



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



MEMELİ ATRİYAL HÜCRELERİNDE ATP-DUYARLI KATYON KANALLARININ YAŞLANMAYA BAĞLI KALP FONKSİYON DEĞİŞİKLİKLERİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Sinan DEĞİRMENCİ

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet UĞUR**

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEMELİ ATRİYAL HÜCRELERİNDE ATP-DUYARLI KATYON
KANALLARININ YAŞLANMAYA BAĞLI KALP FONKSİYON
DEĞİŞİKLİKLERİNDEKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Sinan DEĞİRMENCİ

**BİYO FİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet UĞUR

2. DANIŞMAN

Prof. Dr. Belma TURAN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
19L0230014 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Memeli Atrial Hücrelerinde ATP-duyarlı Katyon Kanallarının Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Değişikliklerindeki Rolünün İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sinan DEĞİRMENCİ

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalında Sinan Değirmenci tarafından hazırlanan
“Memeli Atrial Hücrelerinde ATP-duyarlı Katyon Kanallarının Yaşlanmaya Bağlı
Kalp Fonksiyon Değişikliklerindeki Rolünün İncelenmesi.” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02.07.2021

Prof. Dr. Nuhan Puralı
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet Uğur
Ankara Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Ongun Onaran
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Turgut Baştuğ
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Burak Kandilci
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen Aktan
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Hücre dışı Kimyasal Haberci Olarak ATP ve Kalpteki Etkileri	1
1.2. Pürinerjik Reseptörlerin Sınıflandırılması ve Farmakolojik Özellikleri	3
1.3. Kalpte Bulunan P2 Reseptörleri	9
1.4. ATP'nin Kardiyak Kasılabilirliği Üzerine Etkileri ve P2 Reseptörleri	13
1.5. ATP'nin Kalp Atım Hızı Üzerine Etkileri ve P2 Reseptörleri	14
1.6. Projenin Önemi ve Amacı	15
2. GEREÇ ve YÖNTEM	17
2.1. Hücre Kültürü	17
2.2. Kardiyomiyositlerin İzolasyonu	17
2.3. Floresan Boya Girişi Ölçümü	19
2.4. K ⁺ -kanal Akımlarının Kaydedilmesi	20
2.5. Kullanılan Agonist ve Antagonistler	21
3. BULGULAR	22
3.1. İzole Sıçan Atriyum ve Ventrikül Hücrelerine ATP Etkisi	22
3.2. HL-1 Hücrelerine ATP Etkisi	30
3.3. Fare Atriyum Hücrelerinde ATP Etkisi	38
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
ÖZET	50
SUMMARY	51

KAYNAKLAR	52
EKLER	61
Ek-1. Etik Raporu	61



ÖNSÖZ

ATP' nin kalp üzerindeki etkileri uzun zamandır bilinmektedir. Bu etkilere birçok farklı P2 reseptörünün aracılık ettiği düşünülmektedir. Ancak P2X7 reseptörlerinin memeli kardiyak hücrelerinde fonksiyonel var olup olmadığı netleşmemiş bir konudur. Bu nedenle biz çalışmamızda western blot ve immünohistokimya yöntemleri ile kardiyak hücrelerde gösterilen ve P2X7 reseptörü olduğu iddia edilen proteinin gerçekten fonksiyonel bir P2X7 reseptörü olup olmadığını araştırdık. Fare atriyum kökenli ve pek çok açıdan kardiyak hücre özelliklerini iyi korumuş bir hücre serisi olan HL-1 hücrelerinde ve daha sonra sıçan ve fare ventrikül ve atriumlarından enzimatik olarak izole edilen kardiyak hücrelerde fonksiyonel bir P2X7 reseptörü olup olmadığını inceledik. Bu çalışma ile memeli atriyal hücrelerinde fonksiyonel P2X7 reseptörlerinin varlığının gösterilmesi, bu reseptörün insan kardiyomiyositlerinde de var olduğu iddiaları da göz önüne alındığında, hem kardiyak fizyolojide rol alan yeni bir tip reseptörün, hem de potansiyel bir ilaç hedefinin tanımlanmasında rol oynayabilecektir.

Bu tez çalışmasının danışmalığını üstlenen, tez çalışmasının gerçekleşmesi için her türlü olanağı sağlayan, bilgisi ve tecrübesiyle beni akademik hayata hazırlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Uğur ve Prof. Dr. Belma Turan' a sonsuz teşekkür ederim.

Tez izleme komite üyeleri, Prof. Dr. Ongun Onaran ve Doç. Dr. Hilmi Burak Kandilci' ye değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim. Eğitim sürecinde değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Can Akçalı' ya teşekkür ederim. Doktora çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Erkan Tuncay, Dr. Yusuf Olğar, Dr. Ayşegül Durak ve HL-1 hücrelerini temin eden Gül Şimşek' e teşekkür ederim.

Varlıklarıyla güç veren ve her zaman destekleyen, en değerlilerim sevgili eşime ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BzATP	Benzoil adenozin trifosfat
EC ₅₀	Yarı maksimal etkili konsantrasyon
EGTA	Etilen glikol tetraasetik asit
FBS	Fetal dana serumu
HEPES	N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etanosülfonik asit
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
IP3	İnositol 1,4,5-trisfosfat
KAch	Asetilkolin ile aktive olan K ⁺ kanalları
2-MeS-ATP	2-Metiltiyo-ATP
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ değiş-tokuşçusu
NMDG ⁺	N-metil-D-glukamin
α,β-Me-ATP	α,β-Metilen-ATP
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
PLC	Fosfolipaz C
PPADS	Piridoksalfosfat-6-azofenil-2',4'-disülfonik asit
UDP	Uridin difosfat
UTP	Uridin trifosfat

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kalbin sempatik uyarımı ve sempatik sinirlerde noradrenalinin ve ko-transmitter olarak ATP'nin salınımı.	2
Şekil 1.2. Pürinerjik reseptörler.	4
Şekil 1.3. HEK293 hücrelerine transfekte edilmiş P2X kanallarından ATP (P2X1-5 reseptörleri için 30 µM, sadece P2X7 reseptörü için 1 mM) uygulamasıyla alınan akımlar.	7
Şekil 1.4. Antagonist A-740003 diğer pürinerjik reseptörlere göre P2X7 reseptörü için yüksek seçicilikte bir antagonisttir.	8
Şekil 1.5. Antagonist A-804598 diğer pürinerjik reseptörlere göre P2X7 reseptörü için çok yüksek seçicilikte bir antagonisttir.	9
Şekil 2.1. Fareden atriyal miyosit izolasyon aşamaları.	19
Şekil 3.1. -70 mV' a kenetlenmiş sıçan ventrikül hücrelerinde ATP etkisini gösteren örnek kayıt.	22
Şekil 3.2. -70 mV' a kenetlenmiş sıçan atriyum hücrelerinde ATP etkisini gösteren örnek kayıt.	23
Şekil 3.3. -70 mV' a kenetlenmiş sıçan atriyum ve ventrikül hücrelerinde ATP uygulanarak elde edilmiş doz-yanıt ilişkisi.	24
Şekil 3.4. -70 mV' a kenetlenmiş sıçan ventrikül hücrelerinde EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek kayıt.	25
Şekil 3.5. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek	26

kayıtlar.

Şekil 3.6. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek kayıtlar. 27

Şekil 3.7. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA veya ATP uygulanarak alınmış kayıtların akım-voltaj (I-V) karakteristiği. 28

Şekil 3.8. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA varlığında ATP etkisini gösteren örnek kayıtlar. 29

Şekil 3.9. HL-1 hücrelerinde ATP uygulamasıyla YO-PRO-1 boya girişini gösteren örnek kayıtlar. 31

Şekil 3.10. HL-1 hücrelerinde ATP uygulamasıyla YO-PRO-1 boya girişini ve floresans sinyalinin zamana bağlı değişimini gösteren örnek kayıt (A) ve farklı konsantrasyonlarda ATP uygulamasıyla oluşan boya giriş hızları (ATP sonrası floresans artış eğimi / ATP öncesi floresans artış eğimi oranı olarak verilmiştir (B). 32

Şekil 3.11. -80 mV' a kenetlenmiş HL-1 hücrelerinde EGTA varlığında agonist yanıtları. 33

Şekil 3.12. HL-1 hücrelerinde EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek kayıtlar. 35

Şekil 3.13. HL-1 hücrelerinde EGTA ve ATP uygulanarak alınmış kayıtların akım-voltaj (I-V) karakteristiği. 36

Şekil 3.14. HL-1 hücrelerinde sabit -80 mV tutma potansiyelinde ATP ile oluşan yanıtın üzerinde seçici P2X7 antagonistlerinin etkisi. 37

Şekil 3.15. Membran potansiyeli -80 mV' a kenetlenmiş fare atriyum hücrelerinde EGTA ve ATP uygulanarak alınmış örnek kayıt. 39

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. ATP ve UTP'nin P2X ve P2Y reseptörleri için EC ₅₀ değerleri.	5
Çizelge 1.2. Kalpte bulunduğu iddia edilen P2X reseptörleri	10
Çizelge 1.3. ATP ve türevlerinin kalpteki inotropik etkileri	13
Çizelge 2.1. Sıçan ve fare kardiyomiyosit izolasyonu içerikleri	18
Çizelge 2.2. Akım kayıtlarında kullanılan çözelti içerikleri	20

1. GİRİŞ

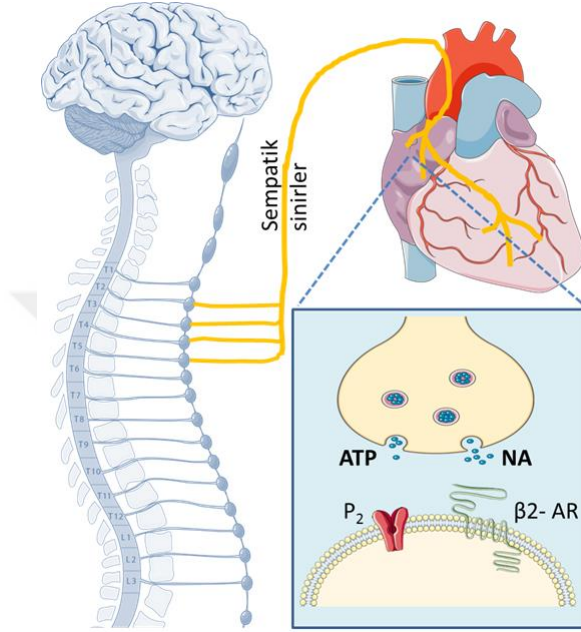
1.1. Hücre dışı Kimyasal Haberci Olarak ATP ve Kalpteki Etkileri

Pürinler ve pirimidinler, diğer önemli biyokimyasal görevlerinin yanı sıra hücre dışında çok sayıda farklı biyolojik etkileri olan önemli sinyal molekülleridir. Bu moleküller hücre dışından zardaki bazı reseptörlere bağlanarak hücre içinde birçok ikinci haberci yolağını aktive ettikleri gibi hücre membranındaki bazı iyon kanallarını da doğrudan aktive ederek hücrenin elektriksel durumunda değişikliklere yol açarlar ve bu yolla hücreler arası haberleşmede rol alırlar.

ATP, hücre içi enerji kaynağı olmasının yanı sıra nöronal hücreler, endotel hücreleri, kas hücreleri gibi birçok hücre tipinden salınan önemli bir hücre dışı kimyasal haberci olarak kabul edilmektedir ve P2 purinerjik reseptörleri aracılığıyla pek çok farklı hücrenin fonksiyonlarını düzenlemektedir (Burnstock, 2006).

ATP büyüklüğü ve yükü nedeniyle lipid membrandan basit difüzyonla taşınamaz. Memeli hücrelerinde, hücre içi boşluktan dış boşluğa birçok ATP salımı yolu vardır. Bunlar arasında gap junction kanalları, connexinler (Kim ve ark., 2018; Le ve ark., 2020; Stout ve ark., 2002) ve pannexinler (Oishi ve ark., 2012), kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyiciye bağlı yol (Abraham ve ark., 1997; al-Awqati, 1995), maksi anyon kanalları (Bell ve ark., 2003), hacim kontrollü anyon ya da Cl^- kanalı (VRAC) (Sabirov ve Okada, 2004) ve ekzositoz (Gordon, 1986) bulunur. Hücrelerdeki ATP salım süreçleri, mekanik uyaranlar gibi farklı tipte uyaranlar tarafından da düzenlenir (Yamamoto ve ark., 2003). Ayrıca ATP, sempatik sinirlerden noradrenalin ile birlikte aynı sinaptik veziküllerde bulunur ve noradrenalin ile aynı mekanizmayı kullanarak bir ko-nörotransmitter olarak salınır (Burnstock, 1972). İnsan kalbinin atriyal miyokardiyumunda, sempatik sinir terminal varikositeleri, kalp kasını innerve eden yoğun bir ağ oluşturur ve kardiyak miyositlerle yakın bir konuma gelir (Şekil 1.1). Sempatik nöronlara ek olarak (Burnstock, 1990), kardiyak miyositler (Paddle ve Burnstock, 1974; Williams ve

Forrester, 1983), endotel hücreleri (Bodin ve ark., 1991; Ralevic ve Burnstock, 1998), düz kas hücreleri (Pearson ve Gordon, 1979), trombositler (Holmsen, 1985) ve diğer hücre türlerinin çeşitli uyarılara yanıt olarak ATP' yi sitozolden hücre dışı boşluğa saldığı da gösterilmiştir.



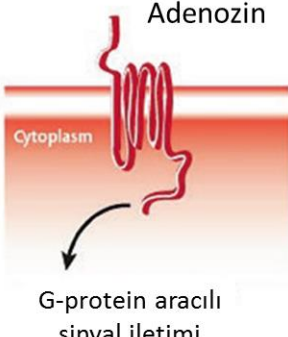
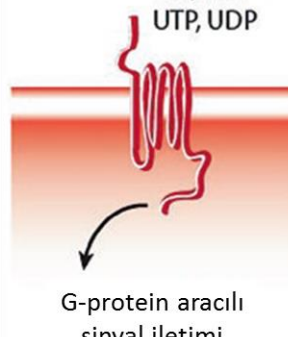
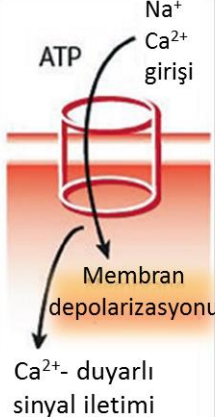
Şekil 1.1. Kalbin sempatik uyarımı ve sempatik sinirlerde noradrenalinin ve ko-transmitter olarak ATP'nin salınımı. (Vegh ve ark., 2016) ve (Kennedy, 2015)' den değiştirilerek çizilmiştir.

Hücre dışı ATP konsantrasyonlarının yaklaşık 1-40 nM olduğu ve hücre içi ATP konsantrasyonlarının yaklaşık 10 mM olduğu düşünülmektedir. Kalpteki koroner arterde, ATP seviyeleri normal şartlarda çok düşüktür (1 nM) (Borst ve Schrader, 1991), bunun başlıca nedeni ATP' nin çözünür ve zara bağlı ektonükleotidazlar (ekto-ATPazlar) tarafından hızla ADP, AMP ve adenozeine parçalanmasıdır (Welford ve ark., 1987). Bununla birlikte, kalpteki interstisyel sıvıda daha yüksek ATP seviyeleri (40 nM) ölçülebilir (Kuzmin ve ark., 1998). Kalpteki koroner arterdeki ATP düzeyi elektriksel uyarı, kardiyotonik ajanların uygulanması (Darius ve ark., 1987; Vial ve ark., 1987), mekanik gerilme (Uozumi ve ark., 1998), daha yüksek kan akışı (Vials ve Burnstock, 1996), yüksek iş yükü (Doyle ve Forrester, 1985) ve hipoksi / iskemi (Kuzmin ve ark., 1998; Vial ve ark., 1987) ile önemli ölçüde artar.

ATP etkileriyle ilgili yapılan ilk çalışmalarda memeli kalplerinde özellikle atriumlarında negatif inotropik etki gözlenmiştir (Burnstock ve Meghji, 1983; Fleetwood ve Gordon, 1987; Hollander ve Webb, 1957; Hopkins, 1973). Daha sonra kobay ve sıçan atrialarında yapılan çalışmalarda ATP' nin azalmasıyla pozitif inotropik etkiler gözlenmiştir (Dorigo ve ark., 1988; Frolidi ve ark., 1994; Frolidi ve ark., 1997; Mantelli ve ark., 1993). Daha sonraki çalışmalarda da düşük konsantrasyonlardaki ATP' nin taşikardiye yol açtığı, yüksek konsantrasyonlardaki ATP'nin ise atrioventriküler bloğa neden olduğu gösterilmiştir. (Hollander ve Webb, 1957; Stoner ve ark., 1948). Hücre dışı ATP konsantrasyonundaki değişikliklerin kalpte hücrelerdeki çok sayıda farklı kanalı etkileyerek aritmilere neden olabileceği de belirtilmiştir (Vassort, 2001). ATP' nin kalpte glikoz transportunu inhibe ettiği de söylenmektedir (Fischer ve ark., 1999). Farklı türlerdeki ve kalbin farklı bölgelerindeki kardiyak hücreler, purinerjik reseptör alt tipleri açısından farklılık gösterir (Woo ve Trinh, 2020).

1.2. Purinerjik Reseptörlerin Sınıflandırılması ve Farmakolojik Özellikleri

Hücre membranının dış yüzeyindeki purin reseptörleri temel olarak ikiye ayrılır: Adenozin duyarlı olan P1 reseptörleri ve ATP, ADP, UTP ve UDP duyarlı olan P2 reseptörleri. P1 reseptörleri kendi içinde A1, A2A, A2B ve A3 olmak üzere dörde ayrılır ancak bu reseptörlerin hepsi G proteini-kenetli reseptör ailesindendir. P2 reseptörleri ise ligand-kapılı iyon kanalı olan P2X ve G proteini-kenetli reseptör olan P2Y reseptörleri olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. P2X reseptörlerinin P2X 1-7 olmak üzere 7 alt tipi ve P2Y reseptörlerinin ise P2Y 1, 2, 4, 6, 11-14 olmak üzere 8 alt tipi vardır (Ralevic ve Burnstock, 1998) (Şekil 1.2).

Pürinerjik Reseptörler			
Aile	Adenozin/P1 Reseptörleri (P1R)	P2 Reseptörleri (P2R)	
Alt aile	-	P2Y	P2X
Reseptör Alt tipleri	A1, A2A, A2B, A3	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14	P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7
Yapı	G-proteini kenetli reseptörler	G-proteini kenetli reseptörler	Ligand-kapılı iyon kanalları
Ligand	 Adenozin Cytoplasm G-protein aracılı sinyal iletimi	 ATP, ADP UTP, UDP G-protein aracılı sinyal iletimi	 ATP Na⁺ Ca²⁺ girişi Membran depolarizasyonu Ca²⁺-duyarlı sinyal iletimi

Şekil 1.2. Pürinerjik reseptörler. (Rajagopal ve Ponnusamy, 2018) kaynağından dilimize uyarlanmıştır.

P2X reseptörleri, 379-472 amino asitli proteinlerden oluşan ligand kapılı kanallardır ve iki transmembran bölgesine sahip alt-ünitelerden oluşan trimerik yapıdadır (Brake ve ark., 1994). Hem homomerik hem de heteromerik trimerler olarak birleşebilirler.

P2X reseptörleri, iyonotropik reseptörlerdir, hücre dışı ATP bağlanmasıyla aktive olurlar ve spesifik-olmayan katyon kanalı olarak çalışırlar. Bu kanalların 7 alt tipinden üçü olan P2X2, P2X4 ve P2X7; Ca²⁺, Na⁺ ve K⁺ gibi küçük katyonların yanında düşük divalan ortamında sürekli ATP uygulaması ile NMDG⁺ ve YO-PRO-1 gibi büyük molekülleri de geçirebilmektedir (North ve Surprenant, 2000).

P2Y reseptörleri, hücrelerin fizyolojik işlevini düzenlemek için hücre içi ikinci haberci sistemlerini aktive eden G-proteinine kenetli reseptörlerdir. ATP ve ADP'ye ek olarak P2Y reseptörlerine, UTP ve UDP pirimidinleri de bağlanabilir. Bir grup P2Y reseptör alt tipi (P2Y reseptörü-1, -2, -4, -6 ve -11), Gq proteinlerini aktive ederek fosfolipaz C' yi (PLC) uyarır ve fosfatidilinositol 4,5-bifosfattan (PIP2) inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) üretimini ve hücre içi depolardan Ca^{2+} mobilizasyonunu sağlar. P2Y11 reseptörü ayrıca adenilat siklazı aktive eder. Kalan P2Y reseptörleri (P2Y reseptörü-12, -13 ve -14), adenilat siklazı inhibe eden Gi proteinleri aracılığı ile sitozoldeki cAMP seviyesini azaltırlar (von Kugelgen, 2006)

P2X ve P2Y reseptörleriyle yapılan çalışmalarda reseptör tipine göre farklı agonist ve antagonistler kullanılmaktadır. Ancak P2X ve P2Y reseptörlerinin birbirlerinden farmakolojik ayrımında en sık kullanılan agonistler ATP ve UTP'dir ve reseptör tipine ve reseptörün bulunduğu hücreye göre değerler değişse de kıyaslama yapabilmek açısından bu agonistlerin EC_{50} değerleri Çizelge 1.1' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. ATP ve UTP'nin P2X ve P2Y reseptörleri için EC_{50} değerleri (Junger, 2011) kaynağından uyarlanmıştır.

