

# Hiperglisemi RBL-1 hücrelerinde $Ca^{2+}$ salınımı ile aktive olan $Ca^{2+}$ akımlarını ( $I_{CRAC}$ ) arttırır

## Hyperglycemia increases $Ca^{2+}$ realese activated $Ca^{2+}$ current ( $I_{CRAC}$ ) in RBL-1 cells

Yasin GÖKÇE<sup>1</sup> (ID), Taufiq RAHMAN<sup>2</sup> (ID), Nazmi YARAŞ<sup>3</sup> (ID)

### ÖZET

**Amaç:** Depo bağımlı  $Ca^{2+}$  girişi (SOCE) olarak farklı türde akımlar tanımlanmış olsa da bunlar arasında en iyi bilineni  $Ca^{2+}$  salınımı ile aktive olan  $Ca^{2+}$  akımlarıdır ( $I_{CRAC}$ ). SOCE yolu çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen hücre içi  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) sinyalleri oluşturmak için önemli bir yoldur. Anormal SOCE, özellikle alerji, diyabet, yangı ve kanseri içeren birçok çeşitli hastalık tipinin altında yatan önemli sebeplerden biri olarak görülmektedir. Bu çalışmada, hipergliseminin SOCE aktivitesi üzerine olan etkileri elektrofizyolojik yöntemlerle incelenmiştir.

**Yöntem:** Bu çalışmada, sıçan bazofilik lösemi-1 (RBL-1) hücreleri yüksek glikoz (YG, 50mM) ve normal glikoz (5.5mM) derişimine sahip DMEM solüsyonları kullanılarak çoğaltılmıştır. RBL-1 hücreleri yeterli sayıya ulaşmasının ardından 72 saat süreyle yüksek glikoz ortamına maruz bırakılmıştır. Bu süreyi takiben hücrelerden Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme tekniği ile SOCE aktivitesi ve voltaj kenetleme yöntemiyle  $I_{CRAC}$  akımları ölçülmüştür.

**Bulgular:**  $I_{CRAC}$  akım ölçümleri patch-clamp ve Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme yöntemleriyle

### ABSTRACT

**Objective:** Although different types of currents have been defined as store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE), the best characterized of these is  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  currents ( $I_{CRAC}$ ). The SOCE pathway is an important way to generate cytosolic  $Ca^{2+}$  signals that regulate various biological processes. Abnormal SOCE appears to be one of the underlying causes of several diseases, particularly allergies, diabetes, inflammation, and cancer. In this study, the effects of hyperglycemia on SOCE activity were investigated by electrophysiological methods.

**Methods:** In this study, rat basophilic leukemia-1 (RBL-1) cells were grown using DMEM solutions with high glucose (HG, 50mM) and normal glucose (5.5mM) concentrations. Following 72 h incubation period, SOCE activity was measured by Fura-2 based  $Ca^{2+}$  imaging technique and ICRAC currents recorded by voltage clamp method.

**Results:**  $I_{CRAC}$  current measurements were performed by the patch-clamp method and Fura-2 based  $Ca^{2+}$

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa  
<sup>2</sup>Cambridge Üniversitesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Cambridge, İngiltere  
<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Antalya



**İletişim / Corresponding Author :** Yasin GÖKÇE  
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü, Şanlıurfa - Türkiye  
E-posta / E-mail : ygokce58@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 22.12.2020  
Kabul Tarihi / Accepted : 29.03.2021

gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol deneyler için PYR6 (SOCE blokörü) kullanılarak akımların SOCE yolağı üzerinden olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca hipergliseminin RBL-1 hücrelerinde SOCE aktivitesini kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı iki farklı yöntemle tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Bulgularımız diyabetik patolojilerde karşılaşılan  $Ca^{2+}$  homeostazındaki ve ER/SR depolarının  $Ca^{2+}$  içeriğindeki bozulmalarda SOCE yolağı ile ilgili proteinlerin önemli bir rolü olabileceğini ortaya koymaktadır. Hücre düzeyinde elde edilen bu bulgular sınırlı olsa da ileride geliştirilecek olan çalışmalara büyük katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** SOCE, RBL-1 hücreler, patch-clamp, hiperglisemi

imaging methods. For positive control experiments, using the PYR6 (SOCE blocker), it was confirmed that the currents were through the SOCE pathway. In addition, it was determined by two different methods that hyperglycemia significantly increased SOCE activity in RBL-1 cells compared to control values.

