

Statinler Doz Bağımlı Olarak Depo-Bağımlı Ca²⁺ Girişini BaskılarStatins Inhibit Store-Operated Ca²⁺ Channels in a Dose Dependent MannerYasin GÖKÇE¹ ¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, TÜRKİYE

Öz

Amaç: Bu çalışmada statinlerin hücre içi Ca²⁺ regülasyonunda önemli bir role sahip olan depo-bağımlı Ca²⁺ girişi (Store-Operated Ca²⁺ Entry, SOCE) mekanizması üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve metod: SOCE ölçümleri RBL-1 hücre hatları kullanılarak gerçekleştirildi. Fura-2 ile yüklenen hücreler thapsigargin ile inkübe edilerek hücre içi Ca²⁺ depolarının boşalması sağlandı ve sonrasında Ca²⁺ eklenerek SOCE ölçümleri floresan mikroskop kullanılarak gerçekleştirildi. Test grubu için hücreler, Ca²⁺ görüntülemenin başlamasından önce 15 dakika süreyle istenen bileşik konsantrasyonuyla ön işleme tabi tutuldu. Ca²⁺ görüntüleme oran-metrik (Fura-2 tabanlı) Ca²⁺ görüntüleme tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Bulgular: Pitavastatin haricinden diğer tüm statinlerin SOCE üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde baskılayıcı rolü olduğu bulundu. Özellikle 3 µM konsantrasyonda mevastatin ve atorvastatinin diğer tüm statinlerden SOCE üzerinde daha etkin olduğu anlaşıldı. Yüksek konsantrasyonlarda ise mevastatinin %80 oranından fazla SOCE'yi baskıladığı bulundu. Mevastatin için IC₅₀ değeri 4,76 µM olarak hesaplandı.

Sonuç: Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kolesterol düşürücü olarak kullanılan statinlerin depo-bağımlı Ca²⁺ kanalları üzerinde etkin olduğu saptandı. Bu çalışmayla ilk defa gösterilmiş olan statinlerin SOCE üzerindeki bu etkileri, statinlerin Ca²⁺ regülasyonundaki rolünün anlaşılmasında ve yeni tedavi metotlarının geliştirilmesi açısından büyük faydalar sağlayabileceğine inanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: SOCE, Orai1, Statinler, Ca²⁺ Regülasyonu

Abstract

Background: In this study, it was aimed to examine the effects of statins on the Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) mechanism, which has an important role in the regulation of intracellular Ca²⁺.

Materials and Methods: SOCE measurements were performed using RBL-1 cell lines. Cells loaded with Fura-2 were incubated with thapsigargin to empty the intracellular Ca²⁺ stores, and then Ca²⁺ was added to the bath solution to measure SOCE utilizing fluorescent microscope. For the test group, cells were pretreated with the desired compound concentration for 15 minutes prior to the initiation of Ca²⁺ imaging. Ca²⁺ imaging was performed using rate-metric (Fura-2-based) Ca²⁺ imaging technique.

Results: All statins except pitavastatin were found to have a statistically significant suppressive role on SOCE. It was found that mevastatin and atorvastatin, especially at 3 µM concentrations, were more effective on SOCE than all other statins. At high concentrations, mevastatin was found to suppress SOCE by more than 80%. The IC₅₀ value for mevastatin was calculated as 4.76 µM.

Conclusions: According to the findings obtained from this study, it was determined that statins, which are used as cholesterol lowering in the treatment of cardiovascular diseases, are effective on store-operated Ca²⁺ channels. It is believed that these effects of statins on SOCE, which were demonstrated for the first time in this study, may provide great benefits in understanding the role of statins in Ca²⁺ regulation and in developing new treatment methods.

Key Words: SOCE, Orai1, Statins, Ca²⁺ Regulation

Sorumlu Yazar/Corresponding Author

Dr. Yasin GÖKÇE

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Bölümü, 63300, Şanlıurfa, TÜRKİYE

E-mail: ygokce@harran.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 24.11.2022

Kabul tarihi / Accepted: 01.12.2022

DOI: 10.35440/hutfd.1209500

Giriş

Statinler, hiperkolestremili hastalarda kan kolesterolünü düşürmek için kullanılan terapötik olarak etkili lipid düşürücü ilaçlardır (1). Statinerler ateroskleroz gelişimini azaltır ve ateromatöz lezyon oluşumunu engeller (2). Statinerler ayrıca HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterolün *de novo* sentezini de engeller (3). Statinerler, dolaşımdaki LDL'leri birleştirebilen ve içselleştirebilen LDL reseptörlerini artıran hücre içi kolesterol seviyesini azaltır. Sonuç olarak, kolesterol sentezini inhibe eder ve LDL'lerin katabolizmasını artırarak plazma kolesterol düzeyini azaltırlar (4). Statinerlerin pleiotropik etkiye ek olarak kolesterolü de düşürdüğü açıktır (5). Statinerlerin yararlı etkileri kalp hastalarında gösterildi (6). Normal dozların uygulanmasını takiben, statinerler hızla emilir ve 4 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşırlar ve 30 izoenzimden oluşan Sitokrom P450 tarafından metabolize edilirler (7). Statinerler ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin farklılaşmış fenotipini uyaran kalsiyum kanallarını dereğüle eder, sonuç olarak kalsiyum girişi yolunu yeniden aktive eder ve ayrıca vasküler hücrelerde kalsiyum kanal blokör etkisinin sinerjize edildiği L-tipi kalsiyum kanallarını yukarı regüle eder (8).

