

## Sıçan Dorsal Kök Gangliyon Sinir Hücre Kültürlerinde Hücre İçi Kalsiyum Depolarından Kafeine Duyarlı Kalsiyum Salıverilmesinin Elektrofizyolojik ve Farmakolojik İncelenmesi\*

Dr. Ahmet AYAR

Londra Üniversitesi, Tıp Fakültesi, St Georg Hastanesi, Fizyoloji Anabilim Dalı,  
İNGİLTERE

- ✓ Bu çalışmanın amacı sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) sinir hücre kültürlerinde kafeinin hücre içi kalsiyum depolarına etkisini tüm hücre diyaliz patch kenetleme ve kalsiyum görüntüleme teknikleri kullanılarak araştırmaktır. Kafein (1mM) uygulaması hem ekstrasellüler kalsiyum varlığında hem de kalsiyumsuz ekstrasellüler kayıt solüsyonu kullanıldığında içe yönelik membran akımlarını aktive etti. Hücre içi kalsiyum bağlama kapasitesinin 20 mM EGTA kullanılarak artırılması, dantrolen veya ryanodinin hücre içine uygulanması ile kafeinin etkisi önlendi. Fura-2 kullanılarak gerçekleştirilen kalsiyum görüntüleme deneyleri elektrofizyolojik bulgularla uyumlu olarak kafeinin bu hücrelerde hücre içi ryanodin/dantrolene duyarlı  $Ca^{2+}$  depolarından kalsiyum salıverilmesine yol açtığını gösterdi. Sonuç olarak kafein sıçan DKG sinir hücrelerinde hücre içi depolardan kalsiyum salıvermektedir ve kafeinin bu etkisi dantrolene duyarlıdır.

**Anahtar kelimeler:** Kafein, kalsiyum, patch kenetleme, duyuşal nöron, hücre kültürü

- ✓ **Electrophysiological and Pharmacological Investigation of Caffeine-Sensitive Calcium Release From Intracellular Calcium Stores in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurones**

The aim of this study was to investigate the actions of caffeine on intracellular calcium stores in cultured rat dorsal root ganglion (DRG) neurones using whole cell variant of the patch clamp and calcium imaging techniques. Extracellular caffeine (1mM) application activated inward currents in the presence and absence of extracellular  $Ca^{2+}$  but fail to activate any current when intracellular  $Ca^{2+}$  buffering capacity increased (using 20 mM EGTA), dantrolen or ryanodine was applied to the cells by the patch pipette solution. Calcium imaging studies using fura-2 confirmed the electrophysiological findings and provided further piece of evidence for caffeine-induced  $Ca^{2+}$  calcium release from ryanodine/dantrolene-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  stores. In conclusion caffeine releases  $Ca^{2+}$  from intracellular stores in DRG neurones and this effect of caffeine is sensitive to dantrolene.

**Key words:** Caffeine, calcium, patch-clamp, sensory neurone, cell culture

### GİRİŞ

Nöronal hücrelerde hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> miktarındaki artış, veziküler nöro-

transmitter salıverilmesi, sinaptik plastisite, enzim aktivasyonu, uyarılabilmenin kontrolü, gen ekspresyonu, programlanmış hücre ölü-

\* Bu çalışmanın bir kısım verileri Türk Farmakoloji Derneğinin XV. Ulusal Farmakoloji Kongresi'nde (1-5 Kasım 1999, Antalya) bildiri olarak sunulmuştur.

mü ve belli iyon kanallarının aktivasyonu gibi bir çok hücrel fizyolojik ve fizyopatolojik olayların kontrolünde önemli rol oynar<sup>(1)</sup>.

$Ca^{2+}$   $[Ca^{2+}]_i$  artışları ya hücre dışından voltaj ve/veya ligand kapılı  $Ca^{2+}$  kanalları aracılığı<sup>(2,3)</sup> ile  $Ca^{2+}$  girişi ya da hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarından  $Ca^{2+}$  saliverilmesi<sup>(4)</sup> ile gerçekleşir. Başlıca iki tip hücre içi  $Ca^{2+}$  deposu mevcuttur, bunlar inozitol 1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ )-'e duyarlı<sup>(5)</sup> ve ryanodine<sup>(6)</sup> duyarlı kalsiyum depolarıdır. Bu depolar kalsiyumu aktif olarak depolayabilir ve uygun uyaran geldiğinde  $IP_3$  veya ryanodin reseptörleri ile ilişkili olan  $Ca^{2+}$  saliverilme kanallarının açılması ile bu kalsiyumu hücre içine salıverebilirler<sup>(7)</sup>.  $[Ca^{2+}]_i$  düzeyleri ATP'ye bağımlı pompalarla hücre içi  $Ca^{2+}$  havuzlarına geri alınması ve/veya  $Na_0/Ca_i$  değiş-tokuş ve  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -ATPaz pompası ile hücre dışına atılması gibi mekanizmalarla düzenlenmektedir<sup>(8)</sup>. Sıçan dorsal kök gangliyon (DKG) hücrelerinde ryanodin duyarlı depoların aynı zamanda kafein, sifingolipidler ve siklikADP-riboza da duyarlı olduğu belirlenmiştir<sup>(9)</sup>.

Kafeine duyarlı kalsiyum saliverilmesi sempatik ve duyuşal nöronlarda bildirilmiştir<sup>(10,11)</sup>. Kafein duyarlı kalsiyum saliverilmesinin duyuşal nöronlarda kalsiyum bağımlı klor kanallarını ve potasyum kanallarını aktive ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir, fakat bu çalışmalarda kalsiyum bağımlı olarak aktive olan non-selektif katyon kanallarıyla ilişkisi ortaya konmamıştır<sup>(12,13)</sup>.

Bu çalışmanın amacı kafeinin sıçan DKG hücresi hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarından kalsiyum saliverilmesi üzerine etkilerini farmakolojik ve elektrofizyolojik yaklaşımlarla araştırmaktır.