**Conclusion:** Our findings reveal that the SOCE pathway may have an important role in the disturbances in  $Ca^{2+}$  homeostasis and  $Ca^{2+}$  content of ER/SR stores encountered in diabetic pathologies. Although these findings at the cellular level are limited, it is thought that they will make great contributions to future studies.

**Key Words:** SOCE, RBL-1 cells, patch-clamp, hyperglycemia

## GİRİŞ

Döllenmeden hücre ölümüne kadar hücresel yaşamın neredeyse her yönünü düzenleyen  $Ca^{2+}$ , evrensel ve çok yönlü bir hücre içi habercidir.  $Ca^{2+}$  sinyallerinin üretilmesi, hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu dinlenim durumundaki düşük ( $\leq 500$  nM) değerinden yaklaşık  $\sim 1\mu M$  seviyesine kadar geçici artışı ile gerçekleşir (1). Hücrelerin bunu gerçekleştirebilmeleri hücre içi depolardan endoplazmik retikulum (ER), uyarıcı-bağımlı  $Ca^{2+}$  salınımına ve ayrıca hücre dışında plazma membranı (PM) üzerine yerleşmiş ligand- veya voltaj-bağımlı  $Ca^{2+}$  geçirgen iyon kanallarından  $Ca^{2+}$  girişine bağlıdır. Bununla birlikte, birçok hücre için,  $Ca^{2+}$ 'yi sinyallerinin ana kaynağı, farklı ve benzersiz bir  $Ca^{2+}$  giriş mekanizması olan depo bağımlı  $Ca^{2+}$  girişi (SOCE) ile gerçekleşir. SOCE, hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının hızlı boşaltılması neticesinden PM üzerinde bulunan Orai1 kanalı ( $Ca^{2+}$  salınımı ile aktive olan  $Ca^{2+}$

kanalı), üzerinden devamlı- $Ca^{2+}$  akımı ( $I_{CRAC}$ ) şeklinde gerçekleşir. Orai1 kanalı, ER membranında eksprese edilen ve ER lümeni içindeki  $Ca^{2+}$  düşüşünü etkili bir şekilde “algılayan” stromal etkileşim molekülü-1 (STIM1) proteinlerinin bu kanalla olan fiziksel teması neticesinde aktive olur ve hücre içine  $Ca^{2+}$  girişini tetikleyerek  $Ca^{2+}$  homeostazında önemli görev alır. SOCE kavramı, yaklaşık otuz yıl önce James Putney tarafından, hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasının her zaman plazma membranı boyunca  $Ca^{2+}$  akışının artmasına yol açtığı gözlemini açıklayabilmek adına formüle edilmiştir. SOCE'nin oluşması için gereken tek şey hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasıdır, bu duruma endojen hücresel sinyal yolları veya farmakolojik reaktifler neden olmaktadır. SOCE ilk olarak mast hücrelerinde tanımlanmasına ve çoğunlukla bu ve diğer uyarılmayan hücrelerde çalışmasına rağmen, bu tür  $Ca^{2+}$  giriş yolağının uyarılabilir hücreler de dahil olmak üzere her tür hücrede var olduğuna dair kanıtlar yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir (2-5).

SOCE'nin geleneksel olarak azalmış hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarını doldurmak için ana yolak olarak görev aldığı iyi bilinmektedir. Bu kadar önemli görevlerinin yanında, SOCE'nin ekzositoz, mitokondriyal metabolizma, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve çoğalması gibi bazı daha spesifik biyolojik süreçleri düzenlemek için uzaysal-zamansal olarak karmaşık  $Ca^{2+}$  sinyalleri de sağlayabileceğine dair kanıtlar ortaya çıkmaya devam etmektedir (6). Son yıllarda, anormal Orai1 kanal aktivitesi, şiddetli kombine immün yetmezlik bozuklukları, diyabet, alerji, tromboz, akut pankreatit, enflamatuar bağırsak hastalığı, romatoid artrit ve kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında gösterilmiştir (7, 8).

Tip 2 diyabetin (T2D) önemli nedensel faktörleri hem kronik hiperglisemi hem de hiperlipidemi olduğu bilinmektedir. Ayrıca T2D ve ER stres arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmiştir (9). ER stres ise genel olarak ER  $Ca^{2+}$  seviyesi düşüklüğü ile karakterize bir durumdur (10). Tüm bu bulgular SOCE kanallarının bu süreçte oldukça önemli bir etkinliğe sahip olması gerekliliğini düşündürmektedir. Ayrıca, son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ER stresinin SOCE etkinliğinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (11).