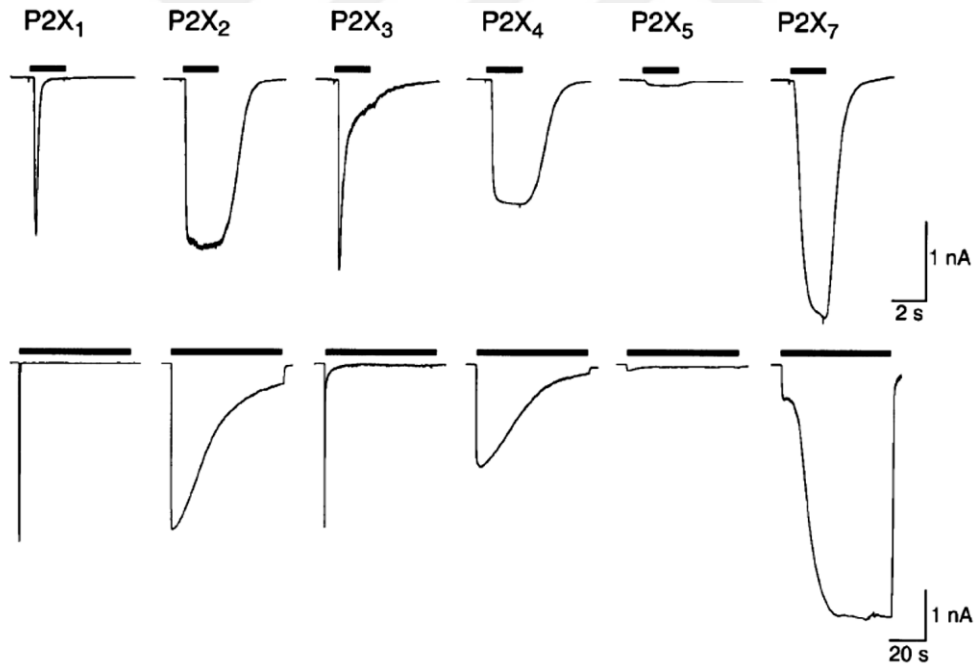
Reseptör	Ligand	Ligand EC_{50} (μM)	Reseptör	Ligand	Ligand EC_{50} (μM)
P2X1	ATP	0,05-1	P2Y1	ADP	8
P2X2	ATP	1-30	P2Y2	ATP, UTP	0,1-0,2
P2X3	ATP	0,3-1	P2Y4	UTP	2,5
P2X4	ATP	1-10	P2Y6	UDP, UTP	0,3-6
P2X5	ATP	1-10	P2Y11	ATP	17
P2X6	ATP	1-12	P2Y12	ADP	0,07
P2X7	ATP	>100	P2Y13	ADP, ATP	0,06-0,26
			P2Y14	UDP-glikoz	0,1-0,5

P2X1 ve P2X3 reseptörleri, ATP'nin yanısıra α,β -meATP ile aktive olabilir ve suramin ve PPADS ile geri dönüşlü olarak bloklanabilir (Valera ve ark., 1994). Bu reseptörlerin ikisi de (P2X1 çok daha duyarlı olmakla birlikte) oldukça düşük ATP konsantrasyonunda aktive olabilmektedir ($<1 \mu\text{M}$) (Schmid ve Evans, 2019; Junger, 2011). P2X1 ve P2X3 reseptörleri birkaç yüz milisaniyede oldukça hızlı desensitizasyon gösterir ve reseptörün desensitizasyondan tam olarak kurtulması için 15 dakikadan fazla bir süre gerekebilir (North, 2002). P2X3 reseptöründe $30 \mu\text{M}$ ATP ile aktive olan akımları inhibe etmede hücre dışı Ca^{2+} 'nın neredeyse etkisiz olduğu gösterilmiştir ($\text{IC}_{50} \sim 90 \text{ mM}$) (Virginio ve ark., 1998).

P2X2 ve P2X4 reseptörleri ATP ile aktive olabilirken, α,β -meATP ile aktive olmazlar (Brake ve ark., 1994; North, 2002). Bu reseptörler, P2X1 ve 2 ye oranla daha yüksek omakla birlikte, nispeten düşük ATP konsantrasyonlarında ($\sim 10 \mu\text{M}$) aktive olabilmektedir (Schmid ve Evans, 2019; Junger, 2011; Ding ve Sachs, 1999b; Ding ve Sachs, 1999a). Her iki reseptör de 10 saniyeden uzun süren agonist uygulamalarında belirginleşen, yavaş bir desensitizasyon gösterirler (Garcia-Guzman ve ark., 1997; North, 2002; Seguela ve ark., 1996; Wang ve ark., 1996) (Şekil 1.3). P2X2 ve P2X4 ifade ettirilmiş HEK293 hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise uzun süreli (10-60 s) $100 \mu\text{M}$ ATP uygulamasıyla kanalın normalde hücre zarının geçirgen olmadığı NMDG⁺ ve YO-PRO-1 boyası gibi büyük moleküllere de geçirgen hale geldiği gösterilmiştir (Virginio ve ark., 1999). Hücre dışı Ca^{2+} 'nın, ATP uygulamasıyla oluşan P2X2 akımını 5 mM 'lık bir IC_{50} değeriyle inhibe edebildiği gösterilmiştir (Evans ve ark., 1995). Diğer divalen katyonların da (Mn, Mg ve Ba gibi) bu kanalı bloke edebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Ding ve Sachs, 2000; Ding ve Sachs, 1999a). P2X4 reseptörleri suramin ve PPADS'ye, kısa süreli uygulamalarda neredeyse duyarsızdır (Buell ve ark., 1996; Soto ve ark., 1996). Ayrıca P2X4 reseptörü P2X2, P2X3 ve P2X7 reseptörlerinden farklı olarak iovermektin ile potansiye olabilmektedir (Khakh ve ark., 1999).

P2X7 reseptörleri ise diğer tüm P2X reseptörlerinden farklı olarak, $100 \mu\text{M}$ 'dan daha fazla ATP konsantrasyonu ile aktive olurlar (Junger, 2011; Schmid ve Evans, 2019). Bu reseptörlerin BzATP duyarlılığı ATP' den 10-100 kat fazladır.

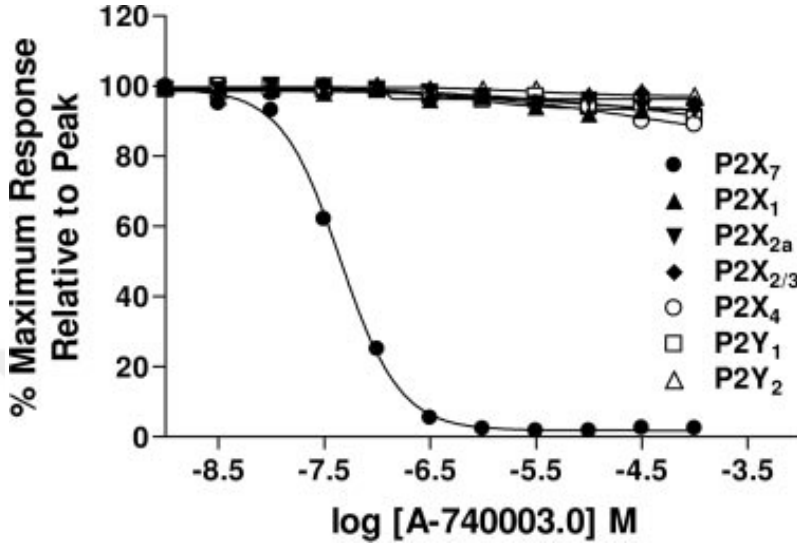
Ayrıca bu reseptörlere agonist uygulamasıyla ortaya çıkan etkiler, hücre dışı Ca^{2+} ve özellikle Mg^{2+} konsantrasyonundan diğer P2X reseptörlerine göre çok daha fazla etkilenmektedir (North, 2002). Bazı çalışmalarda fare P2X7 reseptöründe ard arda agonist uygulaması ile içeri yönlü akımın genliğinin zaman bağımlı olarak arttığı gözlenmiştir (Chessell ve ark., 1998; Hibell ve ark., 2000; Humphreys ve ark., 1998; Rassendren ve ark., 1997). P2X7 ifade ettirilmiş HEK293 hücrelerinde ise agonist uygulamasıyla hücre zarının normalde geçirgen olmadığı NMDG^+ ve YO-PRO-1 boyası gibi büyük moleküllere geçirgen hale geldiği ve ayrıca bu reseptör uyarıyla hücre zarında bleblenme yanıtı oluştuğu da gösterilmiştir (Virginio ve ark., 1999). P2X7 reseptörlerinin tanınmasında akım ve desensitizasyon karakteristiği oldukça önemlidir. Bu reseptörde diğer pürinerjik reseptörlerden farklı olarak çok uzun süreli agonist uygulamasında neredeyse hiç desensitizasyon göstermezler (North, 2002) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. HEK293 hücrelerine transfeke edilmiş P2X kanallarından ATP (P2X1-5 reseptörleri için 30 μM , sadece P2X7 reseptörü için 1 mM) uygulamasıyla alınan akımlar (North, 2002).

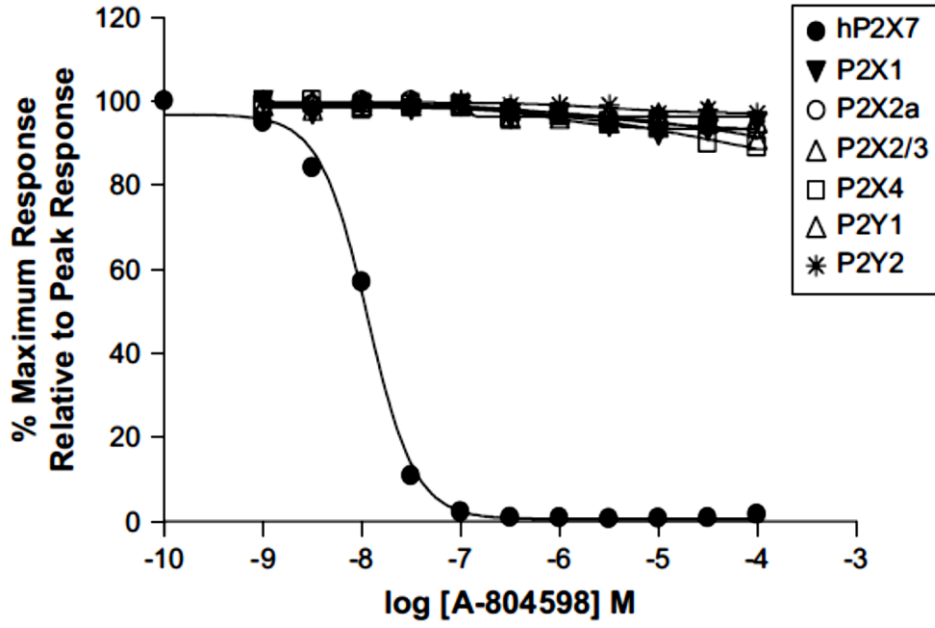
Genel P2X reseptör antagonistlerinden suramin ($\text{IC}_{50} \sim 500 \mu\text{M}$) ve PPADS ($\text{IC}_{50} \sim 50 \mu\text{M}$) bu reseptörlerde göreceli olarak etkisiz kabul edilmektedir

(Surprenant ve ark., 1996). P2X7 reseptörü için ilk tanımlanan yarışmalı antagonist A-740003 dür. Bu antagonistin diğer pürinerjik reseptörlere göre P2X7 için yüksek seçicilikte olduğu gösterilmiştir ($IC_{50} \sim 40$ nM) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Antagonist A-740003 diğer pürinerjik reseptörlere göre P2X7 reseptörü için yüksek seçicilikte bir antagonisttir. P2X1, P2X4 ve P2Y1 reseptörleri 4 μ M ATP ile, P2X2a ve P2X2a/3 reseptörleri 10 μ M ATP ile, P2Y2 reseptörleri 1 μ M UTP ile ve insan P2X7 reseptörleri 5 μ M BzATP ile aktifleştirilmiştir (Honore ve ark., 2006).

Daha sonra A-740003'den çok daha potent bir antagonist olan A-804598 sentezlenmiştir ($IC_{50} \sim 10$ nM). Bu antagonistin, EC_{70} değerlerinde agonist uygulanmış pürinerjik reseptörler arasında ~ 1 nM konsantrasyonda P2X7 için neredeyse tam blokaj sağlayarak çok yüksek seçicilikte olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.5) (Donnelly-Roberts ve ark., 2009).



Şekil 1.5. Antagonist A-804598 diğer pürinerjik reseptörlere göre P2X7 reseptörü için çok yüksek seçicilikte bir antagonisttir. P2X1, P2X4 ve P2Y1 reseptörleri 4 μ M ATP ile, P2X2a ve P2X2a/3 reseptörleri 10 μ M ATP ile, P2Y2 reseptörleri 1 μ M UTP ile ve insan P2X7 reseptörleri 5 μ M BzATP ile aktive edilmiştir. Agonist konsantrasyonları her reseptör alt tipinin EC_{70} değerine göre kullanılmıştır (Donnelly-Roberts ve ark., 2009).

1.3. Kalpte Bulunan P2 Reseptörleri

Hücre dışı ATP ve analoglarının, kardiyovasküler sistemde hücre yüzeyi P2 purinerjik reseptörleri aracılığıyla önemli etkileri vardır. Kalpte, hem ligand kapılı (P2X) hem de G-proteini kenetli (P2Y) pürinerjik reseptörlerinin varlığıyla ilgili çeşitli yöntemlerle yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur.

P2Y reseptörleri, kalp dahil birçok doku tipinde ifade edilir. P2Y reseptör alt tiplerinin ifade profillerinde kalbin farklı bölgelerinde ve türler arasında farklılıklar olduğu bulunmuştur. Fare, sıçan ve insan, fetal ve yetişkin kalplerinde farklı P2Y reseptörlerinin varlığını ve fonksiyonunu iddia eden çok sayıda çalışma mevcuttur (Bogdanov ve ark., 1998; Burnstock ve Knight, 2004; Gergs ve ark., 2014; Mazrouei

ve ark., 2015; Musa ve ark., 2009; Le ve ark., 2020; Novitskaya ve ark., 2016; Webb ve ark., 1996; Woo ve Trinh, 2020).

Kalpte yapılan araştırmalarda P2X reseptörlerinin birçok alt tipinin varlığı da iddia edilmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Kalpte bulunduğu iddia edilen P2X reseptörleri

Çalışma	P2X reseptörü alt tipi	Tür	Yöntem	Kalpte bulunduğu bölge
(Vulchano ve ark., 1996)	P2X1	Sıçan	İmmünofloresan	Kardiyak myositler interkale disklerde
(Bogdano v ve ark., 1998)	P2X1, P2X3 ve P2X4	İnsan fetüs	PCR	Fetal kalp
(Nori ve ark., 1998)	P2X1, P2X2 ve P2X4	Sıçan	PCR	P2X1,P2X2,P2X4: atriyum dokusunda P2X4: ventrikül dokusunda
(Soto ve ark., 1996)	P2X4	Sıçan	Northern blot ve PCR	Kalp dokusu
(Hu ve ark., 2002)	P2X4	Tavuk embriyo	Northern blot	Kalp dokusu
(Bo ve ark., 2003)	P2X4	Sıçan	İmmünhistokimya	Miyokardium interkale disk
(Garcia-Guzman ve ark., 1996)	P2X5	Sıçan	PCR	Kalp dokusu
(Musa ve ark., 2009)	P2X1, P2X4 ve P2X7	İnsan	PCR	P2X4, 7: Sağ atriyum, sinoatriyal düğüm P2X1: sinoatriyal düğüm
	P2X4,	Sıçan	PCR ve in situ	P2X4,5: Sağ atriyum,

	P2X5, P2X7		hibridizasyon	sinoatriyal düğüm, sol ventrikül P2X7: Sağ atriyum, sinoatriyal düğüm
(Le ve ark., 2020)	P2X4, P2X5 ve P2X7	Fare atriyal hücre hattı (HL-1)	PCR ve Western blot	Atriyal miyosit
		Sıçan	PCR ve Western blot	Atriyal (P2X4 ve P2X7 sağ atriyal miyositlerde sola göre daha fazla) ve ventriküler miyosit
(Pfleger ve ark., 2012)	P2X7	Fare	PCR, western blot, immüno Floresan	Atriyum dokusu
		Fare atriyal hücre hattı (HL-1)	Western blot	Atriyal miyosit
(Barth ve ark., 2010)	P2X7	Fare	Western Blot, immünohistokimya	Atriyum dokusu

İnsan kalbinde, P2X4 reseptörü ile beraber P2X7 reseptörünün mRNA'sının sağ atriyumda ve sinoatriyal düğümde P2X reseptörleri arasında en yüksek olduğu bulunmuştur (Musa ve ark., 2009). Aynı araştırmada miyokardiyal enfarktüs (MI) ile indüklenen kalp yetmezliği oluşturulmuş sıçanlarda, sağ atriyum ve sinoatriyal düğümde P2X4 reseptör mRNA' sının arttığı gösterilmiştir (Musa ve ark., 2009). P2X1 reseptörü mRNA'sının az miktarda insan sinoatriyal düğümünde ifade edildiği gösterilmiş, ancak insan sağ atriyumunda ifadesi bulunmamıştır (Musa ve ark., 2009). Ek olarak, P2X2, P2X3 ve P2Y11 reseptörü için mRNA, insan sağ atriyum dokusunda ve sinoatriyal düğümde tespit edilmemiştir (Musa ve ark., 2009). Sıçanlardan izole edilmiş atriyal ve ventriküler miyositlerde ve fare atriyal hücre hattı olan HL-1'de P2X4, P2X5 ve P2X7 reseptör mRNA ve proteinleri tespit edilmiştir (Le ve ark., 2020). Ayrıca, sıçan sağ atriyal miyositlerinde sola göre P2X4 ve P2X7 reseptör protein seviyesi daha fazla olduğu bildirilmiştir (Le ve ark., 2020). Araştırmacılar sıçan atriyal miyositlerden ve HL-1 hücrelerinden makaslama gerilimi

(shear stress) altında ATP salındığını, bu salımın connexin 43 (Cx43) aracılığıyla olduğunu ve atriyal hücrelerdeki P2X4 reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşen kation girişiyle atriyal miyositlerin bu şekilde otokrin bir sinyal sistemiyle de aksiyon potansiyeli oluşturabildiği iddia edilmiştir (Le ve ark., 2020). Aynı çalışmada HL-1 hücrelerinde sıçan atriyal ve ventriküler miyositlerine göre çok daha yüksek P2X7 mRNA ve protein seviyesi ölçülmüştür (Le ve ark., 2020). Fare kalplerinden alınan kesitlerde yapılan bir çalışmada immünohistokimya yöntemiyle damar endotelinde ve atriyal kardiyomiyositlerinde P2X7 reseptörü olduğunu ventriküler kardiyomiyositlerinde ise bulunmadığını ancak RNA ve protein ölçümlerinde ise hem atriyum hem de ventrikül doku homojenatlarında P2X7 reseptörü varlığını saptadıkları belirtilmiştir (Barth ve ark., 2010). Daha sonra aynı grup fare atriyum dokusunda immünofloresan, western blot ve PCR ve HL-1 hücrelerinde de western blot yöntemleriyle P2X7 reseptörleri tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Pfleger ve ark., 2012). Bu grubun yaptığı bu iki çalışma, daha önce doku homojenatlarıyla yapılmış pürinerjik reseptör protein ve RNA ölçümlerindeki çelişkili sonuçların nedenlerinden birini ortaya koymuştur. Kalp dokusu, kardiyomiyosit haricinde makrofaj, fibroblast ve endotel gibi hücreleri de barındırdığı için doku homojenatlarıyla yapılan çalışmalarda sonuçları sadece kardiyomiyositlere atfetmeyi ve dolayısıyla pürinerjik reseptörlerin hücre spesifik olarak varlığını ortaya koymayı ve fonksiyonunu anlamayı güçleştirmektedir.

Embriyonik çalışmalarda ATP'nin kardiyak gelişim programını modüle ettiği ve fare embriyonik kök hücrelerine ATP uygulamasıyla kardiyak hücre sayısında artış olduğu gösterilmiştir (Mazrouei ve ark., 2015). Aynı çalışmada bu hücrelerin ATP-tetiklemeli farklılaşması boyunca P2X7'nin yanında P2X1, P2X4, P2X6, P2Y1, P2Y2, P2Y4 ve P2Y6 reseptörlerini ifade ettiği gösterilmiştir (Mazrouei ve ark., 2015). Sıçan embriyonik kardiyomiyositlerinde yapılan bir çalışmada da P2X7 reseptör ifadesinin 18. embriyonik günden itibaren başladığı bulunmuştur (Cheung ve ark., 2015).

1.4. ATP'nin Kardiyak Kasılabilirliği Üzerine Etkileri ve P2 Reseptörleri

Kalpte, hücre dışı ATP'nin hem negatif hem de pozitif inotropik etkileri vardır (Çizelge 1.3). Hücre dışı ATP, kardiyak kontraksiyonu iki şekilde de etkileyebilir ve etkileri farklı türler arasında değişiklik gösterir. Fare ve insan atriyumunda UTP kaynaklı pozitif inotropik etki gözlenmiş ve bu etkiye P2Y2 veya P2Y4 reseptörlerinin aracılık ettiği ileri sürülmüştür (Gergs ve ark., 2014). Sıçan ve insan atriyumunda yapılmış iki çalışmada, ATP önce kısa süreli negatif inotropik ardından uygulama boyunca pozitif inotropik etki göstermiştir (Froldi ve ark., 1994; Gergs ve ark., 2008). İnsan sağ atriyumundaki çalışmada, ATP'nin pozitif inotropik etkisine P2X4 benzeri reseptörler aracılık ettiği öne sürülmüştür çünkü spesifik olmayan P2 reseptör antagonisti suramin ve PPADS veya PLC blokörü ve adenilat siklaz inhibitörü tarafından bloke edilmemiştir (Gergs ve ark., 2008). Bu çalışmadaki araştırmacıların “P2X4 benzeri reseptörler” çıkarımını destekleyen, spesifik olmayan P2 reseptör antagonisti suramin ve PPADS (IC₅₀ değeri P2X1, P2X2, P2X3 ve P2X5 için ~1-10 µM; P2X4 ve P2X7 için ~500 µM (Jarvis ve Khakh, 2009)) ve PLC ve adenilat siklaz inhibitörü verileri yazarların ifade ettiği gibi sadece P2X4 reseptörünün varlığını değil, aynı zamanda P2X7 reseptörünün varlığını da destekleyebilir. Aynı çalışmada dikkat edilmesi gereken diğer önemli veri de dakikalar süren ATP uygulaması boyunca yanıtın desensitize olmadan devam etmesidir. Aslında bu yanıt karakteristiği daha çok P2X7 reseptörünü düşündürmektedir.

