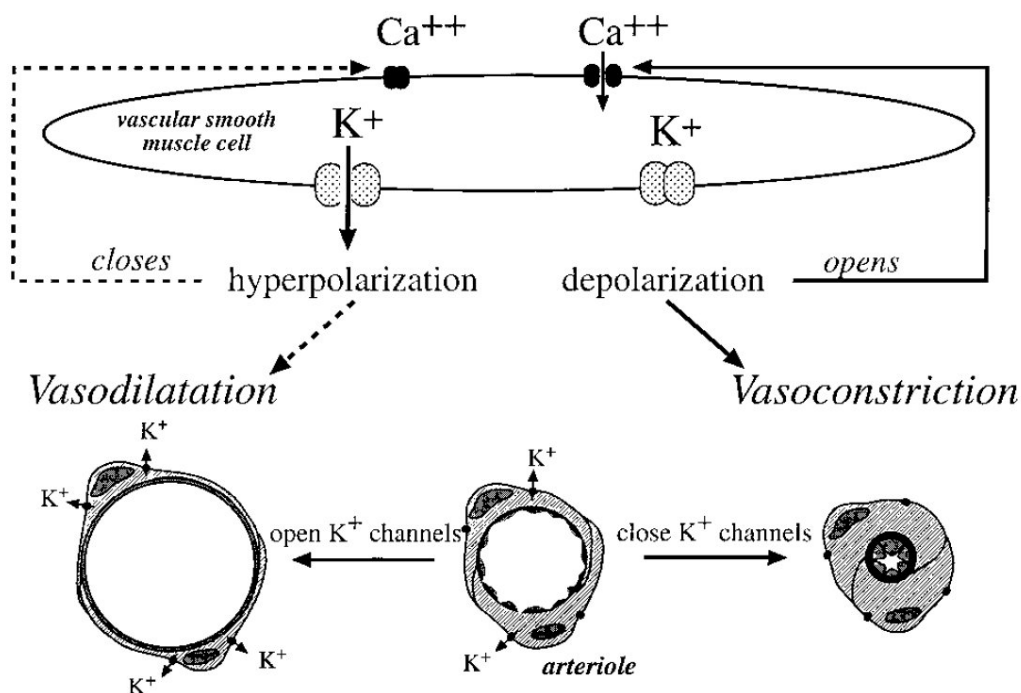
2.2 Regulácia vápnikovej signalizácie

Cievny tonus a teda aj krvný tlak je určený stavom kontraktilných buniek hladkého svalu v stene ciev odporového riečišťa, ktorý je regulovaný $[Ca^{2+}]_i$. Vazokonstriktory $[Ca^{2+}]_i$ zvyšujú a relaxačné faktory ju znižujú. Opačný efekt má koncentrácia Ca^{2+} v endotelových bunkách, pretože tie pri zvýšenej $[Ca^{2+}]_i$ indukujú relaxáciu príľahlých buniek hladkého svalstva (napr. uvoľnením NO) (Ledoux et al., 2006). Pre jemnú reguláciu prietoku krvi tkanivami a orgánmi je preto citlivá regulácia $[Ca^{2+}]_i$ nesmierne dôležitá.

Pri kľudových podmienkach bazálne otváranie K^+ kanálov sprostredkuje výlev iónov cez plazmatickú membránu. To vedie ku kľudovému membránovému potenciálu (E_m) buniek hladkého svalu ciev v rozmedzí hodnôt -55 mV až -40 mV (Cox et al., 2002). V týchto hodnotách E_m sú napät'ovo ovládané Ca^{2+} kanály v nízkom pravdepodobnostnom stave otvorenia a umožňujú tak iba bazálny vtok Ca^{2+} do bunky, udržiavajúci kľudové arteriálne napätie. Pri otvorení draslíkových kanálov dochádza k výlevu K^+ iónov a k hyperpolarizácii. Tá zatvára napät'ovo ovládané Ca^{2+} kanály, znižuje $[Ca^{2+}]_i$ a vedie k vazodilatácii. Naopak

zatváranie K^+ kanálov spôsobuje membránovú depolarizáciu a následné otvorenie Ca^{2+} kanálov. To spôsobuje Ca^{2+} závislú vazokonstrikciu (obrázok 2.) (Jackson 2005).

Podobná úloha ako K^+ kanálom sa pripisuje aj Cl^- kanálom. Otváranie Cl^- kanálov vedie taktiež k výlevu Cl^- z bunky, no pretože sú negatívne nabité vedú k následnej depolarizácii a vazokonstrikcii (Jackson 2000).



Obr. 2. Vzťah K^+ kanálov, Ca^{2+} kanálov a cievného priemeru (upravené podľa Jackson 2000).

Popri hlavnej regulačnej úlohe $[Ca^{2+}]_i$ sa v bunke vyskytuje aj ďalšia forma vápnikovej signalizácie - „vápnikové vlny“. Predpokladá sa, že tieto vlny sú zodpovedné za svalovú kontrakciu. Môžu byť indukované extracelulárnou alkalizáciou alebo kofeínom (Heppner et al., 2002), ako aj endogénnymi vazokonstriktormi ako uridín 5'-trifosfát (UTP) alebo noradrenalín (Jaggar et al., 2000). Paradoxne však aktivujú aj BK_{Ca} kanály a spúšťajú tak hyperpolarizáciu. Ich fyziologická funkcia preto zostáva nejasná (Ledoux et al., 2006).

Posledným typom modifikácie Ca^{2+} signálu sú „vápnikové iskry“. Vytvára ich ryanodínový receptor (RyR) v sarkoplazmatickom retikule. V podstate je to masívna lokálna elevácia, ktorá majú potenciál modulovať Ca^{2+} závislé procesy, bez ohľadu na globálnu $[Ca^{2+}]_i$. Takto ovplyvnené môžu byť napríklad BK_{Ca} kanály (Ledoux et al., 2006).

2.3 Funkcia endotelu

Endotelové bunky sú vzájomne prepojené pevnými spojmi (Nilius et al., 1997). Vďaka tomu, majú možnosť prenášať zmeny v membránových potenciáloch na veľkú vzdialenosť. Umožňuje to aj sumácie jednotlivých podnetov a synchronné reakcie endotelu. Elektricky môžu byť endotelové bunky spojené aj s bunkami hladkého svalu myoendoteliálnymi pevnými spojmi. Zmeny v endotelových bunkách tak môžu byť prenesené aj do buniek hladkého svalu a upraviť cievny tonus (Jackson 2005).

Vazodilatátory ako napríklad acetylcholín zvyšujú $[Ca^{2+}]_i$ v bunkách endotelu. To generuje množstvo vazoaktívnych molekúl relaxujúcich cievy (Ledoux et al., 2006). Priekopnícke práce Furchgotta a Zawadzkeho (1980) prvý krát ukázali, že existuje niečo ako endotelový relaxujúci faktor (EDRF). Neskôr sa tiež dokázalo, že ide o oxid dusnatý (NO). NO je generovaný z L-arginínu pomocou endoteliálnej NO syntázy (eNOS) za prítomnosti kofaktorov ako je tetrahydrobiopterín. NO difunduje do buniek hladkého svalu a aktivuje guanylátcyklázu, čo vedie k cyklickým GMP sprostredkovanej vazodilácii ciev (Förstermann et al., 2006).