SOCE  $Ca^{2+}$  sinyallerinin yukarıda bahsedilen bazı özel hücresel işlemlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı göz önüne alındığında, bu yolağın herhangi bir modülatörünün normal ve patolojik koşullar altında hücre biyolojisi üzerinde önemli etkilere sahip olması muhtemeldir.

Bu çalışmada, normal glikoz (NG, 5.5mM) ve yüksek glikoz (YG, 50mM) ortamında çoğaltılan RBL-1 hücrelerinde SOCE ölçümleri voltaj kenetleme yöntemi ve Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hücre Kültürü

RBL-1 hücreleri %10 (v/v) fetal sığır serumu, 2mM L-glutamin ve %1 (v/v) antibiyotik/antimikotik ile

desteklenen F-12 besin karışımı ile NG (5.5mM) ve YG (50mM) DMEM solüsyonu kullanılarak 37 °C'de, %5  $CO_2$  ve %95 hava ile nemlendirilmiş ortamda kültüre edilmiştir. Hücreler 75  $cm^2$ 'lik flaskta tutulmuş ve ~%80 çoğalmaya ulaştıktan sonra haftada en az bir kez pasajlanmıştır. Hücreler pasaj yapılmadan önce DMEM ve tripsin 37 °C'ye önceden ısıtılmıştır. Flasktaki hücre ortamı aspire edilmiş ve hücreler, 2-3 ml tripsin ilave edilerek flasktan ayrılması sağlanmıştır. Yaklaşık 2-3 dakika sonra, yapışan hücrelerin tamamen ayrılmasına sağlamak için flask yavaşça çalkalanmış ve ardından 8-10 ml DMEM ilave edilerek tripsin nötralize edilmiştir. Hücre süspansiyonu daha sonra birkaç kez nazikçe pipetlenmiş, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatantlar atılmış ve pelletler DMEM (1ml) içinde yeniden süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, hücrelerden akım kayıtları ve  $Ca^{2+}$  sinyal kaydı için plastik ve cam tabanlı petrilere (10 mm) ekilmek suretiyle ilgili deneyler için kullanılmıştır.

### Hücre içi $Ca^{2+}$ Ölçümü

SRBL-1 hücreleri 10 mm'lik cam tabanlı petrilere ekilmiştir. Fura-2 asetoksümetil ester (Fura2-AM), 2 mM'lik bir stok konsantrasyonu hazırlamak için DMSO içerisinde %20 Pluronic® F-127 çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. Boya daha sonra Hank dengeli tuz çözeltisi (HBSS) tamponunu içeren  $Ca^{2+}$  (1.25mM) içinde 3  $\mu$ M çalışma konsantrasyonuna seyreltilmiştir. Hücreler, önceden ısıtılmış HBSS tamponu kullanılarak birkaç kez iyice yıkanmış ve pH 7.4'te tutuldu. Daha sonra hücreler, karanlık bir odaya alınarak 40 dakika süreyle Fura-2 ile yüklenmeleri sağlanmıştır. Hücreler daha sonra boyayı ortamdaki çıkarmak için taze ve önceden ısıtılmış  $Ca^{2+}$  içeren tamponda yıkanmış ve hücreler içindeki tüm boyanın de-esterleşmesini sağlamak için 30 dk süreyle taze takviye edilmiş HBSS tamponuna aktarılmıştır. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. De-esterifikasyon aşamasından sonra hücreler  $Ca^{2+}$  içermeyen tampon ile yıkanmış ve mikroskopta ilk olarak  $Ca^{2+}$  içermeyen durumda görüntüleme başlatılmıştır. Başlangıç

flüoresansı ilk olarak >50s süreyle kaydedilmiş, ardından 2  $\mu$ M thapsigargin (Tg) eklenmiştir. ~10dk sonra, hücre dışı (banyo) solüsyonuna  $Ca^{2+}$  (2 mM) eklenmiş ve ~10dk sonra, banyo solüsyonuna 10  $\mu$ M iyonominin ve 1 mM  $MnCl_2$  eklenmiştir. Pozitif kontrol (Pyr6) için hücreler,  $Ca^{2+}$  görüntülemenin başlamasından önce 15 dakika boyunca istenen bileşik konsantrasyonu ile inkübe edilmiştir.

