

SIÇAN DORSAL KÖK GANGLİON SINİR HÜCRE KÜLTÜRÜ HÜCRE İÇİ KALSİYUM DEPOLARINA KAFEİNİN ETKİSİNDE PERTUSSİS TOKSİN DUYARLI G-PROTEİNLERİN ROLÜ

Ahmet AYAR¹, Kadir SERVİ²

¹Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Elazığ / TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Elazığ / TÜRKİYE

The Effects Of Pertussis Toxin-Sensitive G-proteins on Actions of Caffeine on Intracellular Calcium Stores in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurones

SUMMARY

We have investigated the effects of pertussis toxin (PTX) pre-treatment on the effects of caffeine on intracellular Ca^{2+} stores in cultured rat dorsal root ganglion (DRG) neurones by whole-cell patch-clamp technique. Voltage-activated Ca^{2+} currents and Ca^{2+} -activated chloride and non-selective cation currents were isolated pharmacologically. The Ca^{2+} -activated chloride and non-selective cation currents were used as indicators of raised free intracellular Ca^{2+} close to the cell membrane. When DRG cells were voltage clamped at -90 mV, extracellular application of caffeine (1 mM) activated inward currents in 34 out of 37 cells studied, with a mean peak amplitude and mean delay of -1.33 ± 0.12 nA and 278 ± 12 s ($n=8$), respectively. The caffeine-induced responses were persisted when Ca^{2+} was removed from extracellular recording medium, and the mean peak amplitude was -1.27 ± 0.11 nA ($n=7$) and the mean delay from application of caffeine to the activation of first response was 298 ± 9 s ($n=7$). The caffeine response was abolished by ryanodine (10 μ M, $n=5$), applied intracellularly, but not by its inactive analogue, anhydrorryanodine (100 μ M, $n=7$). Intracellular application of Ca^{2+} chelator 1,2-bis-(O-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) also diminished the caffeine-induced inward currents ($n=5$). But, pre-treating the cultures with PTX for 3-8 hours did not effect the responses to caffeine ($n=12$). These observations strongly suggest that caffeine causes release of intracellular Ca^{2+} in cultured DRG neurones from neonatal rats by a mechanism independent of PTX-sensitive guanine nucleotide binding protein.

Key words: Caffeine, pertussis toxin, ryanodine, sensory neuron, patch clamp

ÖZET

Bu çalışmada tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniğini kullanarak yeni doğan sıçanlardan kültürü yapılmış dorsal kök gangliyon (DKG) sinir hücrelerini pertussis toksin (PTX) ile 3-8 saat ön muamele ederek kafeinin bu hücrelerin hücre içi Ca^{2+} -depolarından Ca^{2+} salıverişine etkisini inceledik. Voltaj-bağımlı Ca^{2+} akımları ve Ca^{2+} -bağımlı klor ve non-selektif katyon akımları farmakolojik olarak izole edildi. Ca^{2+} -bağımlı klor ve non-selektif katyon akımları hücre membranına yakın bölgelerde hücre içi serbest Ca^{2+} miktarındaki artışın indikatörü olarak kullanıldı. DKG hücreleri -90 mV'ta voltaj kenetlendiğinde, kafeinin (1 mM) hücre dışına uygulanması çalışılan 37 hücrenin 34'ünde sırasıyla ortalama 278 ± 12 sn ($n=8$) gecikme ile ortalama pik amplitütü -1.33 ± 0.12 nA ($n=8$) olan içe yönelik membran akımları aktive etti. Ekstrasellüler kayıt solüsyonundan Ca^{2+} uzaklaştırıldığında da gözlenen kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının ortalama pik amplitütü -1.27 ± 0.11 nA ($n=7$) ve kafein uygulamasından kafeine ilk cevabın ortaya çıkmasına kadar geçen ortalama süre 298 ± 9 sn ($n=7$) olarak belirlendi. Kafeine cevaplar intrasellüler uygulanan ryanodin (10 μ M) ile önlendi ($n=5$), fakat ryanodin inaktif analogu olan anhidrorryanodin (100 μ M) bu cevapları önleyemedi ($n=7$). Ca^{2+} şelatörü 1,2-bis-(O-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraasetik asit, tetraasetoksimetil ester (BAPTA-AM) intrasellüler uygulandığında kafeinin indüklediği içe yönelik akımları önlendi ($n=5$). Fakat, kültüre hücrelerin 3-8 saat süreyle PTX ile ön muamele tabi tutulması kafeine cevapları etkilemedi ($n=12$). Bu bulgular kafeinin DKG hücre kültüründe PTX duyarlı G-proteinlerinden bağımsız bir mekanizma ile hücre içi depolardan Ca^{2+} salıverilmesine yol açtığını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kafein, Pertussis toksin, ryanodin, duyuşal nöron, patch kenetleme

