



# Endojen ve Eksojen Adenozin Tri-Fosfat'ın Eritrosit Deformabilitesine Etkisi

## Effect of Endogenous and Exogenous Adenosine-Three Phosphate on Erythrocyte Deformability

Pınar ÜLKER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Yazışma Adresi

Correspondence Address

**Pınar ÜLKER**

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı,  
Antalya, Türkiye

E-posta: ulkerpinar@akdeniz.edu.tr

### ÖZ

**Amaç:** Eritrosit deformabilitesi eritrositlerin dolaşım sisteminde karşılaştıkları kuvvetlerin etkisi altında şekil değiştirebilme yeteneğidir. Bu parametre deneysel ve klinik hemoreoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılarak eritrositlerin mekanik özellikleri değerlendirilmektedir. Eritrositler plazma içinde endojen ve eksojen adenozin tri-fosfat (ATP)'ye sürekli maruz kalmaktadır. Eksojen ATP'nin eritrositlerde hücre içi iyon dengesinde ve hücre hacminde değişmeye neden olduğu daha önce gösterilmiştir. Oysa hücre geometrisinden büyük oranda etkilenen eritrosit deformabilitesinin ATP'den etkilenip etkilenmediği bilinmemektedir. Çalışmanın amacı eritrosit deformabilitesinin endojen ve eksojen ATP'ye yanıtlarının incelenmesidir.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada gönüllü erkeklerden alınan venöz kan örnekleri kullanılmıştır. Kan örneklerinden eritrosit izolasyonu yapıldıktan sonra otolog plazma içinde hematokrit %40 olarak ayarlanmıştır. Eksojen ATP çalışmalarında purinerjik reseptör inhibitörü varlığında ve yokluğunda eritrosit süspansiyonlarına 100, 300 ve 500 µM ATP eklenmiş ve yarım saat inkübasyonun ardından deformabilite ölçümleri yapılmıştır. Endojen ATP çalışmalarında ATP kanal inhibitörü varlığında ve yokluğunda eritrositlere mekanik stres uygulanmış ve mekanik stresin hemen ardından eritrosit deformabilitesi ölçülmüştür.

**Bulgular:** 300 ve 500 µM ATP eritrosit deformabilitesinde düşmeye neden olurken bu düşüş purinerjik reseptör inhibitörü varlığında ortadan kalkmıştır. Öte yandan mekanik stres eritrositlerden ATP salınımını uyarmış ve bu salınım ATP kanal inhibitörü ile ortadan kalkmıştır. Bu koşullar altında endojen ATP eritrosit deformabilitesinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

**Sonuç:** Çalışmanın sonuçları eksojen ATP'nin hücre membranında bulunan purinerjik reseptörler aracılığı ile eritrosit deformabilitesinde azalmaya neden olduğunu ilk defa göstermiştir. Öte yandan dolaşım sisteminde gözlenen mekanik stres düzeylerinde eritrositlerden salınan endojen ATP'nin eritrosit deformabilitesini etkilemediği gösterilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Eritrosit, Deformabilite, ATP, Mekanik stres

### ABSTRACT

**Objective:** Erythrocytes respond to forces by extensive changes in their shape, with the degree of deformation under a given force known as erythrocyte deformability. Erythrocytes are consistently exposed to endogenous and exogenous ATP in the plasma. Studies have shown that exogenous adenosine-three phosphate (ATP) causes the intracellular ionic balance to change and reduces the cell volume. Although it is well known that cell volume is one of the regulators of erythrocyte deformability, there is no study on the effect of ATP on erythrocyte deformability. The aim of this study was to investigate the effects of endogenous and exogenous ATP on erythrocyte deformability.

**Material and Methods:** Erythrocytes isolated from volunteers were used in this study. After erythrocyte isolation, the hematocrit of erythrocyte suspensions was set to 40%. The effect of 100, 300 and 500 µM ATP on erythrocyte deformability was evaluated in the presence or absence of purinergic receptor antagonist. The effect of endogenous ATP on erythrocyte deformability was evaluated after mechanical stress application in the presence or absence of ATP channel inhibitor.

