



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2014; 28 (1): 25 - 28
http://www.fusabil.org

Sıçan Duyusal Nöronlarında KCl ve Kapsaisin ile İndüklenen Hücre İçi Kalsiyum Cevapları Üzerinde Silostazolun Etkisi

Oktaç BURMA¹
Mete ÖZCAN²
Emine KAÇAR³
Ayhan UYSAL¹
Selim KUTLU⁴

¹Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Kalp ve Damar Cerrahi
Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Biyofizik Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

³Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

⁴Necmettin Erbakan
Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Konya, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 24.01.2014
Kabul Tarihi : 27.05.2014

Yazışma Adresi Correspondence

Selim KUTLU
Necmettin Erbakan
Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Konya-TÜRKİYE

skutlu@konya.edu.tr

Amaç: Silostazol, spesifik cAMP fosfodiesteraz III inhibitörü olmakla birlikte medikal olarak bir periferik arter hastalığı olan intermitan klodikasyon tanılı hastalarda fiziksel aktivite esnasında bacakta meydana gelen ağrının giderilmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ağrı çalışmaları için uygun bir deneysel model olan sıçan dorsal kök ganglionlarında (DKG) silostazolun hücre içi kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) düzeyi üzerindeki etkisini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: DKG nöronları 2 günlük Wistar cinsi sıçanlardan çeşitli enzimatik ve mekanik uygulamalarla elde edildi. DKG nöronları 1 μ mol Fura-2 AM boyasıyla boyanarak $[Ca^{2+}]_i$ seviyesindeki değişimler oransal florasan yöntemle tespit edildi. Kültürde bulunan hücreler 340-380 nm dalga boyunda uyarılıp 510 nm dalga boyunda kayıt yapıldı. Her bir nöronun 340/380 (bazal- pik) oranında bazal kalsiyum seviyesi tespit edildikten sonra kültür ortamına KCl (30 mM) ve kapsaisin (1 μ M) uygulandı. Silostazol tek başına veya KCl (30 mM) ve kapsaisin (1 μ M) ile birlikte kültür ortamına uygulanmasıyla küçük çapa sahip DKG nöronlarında meydana gelen $[Ca^{2+}]_i$ değişimi incelendi. Elde edilen veriler Student's t-testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi ve P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Silostazol kültür ortamına öncelikle olarak tek başına uygulandı ve bu uygulama sonucunda hücre içi bazal Ca^{2+} seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmedi (bazal=100.0 \pm 0.0 ve silostazol =%99.8 \pm 0.8). Ortama KCl uygulanması $[Ca^{2+}]_i$ seviyesini %190.3 \pm 6.2 seviyesine yükseltti (p<0.001). Kapsaisin uygulandığında ise $[Ca^{2+}]_i$ seviyesi %165.6 \pm 4.1 değerine ulaştı (P<0.001). Bununla birlikte ortama KCl ve kapsaisin ile birlikte silostazol uygulandığında ise $[Ca^{2+}]_i$ seviyesi sırası ile %189.4 \pm 4.6 ve %166.0 \pm 3.8 idi.

Sonuç: Bu çalışmada ile silostazolün DKG nöronlarında $[Ca^{2+}]_i$ düzeyinde herhangi bir değişime neden olmadığı belirlendi. Silostazol ağrı kesici etkisini muhtemelen hücre içi farklı mekanizmalarla gerçekleştirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Silostazol, duyusal nöron, kalsiyum sinyalleşmesi, ağrı.

Effect of Cilostazol on KCl and Capsaicin Induced Increase in Intracellular Calcium Signaling in Rat Sensory Neurons

Objective: Cilostazol, a specific cAMP phosphodiesterase III inhibitor, is used for medical treatment of intermittent claudication in peripheral artery disease to prevent leg pain during physical activity. Dorsal root ganglion (DRG) neurons are eligible experimental model for pain investigations. Aim of this study was to figure out the effect of cilostazol on intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) signaling in cultured rat DRG neurons.

Materials and Methods: DRG neurons were grown in primary culture following enzymatic and mechanical dissociation of ganglia from 2-day-old Wistar rats. DRG neuronal cultures were loaded with 1 μ mol Fura-2AM and $[Ca^{2+}]_i$ responses to stimulation were assessed by using fluorescent ratiometry. Cultured cells were excited at 340 and 380nm and emission was recorded at 510nm. Responses were determined by the change in 340/380 ratio (basal-peak) for individual neurons. After basal recordings, KCl (30mM) and capsaicin (1 μ M) applied to medium for induction of $[Ca^{2+}]_i$. Cilostazol treated alone or co-administered with KCl and capsaicin for determining the possible changes in calcium signaling in small size DRG neurons. Data were analyzed by using Student's t test, P level of <0.05 defining statistical significance.

