

مقاله پژوهشی

فعالیت کانال کاتیونی ۹۳ پیکو سیمنسی میتوکندری مغز در موش‌های دیابتی دچار اختلال می‌گردد

بهاره رضایی^۱، الهام نور صادقی^۲، رضا صغیری^۳، افسانه الیاسی^{۴*}

۱. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳. بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران

۴. گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۳۱ خرداد ۹۴

دریافت: ۱۷ خرداد ۹۴

چکیده

زمینه و هدف: شواهدی مبنی بر اختلال عملکرد میتوکندری و تغییر در فعالیت کانال‌های پتاسیمی در شرایط دیابت موجود است. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات رفتار بیوفیزیکی کانال کاتیونی ۹۳ پیکوسیمنسی در شرایط دیابت است.

روش‌ها: دیابت با تزریق تک دوز داخل صفاقی ۴۵mg/kg استرپتوزوتوسین حل شده در بافر سیترات ۰/۱ M (pH ۴/۵) به موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرمی) القا شد. پس از استخراج غشای داخلی میتوکندری مغز، وزیکول‌های حاوی غشا داخلی میتوکندری به غشای دولایه لیپیدی الحاق گردید و سپس خصوصیات الکتروفیزیولوژیک تک کانال کاتیونی مورد بررسی قرار گرفت. خلوص نمونه میتوکندری از طریق وسترن بلات تعیین گردید. جهت آنالیز داده‌ها از روش Marcov's noise free single channel analysis استفاده گردید.

یافته‌ها: براساس یافته‌های قبلی یکی از کانال‌های پتاسیمی غشا داخلی میتوکندری دارای کنداکنانس حدود ۹۳ پیکوسیمنس و حساس به 4-AP و غیر حساس به ولتاژ در محدوده ولتاژ ۵۰- تا ۵۰+ بود. مطالعه حاضر نشان داد کنداکنانس کانال در شرایط دیابت به ۴۸ پیکوسیمنس کاهش یافته و منحنی جریان-ولتاژ از حالت یکسوسازی به وضعیت اهمیک تغییر رفتار داد، اما در احتمال باز بودن کانال تغییری مشاهده نشد. وسترن بلات و استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی علیه اندامکهای داخل سلولی نشان داد که نمونه استخراج شده فقط حاوی میتوکندری است.

نتیجه‌گیری: داده‌های ما نشان داد که خصوصیات بیوفیزیکی کانال پتاسیمی از جمله کنداکنانس کانال درموشهای مبتلا به دیابت بطور معناداری تغییر می‌یابد. بر این اساس پیشنهاد می‌شود کانالهای پتاسیمی غشای داخلی میتوکندری احتمالاً در بیماری دیابت درگیر بوده و می‌توانند به عنوان هدف در اتخاذ برنامه درمانی در نظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: بیماری دیابت، غشا دولایه لیپیدی، کانال پتاسیمی، میتوکندری

مقدمه

میتوکندری یک اندامک سلولی قابل توجه با ویژگی‌های متعدد ساختاری و عملکردی است که منبع عمده تولید انرژی سلول است. هم چنین میتوکندری دارای یک نقش اساسی در تنظیم عملکرد سلولی، متابولیسم و مرگ سلول می‌باشد [۱].

af.eliassi@sbm.ac.ir

http://ijpp.phypha.ir

ijpp@phypha.ir

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

پست الکترونیکی:

در مطالعات اخیر، ما موفق به شناسایی کانال پتاسیمی جدیدی با کنداکناس ۹۳ پیکوسیمنس در غشاء داخلی میتوکندری مغز شدیم [۸].

کانال‌های پتاسیمی میتوکندری در بسیاری از عملکردهای میتوکندری از جمله تولید انرژی، حفاظت سلولی و مرگ سلول [۱] نقش دارند. یافته‌هایی موجود هستند مبنی بر اینکه اختلال فعالیت کانال‌های K_{ATP} سلول‌های آلفا جزایر لانگرهانس می‌تواند منجر به اختلال در تنظیم گلوکز و ترشح گلوکاگون در دیابت نوع ۲ شود [۹]. با توجه به نقش کانال‌های پتاسیمی میتوکندری در تولید انرژی، هم چنین گزارش‌هایی حاکی از اختلال عملکرد میتوکندری در شرایط دیابت هدف از این مطالعه بررسی اثر دیابت بر روی خصوصیات بیوفیزیکی کانال پتاسیمی ۹۳ پیکوسیمنس غشاء داخلی میتوکندری مغز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های نر نژاد Wistar با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده گردیده و در شرایط استاندارد دمایی (22°C - 20°C)، سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. مطالعه حاضر پس از تایید هیات "اخلاق در تحقیق" دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید. تمام پروتکل‌های آزمایشی مطابق با دستورالعمل‌های NIH (National Institutes of Health) در زمینه مراقبت و استفاده از حیوانات بودند.