Endotel ďalej sprostredkuje hyperpolarizáciu buniek hladkého svalstva dráhou nezávislou na NO. Táto dráha rovnako zvyšuje vtok draslíka do buniek hladkého svalstva a udržiava tak vazodiláciu. Endotelové hyperpolarizačné faktory sú iba čiastočne pochopené, ich molekulárna podstata zostáva nejasná. Je však známe, že endotelový hyperpolarizačný faktor (EDHF) dokáže kompenzovať úplnú stratu NO-sprostredkovanej vazodilácie (Parkington et al., 2004). Pretože účinnosť EDHF sa zvyšuje s klesajúcim polomerom ciev (Shimokawa et al., 1996), táto vlastnosť je obzvlášť dôležitá v mikrocirkulácii, kde môže dôjsť k zníženej dostupnosti NO. EDHF spôsobuje otváranie draslíkových kanálov hladkého svalstva ciev a to vedie k hyperpolarizácii týchto buniek (Furchgott et al., 1989).

Prostacyklín, tvorený cyklooxygenázovým systémom, je ďalší endotelový dilatátor, ktorý pracuje nezávisle na NO. Jeho vazodilatačná úloha sa však zdá byť obmedzená (Deanfield et al., 2007). Prostacyklín zvyšuje v bunkách hladkého svalstva koncentráciu cyklického AMP, ktorý rovnako ako cGMP navodzuje relaxáciu.

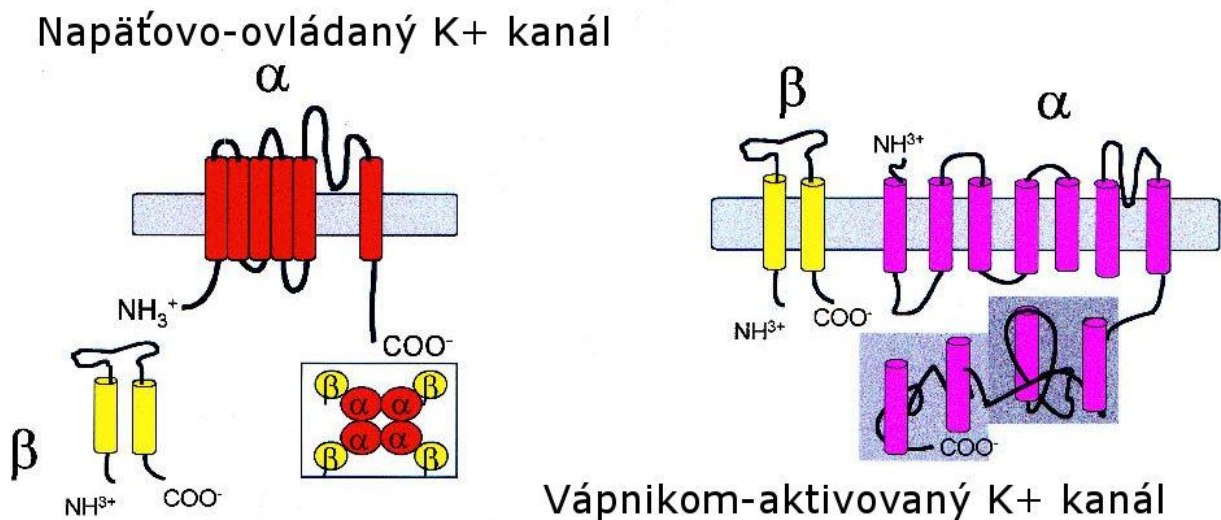
Endotel moduluje tonus ciev nie len uvoľňovaním vazodilatačných látok. Spôsobuje aj vazokonstrikciu a to tvorbou endotelínu a prostanoidov, ako aj konverziou angiotenzínu I na angiotenzín II na povrchu endotelových buniek (Saye et al., 1984).

3. K⁺ kanály v hladkom svale

Draslíkové kanály majú poprednú úlohu v regulácii membránového potenciálu buniek hladkého svalu ciev. Membránový potenciál má priamy vplyv na cievny tonus (Akata 2007).

Na vytvorenie funkčného draslíkového kanálu s jedným priepustným pórom sú potrebné štyri α podjednotky. Tie tvoria cestu pre prechod iónov. Druhým typom podjednotiek sú beta podjednotky, ktoré sa integrujú s alfa podjednotkami. Modulujú ich vlastnosti a zvyšujú tak diverzitu K⁺ kanálov (Cox 2005).

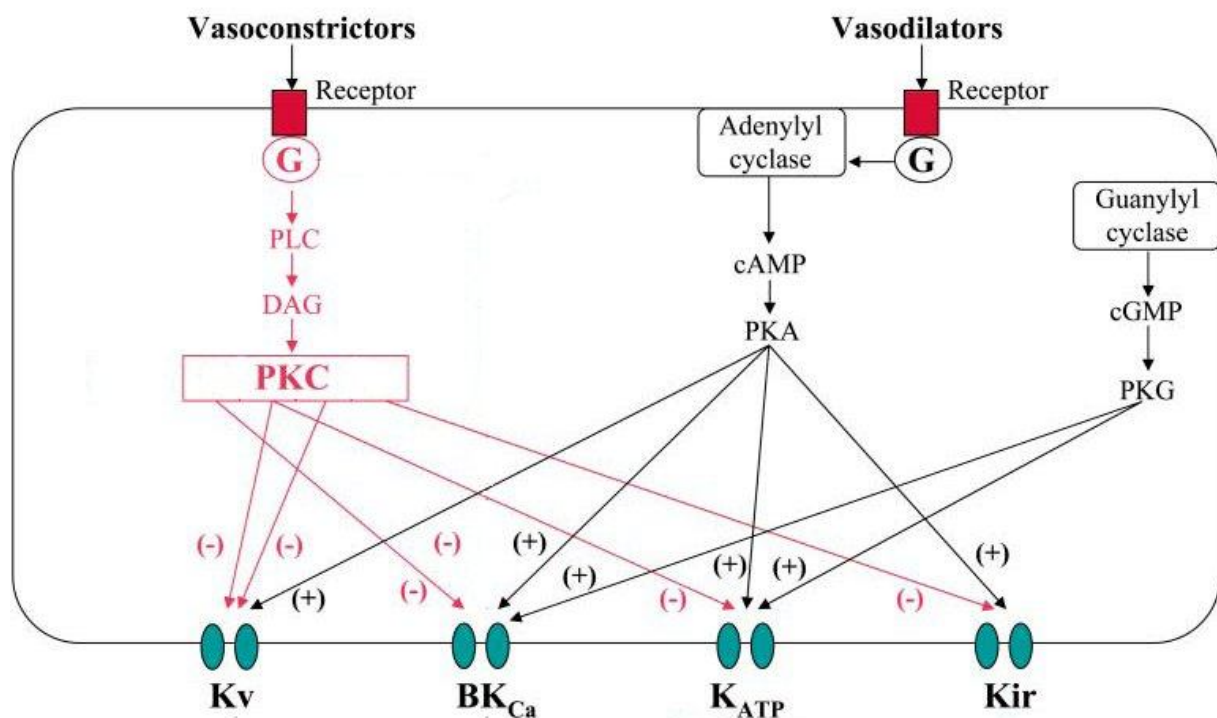
K⁺ kanály cicavcov rozdeľujeme do štrukturálnych rodín podľa toho, koľko transmembránových (TM) a pór formujúcich (P) úsekov má ich α podjednotka. Prvá rodina je charakterizovaná dvomi TM a jednou P doménou. Táto rodina zahŕňa dovnútra usmerňujúce draslíkové K⁺ kanály (K_{IR}) a ATP-senzitívne K⁺ kanály (K_{ATP}). Druhá rodina reprezentuje K⁺ kanály charakterizované šiestimi alebo siedmimi TM doménami a jednou P doménou. Zahŕňa Ca²⁺-aktivované K⁺ kanály (K_{Ca}) a napäťovo-ovládané K⁺ kanály (K_V) (Bryan et al., 2007).