Results: Firstly exposure to cilostazol failed to cause any significant change in basal $[Ca^{2+}]_i$ response (basal=100.0 \pm 0.0 and cilostazol =99.8 \pm 0.8 %). KCl and capsaicin had significant increase in $[Ca^{2+}]_i$ responses to 190.3 \pm 6.2% and 165.6 \pm 4.1% (respectively, P< 0.001). But co-application of cilostazol with KCl and capsaicin did not alter the KCl and capsaicin induced elevation in $[Ca^{2+}]_i$ (189.4 \pm % 4.6 and 166.0 \pm 3.8% respectively).

Conclusion: In conclusion, the results of present study suggest that cilostazol has no effect on $[Ca^{2+}]_i$ signaling in rat sensory neurons in vitro. It seems cilostazol may activate other mechanism(s) at cellular level rather than modulating calcium signaling in DRG neurons.

Key Words: Cilostazol, sensory neuron, calcium signaling, pain.

Giriş

Periferel arter hastalığı (PAH) dünya genelinde en önemli kardiyovasküler problemlerden biridir (1). Diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi ve sigara kullanımı PAH riskini artırmaktadır (2, 3). Alt ekstremiteleri tutan orta dereceli PAH'nın en sık rastlanan semptomu aralıklarla ortaya çıkan ağrıdır ve genellikle intermitan klodikasyon şeklinde isimlendirilen bir yürüme bozukluğu şikayetidir (4). İntermitan klodikasyon kişide egzersiz ve yüreme yeteneğini sınırlamakta ve egzersize bağlı iskemi nedeniyle bacak kaslarında ağrı meydana gelmektedir. İntermitan klodikasyonun tedavi seçenekleri arasında yaşam stilinin değişimi, ilaç tedavisi ve egzersiz yer almaktadır (5).

Silostazol antiplatelet, antitrombotik ve vazodilatör etkilere sahip selektif fosfodiesteraz-3 inhibitörüdür ve İntermitan klodikasyonun periferel vasküler hastalık tedavisinde kullanılmaktadır (6, 7).

Ağrı iletimi periferel reseptörlerin (nosiseptör) uyarılmasını takiben, dorsal kök ganglionları (DKG) nöronları, spinal kord ve beyin sapını da içeren ağrı yolları vasıtasıyla, merkezi sinir sisteminin daha üst seviyelerine bu nosiseptörler ile iletilir (8). Yapılan çalışmalar doku hasarını takiben DKG nöronlarındaki voltaj ve ligand kapılı iyon kanallarının fonksiyonunda ve ekspresyonunda değişim meydana getirdiğini göstermiştir (9, 10). Bununla birlikte, bu iyon kanallarının farmakolojik, fizyolojik ve moleküler yapısı tam anlamıyla aydınlatılmamıştır (11).

DKG nöronları çaplarına göre küçük, orta ve büyük olmak üzere üç alt sınıfa ayrılmaktadır. (12) Küçük çapa sahip olan DKG nöronları (<30 µm) potansiyel nosiseptörler olarak değerlendirilirken, daha büyük çapa sahip nöronlar ise genelde non-nosiseptif nöron oldukları kabul edilir (12).

Kalsiyum iyonu, aralarında nörotransmitter salınımı, gen ekspresyonu, mRNA stabilitesi ve nöronal uyarılabilirlik gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynayan bir "ikincil haberci"dir. Ayrıca hücre içine yüksek miktarda Ca^{+2} akışı ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun ($[Ca^{+2}]_i$) aşırı artışı nöronal hasara yol açarak pek çok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. Bu sebeple $[Ca^{+2}]_i$ sıkı bir kontrol altındadır (13).

Bu çalışmanın amacı intermitan klodikasyonun tedavisinde kullanılan silostazolun küçük çapa sahip DKG nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine olan etkisini kalsiyum görüntüleme yöntemi kullanarak incelemektir.

Gereç ve Yöntem

Sıçan Dorsal Kök Ganglion Hücrelerinin Primer Kültürünün Hazırlanması: Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen 1-2 günlük Wistar cinsi yavru sıçanlar kullanıldı. Sıçan DKG sinir hücrelerinin primer kültürü daha önce detaylı olarak yayınlanan protokole göre çeşitli enzimatik

ve mekanik yöntemlerle izole edilerek tek hücrelere ayrıştırıldı (14).