دیابت از طریق تزریق درون صفاقی ۴۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از استروپتوزوتوسین (حل شده در سیترات بافر ۰/۱ مولار و pH ۴/۵) القا گردید [۱۰]. 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 میلی‌گرم در دسی لیتر حیوانات دیابتی و در صورتی که میزان انسولین سرم کاهش پیدا نکرده باشد حیوانات به عنوان دیابت نوع ۲ انتخاب می‌شدند. کلرید پتاسیم، دی‌یتونین، سوکروز، D-مانیتول، بیکربنات سدیم، هیپس، تریس اسیدی و بازی، سرم آلبومین گاوی (BSA)، STZ، ۴-آمینوپیریدین (4-AP)، EGTA، ناگارز از شرکت سیگما و کاغذ نیترو سلولز و کیت لومینسانس (ECL-kit) از شرکت Amersham

شواهدی مبنی بر اختلال عملکرد میتوکندری در هایپر گلیسمی و مقاومت به انسولین موجود است [۲]. برای مثال، تراکم میتوکندری سلول در شرایط دیابت کاهش می‌یابد، علاوه بر این، در شرایط گلوکز بالا گونه‌های اکسیژن فعال ROS (Reactive Oxygen Species) افزایش یافته که به نوبه خود در تغییرات عملکرد میتوکندری نقش اساسی دارد [۳]. اگر چه بسیاری از مکانیسم‌های سلولی که بواسطه دیابت آسیب دیده اند هنوز بطور کامل بررسی نگردیده است اما به خوبی ثابت شده یکی از مسیرهای بروز عوارض دیابتی منتج از اثرات این بیماری بر عملکرد کانال‌های یونی غشاء سلول و یا ارگانل‌های درون سلولی می‌باشد. برای مثال کاهش جریان پتاسیمی در سطح سارکولم و غشاهای درون سلولی سبب تغییرات فعالیت الکتریکی میوکارد وضعف مکانیسم‌های حفاظت قلبی در طی دیابت می‌گردد [۴]. گزارشات جالبی نیز در سطح غشاهای درون سلولی وجود دارد که نشان می‌دهند افزایش در فعالیتهای اکسیداتیو سلولی بدنبال مقاومت به انسولین در موشهای دیابتی سبب مهار فعالیت کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP میتوکندریایی (mitoK_{ATP}) می‌گردد [۵].

به نظر می‌رسد کانال‌های پتاسیمی میتوکندری در تنظیم پتانسیل غشاء میتوکندری، تنفس و حجم ماتریکس میتوکندری نقش دارند [۱]. انواع متعددی از کانال‌های پتاسیمی موجود در غشاء پلاسمایی در غشاء داخلی میتوکندری نیز دیده شده‌اند مانند کانال پتاسیمی حساس به ATP (mitoK_{ATP})، کانال‌های پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکناس بالا، متوسط و پایین (mitoBK_{Ca} ، mitoIK_{Ca} ، mitoSK_{Ca})، کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ (mitoKv1.3) و کانال‌های پتاسیمی دومنفذی (TASK-3) [۱]. علاوه بر این، آزمایشگاه ما نیز در مطالعات اخیر خود با استفاده از تکنیک الحاق کانال به غشا دو لایه لیپیدی حضور دو نوع کانال mitoBK_{Ca} با کنداکناس‌های ۵۶۵ و ۲۱۱ پیکوسیمنس را در غشاء داخلی میتوکندری مغز نشان داد که به ترتیب توسط ATP و ChTx (Charybdotoxin) مهار [۶] و دیگری تنها به IbTx (Iberitoxin) [۷] حساس بود. مطالعات ما نشان داد کانال mitoBK_{Ca} غیر حساس به ATP و ChTx در شرایط دیابت بشدت غیر فعال شده و بیان زیر واحدهای α و β ساختار کانال بطور معنی داری کاهش می‌یابد [۳]. هم چنین

n- دکان از شرکت مرک و آنتی‌بادی‌ها از شرکت سانتاکروز خریداری شدند.

حیوانات، ۱۸-۱۶ ساعت قبل از جداسازی کبد ناشتا نگه داشته می‌شدند. نمونه های میتوکندری مورد استفاده به روش Kudin و همکارانش استخراج گردید [۱۱]. پس از بیهوشی دو موش صحرایی با کلروفورم و بریدن سر، بلافاصله مغز حیوانات خارج می‌شد. مغزها به محلول سرد (MSE (Mannitol Sucrose EGTA) منتقل و چندین مرتبه شسته می‌شدند. سپس ۱۰ میلی لیتر محلول MSE- ناگارز به آن‌ها اضافه کرده و با هموژنایزر الکتریکی با دور ۶۰۰ واحد بر ثانیه (unit/s) هموژنیزه شدند. در ادامه ۲۰ میلی لیتر دیگر از محلول MSE به آن اضافه شد. (مرحله ۱ و سترن بلات) و به مدت ۴ دقیقه با دور $2000 \times g$ سانتریفیوژ گردیدند. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی را برداشته و به مدت ۹ دقیقه در $12000 \times g$ سانتریفیوژ گردیدند. برای به دست آوردن سیناپتوزومها، رسوب حاصل را در ۱۰ میلی لیتر از محلول MSE- دی‌یتونین سرد حل نموده (مرحله ۲) و محلول به ظرف هموژنیزه کننده منتقل و ۱۰-۸ مرتبه به طور دستی هموژنیزه گردید تا سوسپانسیون همگنی به دست آید. سرانجام سوسپانسیون به مدت ۱۱ دقیقه در $12000 \times g$ سانتریفیوژ و وزیکولهای حاصل در $300 \mu l$ محلول MSE حل شد (مرحله ۳) تا غلظت حدود 20 mg/ml پروتئین به دست آید.