GİRİŞ

Nöronal hücrelerde hücre içi serbest Ca^{2+} miktarındaki, $[Ca^{2+}]_i$ artış aralarında veziküler nörotransmitter salıverilmesi, sinaptik plastisite, enzim aktivasyonu, nörit büyümesi, Ca^{2+} , K^+ ve Cl^- akımlarının direk veya indirek modülasyonu ile uyarılabilmenin kontrolü, gen ekspresyonu, programlanmış hücre ölümünün de yer aldığı çok çeşitli hücre fizyolojik ve patofizyolojik olayların kontrolünde anahtar rolü oynar (1).

Nöronlarda hücre içi serbest Ca^{2+} miktarı artışları ya hücre dışından voltaj kenetli Ca^{2+} kanalları (2) ve reseptör kenetli Ca^{2+} kanalları aracılığı ile (3) Ca^{2+} girişi ya da hücre içi Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} salıverilmesi ile (4) gerçekleşir. Hücre içi Ca^{2+} depoları farmakolojik özelliklerine göre inozitol 1,4,5 trifosfat (IP_3) duyarlı ve ryanodin/kafein duyarlı olmak üzere en az iki alt tipe ayrılır. Bu hücre içi Ca^{2+} depoları farklı hücrelerde bulunabildikleri gibi aynı hücrede her iki tip aynı zamanda birlikte de bulunabilir. Bu yapılar aktif olarak depoladıkları Ca^{2+} 'u uygun uyarım geldiğinde IP_3 ve ryanodin reseptörleri ile kenetli olan hücre içi Ca^{2+} salıverilme kanallarının açılmasıyla sitoplazmaya serbest bırakabilirler. İskelet kasları ve düz kaslarda hücre içi Ca^{2+} depoları başlıca IP_3 , ryanodin ve kafeine duyarlılık göstermesine rağmen, nöronlarda hücre içi Ca^{2+} depoları çeşitli farmakolojik ajanlara duyarlılık gösterir. Sıçan DKG hücrelerinde ryanodin duyarlı depoların aynı zamanda kafein, sifingolipidler ve siklik ADP-riboza duyarlı olduğu belirlenmiştir (5, 6).

Kafeinin iskelet ve kalp kası hücrelerindeki Ca^{2+} salıverici etkisi uzun zamandan beri bilinmektedir ve farmakolojik özellikleri ile kinetiği detaylı olarak ortaya konmuştur (7, 8).

Bu çalışmada sıçan DKG hücrelerinde kafein ve ryanodin Ca^{2+} -salıverilme kanallarını aktive etmek ve bloklamak için farmakolojik ajan olarak kullanıldı.

Kafeinin aralarında çeşitli tip santral nöronlar (9), sempatik nöronlar (10) ve duysal nöronların (11) da bulunduğu pek çok nöronal preparatlarda hücre içi depolardan Ca^{2+} salıverilmesine yol açtığı bildirilmiştir. Fakat, nöronal preparatlarda kafein duyarlı hücre içi Ca^{2+} depolarının özellikleri ve rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmanın amacı sıçan DKG hücrelerinde hücre içi depolardan kafeinin indüklediği Ca^{2+}

salıverilmesinin pertussistoksine (PTX) duyarlılığını belirlemektir.