Floresan görüntüler, QImaging QIClick dijital CCD kamera ile monte edilmiş Nikon Eclipse Ti-S Mikroskop ve 10X (NA 0.25) hava hedefi kullanılarak yakalanmıştır. Uyarma, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boylu LED'ler arasında değişen bir Çift OptoLED Güç Kaynağı (Cairn, İngiltere) ile sağlanmıştır. Fura-2 sinyalinin emisyon floresansı 510 nm'de (470 nm - 550 nm) toplanmıştır. MetaFluor® (Molecular Devices, ABD) Floresan Oranı Görüntüleme Yazılımı ile her 5 saniyede bir 12 bitlik görüntüler elde edilmiştir. Her bir zaman noktasındaki floresan, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boyları için elde edilmiş, oto-floresans için düzeltilmiş ve 355 nm/380 nm oranları hesaplanmıştır.

### Elektrofizyoloji

RBL-1 hücrelerinde CRAC akımları oda sıcaklığında (22-25 °C) tüm-hücre konfigürasyonu kullanılarak kaydedilmiştir. Yama (patch) pipetleri borosilikat cam kapilerlerden (World Precision Instruments, Hitchin, UK) çekilmiştir. Pipet solüsyonu (mM cinsinden): sezyum glutamat 145, NaCl 8,  $MgCl_2$  1, MgATP 2, EGTA 10, HEPES 10, pH 7,2 CsOH ile pipetler doldurulduğunda 2.5-4 M $\Omega$  dirençlere sahipti. Hücre dışı (banyo) solüsyonu ise (mM cinsinden): NaCl 145, KCl 2,8,  $CaCl_2$  10,  $MgCl_2$ , CsCl 10, glikoz 10, HEPES 10, pH NaOH ile 7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm voltajlar hücre içi ve dışı arasındaki +10 mV'luk sıvı bağlantı potansiyeli için düzeltilmiştir.  $I_{CRAC}$ , her 4s'de bir uygulanan step protokolleri (150 ms süreyle 0 - -80 mV) kullanılarak ölçülmüştür. PCLAMP 10 yazılımı ile Axopatch 200B ve Digidata 1440A (Moleküler Cihazlar) veri toplama ve analiz için kullanılmıştır. Veriler 10 kHz'de sayısallaştırılmış ve 1 kHz'de filtrelenmiştir. Hücreler, pulslar arasında 0

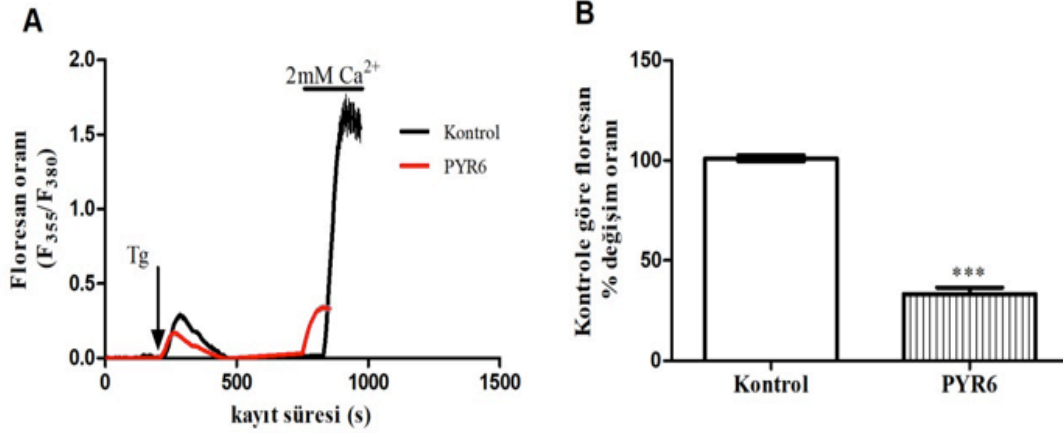
mV'da tutulmuştur. Kapasitif akımlar, her voltaj ramp protokolü öncesi kompanse edilmiştir. Sızıntı akımları tüm-hücre modu sonrası ilk 2-3 kayıt diğer tümünden çıkarılmak kaydıyla elemine edilmiştir. Akım genişliği hücre boyutuna göre normalize edilerek pA/pF olarak gösterilmiştir. Hücreler, kayıttan önce ~ 15dk süreyle PYR6 (3 $\mu$ M) ile inkübe edilmiştir.

