

## بررسی خصوصیات بیوفیزیکی و الکتروفارماکولوژیکی تک کانال $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ در غشاء داخلی میتوکندری مغز موش صحرائی

جواد فحانیک بابائی<sup>۱</sup>، افسانه الیاسی<sup>۱\*</sup>، رضا صغیری<sup>۲</sup>

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. بخش بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران

پذیرش: ۶ تیر ۹۱

دریافت: ۳ اسفند ۹۰

### چکیده

**مقدمه:** کانالهای پتاسیمی حساس به ATP مختلفی در غشاء داخلی میتوکندری شناسایی شده‌اند. این کانالها در فرآیندهای سلولی همچون حفاظت سلولی نقش دارند. در اینجا ما خواص بیوفیزیکی و الکتروفارماکولوژیکی یک کانال  $\text{K}_{\text{ATP}}$  را در غشاء داخلی میتوکندری مغز گزارش نموده‌ایم.

**روش‌ها:** مغز موش بزرگ آزمایشگاهی بالغ بعد از برداشتن، هموژنیزه و محلول آن در طی مراحل MSE-دی‌یزیتونین، آب، و بیکرنات سدیم سانتریفیوژ و وزیکول‌های غشاء داخلی میتوکندری جدا گردید. فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ استخراج گردید. غشاء در منفذی به قطر  $150 \mu\text{m}$  تشکیل شد. سیگنالهای ثبت تک کانال  $1 \text{ kHz}$  فیلتر و با سرعت نمونه برداری  $10 \text{ kHz}$  ذخیره گردیدند. اطلاعات با نرم افزار Pclamp 10 آنالیز گردیدند.

**یافته‌ها:** ثبت تک کانال، کانالی با کندانانس  $143 \pm 7 \text{ pS}$  و وابسته به ولتاژ را در محیط غلظتی  $200 \text{ mM KCl cis}/50 \text{ mM KCl trans}$  نشان داد. توزیع‌های زمانی وضعیت بسته، یک جزء توانی را برای ولتاژهای مثبت و دو جزء توانی را برای ولتاژهای منفی نشان داد. توزیع‌های زمانی وضعیت باز بر دو جزء توانی باز بودن منطبق بود. مهار کانال توسط ATP و از مشخصه‌های کانال، بعنوان کانال  $\text{K}_{\text{ATP}}$  بود. 4-AP و TEA فعالیت کانال را مهار نموده ولی فعالیت کانال تحت تاثیر ایبریوتوکسین و کاریبوتوکسین بعنوان مهارکننده‌های کانال BK تغییر پیدا نکرد و 5-هیدروکسی‌دکانوئیک اسید بعنوان بازدارنده کانال پتاسیمی حساس به ATP کانال را تحت تاثیر قرار نداد. وسترن‌بلات و استفاده از آنتی‌بادی‌هایی بر ضد زیرواحدهای Kir6.1 و SUR2B، پروتئینهایی با وزن مولکولی  $55-64 \text{ kDa}$  و  $120 \text{ kDa}$  را مشخص نمود.

**نتیجه گیری:** نتایج ما حضور کانال  $\text{K}_{\text{ATP}}$  را در میتوکندری مغز نشان می‌دهد. این کانال احتمالاً نقش مهمی در هموستازی میتوکندری مغز دارد.

**واژه‌های کلیدی:**  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ، میتوکندری، غشاء دو لایه لیپیدی، IbTx، glibenclamide

### مقدمه

مانند ایسکمی، تخریب نورونی و پیری با کاهش انرژی و تنظیم یونهای سیتوزولی، دارای نقش اساسی است [۵]. کانالهای یونی مانند کانالهای پتاسیمی یکی از اجزاء سازنده غشاء داخلی میتوکندری می‌باشند. علاوه بر میتوکندری، کانالهای پتاسیمی در سایر اندامکهای درون سلولی مانند هسته [۱، ۷۳]، گرانولهای زیموژن [۷۲]، دستگاه گلژی [۷۳] و شبکه آندوپلاسمی [۳، ۵۵] شناسایی شده‌اند. این کانالها نقش مهمی را در بسیاری از فرآیندهای سلولی مانند جبران بار الکتریکی و تنظیم pH [۲۱، ۶۷] و استرسهای اکسیداتیو [۴، ۴۳] دارند.

میتوکندری برای بسیاری از فرآیندهای سلولی وابسته به انرژی، ATP تولید می‌کند و به عنوان مرکز حیات سلول شناخته شده است. همچنین این ارگانل در طی فرآیندهایی

af.eliassi@sbmu.ac.ir

afeliassi@gmail.com

www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

کانال به غشاء لیپیدی دو لایه و استفاده از برخی داروهای مهار کننده کانال  $K_{ATP}$  مانند داروی  $ATP-Mg^{2+}$ ،  $5-HD$ ،  $HMR$  و مارگاتوکسین، خواص فارماکولوژیک یک نوع کانال حساس به  $ATP$  را در سلولهای مغزی مطالعه نمودند و نشان دادند که کانال فوق دارای کنداکنانس ۲۱۹ پیکوسیمنس با احتمال باز بودن ۰/۵ در ولتاژهای منفی و ۰/۲ در ولتاژهای مثبت می باشد [۱۴].