برای جداسازی غشاء داخلی میتوکندری از روش DaCruz و همکاران استفاده شد [۱۲]. بدین صورت که میتوکندری‌ها در غلظت 5 mg/ml در آب مقطر سوسپانسیون شده و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ تکان داده شدند. سپس این ترکیب ۲۰ مرتبه بوسیله هموژنایزر دستی هموژنیزه و دوبار هر کدام ۵ دقیقه در $12000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. میتوپلاستهای به دست آمده به همراه بیکربنات سدیم 0.1 M (pH ۱۱/۵) در غلظت نهایی 0.5 mg/ml به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ تیمار گردیدند. سرانجام محلول به مدت ۳۵ دقیقه در $100000 \times g$ سانتریفیوژ شده و غشاء داخلی میتوکندری به صورت ویزیکول (مرحله ۴) بدست آمد. نمونه ها جهت بررسی وسترن بلات و الکتروفیزبولوژی در دمای -70°C درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

جهت انجام کار مولکولی، غلظت پروتئین نمونه ها با استفاده از تکنیک برادفورد تعیین و مقدار یکسانی از هر نمونه

جهت الکتروفورز SDS-PAGE استفاده می شد [۱۳]. 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°C غوطه ور می شدند. پس از آن کاغذها به مدت دوساعت در مجاورت آنتی بادی های اولیه شامل: آنتی بادی Cox1، Actin، Calnexin و Golgi Marker قرار داده شدند.

جهت انجام ثبت از فعالیت تک کانال از روش الحاق کانال بدخل غشاء لیپیدی دو لایه BLM (Bilayer Lipid Membrane) استفاده گردید [۱۴]. در این روش وزیکول های استخراج شده غشاء داخلی میتوکندری توسط سوزن استیل با غشاء دولایه لیپیدی جهت الحاق کانال تماس داده می شد. ولتاژ در محفظه سپس (سطح سیتوپلاسمی) اعمال و محفظه ترانس (سطح لومنی) گراند می شد. جریان عبوری از تک کانال توسط آمپلی فایر 525DBC (شرکت Warner) اندازه گیری می گردید. تمام ثبتها در 1 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 شد. جهت آنالیز از روش Marcov's noise free و نرم افزار Clampfit10 (شرکت Axon) استفاده گردید.

یافته‌ها

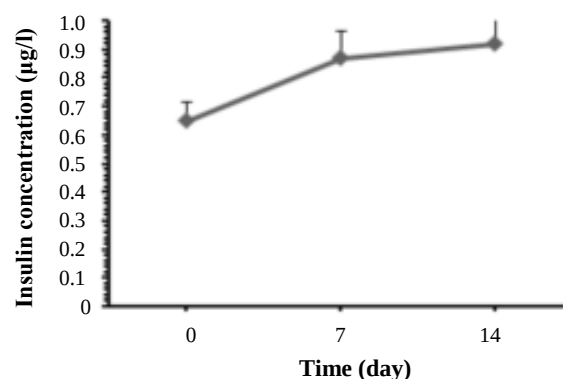
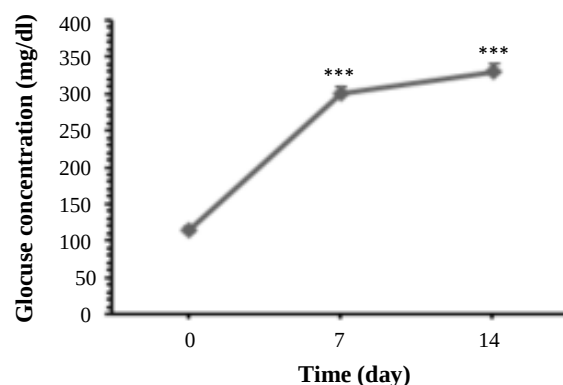
تأیید القای مدل دیابتی نوع ۲؛ طی دو هفته بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، غلظت گلوکز ناشتا و انسولین در روزهای صفر (قبل از تزریق استرپتوزوتوسین)، ۷ و ۱۴ بعد از تزریق استرپتوزوتوسین اندازه گیری شد. برای مقایسه بین روز ۷ و ۱۴ با روز صفر از آزمون آماری repeated one-way ANOVA (با تست تعقیبی Dunnet) استفاده شد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود نتایج 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 معنی‌داری در روزهای ۷ و ۱۴ با روز صفر وجود ندارد. این نتایج تأیید کننده دیابت نوع ۲ با غلظت گلوکز بالای mg/dl ۲۵۰ و غلظت انسولین در محدوده طبیعی است. بدنبال تأیید مدل دیابتی و استخراج غشاء داخلی

نمی شد. این در حالی است که در پتانسیل های مثبت تر از پتانسیل معکوس جریان رو به خارج (outward) و در پتانسیل های منفی تر از پتانسیل معکوس جریان رو داخل (inward) ظاهر می شد. کانال در ولتاژهای مثبت و منفی باز و بسته شدنهای سریع (flickering) نشان می داد. شکل B ۲ رابطه جریان- ولتاژ کانال را در شرایط دیابت نشان می دهد. رابطه جریان- ولتاژ در محدوده ولتاژی +۴۰ mV تا -۶۰ mV خطی بوده و هیچ گونه یکسو سازی نشان نمی دهد. شیب منحنی که نشان دهنده ی کنداكتانس کانال است در ولتاژهای منفی برابر با ۴۸ pS بود. هم چنین بر اساس شکل پتانسیل معکوس (reverse potential) برای وضعیت هدایتی کانال -۲۵ میلی ولت بود.