Depo-bağımlı kalsiyum kanalları [Store-operated Ca^{2+} channels (SOC)], vücutta kalsiyum sinyali için ana yolu temsil eden kalsiyum seçici katyon kanallarıdır. Endoplazmik retikulum (ER) fiziksel ve fonksiyonel bağlantıları nedeniyle, SOC'ler, ER'de Ca^{2+} deposunun azalması ile birlikte kalsiyum girişini indükleyerek kalsiyum homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar (9). Bu depo-bağımlı kalsiyum girişi [store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)], gen transkripsiyonu, ekzositoz, hücre metabolizması ve hareketlilik dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik süreci yürütür (10). SOC'ler, ER Ca^{2+} sensörleri olarak görev yapan stromal etkileşim moleküllerinden (Stim1/2 proteinleri) ve plazma zarında kalsiyum salınımı ile aktive olan kalsiyum [Ca^{2+} realese-activated Ca^{2+} , (CRAC)] kanallarının yapısını oluşturan Orai1/2/3 proteinlerinden oluşur (11–14). Ca^{2+} depolarının azalmasına bağlı olarak, Stim ve Orai proteinleri, sırasıyla ER ve plazma membrandaki (PM) konumlarından ER-PM bağlantı bölgelerine fiziksel olarak temas kurabilmek için hareket ederler (15,16). Hücre içi Ca^{2+} depolarının azalmasına bağlı olarak gerçekleşen Stim/Orai etkileşimi kalsiyum girişini tetikler. Sarco/ER Ca^{2+} ATPase (SERCA) tarafından Ca^{2+} 'nın depolara geri alınması SOCE'nin sona ermesine yol açar ve Stim'ler ve Orai'lar orijinal konumlarına geri döner (17,18).

Başlangıçta sadece uyarılamayan hücrelerin bir özelliği olarak düşünülse de, artık SOCE ve onun altında yatan protein oyuncularının nöronlar, iskelet kas hücreleri ve kardiyomyositler dahil hemen hemen tüm uyarılabilir hücrelerde mevcut olduğu tespit edilmiştir (19–21). En yaygın anormal Ca^{2+} sinyali ile ilgili değişiklikler, hücre içi deponun Ca^{2+} içeriği veya sarkoplazmik retikulum (SR), sarkoendoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz'ın (SERCA) işlevi ve ayrıca ryanodin reseptörlerinin (RyRs) özellikleri üzerinden olduğu gösterilmiştir (22–24). Ancak, hücre içi Ca^{2+} homeostazını doğru

dan veya dolaylı olarak etkileyen diğer yollardan ilave katkıda bulunan mekanizmalar da bu sürece etki ediyor olabilir.

Diğer taraftan statinlerin hücre içi Ca^{2+} regülasyonundaki rolü üzerine yapılan çalışmaların oldukça sınırlıdır. Ali ve ark. statinlerin voltaj-kapılı Ca^{2+} kanalları (L-tipi Ca^{2+} kanalları) üzerinde antagonistik etkileri olduğunu göstermişlerdir (25). Ayrıca Li ve ark. atorvastatinin sıçan ventrikül miyositlerinde Na^{+} kanal akımlarını inhibe ederek Ca^{2+} regülasyonunda görev aldığını göstermişlerdir (26). Statinlerin Ca^{2+} homeostazındaki bu etkileri olası olarak SOCE mekanizmasını da etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, bu çalışma, statinlerin SOC kanallarını etkileyip etkilemediğini araştırmayı amaçlamıştır.

Materyal ve Metod

Hücre Kültürü

Sıçan bazofilik lösemi-1 (RBL-1) hücreleri, 2 mM L-glutamin, %1 (v/v) antibiyotik/antimikotik, ve %10 (v/v) fetal sığır serumu ile takviye edilmiş F-12 besin karışımı ile DMEM ortamında %5 CO_2 ve %95 hava ile nemlendirilmiş atmosferde $37^{\circ}C$ 'de kültüre edildi. Hücreler ~%80 çoğalmaya ulaştıktan sonra haftada en az iki kez pasajlandı ve 75 cm^2 'lik flaskta tutuldu. RBL-1 hücrelerinin pasajlanmalarında, DMEM ve tripsin ortamı önceden $37^{\circ}C$ 'ye ısıtıldı. Hücre ortamı aspire edilip ve 2/3 ml tripsin eklenerek hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. RBL hücrelerinin flasktan tamamen ayırabilmek için flask bir süreliğine nazikçe çalkalandı. Daha sonra 8-10 ml DMEM eklenerek tripsin ortamda nötralize edildi. Hücre süspansiyonu, süpernatantları ayırmak için 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra kalan hücre peleti DMEM (1 ml) içinde yeniden süspansiyon edildi. Ca^{2+} sinyal kaydı için, hücre süspansiyonu flasklara ve cam tabanlı petrilere (10 mm) ekildi. Bu çalışmada Sıçan Bazofilik Lösemi Hücre Hattı (RBL-1 Cell Line) kullanıldığı için etik kurul belgesine ihtiyaç duyulmamıştır.

