

مقاله پژوهشی

## رفتار بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی ۳۴۶ پیکوزیمنی در شبکه اندوپلاسمیک هیاتوسیتها در موشهای صحرایی تحت دیابت

مائده قاسمی<sup>۱،۲</sup>، رضا صغیری<sup>۳</sup>، افسانه الیاسی<sup>۴\*</sup>

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
۳. بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران
۴. گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۲۵ مرداد ۹۴

دریافت: ۱۸ خرداد ۹۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** نقص در هموستاز شبکه اندوپلاسمیک (ER) واقعه مشترک در بیماریهای مختلف از جمله دیابت است. در حال حاضر به خوبی ثابت شده است که کانالهای یونی غشاء ER نقش مهمی در حفظ هموستاز لومن ER دارند. مطالعات قبلی ما حضور یک کانال پتاسیمی ۳۴۶ pS در ER را نشان داد. از این رو، در این مطالعه با استفاده از تکنیک ثبت تک کانال فعالیت این کانال را در موشهای صحرایی دیابتی و کنترل مورد بررسی و مقایسه قرار دادیم.

**روشها:** موشهای صحرایی نر ویستار دوهفته پس از تزریق تک دوز استرپتوزوسین (۴۵ mg/kg) دیابتی شدند. با الحاق کانالهای یونی شبکه اندوپلاسمیک هیاتوسیتهای دیابتی به غشاء دو لایه لیپیدی، ویژگیهای کانال پتاسیمی مورد بررسی قرار گرفت.

**یافتهها:** بر اساس داده های قبلی، غشاء شبکه اندوپلاسمیک، یک کانال پتاسیمی ۳۴۶ pS حساس به ۴-آمینوپیریدین و غیر وابسته به ولتاژ در محدوده  $\pm 30$  میلی ولت را نشان داد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که کندکتانس کانال در دیابت به ۲۵۹ pS کاهش یافت. جالب توجه است که ارتباط ولتاژ - احتمال باز بودن کانال نشان داد که احتمال باز بودن کانال به طور قابل توجهی در ولتاژهای مختلف در رتهای دیابتی کاهش می یابد.

**نتیجه گیری:** ویژگیهای بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی تحت شرایط دیابت به میزان قابل توجهی تغییر می کند. به نظر می رسد کانالهای پتاسیمی ER هیاتوسیتها در دیابت درگیر است و می تواند هدفی برای برنامه های درمانی در نظر گرفته شود.

**واژه های کلیدی:** دیابت، شبکه اندوپلاسمیک، کانال پتاسیمی، هیاتوسیت

### مقدمه

پروتئین های تازه سنتز شده به سمت مقصد، بیوستنز استرونها، تعدیل واکنشهای التهابی و تنظیم فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A<sub>2</sub>، سم زدائی مواد شیمیائی هیدروفوبیک مانند داروها و کارسینوژنها و فعال کردن مکانیسم های مرگ سلولی را بر عهده دارد. جریانهای یونی از جمله جریانهای پتاسیمی از خلال غشاء شبکه اندوپلاسمیک، پایه و اساس این فرآیندها

شبکه اندوپلاسمیک یک ارگانل پیام رسانی چند عملکردی است و محدوده وسیعی از فرآیندهای سلولی را تنظیم می کند. اعمالی مانند تنظیم غلظت کلسیم سیتوزولی-ارگانلی، هدایت

\* نویسنده مسئول مکاتبات: af.eliassi@sbmu.ac.ir

وبگاه مجله: <http://ijpp.phypha.ir>

پست الکترونیکی: [ijpp@phypha.ir](mailto:ijpp@phypha.ir)

پست الکترونیکی:

است و کنترل دقیق آن برای حفظ هومئوستاز کلسیم حیاتی است.

در حال حاضر تحقیقات رو به رشد پیشنهاد می کنند اشتباه در عملکرد شبکه اندوپلاسمیک و میتوکندری در بروز بسیاری بیماریها از جمله دیابت دخالت دارند [۱]. اثرات تخریبی افزایش قند خون با مداخله غشاهای درون سلولی شبکه اندوپلاسمیک و میتوکندری صورت می گیرد. به تعبیر دیگر، هر دو بازوی پاتولوژیک دیابت نوع ۲ یعنی مقاومت انسولینی و ترشح ناقص انسولین به عملکرد شبکه اندوپلاسمیک وابسته است و استرس شبکه اندوپلاسمیک می تواند عامل مشترک در بروز عوارض آن در بافت های مختلف باشد [۲].

اگرچه بسیاری از مکانیسمهای سلولی که بواسطه دیابت آسیب دیده اند هنوز به طور کامل بررسی نگردیده است اما به خوبی ثابت شده یکی از مسیرهای بروز عوارض دیابتی منتج از اثرات این بیماری بر عملکرد کانال های یونی غشاء سلول و یا ارگانل های درون سلولی می باشد. برای مثال، کاهش جریان پتاسیمی در سطح سارکولم و غشاهای درون سلولی سبب تغییرات فعالیت الکتریکی میوکارد و ضعف مکانیسم های حفاظت قلبی در طی دیابت می گردد [۳]. همچنین، همودینامیک غیر طبیعی عروق بافت های مختلف ناشی از آسیب عملکرد کانال های پتاسیمی با کنداکنس بالا Big conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels ( $BK_{Ca}$ ) در شرایط دیابت گزارش شده است [۴، ۵].

مطالعات بیوشیمیائی و مورفولوژیک شبکه اندوپلاسمیک، افزایش فرآیند اتوفاژی و کاهش شبکه اندوپلاسمیک دانه دار سلول های کبدی رادر دیابت نشان داده [۶] و تغییراتی مانند تغییر در شرایط ردوکس شبکه اندوپلاسمیک و چپرون های ردوکس را مسئول ترشح پروتئین های معیوب از کبد دیابتیک می دانند [۷]. اما بر اساس اطلاعات ما تا کنون گزارشی وجود ندارد که حاکی از تغییر عملکرد رفتاری کانال های پتاسیمی شبکه اندوپلاسمیک در شرایط دیابت در سطح تک کانال باشد. مطالعات اخیر ما سه نوع کانال پتاسیمی در غشاء شبکه اندوپلاسمیک را در شرایط کنترل نشان داد که شامل کانال پتاسیمی حساس به ATP با کنداکنس ۵۶۹ pS [۸]، کانال پتاسیمی حساس به ۴-آمینوپیریدین (4-AP) با کنداکنس ۳۴۶ pS [۹] و کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکنس ۲۱۱ pS می باشد [۱۰]. با توجه به اینکه بهم خوردن هومئوستاز شبکه اندوپلاسمیک و بروز استرس شبکه

اندوپلاسمیک در سلول های بتای جزایر و بافت های فعال مانند کبد و چربی نقش مهمی در پاتوژنز دیابت نوع ۲ ایفا می کند و با توجه به تغییر رفتار کانال پتاسیمی حساس به ATP شبکه اندوپلاسمیک سلولهای کبدی در دیابت [۱۱]، در این مطالعه بررسی خصوصیات بیوفیزیکی کانال پتاسیمی حساس به 4-AP شبکه اندوپلاسمیک کبد با کنداکنس pS ۳۴۶ درموش های دیابتی نوع ۲ با استفاده از تکنیک ثبت تک کانال مورد بررسی قرار گرفت تا شاید با اطلاعات بدست آمده بتوان قدم کوچکی در راه شناخت مکانیزمهای سلولی دیابت برداشت.