Hücre içi depolardan kafein etkisiyle  $Ca^{2+}$  saliverilmesine bağılı olarak kalsiyum bağımlı klor kanallarının yanında kalsiyum bağımlı seçici olmayan katyon kanallarının da aktive olduğu ilk defa bu çalışmayla belirlendi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Primer Hücre Kültürü:** Bu amaçla, 1-2 günlük Wistar sıçanları Laminar Flow içerisinde steril bir ortamda dekapite edilerek spinal kolon ayrıldı ve dorsal kök gangliyonları diseksiyon mikroskobu altında ayrılarak tamponlanmış fosfat solüsyonu (PBS) içeren bir petri kutusunda toplandı. Gangliyonlar enzimsel (%0.125 kollagenaz (Sigma) 13 dakika süreyle, %0.25 tripsin (Sigma) 6 dakika süre ile 37 °C'de inkübe edilerek (ve mekanik (ucu daraltılmış bir pastör pipetine çekerek) muamelelerle tek hücrelere ayrıştırıldı. Bu hücre süspansiyonu Poly-L-ornitin (Sigma) ve lamininle (Sigma) steril lameller üzerine ekildi. Bu sinir hücreleri 37 °C'de %5  $CO_2$  ve nemli hava içeren inkübatörde kültür vasatı [F 14 Ham's Nutrient (Gibco) + at serumu (Gibco) + sinir büyütme faktörü (Sigma) + penisilin/streptomisin (ICN)] inkübe edildi ve 7 günde bir taze kültür vasatı ile beslendi.

Elektrofizyolojik kayıtlar 2-14 günlük hücre kültürlerini kullanarak gerçekleştirildi.

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ölçülmesi: DKG hücreleri kültüre edilmiş bir lamel 35 mm çapındaki bir petri kutusu tabanına sıkıca yerleştirildi. Hücreler 1 mikromolar fura-2'nin asetoksimetil ester formu (fura-2/AM; Molecular Probes) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra kalsiyum görüntüleme sistemi içerisinde faz kontrast optiklerle donatılmış ve bilgisayar kontrollü kamera bağlantılı ters mikroskobun (Olympus BX50WI mikroskop, KAI-1001 S/N 5B7890-4201 Olimpus kamera) tablasına yerleştirildi. Hücre içi kalsiyum düzeyleri mikroskop aracılığı ile gönderilen 340-380 nm arasında Xenon ışık kaynağından bilgisayar kontrollü ışık gönderilmesi ve flörsan düzeylerinin ölçülmesi ile belirlendi. Flörsan imajları OraCal Pro (Life Sciences Resources, v 1.20) yazılım programı ile analiz edildi.

Kafeinin  $[Ca^{2+}]_i$  düzeylerine etkisinin araştırıldığı kalsiyum görüntüleme çalışmalarında kafein uygulamasından sonra depoların tükeniminin önlenmesi ve yeniden dolmasının sağlanması amacıyla hücreler her kafein uygulamasından önce 30 mM KCl solüsyonu ile ön depolarizasyona tabi tutularak hücre içi  $Ca^{2+}$  depoların yeniden dolması ve kafeine yanıtların senkronizasyonu sağlandı. KCl uygulamasından sonra  $[Ca^{2+}]_i$  düzeylerinin tamamen istirahat düzeylerine dönmesine kadar beklendikten sonra kafein uygulamaları yapıldı.

Elektrofizyoloji: Elektrofizyolojik kayıtlar tüm hücre patch kenetleme tekniği<sup>(14)</sup> kullanılarak, oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Düşük rezistanslı cam mikropipetler (3-7 MΩ) kullanılarak hücrelere Axoclamp 2A patch kenetleme amplifikatörü ile (Axon Inst., ABD) -90 mV'da devamlı olmayan tek elektrot voltaj keneti uygulandı. Tetrodotoksin (TTX) kullanılarak sodyum kanalları, ekstrasellüler TEA ve intrasellüler sezyum kullanılarak potasyum akımları bloklandı ve böylece kalsiyum ile kalsiyum bağımlı akımlar farmakolojik olarak izole edildi.

Flaş fotosalverilme çalışmaları karanlık ortamda ışığa duyarlı kalsiyum şelatörü "diazo-2" ve kalsiyum bağlama kapasitesi olmayan diazo-3'ün Xenon XF-10 (Hi Tech Sci., Almanya) flaş kaynağından elde edilen kısa dalga boyuna sahip UV ışınları (>300 nm) ile gerçekleştirildi. Kimyasal olarak kafeslenmiş ("caged compound") ve ışığa duyarlı ajanların pipetten hücreye geçişini sağlamak amacıyla, flaş aktivasyonu tüm hücre diyaliz patch kenetleme modülünün gerçekleştirilmesinden 5 dakika sonra yapıldı. Aynı protokol patch pipeti solüsyonuyla hücre içine uygulanan dantrolen ve ryanodin için de takip edilerek bu ajanların hücre içine perfüzyonu sağlandı.

Ekstrasellüler kayıt solüsyonunun içeriği

(mM): ChCl, 130; KCl, 3.0;  $MgCl_2$ , 0.6;  $CaCl_2$ , 2.0;  $NaHCO_3$ , 1.0; HEPES, 10.0., glukoz, 4.0; TEA bromid, 25.0; tetrodotoksin (TTX, Sigma), 0.00125; Solüsyonun pH'sı NaOH ile 7.4; osmolaritesi ise sukroz kullanılarak 320 mOsm'a ayarlandı. Kafeinin aktive ettiği membran akımlarının iyonik temelini belirlenmesine yönelik 9 deneyde ekstrasellüler kayıt solüsyonunda ChCl yerine eşit molar N-metil-D-Glukamin klörür (NMDG-Cl, Sigma) kullanıldı.

Kalsiyum görüntüleme deneylerinde NaCl esash ekstrasellüler kayıt solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyonun içeriği (mM): NaCl, 130.0; KCl, 3.0; CaCl, 2.0;  $MgCl_2$ , 0.6;  $NaHCO_3$ , 1.0; HEPES, 10.0 ve glukoz, 4.0 şeklindedir.