Hücre içi Ca^{2+} Görüntüleme

Ca^{2+} görüntüleme deneyi için oran-metrik (Fura-2 tabanlı) görüntüleme yapıldı. Görüntüleme deneyinde 10 mm cam tabanlı petrilere ekilmiş hücreler kullanıldı. Fura-2 asetoksimetil ester (Fura2-AM), DMSO içinde %20 Pluronic® F-127 solüsyonunda çözündürülmüş ve 2 mM stok olarak hazırlandı. Daha sonra Fura2-AM, 3 μ M çalışma konsantrasyonu için Ca^{2+} (1.25 mM) içeren Hank Dengeli Tuz Solüsyon (HBSS) tamponu içinde seyreltildi (pH 7.4). Hücreleri Fura2-AM ile yüklemek için hücreler 40 dakika karanlık odada tutuldu. Hücrelerin içindeki boyanın de-esterifikasyonu için Ca^{2+} içeren tampon ile her biri 30 dakika olmak üzere iki kez yıkandı. Deesterifikasyon yapıldıktan sonra ortamı yıkamak için Ca^{2+} içermeyen tampon kullanıldı. Hücreleri içeren cam tabanlı petri kabı daha sonra görüntüleme için mikroskoba yerleştirildi. Yaklaşık 1 dakika boyunca ortam floresansı kaydedildikten sonra, Ca^{2+} içermeyen tampon ortamına 2 μ M thapsigargin (Tg) ilave edildi. Ardından, ~10 dakika içinde,

SOCE görüntüleme için Ca^{2+} (2 mM) ekleme protokolü uygulandı. Ca^{2+} sinyalinin tepe değeri belirlemek için deney sonunda banyo çözeltisine 10 μ M iyonominin ve 1 mM $MnCl_2$ eklendi. Test grubu için hücreler 15 dakika boyunca belirlenen statin konsantrasyonları ile inkübe edildi ve sonrasında SOCE ölçümleri yapıldı. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Floresan görüntüler, QImaging QIClick dijital CCD kamera ile monte edilmiş Nikon Eclipse Ti-S Mikroskop ve 10X (NA 0.25) hava hedefi kullanılarak elde edildi. Uyarım, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boyundaki LED'ler arasında değişen Çift OptoLED Güç Kaynağı (Cairn, UK) tarafından sağlandı ve Fura-2 sinyallerinin emisyon dalga boyları 510nm'de toplandı. MetaFluor® (Molecular Devices, ABD) Floresans Oranı Görüntüleme Yazılımı ile her 5 saniyede bir 12 bitlik görüntüler elde edildi. Her bir zaman noktasındaki flüoresan, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boyları için çözümlendi, otomatik flüoresans için düzeltildi ve 355nm/380nm oranları hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Graph Pad Prism Yazılımı kullanılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklar, one way ANOVA ve ardından Dunnett testi ile elde edildi. Tüm sonuçlar, n bağımsız deney için ortalama \pm standart ortalama hata (SEM) olarak ifade edildi, her deney minimum üç kez tekrarlandı. İstatistiksel farklılıklar $p < 0.05$ olarak ayarlandı.

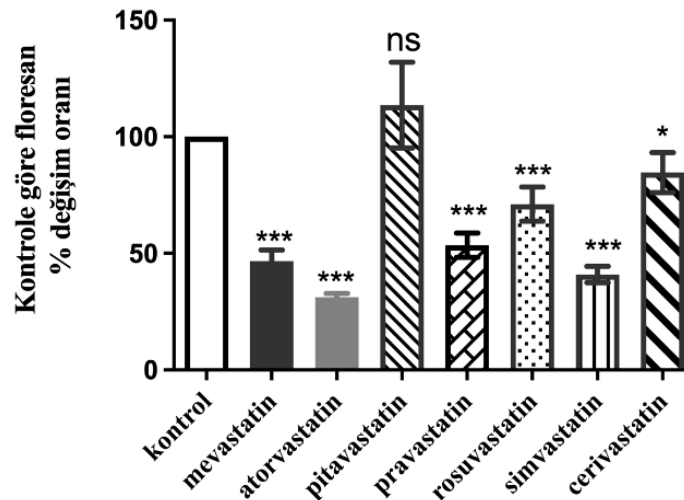
Bulgular

Statinlerin Depo Bağımlı Ca^{2+} Girişi (SOCE) Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