### BULGULAR

SOCE çalışmalarında yaygın olarak kullanılan RBL-1 hücrelerinde Fura-2 bazlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme tekniği (12, 13) kullanılarak hipergliseminin SOCE üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu hücreler ilk önce banyo solüsyonu  $Ca^{2+}$  içermeyen ortamda, sarko-endoplazmik  $Ca^{2+}$ -ATPaz'ı (SERCA) inhibe ederek hücre içi  $Ca^{2+}$  deposunu pasif olarak boşaltan thapsigargin (Tg) ile muamele edilmiştir. Daha sonra, hücrelerde SOCE ölçümü için banyo solüsyonunda  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde  $Ca^{2+}$  uygulaması yapılmıştır. Öncelikli olarak SOCE ölçümlerinin doğrulanması için RBL-1 hücreleri 15dk süre ile PYR6 (SOCE blokörü) ile inkübe edilerek Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  sinyal ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 1'den görüldüğü gibi SOCE blokörü olarak uygulanan PYR6, SOCE aktivitesini kontrol değerlerine göre yaklaşık ~ %60 oranında azaltmıştır.

Daha sonra YG ortamında çoğaltılan RBL-1 hücrelerinde SOCE değişimlerini değerlendirmek üzere Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  sinyal ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 2'den görüldüğü gibi 72 saat süre ile YG ortamının çoğaltılan RBL hücrelerinde SOCE değerlerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir.

$Ca^{2+}$  görüntüleme deneylerinden elde edilen bulguları desteklemek için, RBL-1 hücrelerinden SOCE akım ( $I_{CRAC}$ ) ölçümleri voltaj kenetleme yöntemi kullanılarak tüm-hücre modunda gerçekleştirilmiştir. Şekil 3'den görüldüğü gibi  $I_{CRAC}$  akımları YG ortamında kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ( $I_{CRAC}$ : Kontrol: -2,024pA/pF, YG: -3,194pA/pF,  $p < 0,001$ ).

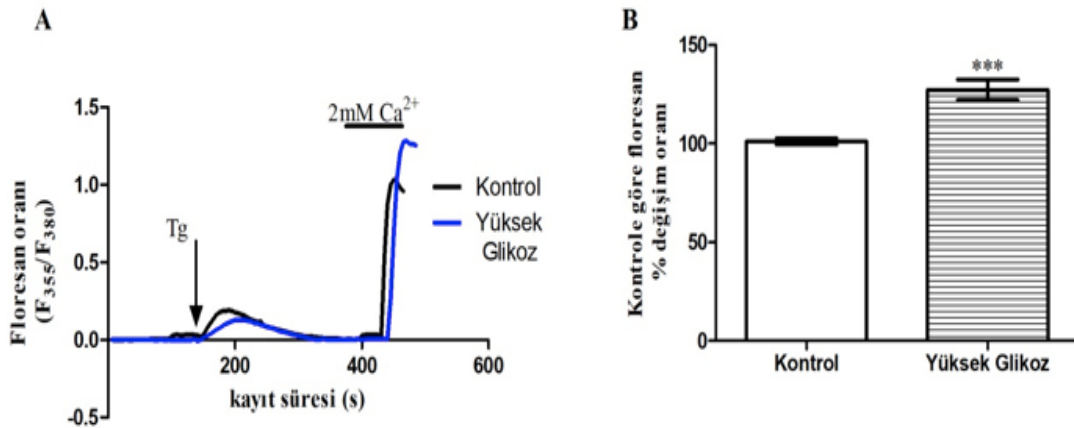


**Şekil 1.** A) RBL-1 hücrelerine 2  $\mu$ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca<sup>2+</sup> sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden iki grup için örnek traseler.

B) Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği.

Her bir değer (ortalama  $\pm$  SEM) 3-5 ayrı deneylerden ve toplam 30-60 hücreden elde edilmiştir.

Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test ile hesaplanmıştır (\*\*\*; p<0,001).