Çizelge 1.3: ATP ve türevlerinin kalpteki inotropik etkileri

Çalışma	Reseptör	Tür	Agonist	Etki	Kalpte bulunduğu bölge
(Gergs ve ark., 2008)	P2X4	İnsan	ATP	Bifazik (Negatif-Pozitif)	Sağ Atriyum
(Froldi ve ark.,	P2Y	İnsan, Sıçan,	UTP	Pozitif	Atriyum

1994; Gergs ve ark., 2008; Gergs ve ark., 2014)		Fare			
(Froldi ve ark., 1994)	P2X	Sıçan	2-MeS-ATP	Negatif	Atriyum
		Fare	2-MeS-ATP	Pozitif	Atriyum
(Scamps ve Vassort, 1990)	P2X4	Sıçan	ATP	Pozitif	Ventrikül
(Hu ve ark., 2001)	P2X4	Fare	2-MeS-ATP	Pozitif	Ventrikül
(Yang ve ark., 2014)	P2X4	Fare	2-MeS-ATP ivermektin	Pozitif	Ventrikül

1.5. ATP'nin Kalp Atım Hızı Üzerine Etkileri ve P2 Reseptörleri

Klinikte ATP'nin supraventriküler aritmileri tedavi etmek için kullanıldığı ve bu etkiden serumda ATP' den bozulan adenozinin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Saito ve ark., 1986). Kurbağa atriyumunda, P1 agonisti adenozininin, ATP'nin negatif kronotropik etkisini taklit ettiği gösterilmiştir (Burnstock ve Meghji, 1981). Tavşan sinoatriyal düğüm hücrelerinde yapılmış bir çalışmada adenozinin, asetilkolin ile aktive olan K⁺ kanallarını (KACH) aktive ettiği gösterilmiştir (Belardinelli ve ark., 1988). Kurbağa pacemaker hücrelerinde, ATP (100 µM) uygulamasının bifazik etkiler oluşturduğu öncelikle geçici olarak atım hızını ve Ca²⁺ tranziyent genliğini artırdığını ve bunun sonrasında atım hızında azalmanın olduğunu gösterilmiştir (Ju ve ark., 2003). Ayrıca, bu etkinin P2Y1 reseptörleri aracılığıyla modüle edildiği iddia edilmiştir (Ju ve ark., 2003). Sıçandan alınan sinoatriyal düğüm içeren atriyal şeritte,

ATP; kalp atım hızını azaltmıştır (Braganca ve ark., 2019). Bu çalışmada ATP tarafından indüklenen negatif kronotropinin, P2X4 reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Braganca ve ark., 2019). ATP'nin neden olduğu negatif kronotropik ve pozitif inotropik etkinin, P2X4 reseptörünün aktivasyonu ile oluşan Na^+ girişinin $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ değiş-tokuşçusunun (NCX) inhibisyonuna veya ters moda dönmesine yol açarak ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Braganca ve ark., 2019). Ayrıca P2X reseptör aktivasyonu Na^+ ve Ca^{2+} akışına neden olarak kardiyomiyosit kasılmasını uyarabilir. ATP, Ca homeostazı ve membran potansiyel değişikliklerine neden olarak kalp aritmileri ve atriyoventriküler bloklara yol açabilir (Guerra Martinez, 2019). Membrandan yüksek miktarda katyon geçişine neden olabilen kalpte hali hazırda bulunan veya ortaya çıkacak diğer pürinerjik reseptörler de benzer şekilde kronotropik etkiler oluşturabilir.

1.6. Projenin Önemi ve Amacı

ATP'nin kalp üzerindeki etkileri uzun zamandır bilinmektedir. Bu etkilere birçok P2 reseptörünün aracılık ettiği yukarıdaki açıklamalardan da anlaşılabacaktır. Ancak P2X7 reseptörlerinin fonksiyonel olarak memeli kardiyak hücrelerinde var olup olmadığı netleşmemiş bir konudur. Bu P2X reseptör alt tipinin memeli atriyal kardiyak hücrelerinde var olabileceğini gösteren mRNA ve protein ölçümlerinden yukarıda bahsedilmiştir. Ancak mRNA ölçümleri P2X7 reseptörlerinin endotel hücrelerinde ve kan hücrelerinin bir kısmında da eksprese edilmesi nedeni ile yanıltıcı pozitif sonuç verebilirler. P2X7 reseptörüne spesifik antikorlarla yapılan western blot ve immünohistokimya çalışmalarında da bazı artefakların yanıltıcı pozitif sonuçlara yol açtığı da çok iyi bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda western blot ve immünohistokimya yöntemleri ile kardiyak hücrelerde gösterilen proteinin fonksiyonel bir P2X7 reseptörüne işaret edip etmediğini araştırdık. Fare atriyum kökenli ve pek çok açıdan kardiyak hücre özelliklerini iyi korumuş bir hücre serisi olan HL-1 hücrelerini deneysel kolaylığı nedeni ile kullandık ve bu hücrelerde daha önceden antikor temelli yöntemlerle tespit edilen proteinin bir fonksiyonel P2X7 reseptörü olup olmadığını inceledik. Daha sonra sıçan ve fare ventrikül ve

atriumlarından enzimatik olarak izole edilen kardiyak hücrelerde de bu reseptörün varlığını araştırdık.

Bu çalışma ile memeli atriyal hücrelerinde fonksiyonel P2X7 reseptörlerinin varlığının gösterilmesi, bu reseptörün insan kardiyomiyositlerinde de var olduğu iddiaları da göz önüne alındığında, hem kardiyak fizyolojide rol alan yeni bir tip reseptörün, hem de potansiyel bir ilaç hedefinin tanımlanmasında rol oynayabilecektir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada fare atriümü kökenli olan HL-1 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, HL-1 için onaylı %10 fetal dana serumu (FBS) (Gibco), 0,1 mM norepinefrin, 2 mM L-Glutamin ve penisilin ve streptomisin içeren Claycomb hücre solüsyonu içinde kültür flasklarında ve 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ bulunduran inkübatörde büyütülmüştür. Hücreler ekilmeden önce flask veya petri tabanı en az 1 saat boyunca %0,02 jelatin ve 5 µg/ml fibronectin içeren solüsyonla kaplanmıştır. Daha sonra bu solüsyon çekilerek uygun miktarda Claycomb hücre solüsyonu (Sigma) doldurularak hücreler ekilmiştir. Hücreler %90-100 yoğunluğa eriştiklerinde Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu ile kaldırılarak 300g de 2-3 dk santrifüjledikten ve süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti Claycomb hücre solüsyonu ile çözülmüş ve önceden hazırlanmış flaslara (innovatech) 1:3 oranında ekilmiştir. Deney için kullanılan hücreler, planlanan deney gününden 3-4 gün önce kırık veya tam yuvarlak cam lamellere ekilmiştir.

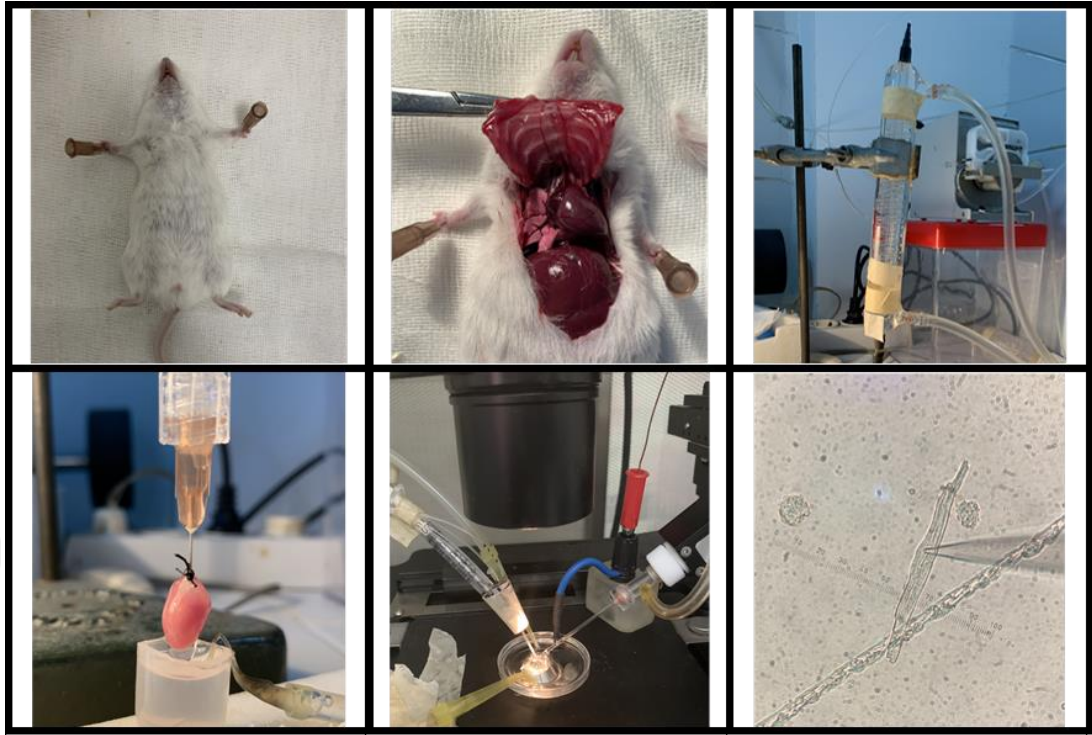
2.2. Kardiyomiyositlerin İzolasyonu

Çalışmamızda 30 adet Wistar albino erkek sıçan ve 30 adet BALB/c erkek fare kullanılmıştır. Deney hayvanları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilmiş ve deney gününe kadar su ve yem kısıtlaması olmaksızın 21±2°C oda sıcaklığında Ankara Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Deney Hayvanı Bakım Ünitesinde barındırılmıştır. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 22/07/2020 tarihli ve 2020-13-120 sayılı karar numarası numarası ile alınan onay belgesi EK-1'de verilmiştir. Yaklaşık 6 aylık erkek sıçan veya fareler sodyum pentobarbital (80 mg/kg, ip) kullanılarak anestezi altına alındıktan sonra göğüs kafesi açılmış ve kalp hızlıca çıkarılmıştır. Kalp, harici dokulardan temizlendikten sonra Langenndorf

perfüzyon sistemine aorttan bağlanarak retrograd perfüzyon başlatılmıştır. 2-3 dk boyunca önce enzim içermeyen ve % 100 O₂ ile gazlandırılan, kalsiyumsuz perfüzyon çözeltisi ile yıkanarak kandan temizlendikten sonra dokuyu parçalamak amacıyla kullanılan enzimleri içeren çözeltiliye geçilmiş ve 25-30 dk boyunca bu çözelti ile perfüze edilmiştir. Bu sürecin sonunda atriyum ve ventrikül birbirinden kesilerek ayrıldıktan sonra dokular makas yardımıyla küçük parçalara bölünmüş, sonra mekanik olarak çalkalanarak hücrelerin serbestleşmesi sağlanmıştır. Hücreler filtreden geçirildikten sonra sırasıyla 0, 0,3 ve 0,5 mM Ca²⁺ içeren çözeltiler içine aktararak hücrelerin kalsiyuma adaptasyonu sağlanmıştır. Fare ve sıçan için kullanılan çözeltilerin bileşimi Çizelge 2.1’ de ayrıntılı olarak verilmiştir. Fareden atriyal miyosit izolasyon aşamaları Şekil 2.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Sıçan ve fare kardiyomiyosit izolasyonu içerikleri

Kullanılan kimyasal madde	Sıçan (mM) (pH: 7,2)	Fare (mM) (pH: 7,4)
NaCl	117	117
KCl	5,7	5,4
MgCl₂	3,6	3,6
KH₂PO₄	1,5	-
NaHCO₃	4,4	-
HEPES	20	10
Taurin	20	-
Glikoz	10	10
Enzim	Collagenase Type 2 (1,2 mg/ml) (Worthington)	Liberase Research Grade (0,0222 mg/ml) (Roche)



Şekil 2.1. Fareden atriyal miyosit izolasyon aşamaları.

2.3. Floresan Boya Girişi Ölçümü

Membrandan büyük molekül ağırlığındaki moleküllerin geçişini görüntüleyebilmek için normal koşullarda hücre zarından geçemeyen ancak agonist uygulamasıyla hücre geçirgenliği arttığında hücre içine girip DNA'ya bağlanan ve bu şekilde floresan özellik kazanan pozitif yüklü YO-PRO-1 boyası kullanılmıştır. Kayıt sırasında içeriği 150 mM NaCl, 5 mM KCl ve 10 mM HEPES, 10 mM glikoz, 5 μ M YO-PRO-1, pH 7.4 olan banyo çözeltisi kullanılmıştır. YO-PRO-1 ölçümlerinde uyarılma için 488 nm lazer kullanılmış ve 500 nm üstü emisyon toplanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda agonist uygulanarak reseptör aktivasyonuna bağlı olarak hücre içine girişi incelenen YO-PRO-1 boyası konfokal mikroskopla (Leica TCS-SP5) görüntülenmiş ve ölçülmüştür.

2.4. ATP-duyarlı Katyon Akımlarının Kaydedilmesi

Çalışmada ATP-duyarlı katyon akımları, yama-kenetleme tekniğinin voltaj-kenetleme modunda ve tüm hücre konfigürasyonunda ölçülmüştür. Kullanılan voltaj protokolleri metin içinde belirtilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda antagonist ve agonist çok kanallı bir mikro perfüzyon sistemi yoluyla uygulanarak membran akımlarındaki değişim kaydedilmiştir. Kayıtlarda, direnci 2,1-2,6 MΩ olan elektrotlar kullanılmıştır. Ölçümlerde kullanılan hücre içi ve hücre dışı çözelti içerikleri Çizelge 2.2’ de verilmiştir. Akımlar AXON marka Axopatch 200B model patch-clamp amfisi kullanılarak kaydedilmiştir. Deneyler oda sıcaklığında yapılmıştır. Ölçülen akım değerleri hücre sığasına oranlanarak akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden verilmiştir.

Çizelge 2.2. Akım kayıtlarında kullanılan çözelti içerikleri

Hücre dışı çözelti (pH: 7,4)					
Çözelti İsmi	NaCl (mM)	KCl (mM)	HEPES (mM)	CaCl₂ (mM)	Glikoz (mM)
K(+)Ca(+)	150	5	10	1,8	10
K(-)Ca(-)	150	5	10	-	10
K(-)Ca(+)	155	-	10	1,8	10
K(-)Ca(-)	155	-	10	-	10
Hücre içi çözelti (pH: 7,2)					
Çözelti İsmi	NaCl (mM)	KCl (mM)	HEPES (mM)	EGTA (mM)	MgATP (mM)
K(+)Pipet	-	130	25	5	3
K(-)Pipet	130	-	25	5	3

2.5. Kullanılan Agonist ve Antagonistler

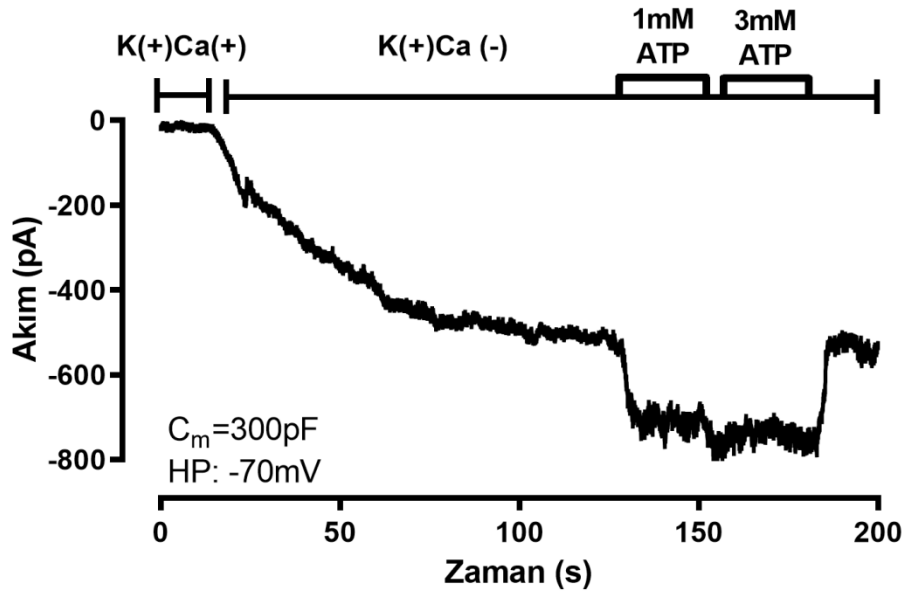
P2X7 antagonisti A-740003 (N-(1-[(Cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide; Alamone Labs), P2X7 antagonisti A-804598 (N-Cyano-N''-[(1S)-1-phenylethyl]-N'-5-quinolinyl-guanidine; Alamone Labs), ATP (Sigma), BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate triethylammonium salt; Sigma).



3. BULGULAR

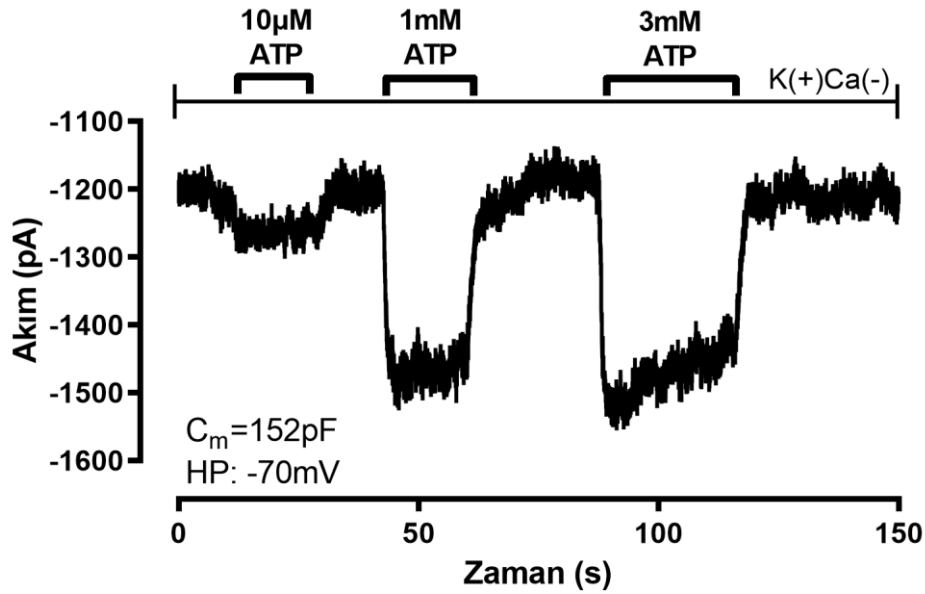
3.1. İzole Sıçan Atriyum ve Ventrikül Hücrelerine ATP Etkisi

Literatür bilgisi ve yapılan ön deneyler kardiyomiyositlerde P2X7 reseptörü olabileceğini düşündürdüğü için erişkin sıçanlardan izole edilmiş kardiyomiyositlere reseptörün agonisti olan ATP ile deneylere başlandı. P2X7 reseptöründe diğer pürinerjik reseptörlerden farklı olarak ATP için EC₅₀ değeri birkaç yüz mikromolar civarında olduğu ve yanıtı net görebilmek için ATP öncelikle milimolar düzeyinde kullanıldı. Ayrıca divalan katyonların özellikle P2X7 reseptör yanıtını bloke ettiği bilindiği için kayıtlar Mg²⁺ ve Ca²⁺ içermeyen çözeltiler içinde alındı. Sıçan ventrikül hücrelerine hücre dışı ATP uygulaması ile alınmış akım kayıt örneği Şekil 3.1’ de verilmiştir.



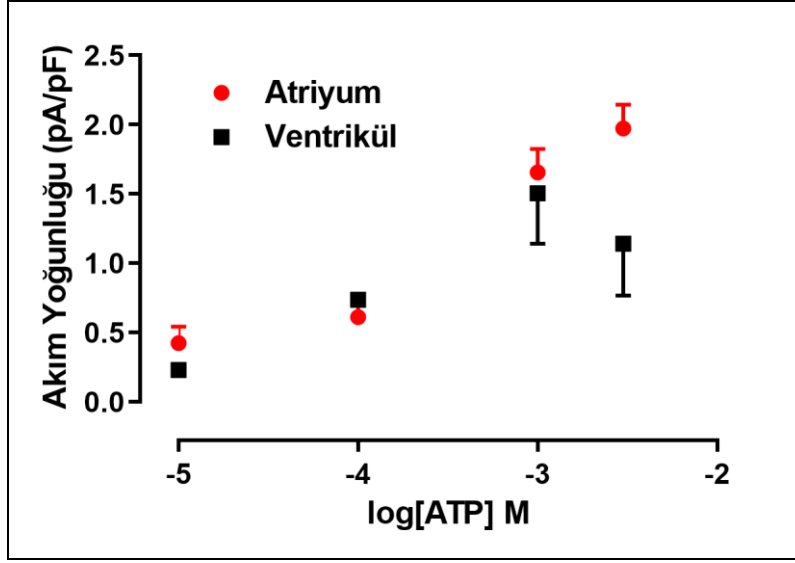
Şekil 3.1. -70 mV’ a kenetlenmiş sıçan ventrikül hücrelerinde ATP etkisini gösteren örnek kayıt. Hücrelere K(+)Ca(-) hücre dışı çözelti varlığında 1 mM ve 3 mM ATP uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(+)Pipet kullanılmıştır.

Şekil 3.1’ de kayıt Ca^{2+} içeren çözelti varlığında başlamaktadır. Daha sonra agonist uygulaması öncesi Ca^{2+} içermeyen çözeltiye geçince negatif yönde bir süre artan ancak sonra sabitlenen bir akım gözlemlendi. Önce bu etkinin “seal” kaybı olabileceğini düşündük ancak daha sonra sadece “seal” kaybından kaynaklanmadığı ortaya çıktı. Bu nedenle daha sonra bu etki göz önüne alınarak kayıt başlamadan önce divalant içermeyen ortama geçilerek stabilize olması beklendikten sonra kayıtlar alındı ve etki değerlendirildi. Sıçan atriyum hücrelerine hücre dışı ATP uygulaması ile alınmış akım kayıt örneği Şekil 3.2’ de verilmiştir.