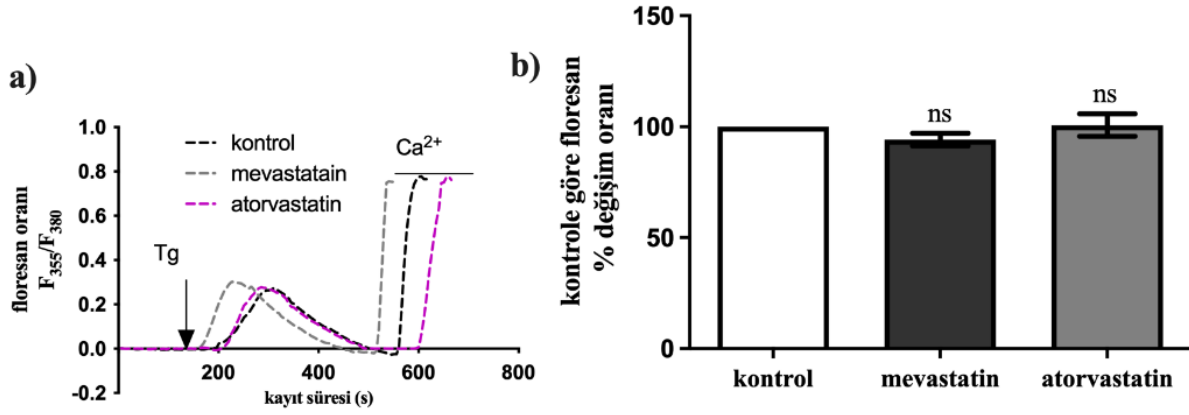
Statinlerin SOCE üzerine etkilerinin incelenmesi için Fura-2 tabanlı Ca^{2+} görüntüleme tekniği kullanıldı. SOCE çalışmalarında sıklıkla kullanılan RBL-1 hücreleri bu çalışmada tercih edildi. Hücreler ilk önce hücre dışı Ca^{2+} yokluğunda, sarkoplazmik Ca^{2+} -ATPaz'ı (SERCA) inhibe ederek hücre içi Ca^{2+} deposunu pasif olarak boşaltan thapsigargin (Tg) ile in-

kübe edildi. Hücre dışı (banyo) solüsyona 2 mM Ca^{2+} ilavesinden hemen sonra beliren SOCE girişi ölçüldü. İlk olarak 10 μ M konsantrasyonda tüm statinlerin (mevastatin, atorvastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, simvastatin, cerivastatin) SOCE üzerine etkileri ölçüldü. Bu konsantrasyonda özellikle mevastatin, atorvastatin ve simvastatinin önemli ölçüde ($\geq 60\%$) SOCE girişini baskıladığı görüldü (Şekil 1). Sadece pitavastatinin bu konsantrasyonda SOCE üzerine etkisinin olmadığı görüldü.

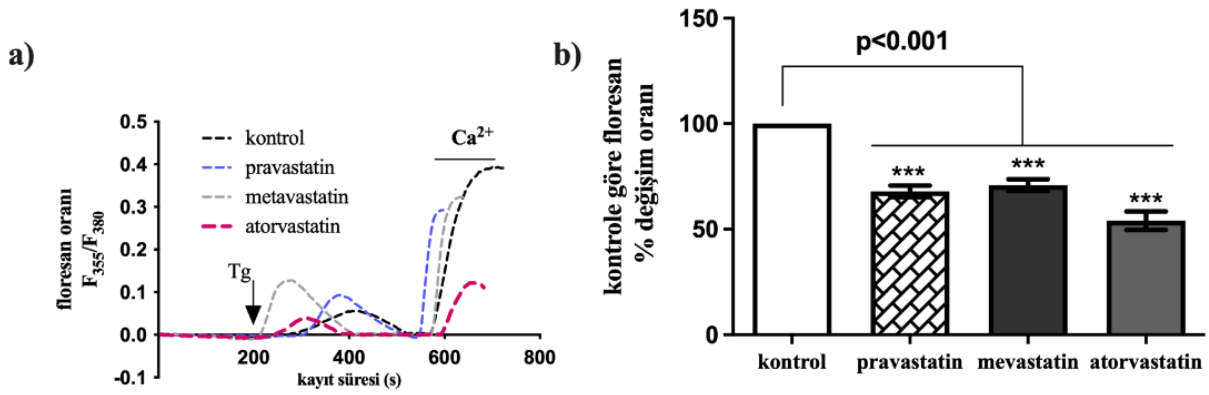
Daha sonra statinlerin farklı dozlarda SOCE üzerine etkilerini gözlemlemek üzere Ca^{2+} sinyal görüntüleri elde edildi. Şekil 2'de görüldüğü gibi 100 nM konsantrasyonda mevastatin ve atorvastatinin SOCE üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır. Bunun yanı sıra, SOCE inhibisyonunda en etkin olan statinler (mevastatin, atorvastatin ve pravastatin) için konsantrasyon-bağımlılığını ve yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerlerini belirleyebilmek için Ca^{2+} sinyal ölçümleri gerçekleştirildi. Şekil 3'te görüldüğü gibi mevastatin, atorvastatin ve pravastatin 3 μ M konsantrasyonda etkin bir şekilde ($\geq 40\%$) SOCE girişini baskılamıştır. 30 μ M konsantrasyonda statinler ile inkübe edilen hücrelerde SOCE cevapları incelendiğinde ise Şekil 4'te görüldüğü gibi mevastatin atorvastatinden çok daha etkin bir şekilde SOCE üzerinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Diğer taraftan 100 μ M mevastatin ile inkübe edilen hücrelerden elde edilen SOCE sinyalleri incelendiğinde ilgili konsantrasyonda mevastatinin SOCE'yi yaklaşık %90 oranında inhibe ettiği görülmektedir (Şekil 5a ve 5b). Elde edilen verilerden anlaşılacağı üzere, özellikle mevastatin ve atorvastatin 100 nM ila 100 μ M konsantrasyon aralığında SOCE üzerinde doza bağlı inhibe edici özellik gösterdiği anlaşılmaktadır (Şekil. 5c). Ayrıca mevastatin için yarı maksimum inhibitör konsantrasyon değeri 4,76 μ M olarak bulunmuştur. 100 nM ve altındaki konsantrasyonda, standart deney protokolü (Ca^{2+} ilavesinden önce ~20 dakika ön inkübasyon) kapsamındaki statinlerin hiçbiri önemli bir SOCE inhibe edici özellik göstermedi.