DOI: 10.17954/amj.2017.67

**Results:** 300 and 500  $\mu$ M ATP caused a decrease in erythrocyte deformability while purinergic receptor antagonist ameliorated this effect. Moreover, mechanical stress application resulted in increased ATP release from erythrocytes. This increase was shown to be abolished in the presence of an ATP channel blocker. Endogenous ATP exerted no effect on erythrocyte deformability.

**Conclusion:** The results of this study demonstrated that exogenous ATP decreases erythrocyte deformability through purinergic receptors. Moreover, endogenous ATP released under mechanical stress conditions had no effect on red blood cell deformability.

**Key Words:** Erythrocyte, Deformability, ATP, Mechanical stress

## GİRİŞ ve AMAÇ

Eritrositler taşıdıkları oksijeni dokulara ulaştırabilmek için kendi boyutlarından daha küçük çapa sahip damarlardan geçmek zorundadır. Bu durum eritrositlerin şeklini tersinir olarak değiştirebilme yani deformabilite yeteneği ile mümkündür (1-3). Eritrosit deformabilitesi eritrositin geometrik şekli, sitoplazmik viskozitesi ve eritrosit membranının mekanik özellikleri tarafından belirlenmektedir (1,4-6). Eritrositlerin hidrodinamik kuvvetlerin etkisindeki şekil değiştirmeleri geri dönüşümlüdür. Şekil değişimine neden olan etkinin ortadan kalkması ile hücre diskoid şekline geri dönmektedir (4,7,8).

ATP, hücrenin primer enerji kaynağı olmasının yanı sıra önemli bir nörotransmitter ve ekstraselüler sinyal molekülüdür (9-12). Ekstraselüler ATP damar düz kas tonüsünün düzenlenmesi, immün ve inflamatuvar yanıtların oluşturulması ve endokrin ve eksokrin sekresyon (13-18) gibi pekçok fizyolojik ve patolojik süreçte etkin bir rol oynamaktadır (19-23). ATP hücresel etkilerini hücre membranında yerleşmiş purinerjik reseptörler üzerinden göstermektedir. Bu reseptörlerin iyonotropik P2X ve metabotropik P2Y olmak üzere 2 adet subtipi bulunmaktadır (24). Hücre tipine göre ATP etkilerine aracılık eden purinerjik reseptör subtipleri değişiklik göstermekle birlikte bugüne kadar insan eritrositlerinde purinerjik reseptörler arasında P2X1, P2X4, P2X7 ve P2Y13'in varlığı gösterilmiştir (25).

Eritrositlerde glikolitik mekanizmalarla üretilen milimolar düzeylerde ATP bulunmaktadır. Bu ATP'nin bir kısmı eritrositlerin dolaşım sisteminin üzerinden geçerken karşılaştıkları hipoksi ve mekanik stres etkisiyle hücre dışına salınmaktadır (26-30). Bu nedenle eritrositler plazma içinde hem kendilerinden salınan (endojen) hem de vasküler sistemin diğer hücreleri tarafından salınan (eksojen) ATP'ye sürekli maruz kalmaktadır. ATP ile inkübe edilen eritrositlerde membranın divalen katyonlara geçirgenliğini artırdığı ve hücre içine sodyum ve kalsiyum girişi olurken hücreden potasyum çıkışı gerçekleştiği bildirilmiştir (31-34). Hücre içi iyonik dengede gözlenen bu değişime hücre hacminde azalmanın da eşlik ettiği gösterilmiştir (35). Oysa ATP'nin eritrosit geometrisinde neden olduğu bu değişimlerin eritrosit deformabilitesini etkileyip etkilemediği bugüne kadar hiç çalışılmamıştır. Bu çalışmanın amacı eritrosit

süspansiyonlarına dışarıdan eklenecek eksojen ve mekanik stres uygulamasıyla hücreden çıkışı uyarılacak olan endojen ATP'nin eritrosit deformabilitesine etkilerini incelemektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Kan Örneklerinin Toplanması ve Eritrosit Süspansiyonlarının Hazırlanması

Bu çalışmada yer alan araştırma protokolleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (07.08.2014.281). Çalışmada erişkin, gönüllü erkeklerden alınan venöz kan örnekleri kullanılmıştır. Kan örnekleri antikoagülan olarak ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 1.5 mg/ml) içeren vakumlu tüplere, dirsek önu venlerinden alınmıştır. İşlem sırasında turnike sadece venin yerini tespit için kullanılmış, kanın enjektöre doldurulmasından önce mutlaka gevşetilmiştir. Örnekler kan alımını takiben hemen değerlendirilmiş ve her örnek üzerindeki çalışmalar kan alımını izleyen dört saat içinde tamamlanmıştır.