بر اساس معادله گولدمن-هوچکین-کتز $E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$ ، نسبت نفوذپذیری کانال در مورد یون های پتاسیم به کلر بالاتر از ۲۵ ($P_K/P_{Cl} > 25$) بود. بنابراین، می توان بیان نمود که کانال برای عبور کاتیون انتخابی بوده و یک کانال کاتیونی است.

اثر ولتاژ بر روی ویژگی های باز و بسته شدن کانال با اندازه گیری احتمال باز بودن کانال (P_o) در ولتاژهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. احتمال باز بودن کانال در شرایط دیابت در محدوده ولتاژی +۵۰ mV تا -۶۰ mV تقریباً ۰/۶ بوده و کانال در این محدوده ولتاژی به صورت غیر وابسته به ولتاژ عمل می کرد (جدول ۱).

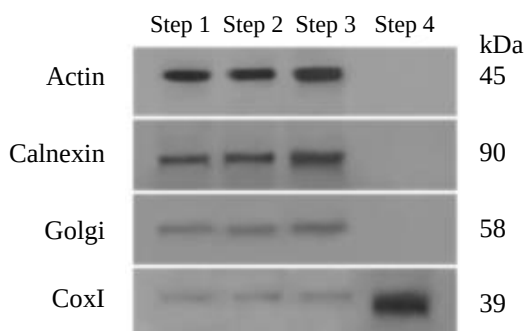
در بررسی فارماکولوژی اثر داروی 4-AP (۴-آمینوپیریدین) به عنوان مهارکننده ی غیر انتخابی کانال



نمودار ۱- غلظت گلوکز ناشتا و انسولین در روزهای صفر (قبل تزریق استرپتوزوتوسین)، ۷ و ۱۴ بعد از تزریق STZ. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار مربوط به ۱۸ n نشان داده شده اند. آزمون آماری repeated One-Way ANOVA افزایش معنی داری را در غلظت گلوکز ناشتا در روز ۷ و ۱۴ بعد از تزریق STZ نسبت به روز صفر نشان می دهد. *** $p < 0.001$: تفاوت معنی دار نسبت به روز صفر.

میتوکندری مغز دیابتی، با استفاده روش وسترن بلات و آنتی بادی های نشانگر غشاء پلاسمایی و غشاهای درون سلولی، خلوص نمونه های میتوکندری مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). نتایج حاصله نشان داد که نمونه میتوکندری فاقد پروتئین های موجود در اندامک های دیگر و غشاء پلاسمایی می باشد.

خصوصیات بیوفیزیکی تک کانال ۹۳ pS در شرایط دیابت: فعالیت کانال بعد از الحاق وزیکول های غشاء داخلی میتوکندری به غشاء دو لایه لیپیدی در محیط غیرهمگن کلریدپتاسیم (۵۰ mM) کلریدپتاسیم در فضای ترانس و ۲۰۰ mM کلریدپتاسیم در فضای سیس) ثبت گردید. شکل ۲A جریان های ثبت شده کانال را در ولتاژهای مختلف غشاء نشان می دهد. در پتانسیل معکوس که گرادیان های شیمیایی و الکتریکی همدیگر را خنثی می کنند هیچ گونه جریانی مشاهده



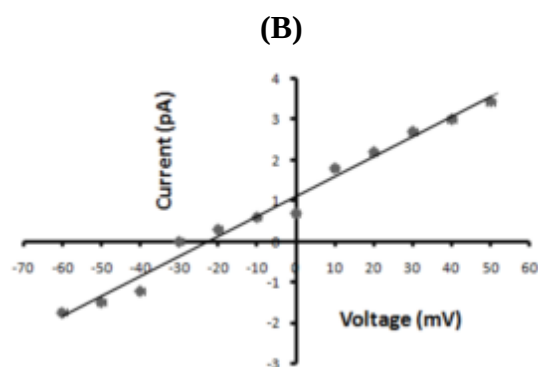
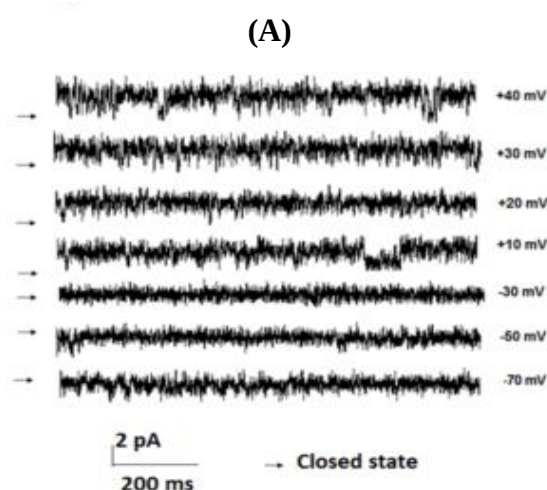
شکل ۱- تعیین خلوص میتوکندری با استفاده از وسترن بلات. کاغذها با آنتی بادی های اختصاصی مجاور شد. آنتی بادی های نشانگر غشاء پلاسمایی (۴۵ kDa) Actin، گلژی (۵۸ kDa) Golgi، شبکه اندوپلاسمی (۹۰ kDa) Calnexin و نشانگر غشاء داخلی میتوکندری (۳۹ kDa) CoxI مورد استفاده قرار گرفت. مراحل ۱ تا ۴ نشان دهنده ی مراحل مختلف استخراج میتوکندری می باشد که در قسمت روش ها توضیح داده شده اند.