Obr. 3. Zobrazenie štruktúry K⁺ kanálu, príklad rozdielnosti alfa a beta podjednotiek (upravené podľa Cox 2002).

V poslednej dobe bol v bunkách hladkého svalu ciev objavený ďalší typ K⁺ kanálov, tzv. K2P (KCNK) kanály. Obsahujú štyri TM domény a dve P domény. Na vytvorenie funkčného kanálu sú tak potrebné iba dve α podjednotky (Kenton et al., 2006).

Aktivitu a vlastnosti K^+ kanálov významne ovplyvňuje fosforylácia (obrázok 4.). Množstvo vazokonstriktorov sa viaže na G proteíny. G_q proteíny aktivujú špecifické fosfolipázy, ktoré tvoria druhých poslov - diacylglycerol a inozitol 1,4,5-trifosfát. Diacylglycerol spolu s Ca^{2+} ďalej aktivujú proteínkinázu C (PKC) (Standen et al., 1998). PKC fosforyláciou kanál inhibuje. Vasodilatátory cez svoje príslušné receptory aktivujú adenylátcyclázu, prípadne guanyátcyclázu. Tieto enzýmy zvyšujú intracelulárnu koncentráciu cAMP a cGMP. Tými je následne aktivovaná proteínkináza A (PKA) a proteínkináza G (PKG) (Standen et al., 1998). Tie fosforylujú jednotlivé draslíkové kanály a tým ich otvárajú.



Obr. 4. Schéma regulácie K^+ kanálov. PLC, fosfolipáza C; DAG, diacylglycerol; PKC, proteín kináza C; PKA, proteín kináza A; PKG, proteín kináza G; cAMP, cyklický adenosín monofosfát, cGMP, cyklický guanozín monofosfát (upravené podľa Ko et al.; 2008).

3.1 Vysoko vodivostné vápnikom-aktivované K^+ kanály

Vápnikom-aktivované K^+ kanály (K_{Ca}) hladkého svalstva sú exprimované hlavne ako vysoko vodivostné (BK_{Ca}) kanály. Tieto kanály majú vysokú vodivosť (240 pS) (Jackson 2000). Keďže patria do rodiny napäťovo-ovládaných kanálov, aktivované sú membránovou depolarizáciou ako aj nárastom $[Ca^{2+}]_i$. Táto vlastnosť ich robí obzvlášť študovanými, pretože

spájajú vápnikové a napät'ové signály (Brenner et al., 2000). Pri nízkych koncentráciách vápnika sa správajú ako čisto napät'ovo-ovládané kanály (Horrigan et al., 1999), ich napät'ový senzor je nezávislý na prítomnosti Ca^{2+} . Ale naviazanie Ca^{2+} umožňuje BK_{Ca} kanálom pracovať pri fyziologických hodnotách membránového potenciálu. Vzhľadom na malú vzdialenosť od sarkoplazmatického retikula, BK_{Ca} kanál môže byť vystavený vysokým hodnotám Ca^{2+} ($>10 \mu\text{M Ca}^{2+}$) (Perez et al., 1999). BK_{Ca} kanály existujú v signálnych komplexoch s napät'ovo ovládanými Ca^{2+} kanálmi, proteín kinázami, fosfatázami a ďalšími signálnymi molekulami (Keef et al., 2001).

Pór formujúce alfa podjednotky BK_{Ca} kanálov, ktoré formujú pór, sú kódované *Slo* génom. Pozostávajú z 11 hydrofóbnych domén (S0-S10). Najnovšia predstava je taká, že transmembránové podjednotky (S1-S6) tvoria jadro kanálu s extracelulárnym NH_2 koncom. Zostávajúce štyri podjednotky (S7-S10) sa nachádzajú v cytoplazme a formujú COOH koncovú časť proteínu (obrázok 3.). Podobne ako u ďalších napätím ovládaných kanálov (napríklad K_V kanály popisované nižšie), S4 doména obsahuje kladne nabitú aminokyselinu a veľmi pravdepodobne slúži ako napät'ový senzor. Alfa podjednotky môžu byť rôzne upravené alternatívnym zostrihom a posttranslačnou modifikáciou *Slo* génu. Tieto úpravy môžu vysvetliť variabilné vlastnosti BK_{Ca} v rôznych tkanivách. Mení sa hlavne napät'ová citlivosť a možnosť fosforylácie kinázami ako sú PKA alebo PKG (Tian et al., 2001, Chen et al., 2005). Táto variabilita je rozšírená asociáciou kanálov s beta podjednotkami, ktoré modulujú ich vlastnosti. Beta podjednotky menia hlavne citlivosť voči koncentrácii Ca^{2+} a veľkosti membránového potenciálu (Brenner et al., 2000).

BK_{Ca} sú blokované milimolárnymi koncentraciami tetraetylamóniových iónov (TEA, univerzálny blokátor K^+ kanálov), ako aj škorpióními toxínmi charybdotoxínom a iberiotoxínom. (Gribkoff et al., 1997). Medzi ďalšie substancie inhibujúce BK_{Ca} patrí estrogén v mikromolárných koncentraciách (Valverde et al., 1999) a etanol (Dopico et al., 2003). Látkami aktivujúcimi BK_{Ca} sa ukázali malé molekuly ako benzimidazolón NS 1619 (Holland et al., 1996).

Fosforylácia BK_{Ca} kanálu mení vápnikovú a napät'ovú citlivosť. Vo väčšine prípadov, PKA a PKG aktivuje BK_{Ca} zvýšením pravdepodobnosti jeho otvorenia a posunutím napät'ovej aktivácie k viac negatívnym membránovým potenciálom. To sa deje bez ovplyvnenia jedno-kanálovej vodivosti alebo napät'ovej citlivosti (Alioua et al., 1995, Perez et al., 1994). Hoci fosforylácia K^+ kanálov pomocou PKC kanál inaktivuje (Schubert et al., 1999), v niektorých prípadoch je jej úloha zatiaľ nejasná (Talukder et al., 2000).

3.2 Napät'ovo-ovládané K⁺ kanály

Dôkazy o tom, že K_V kanály prispievajú k regulácii funkcie hladkého svalu ciev pochádzajú z mnohých experimentov pracujúcich s celými organizmami či jednotlivými bunkami (Cox et al., 2006). Tieto kanály sú aktivované membránovou depolarizáciou a negatívne regulujú membránový potenciál spolu s BK_{Ca} kanálmi (Jackson 2005). Ich aktivita prispieva k udržaniu kľudového membránového potenciálu (Cheong et al., 2001, Yuan et al., 1998). Toto tvrdenie podporuje fakt, že kľudový membránový potenciál buniek hladkého svalu je blízko aktivačného prahu pre prúdy v K_V kanáloch (Nelson et al., 1995).