Kan örneklerindeki lökositler polysucrose (6.0 g/dl) ve sodium diatrizoate (16.7 g/dl) içeren dansite gradiyenti (Histopaque 1119; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Buna göre, 20 ml kan örneği, 50 ml plastik tüp içine konulmuş olan 20 ml dansite gradiyenti üzerine tabakalandırılmış, 700 g'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra dipteki eritrosit kitlesinin üzerinde kalan bölüm aspire edilip atılmıştır. Aspirasyonun ardından dipte çökmüş halde bulunan eritrosit paketi 1 defa Krebs solüsyonunda (NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 mM, MgSO<sub>4</sub> 17H<sub>2</sub>O 1.17 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM ve glukoz 11.2 mM) yıkanmış ve ardından plazmaları içinde resuspanse edilerek hematokriti % 04'e ayarlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında eksojen ATP'nin eritrosit deformabilitesine etkisi araştırılmıştır. Bunun için kan örnekleri 100, 300 veya 500  $\mu$ M ATP ile non-spesifik purinerjik reseptör antagonisti suramin (100  $\mu$ M) varlığında ve yokluğunda 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında endojen ATP'nin eritrosit deformabilitesine etkisi çalışılmıştır. Bunun için ATP kanal blokörü Carbenoxolone varlığında ve yokluğunda eritrositler aşağıda belirtilen şekilde mekanik kuvvetlere maruz bırakılmış ve hemen ardından eritrosit deformabilitesi ölçülmüştür.

## Mekanik Stres Uygulaması

Yukarıda bahsedilen şekilde hazırlanmış olan eritrosit süspansiyonları özel olarak tasarlanmış bir akım sisteminde 20 dakika boyunca 3 Pa büyüklüğünde mekanik kuvvetlere maruz bırakılmıştır. Bu akım sistemi, iç çapı 0.12 cm ve uzunluğu 33 cm olan cam kapiller bir borudan ve senkronize çalışan bir çift enjektör pompasından (Model NE1000, dual pump system; New Era Pump Systems Inc., Wantagh, NY, USA) oluşmaktadır. Birbirine zıt yönde çalışan pompalar, enjektörlerden birinin kapiller boruyu besleyecek şekilde itilmesini; diğerinin ise otomatik olarak doldurulmasını sağlayarak kapiller boru içinde sürekli akım oluşturmaktadır. Eritrositlerin kapiller borudan geçerken karşılaşacakları mekanik kuvvetlerin büyüklüğü aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\delta = \frac{4.Q.\eta}{\pi.r^3}$$

Bu formülde  $\delta$ , duvar kayma kuvveti (2 Paskal);  $r$ , cam kapiller borunun yarıçapı;  $\eta$ , eritrosit süspansiyonlarının viskozitesi ve  $Q$  ise süspansiyonun akım hızını ifade etmektedir. Akım hızı, duvar kayma kuvveti 2 Paskal olacak şekilde hesaplanarak uygulanmıştır.

## ATP Ölçümü

Panneksin inhibitörü carbenoxolone (Carbenoxolone; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, 100  $\mu$ M/L) ile muamele edilen ve edilmeyen eritrosit süspansiyonlarında mekanik stres uygulamasının hemen ardından lusiferin-lusiferaz tekniği kullanılarak eritrositlerden salınan ATP ölçülmüştür. Bunun için eritrosit süspansiyonlarından elde edilen süperenatanlardan alınan 200  $\mu$ l örnek ATP ölçüm kiti kullanılarak luminometrik olarak ölçülmüştür. Bu ölçüm yönteminde ATP ile D-lusiferin reaksiyonu sonucu oluşan fotonlar bir luminometre ile ve 565 nm dalga boyunda (model TD-20/20; Turner Designs, Sunnyvale, CA) ölçülmüştür. Ölçümde elde edilen emisyon dalgası aynı gün hazırlanan olan ATP standart eğrisi ile kıyaslanarak ATP konsantrasyonları elde edilmiştir. Süspansiyon ortamında ölçülen ATP'nin hücrelerin parçalanması sonucu açığa hücre içeriğinin açığa çıkmasından kaynaklanıp kaynaklanmadığı deney günü Drapkin yöntemi ile süspansiyon ortamındaki hemoglobinin ölçümü yapılarak doğrulanmıştır.