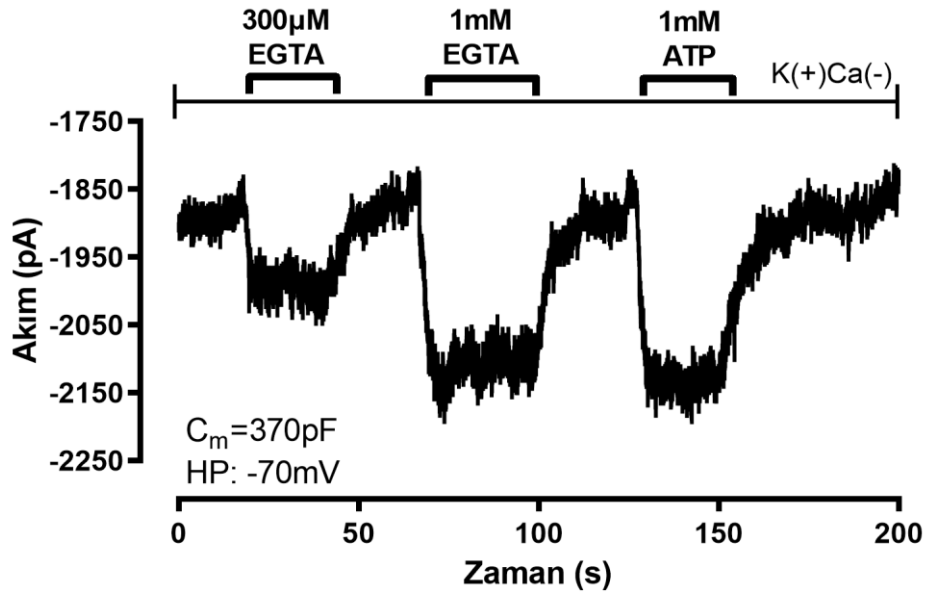
Şekil 3.2. -70 mV’ a kenetlenmiş sıçan atriyum hücrelerinde ATP etkisini gösteren örnek kayıt. Hücrelere K(+)Ca(-) hücre dışı çözelti varlığında 10 µM, 1 mM ve 3 mM ATP uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(+)Pipet kullanılmıştır.

Sıçan atriyum ve ventrikül hücrelerine sabit -70 mV tutma potansiyelinde (HP) farklı konsantrasyonlarda ATP uygulanarak elde edilmiş doz-yanıt ilişkisi Şekil 3.3’ de verilmiştir.



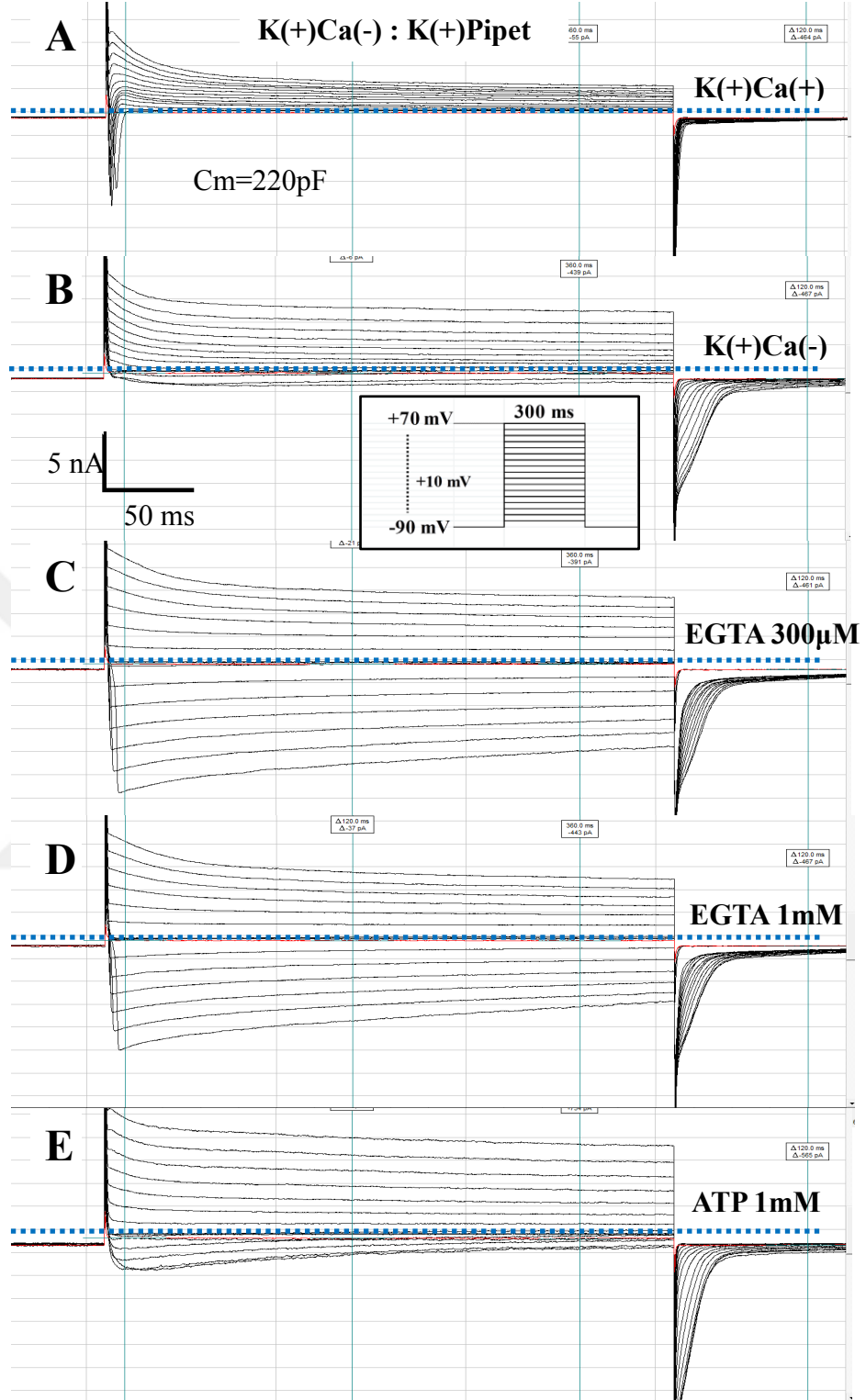
Şekil 3.3. -70 mV' a kenetlenmiş sıçan atriyum ve ventrikül hücrelerinde ATP uygulanarak elde edilmiş doz-yanıt ilişkisi. Hücelere K(+)Ca(-) hücre dışı çözelti varlığında 10 ve 100 μ M, 1 ve 3 mM ATP uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(+)Pipet kullanılmıştır. Değerler hücre sığasına oranlanarak akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden ve ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir. n=3-8 hücre.

Atriyum ve ventrikül hücrelerinde ATP uygulamasıyla elde edilen doz-yanıt ilişkisi (Şekil 3.3), EC_{50} değerinin 100 μ M'ın üzerinde olacağına ve P2X7 reseptörü için tanımlanmış aralıkta olacağına işaret etmektedir. Ancak Ca^{2+} içermeyen çözeltiye geçince ortaya çıkan etki tam olarak aynı olmasa da ATP uygulamasıyla oluşan etkiye benzerlik göstermektedir. ATP'nin divalan bağlayabilen bir molekül olması yapılan ölçümlerde çelasyon etkisinin gözardı edilemeyeceğini düşündürmektedir. Bu nedenle akım yanıtlarının oluşmasında olası bir çelasyon etkisini araştırmak için EGTA ve ATP etkisini karşılaştırmalı inceledik. Şekil 3.4' de sıçan ventrikül hücrelerini -70 mV potansiyeline kenetleyip 300 μ M ve 1 mM EGTA ve 1 mM ATP uygulanarak elde edilmiş örnek akım kaydı verilmiştir.



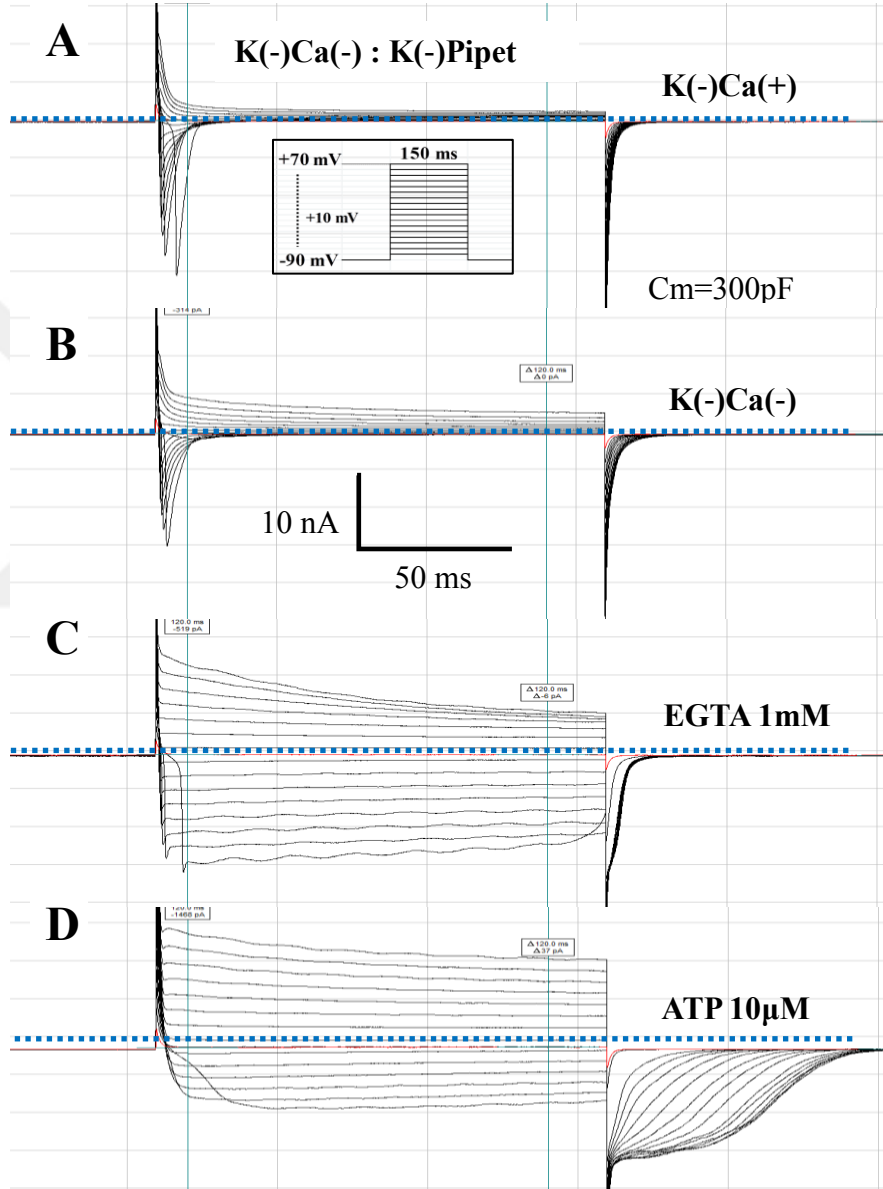
Şekil 3.4. -70 mV' a kenetlenmiş sıçan ventrikül hücrelerinde EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek kayıt. Hücrelere K(+)Ca(-) hücre dışı çözelti varlığında 300 µM ve 1 mM EGTA ve 1 mM ATP uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(+)Pipet kullanılmıştır.

Sıçan ventrikül hücrelerinde, -70 mV kenet potansiyelinde EGTA, hücreler arasında farklılıklar olsa da, ATP'ye benzer ve ATP kadar akımlar oluşturmuştur (Şekil 3.4). EGTA ve ATP' nin oluşturduğu akımların potansiyel-akım ilişkisini görmek için kayıtlar alındı. Şekil 3.5' de sıçan ventrikül hücrelerinden alınan bir kayıt örneği görülmektedir.



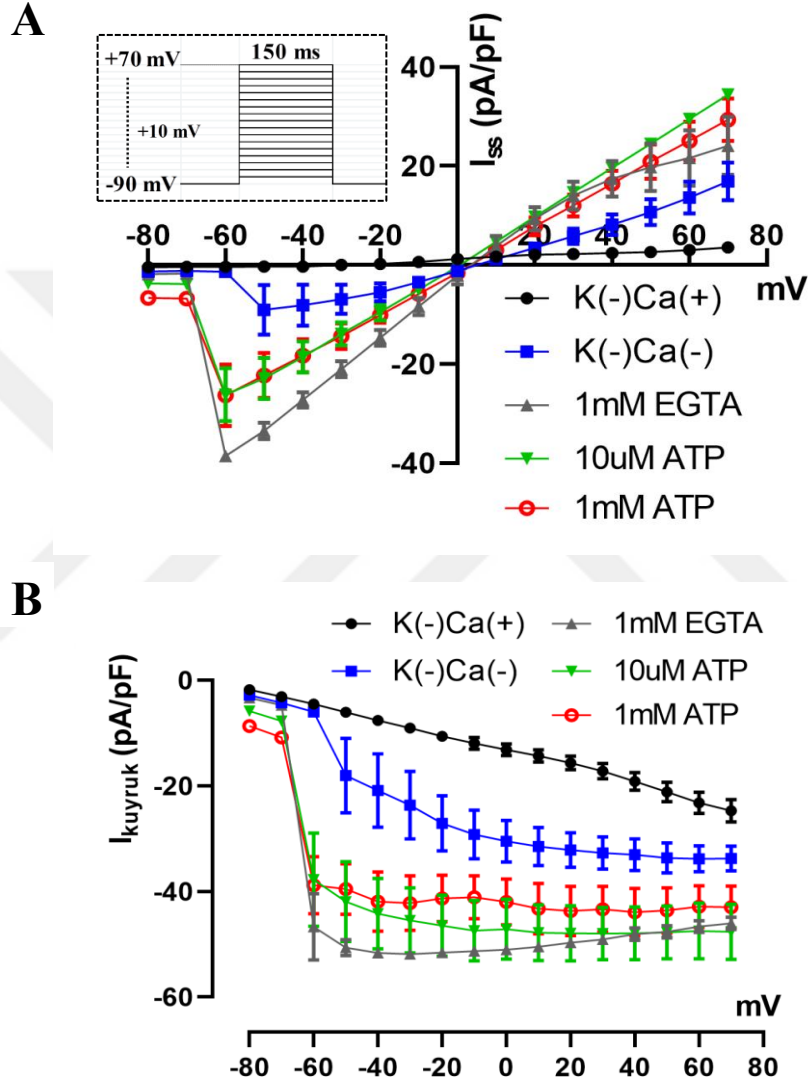
Şekil 3.5. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek kayıtlar. Hücrelere $K(+)Ca(-)$ hücre dışı çözelti varlığında $300 \mu M$ EGTA (C), $1 mM$ EGTA (D) ve $1 mM$ ATP (E) uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak $K(+)Pipet$ kullanılmıştır. Kayıt protokolü şekil içindeki bölümde bölümde gösterilmiştir. Akımın sıfır noktası her kayıt üzerinde mavi renkli kesikli çizgiyle işaretlenmiştir.

300 μM ve 1 mM EGTA'nın neredeyse 8 nA büyüklüğünde ve belirgin inaktivasyon göstermeyen, ancak voltaj bağımlı bir akıma neden olduğu görülmektedir (Şekil 3.5). Ortaya çıkan akımı daha izole hale getirmek için sıçan ventrikül hücrelerinde K^+ içermeyen hücre içinde K(-)Pipet ve dışında K(-)Ca(-) çözeltileri varlığında EGTA ve ATP akım kayıtları alındı (Şekil 3.6).



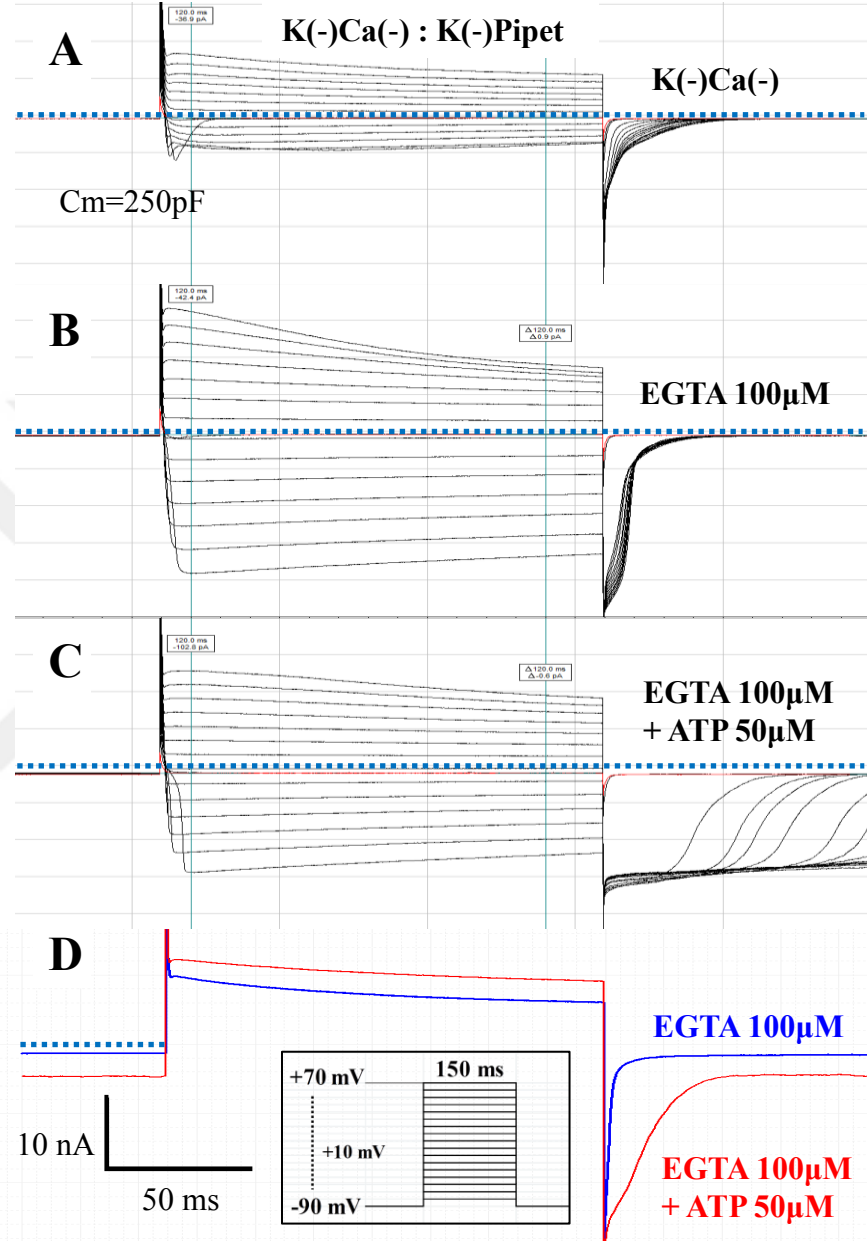
Şekil 3.6. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek kayıtlar. Hücrelere K(-)Ca(-) hücre dışı çözelti varlığında 1 mM EGTA (C) ve 10 μM ATP (D) uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(-)Pipet kullanılmıştır. Kayıt protokolü şekil içindeki bölümde bölümde gösterilmiştir. Akımın sıfır noktası her kayıt üzerinde mavi renkli kesikli çizgiyle işaretlenmiştir.

Sıçan ventrikül hücrelerinde hem EGTA hem de düşük konsantrasyondaki (10 μ M) ATP benzer şekilde etki göstermiş ve çok yavaş inaktivasyon gösteren büyük akımlar ortaya çıkarmışlardır. Ortaya çıkan akımların akım-voltaj (I-V) karakteristiği Şekil 3.7’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA veya ATP uygulanarak alınmış kayıtların akım-voltaj (I-V) karakteristiği. 150 ms’lık voltaj pulsunun sonundaki değerler I_{ss} (A), kenetleme pulsunun sabit tutma potansiyeline (HP) dönüşte oluşan kuyruk akımında kapasitif akım bittiği noktadaki değerler I_{kuyruk} (B) panellerinde verilmiştir. Hücrelere K(-)Ca(-) hücre dışı çözelti varlığında 1 mM EGTA, 10 μ M ve 1 mM ATP uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(-)Pipet kullanılmıştır. Kayıt protokolü şekil içinde kesikli çizgili bölümde gösterilmiştir. Bütün değerler hücre sığasına oranlanarak akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden verilmiştir. n=3-5 hücre.

Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA varlığında ATP uygulanarak ATP etkisi izole edilmeye çalışıldı (Şekil 3.8).