علی رغم تلاشهایی که تاکنون صورت گرفته، هنوز ماهیت مولکولی کانالهای میتوکندری مشخص نشده است. بررسی ساختمان مولکولی کانالهای  $K_{ATP}$  غشاء پلاسمایی نشان می دهد که کانالهای  $K_{ATP}$  دارای ۴ زیر واحد تشکیل دهنده کانال بنام  $Kir6x$  و ۴ گیرنده سولفونیل اوره ( $SURx$ ) می باشند. با توجه به شباهت  $mitoK_{ATP}$  و کانالهای  $K_{ATP}$  غشاء پلاسمایی، اعتقاد بر این است که کانال  $mitoK_{ATP}$  نیز از یک زیر واحد منفذ، مشابه زیر واحد یک سویه  $Kir6.x$  و یک زیر واحد گیرنده سولفونیل اوره ( $mitoSUR$ ) تشکیل شده باشد. از طرفی بر اساس اطلاعات فارماکولوژیک و استفاده از آنتی بادی های اختصاصی کانال  $K_{ATP}$  غشاء، مشخص شده که زیر واحد  $kir6.1$  در میتوکندری سلولهای عضله و کبد [۶۳]، و هر دو زیر واحد  $Kir6.1$ ،  $Kir6.2$  در میتوکندری سلولهای قلب [۴۰، ۴۱] وجود دارند. علاوه بر این حضور زیر واحد گیرنده سولفونیل اوره ( $SUR2A$ ) نیز در میتوکندری میوسیت های عروق نیز مشخص شده است [۵۸]. در سلولهای مغزی گزارشهای مختلفی در مورد زیر واحدهای  $Kir6.x$  وجود دارد که نتایج آنها با یکدیگر متفاوت می باشند. برای مثال  $Szewczyk$  و همکارانش در مطالعاتشان زیر واحد  $Kir6.2$  را گزارش نموده اند [۶۹]. در حالیکه در مطالعه ای دیگر  $Zhou$  و همکاران [۷۹] حضور زیر واحد  $Kir6.1$  و  $Lacza$  و همکارانش [۴۰] هر دو زیر واحد  $Kir6.1$  و  $Kir6.2$  را در مغز پیشنهاد نمودند. در مورد زیر واحد  $mitoSUR$ ، در مطالعات صورت گرفته در میتوکندری سلولهای مغزی، زیر واحد  $SUR2A$  پیشنهاد می شود [۴۰، ۵۶] با این تفاسیر با توجه به نتایجی که تاکنون در مورد ساختمان کانال  $mitoK_{ATP}$  بدست آمده، هنوز ابهاماتی وجود دارد.

در این مطالعه ما با استفاده از تکنیک الحاق کانال به داخل غشاء لیپیدی دو لایه، خواص بیوفیزیکی و الکتروفارماکولوژی کانال پتاسیمی  $K_{ATP}$  را در غشاء داخلی میتوکندری سلولهای

اخیراً گزارشهایی حاکی از آن هستند که این کانالها بویژه در میتوکندری در تنظیم [۶، ۳۳]، هموستاز کلسیم [۲۸، ۷۶]، اسیدیته [۶]، آپوپتوز [۵۳] و حفاظت سلولی [۴۳] نقش داشته و مانند سایر اندامکها، هدف و مقصد نهایی بسیاری از داروها می باشند [۵۰].

بررسی خصوصیات بیوفیزیکی و الکتروفارماکولوژی کانالهای پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری منجر به دسته بندی آنها به کانالهای پتاسیمی حساس به  $ATP$  ( $mitoK_{ATP}$ ) [۲۹]، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکنانس بالا ( $mitoBK_{Ca}$ ) [۲۲، ۲۳، ۵۷]، کانال پتاسیمی حساس به کلسیم با کنداکنانس متوسط ( $mitoIK_{Ca}$ ) [۲۰]، کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ  $Kv_{1.3}$  و ولتاژ  $(mitoKv_{1.3})$  [۶۵] و یک کانال پتاسیمی دو منفذی  $TASK-3$  [۵۱] گردیده است. بنظر می رسد این کانالها مشابه با کانالهای پتاسیمی غشاء سلول نقش مهمی را در کنترل پایداری غشاءهای داخلی میتوکندری دارا باشند [۶۸].

کانالهای پتاسیمی حساس به  $ATP$  ( $mitoK_{ATP}$ ) دارای نقش ویژه ای در حفاظت سلولی می باشند. مطالعات نشان می دهند کانالهای  $mitoK_{ATP}$  در سلولهای عصبی در طی دوره ایسکمی باز شده و بدین وسیله از این سلولها در برابر ایسکمی حفاظت می کنند [۷۵، ۱۱]. این کانال در بسیاری از انواع سلولی یافت شده است (برای مطالعه بیشتر به مقاله مروری  $et al.$ ; 2010  $Szewczyk$  [۶۶]، کانال  $mitoK_{ATP}$  اولین بار با استفاده از تکنیک پچ کلمپ در میتوکندری کبد موش بزرگ آزمایشگاهی شناسایی گردید [۲۹]. استفاده از تکنیکهای مولکولی و میکروسکوپ ایمونوفلورسانت، حضور این کانال و زیر واحدهای تشکیل دهنده آنها در سلولهای مغزی نشان داده است [۵۸]. اولین بار مطالعه فعالیت تک کانال با استفاده از تکنیک الحاق کانال به غشاء لیپیدی دو لایه توسط  $Kulawiak$  و همکاران صورت گرفت [۳۷]، آنها در یک گزارش کوتاه دو نوع کانال پتاسیمی با کنداکنانس های ۷۰-۹۰ و ۲۶۰-۳۲۰ پیکوسیمنس را در محیط  $50 \text{ mM KCl cis} / 450 \text{ mM KCl trans}$  گزارش نمودند و پیشنهاد نمودند که احتمالاً کانال با کنداکنانس ۷۰-۹۰ یک کانال  $mitoK_{ATP}$  در سلولهای مغزی باشد. همچنین در سال ۲۰۰۹  $Choma$  و همکاران با استفاده از تکنیک الحاق

در  $g \times 12000 \times$  برای ۹ دقیقه سانتریفیوژ گردید. برای بدست آوردن سیناپتوزومها، رسوب حاصل را با ۱۰ ml محلول MSE- دیتونین سرد حل نموده و محلول را به ظرف هموژنیزه کننده منتقل و ۸-۱۰ مرتبه به طور دستی هموژنیزه گردید تا سوسپانسیون همگنی بدست آید. سرانجام سوسپانسیون در  $g \times 12000 \times$  برای ۱۱ دقیقه سانتریفیوژ و ویزیکولهای حاصل در  $\mu l \times 300$  محلول MSE حل شده تا غلظت حدود  $20 \text{ mg/ml}$  پروتئین بدست آید.