Patch pipeti solüsyonu içeriği (mM): CsCl, 140.0;  $CaCl_2$ , 0.1; EGTA, 1.1 veya 20.0 mM;  $MgCl_2$ , 2.0; ATP, 2.0 ve HEPES 10.0. Solüsyonun pH'sı Tris kullanılarak 7.2'ye; osmolaritesi ise sukroz ile 310 mOsm'a ayarlandı.

Ekstrasellüler olarak uygulanan ilaçlar hücre dışı kayıt solüsyonunda, patch pipeti aracılığı ile doğrudan hücre içine uygulanan ajanlar ise patch pipeti solüsyonunda hazırlandı. Kafein, ryanodin ve diğer farmakolojik ajanlar geniş uçlu (uç çapı yaklaşık 10  $\mu m$ ) bir pipet aracılığı ile mikro injeksiyonla hücre dışına uygulandı.

Elektrofizyolojik veriler dijital teyp (DTR 1200, Intracel, UK) ile kasetlere kayıt edildi ve 1404 veri görür (dijital/analog dönüştürücü) aracılığı ile kişisel bilgisayara aktarıldı ve özel bilgisayar yazılım programı ile (Cambridge Electronic Design) analiz edildi, gerektiğinde sürekli olarak grafik kağıdına yazdırıldı (Gould Recorder 2200S). Bütün veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde Mann Whitney U Testi (Abstat, Biosoft, UK) ve tek yönlü varyans analizi (Microgal Origin, ABD) kullanıldı,  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### **Kafeinin membran akımları üzerine etkileri:**

Ekstrasellüler kafein (1 mM) uygulaması 2 mM ekstrasellüler kalsiyum içeren kayıt solüsyonu kullanıldığında uygulanan 40 hücrenin 33 tanesinde membrandan içe yönelik iyon akımını aktive etti. Kafein uygulamasını takiben ilk akım aktivasyonuna kadar geçen süre ortalama  $252 \pm 41$  saniye, aktive olan içe yönelik akımların ortalama pik amplitüdü ise  $-1.57 \pm 0.13$  nA idi, (n=33). Kafeinin indüklediği içe doğru membran akımları kalıcı (Şekil 4B) ya da transient (Şekil 1A) tipte idi, bazılarında ise kalıcı akım üzerinde osilasyonlar (Şekil 4B) vardı.

### **Kafeinin aktive ettiği membran akımlarının iyonik temeli:**

Kafeinin aktive ettiği içe yönelik akımların hangi iyon kanallarının aktivasyonu sonucu ortaya çıktığını belirlemek için membranda voltaj bağımlı iyon kanallarını etkilemeyecek düşük amplitütlü depolarizasyonlar (-60 ile +40 mV arasında) kafein uygulamasından önce ve kafeinin indüklediği içe doğru akımlar esnasında aktive edilerek fark akımı hesaplaması yapıldı (Şekil 1A). Fark akımları ilgili membran potansiyeli eşleştirilerek elde edilen bu akımların zıtlanma potansiyeli belirlendi (Şekil 1B). Elde edilen ortalama zıtlanma potansiyeli  $-1.9 \pm 1.6$  mV (n=5) bizim deney koşullarında aktif olan kalsiyum bağımlı klor ( $IC_{Cl(Ca)}$ ) ve kalsiyum bağımlı seçici olmayan (non-selektif) katyon INSK(Ca) için Nernst denkleminde hesaplanan zıtlanma potansiyeline oldukça yakındı.

Bu akımların daha ayrıntılı araştırılması için ekstrasellüler katyonlar non-permeabil katyon olan N- metil D- glukamin (NMDG) ile yer değiştirilerek elde edilen solüsyon kafeinin indüklediği içe yönelik akım esnasında

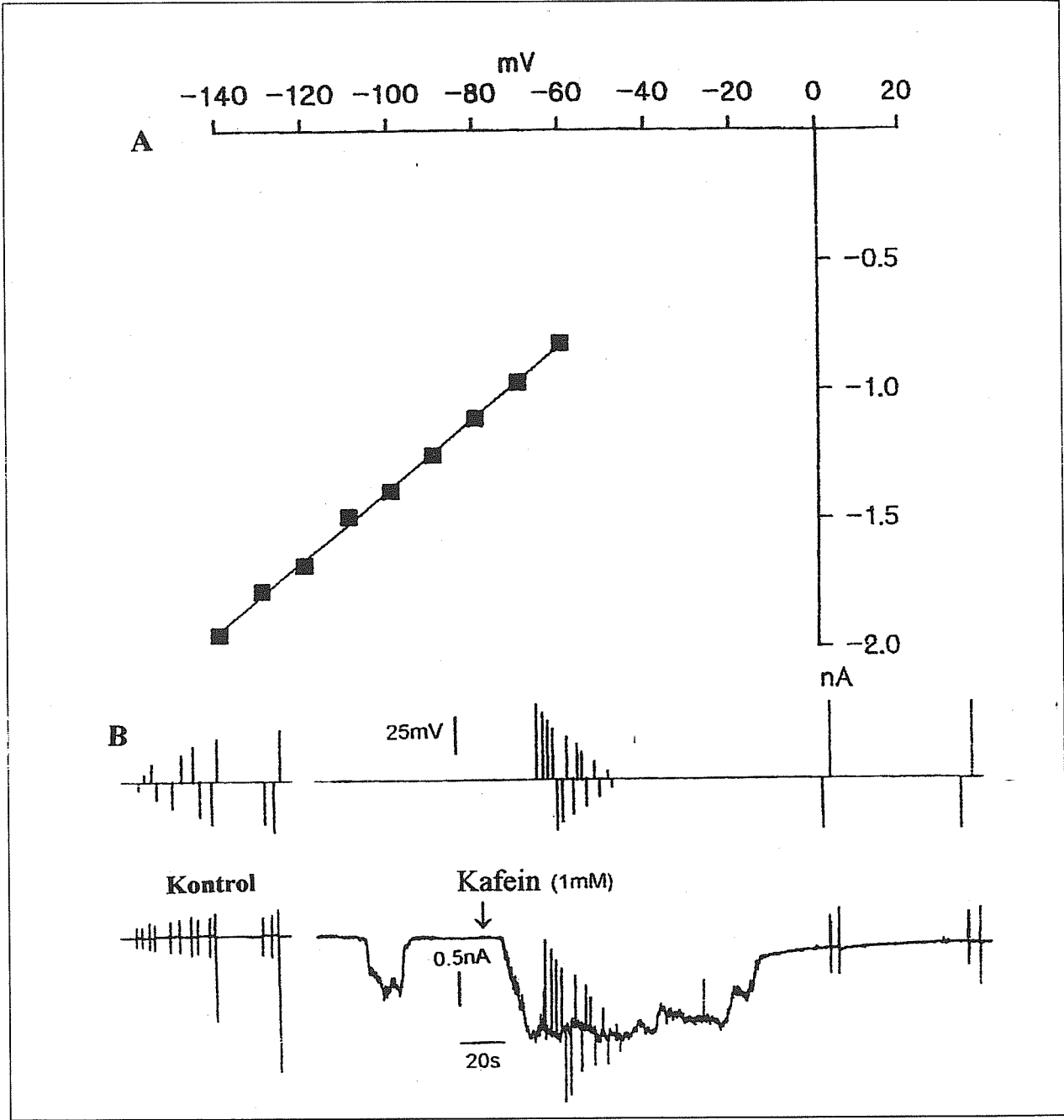
uygulanması ile bu akımlar ortalama %78.6 (0.8 oranında inhibe edildi (n=9, Şekil 2A). NMDG ihtiva eden ekstrasellüler solüsyona niflumik asit (10  $\mu$ M) ilave edildiğinde bu blok %95 $\pm$ 4 (n=4) oranına kadar yükseldi. (Şekil 2B). NMDG ihtiva eden solüsyonun bloklayıcı etkisi geri dönüşümlü ve tekrarlanabilirdi (Şekil 2).