## مواد و روشها

کلریدپتاسیم، سوکروز، تریس اسیدی و بازی، سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin (BSA), STZ, ATP و 4-AP از شرکت سیگما، کاغذ نیترو سلولز و کیت لومینسانس (ECL-kit) از شرکت Amersham، n-دکان از شرکت مرک و آنتی بادی ها از شرکت سانتاکروز خریداری شدند.

مطالعه حاضر پس از تایید کمیته "اخلاق در تحقیق" دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید. تمام پروتکل های آزمایشی مطابق با دستورالعمل های NIH (National Institutes of Health Guidelines) در زمینه مراقبت و استفاده از حیوانات انجام شد.

در این مطالعه از موش های نر نژاد Wistar با وزن ۲۲۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید که در شرایط استاندارد دمایی ( $22^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$ )، سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می شدند. دیابت از طریق تزریق درون صفاقی ۴۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از استروپتوزوتوسین (حل شده در سیترات بافر ۰/۱ مولار و pH ۴/۵) القا گردید. در روز صفر (قبل از تزریق) و روزهای ۷ و ۱۴ پس از تزریق استروپتوزوتوسین، خونگیری جهت تعیین غلظت ناشتای گلوکز و انسولین سرم انجام گرفت. در صورت بالاتر بودن گلوکز سرم از ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر حیوانات دیابتی و در صورتی که میزان انسولین سرم کاهش پیدا نمی کرد حیوانات به عنوان دیابت نوع ۲ انتخاب می شدند.

جهت تعیین خلوص نمونه های شبکه اندوپلاسمیک و بررسی خصوصیات تک کانال پتاسیمی غشاء شبکه

عبوری از تک کانال توسط آمپلی فایر 525DBC- (شرکت Warner) اندازه گیری می گردید. تمام ثبتها در ۱ kHz با استفاده از یک فیلتر ۴ پل بسل فیلتر شده و با سرعت نمونه برداری 10 kHz توسط دستگاه ثبت به کامپیوتر منتقل و ذخیره می گردید. جهت آنالیز از نرم افزار Pclamp9 (شرکت Axon) استفاده گردید.

در روش تجزیه و تحلیل داده های تک کانال، از روش آنالیز عاری از نویز Markov استفاده گردید. کنداکتانس تک کانال بر اساس شیب منحنی ولتاژ-جریان محاسبه شد. احتمال باز بودن کانال  $P_o$  open probability (Po) از طریق به کار گیری الگوریتم های استاندارد تعیین رخداد در Pclamp9 بر اساس نسبت زمان باز بودن کانال به کل زمان ثبت در ولتاژ معینی صورت گرفت.  $P_o$  از روی قطعات یک دقیقه ای در ولتاژهای معین صورت گرفت. همچنین، مقایسه کنداکتانس و احتمال باز بودن کانال بین گروه های کنترل و دیابت از test  $t$ - استفاده شد. معنی دار بودن به صورت  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد. اطلاعات بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردیدند.

### یافته‌ها

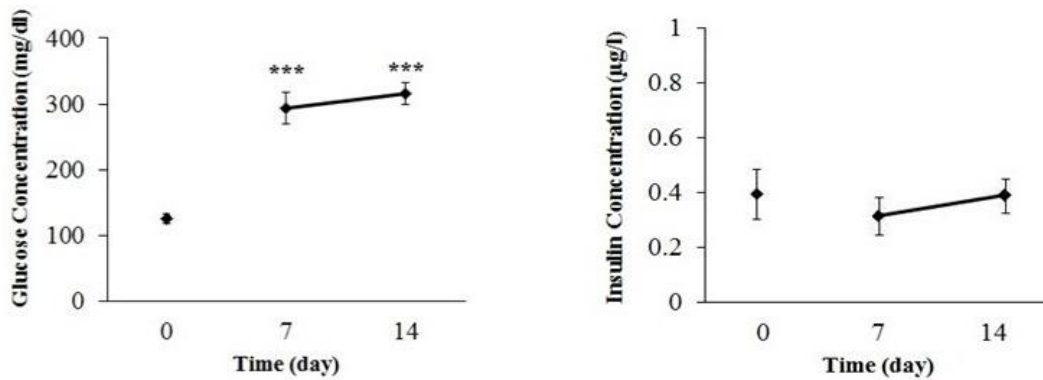
طی دو هفته بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، غلظت گلوکز ناشتا و انسولین در روزهای صفر (قبل از تزریق استرپتوزوتوسین)، ۷ و ۱۴ بعد از تزریق استرپتوزوتوسین مورد اندازه گیری قرار گرفت. برای مقایسه بین روز ۷ و ۱۴ با روز صفر از آزمون آماری repeated measurement (با تست تعقیبی Dunnet) استفاده شد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود نتایج حاصل از غلظت ناشتای گلوکز، تفاوت معنی داری را در روزهای ۷ و ۱۴ ( $p < 0.001$ ) نسبت به روز صفر نشان داد در حالیکه نتایج غلظت انسولین نشان داد تفاوت معنی داری در روزهای ۷ و ۱۴ با روز صفر وجود ندارد. این نتایج تأیید کننده دیابت نوع ۲ با غلظت گلوکز بالای ۲۵۰ mg/dl و غلظت انسولین در محدوده طبیعی است.