### خالص سازی غشاء داخلی میتوکندری: برای جدا

سازی غشاء داخلی میتوکندری از روش Da Cruz و همکاران استفاده شد [۱۶]. بطور خلاصه، میتوکندریها در غلظت  $5 \text{ mg/ml}$  در آب مقطر سوسپانسیون شده و برای ۲۰ دقیقه روی یخ تکان داده شدند. این ترکیب ۲۰ مرتبه با هموژنایزر دستی هموژنیزه و دو مرتبه در  $g \times 12000 \times$  برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میتوپلاستهای بدست آمده با  $0.1 \text{ M}$  بیکربنات پتاسیم ( $\text{pH } 11.5$ ) در غلظت نهایی  $0.5 \text{ mg/ml}$  بمدت ۲۰ دقیقه روی یخ تیمار گردیدند. غشاء داخلی میتوکندری با سانتریفیوژ در  $g \times 100000 \times$  برای ۳۵ دقیقه به صورت ویزیکول بدست آمد. نمونه ها جهت بررسی وسترن بلات و الکتروفیزیولوژی در دمای  $-70^\circ \text{C}$  درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

### وسترن بلات: پس از اندازه گیری غلظت پروتئین غشای

داخلی میتوکندری با استفاده از روش برادفورد، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای  $95^\circ \text{C}$  انکوبه شدند. سپس نمونه ها ( $25 \text{ میکرولیتر}$ ) در ژل  $12\%$  (SDS-PAGE) run شده و بعد از آن به کاغذهای نیتروسولوزی منتقل گردیدند. کاغذها از قبل در ترانسفر بافر به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. و سپس پروتئینها از ژل به کاغذ توسط دستگاه بلاتینگ منتقل گشته و برای قرار گرفتن در مجاورت آنتی بادی آماده گردیدند. کاغذها قبل از قرار گرفتن در مجاورت آنتی بادی اولیه به مدت ۲ ساعت در محلول بلاکینگ شامل: بافر TB (محلول آبی تریس اسیدی  $100 \text{ mM}$  و کلرید سدیم  $0.9\%$ )، محلول TBT (بافر TB و  $0.5\%$  توئین-۲۰) و شیر بدون چربی  $10\%$ ، در دمای اتاق قرار گرفته، سپس کاغذها در مجاورت آنتی بادیهای اولیه شامل: آنتی بادیهای Kir6.1 و SUR2B بمدت یک شب در دمای  $4^\circ \text{C}$  درجه قرار داده شدند. پس از شستشو با محلول TTB به

مغزی مورد بررسی قرار دادیم و نهایتاً با استفاده از آنتی بادیهای Kir6.1 و SUR2B ساختمان مولکولی کانال را نیز مطالعه نمودیم.

## مواد و روش ها

### مواد: کلرید پتاسیم، دیتونین، سوکرز، D-مانیتول،

بیکربنات سدیم هیپس، تریس اسیدی و بازی، سرم آلبومین گاوی (BSA)،  $4\text{-AP}$ ،  $^3\text{TEA}$ ،  $^5\text{-HD}$ ، EGTA، ایبریوتوکسین، گلی بنکلامید و ناگاریز از شرکت سیگما، کاغذ نیتروسولوز و کیت لومینسانس (ECL-kit) از شرکت (Amersham)، n-دکان از شرکت مرک و آنتی بادیهای Kir6.1 از شرکت ABCAM و SUR2B از شرکت سانتاکروز خریداری شدند.

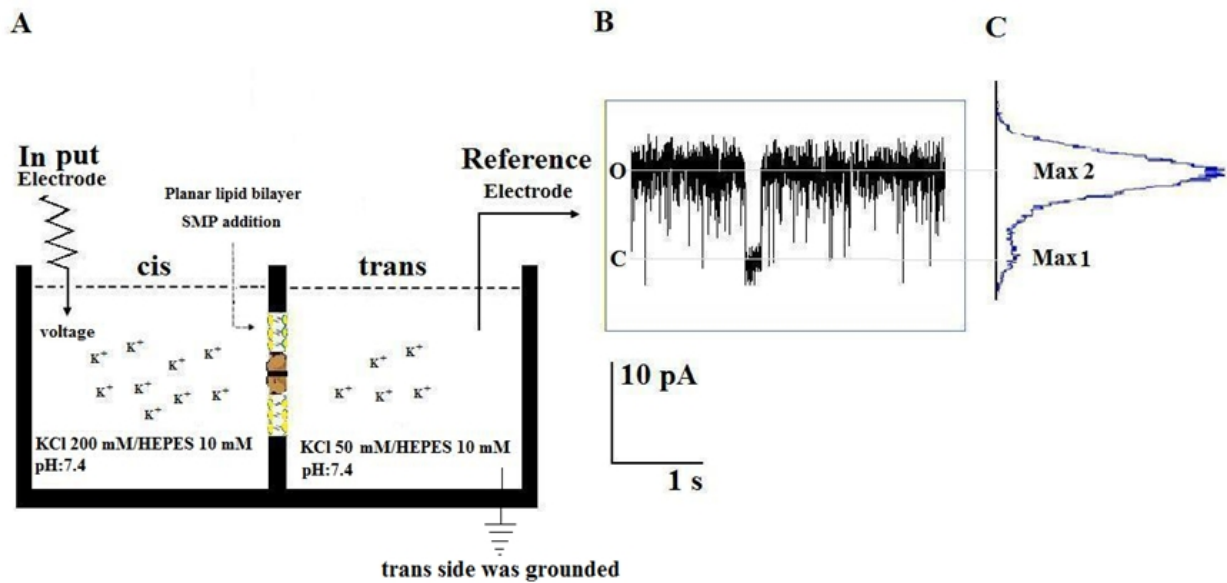
### محلولها: محلولهای مورد نیاز در استخراج میتوکندری

عبارتند از: محلول MSE ( $225 \text{ mM}$  مانیتول،  $75 \text{ mM}$  سوکرز،  $5 \text{ mM}$  هیپس،  $1 \text{ mg/ml}$  BSA،  $1 \text{ mM}$  EGTA،  $7.4 \text{ pH}$ )، محلول MSE- ناگاریز (محلول  $0.5\%$  ناگاریز در محلول MSE)، محلول MSE - دیتونین (محلول  $0.2\%$  دیتونین در محلول MSE)، محلول TB (بافر آبی تریس اسیدی  $100 \text{ mM}$  و کلرید سدیم  $0.9\%$ )، محلول TBT (محلول TB و  $0.5\%$  توئین-۲۰).