### **Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının $Ca^{2+}$ bağımlılığı:**

Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının  $Ca^{2+}$  bağımlılığı,  $Ca^{2+}$  duyarlı flöresan boya fura-2 ile direk görüntüleme ve elektrofizyolojik deneylerde intrasellüler  $Ca^{2+}$  bağlama kapasitesi artırılarak ve ekstrasellüler  $Ca^{2+}$  uzaklaştırılarak indirekt olarak belirlendi.

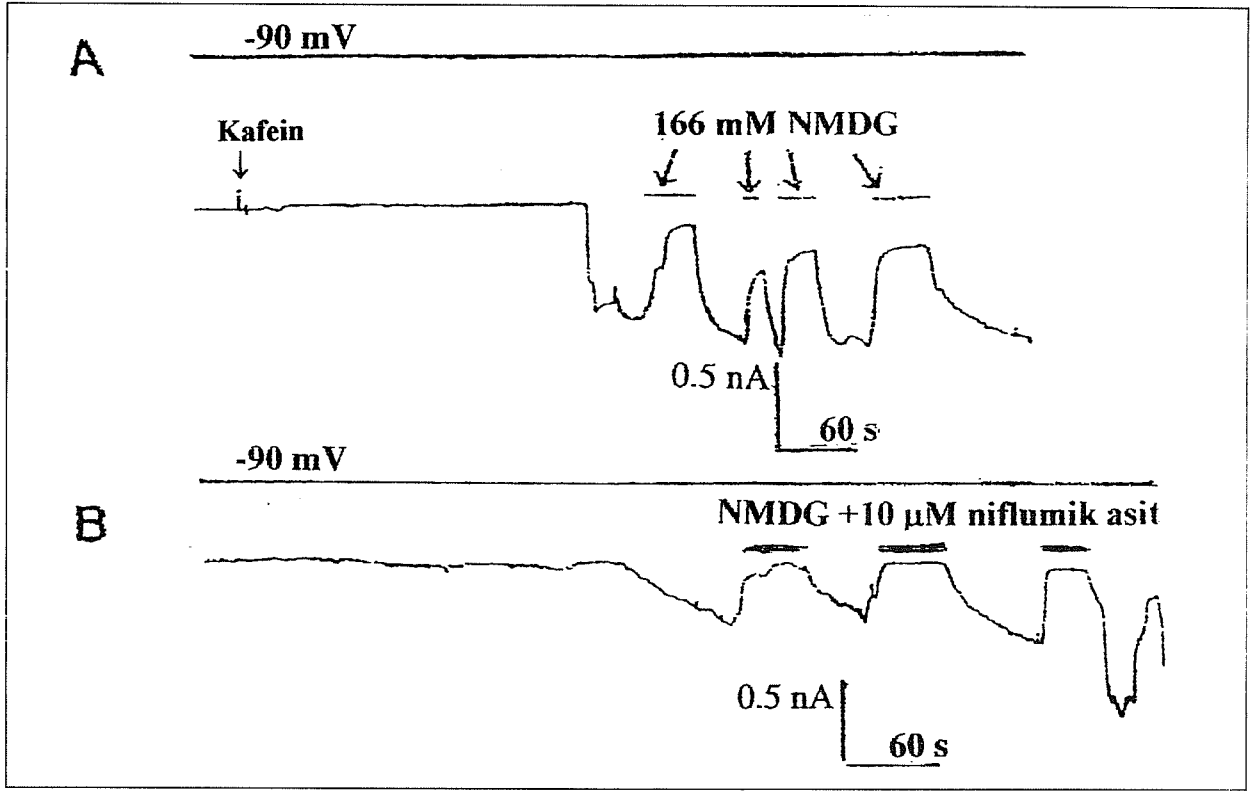
Kalsiyum görüntüleme deneylerinde kafein (1 mM) uygulamasından sonra  $[Ca^{2+}]_i$  düzeylerinde artış kalsiyum duyarlı flöresan boya fura-2 kullanılarak tespit edildi. Hücre içi  $Ca^{2+}$  deposu blokörü dantrolen varlığında (10 mikromolar) kafein uygulamasını takiben  $[Ca^{2+}]_i$  düzeylerinde artış gözlenmedi (n=24, Şekil 3). Elektrofizyoloji deneylerinde hücre içi EGTA konsantrasyonu 20 mM'a çıkarıldığında kafein hiçbir membran akımı aktive edemedi, (n=3; Şekil 4A).