به دنبال تأیید مدل دیابتی و استخراج شبکه اندوپلاسمیک کبد دیابتی، با استفاده روش وسترن بلات و آنتی‌بادی‌های نشانگر غشاء پلاسمائی و غشاهای درون سلولی، خلوص نمونه های شبکه اندوپلاسمیک مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). نتایج حاکی از عدم حضور معنی دار غشا سلولی و یا غشا گلژی است. در مورد میتوکندری، در هیچ کدام از نمونه ها باند مربوط

اندوپلاسمیک با استفاده از روش مولکولی وسترن بلات و ثبت تک کانال نیاز به جداسازی غشاء شبکه اندوپلاسمیک سلولهای هپاتوسیتها از سایر غشاهای درون سلولی بود. بدین منظور از دستورالعمل Kan و همکاران استفاده شد [۱۲]. حیوانات، ۱۶-۱۸ ساعت قبل از جداسازی کبد ناشتا نگه داشته می شدند. بعد از کشتن حیوان و خارج نمودن کبد، بافت هموژنیزه شده (مرحله ۱ وسترن بلات) و طی ۷ مرحله سانتریفیوژ با دور بالا غشاء سلولی، میتوکندری و سایر غشاهای داخل سلولی جدا شده و در نهایت رسوب حاوی وزیکولهای شبکه اندوپلاسمیک بدست آمده در یک میلی لیتر سوکروز ایمیدازول هموژنیزه می شد. همچنین از مراحل ۲ و ۳ یا به عبارتی مرحله گردادیان سوکروز و مرحله پایانی سانتریفیوژ جهت تعیین خلوص، نمونه‌هایی برداشته می‌شد و نمونه ها در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ - نگهداری می‌شدند.

جهت انجام کار مولکولی، غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از تکنیک برادفورد تعیین و مقدار یکسانی از هر نمونه جهت الکتروفورز SDS-PAGE استفاده می شد. پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی جدا و با استفاده از بلات کردن به روش نیمه مرطوب بر روی غشاء نیتروسولوزی منتقل شده و پس از انتقال، جهت پیشگیری از اتصال آنتی بادی ها به نواحی غیراختصاصی، غشاءها در ظرف حاوی بافر بلاکینگ (شیر خشک، گلیسرول و TBS) تا روز بعد، در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  غوطه ور می شدند. سپس این غشاها در مجاورت با آنتی بادی اولیه قرار می گرفتند. جهت تایید خلوص وزیکول های شبکه اندوپلاسمیک از نشانگر غشا داخلی میتوکندری (Cox1, SC-58347, Santa Cruz)، غشاء پلاسمائی (actin, SC-1615, Santa Cruz)، (58 kDa Golgi protein, abcam, ab6284) و شبکه اندوپلاسمیک (Calnexin, SC-11397, Santa Cruz) استفاده گردید.

جهت انجام ثبت از فعالیت تک کانال از روش الحاق کانال بداخل غشاء لیپیدی دو لایه black lipid membrane (BLM) استفاده گردید [۱۳]. در این روش وزیکول های استخراج شده شبکه اندوپلاسمیک توسط سوزن استیل با غشاء دولایه لیپیدی جهت الحاق کانال تماس داده می شد. ولتاژ در محفظه سیس (سطح سیتوپلاسمی) اعمال و محفظه ترانس (سطح لومنی اندوپلاسمیک رتیکلوم) گراند می شد. جریان

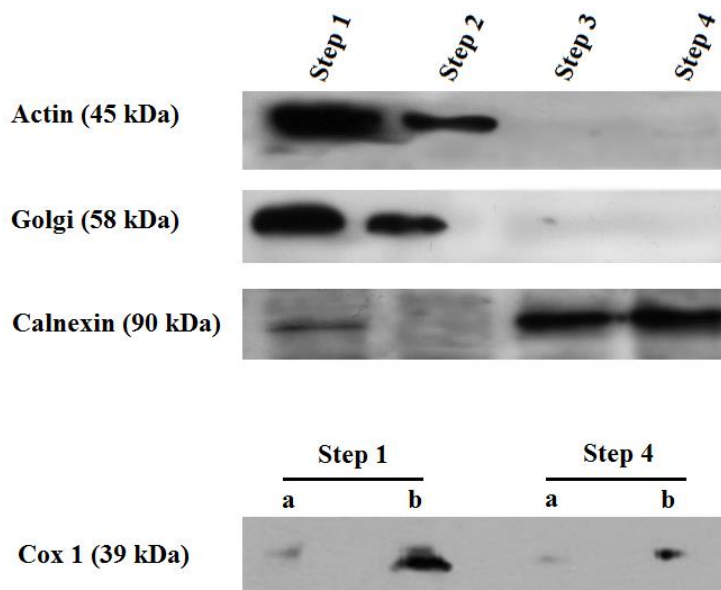


**نمودار ۱-** غلظت گلوکز ناشتا و انسولین در روزهای صفر (قبل از تزریق استریتوزوتوسین)، ۷ و ۱۴ بعد از تزریق داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار مربوط به ۱۸ نمونه نشان داده شده‌اند. آزمون آماری *repeated measurement* افزایش معنی داری را در غلظت گلوکز ناشتا در روز ۷ و ۱۴ بعد از تزریق استریتوزوتوسین نسبت به روز صفر نشان می‌دهد. \*\*\*: تفاوت معنی‌دار با  $p < 0.001$  نسبت به روز صفر.

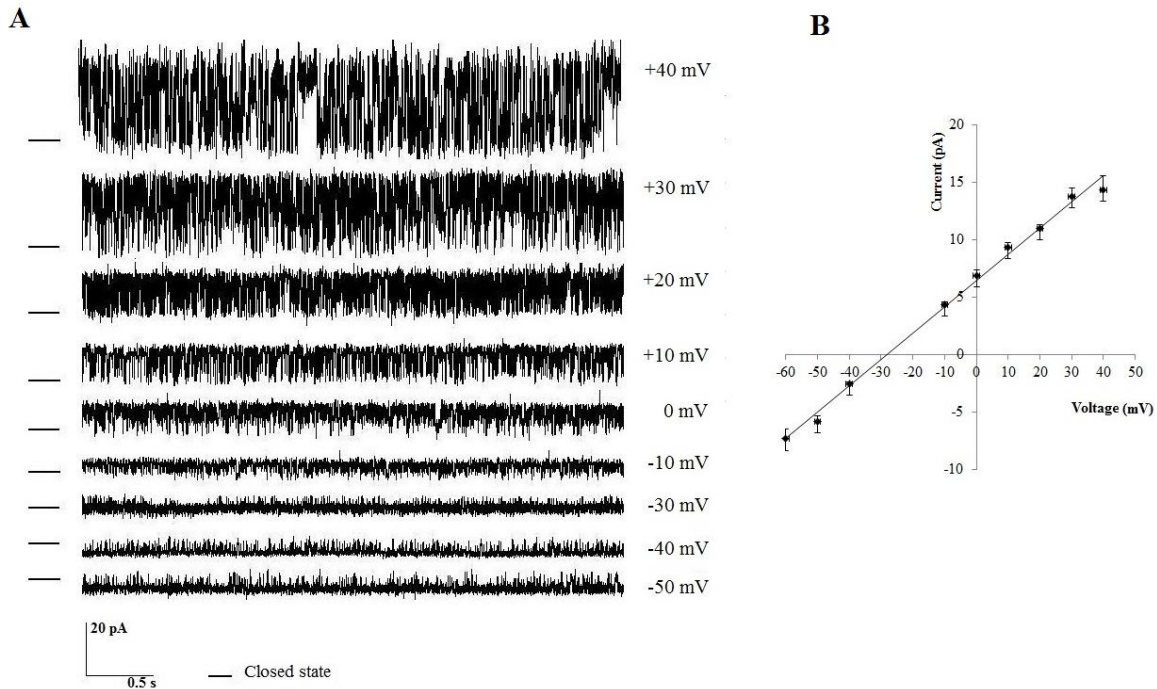
نتایج نشان داد که نمونه شبکه اندوپلاسمیک خالص بوده است.