MATERYAL VE METOT

Primer Hücre Kültürü: Bu amaçla, 1-2 günlük Wistar ratları dekapite edilerek spinal kord ayrıldı ve dorsal kök ganglionları diseksiyon mikroskopu altında disekte edilerek fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS) içeren bir petri kutusunda toplandı. Ganglionlar enzimsel [%0.125 kollagenaz (Sigma) 13 dakika süreyle, %0.25 tripsin (Sigma) 6 dakika süre ile 37 °C'de inkübe edilerek] ve mekanik (ucu daraltılmış bir Pastör pipetine çekerek) muamelelerle tek hücrelere ayrıştırıldı. Bu hücre süspansiyonu Poly-L ornitin (Sigma) ve lamininle (Sigma) steril lameller üzerine ekildi. Bu sinir hücreleri 37 °C'de %5 CO_2 ve nemli hava içeren inkübatörde kültür medyumunda [F14 Ham's Nutrient (Gibco) + at serumu (Gibco) + sinir büyütme faktörü (Sigma) + penisilin/streptomisin (ICN)] inkübe edildi ve 7 günde bir taze kültür medyumunu ile beslendi.

Elektrofizyolojik kayıtlar 2-14 günlük hücre kültürlerini kullanarak gerçekleştirildi.

Elektrofizyoloji: Elektrofizyolojik kayıtlar tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği (12) kullanılarak, oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Düşük dirençli cam mikro pipetlerle (3-7 M Ω) hücrelere Axoclamp 2A (Axon Inst, USA) patch kenetleme amplifikatörü kullanılarak -90 mV'da devamlı olmayan tek elektrot voltaj kenedi uygulandı. Bütün kayıtlar -90 mV'da gerçekleştirildi. Kolin klorür (ChCl) ile Tedrodotoksin (TTX) kullanılarak sodyum kanalları, ekstrasellüler tetraetil amonyum (TEA) ve intrasellüler sezyum klörür (CsCl) kullanılarak potasyum akımları bloklandı ve böylece Ca^{2+} ile Ca^{2+} -bağımlı akımlar farmakolojik olarak izole edildi.

Intrasellüler olarak uygulanan ajanların (ryanodin ve anhidroryanodin) patch pipetinden hücreye geçişini sağlamak amacıyla, hücre dışına kafein uygulaması tüm hücre patch kenetleme modülünün gerçekleştirilmesinden en az 5 dakika sonra yapıldı.

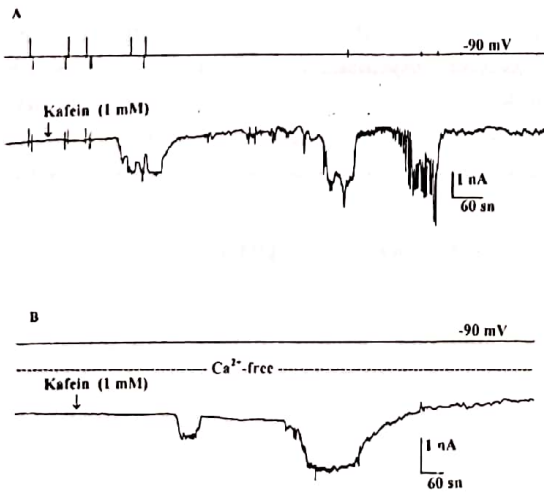
Ekstrasellüler kayıt solüsyonunun içeriği (mM): ChCl, 130; KCl, 3.0; $MgCl_2$, 0.6; $CaCl_2$, 2.0; $NaHCO_3$, 1.0; HEPES, 10.0, glukoz, 4.0; TEA bromid, 25.0; tetrodotoksin (TTX, Sigma), 0.00125; solüsyonun pH'sı NaOH ile 7.4; osmolaritesi ise sukroz kullanılarak 320 mOsm'a ayarlandı. Kolin klorür TTX dirençli sodyum akımlarını bloklamak için kullanıldı.

Patch pipeti solusyunu içeriği (mM): CsCl, 140; CaCl₂, 0.1; EGTA, 1.1 veya 20 mM; MgCl₂, 2.0; ATP, 2.0 ve HEPES 10.0. Solusyonun pH'sı Tris kullanılarak 7.2'ye; osmolalitesi ise sukroz ile 310 mOsm'a ayarlandı.

Ekstrasellüler olarak uygulanan ilaçlar hücre dışı kayıt solusyonunda, pipet aracılığı ile direk hücre içine uygulanan ajanlar ise patch pipeti solusyonunda hazırlandı. Kafein, ryanodin ve diğer farmakolojik ajanlar uç çapı yaklaşık 10 µm olan bir pipet aracılığı ile mikro ejeksiyonla hücre dışına uygulandı (Pneumatic Pump, WP Instruments, USA).