Fakat hücreler kalsiyumsuz ekstrasellüler kayıt solüsyonunda tutulduğunda kafein uygulanan hücrelerin tamamında (n=6) içe yönelik membran akımlarını aktive etti (Şekil 4B). Kafeinin kalsiyumsuz ortamda aktive ettiği içe yönelik akımların ortalama pik amplitüdü  $-1.15 \pm 0.15$  nA, kafein uygulamasından akımların aktivasyonuna kadar geçen ortalama süre ise  $370 \pm 75$  s olarak belirlendi, (n=6). Bu içe yönelik akımların pik amplitüt değerleri ile 2 mM ekstrasellüler kalsiyum mevcudiyetinde elde edilen içe yönelik akımların pik amplitüt değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu (p>0.05).



Şekil 1. Kafeinin aktive ettiği içe yönelik membran akımlarının zıtlanma potansiyelinin hesaplanması.

Hücreler -90 milivolta voltaj kenetlendi. Kafein uygulamasından önce -60/40 mV arasında depolarize edici voltaj dalgaları uygulandı, bu protokol kafeinin indüklediği içe doğru akım esnasında tekrarlanarak (A) elde edilen fark akımları membran voltaj değerleri ile eşleştirilerek (B) zıtlanım potansiyeli hesaplandı, şekilde bir örnek hücreye ait veriler sunulmuştur. Akım ve voltaj traselerindeki defleksiyonlar aktive edilen voltaj dalgaları ve meydana getirdikleri membran akımlarını göstermektedir.



Şekil 2. NMDG ve niflumik asidin (10 (M) kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarına etkileri.

Hücreler -90 milivolta voltaj kenetlendi. Kafein uygulamasından sonra başlayan içe doğru akımlar esnasında NMDG (A) ve NMDG + niflumik asit (B) uygulandı ve akımların bloklandığı gözlemlendi. NMDG ve niflumik asit şekilde belirtilen süre boyunca hücre dışına uygulandı. Şekilde her protokole ait birer örnek hücreden elde edilen kayıtlar gösterilmiştir. Şekil B'de kafein uygulaması gösterilen kısımdan önce yapılmıştır.

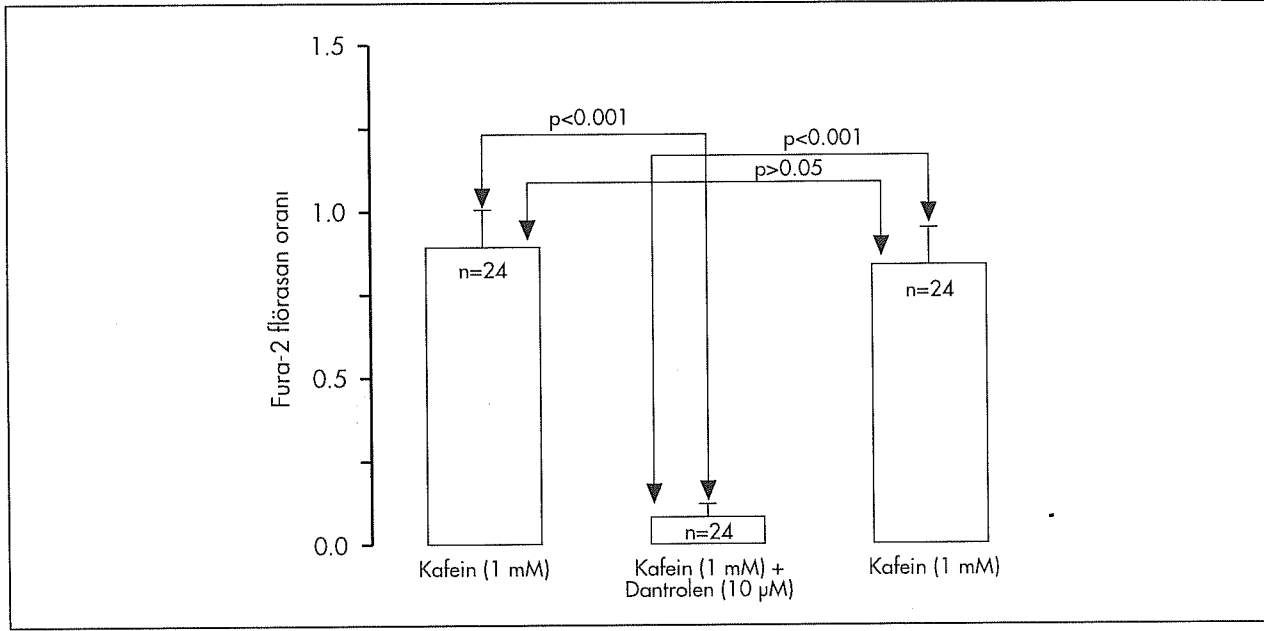
İlave olarak kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının kalsiyum duyarlılığı fotosensitif kalsiyum şelatörü "diaz-2" ve onun kontrolü olan diazo-3 kullanılarak belirlendi. Patch pipeti içerisinde diazo-2 ve diazo-3 yüklenen hücrelere ekstrasellüler kafein uygulaması sırasında  $-0.77 \pm 0.25$  nA (n=3) ve  $-1.47 \pm 0.34$  nA (n=4) amplitüdünde içe yönelik akımları aktive etti. 200 volt şiddetindeki flaşla bu ışığa duyarlı bileşiklerin fotosaliverilmesi gerçekleştirildiğinde diazo-2 akımı tamamen inhibe ederken (n=3,  $p < 0.001$ , veri gösterilmedi) diazo-3 hiçbir etki etmedi.

Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının farmakolojisi:

Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının farmakolojisi incelenerek bu ajanın da ryanodin ile aynı hücre içi deposunu etkileyip etkilemediği araştırıldı. Patch pipeti içerisinde hücre içine uygulanan ryanodin (10 µM) bu hücrelere ekstrasellüler uygulanan kafeininin (1 mM) membran akımı aktive etmesini önledi (n=5, Şekil 5A). Ayrıca hücre içi kalsiyum deposu saliverilme kanal blokörü dantrolen-sodyum (10 (M); hücre içine uygulandığında kafeine (1 mM) cevabı önledi (n=3, Şekil 5B).

#### TARTIŞMA VE SONUÇ

Kafein, hücre içi depolardan  $Ca^{2+}$  salive-

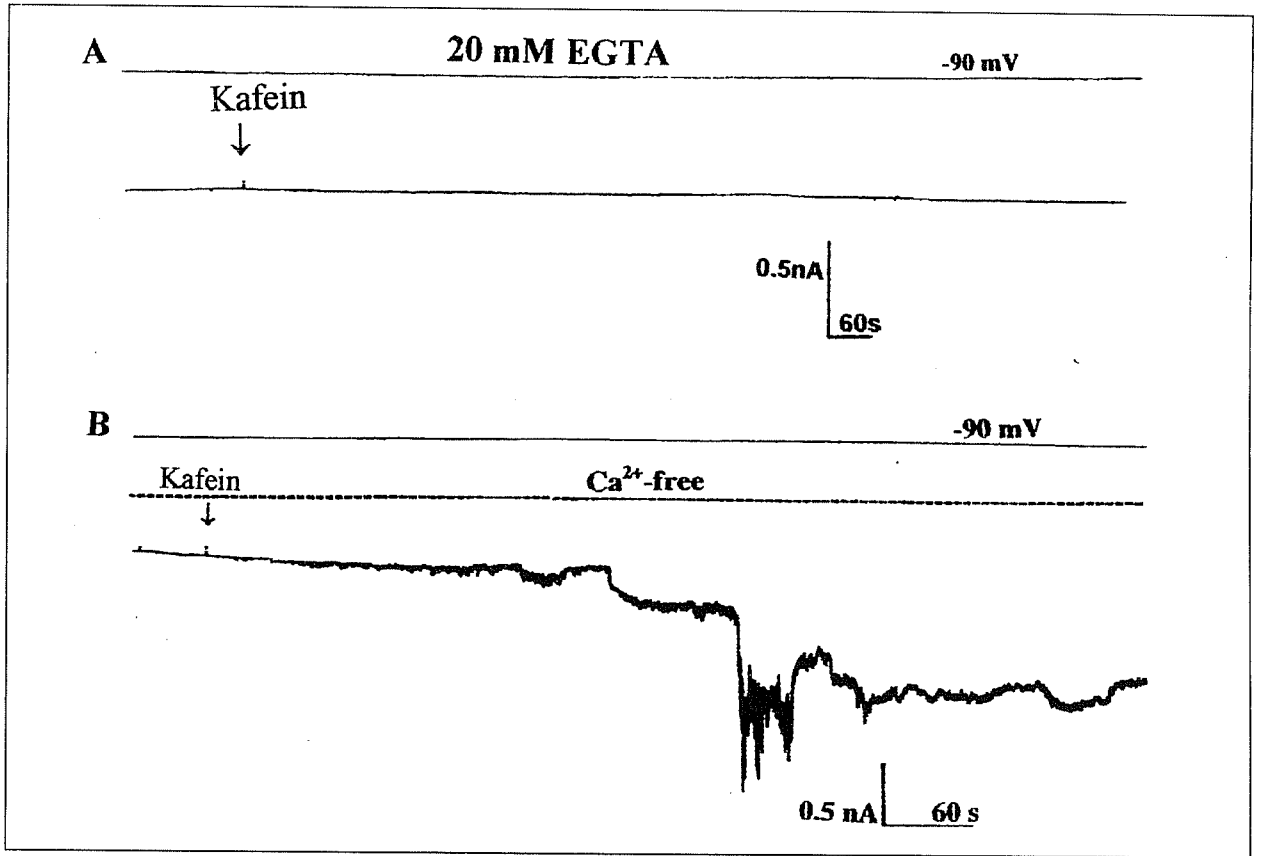


Şekil 3. Kafein uygulamasının hücre içi serbest kalsiyum düzeyini belirten fura-2 flöresan oranına kontrol koşullarında ve dantrolen varlığında etkileri. Toplam 24 hücreden elde edilen kalsiyum görüntüleme deney verilerinin ortalamaları gösterildi. Solda ilk kafein uygulamasına ait veriler, ortada kafein + dantrolen uygulaması, sağda ise aynı hücrelere kafein+ dantrolen uygulamasını takiben ikinci kafein uygulamasına ait veriler görülmektedir.

rilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan ve ryanodin reseptörü/ $\text{Ca}^{2+}$ -salıverilme kanalını aktive eden önemli bir farmakolojik ajandır (7.15.16). Kafeinin hücre içi kalsiyum deposu kalsiyum salıverilme kanallarının kalsiyuma duyarlılığını artırdığı ve kafein etkisinden sonra istirahat durumundaki hücre içi serbest  $\text{Ca}^{2+}$  düzeylerinin bile kalsiyum-tetiklemeli kalsiyum salıverilmesi mekanizmaları ile  $\text{Ca}^{2+}$  salıverilmesine yol açabildiği bilinmektedir<sup>(16)</sup>.

Bu çalışmada, kalsiyum görüntüleme tekniği ile kafeinin hücre içi kalsiyum düzeyini artırdığı fakat bu etkinin dantrolen uygulaması ile önlenmesi bulgusu kafeinin hücre içi depolardan kalsiyum salıverici etkisini doğrudan ortaya koymasının yanında elektrofizyolojik bulgularla tam paralellik göstererek bu bulguların güvenilirliklerini artırmaktadır. Kalsiyum görüntüle-

me deneylerinde hücrelere kafein uygulamasından önce KCl (30 mM) uygulayarak hücre içi kalsiyum depoların yeniden dolması sağlandığından dantrolen uygulamasından sonra kafeine yanıt elde edilmemesi önceki kafein uygulamasına bağlı olarak hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  depolarının boşalması sonucu değil, bu ajanın hücre içi kalsiyum depolarını bloklemesine bağlı olarak ortaya çıktığını göstermektedir. İlave olarak, kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının hücre içi kalsiyum bağlama kapasitesi artırıldığında gözlenmemesi fakat ekstrasellüler kalsiyumsuz solüsyon kullanıldığında gözlenebilmesi kafeinin bu akımları hücre içi depolardan kalsiyum salıverilmesine yol açarak aktive ettiğini ortaya koymaktadır. Hücre içine foto-salıverilen diazo-2 ile bloklanabilme bulgusu da bu akımların  $\text{Ca}^{2+}$  bağımlı olarak ortaya çıktığına ilave kanıt teşkil etmektedir.