میزان جریان، احتمال باز بودن و رابطه جریان-ولتاژ کانال در دو گروه کنترل و دیابتی در ولتاژهای مختلف و با استفاده از آزمون آمار ی t-test مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۴A جریان های ثابت شده از کانال را در موش های صحرایی دیابتی و موش های سالم در ولتاژ $+30 \text{ mV}$ و -50 mV نشان می دهد. همانطور که در شکل ۴B نشان داده شده است میزان جریان در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل، کاهش نشان می دهد. بطوریکه در ولتاژ $+30 \text{ mV}$ دامنه جریان در گروه کنترل $0.91 \pm 0.02 \text{ pA}$ بوده در حالیکه در گروه دیابتی جریان به $0.32 \pm 0.03 \text{ pA}$ کاهش معنادار یافته است ($p < 0.01$). همچنین، در ولتاژ -50 mV در گروه کنترل دامنه جریان از $0.46 \pm 0.03 \text{ pA}$ به $0.2 \pm 0.03 \text{ pA}$ کاهش یافته است ($p < 0.01$). درمورد مدت زمان باز بودن کانال در دو گروه تغییر معناداری مشاهده نشد.

رابطه جریان-ولتاژ کانال (شکل ۴C) در محدوده ولتاژی $+50 \text{ mV}$ تا -60 mV نشان دهنده ی یکسوسازی در گروه کنترل است در حالیکه در گروه دیابتی رفتار اهمیک است و هیچ گونه یکسوسازی را نشان نمی دهد. شیب منحنی که نشان دهنده کنداکتانس کانال است در گروه کنترل برابر با $5 \pm 93 \text{ pS}$ بوده، در حالی که در گروه دیابتی مقدار 46 pS را نشان می دهد.

جدول ۱- میانگین احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مختلف در شرایط کنترل و دیابت

Voltage (mV)	Control open probability (Po)	Diabetes open probability (Po)
+50	0.63 ± 0.03	0.6 ± 0.03
+40	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.01
+30	0.64 ± 0.02	0.63 ± 0.03
+20	0.63 ± 0.01	0.61 ± 0.03
+10	0.62 ± 0.01	0.62 ± 0.01
0	0.62 ± 0.02	0.62 ± 0.01
-10	0.62 ± 0.03	0.65 ± 0.02
-20	0.64 ± 0.01	0.62 ± 0.03
-30	-----	-----
-40	0.62 ± 0.05	0.63 ± 0.01
-50	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.02

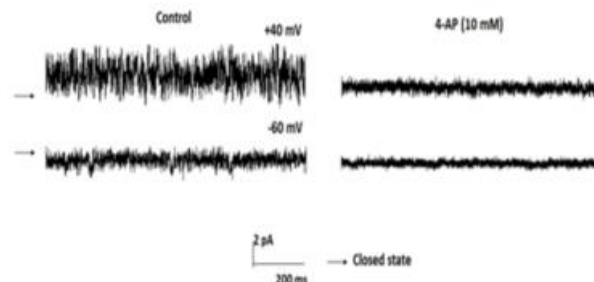


شکل ۲- ثبت تک کانال و منحنی جریان - ولتاژ فعالیت کانال پتاسیمی حساس به 4-AP با کندکنس 93 pS در ولتاژهای مختلف. A- ثبت از فعالیت تک کانال در شرایط 50 mM کلریدپتاسیم در فضای ترانس و 200 mM کلریدپتاسیم در فضای سیس انجام شد. تعداد جریانهای ثبت شده بسته به میزان نوبز پایه به صورت offline به مقدار $900\text{--}700 \text{ Hz}$ فیلتر شده اند. B- منحنی رابطه جریان-ولتاژ کانال پتاسیمی حساس به 4-AP در شرایط 50 mM کلریدپتاسیم در فضای ترانس و 200 mM کلریدپتاسیم در فضای سیس. نقاط، میانگین $\pm$ انحراف معیار مربوط به $n = 3$ را در هر ولتاژ نشان می دهد. منحنی، ارتباط اهمیک (خطی) را نشان داد. شیب خط، کنداکتانس 46 pS را نشان می دهد.

پتاسیمی بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۳ اثر اضافه کردن ۴- آمینوپیریدین با غلظت 10 mM در محفظه سپس را بر روی فعالیت کانال در دو ولتاژ $+40 \text{ mV}$ و -60 mV نشان می دهد. قبل از اضافه کردن ۴- آمینوپیریدین میزان جریان در ولتاژ $+40 \text{ mV}$ ، 0.51 ± 0.03 و احتمال باز بودن کانال 0.66 و برای ولتاژ -60 mV میزان جریان $0.79 \pm 0.07 \text{ pA}$ و احتمال باز بودن کانال 0.62 بود و پس از اضافه کردن ۴- آمینوپیریدین فعالیت کانال بطور کامل مهار گردید. جهت بررسی تغییرات احتمالی در رفتار بیوفیزیکی کانال،

های کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم روی آن اثری نداشت. در مطالعه حاضر، ما نشان دادیم اضافه کردن 4-AP سبب مهار کانال می گردد (شکل ۴). در حالیکه IbTx و ATP بر روی آن اثری نداشت (اطلاعات نشان داده نشده است). بنابر این، کانال الحاق شده به غشا که از غشاء داخلی میتوکندری مغز 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 آن است که نتایج ما اشاره به اختلافات معنی دار در کنداکنانس کانال بین کانال های بدست آمده از غشا دیابتیک و کنترل می کند.