Alfa podjednotky K_V kanálov majú šesť transmembránových úsekov (S1-S6) a jednu P doménu, ktorá tvorí kanálový pór spolu s S5 a S6 doménou (obrázok 3.). Štyri rodiny funkčných alfa podjednotiek (KV1-KV4) sú exprimované v hladkom svalstve ciev. N- a C-konce podjednotiek sa nachádzajú v cytoplazme. Úsek S4 tvorí napät'ový senzor. Kanály sa skladajú z minimálne 4 identických (homotetramérnych) alebo blízko príbuzných (heterotetramérnych) podjednotiek (Cox et al., 2006). Heterotetramérne zloženie kanálu a rôzne kombinácie beta podjednotiek tvoria veľkú diverzitu týchto kanálov (Xu et al., 1998). Preto identifikácia molekulárneho zloženia a presné určenie vlastností týchto kanálov sú veľmi náročné.

Dva širokospektrálne blokátory K⁺ kanálov, 4-aminopyridín (4-AP) a tetraethylamonium (TEA) inhibujú množstvo K_V kanálov. Medzi jednotlivými rodinami K_V podjednotiek sa účinky týchto blokátorov výrazne líšia. Tieto rozdiely môžu byť užitočné pri identifikácii príslušnosti k týmto rodinám. Ich špecifická účinnosť je však limitovaná. Preto je potrebné hľadať nové, selektívnejšie blokátory. Príkladom je hanatoxín, ktorý špecificky inhibuje K_V2 rodinu, heteropodatoxín pre K_V4 rodinu. Margatoxín a agitoxín selektívne inhibujú K_V1.3, maurotoxín a Pi4 blokujú K_V1.2. Pretože malé peptidové inhibítory majú obmedzený terapeutický potenciál, hľadajú sa malé nepeptidické molekuly. Jednou z nich je correlide, ktorý blokuje K_V1 rodinu. Bol izolovaný z koreňa stromu z Kostariky. Podobné snahy viedli k identifikácii novej triedy blokátorov K_V kanálov – analógov cyklohexylu (Schmalhofer et al., 2002).

K_V kanály vo vaskulárnych myocytoch sú inhibované nárastom intracelulárneho Ca²⁺. Ca²⁺ pôsobí na K_V buď priamo, alebo cez úzko spojeného posla (Gelband et al., 1995). Tento proces hrá v hladkom svale dôležitú úlohu pri aktivácii svalu vazokonstriktormi. Látky ako sú noradrenalín a serotonín depolarizujú membránový potenciál a aktivujú vtok Ca²⁺ do bunky

cez napäťovo ovládané Ca^{2+} kanály (Mulvany et al., 1982). Inhibičný efekt Ca^{2+} na K_V vysvetľuje mechanizmus ich pôsobenia. Zvýšená koncentrácia Ca^{2+} vedie k vazokonstrikcii a následnej inhibícii K_V kanálov. Táto inhibícia sa zastaví až v momente, kedy sa aktivujú BK_{Ca} kanály a vykompenzujú pokles prúdu spôsobený blokáciou K_V (Cox et al., 2006). Ca^{2+} aktivuje aj PKC, ktorá fosforyluje miesta na ich alfa podjednotke a rovnako inaktivuje K_V . Je to ďalší dôležitý mechanizmus umožňujúci pretrvávajúci vtok Ca^{2+} počas aktivácie agonistom.

Aktiváciu K_V kanálov spôsobuje PKA a podobnú funkciu má aj PKG. Medzi ďalšie kinázy ovplyvňujúce K_V patria Rho kináza, Ca/kalmodulín dependentná kináza II a kaseín kináza. Aktivita mnohých K_V je regulovaná látkami schopnými modifikovať redox stav aminokyselín tvoriacich kanály. Tieto faktory umožňujú kanálom reagovať na hypoxiu (Tang et al., 2004).

3.3 Dovnútra-usmerňujúce K^+ kanály

Dovnútra usmerňujúce K^+ kanály hladkého svalstva majú svoj názov odvodený z faktu, že pri membránových potenciáloch negatívnych k draslíkovému rovnovážnemu potenciálu (ten je negatívnejší než E_m) vedú K^+ do bunky. Pri viac pozitívnych potenciáloch, obmedzujú uvoľňovanie K^+ z bunky (Jackson 2005). Napriek silnému usmerňovaniu dovnútra podľa Smitha et al. (2008) ich základnou vlastnosťou je malá, von smerujúca vodivosť, zvyšujúca sa v negatívnych hodnotách. Podľa neho je táto biofyzikálna vlastnosť základná pretože, umožňuje týmto kanálom amplifikáciu draslíkovej vodivosti v hladkom svale artérií. Nameraný prúd smerujúci von má veľkosť picoampérov (Xu et al., 1999). Napriek tomu, že ich vodivosť je tak malá, v tonuse ciev môžu tieto kanály spôsobiť enormné zmeny, pretože hladké svalstvo artérií má veľmi vysoký vstupný odpor (Quayle et al., 1996). K_{IR} ovplyvňujú kľudový potenciál hlavne v malých artériách. Pri fyziologických podmienkach udržiavajú bunky hladkého svalstva relatívne hyperpolarizované, čo má za následok ich väčší priemer než v prípade keby boli tieto kanály zavreté (Park et al., 2008). Ďalšou možnou funkciou týchto kanálov je, že tvoria metabolický senzor pre zvýšenú koncentráciu draslíka v extracelulárnom prostredí. V tomto prípade by mohli byť zodpovedné za vazodilatáciu a zvýšenie krvného prietoku počas neuronálnej aktivity CNS alebo počas cvičenia (Haddy et al., 2005).

K_{IR} kanály sa skladajú z tetramérov podjednotiek, z ktorých každá má 2 transmembránové úseky. V hladkom svale ciev sa nachádza K_{IR} 2.1 izoforma (Jackson 2005). To, že von smerujúci prúd má veľkosť picoampérov, je pravdepodobne dôsledok internej blokády kanálu iónmi Mg^{2+} alebo polyamínom (Xu et al., 1999).

Špecifickým blokátorom týchto kanálov je Ba^{2+} . Polovičná hodnota pre inhibíciu (K_d) je K_{IR} 2,2 μM pri -60 mV a vzrastá so zvyšujúcou sa hyperpolarizáciou. Ba^{2+} je oveľa menej efektívne pre ostatné typy kanálov. Pre K_{ATP} je K_d 200 μM pri -60 mV, pre BK_{Ca} $K_d > 10 \mu M$ a pre K_V je $K_d > 1 mM$ (Robertson et al., 1996). Medzi ďalšie blokátory patrí Rb^+ , Cs^+ a intracelulárne Mg^{2+} (Kubo et al., 2005).

Funkciu K_{IR} kanálov ako pri iných kanáloch regulujú vazokonstriktory aj vazodilatátory. Ich pôsobenie na tieto kanály zatiaľ nie je dostatočne preštudované, na rozdiel od ostatných typov K^+ kanálov (Park et al., 2008).