Ryanodin, anhidroryanodin Alomone Labs, (İsrail), BABTA, kafein, pertussis toksin ve solusyonların hazırlanmasında kullanılan kimyasal ajanlar Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

Elektrofizyolojik data dijital/analog dönüştürücü (Digidata 1200B, Axon Instruments, USA) aracılığı ile kişisel bilgisayara aktarıldı ve yazılım programı ile (pClamp 7, Axon Instruments, USA) analiz edildi, gerektiğinde sürekli olarak grafik kağıdına yazdırıldı (Gould Recorder 2200S). Bütün veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde Student's *t* testi veya One-way ANOVA testi (Microcal Origin) kullanıldı, *p*<0.05 değeri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.



Şekil 1. Kafein Hücre İçi Depolardan Kalsiyum Saliverilmesine Yol Açarak Aktive Ettiği Membran Akımları DKG hücreleri tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği kullanılarak: -90 MV'da voltaj kenetlendi. Üstteki trase voltaj, alttaki trase ise akımı göstermektedir. Kafein okla gösterilen noktadan itibaren sürekli olarak ekstrasellüler olarak uygulandı. Voltaj trasesindeki

defleksiyonlar aktive edilen pozitif ve negatif voltaj enjeksiyonlarını göstermektedir. 2 mM ekstrasellüler Ca²⁺ varlığında (A) ve ekstrasellüler Ca²⁺ uzaklaştırıldığında (B) kafein kısa bir gecikme ile içe yönelik membran akımları aktive etti.

BULGULAR

Kafeinin membran akımları üzerine etkileri:

Ekstrasellüler kafein uygulaması (1 mM) 37 hücrenin 34'ünde içe yönelik membran akımı aktive etti. 2 mM ekstrasellüler Ca²⁺ içeren kayıt solusyonu kullanıldığında, kafein uygulamasını takiben ilk akım aktivasyonu ortalama 278±12 sn (n=8) geçikme ile içe yönelik membran akımları aktive etti, aktive olan bu içe yönelik akımların ortalama pik amplitüdü ise 1.33±0.12 nA idi, (n=8). Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımları kalıcı ya da transient tipte idi, bazılarında ise kalıcı akım üzerinde osilasyonlar vardı (Şekil 1A).

Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının Ca²⁺ bağımlılığı:

Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının Ca²⁺ bağımlılığı, intrasellüler Ca²⁺ bağlama kapasitesi artırılarak ve ekstrasellüler Ca²⁺ uzaklaştırılmış Ca²⁺-free kayıt solusyonu kullanılarak belirlendi.

Hücre içinde BABTA (100 µM) kullanıldığında, ekstrasellüler kafein (1mM) uygulaması hiçbir membran akımı aktive edemedi, (n=5).

Fakat hücreler Ca²⁺-free ekstrasellüler kayıt solusyonunda tutulduğunda kafein uygulaması içe yönelik membran akımlarını aktive etti (Şekil 1B). Kafeinin Ca²⁺-free ortamda aktive ettiği içe yönelik akımların ortalama amplitüdü -1.33±0.12 nA, kafein uygulamasından akımların aktivasyonuna kadar geçen ortalama süre ise 298±9 s olarak belirlendi, (n=7). Bu değerlerle 2mM ekstrasellüler Ca²⁺ mevcudiyetinde elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark yoktu (*p*>0.05).

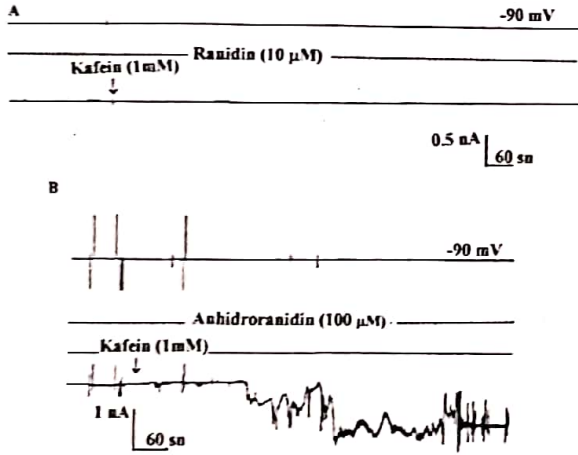
Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının farmakolojisi:

Kafeinin indüklediği içe yönelik membran akımlarının farmakolojisi incelenerek bu ajanın da ryanodin ile aynı hücre içi deposunu etkileyip etkilemediği araştırıldı.