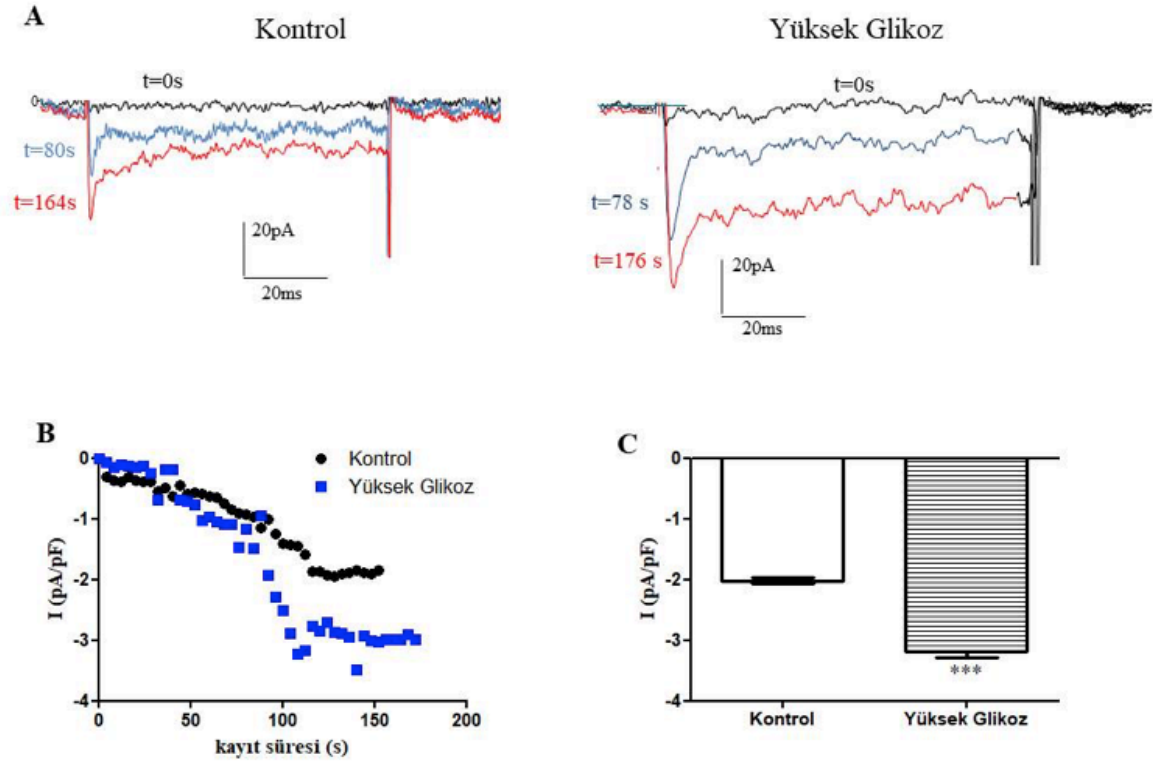


**Şekil 2.** A) RBL-1 hücrelerine 2  $\mu$ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca<sup>2+</sup> sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden kontrol ve yüksek glikoz grupları için örnek traseler.

B) Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği.

Her bir değer (ortalama  $\pm$  SEM) 3-5 ayrı deneylerden ve toplam 30-60 hücreden elde edilmiştir.

Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test ile hesaplanmıştır (\*\*\*; p<0,001).



**Şekil 3.** A) RBL-1 hücrelerine ait  $I_{CRAC}$  akımlarını gösteren örnek traseler (kontrol ve yüksek glukoz grupları). B) Her bir grup için en az 5-hücreden elde edilen  $I_{CRAC}$  akımlarının -80mV değerlerinin zamana göre değişim grafikleri. C) Bar grafiği (ortalama  $\pm$ S.E.M) akım yoğunluklarının tepe değerlerini göstermiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test ile hesaplanmıştır (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

RBL-1 hücreleri, bağışıklık ve nöroimmün sistemlerin bir parçası olan mast hücrelere olan fonksiyonel benzerlikleri, genetik olarak manipüle edilebilmeleri ve kolayca çoğaltılabilmeleri açısından yaygın şekilde kullanılmaktadır ayrıca SOCE proteinleri bu hücrelerde eksprese edilmektedir (14). Bu anlamda, RBL-1 hücrelerde

hipergliseminin SOCE yolağını nasıl etkilediğinin gösterilmesinin literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmüştür.

Hücre içi  $Ca^{2+}$ 'in sürekli birikimi hücrelerde  $Ca^{2+}$  aşırı yüklenmesine neden olacağı, bu da enerji üretiminin bozulmasına ve diyabet gibi patolojik durumlarda oksidatif stresin daha da artmasına neden olacağı iyi bilinmektedir.  $Ca^{2+}$ 'yi regülasyonu hücre fonksiyonlarının ve büyümenin düzenlenmesi