3.4 ATP-senzitívne K^+ kanály

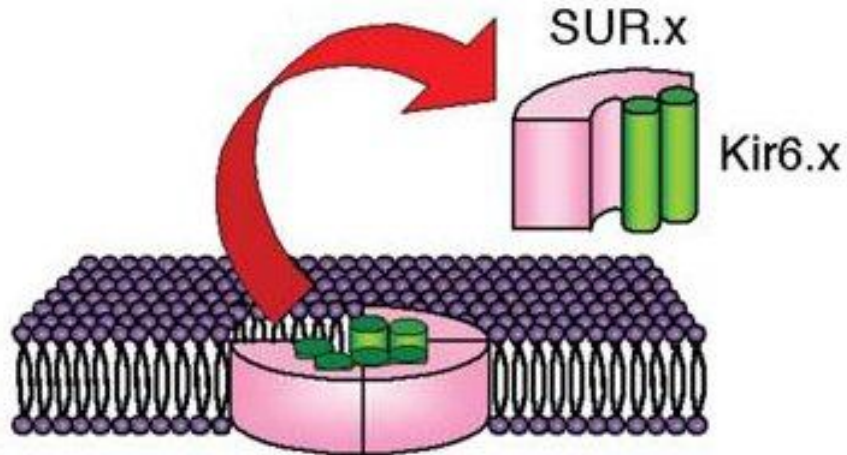
K_{ATP} kanály hladkého svalstva sú pomenované podľa faktu, že pri zníženej intracelulárnej koncentrácii ATP sa otvárajú (Jackson 2005). K_{ATP} tvoria prepojenie medzi metabolizmom a membránovou vzrušivosťou. Výraznou mierou prispievajú k udržiavaniu E_m a teda aj cievneho tonusu. K_{ATP} kanály patria do rodiny dovnútra-usmerňujúcich kanálov a pri pozitívnejších hodnotách membránového potenciálu než je hodnota E_m vedú menší prúd von z bunky (Teramoto 2006).

Tieto kanály v hladkom svale sú zložené z tetraméru dovnútra-usmerňujúcich podjednotiek K_{IR} 6.1, ktoré formujú vodivý pór (obrázok 5.). Beta podjednotky tvoria regulačné podjednotky sulfonylurea receptoru (SUR) (Jackson 2005).

Ako pre ostatné draslíkové kanály aj pre K_{ATP} je rozhodujúca fosforylácia. Aktivačne pôsobí PKA a inhibične pôsobí PKC. Molekulárna podstata týchto procesov však zostáva neznáma (Teramoto 2006).

K_{ATP} kanály sú blokované sulfonylureatmi ako glibenclamid. Blokáda sa deje na beta podjednotke. Aktivované sú látkami ako pinacidil a cromakalim (Kubo et al., 2005).

ATP-senzitívny kanál



Obr. 5. Rozloženie podjednotiek ATP-senzitívneho kanálu. Kir6.x, dovnútra-usmerňujúca podjednotka; SUR.x, sulfonylurea receptor (upravené podľa Teramoto 2006).

3.5 K₂P K⁺ kanály

Vazodilatačná funkcia bola donedávna takmer výlučne pripisovaná klasickým skupinám K⁺ kanálov. Iba v poslednej dobe sa začínajú objavovať práce o dilatačnej funkcii K₂P kanálov. Príkladom je Gurney et al. (2003) ktorí ukázali že, takýto typ kanálov je hlavným prispievateľom k udržiavaniu membránového potenciálu buniek hladkého svalstva v pľúcnych artériách. K₂P kanály regulujú cerebro-vaskulárnu aktivitu a sú ovplyvnené vazoaktívnymi lipidmi (Blondeau et al., 2007). Produkcia endoteliálnych faktorov zodpovedná za relaxáciu hladkého svalstva, hlavne NO, vyžaduje kanály z tejto rodiny (TREK1) (Garry et al., 2007). Zdá sa, že K₂P rodina môže sprostredkovať množstvo vazodilatačných reakcií, no potrebný je ďalší výzkum.

4. K^+ kanály v endoteli

Endotelové bunky exprimujú množstvo kanálov: K_{IR} , K_{ATP} , K_V a minimálne dve triedy K_{Ca} kanálov (obrázok 6.) (Jackson 2005). Rovnako ako v hladkom svale ciev, aj v endoteli sa predpokladá hlavná úloha draslíkových kanálov v regulácii membránového potenciálu (Nilius et al., 2001).

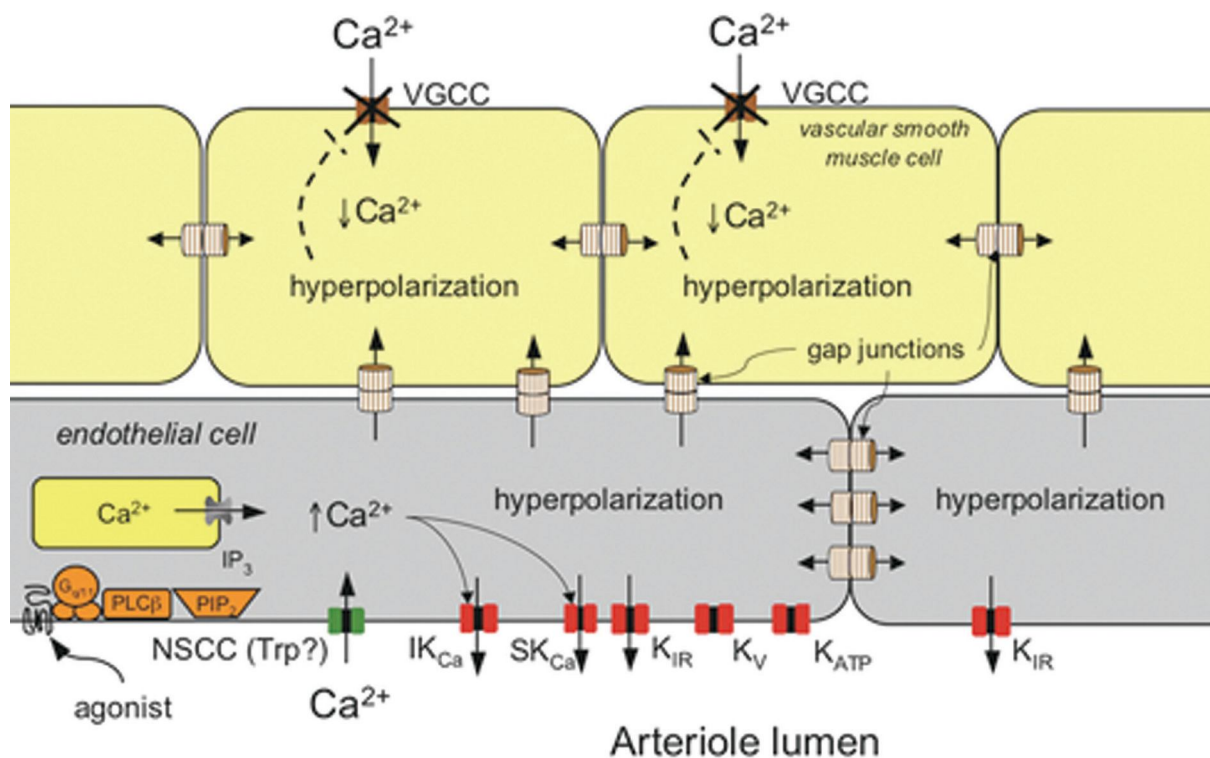
V endoteli sa nachádzajú K_{Ca} kanály nízkovodivostné (sK_{Ca}) a stredne vodivostné (IK_{Ca}). Ich vodivosť je 10 pS pre sK_{Ca} a 30-80 pS pre IK_{Ca} . Tieto kanály odlišujúce sa od BK_{Ca} kanálov v hladkom svale ciev svojou vodivosťou sa ďalej líšia aj tým, že sú nezávislé na zmene membránového potenciálu (Ledoux et al., 2006). Ich stav je silno závislý iba na $[Ca^{2+}]_i$. Senzor Ca^{2+} sa nenachádza v štrukturálnych doménach kanálu ako pri BK_{Ca} kanáloch, ale je v nich prítomný Ca^{2+} viazajúci proteín kalmodulín. Vazebné miesto pre tento proteín sa nachádza na COOH konci a je prevdepodobne schopné naviazať až štyri kalmodulíny (Nilius et al., 2001). Predpokladá sa, že sK_{Ca} a IK_{Ca} kanály úzko súvisia s EDHF-indukovanou vazodilatáciou. Membránová hyperpolarizácia, ktorá vzniká pôsobením K_{Ca} kanálov, vedie k ďalšiemu vtoku Ca^{2+} do bunky z dôvodu zvýšenia elektrochemického gradientu pre Ca^{2+} (Ledoux et al., 2006). Nízkovodivostné sK_{Ca} kanály existujú v troch izoformách: $sK1$, $sK2$, $sK3$. Z toho však iba $sK2$ a $sK3$ sa nachádzajú v endoteli. Taylor et al. (2003) priniesol dôkaz o tom, že expresia $sK3$ má vysoký vplyv na cievny tonus tým, že tieto kanály udržiujú membránovú hyperpolarizáciu. Možná je aj spojitosť expresie týchto kanálov s estrogénom pri ktorej $sK3$ kanály pravdepodobne hrajú hlavnú úlohu v kardiovaskulárnych účinkoch tohto hormónu (Mendelsohn, 2002).