### استخراج میتوکندری از مغز موش بزرگ

**آزمایشگاهی:** نمونه های میتوکندری مورد استفاده با روش Kuddin و همکاران استخراج گردیدند [۳۶]. دو موش بزرگ آزمایشگاهی ( $180$  تا  $200$  گرمی) توسط کلروفورم بیهوش و سر آنها بریده شده، مغز آنها را فوراً خارج و به محلول سرد MSE منتقل و چند مرتبه شستشو داده شدند. پس از اضافه کردن  $10 \text{ ml}$  محلول MSE- ناگاریز، به آن با هموژنایزر الکتریکی در  $600 \text{ units/s}$  هموژنیزه شدند. در ادامه  $20 \text{ ml}$  محلول سرد MSE به آن اضافه شده و هموژن در  $g \times 20000 \times$  برای ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول را برداشته و

1. Bovine serum albumin
2. 4- Aminopyridin
3. Tetraethylammonium
4. 5-hydroxydecanoic acid



شکل ۱

مدت ۱ ساعت در مجاورت آنتی بادی ثانویه برای هر دو نمونه به نسبت ۱:۵۰۰ تکان داده شدند. پس از شستشوی نهایی با محلول TTB کاغذها با استفاده از روش شیمیولومینسانس (ECL-kit) بر روی فیلم عکاسی ظاهر و بانهای پروتئینی بررسی گردیدند. تشکیل غشاء دولایه لیپیدی: جهت تشکیل غشاء دولایه لیپیدی (BLM) از یک یا مخلوطی از لیپیدهای طبیعی و یا مصنوعی استفاده می‌گردد. در این پروژه جهت تشکیل BLM از فسفاتیدیل کولین استفاده شد.

استخراج فسفاتیدیل کولین (PC): ماده فوق از زرده تخم مرغ بر اساس روش Singleton و همکاران در سال ۱۹۶۵ استخراج گردید [۵۹]. به طور خلاصه در مرحله اول فسفولیپیدها با استفاده از حلالهای آلی از سایر ترکیبات همانند پروتئینها، پیگمانهای رنگی، و سایر چربیها جدا شده، سپس فسفاتیدیل کولین از سایر فسفاتیدها با استفاده از ستون کروماتوگرافی که فاز ثابت آن، آلومینیوم اکساید و فاز متحرک آن متانل و کلروفرم بود، جدا گردید. خلوص ماده استخراج شده با استفاده از TLC<sup>۱</sup> مورد سنجش قرار گرفت.

**ثبت الکتروفیزبولوژی:** وزیکولهای استخراج شده از غشاء داخلی میتوکندری، توسط سوزن استیل به قطر ۱۵۰  $\mu\text{m}$  با غشاء دولایه لیپیدی جهت الحاق کانال تماس داده می‌شد. جریان عبوری از تک کانال توسط بای لایر کلمپ آمپلی فایر BC-525D (شرکت Warner) اندازه گیری می‌گردید. ولتاژ در محفظه سیس اعمال می‌شد و محفظه ترانس گراند می‌گردید (شکل ۱A). اتصالات الکتریکی دو محفظه توسط الکترودهایی از جنس نقره/کلرید نقره و پل نمکی/آگار (۳ مولار KCl) با دستگاه آمپلی فایر برقرار می‌گردید. تمام ثبت‌ها در ۱ kHz با استفاده از یک فیلتر ۴ پل بسل و با سرعت نمونه برداری ۱۰ kHz نمونه برداری و توسط دستگاه ثبت (شرکت Axon) به کامپیوتر منتقل و ذخیره می‌گردیدند. جهت آنالیز از

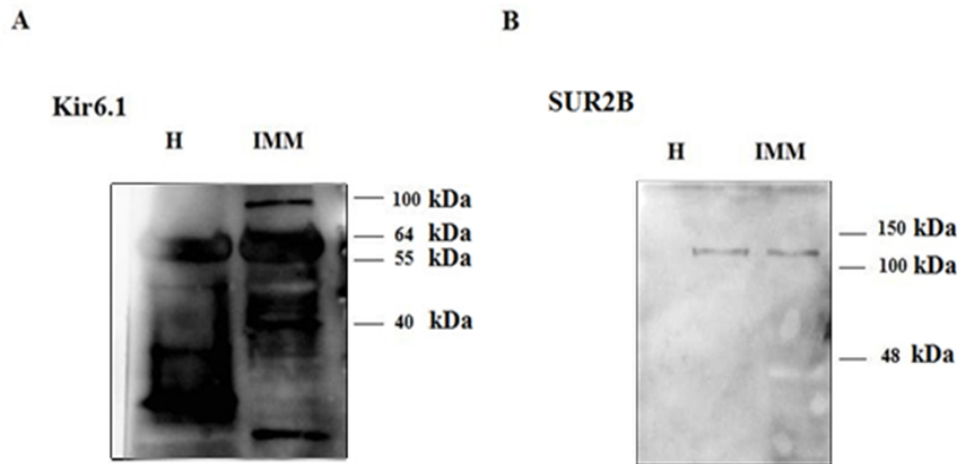
### استخراج فسفاتیدیل کولین (PC): ماده فوق از زرده

تخم مرغ بر اساس روش Singleton و همکاران در سال ۱۹۶۵ استخراج گردید [۵۹]. به طور خلاصه در مرحله اول فسفولیپیدها با استفاده از حلالهای آلی از سایر ترکیبات همانند پروتئینها، پیگمانهای رنگی، و سایر چربیها جدا شده، سپس فسفاتیدیل کولین از سایر فسفاتیدها با استفاده از ستون کروماتوگرافی که فاز ثابت آن، آلومینیوم اکساید و فاز متحرک آن متانل و کلروفرم بود، جدا گردید. خلوص ماده استخراج شده با استفاده از TLC<sup>۱</sup> مورد سنجش قرار گرفت.

### تشکیل غشاء دولایه لیپیدی: برای تشکیل غشاء از

روش Muller و همکاران استفاده شد [۴۵]. در این روش دو محفظه سیس (فضای سیتوپلاسمی) و ترانس (فضای لومنی) از جنس تفلون که دارای محلولهای کلرید پتاسیم با غلظتهای

1. Thin Layer Chromatography



شکل ۲

50kDa تا 60 در هر دو نمونه هموژنیزه (H) و نمونه پروتئین استخراج شده از غشاء داخلی میتوکندری (IMM) نشان داد (شکل ۲A). هم چنین با استفاده از آنتی بادی SUR2B (بعنوان آنتی بادی شناسایی کننده زیر واحد قسمت سولفونیل اوره کانال) باندی در ناحیه بین 120 تا 140 kDa در نمونه های هموژنیزه و غشاء داخلی میتوکندری مشاهده گردید (شکل ۲B).