Şekil 4. Kafeinin aktive ettiği membran akımlarının kalsiyum bağımlılığı.

Hücreler -90 milivolta voltaj kenetlendi. Hücre içine patch pipeti içerisinde 20 mM EGTA uygulandı, tüm hücre diyaliz kayıt formunun gerçekleştirilmesinden sonra EGTA'nın hücre içerisine difüzyonu için 5 dakika beklendi, ardından yapılan kafein uygulaması membran akımı aktive edemedi (A) fakat ekstrasellüler kalsiyumsuz kayıt solüsyonu kullanıldığında kafein içe doğru membran akımları aktive etti (B). Şekilde 2 ayrı hücreden elde edilen kayıtlar gösterilmiştir.

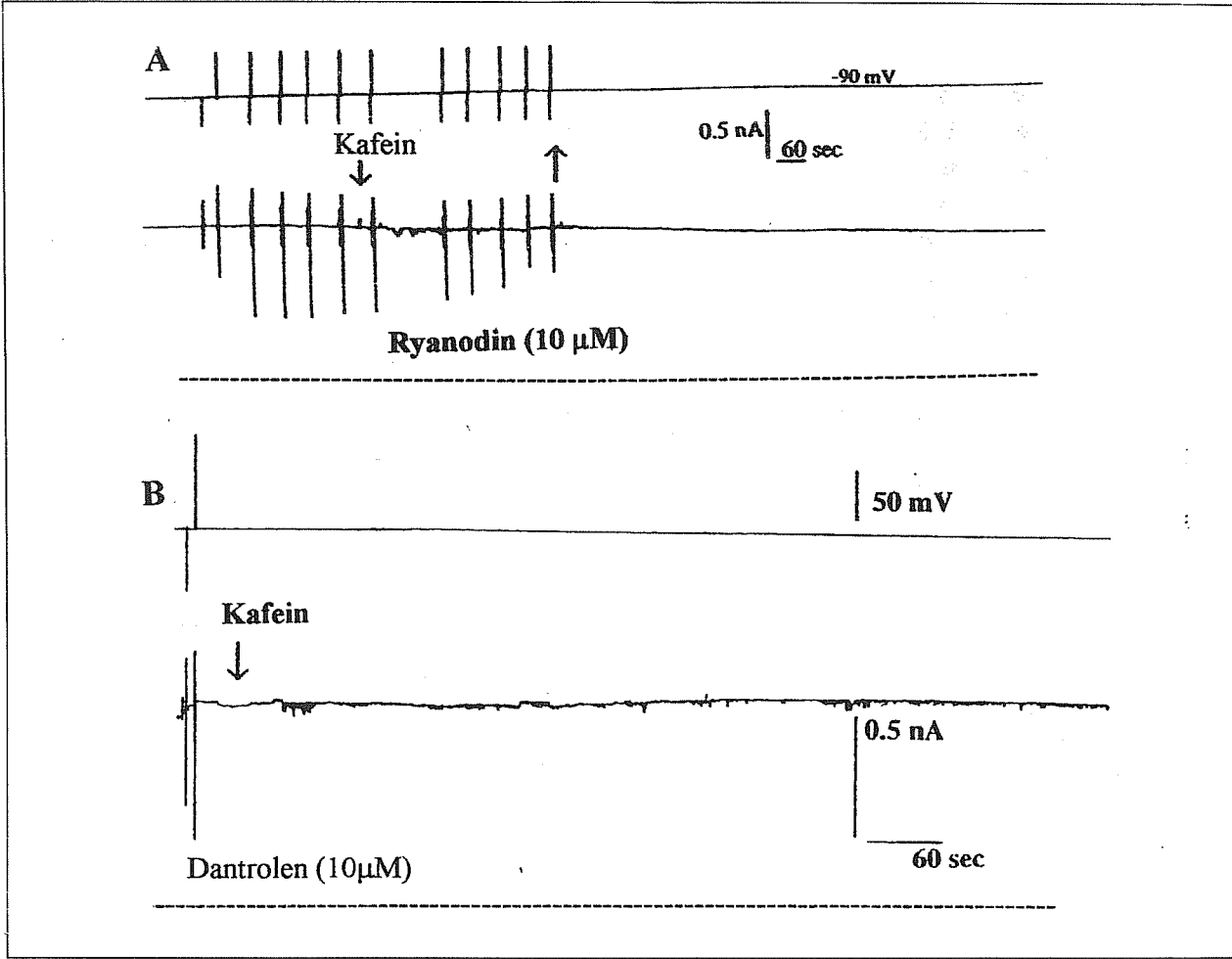
Diazo-2, kalsiyum şelatörü olan BAPTA'ya ışığa duyarlı bir halka eklenerek elde edilen ve bu halka uygun bir ışıkla kırılmadıkça biyolojik olarak etkisiz olan bir bileşiktir. Diazo-3 ise kimyasal yapı olarak BAPTA'ya benzer fakat ışığa maruz kaldıktan sonra diazo-2 ile aynı yan ürünü serbest bırakmasına rağmen kalsiyum bağlama kapasitesi olmayan ve bu özelliği ile diazo-2 deneyleri için kontrol modeli oluşturan bir bileşiktir.