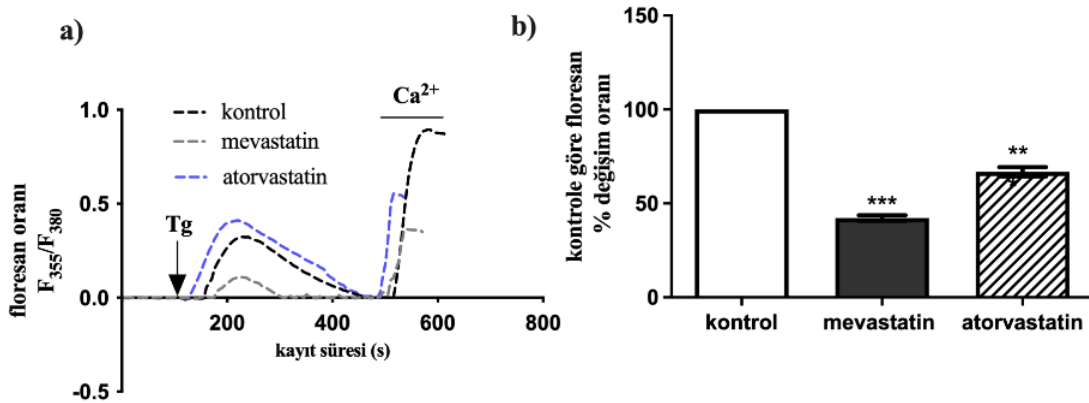
Şekil 1. Kontrol hücrelerde ve 10 μ M her bir statin ile inkübe edilen hücrelerde Tg tarafından tetiklenen tepe SOCE seviyelerini gösteren histogramlar. Her değer (ortalama \pm SEM), 3-5 ayrı deneyden ve toplam 30-80 hücreden türetili. Tüm koşullar için değerler arasındaki istatistiksel farklılık one way ANOVA (Dunnett) testi kullanılarak belirlendi (*; $p < 0,05$, ***; $p < 0,001$).