### خصوصیات بیوفیزیکی تک کانال پتاسیمی

**mitoK<sub>ATP</sub> غشاء داخلی میتوکندری مغز:** ثبت جریان در ولتاژهای مختلف: فعالیت کانال بعد از الحاق وزیکولهای غشاء داخلی میتوکندری به غشاء دو لایه لیپیدی در محیط غیر همگون کلرید پتاسیم (200 mM KCl cis/50 mM KCl) (trans) ثبت گردید. در ۱۰٪ از کوشش ها، نیم تا ده دقیقه بعد از الحاق وزیکولهای غشاء داخلی میتوکندری به غشاء دو لایه لیپیدی کانال مشاهده گردید. شکل ۳A، جریان های ثبت شده در ولتاژهای مختلف غشاء، از ۴۰ + تا ۴۰ - میلی ولت را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود در ولتاژ صفر میلی ولت بدون اینکه هیچگونه اختلاف ولتاژی اعمال شده باشد، جریان پتاسیمی بصورت رو به بالا و مثبت ثبت گردیده که ناشی از حرکت یونها در جهت گرادینان غلظتی از محفظه سیس به ترانس است. میزان جریان در ولتاژ نزدیک به ۳۰ - میلی ولت به شدت کاهش یافته و در ولتاژ ۳۰ - میلی ولت به صفر رسیده است. در ولتاژ منفی تر از ۳۰ - میلی ولت جریانه های روبه پایین ثبت گردیده که نشانه حرکت رو به داخل یا به عبارتی حرکت

نرم افزار Pclamp 10 (شرکت Axon) استفاده گردید. روش های تجزیه و تحلیل داده ها: در روشهای تجزیه و تحلیل داده های تک کانال، ساده ترین حالت حضور یک وضعیت بسته و یک وضعیت باز می باشد. ارتفاع یا آمپلی تود بین این دو وضعیت نشان دهنده میزان عبور جریان از درون کانال بر اساس پیکو آمپر (pA) می باشد (شکل ۱B). متوسط میزان جریان عبوری توسط رسم هیستوگرام بیان شد (شکل ۱C). کنداکتانس تک کانال بر اساس شیب منحنی ولتاژ-جریان محاسبه گردید. احتمال باز بودن کانال (P<sub>o</sub>) از طریق به کار گیری الگوریتمهای استاندارد تعیین رخدادهای Pclamp10، بر اساس نسبت زمان باز بودن کانال به کل زمان ثبت در ولتاژ معینی صورت گرفت. P<sub>o</sub> از روی قطعات یک دقیقه ای در ولتاژهای معین محاسبه گردید. اطلاعات بصورت mean ± SEM گزارش گردیدند.