için çok önemlidir (15). SOCE, hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasına bağlı olarak tetiklenen hücrel  $Ca^{2+}$  girişi için benzersiz bir mekanizma olarak kabul edilmekte ve çok sayıda biyolojik sürece katılmaktadır (16). Plazma membranı üzerindeki G proteinine bağlı reseptörlerin aktivasyonu sonucunda ER/SR  $Ca^{2+}$  depolarının boşalması fosfolipazC/IP3 yolağı üzerinden sinyal olaylarının bir parçası olarak fizyolojik nedenlerle meydana gelmektedir (17). ER/SR  $Ca^{2+}$  salınımı, Stim1 proteinin Orai1 ve TRPC ile etkileşimine neden olarak hücrel fonksiyonlar için gerekli olan  $Ca^{2+}$ 'un hücre içine girişini tetiklemektedir (14). Bu yolak üzerinde sorumlu proteinlerdeki (Orai1 veya Stim1) kayıplar immün hücrelerde bağışıklık fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (18). Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık cevaplarını etkileyen bir başka mekanizma olan ER stresi ve kronik ER stresi, hastalık patogenezi ve ilerlemesinde yer alan anormal fizyolojik süreçlere katkıda bulunmaktadır (19, 20). Ayrıca, kronik ER stresine bağlı anormal immün aktivasyonu, diyabet, ateroskleroz, miyosit ve enflamatuar bağırsak hastalığı gibi otoimmün ve enflamatuar bozukluklarla yakından ilişkilidir (21). Yine son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, ER stresinin diyabetik kardiyomiyopati gelişiminde önemli rol aldığı gösterilmiştir (22, 23). Uzun süreli hiperglisemi,  $Ca^{2+}$  aşırı yüklenmesine neden olarak hücrelerde ER/SR  $Ca^{2+}$  dengesini bozduğu gösterilmiştir (9).

Çalışmamızda, hipergliseminin  $I_{CRAC}$  akımlarını kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol deneyleri CRAC kanal blokörü olarak sıklıkla kullanılan PYR6 ile gerçekleştirilmiş ve %60 düzeyinde inhibisyon gözlenmiştir. Bu çalışmada, elde edilen sonuçları destekler nitelikte, mezangiyal hücreler ve trombositlerde hipergliseminin SOCE aktivitesini arttırdığı gösteren çalışmalar mevcuttur (10, 24). Bununla birlikte,

diğer bazı çalışmalarda, hiperglisemide artan glikasyon son ürününün, mezangiyal hücrelerde ve neonatal kardiyomiyositlerde SOCE'yi baskıladığı gösterilmiştir (25-27). SOCE etkinliğindeki bu azalmanın SOCE proteinleri (Stim/Orai) arasındaki etkileşimlerin bozulmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca Stim/Orai eksenini üzerinden gerçekleşen SOCE dışında etkili olabilecek diğer depo-bağımlı kanalların (TRP kanallar gibi) özellikle patolojik durumlarda nasıl etkilendiğinin belirlenmesi SOCE etkinliğinin aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacaktır. SOCE sadece Stim/Orai eksenini üzerinden değil ayrıca Stim/Orai/TRPC'ler ve TRP kanalları üzerinden aktive olabilmektedir. Dahası, Stim ve Orai izoformlarının patolojik durumlarda aktivasyonlarında meydana gelebilecek değişiklikler yeni bir eksenin (Stim2/Orai1, Stim2/Orai2 gibi) oluşmasına neden olarak SOCE etkinliğinin bozulmasına sebebiyet verebilir. Bu anlamda diyabet gibi patofizyolojik durumlarda SOCE rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için bu yolak üzerinde görev alan tüm proteinlerin ekspresyon seviyeleri ve buna bağlı olarak proteinler arası etkileşimlerin aydınlatılması gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, hiperglisemi durumunda  $Ca^{2+}$  homeostazındaki bozulmalarla SOCE yolağı arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bu anlamda, diyabetik bozukluklarda SOCE mekanizması üzerine yapılacak çalışmalar ve geliştirilecek yeni tedavi yöntemlerinin bu hastalığın ilerlemesinin durdurulmasında büyük kazanımlar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada YG ortamında çoğaltılan RBL-1 hücrelerinde SOCE aktivitesi Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme tekniği ile ve  $I_{CRAC}$  akımları voltaj kenetleme tekniği ile incelenmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlara göre SOCE aktivitesinin kontrol değerlerine göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Bulgularımız diyabetik



patojilerde karşılaşılan  $Ca^{2+}$  homeostazındaki ve ER/SR  $Ca^{2+}$  içeriğindeki bozulmalara SOCE yolağındaki ilgili proteinlerin (Stim1, Orai1 ve TRPC) aracılık ettiği akımlarında gözlenen değişimlerin neden olabileceği yönünde literatüre önemli katkılar sağlamıştır. Bu çalışmada, RBL-1 hücreleri üzerinden

elde edilen bulguların kardiyomyosit, mezengial hücreler gibi diğer hücre türlerinde de gösterilmesi hipergliseminin SOCE üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi metotlarının geliştirmesine olanak sağlayacaktır.