İzole edilen hücreler, 12 mm çapa sahip daha önceden poli-D-lizin ve laminin kaplanmış cam lamellere (BD BioCoat, ABD) ekildi. Bu işlemin ardından inkübasyon amacıyla 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli bir inkübatöre (Heraeus, Almanya) bırakıldı. Lamel üzerine DKG nöronlarının iyice yapışması sağlamak amacıyla en az 4-6 saat süreyle inkübe edildi ve daha sonra kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanıldı.

Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme ve Görüntü

Analizleri: Hücrelerin Fura-2-acetoxymethyl ester (AM) ile yüklenmesi (floresan işaretleme): Bu çalışmada 1 günlük DKG hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerin kültür ortamında 20 gün yaşatılmasına rağmen, 1 günlük hücrelerin kullanılmasının sebebi aksonal ve dendritik uzantıların floresan kalsiyum görüntüleme deneylerindeki hesaplamaları etkilemesidir. Floresan boya yüklemesi amacıyla hücreler Fura-2 AM (Fura-2 acetoxymethyl ester) (5 µM, Molecular Probes, İngiltere) ile oda sıcaklığında (≈ 22°C) bir saat inkübe edildi. Yüklemeyi takiben hücreler 20 dk içerisinde NaCl esaslı hücre dışı solüsyonu [135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 11.5 mM glikoz, 11.6 mM HEPES (ozmolarite 310 - 320 mOsm, sukroz) ile en az üç kez daha yıkanarak, hücre dışındaki boya uzaklaştırıldı ve fura-2'nin deesterifikasyonu sağlandı. Bu işlemi takiben hücreler, mikroinkübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktarıldı ve mikroinkübasyon-perfüzyon sistemi (Warner Instruments, ABD) aracılığı ile (1 ml/dakika) sürekli solüsyonlar perfüze edildi ve bu hücreler floresan ataşmanlı Nikon TE 2000S ters mikroskop altında gerektiğinde görsel olarak değerlendirildi. Bir Xenon ışık kaynağından (LS- Sutter Instr, ABD) UV ışını hızlı bir otomatik filtre sürücüsüne (Lambda-2, Sutter Instr, ABD) gönderildi. Işıklar bu filtre sürücüsünün sahip olduğu 340 ve 380 nm filtrelerden (Chroma, ABD) geçerek mikroskop optikleri (Nikon TE 2000 S, S-flour 40X objektif, NA=1.4) aracılığı dual eksitasyon ve 510 nm'de emisyon gerçekleşmesini sağladı. Dijital bir CCD kamera (ORCA 285, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japonya) aracılığı ile floresan görüntüleri ve veri kazanım-yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığı ile bilgisayar hafızasına kayıt edildi ve bu işlemi takiben floresan oranları off-line olarak analiz edildi.

Çalışmada kullanılan silostazol ve KCl deiyonize suda, kapsaisin (Sigma) ise dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Hücreler, perfüzyon sistemi aracılığı ile sadece kısa süreli kapsaisin (1 µM) ve yüksek K⁺ (30 mM) uygulamasına maruz bırakıldı. DMSO'nun uygulanan konsantrasyonunun $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine etkisi olmadığı belirlendi.

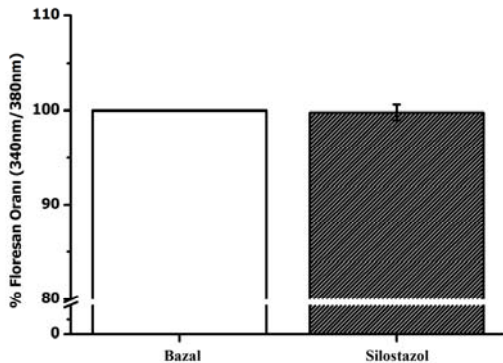
İstatistiksel Analizler: Bütün veriler ortalama ± standart hata (ort±SH) olarak belirlendi. İstatistiksel karşılaştırmalar için Student's t testi kullanıldı. P<0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