فعالیت کانال بعد از الحاق وزیکول‌های شبکه اندوپلاسمیک به غشاء دو لایه لیپیدی در محیط غیرهمگن کلریدپتاسیم (۵۰ mM کلرید پتاسیم در فضای ترانس و ۲۰۰ mM کلرید پتاسیم در فضای سیس) ثبت گردید. شکل ۲A جریان‌های ثبت شده کانال را در ولتاژهای مختلف غشاء نشان می‌دهد. در پتانسیل معکوس که گرادیان‌های شیمیایی و الکتریکی همدیگر را خنثی می‌کنند هیچ گونه جریانی

به غشاء داخلی میتوکندری مشاهده نشد. از آنجائی که در استخراج غشاء داخلی میتوکندری، یک مرحله استفاده از آب وجود دارد تا غشاء داخلی آن در دسترس قرار گیرد بنابراین نمونه‌ها در دو حالت سوسپانسیون شده درون آب (باند b از شکل ۱) و دست نخورده (باند a از شکل ۱) مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاکی از وجود مقدار بسیار جزیی میتوکندری سالم و عدم حضور غشا داخلی جدا شده از آن در نمونه شبکه اندوپلاسمیک بود. در نهایت، همچنانکه شکل نشان می‌دهد باند قوی کالکسین در مرحله ۴ نشان دهنده حضور غلظت بالای غشاء شبکه اندوپلاسمیک دانه دار می‌باشد. به طور کلی



**شکل ۱-** تعیین خلوص نمونه شبکه اندوپلاسمیک با استفاده از وسترن بلات. از نمونه‌های پس از مرحله هموژنیزاسیون (step 1)، اولین مرحله سانتریفیوژ بکمن (step 2)، مرحله گرادیان سوکروز (step 3) و آخرین مرحله رسوب حاصل از سانتریفیوژ بکمن (step 4) جهت وسترن بلات استفاده شد. آنتی بادی‌های نشانگر غشاء پلاسمایی (Actin)، گلژی (Golgi 58kDa)، شبکه اندوپلاسمی (Calnexin) و غشاء داخلی میتوکندری (Cox1) مورد استفاده قرار گرفت. مراحل (steps) در قسمت روش‌ها توضیح داده شده‌اند.



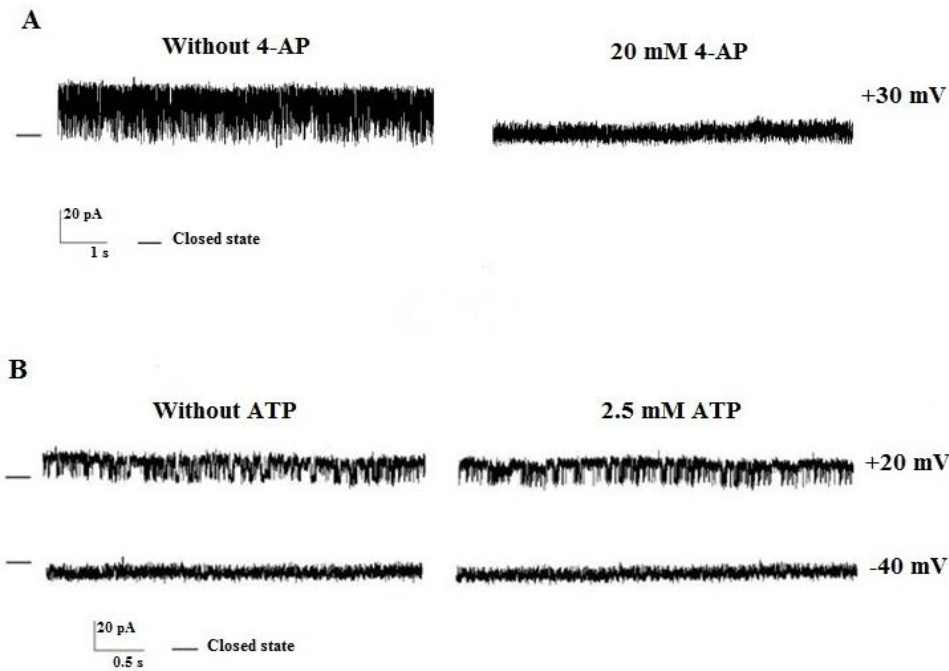
شکل ۲- ثبت تک کانال و منحنی جریان - ولتاژ فعالیت کانال پتاسیمی حساس به 4-AP با کاندکتانس ۲۵۹ pS در ولتاژهای مختلف. A- ثبت از فعالیت تک کانال در شرایط ۵۰ mM کلریدپتاسیم در فضای ترانس و ۲۰۰ mM کلریدپتاسیم در فضای سیس انجام شد. تعداد جریان‌های ثبت شده بسته به میزان نویز پایه به صورت offline به مقدار ۷۰۰-۹۰۰ Hz فیلتر شده‌اند. B- منحنی رابطه جریان-ولتاژ کانال پتاسیمی حساس به 4-AP در شرایط ۵۰ mM کلرید پتاسیم در فضای ترانس و ۲۰۰ mM کلریدپتاسیم در فضای سیس. نقاط، میانگین  $\pm$  انحراف معیار مربوط به  $n = 5$  را در هر ولتاژ نشان می‌دهد. منحنی، ارتباط اهمیک (خطی) را نشان داد. شیب خط، کاندکتانس ۲۵۹ pS را نشان می‌دهد.

پتانسیل‌های منفی‌تر از پتانسیل معکوس جریان رو به داخل (inward) ظاهر می‌شد. کانال در ولتاژهای مثبت و منفی باز اضافه کردن ۴-آمینوپیریدین میزان جریان،  $1/91 \pm$  pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۵۶ بود پس از اضافه کردن ۴-آمینوپیریدین فعالیت کانال بطور کامل مهار گردید.