این نتایج برای اولین بار نشان داد جریان یونی در شرایط دیابت اولیه به میزان ۵۰٪ در مقایسه با شرایط کنترل کاهش یافته است (کاهش از ۹۳ pS در شرایط کنترل به ۴۸ pS در شرایط دیابت). این رفتار میتواند ناشی از یک مکانیزم مهار جزئی ناشی از افزایش گلوکز خون بدلیل تغییرات در ساختمان کانال باشد [۳]. نتایج مشابهی توسط Li و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده شد و حاکی از کاهش جریان از کانال های BK_{Ca} سلول های عضله صاف موشهایی با دیابت مقاوم به انسولین بود [۱۶]. این نتایج و نتایج حاصل از مطالعات Lu و همکاران (۲۰۰۸) [۱۷] 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_{Ca} عروق در شرایط دیابت ممکن است حاصل کاهش بیان زیر واحد $\beta 1$ در ساختمان کانال باشد [۱۸]. مطالعات اخیر ما نیز نشان داد که بیان زیرواحدهای $\beta 4$ و α کانال $mitoBK_{Ca}$ مغز در شرایط دیابت کاهش یافته و احتمالا مسئول تغییر رفتار کینتیکی کانال می باشد [۳]. این نکته را نیز باید در نظر داشت که زیر واحدهای ساختمانی کانال ها می تواند هدف فرایندهای اکسیداتیو ناشی گلوکز خون باشد [۳]. 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.

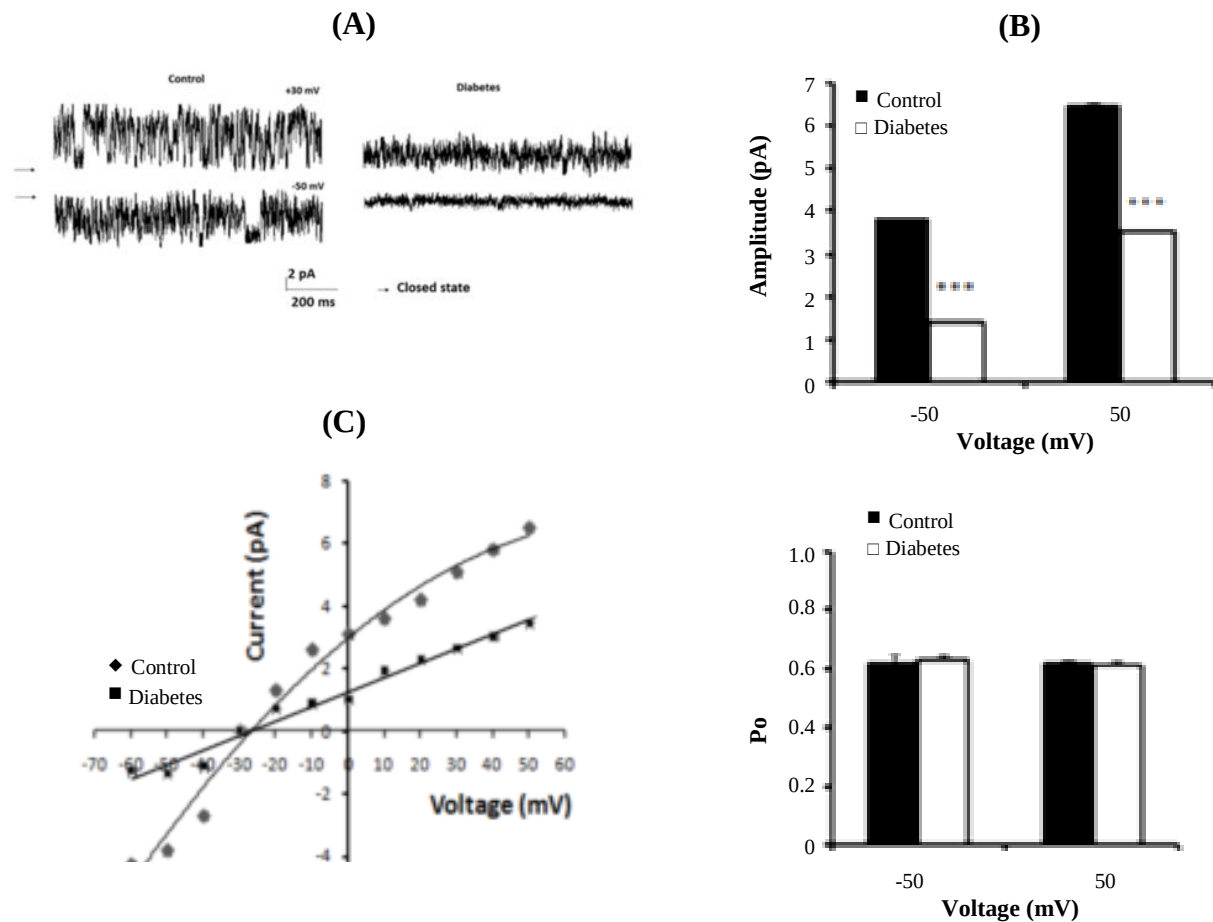


شکل ۳- اثر 4-AP بر فعالیت تک کانال حساس به 4-AP در ولتاژهای +۴۰ mV و -۶۰ mV. ثبت از فعالیت کانال در +۴۰ mV (در شرایط ۵۰ mM کلریدپتاسیم در فضای ترانس و ۲۰۰ mM کلریدپتاسیم در فضای سیس) قبل و بعد از اضافه کردن ۴-آمینوپیریدین با غلظت ۱۰ mM به فضای سیس. ۴-آمینوپیریدین به طور کامل فعالیت کانال را مهار می کرد ($n = 3$).