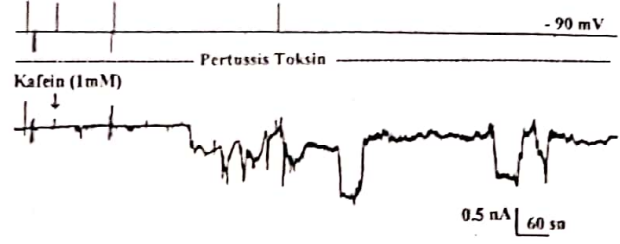
Patch pipeti içerisinde ryanodin (10 µM) uygulaması, ekstrasellüler kafeininin (1mM)

membran akımı aktive etmesini önledi (n=5, şekil 2A).

Fakat, anhidroryanodin, ryanodin inaktif analogu, (100 μ M) patch pipeti aracılığı ile hücre içine uygulandığında ekstrasellüler uygulanan kafeinin içe yönelik membran akımı aktive etmesini önleyemedi (n=7, Şekil 2B). Anhidroryanodin varlığında ekstrasellüler kafein uygulaması 280 ± 10 sn gecikme ile -1.11 ± 0.11 nA amplitüdünde içe yönelik membran akımları aktive etti, (n=7, şekil 2B). Anhidroryanodin (100 μ M) hücre içine uygulanmasının membran akımlarına etkisini incelemek amacıyla hücreye hiçbir uygulama yapılmadan 30 dakika beklendi ve anhidroryanodin hiçbir membran akımını aktive etmediği gözlemlendi (n=3).



Şekil 2. Hücre İçi Uygulanan Ryanodin ve Anhidroryanodin Kafeinin Aktive Ettiği Membran Akımlarına Etkileri DKG hücresi tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği kullanılarak -90 MV'da voltaj kenetlendi. Üstteki trase voltaj, alttaki trase ise akımı göstermektedir. Kafein okla gösterilen noktadan itibaren sürekli olarak ekstrasellüler olarak uygulandı. Voltaj trasesindeki defleksiyonlar aktive edilen pozitif ve negatif voltaj enjeksiyonlarını göstermektedir. Ryanodin ve anhidroryanodin patch pipeti aracılığı ile hücre içine uygulandı. Ryanodin uygulandığında kafeine cevap gözlenmedi (A), fakat anhidroryanodin kafeine cevapları etkilemedi (B).



Şekil 3. Pertussis Toksinle İnkübasyonun Kafeinin Aktive Ettiği Membran Akımlarına Etkileri 8 saat süreyle 0.5μ M/ml dozunda pertussis toksin ile inkübe edilen DKG hücresi tüm hücre diyaliz patch kenetleme tekniği kullanılarak -90 MV'da voltaj kenetlendi. Üstteki trase voltaj, alttaki trase ise akımı göstermektedir. Kafein okla gösterilen noktadan itibaren sürekli olarak ekstrasellüler olarak uygulandı. Voltaj trasesindeki defleksiyonlar aktive edilen pozitif ve negatif voltaj enjeksiyonlarını göstermektedir. Ekstrasellüler olarak uygulanan kafeinin aktive ettiği içe yönelik membran akımları görülmektedir.

Kafeine cevabın oluşmasında PTX duyarlı G-proteinlerin rolünü tespit etmek amacıyla hücreler 3 (n=6) ve 8 saat (n=6) saat süreyle $0,3 \mu$ g/ml PTX ile inkübe edildi. PTX ile inkübe edilen hücrelere kafein uygulandığında ortalama amplitütü -1.09 ± 0.07 nA (n=12) olan ve kafein uygulamasını takiben ortalama 294 ± 11 sn (n=12) gecikme ile başlayan içe yönelik membran akımları gözlemlendi (Şekil 3). Bu akımların gerek pik amplitüt değerleri ve gerekse başlamalarındaki gecikme PTX ile muamele edilmemiş Ca^{2+} mevcut ve Ca^{2+} -free solüsyonların kullanıldığı koşullarda elde edilen kafein cevaplarından istatistiksel olarak farklı bulunmadı ($p > 0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kafein hücre içi depolardan Ca^{2+} salıverilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan ve ryanodin reseptörü/ Ca^{2+} -salıverime kanallarını aktive eden önemli bir farmakolojik ajandır (11). Kafeinin konsantrasyon bağımlı olarak etkili olduğu ve farklı nöronlarda farklı konsantrasyonların anlamlı derecede farklı miktarlarda Ca^{2+} salıverilmesine yol açtığı bildirilmiştir. Sıçan duyuşal nöronlarında Ca^{2+} salıverilmesi için minimum konsantrasyonun 1 mM ve maksimum konsantrasyonun ise $10-20$ mM olduğu bildirilmiştir (11). Bu çalışmada kullanılan 1 mM kafein konsantrasyonu tespit edilebilir düzeyde Ca^{2+} salıverilmesini sağladı.