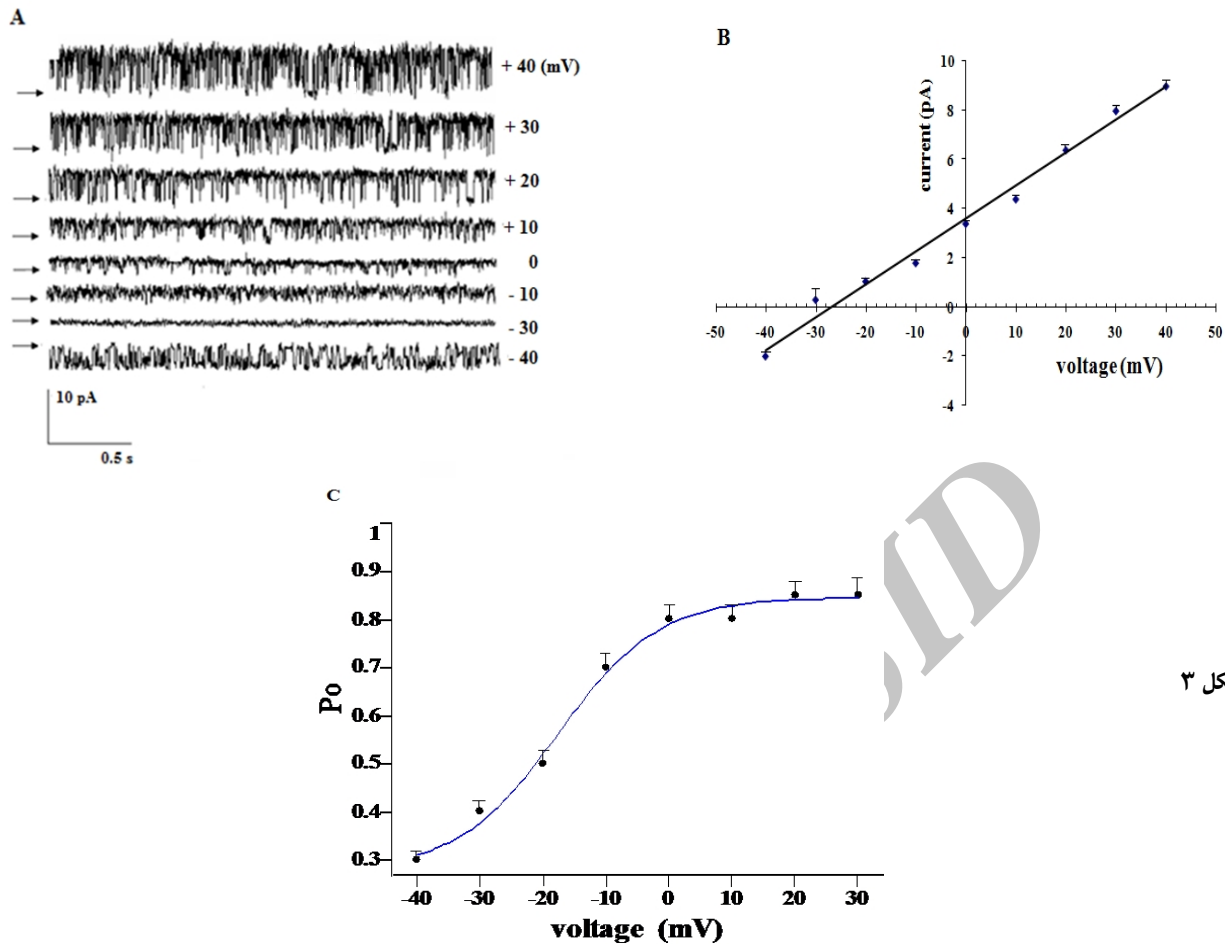
## یافته ها

### تعیین زیر واحدهای کانال پتاسیمی mito K<sub>ATP</sub> غشاء داخلی میتوکندری:

با استفاده از تکنیک وسترن بلات و آنتی بادی های اختصاصی برای کانال K<sub>ATP</sub>، زیر واحدهای کانال را شناسایی نمودیم. با استفاده از آنتی بادی Kir6.1 (بعنوان آنتی بادی شناسایی کننده زیر واحد تشکیل دهنده منفذ کانال K<sub>ATP</sub>) نتایج ما باند قوی را در ناحیه بین

2. Homogenate
3. Mitochondria inner membrane

1. Open probability



شکل ۳

کاتیونی است.

**وابستگی به ولتاژ احتمال باز بودن کانال: اثر ولتاژ**  
بر روی ویژگیهای باز و بسته شدن کانال با اندازه گیری احتمال باز بودن کانال ( $P_o$ ) در ولتاژهای مختلف در محیط (200 mM) احتمال باز بودن کانال به عنوان تابعی از ولتاژ در نظر گرفته شده و منحنی  $P_o$  برای آن رسم گردید. همانطور که شکل ۳C نشان می دهد احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای مثبت، بالا و با تغییر پتانسیل غشاء به سمت ولتاژهای منفی، احتمال باز بودن کانال کاهش پیدا کرد. منحنی ولتاژ-احتمال باز بودن کانال، با معادله Boltzman-Z delta

$$P_o = \frac{1}{1 + e^{\frac{zdf(V - V_{mid})}{RT}}}$$

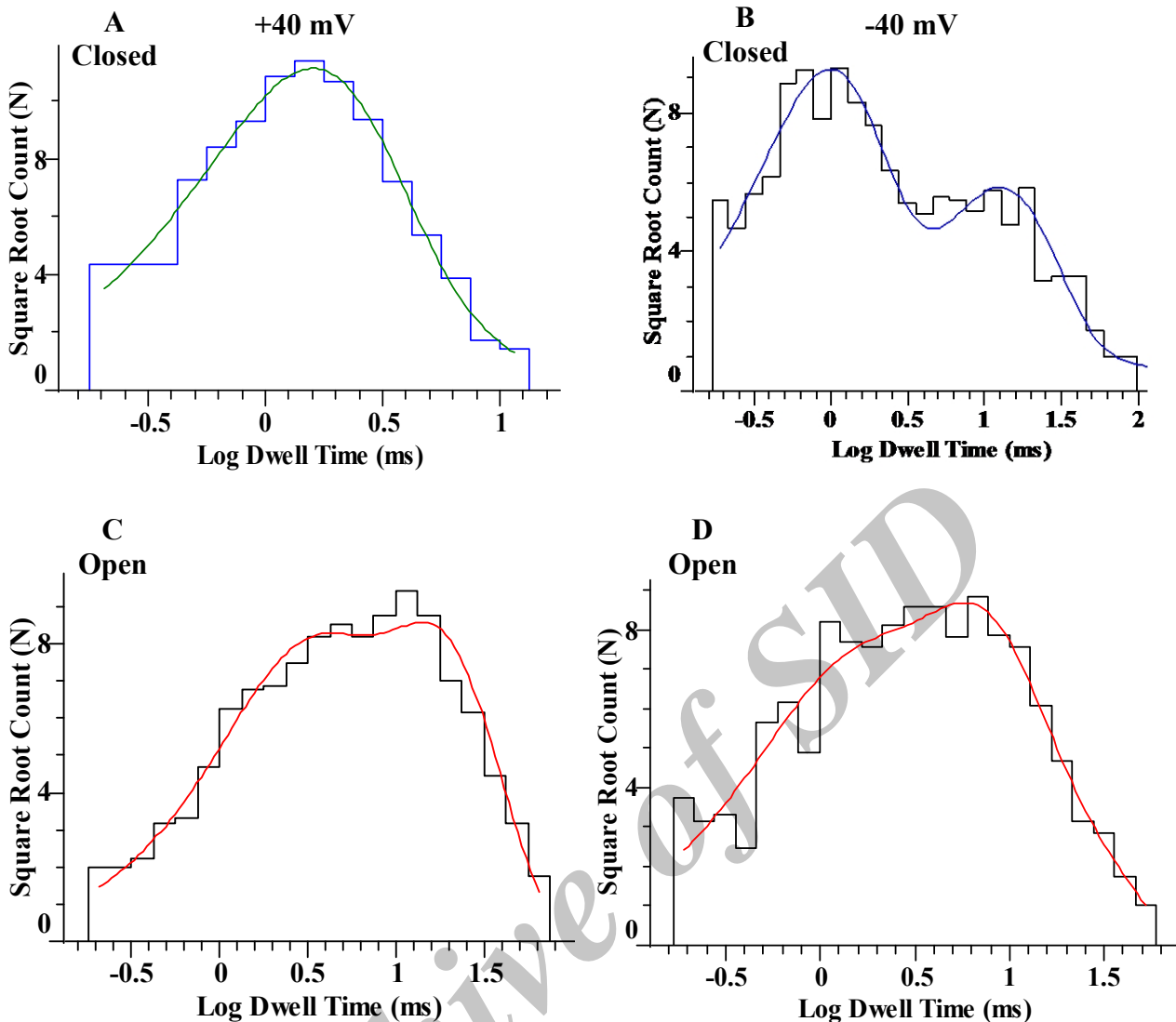
تطبيق<sup>۲</sup> گردید و مقادیر زیر بدست آمد:

$V_{mid}$ :  $-17.72 \pm 1.3$  mV (ولتاژ مربوط به ۵۰٪ حداکثر فعالیت)

یون پتاسیم از محفظه ترانس به محفظه سیس می باشد. همانطور که شکل ۳A نشان می دهد با افزایش ولتاژ به سمت ولتاژهای مثبت، احتمال باز بودن کانال افزایش می یابد.