بحث

دیابت از شایعترین و سخت ترین بیماری های متابولیک است که با اجزای سازنده سلول مانند میتوکندری دارای تعامل می باشد. برای مثال، مطالعات نشان داده اند که تولید بیش از حد گونه های فعال اکسیژن (ROS) توسط میتوکندری باعث آسیب سلول های بتای پانکراسی به صورت آپوپتوز و کاهش عملکرد طبیعی آن ها می شود [۱۵]. همچنین مطالعات نشان می دهند دیابت سبب کاهش تعداد میتوکندری می گردد و این کاهش نیز احتمالا ناشی از تولید ROS در شرایط گلوکز بالا است [۳]. علی رغم مطالعاتی که در این خصوص صورت گرفته است هنوز مکانیزم های سلولی در گیر در این بیماری به خوبی شناسایی نشده اند. مطالعات اخیر ما و دیگران حضور چند کانال پتاسیمی را در غشا داخلی میتوکندری مغز با کمک تکنیک الحاق کانال به داخل غشا دو لایه لیپیدی نشان داد که شامل: ۱) کانال $mitoK_{ATP}$ [۹، ۲۹]، کانال BK_{Ca} حساس به ATP [۶]، کانال BK_{Ca} غیر حساس به ATP [۷]، و کانال کاتیونی حساس به 4-AP [۸] می باشند. مطالعه حاضر رفتار کانال کاتیونی حساس به 4-AP را در شرایط دیابت مورد مقایسه با رفتار آن در شرایط سلامت قرار داد.

مطالعات قبلی ما بر روی نمونه های جدا شده از غشاء داخلی میتوکندری مغز موش در شرایط کنترل، حضور کانال کاتیونی با کنداکنانس ۹۳ pS را نشان داد. نحوه باز و بسته شدن کانال وابسته به ولتاژ نبود و تغییرات ولتاژ احتمال باز بودن کانال را تغییر نمی داد. هم چنین، تنها 4-AP سبب مهار کانال می گشت و ATP به عنوان مهار کننده کانال K_{ATP} [۸] و هم چنین IbTx و ChTx به عنوان مهارکننده



شکل ۴- مقایسه فعالیت تک کانال حساس به 4-AP با کنداکناس ۹۳ pS در ولتاژهای +۳۰ mV و -۵۰ mV در دو گروه کنترل و دیابت. A- ثبت از فعالیت تک کانال در ولتاژهای +۳۰ mV و -۵۰ 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 +۵۰ mV و -۵۰ mV. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است ($n = 3$). آزمون unpaired t-test نشان داد که کاهش معناداری در دامنه جریان در تمامی ولتاژها وجود دارد. اما احتمال باز بودن کانال تغییری نکرده است. 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 $n=3$ را در هر ولتاژ نشان می دهد. در گروه دیابت در محدوده ولتاژی -۶۰ mV تا +۵۰ mV منحنی ارتباط اهمیک را نشان می دهد شیب خط، در گروه کنترل کنداکناس ۹۳ و در گروه دیابت ۴۶ pS را نشان می دهد. **** $p < 0.001$: تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل.

نتیجه گیری

یافته های مطالعه حاضر نشان داد که در دیابت اولیه، فعالیت تک کانال کاتیونی غشاء داخلی میتوکندری کاهش یافته و عملکرد کانال دستخوش تغییر شده است. این تغییر احتمالاً نه تنها با کاهش تعداد کانال بلکه بدلیل اختلال در کینتیک کانال ها همراه شده و کاهش کنداکناس 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 میتواند درک بهتری از مکانیسم های دخیل در عدم کارکرد صحیح میتوکندری و پاتوژنز بیماری دیابت داشته باشد.

تغییر در خصوصیات بیوفیزیکی کانال های میتوکندری می تواند باعث تغییر در عملکرد کلی میتوکندری شود چرا که مطالعات نشان می دهند باز شدن کانال BK_{Ca} میتوکندری مغز می تواند سبب مهار تولید ROS توسط کمپلکس یک زنجیره تنفسی شود، که این اثر برای بقای عصبی بسیار سودمند است [۱۹]. هم چنین گزارش ها حاکی از آن است که باز شدن کانال $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ باعث افزایش اکسیداسیون فلاووپروتئین ها در میتوکندری می شود [۲۰]. بنابراین، کاهش فعالیت مشاهده شده در رفتار کانال در شرایط دیابت می تواند بیان کننده اختلال در عملکرد میتوکندری و یا به عکس باشد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه تشکر به عمل می‌آید.