## Eritrosit Deformabilitesi

Eritrosit deformabilitesi bir ektasitometre (LORRCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirilmiştir. Eritrositler, izotonik fosfat tamponu (PDF) ile konsantrasyonu %5, viskozitesi ise 24cp olacak şekilde

hazırlanmış PVP-360 (polivinylpyrolidone, Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisi içinde yaklaşık 1/200 dilüsyonda süspansiyon haline getirilmiştir. Bu süspansiyonun yaklaşık 1 ml'si aralarında 0.3 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan 2 cam silindirden oluşan bir viskometri sistemine yerleştirilmiştir. İki cam silindirin arasındaki boşluğa doldurulan süspansiyon dışındaki cam silindirin sistemi kontrol eden bilgisayar tarafından uygun kayma kuvvetlerini oluşturmak üzere hesaplanan bir hızla döndürülmesiyle bu kuvvetlerin etkisi altında bırakılmıştır. Belirlenen aralıktaki kayma kuvvetlerini oluşturacak dönme hızları bilgisayar tarafından izotonik fosfat tamponu-PVP çözeltisinin viskozitesi de dikkate alınarak hesaplanmıştır. Bu sırada sabit silindirin içinde yer alan bir lazer kaynağından çıkan bir ışın eritrosit süspansiyonuna ulaşmakta ve sonra bir ekran üzerine yansıyan difraksiyon paterni süspansiyondaki eritrositlerin şeklini ve dönme hareketlerinin yarattığı akıma orientasyonlarını yansıtmaktadır. Artan kayma kuvvetlerine paralel olarak, dairesel bir formdan elipsoid forma dönüşümün derecesi ile eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilitesi) arasında doğru orantı vardır. Elipsoid difraksiyon paterninin uzun (a) ve kısa eksenlerinin (b) uzunluklarının bilgisayar tarafından saptanmasıyla  $EI=A-B/A+B$  şeklinde bir elongasyon indeksi (EI) hesaplanmıştır. Ölçümler 37°C'de yapıldı. EI değerleri 9 kayma stresi arasında (0.3-30Pa) ölçülmüştür. Bu değerler kullanılarak her örnek için maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti (SS1/2) LineaWeaver-Burke analizi uygulanarak hesaplanmıştır.

## 3.6. İstatistiksel Analiz

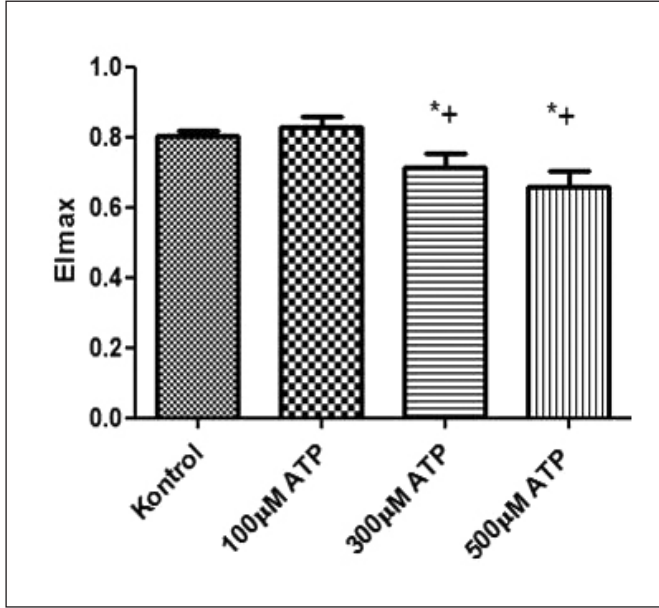
İstatistiksel analizde GraphPad Prism (3.cü sürüm) kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirilirken student t-testi kullanılmıştır, fark var ise grupların post-hoc karşılaştırması Man-Whitney testi ile gerçekleştirilmiştir.