در بررسی اثر نوکلوتیدها بر فعالیت کانال از ATP استفاده گردید. شکل ۳B اثر اضافه کردن ATP با غلظت ۲/۵ mM در محفظه سیس را بر روی فعالیت کانال در ولتاژهای +۲۰ mV و -۴۰ mV نشان می‌دهد. در ولتاژ +۲۰ mV قبل از اضافه کردن ATP میزان جریان  $10/99 \pm 0/35$  pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۷۱ بود. بعد از اضافه کردن ATP میزان جریان  $11/01 \pm 0/3$  pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۶۸ شد در این ولتاژ تغییر معنی داری در میزان جریان و احتمال باز بودن کانال مشاهده نشد. در ولتاژ -۴۰ mV قبل از اضافه کردن ATP میزان جریان  $10/12 \pm 0/12$  pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۶۳ بود. بعد از اضافه کردن ATP میزان جریان  $10/22 \pm 0/2$  pA و احتمال باز بودن کانال ۰/۶۳ شد. در این ولتاژ نیز تغییر معنی داری در میزان جریان

مشاهده نمی‌شد. این در حالی است که در پتانسیل‌های مثبت‌تر از پتانسیل معکوس جریان رو به خارج (outward) و در بسته شدن‌های سریع (flickering) نشان می‌داد. شکل 3B رابطه جریان- ولتاژ کانال را در شرایط دیابت نشان می‌دهد. رابطه جریان- ولتاژ در محدوده ولتاژی +۴۰ mV تا -۶۰ mV خطی بوده و هیچ گونه یکسو سازی نشان نمی‌دهد. شیب منحنی، کاندکتانس کانال را  $259 \pm 6/86$  pS نشان می‌دهد. با توجه به اینکه در شرایط یونی، پتانسیل معکوس بدست آمده ( $\sim -30$  mV) نزدیک پتانسیل تعادلی پتاسیم ( $E_K = -34$  mV) است، می‌توان گفت کانال نسبت به پتاسیم انتخابی است. بر اساس معادله گولدمن-هوچکین-کتر  $E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$ ، نسبت نفوذپذیری  $K^+/Cl^-$  بیشتر از ۲۵ خواهد بود. بنابراین، می‌توان بیان نمود که کانال برای عبور کاتیون انتخابی بوده و یک کانال کاتیونی است.

در بررسی فارماکولوژی اثر دو داروی 4-AP و ATP مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۳A اثر اضافه کردن ۴-آمینوپیریدین با غلظت ۲۰ mM در محفظه سیس بر فعالیت کانال در ولتاژ +۳۰ mV را نشان می‌دهد. قبل از



شکل ۳- اثر 4-AP و ATP بر فعالیت تک کانال پتاسیمی حساس به 4-AP در ولتاژهای +30 mV، +20 mV و -40 mV -A. ثبت از فعالیت کانال در +30 mV (در شرایط 50 mM کلریدپتاسیم در فضای ترانس و 200 mM کلریدپتاسیم در فضای سیس) قبل و بعد از اضافه کردن 4-آمینوپیریدین با غلظت 20 mM به فضای سیس. 4-آمینوپیریدین به طور کامل فعالیت کانال را مهار کرد (n = 4). B- ثبت از فعالیت کانال در شرایط 50 mM کلریدپتاسیم در فضای ترانس و 200 mM کلریدپتاسیم در فضای سیس قبل و بعد از اضافه کردن ATP با غلظت 2.5 mM به فضای سیس. در ولتاژهای مثبت و منفی اضافه کردن ATP تغییری بر فعالیت کانال ایجاد نکرد (n = 3). وضعیت بسته کانال را نشان می‌دهند.

همانطور که در شکل 4B نشان داده شده است میزان جریان و مدت زمان باز بودن کانال در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل، کاهش نشان می‌دهد. بطوریکه در ولتاژ +10 mV دامنه جریان در گروه کنترل 1/1 ± 12/3 pA بوده در حالیکه در گروه دیابتی جریان به 0/42 ± 9/37 pA کاهش معنادار یافته است (p < 0/01). همچنین، در ولتاژ -10 mV در گروه کنترل دامنه جریان از 1 ± 6/42 pA به 0/21 ± 4/37 pA

و احتمال باز بودن کانال مشاهده نشد (n = 3). مهار کانال توسط 4-AP و عدم مهار توسط ATP نشان داد که این کانال همان کانال 346 پیکوسیمسی است که فعالیت آن در غشاء شبکه اندوپلاسمیک دانه دار در شرایط کنترل ثبت گردیده است [10]. بدین ترتیب خصوصیات بیوفیزیکی آن در شرایط دیابت مورد بررسی قرار گرفت و با کنترل مقایسه شد.

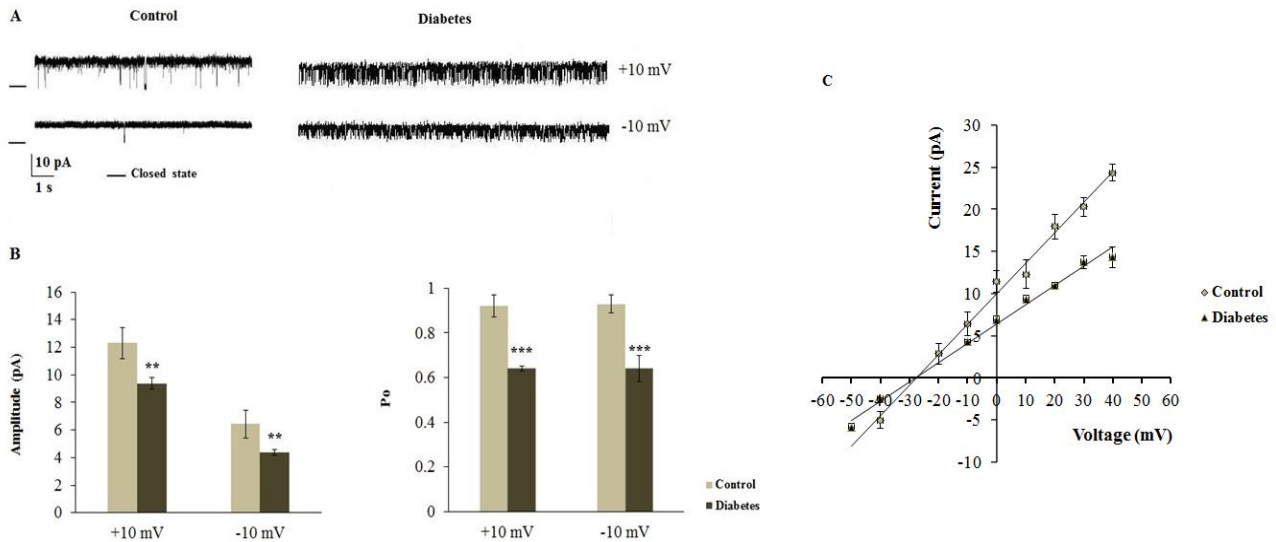
اثر ولتاژ بر روی ویژگی‌های باز و بسته شدن کانال با اندازه‌گیری احتمال باز بودن کانال (Po) در ولتاژهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. احتمال باز بودن کانال در شرایط دیابت در محدوده ولتاژی +40 mV تا -40 mV تقریباً 0/6 بوده و کانال در این محدوده ولتاژی به صورت غیر وابسته به ولتاژ عمل می‌کرد (جدول 1).