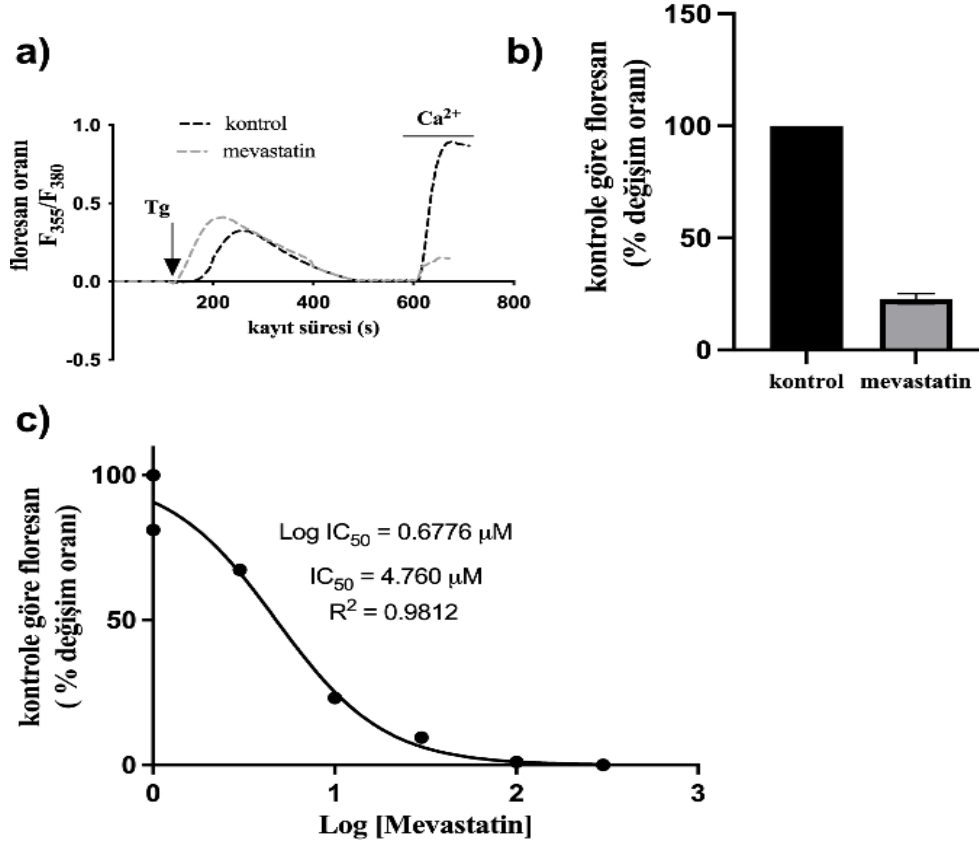
Şekil 2. a) RBL-1 hücrelerine 2 μ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca²⁺ sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden her grup için örnek traseler (her bir statin konsantrasyonu 100nM). **b)** Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği. Her bir değer (ortalama \pm SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve toplam 30-80 hücreden elde edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık one way ANOVA (Dunnets) test kullanılarak belirlendi.



Şekil 3. a) RBL-1 hücrelerine 2 μ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca²⁺ sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden her grup için örnek traseler (her bir statin konsantrasyonu 3 μ M). **b)** Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği. Her bir değer (ortalama \pm SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve toplam 30-80 hücreden elde edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık one way ANOVA (Dunnets) test kullanılarak belirlendi (***; p<0,001).



Şekil 4. a) RBL-1 hücrelerine 2 μ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca²⁺ sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden her grup için örnek traseler (her bir statin konsantrasyonu 30 μ M). **b)** Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği. Her bir değer (ortalama \pm SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve toplam 30-80 hücreden elde edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık one way ANOVA (Dunnets) test kullanılarak belirlendi (***; p<0,001).



Şekil 5. a) RBL-1 hücrelerine 2 μM (Tg) eklenerek tetiklenen Ca^{2+} sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden her grup için örnek traseler (mevastatin konsantrasyonu 100 μM). **b)** Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği. **c)** Mevastatinin Thapsigargin tarafından tetiklenen RBL-1 hücrelerinde SOCE üzerindeki inhibitör etkisinin doza bağlılığını gösteren konsantrasyon-tepki eğrisi. SOCE, Fura-2AM ile yüklenmiş RBL-1 hücrelerinin Ca^{2+} görüntüleme deneyi sırasında Ca^{2+} geri eklenmesini takiben tepe Fura-2 floresan oranı ile gösterildi. Her bir değer (ortalama \pm SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve toplam 30-80 hücreden elde edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık student t-test kullanılarak belirlendi (***, $p < 0,001$).

Tartışma

Hücrelerde bazal sitoplazmik Ca^{2+} seviyesi yaklaşık olarak ~ 500 nM civarında ölçülür ve Ca^{2+} salınımı, girişi, alımı ve akışı arasındaki dengeyi yansıtır. Hücre dışı Ca^{2+} 'nın sitoplazmaya girişi, öncelikle depolarizasyon, agonistler veya hücre içi depoların boşalması ile aktive olabilen plazma membran kanalları tarafından yönetilir (27). Sonucunu ile ilgili olarak, Ca^{2+} 'nın endoplazmik retikulumdan (ER) sitozole ilk salımı, ER depolarının boşalmasına ve ardından "depo-bağımlı Ca^{2+} girişi" [Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE)] olarak adlandırılan bir süreçle membran kanallarının aktivasyonuna yol açar. Ca^{2+} kanallarının Orai ailesi, SOCE'de ilk tanımlanan ve en kapsamlı çalışılan bileşendir. Diğer bazı çalışmalar, Orai ailesine ait olmayan geçici reseptör potansiyel [Transient receptor potential channel, (TRPC)] ailesinin "kanonik" alt ailesinin üyelerinin de depoya bağlı bir şekilde etkinleştirildiğini göstermiştir. Bu kanalların (Orai ve TRPC'ler) bağımsız olup olmadığı veya fonksiyonel kompleksler oluşturup oluşturmadığı üzerine çalışmalar halen devam etmektedir. SOCE'nin geleneksel olarak boşalmış hücre içi Ca^{2+} depolarını yenilemek için ana yol olarak hizmet ettiği iyi bilinmektedir. Bu kadar önemli görevinin yanı sıra, SOCE'nin ekzositoz, mitokondriyal metabolizma, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve proliferasyonu