## SONUÇLAR

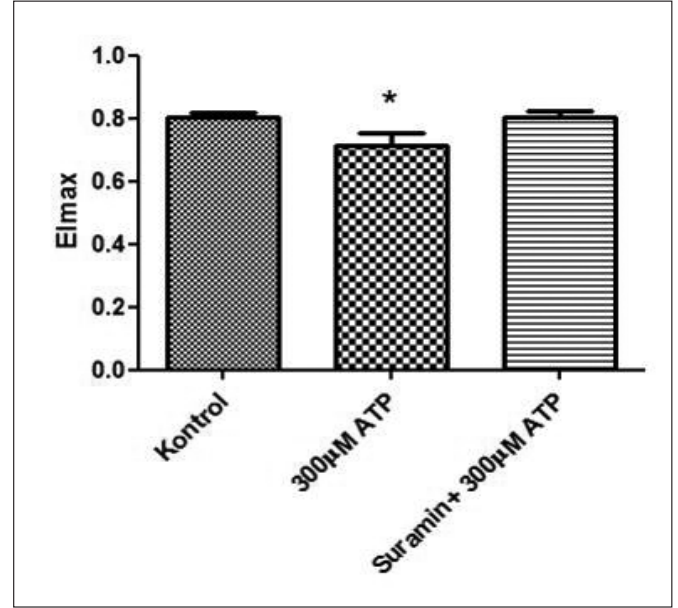
30 dakika boyunca 300 ve 500  $\mu$ M ATP ile inkübe edilen eritrositlerin deformabilite yeteneklerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşmüştür. Buna karşın 100  $\mu$ M ATP'nin eritrosit deformabilitesine önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 1). 300 ve 500  $\mu$ M ATP'ye cevaben meydana gelen deformabilite düşüşü non-spesifik purinerjik reseptör antagonisti Suramin varlığında ortadan kalkmıştır (Şekil 2,3). Öte yandan hem 1 hem de 3 Paskal düzeyinde uygulanan mekanik stres hücrelerden ATP çıkışını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır (Şekil 4). ATP kanal blokörü Carbenoxolone ise 3 paskal düzeyinde mekanik strese cevaben eritrositlerden ATP çıkışını önlemiştir (Şekil 5). Bununla birlikte 3 Paskal düzeyinde uygulanan mekanik kuvvetlere cevaben eritrositlerden salınımı uyarılan endojen ATP eritrosit deformabilitesinde herhangi bir değişime neden olmamıştır (Şekil 6).

## TARTIŞMA

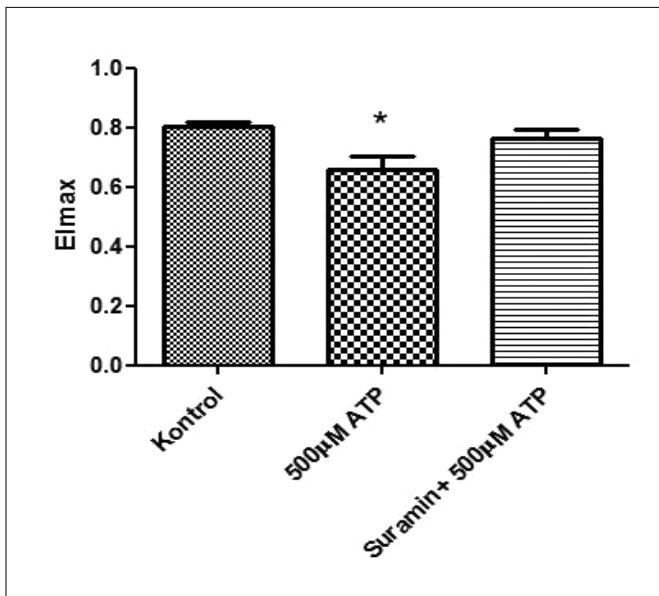
Bu çalışmanın bulguları eksojen ATP'nin eritrositlerin şekil değiştirme yeteneğinde önemli düzeyde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu azalma non-spesifik purinerjik reseptör antagonisti olan suramin ile geri çevrilebilmektedir. Bununla birlikte eritrosit deformabilitesinin eksojen ATP'ye verdiği yanıt uygulanan kayma kuvvetinin büyüklüğüne bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Öte yandan mekanik stresle hücreden çıkışı uyarılan endojen ATP'nin eritrosit deformabilitesini etkilemediği gösterilmiştir.