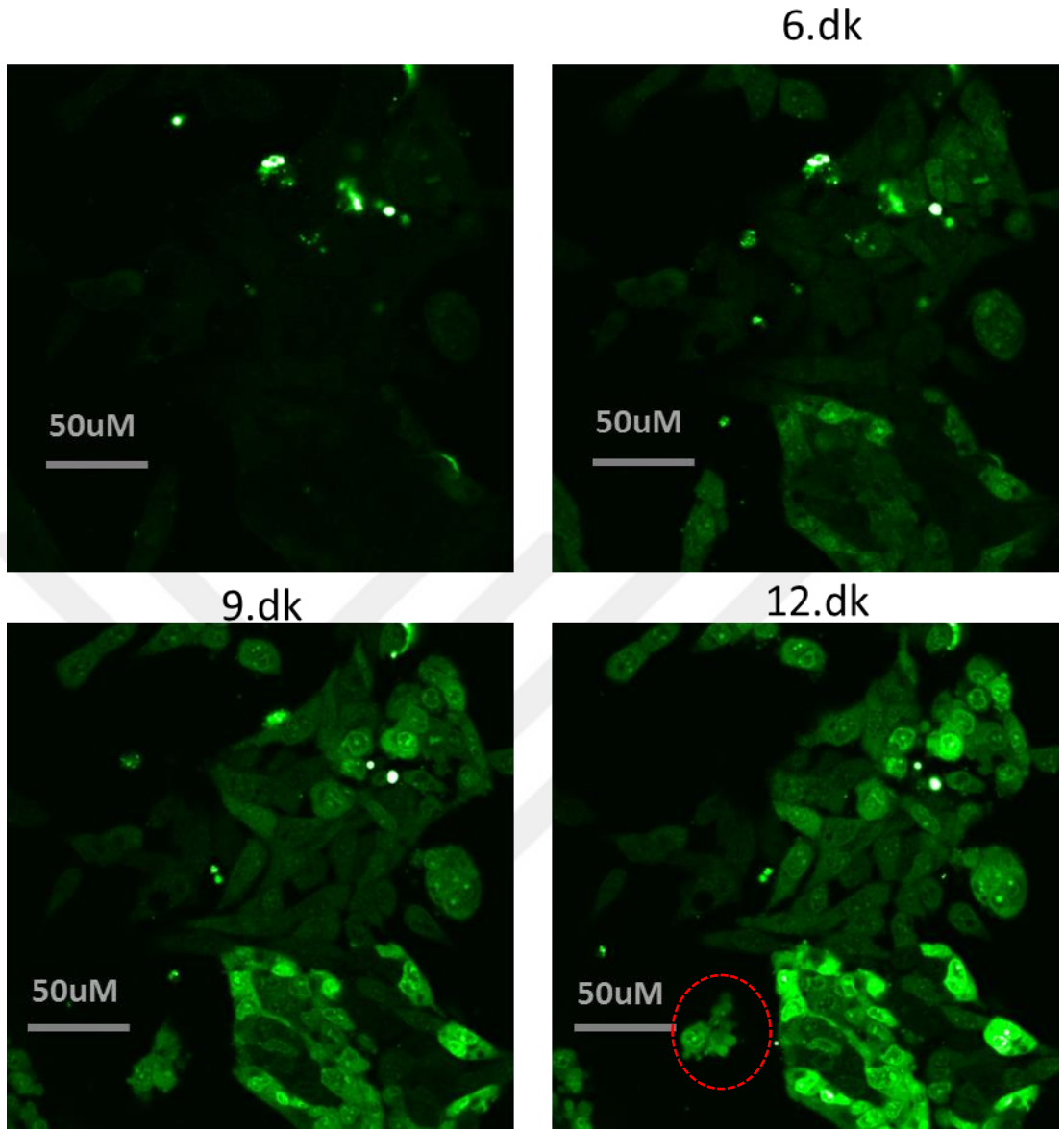
Şekil 3.8. Sıçan ventrikül hücrelerine EGTA varlığında ATP etkisini gösteren örnek kayıtlar. Hücrelere K(-)Ca(-) hücre dışı çözelti varlığında 100 μM EGTA (B) ve 100 μM EGTA varlığında 50 μM ATP (C) uygulanmıştır. “EGTA 100μM + ATP 50μM” kayıtdaki erişim direnci (Access resistance, R_a) en iyi durumuna getirilip tekrar kayıt alındıktan sonra “EGTA 100μM” ile kıyaslanması ile çelasyon etkisinden ayrılmış ATP yanıtının örneği verilmiştir (D). Hücre içi çözelti olarak K(-)Pipet kullanılmıştır. Kayıt protokolü şekil içindeki bölümde gösterilmiştir. Akımın sıfır noktası her kayıt üzerinde mavi renkli kesikli çizgiyle işaretlenmiştir.

Kayıt sırasında erişim direncindeki (Access resistance, R_a) artış Şekil 3.7.C'deki gibi kuyruk akımlarında deaktivasyonun çok yavaşlamış gibi görünmesine neden olmaktadır. Ancak aynı kayıt erişim direnci en düşük seviyeye getirilip alındığında ve yine erişim direnci benzer derecede düşük olan “EGTA 100 μ M” ile kıyaslandığında Şekil 3.7.C’deki kadar dramatik olmasa da ATP uygulamasının kuyruk akımlarında deaktivasyonda belirgin bir yavaşlamaya neden olduğu görülmektedir (Şekil 3.7.D). 50 μ M ATP akımların genliği üzerinde büyük bir etki oluşturmamış sadece kuyruk akımlarındaki deaktivasyonu yavaşlatmıştır. Şekil 3.6, 3.7 ve 3.8’de görüldüğü üzere 10 ve 50 μ M gibi düşük ATP konsantrasyonlarında da ortaya çıkabilen ve özellikle akımların deaktivasyonu üzerinde ortaya çıkan bu etkilerin P2X7 aracılı olmadığı, daha çok P2Y aracılı olabileceğini düşünmekteyiz.

Özetle sıçan ventrikül hücrelerinde Ca^{2+} içermeyen banyo çözeltilerinde ATP uygulaması -60 mV da neredeyse tamamen aktive olan, voltaj bağımlı bir katyon akımı oluşturmaktadır. Bu etki EGTA uygulaması ile tam olarak taklit edilebilmektedir. Dolayısı ile ATP nin bu etkisinin divalant katyon, özellikle de Ca^{2+} çelasyonu özelliğine bağlı fiziko-kimyasal bir etki olabileceğini düşündük.

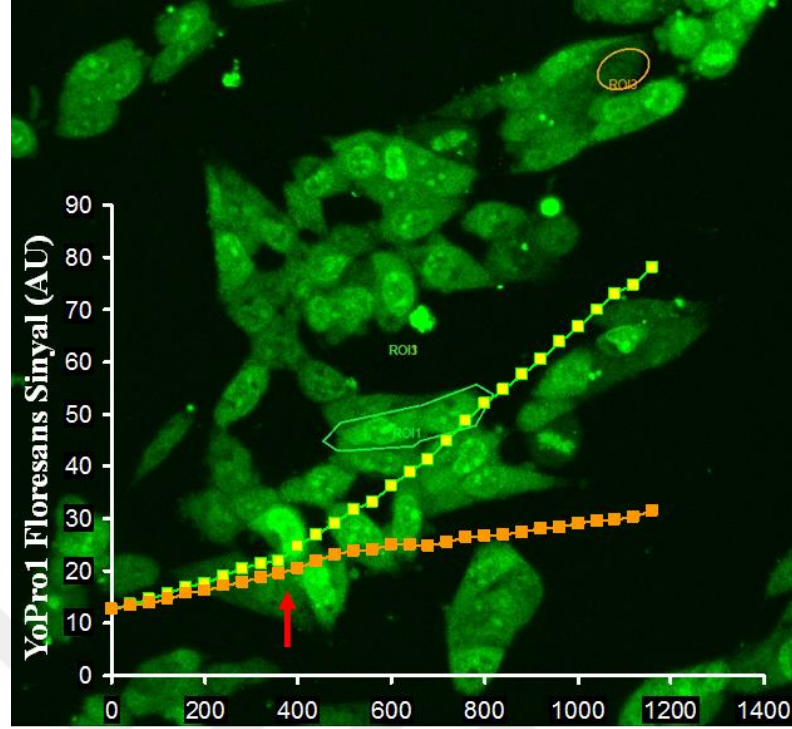
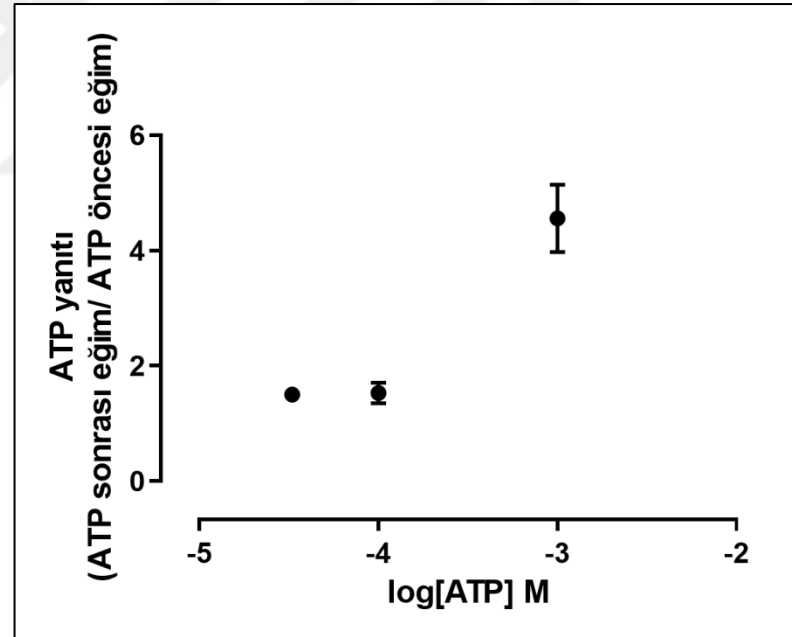
3.2. HL-1 Hücrelerine ATP Etkisi

Daha önceki çalışmalarda fare atriyal miyositleriyle birlikte fare atriyal miyositlerinden türetilmiş hücre hattı olan HL-1 hücrelerinde de P2X7 reseptörünün varlığı protein ölçümlerine dayanarak iddia edilmiştir. P2X7 reseptörü P2X2 ve P2X4 reseptörü gibi aktifleştğinde Ca^{2+} , Na^+ ve K^+ gibi küçük katyonların yanında NMDG ve YO-PRO-1 DNA boyası gibi büyük molekülleri de geçirebilmektedir. YO-PRO-1 boyası hücre içine girip DNA’ya bağlandıktan sonra floresans veren bir boyadır. Bu reseptörlerin membrandaki varlığını fonksiyonel olarak göstermek için kullanılabilmektedir. HL-1 hücrelerinde 1mM ATP uygulaması konfokal mikroskopta YO-PRO-1 boya girişi ölçüldü ve dakikalar içinde boya girişiyle birlikte P2X7 aktivasyonu ile ortaya çıkan bleb lenmeler gözlemlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. HL-1 hücrelerinde ATP uygulamasıyla YO-PRO-1 boya girişini gösteren örnek kayıtlar. Hücelere K(+)Ca(-) hücre dışı çözeltide 5 μ M YO-PRO-1 varlığında 1 mM ATP uygulanmıştır. Daire içindeki alanda bleblenmiş hücreler görülmektedir.

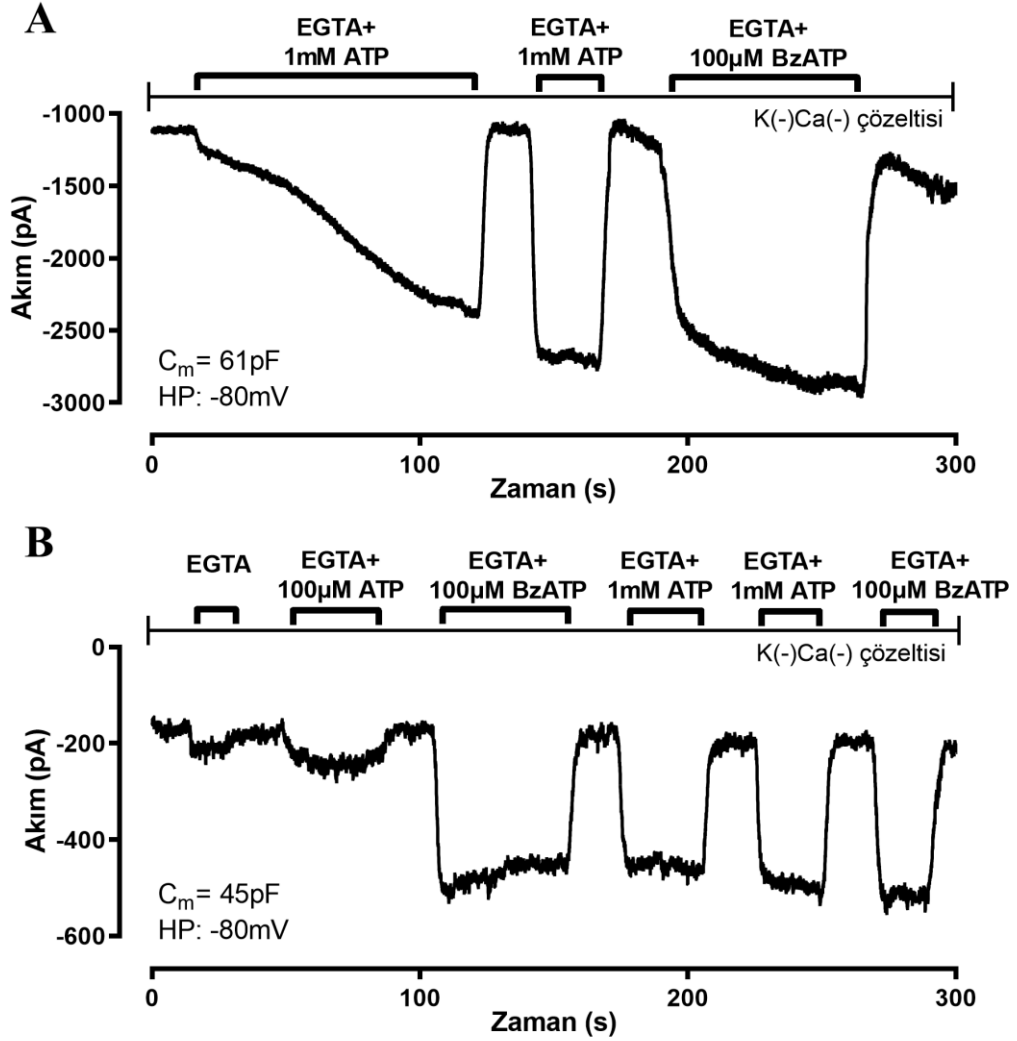
HL-1 hücrelerinde ATP uygulamasıyla ortaya çıkan YO-PRO-1 boya girişi ve floresans artışı yanıtının analiziyle ilgili örnek şekil ve farklı konsantrasyonlarda ATP uygulamasıyla ortaya çıkan yanıt değerleri Şekil 3.10' da verilmiştir.

A**B**

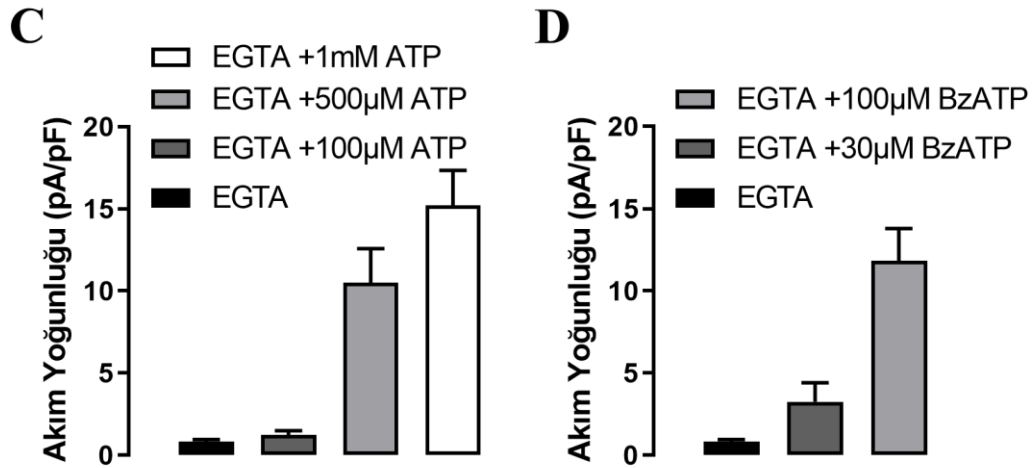
Şekil 3.10. HL-1 hücrelerinde ATP uygulamasıyla YO-PRO-1 boya girişini ve floresans sinyalinin zamana bağlı değişimini gösteren örnek kayıt (A) ve farklı konsantrasyonlarda ATP uygulamasıyla oluşan boya giriş hızları (ATP sonrası floresans artış eğimi / ATP öncesi floresans artış eğimi oranı olarak) verilmiştir (B). Zamana bağlı floresans değişimi bir cevap veren (yeşil ROI ve grafik), bir de cevap vermeyen (turuncu ROI ve grafik) hücrede gösterilmiştir. ATP uygulama anı şekilde kırmızı okla belirtilmiştir. Hücrelere K(+)/Ca(-) hücre dışı çözeltide 5 μ M YO-PRO-1 varlığında şekilde belirtilen konsantrasyonlarda ATP uygulanmıştır.

YO-PRO-1 boyası ile HL-1 hücrelerinde yapılan deneyde ATP için EC_{50} değerinin $100 \mu M$ ' ın üzerinde olacağı görülmektedir (Şekil 3.10.B).

Daha önce sıçan ventrikül hücrelerinde divalan katyonların çelasyonunun ATP ile benzer etkiler oluşturabildiğini gözlemlemiş ve ATP' nin etkisinin muhtemelen reseptör aracılı değil ATP'nin de oluşturabileceği divalan katyon çelasyonu etkisinden olabileceğini EGTA deneyleri ile görmüştük. Bu çelasyon etkisini ATP nin reseptör aracılı etkisinden ayırt edebilmek için ATP uygulamasını HL-1 hücrelerinde EGTA varlığında yaptık. HL-1 hücrelerinde de EGTA'nın ve EGTA varlığında uygulanan ATP ve BzATP etkileri Şekil 3.11'de verilmiştir.



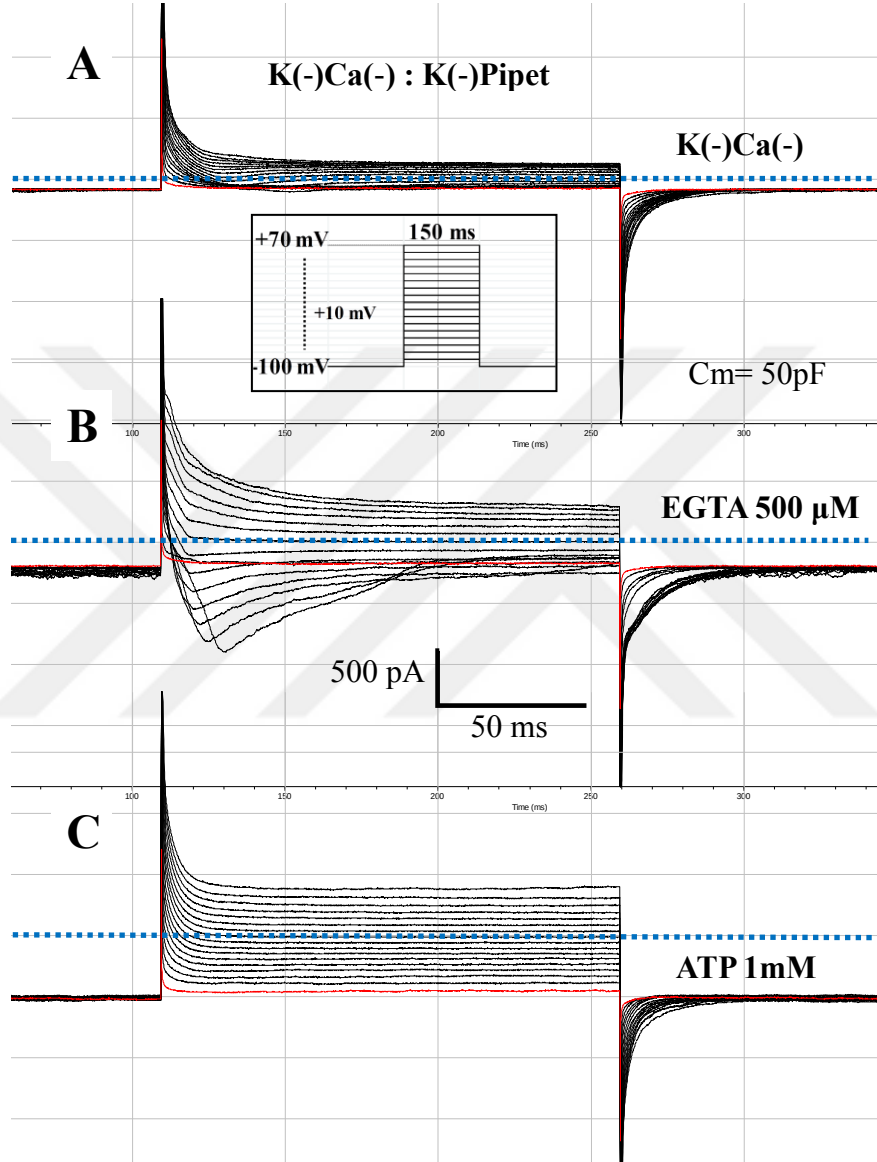
Şekil 3.11. Devamı diğer sayfadadır.



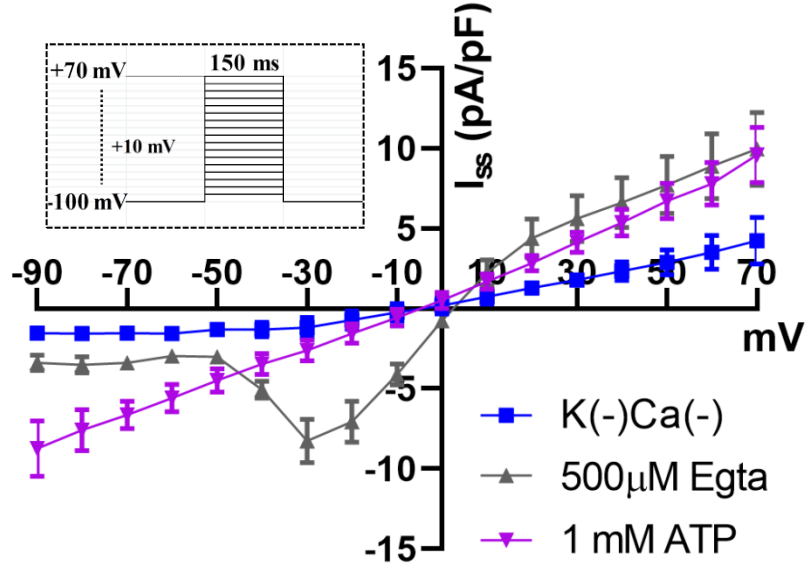
Şekil 3.11. -80 mV' a kenetlenmiş HL-1 hücrelerinde EGTA varlığında agonist yanıtları. Hücrelere K(-)Ca(-) hücre dışı çözeltisi içinde 500 µM EGTA, 500 µM EGTA +100 µM; 500 µM; 1 mM ATP veya 500 µM EGTA + 30 µM; 100 µM BzATP uygulanmıştır. EGTA varlığında uygulanan ATP ve BzATP için kaydedilen akım örnekleri (A) ve (B) de, ortalama değerler ise (C) ve (D) de gösterilmiştir. Hücre içi çözelti olarak K(-)Pipet kullanılmıştır. Değerler hücre sığasına oranlanarak akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden ve ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir. n=9-17 hücre.