جهت بررسی تغییرات احتمالی در رفتار بیوفیزیکی کانال، میزان جریان، احتمال باز بودن و رابطه جریان-ولتاژ کانال در دو گروه کنترل و دیابتی در ولتاژهای مختلف و با استفاده از آزمون آماری t-test مورد بررسی قرار گرفت. شکل 4A جریان‌های ثبت شده از کانال را در موش‌های صحرایی دیابتی و موش‌های سالم در ولتاژ +10 mV و -10 mV نشان می‌دهد.

جدول 1- میانگین احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مختلف در شرایط دیابت

Voltage (mV)	open probability (Po) Diabetes
+40	0.60 ± 0.1
+30	0.53 ± 0.09
+20	0.56 ± 0.02
+10	0.68 ± 0.02
0	0.66 ± 0.05
-10	0.64 ± 0.06
-20	0.57 ± 0.09
-30	-----
-40	0.7 ± 0.04

میانگین احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مختلف و در شرایط 50 mM کلریدپتاسیم در فضای ترانس و 200 mM کلریدپتاسیم در فضای سیس. نتایج، میانگین ± انحراف معیار مربوط به n = 5 را در هر ولتاژ نشان می‌دهد.



**شکل ۴- مقایسه فعالیت تک کانال پتاسیمی حساس به 4-AP با کندکتانس ۲۵۹ pS در ولتاژهای +۱۰ mV و -۱۰ mV در دو گروه کنترل و دیابت. A- ثبت از فعالیت تک کانال در ولتاژهای +۱۰ mV و -۱۰ mV در دو گروه کنترل و دیابت در شرایط ۵۰ mM کلرید پتاسیم در فضای ترانس و ۲۰۰ mM کلرید پتاسیم در فضای سیس انجام شد. جریان های ثبت شده بسته به میزان نویز پایه به صورت offline به مقدار ۷۰۰-۹۰۰ Hz فیلتر شده اند. وضعیت بسته کانال را نشان می دهند. B- مقایسه میانگین میزان جریان و احتمال باز بودن کانال در گروه دیابت و کنترل در ولتاژهای +۱۰ mV و -۱۰ mV. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است (n = ۵). آزمون unpaired t-test نشان داد که کاهش معناداری در دامنه جریان و احتمال باز بودن کانال در تمامی ولتاژها وجود دارد. C- منحنی رابطه جریان-ولتاژ کانال در دو گروه کنترل و دیابت در شرایط ۵۰ mM کلرید پتاسیم در فضای ترانس و ۲۰۰ mM کلرید پتاسیم در فضای سیس. نقاط، میانگین  $\pm$  انحراف معیار مربوط به n = ۵ را در هر ولتاژ نشان می دهد. در هر دو گروه در محدوده ولتاژی ۵۰ mV تا +۴۰ mV منحنی ارتباط اهمیک را نشان می دهد شیب خط، در گروه کنترل کندکتانس ۳۴۶ pS و در گروه دیابت ۲۵۹ pS را نشان می دهد. \*\*: تفاوت معنی دار با  $p < 0.01$  و \*\*\*: تفاوت معنی دار با  $p < 0.001$  نسبت به گروه کنترل.**

بسیاری از مکانیسم های شبکه اندوپلاسمیک که در شرایط دیابت به اختلال عملکرد سلول منجر می شود هنوز نامشخص است. در این مطالعه، بعضی از رفتارهای بیوفیزیکی کانال پتاسیمی حساس به 4-AP در شرایط دیابت با وضعیت کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که نه تنها کندکتانس کانال بلکه احتمال باز بودن آن نیز بطور معنی داری در وضعیت دیابت اولیه کاهش می یابد.

تکنیک های الکتروفیزیولوژی حضور کانال های پتاسیمی را در غشاهای داخل سلولی نشان می دهند. مطالعات قبلی ما نیز از طریق تکنیک الحاق کانال به غشا دو لایه لیپیدی نشان داد که چندین کانال پتاسیمی در غشای شبکه اندوپلاسمیک هیپاتوسیت های موش های صحرایی وجود دارد که شامل کانال پتاسیمی حساس به آدنوزین تری فسفات (rerK<sub>ATP</sub>)، reticulum ATP-sensitive potassium channels [A]، کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کندکتانس متوسط Rough endoplasmic reticulum (rerIK<sub>Ca</sub>)، intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels [۱۰] و کانال پتاسیمی حساس به 4-AP می باشند [۹]. به نظر می آید این کانال ها در فرایندهایی مانند جبران

کاهش یافته است ( $p < 0.01$ ). در مورد مقایسه Po بین دو گروه باز هم کاهش در احتمال باز بودن کانال در هر دو ولتاژ دیده شد. بطوریکه در ولتاژ +۱۰ mV در گروه کنترل احتمال باز بودن  $0.92 \pm 0.05$  بوده که به  $0.64 \pm 0.05$  کاهش یافت ( $p < 0.001$ ) و در ولتاژ -۱۰ mV از  $0.93 \pm 0.04$  در گروه کنترل به  $0.64 \pm 0.06$  در گروه دیابتی رسید ( $p < 0.001$ ).

رابطه جریان- ولتاژ کانال (شکل ۴C) در هر دو گروه در محدوده ولتاژی +۴۰ mV تا -۵۰ mV اهمیک بوده و هیچ گونه یکسوسازی را نشان نمی دهد. شیب منحنی که نشان دهنده کندکتانس کانال است در گروه کنترل برابر با ۳۴۶ pS بوده، در حالی که در گروه دیابتی مقدار ۲۵۹ pS را نشان می دهد.