Predpokladá sa, že funkcia K_{IR} kanálov je podobná tej v hladkom svale ciev. Membránový potenciál endotelových buniek pri fyziologických hodnotách extracelulárnej koncentrácie K^+ sa pohybuje okolo -30 mV (Emerson et al., 2000). To je hodnota E_m vzdialená pre usmernené vedenie dovnútra K_{IR} kanálov. Tieto kanály však môžu fungovať ako K^+ senzor a prispievať tak ku K^+ indukovanej vazodilatácii. (Nilius et al., 2001).

Funkcia K_{ATP} a K_V kanálov zostáva neznáma. Pre K_V kanály bolo navrhnuté že prispievajú k osciláciám membránového potenciálu a negatívne spätnou väzbou regulujú membránový potenciál (Dittrich et al., 1999). Tieto dohady, však bude ešte potrebné potvrdiť. K_{ATP} pravdepodobne rovnako ako v bunkách hladkéhovalu ciev výraznou mierou prispievajú k udržiavaniu E_m (Janigro et al., 1993).

Ión. kanál	Alfa podj.	Beta podj.	Aktivuje kanál	Inhibuje kanál	Antagonisti
sK _{Ca}	SK3	CaM	↑ [Ca ²⁺] _i	↓ [Ca ²⁺] _i	apamín, d-tubokurain
IK _{Ca}	IK1	CaM	↑ [Ca ²⁺] _i	↓ [Ca ²⁺] _i	charybdotoxín, clotrimazol, TBA
K _{IR}	KIR 2.1	—	hyperpol.; ↑ [K ⁺] _{out} ; NO	depol.; ↓ [K ⁺] _{out}	Ba ²⁺ ; quinidín
K _V	KV 1.5; 1.6	K _v β	depol.; PKA; ↓ pH	hyperpol.; ↑ [Ca ²⁺] _i ; Rho-kináza	4- aminopyridín; korreloid; agitotoxí-2
K _{ATP}	KIR 6.1; 6.2	SUR2b	↓ ATP; ↑ADP; PKA; PKG; pinacidil	↑ ATP; ↓ ADP; ↑ [Ca ²⁺] _i ; PKC	glibenclamid; tolbutamid; Ba ²⁺

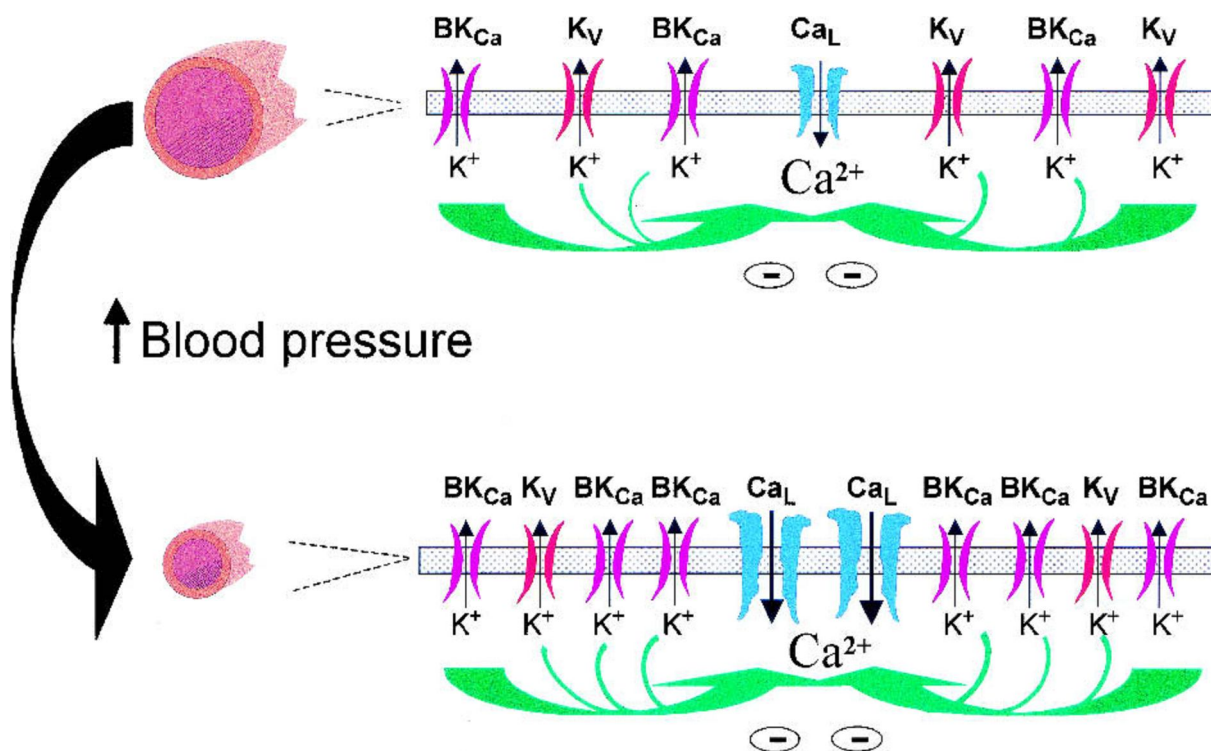
Tab. 1. Draslíkové kanály v endoteli ciev. TBA, tetrabutyl amónium (upravené podľa Jackson 2005).