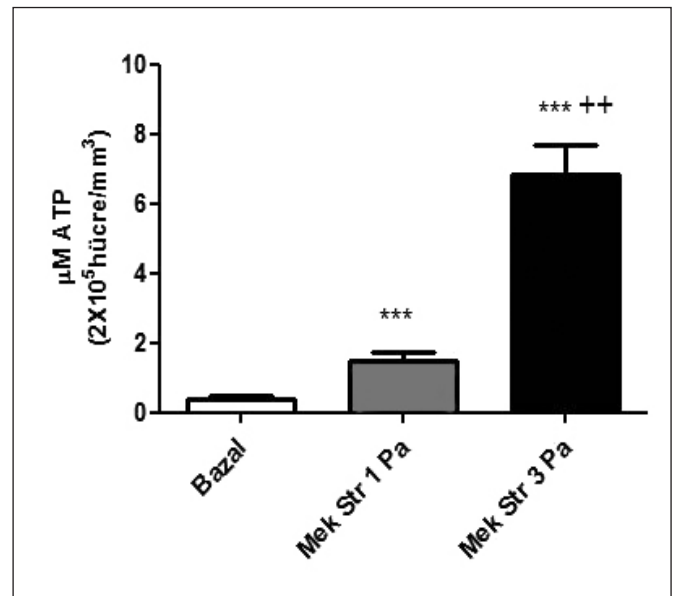
**Şekil 1:** Farklı dozlarda ATP'ye cevaben EI değişimleri. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \*  $P < 0.05$ , Kontrolden fark; +  $P < 0.05$ , 100µM ATP'den fark (n=14)



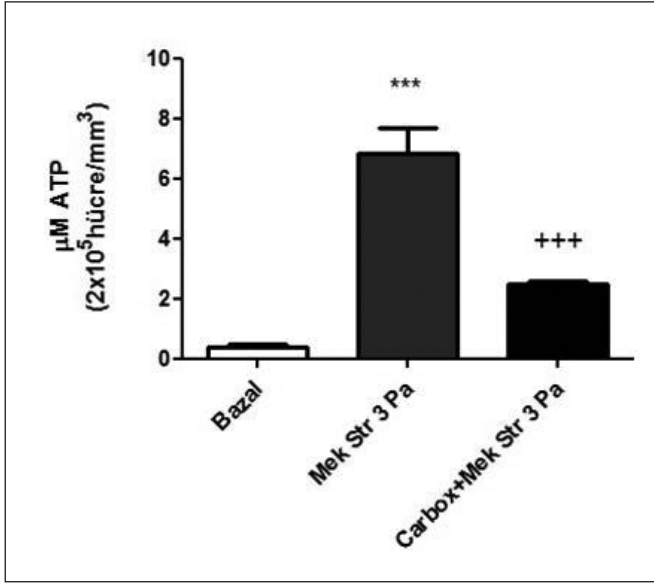
**Şekil 2:** Purinerjik reseptör inhibisyonunun ATP aracılı EI değişimlerine etkisi \*  $P < 0.05$ , Kontrolden fark; (n=14).



**Şekil 3:** Purinerjik reseptör inhibisyonunun ATP aracılı EI değişimlerine etkisi \*  $P < 0.05$ , Kontrolden fark; (n=14).