gibi bazı daha spesifik biyolojik süreçleri düzenlemek için mekansal-zamansal olarak karmaşık Ca^{2+} sinyalleri regüle edebileceğine dair kanıtlar ortaya çıkmaya devam etmektedir (28). Son yıllarda, ciddi kombine immün yetmezlik bozuklukları, alerji, tromboz, akut pankreatit, enflamatuar barsak hastalığı, romatoid artrit ve kanser dahil olmak üzere birçok insan hastalığında anormal Orai1 kanal aktivitesi kaydedilmiştir (29).

Diğer taraftan statinler her ne kadar kolesterol düşürücü ilaçlar olsalar da hücre içi Ca^{2+} regülasyonunun sağlanmasında oldukça önemli role sahiptirler. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada simvastatinin ROCK'a bağlı Ca^{2+} duyarlılığını ve voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarını inhibe ederek pulmoner arter basıncını ve sağ ventrikül hipertrofini azalttığı gösterilmiştir (30). Dahası, statinlerin L-tipi voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının ileri regülasyonu ile koroner arter kalsifikasyonuna neden olan yan etkileri de mevcuttur (31). Başka bir çalışmada ise statinlerin voltaj kapılı kanallar üzerinden Ca^{2+} kanal blokörü olarak aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (25). Tüm bu bilgiler Ca^{2+} sinyal mekanizmasında oldukça öneme sahip olan SOCE mekanizmasının statinlerle olası bağlantısına işaret etmektedir. Bu çalışmada ilk defa tüm statinlerin farklı dozlarda SOCE üzerine olan etkileri incelenmiştir. SOCE ölçümü için Ca^{2+} içermeyen durumda hücreler

2 μM thapsigargin ile inkübe edilerek hücre içi Ca^{2+} depolarının boşalması sağlandı ve ardından solüsyona 2 μM Ca^{2+} eklenerek SOCE belirgin hale getirildi. 100 nM konsantrasyonunda statinlerin SOCE üzerinde etkilerinin olmadığı anlaşıldı (Şekil 2). 10 μM konsantrasyonunda 15 dk statinlerle inkübe edilen hücrelerde gerçekleştirilen ölçümlerinde ise pitavastatin haricinde tüm statinlerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde SOCE'yi baskıladığı görülmüştür (Şekil 1). Daha yüksek konsantrasyonlarda ise atorvastatin ve mevastatinin diğer statinlere oranla SOCE üzerinde daha etkin bir role sahip olduğu görüldü (Şekil 3, 4). Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda (100 μM) mevastatinin SOCE'yi %80 den büyük oranda baskıladığı ve IC_{50} değerinin ise 4,76 μM olduğu bulundu (Şekil 5).

Sonuç

Bu çalışmada hücre içi Ca^{2+} regülasyonunda oldukça önemli bir mekanizma olan SOCE üzerine statinlerin etkileri incelendi. Pitavastatin haricinde diğer tüm statinlerin SOCE'yi doz bağımlı şekilde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde baskıladığı görüldü. Özellikle de mevastatinin diğerlerine nazaran daha etkin olduğu bulundu. Statinlerin kardiyovasküler hastalıkları önlemede kolesterol düşürücü ilaçlar olarak kullanılsa da yan etkileri yönünden tartışmalar giderek artmaktadır. Özellikle voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları üzerinden etkileri ile hem kalsifikasyona hem de hücre içi Ca^{2+} regülasyonunda bozulmalara neden olabileceği düşünülmektedir. Bu etkilerinin yanı sıra bu çalışmada da gösterildiği gibi statinlerin farklı hücrelerde SOCE üzerindeki etkilerinin araştırılması statinlerin Ca^{2+} regülasyonundaki rolünün anlaşılması açısından ve yeni tedavi metotlarının geliştirilmesinde büyük faydalar sağlayabileceğine inanılmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan RBL-1 hücre hattını temin eden Cambridge Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Taufiq Rahman'a teşekkür ederim.

Etik onam: Bu çalışmada Sıçan Bazofilik Lösemi Hücre Hattı (RBL-1 Cell Line) kullanılmıştır. Bu yüzden etik kurul belgesine ihtiyaç duyulmamıştır.

Yazar Katkıları:

Konsept: Y.G.

Literatür Tarama: Y.G.

Tasarım: Y.G.

Veri toplama: Y.G.

Analiz ve yorum: Y.G.

Makale yazımı: Y.G.

Eleştirel incelenmesi: Y.G.