### ETİK KURUL ONAYI

\* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.



## KAYNAKLAR

1. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000; 1(1): 11-21.
2. Amcheslavsky A, Yeromin AV, Penna A, Cahalan MD. Store-operated calcium channels. *Encycl Biol Chem Second Ed*, 2013; (307): 314-20.
3. Parekh AB, Putney JW. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 2005; 85(2): 757-810.
4. Hunton DL, Zou L, Pang Y, Marchase RB, Dacia L, Zou L, et al. Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004; 0005: 1124-32.
5. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol*, 2002; 4(11): E263-72.
6. Parekh AB. Store-operated CRAC channels: function in health and disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2010; 9(5): 399-410.
7. Tian C, Du L, Zhou Y, Li M. Store-operated CRAC channel inhibitors: opportunities and challenges. *Future Med Chem*, 2016; 8(7): 817-32.
8. Wang J, Fu J, Li J, Wang Y, Tang L, Bai S, et al. Enhanced store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in high glucose-cultured neonatal and adult diabetic rat cardiomyocytes. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017; 10(2): 877-89.
9. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*, 2012; (81): 767-93.
10. Chaudhari S, Wu P, Wang Y, Ding Y, Yuan J, Begg M, et al. High glucose and diabetes enhanced store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and increased expression of its signaling proteins in mesangial cells. *Am J Physiol Physiol*, 2014; 306(9): F1069-80.
11. Zhang IX, Ren J, Vadrevu S, Raghavan M, Satin LS. ER stress increases store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) and augments basal insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 2020; 295(17): 5685-70.
12. Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW. Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods*, 2008; 46(3): 204-12.
13. Hendron E, Wang X, Zhou Y, Cai X, Goto JI, Mikoshiba K, et al. Potent functional uncoupling between STIM1 and Orai1 by dimeric 2-aminodiphenyl borinate analogs. *Cell Calcium*, 2014; 56(6): 482-92.
14. Putney JW, Steinckwich-Besançon N, Numaga-Tomita T, Davis FM, Desai PN, D'Agostin DM, et al. The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017; 1864(6): 900-06.
15. Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandero S, Hill JA. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov Today Dis Mech*, 2010; 7(2): 135-43.
16. Putney JW. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 1986; 7(1): 1-12.
17. Várnai P, Hunyady L, Balla T. STIM and orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci*, 2009; 30(3): 118-28.
18. Shaw PJ, Feske S. Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity. *J Physiol*, 2012; 590(17): 4157-67.
19. Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Ito H, Koide N, Mori I, et al. Lipopolysaccharide prevents apoptosis induced by brefeldin A, an endoplasmic reticulum stress agent, in RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 340(2): 589-96.
20. Kim SY, Hwang JS, Han IO. Tunicamycin inhibits Toll-like receptor-activated inflammation in RAW264.7 cells by suppression of NF- $\kappa$ B and c-Jun activity via a mechanism that is independent of ER-stress and N-glycosylation. *Eur J Pharmacol*, 2013; 721(1-3): 294-300.

21. Arruda AP, Hotamisligil GS. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell Metab*, 2015; 22(3): 381-97.
22. Li Z, Zhang T, Dai H, Liu G, Wang H, Sun Y, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol*, 2008; 196(3):565-72.
23. Li Z, Zhang T, Dai H, Liu G, Wang H, Sun Y, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr*, 2007; 41(1): 58-67.
24. Xia W, Li Y, Wang B, Chen J, Wang X, Sun Q, et al. Enhanced Store-Operated Calcium Entry in Platelets is Associated with Peripheral Artery Disease in Type 2 Diabetes. *Cell Physiol Biochem*, 2015; 37(5): 1945-55.
25. Menè P, Pugliese G, Pricci F, Di Mario U, Cinotti GA, Pugliese F. High glucose level inhibits capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in cultured rat mesangial cells by a protein kinase C-dependent mechanism. *Diabetologia*, 1997; 40(5): 521-27.
26. Menè P, Pascale C, Teti A, Bernardini S, Cinotti GA, Pugliese F. Effects of advanced glycation end products on cytosolic Ca<sup>2+</sup> signaling of cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 1999; 10(7): 1478-86.
27. Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB. Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Diabetes*, 2002; 51(12): 3461-67.