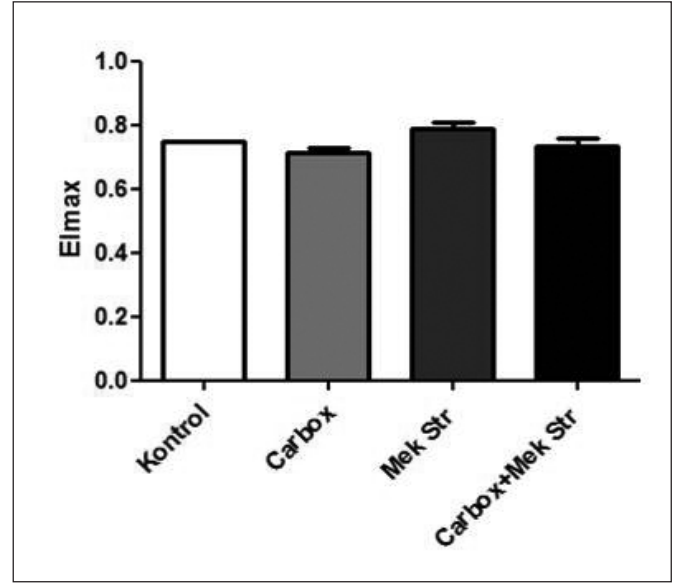
**Şekil 4:** Mekanik Stresin eritrositlerden ATP salınımına etkisi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \*\*\*  $P < 0.001$ , Bazaldan fark; ++  $P < 0.01$ , Mek str1 paskaldan fark (n=9).



**Şekil 5:** ATP kanal inhibisyonunun mekanik strese cevaben eritrositlerden ATP salınımına etkisi. \*\*\* P<0.001, Bazalden fark; +++ P<0.001, Mek str 3 paskaldan fark (n=9).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda insan eritrositlerinde başlıca P2X1, P2X4, P2X7 ve P2Y13'in bulunduğu gösterilmiştir (25). Bu çalışmada hem 300 hem de 500 µM eksojen ATP'ye cevaben eritrosit deformabilitesinde gözlenen düşüş, bir non-spesifik purinerjik reseptör antagonisti olan Suramin ile ortadan kalkmıştır. Bu sonuçlar eksojen ATP'nin eritrosit membranında bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak bu etkiyi gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Eritrositler hücre içi ATP konsantrasyonu en yüksek hücrelerden biridir. Endojen ATP'nin eritrositlerin belirli hidrodinamik kuvvetlerin etkisi altında şekil değiştirmesinde özellikle hücre iskeleti bileşenlerinden spektrin proteini üzerinden rol aldığı gösterilmiştir (36). Bunun yanında hücre içinde bulunan ATP'nin bir kısmı dolaşım sisteminden geçerken karşılaştıkları hipoksi ve mekanik stres etkisiyle hücre dışına salınmaktadır (26-30). Bugüne kadar mekanik kuvvetlerin etkisiyle eritrositlerden salınan endojen ATP'nin eritrosit deformabilitesine otokrin/parakrin olarak bir etkisinin olup olmadığı çalışılmamıştır. Bu çalışmada, 3



**Şekil 6:** Eritrositlerden ATP çıkışının engellendiği ve engellenmediği koşullarda 3 paskal mekanik strese cevaben eritrositlerden salınan endojen ATP'nin eritrosit deformabilitesine etkisi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.(n=9).

Paskal düzeyinde eritrositlere uygulanan mekanik stresin hücrelerden ATP çıkışını uyardığı, süspansiyon ortamında ATP seviyelerinin ölçülmesiyle gösterilmiştir. ATP kanal blokörü Carbenoxolone ise mekanik strese cevaben eritrositlerden ATP çıkışını önlemiştir. Öte yandan 3 Paskal düzeyinde uygulanan mekanik kuvvetlere cevaben eritrositlerden salınımı uyarılan endojen ATP eritrosit deformabilitesinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Bu sonuçlar 3 Paskal düzeyindeki mekanik kuvvetlerin altında eritrositlerden salınan ATP düzeyinin otokrin/parakrin etki ile eritrosit deformabilitesini etkilemeye yeterli olmadığını göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçları eksojen ATP'nin hücre membranında bulunan purinerjik reseptörler aracılığı ile eritrosit deformabilitesinde azalmaya neden olduğunu ilk defa göstermiştir. Öte yandan dolaşım sisteminde gözlenen mekanik stres düzeylerinde eritrositlerden salınan endojen ATP'nin eritrosit deformabilitesini etkilemediği gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol* 1987; 49: 177-92.
2. Shiga T, Maeda N, Kon K. Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990; 10(1): 9-48.
3. Gordon RJ, Ravin MB. Rheology and anesthesiology. *Anesth Analg* 1978; 57(2): 252-61.