سهم نویسندگان

ب.ر: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ا.ن: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ر.ص: طراحی مطالعه؛ ا.ا: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

- [1] Szabo I, Zoratti M, Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev* 94 (2014) 519–608.
- [2] Joseph AM, Joannisse DR, Baillot RG, Hood DA, Mitochondrial dysregulation in the pathogenesis of diabetes: Potential for mitochondrial biogenesis-mediated interventions. *Exp Diabetes Res* (2012) 642038.
- [3] Noursadeghi E, Jafari A, Saghir R, Sauve R, Eliassi A, Impairment of brain mitochondrial charybdotoxin- and ATP-insensitive BK channel activities in diabetes. *NeuroMolecular Med* 16 (2014) 862–871.
- [4] Fancher IS, Dick GM, Hollander JM, Diabetes mellitus reduces the function and expression of ATP- dependent K⁺ channels in cardiac mitochondria. *Life Sci* 92 (2014) 664–668.
- [5] Katakam PVG, Jordan JE, Snipes JA, Tulbert CD, Miller AW, Busija DW, Myocardial preconditioning against ischemia-reperfusion injury is abolished in Zucker obese rats with insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292 (2007) R920–R926.
- [6] Eliassi A, Saghir R, How many types of large conductance Ca²⁺ activated potassium channels exist in brain mitochondrial inner membrane: evidence for a new mitochondrial large conductance Ca²⁺ activated potassium channel in brain. *Neuroscience* 199 (2011) 125–132.
- [7] Fahanik-Babaei J, Eliassi A, Jafari A, Sauve R, Salari S, Saghir R, Electro-pharmacological profile of a mitochondrial inner membrane big-potassium channel from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1808 (2011) 454–460.
- [8] Fahanik-babaei J, Jafari A, Eliassi A, Saghir R, Evidences for a new cation channel in the brain mitochondrial inner membrane. *Physiol Pharmacol* 17 (2013) 80–93 [in Persian].
- [9] Zhang Q, Ramracheya R, Lahmann C, Tarasov A, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Brereton M, Collins S, Galvanovskis J, Gonzalez A, Groschner LN, Rorsman NJ, Salehi A, Travers ME, Walker JN, Gloyd AL, Gribble F, Johnson PR, Reimann F, Ashcroft FM, Rorsman P, Role of KATP channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes. *Cell Metab* 18 (2013) 871–882.
- [10] Islam MS, Choi H, Nongenetic model of type 2 diabetes: A comparative study. *Pharmacology* 79 (2007) 243–249.
- [11] Kudin AP, Bimpong-buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS, Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279 (2004) 4127–4135.
- [12] Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone PA, Martinou JC, Proteomic Analysis of the Mouse Liver Mitochondrial Inner Membrane. *J Biol Chem* 278 (2003) 41566–41571.
- [13] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248–254.
- [14] 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.
- [15] Su S, Kuo C, Liu C, Diabetes and Mitochondria. *The Changhua J Med* 11 (2013) 1–7.
- [16] Li S, Deng Z, Wei L, Liang L, Ai W, Shou X, Chen X, Reduction of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel with compensatory increase of nitric oxide in insulin resistant rats. *Diabetes Metab Res Rev* 27 (2011) 461–469.
- [17] Lu T, Ye D, He T, Wang X, Wang H, Lee H, Impaired Ca²⁺ dependent activation of large-conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels in the coronary artery smooth muscle cells of Zucker diabetic fatty rats. *Biophys J* 95 (2008) 5165–5177.
- [18] Ru-xing W, Hai-feng S, Qiang C, Ying W, Wei S, Yuan J, Yong Y, Ku-lin L, Chang-ying Z, Jie Z, Su-xia G, Xiao-rong L, Tong L, Molecular mechanisms of diabetic coronary dysfunction due to large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel impairment. *Chinese Med J* 125 (2012) 2548–2555.
- [19] Kulawiak B, Kudin AP, Szewczyk A, Kunz WS, BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp Neurol* 212 (2008) 543–547.
- [20] Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC, Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K_{ATP} channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 97 (2002) 4–14.

Research paper

Brain mitochondrial 93 pS cationic channel activities impaired in diabetic rats

Bahareh Rezaee¹, Elham Noorsadeghi², Reza Saghir³, Afsaneh Eliassi^{1,4*}

1. Neurophysiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Department of Biochemistry, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran

4. Department of Physiology and Neurophysiology Research Center, Medical school, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 7 June 2015

Accepted: 21 June 2015

Abstract

Background and aim: Evidence indicates an impairment of mitochondrial functions and alterations in potassium channel activities in diabetes mellitus. This study was carried out to consider whether the biophysical properties of the mitochondrial 93 pS cationic channel are altered in diabetes.

Methods: Diabetes mellitus was induced in male Wistar rats (200-250 g) by single intraperitoneal injection of 45 mg/kg streptozotocin dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). The brain mitochondrial inner membranes were extracted and vesicles were incorporated into lipid bilayer membranes, and single potassium channel properties were evaluated. Purity of the cell fraction was also tested by Western blotting. Data were analyzed by Makov noise free single channel analysis.

Results: Based on our previous data, mitochondrial inner membrane has a potassium channel with a main conductance of 93 pS, which was 4-AP-sensitive and voltage-insensitive at -50 to +50 mV. Our data showed that channel conductance decreased to 48 pS and inwardly rectifying current voltage curve was altered to an ohmic behavior in vesicles of diabetic rats but there was no effect on channel open probability. Western blotting and antibodies directed against various cellular proteins revealed that the extracted material contains only mitochondria.

Conclusion: Our data showed that the biophysical properties (conductance) of potassium channel were significantly altered in diabetes. Based on these findings, we propose that the brain mitochondrial potassium channels are involved in diabetes, and it can be considered as a target for therapeutic plans.

Keywords: Diabetes, Lipid bilayer membrane, Mitochondria, Potassium channel

Please cite this article as follows:

Rezaee B, Noorsadeghi E, Saghir R, Eliassi A, Brain mitochondrial 93 pS cationic channel activities impaired in diabetic rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 1 (2017) 52-60.

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

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

E-mail: ijpp@phypha.ir