**رابطه جریان-ولتاژ:** در شکل ۳B نمودار ولتاژ-جریان نشان داده شده است. رابطه جریان-ولتاژ در محدوده +۴۰ تا -۴۰ میلی ولت برای کانال به صورت خطی است و هیچگونه انحراف از خط راست یا جریان رو به داخل مشاهده نمی گردد. شیب منحنی که نشان دهنده کندانکتانس کانال است برابر با  $143 \pm 7$  پیکوسیمنس (pS) است. همانطور که شکل نشان می دهد پتانسیل معکوس<sup>۱</sup> برای وضعیت هدایتی کانال  $3 \pm 30$  میلی ولت است. با توجه به اینکه میزان پتانسیل معکوس بدست آمده نزدیک به پتانسیل تعادلی پتاسیم  $E_k = -30$  mV در شرایط یونی  $\frac{[k]_i}{[k]_o} = \frac{200 \text{ mM}}{50 \text{ mM}}$  است، می توان بیان نمود کانال برای عبور پتاسیم انتخابی بوده، یک کانال

1. Reverse potential
2. Fit



شکل ۴

کانالها در شکل ۴ برای ولتاژهای +۴۰ و -۴۰ میلی ولت نشان داده شده است. توزیع‌های زمانی وضعیت بسته، یک جزء توانی را در +۴۰ mV با ثابت زمانی  $\tau_{closed1} \sim 4.5$  ms (شکل ۴A) و دو جزء توانی را در -۴۰ mV با ثوابت زمانی  $\tau_{closed1} \sim 1.5$  ms و  $\tau_{closed2} \sim 12$  ms (شکل ۴B) نشان می‌دهد. توزیع زمانی باز، با دو تابع توانی منطبق گردیده است و همانطور که شکل D و C نشان می‌دهد به نظر می‌آید ولتاژهای مثبت و منفی تأثیر معنی داری بر روی توزیع‌های زمانی باز نداشته باشد.

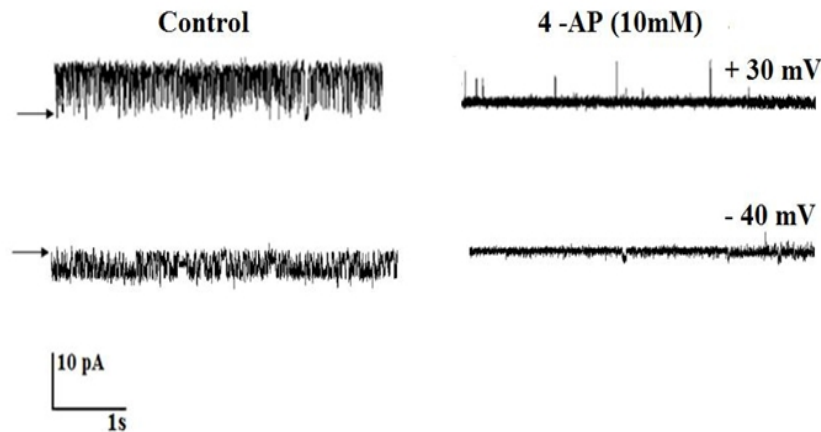
**بررسی خواص فارماکولوژیک کانال:** اثر 4-AP بر روی فعالیت کانال  $4\text{-AP:mitoK}_{ATP}$  به عنوان مهار کننده غیر انتخابی کانال پتاسیمی بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵ اثر افزودن 4-AP را در محفظه cis در غلظت 10 mM بر روی فعالیت کانال در دو ولتاژ +۳۰ و -۴۰

(Apparent gating charge)  $Z_d = 3.14 \pm 0.4$

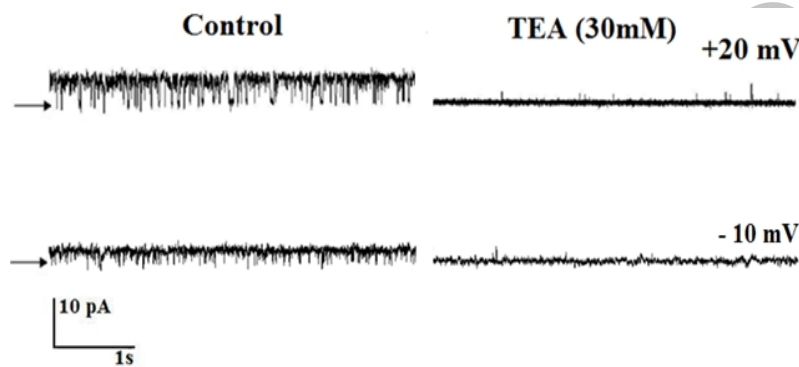
ماکزیمم احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای بالاتر از صفر مشاهده شده و در ولتاژهای +۲۰ و +۳۰ برابر  $0.85 \pm 0.05$  است.

### بررسی توزیع زمانی حالت‌های باز و بسته کانال

**(dwell time distribution):** جزئیات بیشتر اثر ولتاژ روی نحوه باز و بسته شدن تک کانال توسط بررسی توزیع‌های زمانی (dwell time) distributions حالت‌های باز و بسته کانال در دو ولتاژ مثبت و منفی مورد مطالعه قرار گرفت. در هیستوگرام‌های توزیع زمانی بسته، فواصل زمانی وضعیت بسته به زمان‌هایی اطلاق گردیده که در آن میزان جریان صفر و یا  $\pm 0.3$  pA بوده است. در هیستوگرام‌های باز فواصل زمانی باز به زمان‌هایی اطلاق گردیده که در آن میزان جریان در حداکثر مقدار خود بوده است. مثالهایی از این هیستوگرام‌ها برای



شکل ۵



شکل ۶

### اثر Iberitoxin (IbTx) بر روی فعالیت کانال

**mitoK<sub>ATP</sub>**: اثر ایبریوتوکسین به عنوان مهارکننده اختصاصی کانالهای پتاسیمی حساس به کلسیم (بویژه با کنداکتانس بالا) بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۷ اثر افزودن IbTx را در ناحیه cis در غلظت ۱۰۰ nM بر روی فعالیت کانال به ترتیب در دو ولتاژ دو ولتاژ +۲۰ و -۱۰ نشان می‌دهد. میزان جریان برای ولتاژ +۲۰ میلی ولت قبل از اضافه کردن IbTx برابر با  $2 \pm 6$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن  $0.8$  (شکل ۵)، و برای ولتاژ -۱۰ میلی‌ولت میزان جریان  $0.5 \pm 2$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن  $0.8$  بود. پس از اضافه کردن IbTx فعالیت کانال هر دو ولتاژ +۲۰ و -۱۰ میلی ولت تغییر محسوس و معنی داری در میزان جریان و احتمال باز بودن کانال ایجاد نشد (شکل ۱۰).