Bulgular

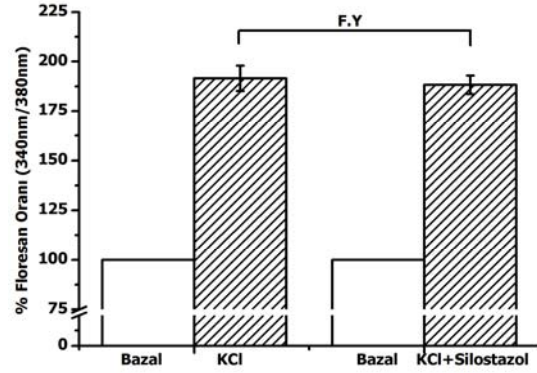
Bu çalışmanın başlangıcında ilk olarak silostazolun bazal $[Ca^{2+}]_i$ düzeyi üzerine etkinliği incelendi. Silostazolun (1 μ M) DKG nöronlarında bazal kalsiyum seviyesi üzerine etkisinin olmadığı tespit edildi. Bazal kalsiyum seviyesi $\%100.0 \pm 0.0$ kabul edildiğinde silostazol uygulaması ardından ölçülen kalsiyum seviyesi $\%99.8 \pm 0.8$ idi (Şekil 1). Bu uygulamanın ardından $[Ca^{2+}]_i$ değişiklikleri takip edebilmek amacıyla küçük çaplı DKG hücrelerinin kapsaisin ve yüksek K^+ ile uyarıma cevaplılığı tespit edildi. Uygulamalar öncesi floresan oranı (340/380 nm) yaklaşık olarak 0.6 ve 0.8 arasındaydı.

Non-spesifik membran depolarizasyonu meydana getiren KCl uygulaması ile meydana gelen $[Ca^{2+}]_i$ seviyesindeki değişim tüm hücre alt tiplerinde (küçük, orta ve büyük) daha önceki çalışmalarla (15) uyumlu bir şekilde benzerdi. Kapsaisin duyarlı olan nosiseptif nöronlar daha önce yapılan bir çalışma (15) ile ortaya konulan kapsaisin uygulamasının küçük çaplı DKG nöronlarında büyük ve orta çaplı DKG nöronlarına oranla çok daha yüksek oranda ve belirgin bir $[Ca^{2+}]_i$ artışına yol açması, bu çalışmada elde edilen kapsaisin cevapları ile benzerlik göstermektedir. Mevcut deney koşullarında fura-2 ile yüklenmiş stabil (bazal) istirahat floresan sinyalleri veren DKG hücrelerinden en az 5 dk süresince stabil floresan sinyalleri kayıt edilebilmiştir. Bu kaydın devamında yüksek konsantrasyon KCl (30mM) uygulandığında küçük çaplı DKG nöronlarında meydana gelen $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonundaki artış $\%190.3 \pm 6.2$ (n=20) iken, 1 μ M silostazol+KCl uygulandığında meydana gelen artış $\%189.4 \pm 4.6$ (n=20) idi (Şekil 2). KCl'ün yalnız başına ve silostazol ile birlikte uygulaması arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunamadı.

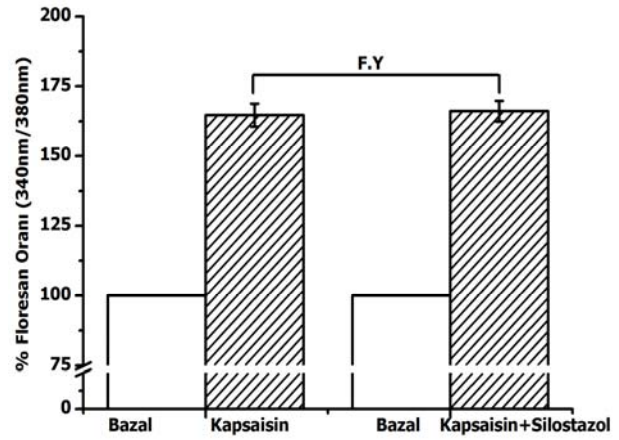
Benzer şekilde kapsaisin uygulandığında, $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonu küçük çaplı DKG nöronlarında önemli ölçüde artmıştı. Bu meydana gelen artış $\% 165.6 \pm 4.1$ (n=20) iken, 1 μ M silostazol+kapsaisin uygulandığında meydana gelen artışın $\% 166.0 \pm 3.8$ (n=20) olduğu tespit edildi (Şekil 3). Kapsaisinin yalnız başına ve silostazol ile birlikte uygulamasının küçük çaplı DKG nöronlarında $[Ca^{2+}]_i$ seviyesindeki artış incelendiğine farklılık bulunmamaktaydı.



Şekil 1. Silostazol bazal kalsiyum seviyesi üzerine etkisi



Şekil 2. KCl'nin yalnız başına ve silostazol ile birlikte uygulaması F.Y: Fark yok



Şekil 3. Kapsaisinin yalnız başına ve silostazol ile birlikte uygulaması F.Y: Fark yok

Tartışma

Bu çalışmanın bulguları, duyuşsal nöronlarda KCl ve kapsaisin ile indüklenen $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonundaki artışı, fosfodiesteraz-3 enzim inhibitörü silostazolun aktive etmediğini göstermektedir.