Tekrarlanan ve uzun süreli agonist uygulamaları sonucunda P2X7 yanıtının saniyeler hatta dakikalar içinde yavaş yavaş arttığı ve bir noktada da en yüksek değerine ulaştıktan sonra sabit genlikte yanıtlar oluşturduğu bilinmektedir. P2X7 akımı için tipik olan bu akım kinetiği Şekil 3.11.A' da HL-1 hücreleri için de açıkça görülmektedir. EGTA uygulamasının, yani çelasyonun, -80 mV' a kenetlenen HL-1 hücrelerinde sıçan ventriküllerinden farklı olarak çok küçük bir etki oluşturması agonist varlığında alınan ölçümlerin fiziko-kimyasal bir çelasyon etkisinden çok reseptör aracılı etkinin bir sonucu olduğunu düşündürmektedir. Akım karakteristiğine bakıldığında 30-40 saniyelik agonist uygulamaları boyunca akımlar desensitize olmadan aktif kalmıştır. Agonist doz-cevap eğrilerine bakıldığında ise BzATP duyarlılığının ATP duyarlılığına göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 3.11.C ve D).

HL-1 hücrelerinde EGTA ve EGTA varlığında agonist uygulamasının potansiyel bağımlı akımlara olan etkilerini örnek akım kayıtları Şekil 3.12 ve akım-voltaj karakteristiği eğrileri Şekil 3.13’de verilmiştir.



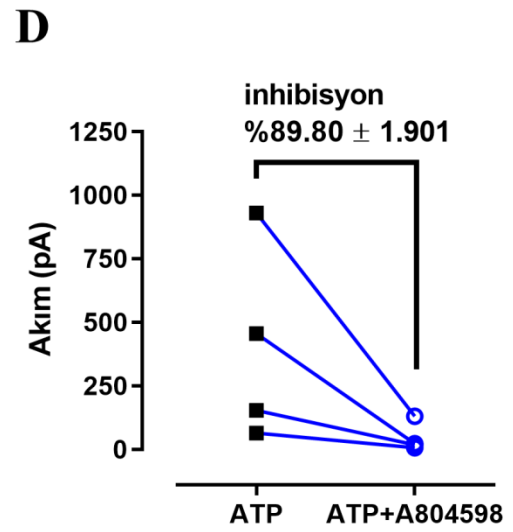
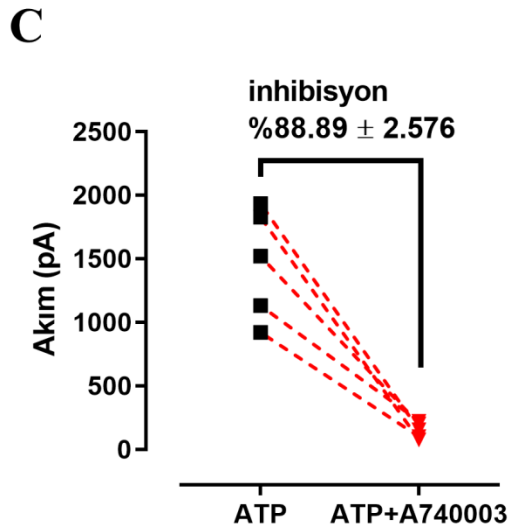
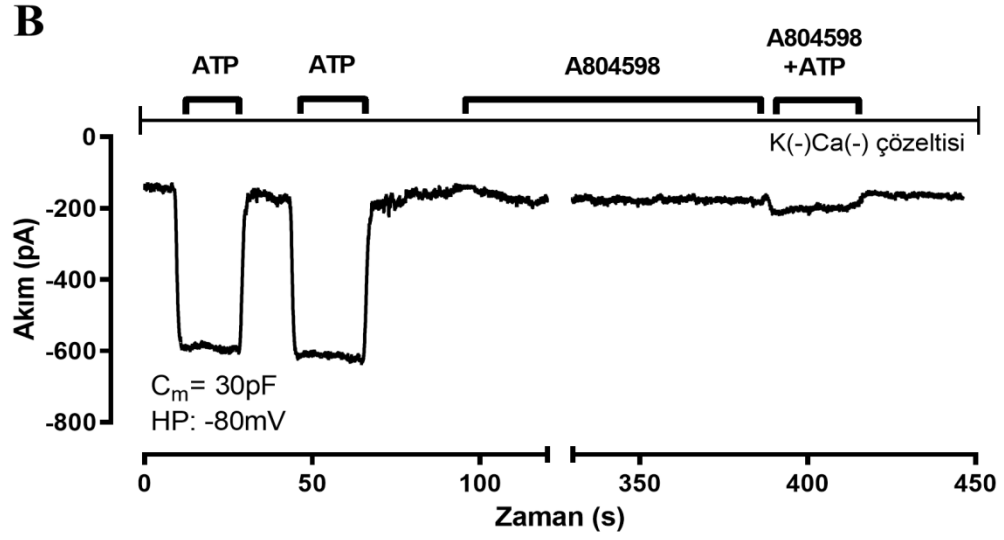
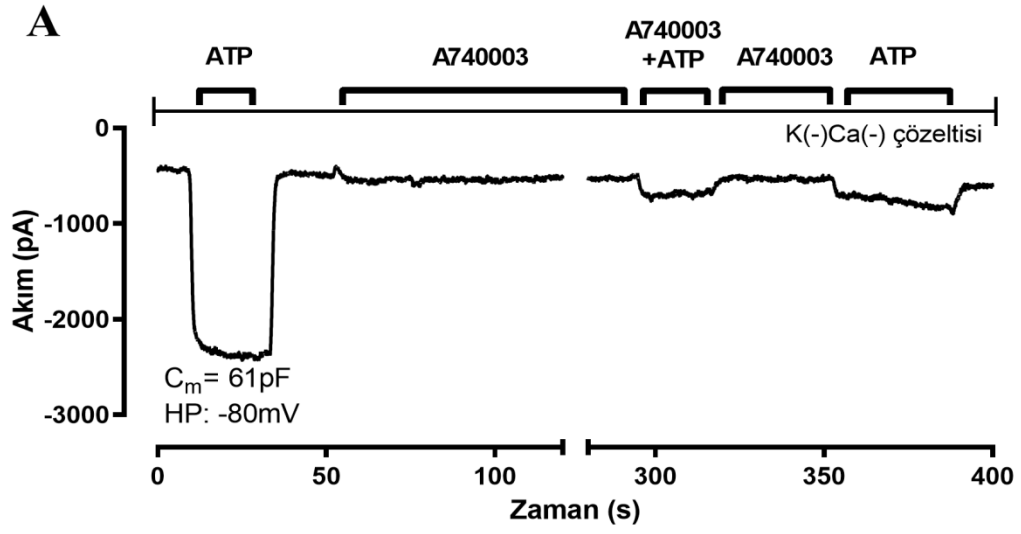
Şekil 3.12. HL-1 hücrelerinde EGTA ve ATP etkisini gösteren örnek kayıtlar. Hücelere $K(-)Ca(-)$ hücre dışı çözelti varlığında $500 \mu M$ EGTA (B) ve $1 mM$ ATP (C) uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak $K(-)Pipet$ kullanılmıştır. Kayıt protokolü şekil içindeki bölümde bölümde gösterilmiştir. Akımın sıfır noktası her kayıt üzerinde mavi renkli kesikli çizgiyle işaretlenmiştir.



Şekil 3.13. HL-1 hücrelerinde EGTA ve ATP uygulanarak alınmış kayıtların akım-voltaj (I-V) karakteristiği. 150 ms'lik kenetleme pulsunun sonundaki değerler I_{ss} olarak verilmiştir. Hücrelere K(-)Ca(-) hücre dışı çözelti içinde 500 μ M EGTA ve 1 mM ATP uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(-)Pipet kullanılmıştır. Kayıt protokolü şekil içinde kesikli çizgili bölümde gösterilmiştir. Bütün değerler hücre sığasına oranlanarak akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden verilmiştir. n=4-9 hücre.

EGTA uygulaması, yani divalan iyon çelasyonu, HL-1 hücrelerinde potansiyel bağımlı aktivasyon gösteren bir akım oluştururken ATP potansiyelden bağımsız agonistle aktifleşen bir akım ortaya çıkarmıştır. EGTA uygulaması, yani çelasyon HL-1 hücrelerinde her iki voltaj protokolünde de (sabit kenet potansiyellerinde ve puls protokolü ile) alınan akımlarda da sıçan ventriküllerindekinden hem daha küçük hem de kinetik olarak farklı (100 ms içinde büyük oranda inaktive olan) bir etki oluşturduğu görülmektedir. Ayrıca ATP' nin tek başına uygulandığında voltaj bağımlı bir akım oluşturmadığı da görülmektedir. Bu nedenle HL-1 hücrelerinde agonist varlığında gözlenen akımların fiziko-kimyasal bir çelasyon etkisinden çok reseptör aracılı etkinin bir sonucu olduğu söylenebilir.

HL-1 hücrelerinde, P2X7 reseptörü için oldukça seçici olduğu bilinen antagonistler ile kayıtlar alındı ve inhibisyon oranları değerlendirildi (Şekil 3.14).

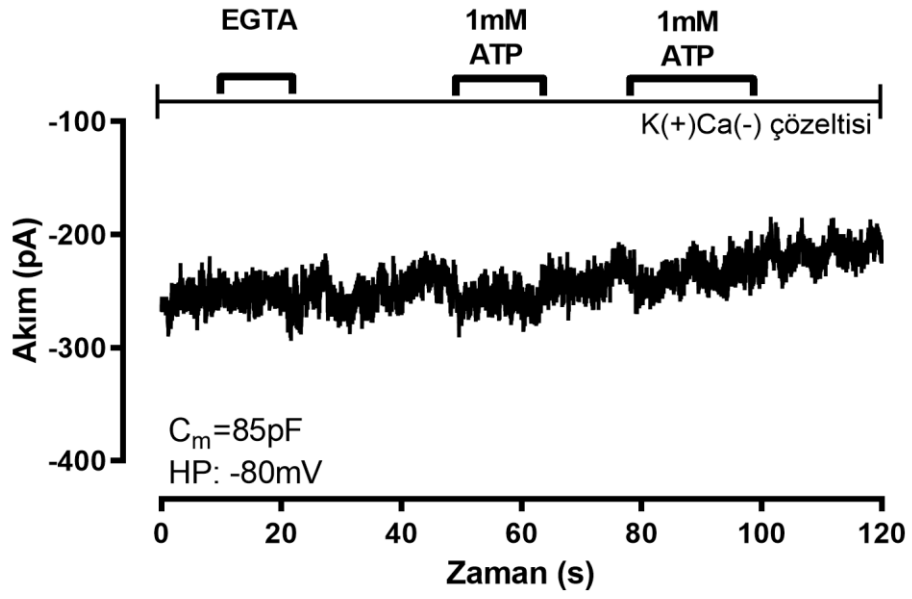


Şekil 3.14. HL-1 hücrelerinde sabit -80 mV tutma potansiyelinde ATP ile oluşan yanıtın üzerinde seçici P2X7 antagonistlerinin etkisi. Antagonist A740003 (3 µM) varlığında alınmış örnek kayıt (A) ve inhibisyon oranı akım değerleriyle birlikte (C) ve antagonist A804598 (0,9 µM) varlığında alınmış örnek kayıt (B) ve inhibisyon oranı akım değerleriyle birlikte (D) verilmiştir. Hücrelere K(-)Ca(-) hücre dışı çözelti içinde 400 µM ATP defalarca uygulanarak yanıt maksimize edildikten sonra antagonistler yaklaşık 5 dk uygulanıp ATP ve antagonistler birlikte uygulanarak antagonist yanıtları elde edilmiştir. Hücre içi çözelti olarak K(-)Pipet kullanılmıştır. İnhibisyon oranı değerleri % olarak ve ortalama $\pm$ SEM şeklinde verilmiştir. n=4-5 hücre.

HL-1 hücrelerinde her iki seçici P2X7 antagonistinin (A740003 3 µM ve A804598 0,9 µM) ardışık uygulamalarla maksimize edilmiş 400 µM ATP yanıtını yaklaşık %90 oranında inhibe etmesi bu hücrelerdeki ATP yanıtının P2X7 reseptör aracılı olduğunu kuvvetle düşündürmektedir.

3.3. Fare Atriyum Hücrelerinde ATP Etkisi

Genç ve yaşlı fare kalplerinden izole edilmiş atriyum hücrelerinde çok sayıda deney yapıldı ancak hücre zar potansiyeli -80 mV' a kenetli kardiomyositlerde ATP uygulaması ile oluşan bir yanıt gözlemlenemedi. Şekil 3.15' de fare atrium hücrelerine EGTA ve ATP uygulamasıyla alınmış örnek bir akım kaydı verilmiştir. Benzer şekilde farklı günlerde 10'u genç 7'si yaşlı olmak üzere farklı hayvanlardan izole edilmiş olan toplam 17 hücreden alınmış kayıtların hiçbirinde ATP uygulamalarıyla oluşan bir akım yanıtı gözlenmemiştir.



Şekil 3.15. Membran potansiyeli -80 mV' a kenetlenmiş fare atriyum hücrelerinde EGTA ve ATP uygulanarak alınmış örnek kayıt. Hürelere K(+)Ca(-) hücre dışı çözeltisi içinde 500 μ M EGTA ve 1 mM ATP uygulanmıştır. Hücre içi çözelti olarak K(+)Pipet kullanılmıştır.

4. TARTIŞMA

ATP, hücre içi enerji kaynağı olmasının yanı sıra nöronal hücreler, endotel hücreleri, kas hücreleri gibi birçok hücre tipinden salınan önemli bir hücre dışı kimyasal haberci olarak kabul edilmektedir ve P2 purinerjik reseptörleri aracılığıyla pek çok farklı hücrenin fonksiyonlarını düzenlemektedir (Burnstock, 2006). ATP, sempatik sinirlerden noradrenalin ile birlikte aynı sinaptik veziküllerde bulunur ve noradrenalin ile mekanizmayı kullanarak bir ko-nörotransmitter olarak salınır (Burnstock, 1972). Sinaptik nöronlara ek olarak (Burnstock, 1990), kardiyak miyositler (Paddle ve Burnstock, 1974; Williams ve Forrester, 1983), endotel hücreleri (Bodin ve ark., 1991; Ralevic ve Burnstock, 1998), düz kas hücreleri (Pearson ve Gordon, 1979), trombositler (Holmsen, 1985) ve diğer hücre türlerinin çeşitli uyarılara yanıt olarak ATP' yi sitozolden hücre dışı boşluğa saldığı da gösterilmiştir. Kalpteki koroner arterdeki ATP düzeyi elektriksel uyarı, kardiyotonik ajanların uygulanması (Darius ve ark., 1987; Vial ve ark., 1987), mekanik gerilme (Uozumi ve ark., 1998), daha yüksek kan akışı (Vials ve Burnstock, 1996), yüksek iş yükü (Doyle ve Forrester, 1985) ve hipoksi / iskemi (Kuzmin ve ark., 1998; Vial ve ark., 1987) ile önemli ölçüde artar. Dolayısı ile hücre dışı ATP kalpte bir nörotransmitter/otakoid olarak görev yapmaktadır.

Hücre dışı ATP etkileriyle kalp üzerinde inotropik ve kronotropik etkileri gösteren hem birbirlerini destekleyen hem de birbiriyle ters düşen çok sayıda çalışma mevcuttur (Burnstock ve Meghji, 1983; Fleetwood ve Gordon, 1987; Hollander ve Webb, 1957; Hopkins, 1973). ATP'nin kalp üzerindeki etkilerinin bazı P2X ve P2Y reseptörleri ile ilişkili olduğu iddia eden çalışmalar mevcuttur (Froldi ve ark., 1994; Hu ve ark., 2001; Gergs ve ark., 2008; Gergs ve ark., 2014; Scamps ve Vassort, 1990; Yang ve ark., 2014).

Hücre dışı ATP'nin kalp kasında çok önemli bir sinyal molekülü olduğu düşünülmektedir. Kalpte P2X reseptörlerinin varlığı çeşitli çalışmalarla iddia edilmiş olmakla beraber P2X tipi reseptörlerin uyarılabilir bir hücre tipi olan

kardiyomiyositlerdeki varlıkları ve rolleri pek de netleşmemiş bir konudur. P2X7 alt tipinin de kardiyomiyosit hücrelerinde var olduğu ile ilgili dolaylı gözlemler vardır. Ancak P2X7 reseptörünün kalpte başta endotel ve kan hücreleri olmak üzere başka tip hücrelerde de eksprese olması ve ayrıca P2X proteinini tanıyan antikörlerin yalancı pozitif bazı sonuçlar verebildiğinin iyi bilinmesi gibi nedenlerden dolayı bu proteinin kardiyomiyositlerde gerçekten var olup olmadığı belli değildir. Ayrıca kardiyomiyositlerde bir P2X7 reseptörünün var olduğunu gösteren doğrudan fonksiyonel bir gözlem de mevcut değildir. Pürinerjik reseptörlerden biri olan P2X7 reseptörün diğer P2X reseptörlerinden oldukça farklı olan özellikleri düşünüldüğünde kalbin kasılmasında, uyarılabilirliğinde, morfolojisinde ve genel olarak işlevinde önemli bir yeri olabileceği anlaşılabilmektedir.

Bu çalışmamızda sıçan ventrikül ve atriyum hücrelerinde nominal olarak Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi divalan katyon içermeyen bir hücre dışı çözelti içinde ATP uygulamasının sabit potansiyele kenetlenmiş hücrelerde ligand kapılı reseptör uyarısı ile uyumlu bir akım oluşturabildiğini gözlemledik. Bu akımların doz-cevap eğrilerine baktığımızda da bunların EC_{50} değerlerinin P2X7 reseptörü ile oldukça uyumlu olduğunu görmemize rağmen, bu akımlara çok benzer akımları hem nominal Ca^{2+} içermeyen hem de EGTA uygulaması ile de oluşturabilmemiz, ve ayrıca literatürde özellikle ventrikül hücrelerinde P2X7 reseptör proteininin ve mRNA' sının olmadığı bilgisi de göz önüne alındığında, bu akımların bir divalan iyon çelatörü olan ATP' nin zaten nominal Ca^{2+} içermeyen çözeltideki var olan minimal kalsiyum iyonunu da çelate ederek, çok düşük derişimlere indirmesinden doğan seçici olmayan akımlar olabileceğini düşündük. Bizim çalışmamızda EGTA ve ATP'nin her ikisinin de oluşturduğu akımların voltaj-akım karakteristikleri bu akımların divalan iyon çelasyonu ile özellik değiştiren L-tipi Ca^{2+} kanallarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Sıçan ventrikül hücrelerinde ATP uygulayarak elde ettiğimiz akımların doz-yanıt ilişkisi ile yine sıçan ventrikül hücrelerinde benzer çözeltilerle yapılmış bir başka çalışmada elde edilen ATP akımlarının doz-cevap eğrisi çarpıcı bir benzerlik göstermektedir. P2Y2 reseptörlerinin uyarılması sonucu aktive olan TRPC3/7 kanallarına atfedilen bu akım için ölçtükleri EC_{50} değeri $558 \mu M$ dır ve bu değer ilginç olarak bilinen P2Y reseptörlerinin aralığının oldukça dışında yüksek bir

değerdir (Alvarez ve ark., 2008). Bu çalışmada ATP ile oluşan akımın sadece düşük dozlarda oluşan kısmının hangi mekanizma ile olduğu tartışılmış, yüksek dozlarda oluşan kısmının hangi mekanizma ile oluştuğu konusuna ise hiç değinilmemiştir. Bizim sıçan ventrikül hücrelerinde ATP ve aynı zamanda EGTA ile uyarılabildiğini gözlediğimiz akım Alvarez ve ark.'nın çalışmasında gözlemlediği akımın yüksek dozlarda oluşan kısmı olabilir. Buna ek olarak literatürde var olan başka bilgiler memeli ventrikül hücrelerinde özellikle de sıçan ventriküler miyositlerinde bu tip akımlar oluşturabilecek iki olası adayı daha işaret etmektedir. Bunlardan birincisi düşük divalan derişimlerinde aktive olduğu iddia edilen ve (I_{MIC}) olarak adlandırdıkları bir TRP (TRPM6 veya TRPM7) kanalı akımı (Gwanyanya ve ark., 2004), İkincisi ise düşük divalan koşullarında özellik değiştiren L-tipi Ca^{2+} kanallarının, Ca^{2+} derişiminin çok düşmesi ile hem seçiciliklerini hem de inaktivasyon özelliklerini kaybetmesi oluşan bir akımdır (Matsuda, 1986; Yuan ve ark., 1996). Bu akımlardan birini veya birkaçını ATP uygulaması ile gözlemlediğimizi düşünmekteyiz. Literatürde bahsedilen akımların çok düşük Ca^{2+} derişimlerine hassas oluşu da ($10 \mu M$ 'lık derişimler neredeyse akımları tümüyle inhibe veya aktive etmektedir. (Gwanyanya ve ark., 2004)) bu hipotezimizi güçlendirmektedir. Dolayısı ile elimizdeki bulgular sıçan ventriküler ve atrial miyositlerinde ATP uyarısı ile gözlemlediğimiz akımların, kalsiyum iyonlarının ATP ile çelasyonu sonucu çok düşük derişimlere inmesi ile oluşan bir çeşit seçici olmayan katyon akımı olduğunu göstermekte ve ATP' nin bu hücrelerde herhangi bir ligand kapılı kanal akımı (yani P2X reseptör akımı) oluşturduğuna dair bir delil sunmamaktadır. Aktive olan bu akımın ne olduğunu ise konumuz dışında kaldığı için daha fazla araştırmadık. Ancak ATP' nin çelasyon mekanizması haricinde neden olduğu bir etki olarak EGTA varlığında uygulanan 10 ve 50 μM ATP' nin yol açtığı ve çelasyonla aktive olan akımların deaktivasyonunda belirgin bir yavaşlamayı burada bir dip not olarak belirtmek isteriz. ATP' nin bu konsantrasyon aralığında etki göstermiş olması bu deaktivasyonu uzatıcı etkinin P2Y reseptörü aracılı olabileceğini düşündürmüştür. Sıçan ventrikül hücrelerinde ATP uygulaması ile L-tipi Ca^{2+} akımlarının genliğinin arttığı ve bu artışın P2Y aracılı olduğu da öne sürülmüştür (Scamps ve Vassort, 1994).