Çıkar Çatışması: Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK 1059B141800131) Hibeleri ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Stancu C, Sima A. Statins: Mechanism of action and effects. J of Cellular and Molecular Medicine. 2001; 5: 378–87.

- Moneta GL. A Randomized Trial of Rosuvastatin in the Prevention of Venous Thromboembolism. Yearb Vasc Surg. 2010;2010(18):301–3.
- Tobert JA. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(7):517–26.
- Lennernäs H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. Clinical Pharmacokinetics. 1997; 32: 403–25.
- Kavalipati N, Shah J, Ramakrishnan A, Vasnavala H. Pleiotropic effects of statins. Indian J Endocrinol Metab. 2015;19(5):554–62.
- Gary PH, JBM. SCT et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. New English J Med. 1990;323(16):1120–3.
- Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2005; 19: 117–25.
- Middleton K, Fish DE. Calcium channel regulation in vascular smooth muscle cells: synergistic effects of statins and calcium channel blockers. Curr Rev Musculoskeletal Med. 2009; 2; 94–104.
- Putney JW. A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium. 1986;7(1):1–12.
- Lewis RS. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. Nature. 2007;446(7133):284–7.
- Pylayeva-Gupta Y, Kelsey C, Martin Mhatre V, Ho J-AL. STIM Is a Ca^{2+} Sensor Essential for Ca^{2+} -Store-Depletion-Triggered Ca^{2+} Influx. Bone. 2012;23(1):1–7.
- Gross SA, Wissenbach U, Philipp SE, Freichel M, Cavalieri A, Flockerzi V. Murine ORAI2 splice variants form functional Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels. J Biol Chem. 2007;282(27):19375–84.
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. Nature. 2005;437(7060):902–5.
- Wissenbach U, Philipp SE, Gross SA, Cavalieri A, Flockerzi V. Primary structure, chromosomal localization and expression in immune cells of the murine ORAI and STIM genes. Cell Calcium. 2007;42(4–5):439–46.
- Baba A, Yasui T, Fujisawa S, Yamada RX, Yamada MK, Nishiyama N, et al. Activity-evoked capacitative Ca^{2+} entry: Implications in synaptic plasticity. J Neurosci. 2003;23(21):7737–41.
- Mercer JC, DeHaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, et al. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. J Biol Chem. 2006;281(34):24979–90.
- Alonso MT, Manjarrés IM, García-Sancho J. Privileged coupling between Ca^{2+} entry through plasma membrane store-operated Ca^{2+} channels and the endoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. Mol Cell Endocrinol. 2012;353(1–2):37–44.
- Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. Physiol Rev. 2015; 95(4); 1383–436.
- Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. Physiol Rev. 2015; 95(4);1383–436.
- Chaudhari S, Wu P, Wang Y, Ding Y, Yuan J, Begg M, et al. High glucose and diabetes enhanced store-operated Ca^{2+} entry and increased expression of its signaling proteins in mesangial cells. Am J Physiol - Ren Physiol. 2014;306(9):F1069–80.

21. Gökçe Y, Erkan O, Savaş K, Rahman T, Yaraş N. Pharmacological blockade of angiotensin II receptor restores diabetes-associated reduction of store operated Ca²⁺ entry in adult cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;610:56–60.
22. Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, et al. Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2002;283(4 52-4):H1398-408.
23. Bouchard RA, Bose D. Influence of experimental diabetes on sarcoplasmic reticulum function in rat ventricular muscle. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1991;260(2 29-2):H341–54.
24. Yaras N, Bilginoglu A, Vassort G, Turan B. Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca²⁺ release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *American J of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2007: 292;H912-20.
25. Ali N, Begum R, Faisal MS, Khan A, Nabi M, Shehzadi G, et al. Current statins show calcium channel blocking activity through voltage gated channels. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2016;17(1):1–7.
26. Li H, Wan Z, Li X, Teng T, Du X, Nie J. Effects of atorvastatin on time-dependent change of fast sodium current in simulated acute ischaemic ventricular myocytes. *Cardiovascular J of Africa*. 2021;30(5); 268-74.
27. Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M. Stim1 and orai1 mediate crac currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res*. 2008;103(11):1289–99.
28. Parekh AB. Store-operated CRAC channels: Function in health and disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010: 9(5); 399-410.
29. Koch G. Store-operated CRAC channel inhibitors: opportunities and challenges. *Chimia (Aarau)*. 2017;71(10):643.
30. Absi M, Eid BG, Ashton N, Hart G, Gurney AM. Simvastatin causes pulmonary artery relaxation by blocking smooth muscle ROCK and calcium channels: Evidence for an endothelium-independent mechanism. *PLoS One*. 2019;14(8):1–17.
31. LaMonte MJ, FitzGerald SJ, Church TS, Barlow CE, Radford NB, Levine BD, et al. Coronary artery calcium score and coronary heart disease events in a large cohort of asymptomatic men and women. *Am J Epidemiol*. 2005;162(5):421–9.