## بحث

دیابت به عنوان یکی از بیماری های متابولیک شایع و خطرناک با تغییر عملکرد ساختارهای درون سلولی بویژه میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک ارتباط مستقیم دارد. برخی از شواهد نشان داده اند که اختلال در عملکرد شبکه اندوپلاسمی به عوارض دیابت در ارگان های مختلف کمک می کند [۱] اما

شارژهای الکتریکی، تولید pH، تولید استرس اکسیداتیو، و تنظیم حجم سلول نقش مهمی دارند [۱۴، ۱۵]. گزارشات متعددی حاکی از تغییر رفتار کانال های یونی غشا سلولی در شرایط دیابت وجود دارد [۴، ۵]. مطالعه اخیر ما در سطح تغییرات رفتاری کانال در غشاهای داخل سلولی نیز نشان داد که فعالیت کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا در غشا داخلی میتوکندری مغز (mitoBK<sub>Ca</sub>) در شرایط دیابت نوع دو بشدت کاهش می یابد [۱۶].

بررسی های قبلی ما بر روی نمونه های جدا شده از شبکه اندوپلاسمیک سلول های هپاتوسیت موش در شرایط کنترل، حضور کانال کاتیونی با کنداکتانس ۳۴۶ pS را نشان داد که تنها توسط 4-AP مهار می گشت و ATP و گلی بنکلامید به عنوان مهار کننده های کانال K<sub>ATP</sub> و هم چنین IbTx و ChTx به عنوان مهار کننده های کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم روی آن اثری نداشت [۱۰]. در مطالعه حاضر، ما نشان دادیم اضافه کردن 4-AP سبب مهار کانال می گردد در صورتی که ATP (شکل ۴B) و IbTx و ChTx (اطلاعات نشان داده نشده است) اثری بر روی آن نداشتند. بنابراین، نتایج تأیید می کنند کانال الحاق شده به غشا که از رتیکولوم اندوپلاسمیک موشهای دیابتی استخراج گردیده است همان کانال کاتیونی حساس به 4-AP است که قبلا تحت شرایط کنترل مورد مطالعه قرار گرفته بود. نکته حائز اهمیت وجود اختلافات معنی دار در کنداکتانس کانال و رفتار باز و بسته شدن کانال (gating behavior) بین کانال های بدست آمده از غشا دیابتیک و کنترل می باشد. این نتایج برای اولین بار نشان داد جریان یونی در شرایط دیابت اولیه به میزان ۲۶٪ در مقایسه با شرایط کنترل کاهش یافته است (کاهش از ۳۴۶ pS در شرایط کنترل به ۲۵۹ pS در شرایط دیابت). مطالعات ما نشان داد کانال در شرایط دیابت همانند شرایط کنترل دارای سه سطح عبوری برای جریان است اما ارتفاع هر سه سطح جریانی در شرایط دیابت حدود ۲۶٪ کاهش می یابد. این رفتار می تواند ناشی از یک مکانیزم مهار جزئی ناشی از افزایش گلوکز خون بدلیل تغییرات در ساختمان کانال باشد [۱۷]. نتایج ما هم چنین کاهش غیر وابسته به ولتاژ در حدود ۴۰٪ را در پارامتر احتمال باز بودن کانال در شرایط دیابت نسبت به کنترل را نشان می دهد. کاهش احتمال باز بودن کانال قبلا برای کانال BK<sub>Ca</sub> غشا پلاسمایی کرونر در موشهای دیابتیک ناشی

از استرپتوزوتوسین گزارش شده است [۱۸]. هم چنین، نتایج مشابهی توسط Li و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده شد و حاکی از کاهش جریان از کانال های BK<sub>Ca</sub> سلول های عضله صاف موشهایی با دیابت مقاوم به انسولین می باشد [۱۹]. مطالعه حاضر نشان می دهد کاهش احتمال باز بودن کانال می تواند ناشی از افزایش فرکانس بسته شدن باشد (شکل ۵A). این نتایج و نتایج حاصل از مطالعات Lu و همکاران (۲۰۰۸) [۲۰] پیشنهاد می کند که تغییرات بیوفیزیکی مشاهده شده در رفتار کانال حاصل از دیابت احتمالا ناشی از افزایش سدهای انرژی برای فعال شدن کانال بوده و می تواند در عملکرد ضعیف یک ارگان نقش داشته باشد. جالب است ذکر گردد این تغییرات رفتاری می تواند حاصل تغییرات در ساختمان و میزان بیان زیر واحدهای تشکیل دهنده کانال باشد. شواهدی حاکی از آن است که کاهش جریان و احتمال باز بودن کانال BK<sub>Ca</sub> عروق در شرایط دیابت ممکن است حاصل کاهش بیان زیر واحد  $\beta 1$  در ساختمان کانال باشد [۱۸، ۱۹]. مطالعات اخیر ما نیز نشان داد که بیان زیرواحدهای  $\beta 4$  و  $\alpha$  کانال mitoBK<sub>Ca</sub> مغز در شرایط دیابت کاهش یافته و احتمالا مسئول تغییر رفتار کینتیکی کانال می باشد [۱۶]. این نکته را نیز باید در نظر داشت که زیر واحدهای ساختمانی کانال ها می تواند هدف فرایندهای اکسیداتیو ناشی از گلوکز خون باشد [۱۷]. با توجه به اینکه هنوز ساختمان این کانال شناسایی نگردیده در ابتدا نیاز است ساختمان مولکولی آن در شرایط کنترل مورد مطالعه قرار گرفته و سپس اثر گلوکز و یا دیابت بر روی بیان زیرواحدهای ساختمانی آن بررسی گردد.

## نتیجه گیری

به طور کلی، یافته های مطالعه حاضر نشان داد که در دیابت اولیه، فعالیت تک کانال کاتیونی شبکه اندوپلاسمیک کاهش یافته و عملکرد کانال دستخوش تغییر شده است. این تغییر احتمالا نه تنها با کاهش تعداد کانال بلکه بدلیل اختلال در کینتیک کانال ها همراه شده و کاهش کنداکتانس و Po را بدنبال داشته است. از آنجائی که دستیابی به عملکرد کانال مستلزم یافتن دانش ساختاری و ویژگی های رفتاری کانال می باشد به نظر می رسد نتایج فوق می تواند درک بهتری از مکانیسم های دخیل در عدم کارکرد صحیح شبکه اندوپلاسمیک و پاتوژنز بیماری دیابت داشته باشد.



## سپاسگزاری

از دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه تشکر بعمل می‌آید.

## سه‌م نویسنده‌گان

م.ق: انجام مطالعه و نگارش مقاله; ر.ص: مشاوره; ا.ا: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه.