Literatürdeki çok sayıdaki çalışmada sıçan ventrikül ve atrial dokusunda çeşitli P2X reseptör mRNA ve proteinlerinin tespit edilmiş olduğunu dolayısı ile bu reseptörlerin bu dokulardaki kardiyomiyositlerde bulunduğunun iddia edildiğini yukarıda belirtmiştik. Özellikle atrial kardiyomiyositlerde P2X7 reseptörünün varlığı iyi araştırılmış olduğu için bu dokudan elde edilen kardiyomiyositlerde herhangi bir P2X akımı gözlemleyememiş olmamız bizi literatürdeki bulguların bir artefakt olabileceği fikrine götürdü. Bir proteinin mRNA' sının bir hücrede bulunması o proteinin varlığı için gerekli olduğu ancak bunun yeterli koşul olmadığı iyi bilinmektedir. Ayrıca antikorların western blot ya da immunohistokimya deneylerinde non-spesifik reaksiyon vermesi de gayet olasıdır. Fare atriyal hücre hattı olan HL-1'de P2X4, P2X5 ve özellikle P2X7 reseptör mRNA' sı tespit edilmiş ve western blot yöntemi ile de proteinlerin varlığı iddia edilmiştir (Le ve ark., 2020). Aynı çalışmada fare atrium dokusunda P2X7 reseptörünün varlığını gösteren antikorlar HL-1 hücrelerinde de bu proteine ait bantlar göstermiştir (Le ve ark., 2020). Başka bir çalışmada da HL-1 hücrelerinde de western blot yöntemiyle P2X7 reseptörleri tespit edildiği bildirmiştir (Pfleger ve ark., 2012). Le ve arkadaşlarının bu yukarıda bahsedilen bulgusu bize western blot ve immünohistokimya yöntemlerinin gösterdiği proteinin gerçekten de P2X7 reseptörü olup olmadığını test etme şansı verdi.

HL-1 hücrelerinde ATP uygulaması ile oluşan akımları inceledik. Yaptığımız deneylerde yukarıda ayrıntılı olarak açıkladığımız ve ventrikül hücrelerinde gördüğümüz divalan iyon çelasyonu ile oluşan akım yanıtını ATP' nin reseptör aracılı yanıtlarından ayırabilmek amacı ile ATP ve BzATP' yi EGTA varlığında uyguladık ve ayrıca sadece EGTA uygulaması ile oluşan yanıtlarla kıyasladık. ATP 1 mM ve BzATP ise 100 µM konsantrasyona kadar uygulanmış ve bu derişimlerde artmaya devam eden akımlara neden olmuştur. P2X7 reseptörleri ise diğer tüm P2X reseptörlerinden farklı olarak, 100 µM' dan daha fazla ATP konsantrasyonu ile aktive olurlar (Junger, 2011; Schmid ve Evans, 2019). Bu reseptörlerin BzATP duyarlılığı fare dokusunda ATP' den 5 kat kadar kat fazladır (Bartlett ve ark., 2014). Bizim, HL-1 hücrelerinde elde ettiğimiz bulguların işaret ettiği ATP doz-yanıt ilişkisinin EC₅₀ değeri ve BzATP ile ATP potenslerinin farkı literatürde P2X7 için

tanımlanmış olan değerlerle son derece uyumludur. HL-1 hücrelerinde ATP ile oluşan akımlar EGTA' nın tek başına oluşturduğu akımlardan açıkça farklıdır ve divalant çelasyonu ile oluşmamaktadır. Çalışmamızda, -80 mV' a kenetlenmiş hücrelerden aldığımız kayıtlarda, literatürde P2X7 reseptörü için tipik bir özellik olarak belirtilen, ard arda agonist uygulaması ile akımın genliğinin zaman içinde artışını (Chessell ve ark., 1998; Hibell ve ark., 2000; Humphreys ve ark., 1998; Rassendren ve ark., 1997) biz de gözlemledik. Ayrıca P2X7 reseptörlerinin diğer P2X reseptörlerinden farklı olarak çok uzun süreli agonist uygulamasında neredeyse hiç desensitizasyon göstermedikleri bu reseptörlerin diğer P2X reseptörlerinden ayrılmasında önemli bir kriterdir (North, 2002). Çalışmamızda biz de -80 mV a kenetlenmiş HL-1 hücrelerinde 40-50 saniyelik ATP ve BzATP uygulamaları boyunca hiç desensitize olmayan akımlar ölçtük. Bunlara ek olarak P2X7 reseptörü ifade ettirilmiş HEK293 hücrelerinde yapılan çalışmalarda agonist uygulamasıyla aktive olan P2X7 reseptörünün, hücre zarının normalde geçirgen olmadığı NMDG⁺ ve YO-PRO-1 boyası gibi büyük molekülleri geçirdiği ve ayrıca bu reseptör uyarısıyla hücre zarında bleblenme yanıtı olduğu da bilinmektedir (Virginio ve ark., 1999). Bu çalışmamızda HL-1 hücrelerinde konfokal mikroskop kullanılarak yaptığımız deneylerde ATP uygulamasıyla hücrelerde YO-PRO-1 boya girişine bağlı floresans artışı olduğu ve ardından hücrelerde bleblenme oluştuğunu biz de gözlemledik. Bütün bu bulgular HL-1 hücrelerinde ATP uyarısı ile oluşan akımların P2X7 reseptörüne bağlı olduğunu göstermektedir. Bütün bunlara ek olarak P2X7 reseptörü için tanımlanan ve oldukça yüksek seçicilik gösteren yarışmalı antagonistler olan A-740003 (Honore ve ark., 2006) ve ondan çok daha potent bir antagonist olan A-804598 (Donnelly-Roberts ve ark., 2009) , -80 mV' a kenetlenmiş HL-1 hücrelerinde 400 µM ATP uygulamasıyla oluşan akımları literatürde bildirilen derişimlerle uyumlu derişimlerde, yaklaşık %90 oranında inhibe etmiştir. Bütün bu bulgularımız HL-1 hücrelerinde fonksiyonel bir P2X7 reseptörü olduğunu ve literatürde HL-1 hücreleri için bildirilen mRNA ve western blot verilerinin, bu hücrede var olan fonksiyonel bir P2X7 reseptörünü gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Fare atriyumunda P2X7 reseptörlerinin kardiyomiyositlerde hücre zarında bulunduğu dair çeşitli yayınlar ve HL-1 hücrelerinde P2X7 reseptörünün var

olduğunu gösteren verilerimiz ışığında dikkatimizi HL-1 hücrelerinin kökeni olan fare atriyal miyositlerine yönelttik. Ancak yaptığımız deneylerde genç ve yaşlı fare kalplerinden izole edilmiş atriyum hücrelerinde HL-1 hücrelerinde yanıt alınan koşullarda yapılan deneylerde ATP uygulaması ile oluşan her hangi bir akım yanıtı gözleyemedik.

Bu negatif bulgumuz gösterilmiş olan P2X7 reseptörlerinin kardiyomiyositler yerine dokuda bulunan diğer tip hücrelerde olduğu iddia edilerek açıklanabilir. Ancak yapılan bir çalışmada hem atriyum hem de ventrikül doku homojenatlarında P2X7 reseptörü mRNA' sı ve proteini saptadıklarını belirtilmelerine karşın araştırmacılar fare kalplerinden aldıkları doku kesitlerinde immünohistokimya yöntemiyle damar endotelinde ve atriyal kardiyomiyositlerde P2X7 reseptörü olduğunu ventrikülerde ise endotel hücrelerinde P2X7 boyanması olmasına karşılık kardiyomiyositlerinde bu proteinin bulunmadığı bildirilmiştir. (Barth ve ark., 2010). Bu bulgu, P2X7 reseptörünün atriumda atrial kardiyomiyositlerde var olduğunu kuvvetle düşündürmektedir. Daha sonra aynı grup başka bir çalışmada fare atriyum dokusunda immünohistokimya, western blot ve PCR yöntemleriyle P2X7 reseptörlerinin varlığını tespit ettiklerini tekrar bildirmişlerdir (Pfleger ve ark., 2012). Kalp dokusu, kardiyomiyosit haricinde makrofaj, fibroblast ve endotel gibi hücreleri de barındırdığı için doku homojenatlarıyla yapılan çalışmalardaki sonuçları sadece kardiyomiyositlere atfetmeyi ve dolayısıyla pürinerjik reseptörlerin hücre spesifik dağılımlarını ortaya koymayı güçleştirmektedir. Bu grubun yaptığı bu iki çalışmanın sonuçları daha önce doku homojenatlarıyla yapılmış pürinerjik reseptör protein ve RNA ölçümlerindeki sonuçlarla uyumlu olup bu yanıltıcı faktörlerden arınmış bir şekilde atriyal kardiyomiyositleri işaret etmektedir.

Dolayısıyla HL-1 hücrelerinde fonksiyonel bir P2X7 reseptörünün varlığını ispatlayan sonuçlarımız, literatürde HL-1 hücrelerinde bu reseptörün varlığını göstermekte kullanılan antikorlarla yapılan ve fare atrial kardiyomiyositlerde P2X7 reseptörü olduğunu gösteren bulguların doğru olabileceğini kuvvetle düşündürmesine ve HL-1 hücrelerindeki pozitif sonuçlarımızın kullandığımız deneysel tekniğin bu reseptörün varlığını kardiyak dokularda göstermeye yeterli olduğunu ispatlamasına

karşın fare atriyal miyositlerinde P2X7 reseptörü yanıtına benzeyen bir yanıtın varlığını tüm çabalarımıza rağmen gösteremememiz beklenmedik bir sonuç olup iyi bir açıklama gerektirmektedir. Bir olasılık P2X7 reseptör ekspresyonunun dağılımının kalpte çok lokalize olmasıdır. İnsan kalbinde, P2X reseptörleri arasında P2X4 ve P2X7 mRNA' sının insitu hibridizasyon yöntemi ile sağ atriyumda ve sinoatriyal düğümde en yüksek olduğu bulunmuştur (Musa ve ark., 2009). Ayrıca, sıçan sağ atriyal miyositlerinde sola göre P2X4 ve P2X7 reseptör protein seviyesi daha fazla olduğu bildirilmiştir (Le ve ark., 2020). Bizim deneylerimizde fare kalbinden atriyal miyositleri izole ederken, dokunun küçük olması ve elde edilen canlı hücre sayısındaki azlık nedeniyle bölge ayrımı yapılmadan tüm atriyum dokusu kullanılmıştır. Literatürde iddia edildiği gibi P2X7 reseptörünün miktarı bölgelere göre büyük değişkenlik gösteriyorsa ve daha çok sinoatriyal düğüm gibi çok özel bir bölgede bulunuyorsa, yapılan izolasyonlarda bu özel bölgeden hücre elde edememiş ve bu nedenle de yanıt alamamış olabiliriz. Bu durumda daha lokalize bir izolasyon yöntemiyle, sağ atriyumdan elde edilecek hücrelerde tekrarlanacak deneylerle açıklığa kavuşturulabilir. Atriyal kardiyomiyositlerdeki negatif bulgularımıza getirilebilecek bir başka açıklama ise P2X7 reseptörünün kalp dokusunun embriyolojik gelişmesi sırasında sadece belli dönemlerde eksprese olması ve erişkinde bu ekspresyonun kaybolmasıdır. Embriyonik çalışmalarda ATP' nin kardiyak gelişim programını modüle ettiği iddia edilmiştir. Embriyonik dönemde doğru kalp gelişimi için P2X7 reseptör işlevinin önemli olduğu ortaya atılmıştır. Sıçan embriyonik kardiyomiyositlerinde yapılan bir çalışmada P2X7 reseptör ifadesinin 18. embriyonik günden itibaren başladığı bulunmuştur (Cheung ve ark., 2015). HL-1 hücrelerinin ise embriyonik ve yetişkin miyositler arasında bir karışımı temsil ettiği düşünülmektedir. Embriyonik atriyal kalp kası hücrelerinin tipik yapısal özellikleri, kültürdeki HL-1 hücrelerinde de bulunmuştur (Claycomb ve ark., 1998). Bu durum ölümsüzleştirilmiş HL-1 atriyal hücrelerinde yüksek P2X7 reseptör ekspresyonunun olmasının ancak erişkin hücrelerinde bulunmamasının nedeni olabilir. Ancak bu hipotez doğru ise yukarda belirtilen ve erişkin kardiyomiyositlerinde P2X7 reseptörünün varlığına işaret eden bulguların bir artefakt olduğunu kabul etmek de gerekecektir. Bir üçüncü olasılık ise atrial kardiyomiyositlerdeki P2X7 reseptörünün bir ligand kapılı katyon kanalı olarak

fonksiyon görmemesidir. Bu reseptörün diğer ligand kapılı kanallardan farklı olarak ve bu fonksiyonundan bağımsız bir şekilde metabotropik reseptörler gibi hücre içi iletim yollarını doğrudan uyurabildiğine dair deliller mevcuttur (Ugur ve Ugur, 2019).

Bu çalışma memeli atriyal hücrelerinde fonksiyonel P2X7 reseptörlerinin varlığının gösterilmesi için bir ilk adım oluşturmaktadır. Bu reseptörün insan kardiyomiyositlerinde de var olduğu iddiaları da göz önüne alındığında, hem kardiyak fizyolojide rol alan yeni bir tip reseptörün, hem de potansiyel bir ilaç hedefinin tanımlanmasında rol oynayabilecektir. Ancak erişkin memeli kardiyomiyositlerinde fonksiyonel bir P2X7 reseptörünün varlığını, bu reseptörün bu hücrelerde olduğuna dair bazı verilere rağmen gösterememiş olmamız, HL-1 hücrelerindeki pozitif sonuçlarımızla birlikte değerlendirilirse bu konuda son noktanın konamadığını ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

ATP, hücre içi enerji kaynağı olmasının yanı sıra nöronal hücreler, endotel hücreleri, kas hücreleri gibi birçok hücre tipinden salınan önemli bir hücre dışı kimyasal haberci olarak kabul edilmektedir. ATP'nin kalp üzerindeki etkileri uzun zamandır bilinmektedir. Bu etkilere birçok P2 reseptörünün aracılık ettiği yukarıdaki açıklamalardan da anlaşılabacaktır. Ancak P2X7 reseptörlerinin memeli kardiyak hücrelerinde fonksiyonel olarak var olup olmadığı netleşmemiş bir konudur. Bu P2X reseptör alt tipinin memeli atriyal kardiyak hücrelerinde var olabileceğini gösteren mRNA ve protein ölçümlerinden yukarıda bahsedilmiştir. Ancak mRNA ölçümleri P2X7 reseptörlerinin endotel hücrelerinde ve kan hücrelerinin bir kısmında da eksprese edilmesi nedeni ile yanıltıcı pozitif sonuç verebilirler. P2X7 reseptör antikorlarıyla yapılan western blot ve immünohistokimya çalışmalarında da bazı artefaktların yanıltıcı pozitif sonuçlara yol açtığı da çok iyi bilinmektedir. Bu nedenle biz çalışmamızda western blot ve immünohistokimya yöntemleri ile kardiyak hücrelerde gösterilen proteinin fonksiyonel bir P2X7 reseptörüne işaret edip etmediğini araştırdık. Fare atriyum kökenli ve pek çok açıdan kardiyak hücre özelliklerini iyi korumuş bir hücre serisi olan HL-1 hücrelerini deneysel kolaylığı nedeni ile kullandık ve bu hücrelerde daha önceden antikor temelli yöntemlerle tespit edilen proteinin fonksiyonel bir P2X7 reseptörü olup olmadığını inceledik. Daha sonra sıçan ve fare ventrikül ve atriumlarından enzimatik olarak izole edilen kardiyak hücrelerde de bu reseptörün varlığını araştırdık.

Bu çalışmada sıçan ventrikül hücrelerinde divalan katyon konsantrasyonundan etkilenen ve ATP uygulamasıyla deaktivasyon özelliği yavaşlayan bir akım ölçülmüştür. Bu akımın, literatürde belirtilen düşük divalan konsantrasyonunda L-tipi Ca^{2+} kanallarından geçen ve büyük oranda sodyum iyonlarından oluşan ve P2Y reseptörü aracılığıyla modüle olabilen bir akım olabileceğini düşünüyoruz.

Fare atriyal hücre hattı olan HL-1 hücrelerinde ATP uygulamasıyla P2X7 reseptörünü işaret eden; büyük bir molekül olan YO-PRO-1 boya girişi, bleblenme, 40-50 saniyelik uygulamalarda neredeyse hiç desensitize olmayan katyon akımı ve tekrarlanan 400 μ M ATP uygulamasıyla maximize edilmiş akım yanıtlarının spesifik P2X7 antagonistleri olan A-740003 ve A-804598 ile yaklaşık %90 oranında inhibe edildiği bulunmuştur.

Bu çalışmada genç ve yaşlı fare kalplerinden izole edilmiş atriyum hücrelerinde HL-1 hücrelerinde yanıt alınan koşullarda yapılan deneylerde ATP uygulaması ile oluşan her hangi bir akım yanıtı gözleyemedik. Benzer şekilde farklı günlerde ve hayvanlardan izole edilmiş 10'u genç 7'si yaşlı olmak üzere 17 hücreden alınmış kayıtlar vardır.

Fare kalbinden atriyal miyositleri izole ederken, dokunun küçük olması ve canlı hücre sayısındaki azlık nedeniyle bölge ayrımı yapılmadan tüm atriyum dokusu kullanılmıştır. Literatürde görüldüğü üzere P2X7 reseptörünün ekspresyonu bölgelere göre değişkenlik göstermektedir ve daha çok sinoatriyal düğüm gibi çok özel bir bölgede bulunduğu iddia edilmektedir. Yapılan denemelerde bu özel bölgeden hücre elde edilememiş olabilir ve bu nedenle de yanıt alınamamış olabilir. Daha lokalize bir izolasyon yöntemiyle elde edilecek hücrelerde deneyler tekrarlanabilir.

Sıçan atriyal miyositlerinde spesifik P2X7 antagonistleriyle akım ölçülerek ATP' nin bu hücrelerdeki etkilerinin çelasyon etkisinden arındırılarak P2X7 reseptörü aracılı olup olmadığı anlaşılabilir.

Bu çalışma ile memeli atriyal hücrelerinde fonksiyonel P2X7 reseptörlerinin varlığının gösterilmesi, bu reseptörün insan kardiyomiyositlerinde de var olduğu iddiaları da göz önüne alındığında, hem kardiyak fizyolojide rol alan yeni bir tip reseptörün, hem de potansiyel bir ilaç hedefinin tanımlanmasında rol oynayabilecektir.

ÖZET

Memeli Atriyal Hücrelerinde ATP-duyarlı Katyon Kanallarının Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Değişikliklerindeki Rolünün İncelenmesi

ATP'nin kalp üzerindeki etkileri uzun zamandır bilinmektedir. Bu etkilere birçok farklı P2 reseptörünün aracılık ettiği düşünülmektedir. Ancak P2X7 reseptörlerinin memeli kardiyak hücrelerinde fonksiyonel olarak var olup olmadığı netleşmemiş bir konudur. Bu nedenle biz çalışmamızda western blot ve immünohistokimya yöntemleri ile kardiyak hücrelerde gösterilen proteinin fonksiyonel bir P2X7 reseptörüne işaret edip etmediğini araştırdık. Fare atriyum kökenli ve pek çok açıdan kardiyak hücre özelliklerini iyi korumuş bir hücre serisi olan HL-1 hücrelerinde ve daha sonra sıçan ve fare ventrikül ve atriyumlarından enzimatik olarak izole edilen kardiyak hücrelerde daha önceden antikör temelli yöntemlerle tespit edilen proteinin fonksiyonel bir P2X7 reseptörü olup olmadığını inceledik.

Bu çalışmada sıçan ventrikül hücrelerinde divalan katyon konsantrasyonundan etkilenen ve ATP uygulamasıyla deaktivasyon özelliği yavaşlayan bir akım ölçülmüştür. Bu akımın literatürde belirtilen düşük divalan konsantrasyonunda L-tipi Ca^{2+} kanallarından geçen ve büyük oranda sodyum iyonlarından oluşan ve P2Y reseptörü aracılığıyla modüle olabilen bir akım olabileceğini düşünüyoruz.

Fare atriyal hücre hattı olan HL-1 hücrelerinde ATP uygulamasıyla P2X7 reseptörünü işaret eden; büyük bir molekül olan YO-PRO-1 boya girişi, bleblenme, 40-50 saniyelik uygulamalarda neredeyse hiç desensitize olmayan katyon akımı ve tekrarlanan 400 μM ATP uygulamasıyla maximize edilmiş akım yanıtlarının spesifik P2X7 antagonistleri olan A-740003 ve A-804598 ile yaklaşık %90 oranında inhibe edildiği bulunmuştur.

Bu çalışmada genç ve yaşlı fare kalplerinden izole edilmiş atriyum hücrelerinde HL-1 hücrelerinde yanıt alınan koşullarda yapılan deneylerde ATP uygulaması ile oluşan her hangi bir akım yanıtı gözleyemedik. Benzer şekilde farklı günlerde ve hayvanlardan izole edilmiş 10'u genç 7'si yaşlı olmak üzere 17 hücreden alınmış kayıtlar vardır.

Fare kalbinden atriyal miyositleri izole ederken, dokunun küçük olması ve canlı hücre sayısındaki azlık nedeniyle bölge ayrımı yapılmadan tüm atriyum dokusu kullanılmıştır. Literatürde görüldüğü üzere P2X7 reseptörünün miktarı bölgelere göre değişkenlik göstermektedir ve daha çok sinoatriyal düğüm gibi çok özel bir bölgede bulunduğu iddia edilmektedir. Yapılan denemelerde bu özel bölgeden hücre elde edilememiş olabilir ve bu nedenle de yanıt alınamamış olabilir. Daha lokalize bir izolasyon yöntemiyle elde edilecek hücrelerde deneyler tekrarlanabilir.

Bu çalışma ile memeli atriyal hücrelerinde fonksiyonel P2X7 reseptörlerinin varlığının gösterilmesi, bu reseptörün insan kardiyomiyositlerinde de var olduğu iddiaları da göz önüne alındığında, hem kardiyak fizyolojide rol alan yeni bir tip reseptörün, hem de potansiyel bir ilaç hedefinin tanımlanmasında rol oynayabilecektir.