4. Mohandas N, Chasis JA, Shohet SB. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin Hematol* 1983; 20(3): 225-42.
5. Heath BP, Mohandas N, Wyatt JL, Shohet SB. Deformability of isolated red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 691(2): 211-9.

6. Mohandas N, Shohet SB. The role of membrane-associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability. *Clin Haematol* 1981; 10(1): 223-37.
7. Mohandas N, Chasis JA. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: Regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30(3): 171-92.
8. Evans EA, La Celle PL. Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. *Blood* 1975; 45(1): 29-43.
9. Burnstock G. Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull* 1999; 50(5-6): 355-7.
10. Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1976; 1(4): 239-48.
11. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(3): 166-76.
12. Fitz JG. Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007; 118: 199-208.
13. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 2004; 240: 31-304.
14. McMillan MR, Burnstock G, Haworth SG. Vasodilatation of intrapulmonary arteries to P2-receptor nucleotides in normal and pulmonary hypertensive newborn piglets. *Br J Pharmacol* 1999; 128(3): 543-8.
15. Burnstock G. Vessel tone and remodeling. *Nat Med* 2006; 12(1): 16-7.
16. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 2006; 12(1): 133-7.
17. Ohtani M, Ohura K, Oka T. Involvement of P2X receptors in the regulation of insulin secretion, proliferation and survival in mouse pancreatic beta-cells. *Cell Physiol Biochem* 2011; 28(2): 355-66.
18. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 2012; 3: 1034.
19. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(23): 8067-72.
20. Okada SF, Ribeiro CM, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Abdullah LH, van Heusden C, Lazarowski ER, Boucher RC. Inflammation promotes airway epithelial ATP release via calcium-dependent vesicular pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49(5): 814-20.
21. Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov DM, Spyer KM, Gourine VN. Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: Real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. *J Physiol* 2007; 585(Pt 1): 305-16.
22. Bodin P, Burnstock G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res* 1998; 47(8): 351-4.
23. Dale N, Frenguelli BG. Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7(3): 160-79.
24. Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: Modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(3): 862-9.
25. Hoffman JF, Alicia D, Amittha W, Sulayman D. Tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> channels and muscarinic and purinergic receptors identified in human erythroid progenitor cells and red blood cell ghosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(33): 12370-4.
26. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 2): H1726-32.
27. Wan J, Ristenpart WD, Stone HA. Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(43): 16432-7.
28. Forsyth AM, Wan J, Owrutsky PD, Abkarian M, Stone HA. Multiscale approach to link red blood cell dynamics, shear viscosity, and ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(27): 10986-91.
29. Wan J, Forsyth AM, Stone HA. Red blood cell dynamics: From cell deformation to ATP release. *Integr Biol (Camb)* 2011; 3(10): 972-81.
30. Sprague RS, Bowles EA, Achilles D, Ellsworth ML. Erythrocytes as controllers of perfusion distribution in the microvasculature of skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 202(3): 285-92.
31. Sluyter R, Shemon AN, Barden JA, Wiley JS. Extracellular ATP increases cation fluxes in human erythrocytes by activation of the P2X7 receptor. *J Biol Chem* 2004; 279(43): 44749-55.
32. Sluyter R, Dalitz JG, Wiley JS. P2X7 receptor polymorphism impairs extracellular adenosine 5'-triphosphate-induced interleukin-18 release from human monocytes. *Genes Immun* 2004; 5(7): 588-91.
33. Parker JC, Snow RL. Influence of external ATP on permeability and metabolism of dog red blood cells. *Am J Physiol* 1972; 223(4): 888-93.
34. Parker JC, Castranova V, Goldfinger JM. Dog red blood cells: Na and K diffusion potentials with extracellular ATP. *J Gen Physiol* 1977; 69(4): 417-30.
35. Light DB, Capes TL, Gronau RT, Adler MR. Extracellular ATP stimulates volume decrease in Necturus red blood cells. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 1): C480-91.
36. Rodriguez-Garcia R, López-Montero I, Mell M, Egea G, Gov NS, Monroy F. Direct cytoskeleton forces cause membrane softening in red blood cells. *Biophys J* 2015; 108(12): 2794-806.