## تعارض در منافع

نویسنده‌گان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

## فهرست منابع

- [1] Lee KU, Harris RA, Mitochondria and endoplasmic reticulum in diabetes and its complications. *Exp Diabetes Res* 2012 (2012) 1-2.
- [2] Schönthal AH, Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica* 2012 (2012) 1-26.
- [3] Chen ZC, Cheng YZ, Chen LJ, Cheng KC, Li Y, Cheng J, Increase of ATP-sensitive potassium (K(ATP)) channels in the heart of type-1 diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 11 (2012) 1-9.
- [4] Lu T, Lee HC, Impaired vascular BK channel function in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* (2011) 53-70.
- [5] Wang Y, Zhang HT, Su XL, Deng XL, Yuan BX, Zhang W, et al, Experimental diabetes mellitus down-regulates large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in cerebral artery smooth muscle and alters functional conductance. *Curr Neurovasc Res* 7 (2010) 75-84.
- [6] Lenk SE, Bhat D, Blakeney W, Dunn WJ, Effects of streptozotocin-induced diabetes on rough endoplasmic reticulum and lysosomes of rat liver. *Am J Physiol* 263 (1992) 856-862.
- [7] Nardai G, Stadler K, Papp E, Korcsma'ros T, Jakus J, Csermely P, Diabetic changes in the redox status of the microsomal protein folding machinery. *Biochem Biophys Res Commun* 334 (2005) 787-795.
- [8] Salari S, Ghasemi M, Fahanik Babaei J, Saghiri R, Sauve R, Eliassi A, Evidence for a KATP channel in rough endoplasmic reticulum (rerKATP channel) of rat hepatocytes. *Plos One* 10 (2015) 1-13.
- [9] Salari S, Eliassi A, Saghiri R, Evidences on the existence of a new potassium channel in the rough endoplasmic reticulum (RER) of rat hepatocytes. *Physiol Pharmacol* 15 (2011) 16-26 [in Persian].
- [10] Salari S. *Characterization of electropharmacological properties of single  $K^+$  channel on rough endoplasmic reticulum in rat hepatocytes by channel incorporation into bilayer lipid membrane* [dissertation]. Shahid Beheshti Univ. Med. Sci., 2011.
- [11] Ghasemi M, Khodaei N, Salari S, Eliassi A, Saghiri R, Gating behavior of endoplasmic reticulum potassium channels of rat hepatocytes in diabetes. *Iran Biomed J* 18 (2014) 165-172.
- [12] Kan FW, Jolicoeur M, Paiement J, Freeze-fracture analysis of the effects of intermediates of the phosphatidylinositol cycle on fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. *Biochim Biophys Acta* 1107 (1992) 331-341.
- [13] Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC, Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 194 (1962) 979-980.
- [14] Averaimo S, Milton RH, Duchen MR, Mazzanti M, Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): Sensor and effector during oxidative stress. *FEBS Lett* 584 (2010) 2076-2084.
- [15] Malinska D, Mirandola SR, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. *FEBS Lett* 584 (2010) 2043-2048.
- [16] Noursadeghi E, Jafari A, Saghiri R, Sauve R, Eliassi M, Impairment of brain mitochondrial charybdotoxin- and ATP-insensitive BK channel activities in diabetes. *Neuromolecular Med* 16 (2014) 862-871.
- [17] Lu T, He T, Katusic ZS, Lee HC, Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels by high glucose. *Circ Res* 99 (2006) 607-616.
- [18] Wang RX, Shi HF, Chai Q, WuY, Sun W, Ji Y, Yao Y, Li KL, Zhang CY, Zheng J, Guo SX, Li XR, Lu T, Molecular mechanisms of diabetic coronary dysfunction due to large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel impairment. *Chin Med J* 125 (2012) 2548-2555.
- [19] Li S, Deng Z, Wei L, Liang L, Ai W, Shou X, Chen X, Reduction of large-conductance  $Ca^{2+}$  activated  $K^+$  channel with compensatory increase of nitric oxide in insulin resistant rats. *Diabetes Metab Res Rev* 27 (2011) 461-469.
- [20] Lu T, Ye D, He T, Wang XL, Wang HL, Lee HC, Impaired  $Ca^{2+}$ -dependent activation of large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in the coronary artery smooth muscle cells of Zucker diabetic fatty rats. *Biophys J* 95 (2008) 5165-5177.

## Research paper

**Biophysical properties of single 346 pS potassium channel of hepatocyte endoplasmic reticulum in diabetic rats**Maedeh Ghasemi<sup>1,2</sup>, Reza Saghiri<sup>3</sup>, Afsaneh Eliassi<sup>4\*</sup>*1. Department of Physiology, Medical school, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran**2. Department of Physiology, Medical school, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran**3. Department of Biochemistry, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran**4. Department of Physiology and Neurophysiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 8 June 2015

Accepted: 16 August 2015

**Abstract**

**Background and aim:** Defects in endoplasmic reticulum (ER) homeostasis are common in different diseases, such as diabetes. It is now well established that ion channels of ER membrane have a critical role in ER luminal homeostasis. Our previous studies showed the presence of a 346 pS potassium channel in ER. Therefore, in this study, we examined and compared the activities of this channel in control and diabetic rats using single-channel recording techniques.

**Methods:** Diabetes mellitus was established in male Wistar rats 2 weeks after single injection of streptozotocin 45 mg/kg, i.p. Ion channel of rough endoplasmic reticulum of diabetic hepatocytes was incorporated into the bilayer lipid membrane and the characterization of K<sup>+</sup> channel was then evaluated.

**Results:** Based on our previous data, endoplasmic reticulum membrane has a potassium channel with a main conductance of 346 pS, which is sensitive to 4-Aminopyridine and voltage-insensitive at  $\pm 30$  mV. In the present study, it was demonstrated that the channel conductance was decreased to 259 pS in diabetes mellitus. Interestingly, the channel P<sub>o</sub>-voltage relation demonstrated that channel P<sub>o</sub> significantly lower in diabetic rats compared to normal rats at different voltages.

**Conclusion:** Our data showed that the biophysical properties of potassium channel were significantly altered under diabetic condition. We propose that the hepatocyte ER potassium channels are involved in diabetes pathology, and it may be considered as a target for therapeutic plans.

**Keywords:** Diabetes, Endoplasmic reticulum, Hepatocyte, Potassium channel

**Please cite this article as follows:**

Ghasemi M, Saghiri R, Eliassi A, Biophysical properties of single 346 pS potassium channel of hepatocyte endoplasmic reticulum in diabetic rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 1 (2017) 80-89.

\*Corresponding author e-mail: af.eliassi@sbmu.ac.ir

Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>

E-mail: [ijpp@phypha.ir](mailto:ijpp@phypha.ir)