DKG nöronlarının KCl ve kapsaisin ile uyarılmaya karşılık oluşan cevapları, çaplara göre sınıflandırıldığında silostazolun, KCl ve kapsaisin ile birlikte uygulamasının çap farkı olmaksızın bu nöronları etkilemediği tespit edildi.

Silostazolun platelet agregasyonunu, intraselluler cAMP miktarını ve protein kinaz A aktivasyonunu artırarak meydana getirdiği bilinmektedir (16, 17). Ayrıca silostazolun kardiyoprotektif etkisinin mitokondriyal kalsiyum aktiveli potasyum kanallarının (mitoK_{Ca}) açılmasının rolü olabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (18-20). Buna ilaveten silostazolun yüksek iletkenlikli kalsiyum bağımlı potasyum kanalları aracılığıyla hipofiz GH3 hücrelerinde ve feokromositoma PC12 hücrelerinde arttırdığı gösterilmiştir (21). Ancak DKG hücrelerinde yapılan bu çalışmada kalsiyum bağımlı K^+ kanal iletkenliği sorgulanmamıştır.

Tüm bu çalışmalar ilave çalışmalarla silostazolun DKG nöronlarında da benzer etkilerinin olup olmadığını incelemesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; spesifik cAMP fosfodiesteraz 3 inhibitörü olan silostazolun duyusal nöronlar üzerine

meydana getirebileceği olası etkilerin ve hücrel mekanizmalarının ilave çalışmalarla sorgulanması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Whyne TF. A Review of the role of anticoagulation in the treatment of peripheral arterial disease. *Int J Angiol* 2012; 21: 187-194.
2. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, et al. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation* 1985; 71: 510-515.
3. Criqui MH, Denenberg JO, Langer RD, Fronek A. The epidemiology of peripheral arterial disease: Importance of identifying the population at risk. *Vasc Med* 1997; 2: 221-226.
4. Schainfeld RM. Management of peripheral arterial disease and intermittent claudication *J Am Board Fam Prac* 2001; 14: 443-450.
5. Hankey GJ, Norman PE, Eikelboom JW. Medical treatment of peripheral arterial disease. *JAMA* 2006; 295: 547-553.
6. Kawanabe Y, Takahashi M, Jin X, et al. Cilostazol prevents endothelin-induced smooth muscle constriction and proliferation. *PLoS One* 2012; 7: 44476.
7. Sallustio F, Rotondo F, Di Legge S, Stanzione P. Cilostazol in the management of atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2010; 8: 363-372.
8. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 2004; 1000: 40-56.
9. Devor M, Janig W, Michaelis M. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol* 1994; 71: 38-47.
10. Devor M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. *Textbook of Pain*. 3rd Edition. Wall PD, Melzack, R. (Editors). Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994; 79-101.
11. Moldovan M, Alvarez S, Romer Rosberg M, Krarup C. Axonal voltage-gated ion channels as pharmacological targets for pain. *Eur J Pharmacol* 2013; 708:105-112.
12. Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 1985; 359: 31-46.
13. Miller RJ. The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog Neurobiol* 1991; 37: 255-285
14. Ozcan M, Ayar A, Serhatlioglu I, et al. Orexins activates protein kinase C-mediated Ca(2+) signaling in isolated rat primary sensory neurons. *Physiol Res* 2010; 59: 255-262.
15. Özcan M, Alçin E, Kuzgun KT, Keleştimur H, Ayar A. Sıçan duyusal sinir hücresi alt tiplerinde kalsiyum sinyallerinin incelenmesi: Kapsaisin duyarlılığı, nonspesifik depolarizasyon ve hücre çapı arasındaki ilişki. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30: 544-552.
16. Kimura Y, Tani T, Kanabe T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1144-1149.
17. Tanaka K, Gotoh F, Fukuuchi Y, et al. Effects of a selective inhibitor of cyclic AMP phosphodiesterase on the pial microcirculation in feline cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20: 668-673.
18. Xu W, Liu Y, Wang S, et al. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 2002; 298: 1029-1033.
19. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 2005; 111: 198-203.
20. O'Rourke B. Mitochondrial ion channels. *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 19-49.
21. Wu SN, Liu SI, Huang MH. Cilostazol, an inhibitor of type 3 phosphodiesterase, stimulates large-conductance, calcium-activated potassium channels in pituitary GH₃ cells and pheochromocytoma PC12 cells. *Endocrinology* 2004;145: 1175-1184.