Anahtar Sözcükler: ATP, P2X7, HL-1, patch-clamp.

SUMMARY

The Investigation of the Role of ATP-sensitive Cation Channels on Aging Associated Heart Function Alterations on Mammalian Atrial Cells.

The effects of ATP on the heart have been known for a long time. These effects are thought to be mediated by many different P2 receptors. However, it is unclear whether functional P2X7 receptors exist in mammalian cardiac cells and what they function. Therefore, in this study, we investigated whether the protein expressed in cardiac cells indicates a functional P2X7 receptor. We examined whether the protein, which was previously detected by antibody-based methods, is a functional P2X7 receptor in HL-1 cells, a cell line of mouse atrial origin with well preserved cardiac cell properties in many respects, and then in cardiac cells enzymatically isolated from rat and mouse ventricles and atria.

In this study, a current, which is affected by the divalent cation concentration in rat ventricular cells and whose deactivation is slowed by ATP application, was measured. We think that this current is a current that passes through L-type Ca^{2+} channels at low divalent concentration and consists mostly of Na^+ and can be modulated through the P2Y receptor.

This study revealed several findings pointing to the existence of the P2X7 receptor in HL-1 cells: YO-PRO-1 dye uptake, membrane blebbing and almost no desensitizing cation current by 40-50 second agonist applications was observed. Furthermore, two of specific P2X7 antagonists, A-740003 and A-804598, approximately inhibited 90% of the cationic current which was maximized by repeated application of 400 μM ATP.

In this study, several experiments were performed in atrial cells isolated from the hearts of young and aged mice, but we could not observe any response to ATP at a constant holding potential of -80 mV. Similarly, there are recordings taken from 17 cells, 10 young and 7 old, isolated from mice hearts on different days. When isolating atrial myocytes from mouse hearts, the whole atrial tissue was used without region separation due to the small tissue size and low cell viability. As seen in the literature, the amount of P2X7 receptor varies according to regions and it is claimed that it is located in a very specific region such as the sinoatrial node. Cells may not have been obtained from this particular region in the trials, and therefore no response may have been obtained. Experiments can be repeated with cells obtained with a more localized isolation method.

With this study, the existence of functional P2X7 receptors in mammalian atrial cells may lead to the identification of both a new type of receptor involved in cardiac physiology and a potential drug target. It is crucial considering the claims that this receptor is also present in human cardiomyocytes.

Keywords: ATP, P2X7, HL-1, patch-clamp.

KAYNAKLAR

- ABRAHAM, E. H., OKUNIEFF, P., SCALA, S., VOS, P., OOSTERVELD, M. J., CHEN, A. Y., SHRIVASTAV, B. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and adenosine triphosphate. *Science*, **275**: 1324-6
- AL-AWQATI, Q. (1995) Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. *Science*, **269**: 805-6
- ALVAREZ, J., COULOMBE, A., CAZORLA, O., UGUR, M., RAUZIER, J. M., MAGYAR, J., MATHIEU, E. L., BOULAY, G., SOUTO, R., BIDEAUX, P., SALAZAR, G., RASSENDREN, F., LACAMPAGNE, A., FAUCONNIER, J., VASSORT, G. (2008) ATP/UTP activate cation-permeable channels with TRPC3/7 properties in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **295**: H21-8
- BARTH, K., PFLEGER, C., LINGE, A., SIM, J. A., SURPRENANT, A., STEINBRONN, N., STRASSER, R. H., KASPER, M. (2010) Increased P2X7R expression in atrial cardiomyocytes of caveolin-1 deficient mice. *Histochem Cell Biol*, **134**: 31-8
- BARTLETT, R., STOKES, L., SLUYTER, R. (2014) The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev*, **66**: 638-75
- BELARDINELLI, L., GILES, W. R., WEST, A. (1988) Ionic mechanisms of adenosine actions in pacemaker cells from rabbit heart. *J Physiol*, **405**: 615-33
- BELL, P. D., LAPOINTE, J. Y., SABIROV, R., HAYASHI, S., PETI-PETERDI, J., MANABE, K., KOVACS, G., OKADA, Y. (2003) Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 4322-7
- BO, X., KIM, M., NORI, S. L., SCHOEPPER, R., BURNSTOCK, G., NORTH, R. A. (2003) Tissue distribution of P2X4 receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res*, **313**: 159-65
- BODIN, P., BAILEY, D., BURNSTOCK, G. (1991) Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, **103**: 1203-5
- BOGDANOV, Y., RUBINO, A., BURNSTOCK, G. (1998) Characterisation of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart. *Life Sci*, **62**: 697-703
- BORST, M. M., SCHRADER, J. (1991) Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ Res*, **68**: 797-806

- Braganca, B., Nogueira-Marques, S., Ferreira, F., Fontes-Sousa, A. P., Correia-de-Sa, P. (2019) The Ionotropic P2X₄ Receptor has Unique Properties in the Heart by Mediating the Negative Chronotropic Effect of ATP While Increasing the Ventricular Inotropy. *Front Pharmacol*, **10**: 1103
- Braake, A. J., Wagenbach, M. J., Julius, D. (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature*, **371**: 519-23
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R. A., Surprenant, A. (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J*, **15**: 55-62
- Burnstock, G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, **24**: 509-81
- Burnstock, G. (1990) Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves. *Neurochem Int*, **17**: 357-68
- Burnstock, G. (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*, **27**: 166-76
- Burnstock, G., Knight, G. E. (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*, **240**: 31-304
- Burnstock, G., Meghji, P. (1981) Distribution of P1- and P2-purinoceptors in the guinea-pig and frog heart. *Br J Pharmacol*, **73**: 879-85
- Burnstock, G., Meghji, P. (1983) The effect of adenylyl compounds on the rat heart. *Br J Pharmacol*, **79**: 211-8
- Chesell, I. P., Simon, J., Hibell, A. D., Michel, A. D., Barnard, E. A., Humphrey, P. P. (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X₇ receptor. *FEBS Lett*, **439**: 26-30
- Cheung, K. K., Marques-da-Silva, C., Vairo, L., Dos Santos, D. S., Goldenberg, R., Coutinho-Silva, R., Burnstock, G. (2015) Pharmacological and molecular characterization of functional P2 receptors in rat embryonic cardiomyocytes. *Purinergic Signal*, **11**: 127-38
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., Izzo, N. J., Jr. (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 2979-84
- Darius, H., Stahl, G. L., Lefler, A. M. (1987) Pharmacologic modulation of ATP release from isolated rat hearts in response to vasoconstrictor stimuli using a continuous flow technique. *J Pharmacol Exp Ther*, **240**: 542-7

- DING, S., SACHS, F. (1999a) Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings. *J Membr Biol*, **172**: 215-23
- DING, S., SACHS, F. (1999b) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J Gen Physiol*, **113**: 695-720
- DING, S., SACHS, F. (2000) Inactivation of P2X2 purinoceptors by divalent cations. *J Physiol*, **522 Pt 2**: 199-214
- DONNELLY-ROBERTS, D. L., NAMOVIC, M. T., SURBER, B., VAIDYANATHAN, S. X., PEREZ-MEDRANO, A., WANG, Y., CARROLL, W. A., JARVIS, M. F. (2009) [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology*, **56**: 223-9
- DORIGO, P., GAION, R. M., MARAGNO, I. (1988) Negative and positive influences exerted by purine compounds on isolated guinea-pig atria. *J Auton Pharmacol*, **8**: 191-6
- DOYLE, T. B., FORRESTER, T. (1985) Appearance of adenosine triphosphate in the perfusate from working frog heart. *Pflugers Arch*, **405**: 80-2
- EVANS, R. J., LEWIS, C., BUELL, G., VALERA, S., NORTH, R. A., SURPRENANT, A. (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol*, **48**: 178-83
- FISCHER, Y., BECKER, C., LOKEN, C. (1999) Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, **274**: 755-61
- FLEETWOOD, G., GORDON, J. L. (1987) Purinoceptors in the rat heart. *Br J Pharmacol*, **90**: 219-27
- FROLDI, G., PANDOLFO, L., CHINELLATO, A., RAGAZZI, E., CAPARROTTA, L., FASSINA, G. (1994) Dual effect of ATP and UTP on rat atria: which types of receptors are involved? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **349**: 381-6
- FROLDI, G., VARANI, K., CHINELLATO, A., RAGAZZI, E., CAPARROTTA, L., BOREA, P. A. (1997) P2X-purinoceptors in the heart: actions of ATP and UTP. *Life Sci*, **60**: 1419-30
- GARCIA-GUZMAN, M., SOTO, F., LAUBE, B., STUHMER, W. (1996) Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett*, **388**: 123-7
- GARCIA-GUZMAN, M., STUHMER, W., SOTO, F. (1997) Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Brain Res Mol Brain Res*, **47**: 59-66

- GERGS, U., BOKNIK, P., SCHMITZ, W., SIMM, A., SILBER, R. E., NEUMANN, J. (2008) A positive inotropic effect of ATP in the human cardiac atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**: H1716-23
- GERGS, U., SIMM, A., BUSHNAQ, H., SILBER, R. E., NEUMANN, J. (2014) A positive inotropic effect of UTP in the human cardiac atrium. *Eur J Pharmacol*, **724**: 24-30
- GORDON, J. L. (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, **233**: 309-19
- GUERRA MARTINEZ, C. (2019) P2X7 receptor in cardiovascular disease: The heart side. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **46**: 513-526
- GWANYANYA, A., AMUZESCU, B., ZAKHAROV, S. I., MACIANSKIENE, R., SIPIDO, K. R., BOLOTINA, V. M., VEREECKE, J., MUBAGWA, K. (2004) Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation. *J Physiol*, **559**: 761-76
- HIBELL, A. D., KIDD, E. J., CHESSELL, I. P., HUMPHREY, P. P., MICHEL, A. D. (2000) Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors. *Br J Pharmacol*, **130**: 167-73
- HOLLANDER, P. B., WEBB, J. L. (1957) Effects of adenine nucleotides on the contractility and membrane potentials of rat atrium. *Circ Res*, **5**: 349-53
- HOLMSEN, H. (1985) Platelet metabolism and activation. *Semin Hematol*, **22**: 219-40
- HONORE, P., DONNELLY-ROBERTS, D., NAMOVIC, M. T., HSIEH, G., ZHU, C. Z., MIKUSA, J. P., HERNANDEZ, G., ZHONG, C., GAUVIN, D. M., CHANDRAN, P., HARRIS, R., MEDRANO, A. P., CARROLL, W., MARSH, K., SULLIVAN, J. P., FALTYNEK, C. R., JARVIS, M. F. (2006) A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **319**: 1376-85
- HOPKINS, S. V. (1973) The action of ATP in the guinea-pig heart. *Biochem Pharmacol*, **22**: 335-9
- HU, B., MEI, Q. B., YAO, X. J., SMITH, E., BARRY, W. H., LIANG, B. T. (2001) A novel contractile phenotype with cardiac transgenic expression of the human P2X4 receptor. *FASEB J*, **15**: 2739-41
- HU, B., SENKLER, C., YANG, A., SOTO, F., LIANG, B. T. (2002) P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *J Biol Chem*, **277**: 15752-7

- HUMPHREYS, B. D., VIRGINIO, C., SURPRENANT, A., RICE, J., DUBYAK, G. R. (1998) Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol*, **54**: 22-32
- JARVIS, M. F., KHAKH, B. S. (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, **56**: 208-15
- JU, Y. K., HUANG, W., JIANG, L., BARDEN, J. A., ALLEN, D. G. (2003) ATP modulates intracellular Ca²⁺ and firing rate through a P2Y1 purinoceptor in cane toad pacemaker cells. *J Physiol*, **552**: 777-87
- JUNGER, W. G. (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*, **11**: 201-12
- KENNEDY, C. (2015) ATP as a cotransmitter in the autonomic nervous system. *Auton Neurosci*, **191**: 2-15
- KHAKH, B. S., PROCTOR, W. R., DUNWIDDIE, T. V., LABARCA, C., LESTER, H. A. (1999) Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *J Neurosci*, **19**: 7289-99
- KIM, J. C., SON, M. J., WOO, S. H. (2018) Ca²⁺ Signaling Triggered by Shear-Autocrine P2X Receptor Pathway in Rat Atrial Myocytes. *Cell Physiol Biochem*, **50**: 2296-2313
- KUZMIN, A. I., LAKOMKIN, V. L., KAPELKO, V. I., VASSORT, G. (1998) Interstitial ATP level and degradation in control and postmyocardial infarcted rats. *Am J Physiol*, **275**: C766-71
- LE, Q. A., KIM, J. C., KIM, K. H., VAN VU, A. T., WOO, S. H. (2020) Distinct shear-induced Ca(2+) signaling in the left and right atrial myocytes: Role of P2 receptor context. *J Mol Cell Cardiol*, **143**: 38-50
- MANTELLI, L., AMERINI, S., FILIPPI, S., LEDDA, F. (1993) Blockade of adenosine receptors unmasks a stimulatory effect of ATP on cardiac contractility. *Br J Pharmacol*, **109**: 1268-71
- MATSUDA, H. (1986) Sodium conductance in calcium channels of guinea-pig ventricular cells induced by removal of external calcium ions. *Pflugers Arch*, **407**: 465-75
- MAZROUEI, S., SHARIFPANA, F., BEKHTE, M. M., FIGULLA, H. R., SAUER, H., WARTENBERG, M. (2015) Cardiomyogenesis of embryonic stem cells upon purinergic receptor activation by ADP and ATP. *Purinergic Signal*, **11**: 491-506
- MUSA, H., TELLEZ, J. O., CHANDLER, N. J., GREENER, I. D., MACZEWSKI, M., MACKIEWICZ, U., BERSEWICZ, A., MOLENAAR, P., BOYETT, M. R., DOBRZYNSKI, H. (2009) P2 purinergic receptor mRNA in rat and human sinoatrial node and other heart regions. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, **379**: 541-9

- NORI, S., FUMAGALLI, L., BO, X., BOGDANOV, Y., BURNSTOCK, G. (1998) Coexpression of mRNAs for P2X1, P2X2 and P2X4 receptors in rat vascular smooth muscle: an in situ hybridization and RT-PCR study. *J Vasc Res*, **35**: 179-85
- NORTH, R. A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, **82**: 1013-67
- NORTH, R. A., SURPRENANT, A. (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**: 563-80
- NOVITSKAYA, T., CHEPURKO, E., COVARRUBIAS, R., NOVITSKIY, S., RYZHOV, S. V., FEOKTISTOV, I., GUMINA, R. J. (2016) Extracellular nucleotide regulation and signaling in cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*, **93**: 47-56
- OISHI, S., SASANO, T., TATEISHI, Y., TAMURA, N., ISOBE, M., FURUKAWA, T. (2012) Stretch of atrial myocytes stimulates recruitment of macrophages via ATP released through gap-junction channels. *J Pharmacol Sci*, **120**: 296-304
- PADDLE, B. M., BURNSTOCK, G. (1974) Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilatation. *Blood Vessels*, **11**: 110-9
- PEARSON, J. D., GORDON, J. L. (1979) Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature*, **281**: 384-6
- PFLEGER, C., EBELING, G., BLASCHE, R., PATTON, M., PATEL, H. H., KASPER, M., BARTH, K. (2012) Detection of caveolin-3/caveolin-1/P2X7R complexes in mice atrial cardiomyocytes in vivo and in vitro. *Histochem Cell Biol*, **138**: 231-41
- RAJAGOPAL, S., PONNUSAMY, M. (2018) *Metabotropic GPCRs: TGR5 and P2Y Receptors in Health and Diseases*, Springer
- RALEVIC, V., BURNSTOCK, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, **50**: 413-92
- RASSENDREN, F., BUELL, G. N., VIRGINIO, C., COLLO, G., NORTH, R. A., SURPRENANT, A. (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem*, **272**: 5482-6
- SABIROV, R. Z., OKADA, Y. (2004) Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway. *Biophys J*, **87**: 1672-85
- SAITO, D., UEEDA, M., ABE, Y., TANI, H., NAKATSU, T., YOSHIDA, H., HARAOKA, S., NAGASHIMA, H. (1986) Treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia with intravenous injection of adenosine triphosphate. *Br Heart J*, **55**: 291-4

- SCAMPS, F., VASSORT, G. (1990) Mechanism of extracellular ATP-induced depolarization in rat isolated ventricular cardiomyocytes. *Pflugers Arch*, **417**: 309-16
- SCAMPS, F., VASSORT, G. (1994) Pharmacological profile of the ATP-mediated increase in L-type calcium current amplitude and activation of a non-specific cationic current in rat ventricular cells. *Br J Pharmacol*, **113**: 982-6
- SCHMID, R., EVANS, R. J. (2019) ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annu Rev Physiol*, **81**: 43-62
- SEGUELA, P., HAGHIGHI, A., SOGHOMONIAN, J. J., COOPER, E. (1996) A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain. *J Neurosci*, **16**: 448-55
- SOTO, F., GARCIA-GUZMAN, M., GOMEZ-HERNANDEZ, J. M., HOLLMANN, M., KARSCHIN, C., STUHMER, W. (1996) P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 3684-8
- STONER, H. B., GREEN, H. N., THRELFALL, C. J. (1948) Bodily reactions to trauma; a possible role of nucleotides in cardiac ischaemia. *Br J Exp Pathol*, **29**: 419-46
- STOUT, C. E., COSTANTIN, J. L., NAUS, C. C., CHARLES, A. C. (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*, **277**: 10482-8
- SURPRENANT, A., RASSENDREN, F., KAWASHIMA, E., NORTH, R. A., BUELL, G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, **272**: 735-8
- UGUR, M., UGUR, O. (2019) A Mechanism-Based Approach to P2X7 Receptor Action. *Mol Pharmacol*, **95**: 442-450
- UOZUMI, H., KUDOH, S., ZOU, Y., HARADA, K., YAMAZAKI, T., KOMURO, I. (1998) Autocrine release of ATP mediates mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation*. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS 227 EAST WASHINGTON SQ, PHILADELPHIA, PA 19106 USA,
- VALERA, S., HUSSY, N., EVANS, R. J., ADAMI, N., NORTH, R. A., SURPRENANT, A., BUELL, G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, **371**: 516-9
- VASSORT, G. (2001) Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiol Rev*, **81**: 767-806
- VEGH, A. M. D., DUIM, S. N., SMITS, A. M., POELMANN, R. E., TEN HARKEL, A. D. J., DERUITER, M. C., GOUMANS, M. J., JONGBLOED, M. R. M. (2016) Part and Parcel of

the Cardiac Autonomic Nerve System: Unravelling Its Cellular Building Blocks during Development. *J Cardiovasc Dev Dis*, **3**

- VIAL, C., OWEN, P., OPIE, L. H., POSEL, D. (1987) Significance of release of adenosine triphosphate and adenosine induced by hypoxia or adrenaline in perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, **19**: 187-97
- VIALS, A. J., BURNSTOCK, G. (1996) ATP release from the isolated perfused guinea pig heart in response to increased flow. *J Vasc Res*, **33**: 1-4
- VIRGINIO, C., MACKENZIE, A., RASSENDREN, F. A., NORTH, R. A., SURPRENANT, A. (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci*, **2**: 315-21
- VIRGINIO, C., NORTH, R. A., SURPRENANT, A. (1998) Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *J Physiol*, **510 (Pt 1)**: 27-35
- VON KUGELGEN, I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther*, **110**: 415-32
- VULCHANOVA, L., ARVIDSSON, U., RIEDL, M., WANG, J., BUELL, G., SURPRENANT, A., NORTH, R. A., ELDE, R. (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 8063-7
- WANG, C. Z., NAMBA, N., GONOI, T., INAGAKI, N., SEINO, S. (1996) Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, **220**: 196-202
- WEBB, T. E., BOLUYT, M. O., BARNARD, E. A. (1996) Molecular biology of P2Y purinoceptors: expression in rat heart. *J Auton Pharmacol*, **16**: 303-7
- WELFORD, L. A., CUSACK, N. J., HOURANI, S. M. (1987) The structure-activity relationships of ectonucleotidases and of excitatory P2-purinoceptors: evidence that dephosphorylation of ATP analogues reduces pharmacological potency. *Eur J Pharmacol*, **141**: 123-30
- WILLIAMS, C. A., FORRESTER, T. (1983) Possible source of adenosine triphosphate released from rat myocytes in response to hypoxia and acidosis. *Cardiovasc Res*, **17**: 301-12
- WOO, S. H., TRINH, T. N. (2020) P2 Receptors in Cardiac Myocyte Pathophysiology and Mechanotransduction. *Int J Mol Sci*, **22**
- YAMAMOTO, K., SOKABE, T., OHURA, N., NAKATSUKA, H., KAMIYA, A., ANDO, J. (2003) Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca²⁺ influx into pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**: H793-803

YANG, T., SHEN, J. B., YANG, R., REDDEN, J., DODGE-KAFKA, K., GRADY, J., JACOBSON, K. A., LIANG, B. T. (2014) Novel protective role of endogenous cardiac myocyte P2X4 receptors in heart failure. *Circ Heart Fail*, **7**: 510-8

YUAN, W., GINSBURG, K. S., BERS, D. M. (1996) Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol*, **493 (Pt 3)**: 733-46



EKLER

Ek-1. Etik Raporu

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 22/07/2020
TOPLANTI NO : 2020-13
DOSYA NO : 2019-69
KARAR NO : 2020-13-120

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Belma TURAN'ın yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Mehmet UĞUR ve Arş. Gör. Sinan DEĞİRMENCİ'nin katıldığı "Memeli Atriyal Hücrelerinde ATP-duyarlı Katyon Kanallarının Yaşlanmaya Bağlı Kalp Fonksiyon Değişikliklerindeki Rolünün İncelenmesi" başlıklı çalışma Kurulumuzun 08.05.2019 tarihli toplantısında alınan 2019-10-100 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Proje yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 17.07.2020 tarih ve 19191 sayılı dilekçede belirtilen gerekçelerden ötürü, onay alınan projede kullanılacak 30 adet fareye ek olarak 30 adet sıçan talep edilmektedir.

Söz konusu dilekçe, Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve projede kullanılacak hayvan türüne 30 adet sıçan eklenmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 30 (30 İlave Sıçan)
Geçerlilik Süresi : 20/05/2019-20/05/2021