Obr. 6. Draslíkové kanály v endoteli ciev VGCC, vysoko vodivostné vápnikové kanály; NSCC, neselektívne kationové kanály; PLC, fosfolipáza C; PIP, fosfatidylinozitolfosfát (upravené podľa Jackson 2005).

5. Remodelácia K^+ kanálov pri hypertenzii

Počas zvýšenia krvného tlaku dochádza k adaptácii steny ciev. Prvotná reakcia na zvýšený tlak je konstriktia artérií a arteriol. Táto reakcia sa nazýva myogénna odpoveď a vedie k depolarizácii, ktorá súvisí s aktiváciou, prípadne inhibíciou iónových kanálov v membráne hladkého svalu (Schubert and Mulvany 1999). Myogénna odpoveď v artériách a arteriolách zosiluje pôvodné zvýšenie krvného tlaku zvyšovaním periférneho odporu ciev. V mozgovom, koronárnom a obličkovom obeh, ktoré majú výraznú autoreguláciu lokálneho krvného toku, myogénna odpoveď tlmí prenos vysokého krvného tlaku do týchto kritických orgánov (Cox et al., 2002). Pri pretrvávajúcej hypertenzii bunky hladkého svalu menia zastúpenie iónových kanálov a udržiavajú tak depolarizáciu a vazokonstriktiu (Cox et al., 2002). Pretrvávajúce zvýšenie krvného tlaku vedie ku kanálovej remodelácii v plazmatickej membráne. To má za následok zvýšenú depolarizáciu a kontrakciu ciev.



Obr. 7. Remodelácia iónových kanálov v hladkom svalc ciev (upravené podľa Cox 2002).

Hlavným kanálom určujúcim kľudový potenciál je K_V (Fleischmann et al., 1993). Počet týchto kanálov u hypertenzných jedincov klesá (Martens et al., 1996). S K_V kanálmi súvisia vysoko vodivostné Ca²⁺ kanály, ktorých počet a vodivosť sa počas hypertenzie zvyšuje.

Zvýšený vtok Ca^{2+} zvyšuje kontrakciu hladkého svalu ciev a inhibuje K_V kanály (Cox et al., 2001).

Neprirodzené zvýšenie vtoku iónov do bunky hladkého svalu cez vysoko vodivostné Ca^{2+} kanály a zníženie výtoku cez K_V kanály má za následok extrémne zúženie ciev (Cox et al., 2002). Významú úlohu v takýchto situáciách hrá zvýšenie K^+ vtoku cez BK_{Ca} kanály (Berger et al., 1999). Ich hyperpolarizujúci účinok zabraňuje neprirodzenej vazokonstrikcii v menších cievach a limituje ďalšie nárasty krvného tlaku počas hypertenzie (Paterno et al., 1997).

6. Záver

Každý typ draslíkového kanálu má pri regulácii cievného tonusu svoju úlohu. Zásadný význam pre udržanie kľudového membránového potenciálu majú K_V kanály, schopné reagovať na depolarizáciu svojím otvorením. K_{Ca} kanály majú podobnú úlohu, ale na rozdiel od K_V kanálov, sú aktivovateľné nie len napätím, ale aj zvýšenou koncentráciou intracelulárneho Ca^{2+} . Jednotlivé K_{Ca} kanály nachádzajúce sa v hladkom svale ciev a endoteli sa medzi sebou líšia vodivosťou a typom Ca^{2+} senzoru. K_{IR} kanály svojou zvyšujúcou sa von smerujúcou vodivosťou v negatívnych hodnotách amplifikujú draslíkový prúd a pôsobia ako senzor zvýšenej K^+ koncentrácie v extracelulárnom priestore. Prepojenie medzi metabolizmom a membránovým potenciálom vytvárajú K_{ATP} kanály. Tieto štyri skupiny kanálov tvoria základ draslíkovej vodivosti v hladkom svale ciev.

Komplexné pochopenie celulárnych mechanizmov regulujúcich cievný tonus je potrebné nie len pre výskumnú činnosť ale aj pre klinickú prax. Draslíkové kanály hrajú v týchto mechanizmoch hlavnú úlohu. Môžu byť považované za jedny z hlavných terapeutických cieľov pri poruchách krvného tlaku. Pochopenie tejto problematiky má svoj význam aj pre anesteziológov, pretože rôzne druhy anestetík môžu krvný tlak ovplyvniť.

V mojej práci som zhrnul niektoré podstatné informácie o draslíkových kanáloch a pokúsil som sa popísať ich funkciu. Nie vo všetkých prípadoch existuje dostatok informácií na jej presné určenie. Preto pre komplexné pochopenie danej problematiky bude potrebný ďalší výskum.

Zoznam skratiek

4-AP	4-aminopyridín
cAMP	cyklický adenylylmonofosfát
ATP	adenozíntrifosfát
CaM	kalmodulín
$[Ca^{2+}]_i$	intracelulárna koncentrácia vápnika
CNS	centrálne nervová sústava
DG	diacylglycerol
E_m	kludový membránový potenciál
EDHF	Endothelium-Derived Hypertension Factor
EDRF	endotelový relaxujúci faktor
cGMP	cyklický guanozylmonofosfát
IP3	inozitol trifosfát
K_v	napätovo-ovládané K^+ kanály
K_{Ca}	vápnikom-aktivované K^+ kanály
K_{IR}	dovnútra-usmerňujúce K^+ kanály
K_{ATP}	ATP-senzitívne K^+ kanály
MLCK	kináza ľahkého reťazca myozínu
MLC	ľahký reťazec myozínu
NO	oxid dusičnatý
eNOS	endoteliálna NO syntáza
NSCC	neselektívne kationové kanály
P	pór formujúci úsek
PIP	fosfatidylinozitolfosfát
PKA	proteínkináza A
PKC	proteínkináza C
PKG	proteínkináza G
PLC	fosfolipáza C
TBA	tetrabutyl amónium
TEA	tetraetylamóniových
TM	transmembránový úsek
VGCC	vysoko vodivostné vápnikové kanály

Zoznam použitej literatúry

- Akata T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth.* 2007; 21: 220-31.
- Alioua A, Huggins JP, Rousseau E. PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995; 268: 1057-63.
- Arner A, Pfitzer G. Regulation of cross-bridge cycling by Ca²⁺ in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999; 134: 63-146.
- Berger MG, Rusch NJ. Voltage and calcium-gated potassium channels: functional expression and therapeutic potential in the vasculature. *Perspect Drug Discovery Design.* 1999; 15/16: 313-332.
- Blondeau N, Pétrault O, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res.* 2007; 101: 176-84.
- Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature.* 2000; 407: 870-6.
- Cox RH, Folander K, Swanson R. Differential expression of voltage-gated K(+) channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension.* 2001; 37: 1315-22.
- Cox RH. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem Biophys.* 2005; 42: 167-95.
- Cox RH, Rusch NJ. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. *Microcirculation.* 2002; 9: 243-57.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115: 1285-95.
- Dittrich M, Daut J. Voltage-dependent K(+) current in capillary endothelial cells isolated from guinea pig heart. *Am J Physiol.* 1999; 277: 119-27.
- Dopico AM. Ethanol sensitivity of BK(Ca) channels from arterial smooth muscle does not require the presence of the beta 1-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284: 1468-80.
- Eckert, R., Randall, R., Augustine, G. *Animal physiology: mechanisms and adaptations.* 2001. W.H. Freeman & Co Ltd.
- Emerson GG, Segal SS. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ Res.* 2000; 87: 474-9.
- Figuroa XF, Chen CC, Campbell KP, Damon DN, Day KH, Ramos S, Duling BR. Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: 1371-83.
- Fleischmann BK, Washabau RJ, Kotlikoff MI. Control of resting membrane potential by delayed rectifier potassium currents in ferret airway smooth muscle cells. *J Physiol.* 1993; 469: 625-38.
- Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113: 1708-14.

- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989; 3: 2007-18.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27; 288(5789):373-6.
- Garry A, Fromy B, Blondeau N, Henrion D, Brau F, Gounon P, Guy N, Heurteaux C, Lazdunski M, Saumet JL. Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep*. 2007; 8: 354-9.
- Gelband CH, Hume JR. $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K^+ channels in canine renal artery. Novel mechanism for agonist-induced membrane depolarization. *Circ Res*. 1995; 77: 121-30.
- Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI. The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (BK) potassium channels. *Advances in pharmacology*. 1997; 37: 319-348.
- Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, Kempson FE. Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 2003; 93: 957-64.
- Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290: 546-52.
- Heppner TJ, Bonev AD, Santana LF, Nelson MT. Alkaline pH shifts Ca^{2+} sparks to Ca^{2+} waves in smooth muscle cells of pressurized cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283: 2169-76.
- Holland M, Langton PD, Standen NB, Boyle JP. Effects of the BKCa channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1996; 117: 119-29.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev*. 1996; 76: 967-1003.
- Horrigan FT, Cui J, Aldrich RW. Allosteric voltage gating of potassium channels I. $Mslo$ ionic currents in the absence of Ca^{2+} . *J Gen Physiol*. 1999; 114: 277-304.
- Cheong A, Dedman AM, Beech DJ. Expression and function of native potassium channel $[K(V)\alpha 1]$ subunits in terminal arterioles of rabbit. *J Physiol*. 2001; 534: 691-700.
- Chen L, Tian L, MacDonald SH, McClafferty H, Hammond MS, Huibant JM, Ruth P, Knaus HG, Shipston MJ. Functionally diverse complement of large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) α -subunits generated from a single site of splicing. *J Biol Chem*. 2005; 280: 33599-609.
- Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. 2000; 35: 173-8.
- Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation*. 2005; 12: 113-27.
- Jaggard JH, Porter VA, Lederer WJ, Nelson MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 278: 235-56.
- Janigro D, West GA, Gordon EL, Winn HR. ATP-sensitive K^+ channels in rat aorta and brain microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1993; 265: 812-21.
- Keef KD, Hume JR, Zhong J. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca^{2+} channels ($Ca(V)1.2a,b$) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281: 1743-56.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev*. 2005; 57: 509-26.

- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008; 44: 65-81.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21: 69-78.
- Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol.* 2002; 89: 12-17.
- Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels in genetic and nongenetic hypertension. *Circ Res.* 1996; 79: 295-301.
- Mulvany MJ, Nilsson H, Flatman JA. Role of membrane potential in the response of rat small mesenteric arteries to exogenous noradrenaline stimulation. *J Physiol.* 1982; 332: 363-73.
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995; 268: 799-822.
- Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev.* 2001; 81: 1415-59.
- Parkington HC, Coleman HA, Tare M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res.* 2004; 49: 509-14.
- Paterno R, Heistad DD, Faraci FM. Functional activity of Ca²⁺-dependent K⁺ channels is increased in basilar artery during chronic hypertension. *Am J Physiol.* 1997; 272: 1287-1291
- Park WS, Han J, Earm YE. Physiological role of inward rectifier K(+) channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 2008; 457: 137-47.
- Pérez GJ, Bonev AD, Patlak JB, Nelson MT. Functional coupling of ryanodine receptors to K_{Ca} channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol.* 1999; 113: 229-38.
- Pérez GJ, Toro L. Differential modulation of large-conductance K_{Ca} channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *Am J Physiol.* 1994; 266: 1459-63.
- Quayle JM, Dart C, Standen NB. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol.* 1996; 494: 715-26.
- Robertson BE, Bonev AD, Nelson MT. Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg²⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺. *Am J Physiol.* 1996; 271: 696-705.
- Saye JA, Singer HA, Peach MJ. Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension.* 1984; 6: 216-21.
- Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; 28: 703-11.
- Schmalhofer WA, Bao J, McManus OB, Green B, Matyskiela M, Wunderler D, Bugianesi RM, Felix JP, Hanner M, Linde-Arias AR, Ponte CG, Velasco L, Koo G, Staruch MJ, Miao S, Parsons WH, Rupprecht K, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Identification of a new class of inhibitors of the voltage-gated potassium channel, Kv1.3, with immunosuppressant properties. *Biochemistry.* 2002; 41: 7781-94.
- Schubert R, Mulvany MJ. The myogenic response: established facts and attractive hypotheses. *Clin Sci (Lond).* 1999; 96: 313-26.

- Schubert R, Noack T, Serebryakov VN. Protein kinase C reduces the K_{Ca} current of rat tail artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1999; 276: 648-58.
- Smith PD, Brett SE, Luykenaar KD, Sandow SL, Marrelli SP, Vigmond EJ, Welsh DG. K_{IR} channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle. *J Physiol*. 2008; 586: 1147-60.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*. 2000; 522: 177-85.
- Standen NB, Quayle JM. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand*. 1998; 164: 549-57.
- Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol*. 2006; 572: 617-24.
- Tang XD, Santarelli LC, Heinemann SH, Hoshi T. Metabolic regulation of potassium channels. *Annu Rev Physiol*. 2004; 66: 131-59.
- Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayden JE, Bond CT, Adelman JP, Nelson MT. Altered expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK₃) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ Res*. 2003; 93: 124-31.
- Tian L, Duncan RR, Hammond MS, Coghill LS, Wen H, Rusinova R, Clark AG, Levitan IB, Shipston MJ. Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7717-20.
- Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Lann GE, Vergara C, Latorre R. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*. 1999; 285: 1929-31.
- Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res*. 2004; 49: 503-8.
- Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Golovina VA, Rubin LJ. Molecular basis and function of voltage-gated K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998; 274: L621-35.
- Xu J, Li M. Auxiliary subunits of Shaker-type potassium channels. *Trends Cardiovasc Med*. 1998; 8: 229-34.
- Xu X, Rials SJ, Wu Y, Marinchak RA, Kowey PR. The properties of the inward rectifier potassium currents in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch*. 1999; 438: 187-94.
- Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003; 27: 201-6.
- Wellman GC, Cartin L, Eckman DM, Stevenson AS, Saundry CM, Lederer WJ, Nelson MT. Membrane depolarization, elevated Ca²⁺ entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281: H2559-67.