Kafeinin indüklediği bu akımların bitkisel alkaloit ryanodin ve anti malini hipertermik

ilaç dantrolenle bloklanması bu görüşü destekleyen farmakolojik bulgulardır. Ryanodinin hücre içi Ca<sup>2+</sup> depolarını düşük iletkenlik durumunda kilitleyerek kalsiyum tükenişine yol açtığı ve böylece agonistlerle Ca<sup>2+</sup> salıverilmesini blokladığı bilinmektedir<sup>(17)</sup>.

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> artışı sonucu aktive olan bu içe yönelik membran akımlarını taşıyan iyon kanallarının ise farmakolojik ve biyofiziksel yaklaşımlar sonucu I<sub>Cl(Ca)</sub> ve I<sub>NSR(Ca)</sub> kanalları olduğu anlaşılmaktadır. NMDG uygulamaları sonucu elde edilen bloğun bu akımların





Şekil 5. İntrasellüler uygulanan ryanodin (A) ve dantrolenin (B) kafeinin membran akımı aktive etmesini önledi. Tüm hücre diyaliz formunun gerçekleştirilmesinden sonra ryanodin (A) ve dantrolenin (B) patch pipetinden hücreye perfüzyonu için 5 dakika beklendi ve ardından kafein uygulaması yapıldı. Hücreler -90 milivolta voltaj kenetlendi. Akım ve voltaj traselerinde görülen defleksiyonlar aktive edilen voltaj bağımlı kalsiyum akımlarını göstermektedir. (↓) kafein uygulamaya başlama noktası, (↑) kafein uygulamasının sonlandığı nokta.

büyük oranda  $I_{NSK(Ca)}$  kanalları ile ve spesifik klor kanalı blokörü niflumik asit + NMDG kombinasyonunun daha güçlü bir inhibisyona yol açması bu akımlardan kısmen de olsa  $I_{Cl(Ca)}$  kanallarının da sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır. Kafein etkisiyle  $Ca^{2+}$  saliverilmesine bağlı olarak non-selektif katyon kanallarının aktive olması ve bu kanalların aktivasyonunun baskın olarak içe

yönelik membran akımlarını aktive etmesi bulgusu sıçan DKG hücrelerinde ilk defa bu çalışmayla ortaya konmuş ve kafein etkisiyle kalsiyum saliverilmesinin non-selektif katyon kanallarının aktivasyonuna bağlı hücresel fizyolojik olaylarda da rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Deneylerin gerçekleştirildiği kayıt koşullarında sodyum ve potasyum kanalları farmakolojik olarak bloklandığın-

dan bu kanalların rol alma olasılığı yoktur (bkz. ekstrasellüler kayıt ce hücre içi patch pipet solüsyonları).

Sonuç olarak, kafeinin sıçan DKG hücrelerinde ryanodin ve dantrolene de duyarlı olan hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesine yol açtığı elektrofizyolojik ve direkt kalsiyum görüntüleme tekniği ile uyumlu bir şekilde ortaya konmuştur.

#### TEŞEKKÜR

Çalışmaya danışmanlık yapan, Londra Üniversitesi, St Georg Hastanesi, Fizyoloji Anabilim Dalı ve Aberdeen Üniversitesi, Tıbbi Bilimler Enstitüsü, Biyomedikal Bilimler Anabilim Dalı'nda laboratuvar imkanlarını ve her türlü yardımlarını esirgemeyen (doktora çalışmalarının bir kısmını içeren bu Türkçe makaleye ortak yazar olmak istemeyen) Dr Roderick H Scott'a teşekkürlerimi sunarım.

Geliş tarihi : 13.11.2000

Yayına kabul tarihi : 09.04.2001

Yazışma adresi:

Dr. Ahmet AYAR

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Farmakoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

#### KAYNAKLAR

1. Miller RJ. The control of neuronal  $Ca^{2+}$  homeostasis. *Prog Neurobiol* 1991; 37: 255- 285.
2. Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T. Receptor-activated  $Ca^{2+}$ -influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Neurosci*. 1994; 15: 77-83.
3. Hess P. Calcium channels in vertebrate cells. *Annual. Rev. Neurosci*. 1990; 13: 337-356.
4. Kostyuk P and Verkhatsky A. Calcium stores in neuronal cells. *Neuroscience* 1994; 63: 381-404.
5. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-325.
6. McPherson PS and Campbell KP. The ryanodine receptor/ $Ca^{2+}$ release channel. *The Journal of Biol.*

*Chem*. 1993; 268:13765-13768.

7. Erlich BE, Kaftan E, Bezprozvanny S, et al. The pharmacology of intracellular  $Ca^{2+}$  release channels. *Trends Pharmacol. Sci*. 1994; 15: 145-149.
8. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem*. 1987; 56: 395-433.
9. Ayar A and Scott RH. 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*. 1999; 359: 81-91.
10. Thayer SA, Hirning LD, Miller RJ. The role of caffeine-sensitive calcium stores in the regulation of intracellular free calcium in rat sympathetic neurones in vitro. *Mol. Pharmacol*. 1988; 34: 664-673.
11. Ivanenko A, Baring MD, Airey JA, et al. A caffeine- and ryanodine sensitive  $Ca^{2+}$  store in avian sensory neurones. *Journal of Neurophysiol*. 1993; 70: 710-722.
12. Currie KPM and Scott RH. Calcium-activated currents in cultured neurones from rat dorsal root ganglia. *Br. J. Pharmacol*. 1992; 106: 593-602.
13. Kuba K. Release of calcium ions linked to activation of potassium conductance in a caffeine-terated sympathetic neurone. *J. Physiol*. 1980; 298: 251-269.
14. Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflugers Archiv*. 1981; 391: 85-100.
15. Shmigol A, Svichar N, Kostyuk P, et al. Gradual caffeine induced  $Ca^{2+}$  release in mice DRG neurones is controlled by cytoplasmic and intraluminal  $Ca^{2+}$ . *Neuroscience* 1995; 73: 1109-1118.
16. Usachev Y, Shmigol A, Pronchuk N, et al. Caffeine-induced  $Ca^{2+}$  release from internal stores in rat sensory neurones. *Neuroscience* 1993; 57: 845-859.
17. Meisner G. Ryanodine receptor/ $Ca^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol*. 1994; 56: 485-508.