Yaygın kullanımı ve Ca^{2+} -tetikleme Ca^{2+} -salıverilmesine (KTKS) iyi bilinen etkilerinin yanında, bir metilksantin olan kafeini popüler farmakolojik araç yapan çeşitli avantajları vardır. Kafein hücre membranından hızla geçerek hücre içinde ekstrasellüler konsantrasyonu ile dengeye ulaşır (13). İlave olarak, kafein hücre içi Ca^{2+} depolarından direk olarak Ca^{2+} salıvererek Ca^{2+} -bağımlı membran akımlarını aktive eder. Bu akımlar bu çalışmada $[Ca^{2+}]_i$ artışın fizyolojik indikatörü olarak kullanıldı. Duyusal (14) ve sempatik (10) nöronlar kafein duyarlı hücre içi Ca^{2+} depolarına sahiptir ve Ca^{2+} salıverilmesini takiben bu depolar hızla Ca^{2+} ile tekrar dolar.

Ryanodin ve kafeinin Ca^{2+} -salıverilme kanallarına etkisi farklıdır, kafein tek kanal iletkenliğini etkilemeksizin kanalın açılma olasılığını artırır, fakat ryanodin kanalın iletkenliğini değiştirir, fakat Ca^{2+} -salıverilme kanalının Ca^{2+} , Mg^{2+} ve ATP gibi regülatör ajanlara duyarlılığı değiştirmez (15).

Bu çalışmada kafein (1mM) cevapları ryanodin ile bloklandı (Şekil 2A), bu bulgu literatür ile uyumludur (16). Ryanodin (1-10 μ M) Ca^{2+} -salınma kanalına bağlanarak kanalı yarı açık bir durumda kilitlet (tam olmayan iletken bir durumda) ve böylece bu Ca^{2+} depolarında adeta sızıntıya yol açarak Ca^{2+} birikimini önler ve depoları tüketebilir. Bu mekanizma ile agonistlerle Ca^{2+} salıverilmesini blokladığı bilinmektedir. Ryanodin yüksek konsantrasyonları ise (<10 μ M) bu Ca^{2+} salıverilme kanallarını bloklar (16). Ryanodin asidik ortamda su kaybetmesi sonucu biyolojik aktivitesini kaybederek anhidroryanodin oluşur ve bu inaktif bileşik ryanodin negatif kontrolü olarak kullanılabilir (17). Anhidroryanodin ise kafeine cevaplarda anlamlı herhangi bir değişikliğe yol açmadı (Şekil 2B). Bu da kafeinin ryanodin duyarlı

hücre içi Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} salıverilmesine yol açtığını destekleyen ilave bir bulgudur.

Hücrelerin büyük bir çoğunluğu (%82) ekstrasellüler kafein uygulamasına cevap verdi. Literatürle uyumlu olarak bu çalışmada da gözlenen, bazı hücrelerin kafeine cevap vermemesi sıçan DKG hücrelerinin heterojen olmasına bağlı olabilir. Ayrıca, bu durum endoplazmik retikulumda (geniş anlamda hücre içi Ca^{2+} depolarında) spontan olarak Ca^{2+} dolumunun gerçekleşip gerçekleşmemesine veya ryanodin reseptörlerinin ekspresyonunun heterojenitesine bağlı olabilir (18).

Kafeine cevaplar hücre içi Ca^{2+} -bağlama kapasitesi artırıldığında gözlenmedi, ryanodin tarafından bloklandı (Şekil 2A) fakat anhidroryanodinden etkilenmedi (Şekil 2 B); ekstrasellüler Ca^{2+} -free solüsyon kullanıldığında hala gözlendi (Şekil 1B) ve ekstrasellüler 2 mM Ca^{2+} varlığında kafeinin indüklediği cevaplardan (Şekil 1A) anlamlı derecede farklı değildi. Bütün bu özellikler kafeinin hücre içi Ca^{2+} -depolarından Ca^{2+} salıverilmesine yol açtığını destekleyen güçlü kanıtlardır. Fakat PTX ile muamele kafein cevaplarını etkilemediğinden (Şekil 3), kafeinin etkisinde PTX duyarlı hücre içi sinyalleşmenin rol almadığı sanılmaktadır. Ekstrasellüler kafein uygulamasını takiben hücre membranından hızla penetre olarak <150 milisaniye gibi çok kısa sürede hücre içi konsantrasyonu hücre dışı ile dengeye gelebilen kafeine (13) cevabın ortaya çıkmasındaki gecikme PTX duyarlı G-proteini aktivasyonu dışında başka bir hücresel ikincil haberci mekanizmasının aktivasyonuna bağlı olabilir. Ayrıca, bu çalışmada kafeinin hücre içi depolardan Ca^{2+} salıverici etkisinin indirek indikatörü olarak kullandığımız Ca^{2+} -bağımlı membran iyon kanallarının (Ca^{2+} -bağımlı klor ve non-selektif katyon kanalları) aktivasyonu da bu gecikmeden sorumlu olabilir.

KAYNAKLAR

1. Miller RJ. The control of neuronal Ca^{2+} homeostasis. *Progress in Neurobiology* 1991; 37: 255-285.
2. Hess P. Calcium channels in vertebrate cells. *Ann Rev of Neurosci* 1990; 13: 337-356.
3. MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook SJ, et al. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 1986; 321: 519-552.
4. Berridge MJ. A tale of two messengers. *Nature* 1993; 365: 388-389.

5. Ayar A, Scott RH. The actions of ryanodine on Ca^{2+} -activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 359: 81-91.
6. Ayar A, Thatcher NM, Zehavi U, et al. Mobilization of intracellular calcium by intracellular flash photolysis of caged dihydrosphingosine in cultured rat sensory neurones. *Acta Biochim Pol* 1988; 45: 311-326.
7. Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 1977; 57: 71-108.
8. Lai SA, Erickson HP, Rousseau E, et al. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988; 331: 315-319.
9. Irving AJ, Collingridge GL, Schofield JG. Interactions between Ca^{2+} mobilizing mechanisms in cultured rat cerebellar granule cells. *J Physiol* 1992; 456: 667-680.
10. Friel DD, Tsien RW. A caffeine and ryanodine sensitive Ca^{2+} store in bullfrog sympathetic neurones modulates effects of Ca^{2+} entry on $[Ca^{2+}]_i$. *J Physiol* 1992; 450: 217-246.
11. Shmigol A, Svichar N, Kostyuk P, et al. Gradual caffeine-induced Ca^{2+} release in mice DRG neurones is controlled by cytoplasmic and intraluminal Ca^{2+} . *Neuroscience* 1995; 73:1109-1118.
12. Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflugers Archiv* 1981; 391: 85-100.
13. O'Neill SC, Donoso P, Eisner DA. The role of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]$ sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and $[Caffeine]_i$. *J Physiol* 1990; 425: 55-70.
14. Usachev Y, Shmigol A, Pronchuk N, et al. Caffeine-induced calcium release from internal stores in rat sensory neurones. *Neuroscience* 1993; 57: 845-859.
15. Meissner G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 485-508.
16. McPherson PS, Kim YK, Valdivia H, et al. The brain ryanodine receptor: a caffeine sensitive calcium release channel. *Neuron* 1991; 7: 17-25. Jefferies PR, Toia RG, Brannigan B, et al. Ryania insecticide: analysis of biological activity of ten natural ryanoids. *J Agric Food Chem* 1992; 40:509-512.
17. Shmigol A, Kostyuk P, Verkhatsky A. Role of caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in Ca^{2+} signal termination in adult mouse DRG neurones. *NeuroReport* 1994; 5: 2073-20