### بررسی اثر داروهای مهارکننده ATP:

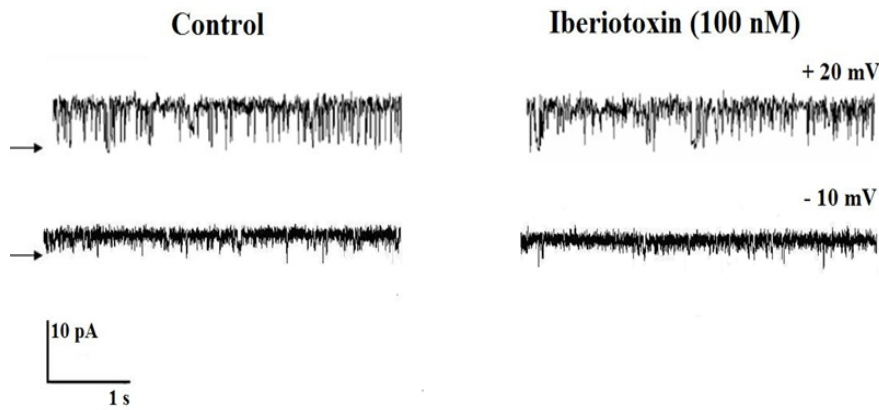
۱. اثر ATP بر روی فعالیت کانال mitoK<sub>ATP</sub>: اثر ATP به عنوان مهار کننده کانالهای پتاسیمی حساس به ATP بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۷ اثر افزودن

میلی ولت نشان می‌دهد. میزان جریان برای ولتاژ +۳۰ میلی ولت قبل از اضافه کردن 4-AP برابر با  $1 \pm 8$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن  $0.85$  (شکل ۵) و برای ولتاژ -۴۰ میلی‌ولت میزان جریان  $1 \pm 3$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن  $0.3$  بود (شکل ۵). پس از اضافه کردن 4-AP فعالیت کانال به طور کامل مهار گردید و احتمال باز بودن کانال در هر دو ولتاژ تقریباً به صفر رسید.

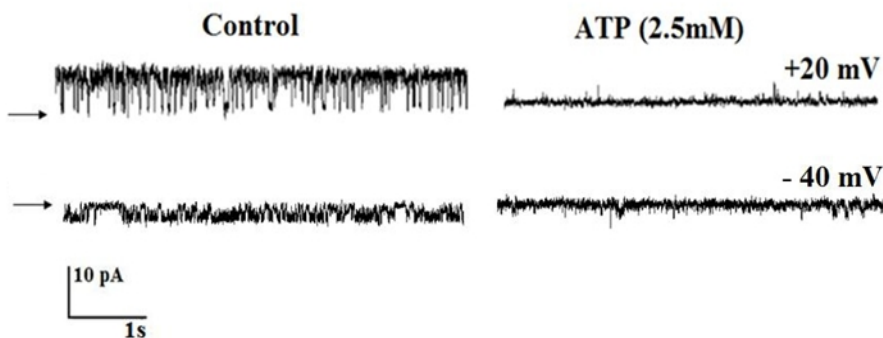
### اثر TEA بر روی فعالیت کانال mitoK<sub>ATP</sub>: اثر

افزودن TEA به عنوان مهار کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۶ اثر افزودن TEA در محفظه cis در غلظت ۳۰ mM بر روی فعالیت کانال به ترتیب در دو ولتاژ +۲۰ و -۱۰ میلی ولت را نشان می‌دهد. همانطور که شکل ۶ نشان می‌دهد، میزان جریان برای ولتاژ +۲۰ میلی ولت قبل از اضافه کردن TEA برابر با  $2 \pm 6$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن  $0.8$  و برای ولتاژ -۱۰ میلی ولت میزان جریان پیکو آمپر  $0.5 \pm 2$  و احتمال باز بودن آن  $0.7$  است. پس از اضافه کردن TEA فعالیت کانال به طور کامل در هر دو ولتاژ +۲۰ و -۱۰ میلی ولت مهار گردید (شکل





شکل ۷



شکل ۸

گلیسین کلامید، فعالیت کانال در هر دو ولتاژ +۳۰ و -۱۰ میلی ولت تغییر و مهار گردید (شکل ۹).

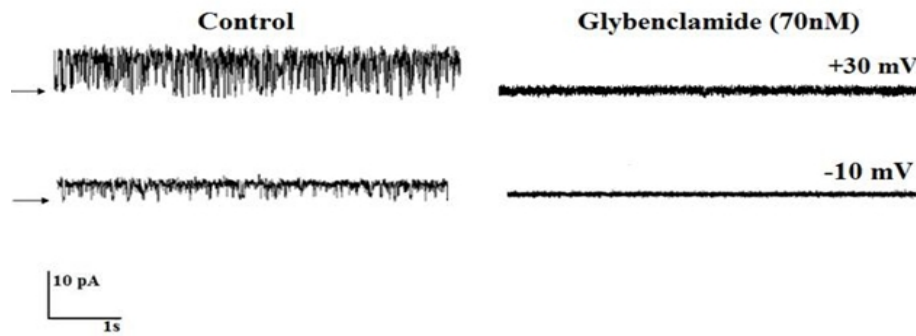
۳. اثر 5-HD بر روی فعالیت کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ : اثر 5-HD به عنوان مهار اختصاصی کانالهای پتاسیمی  $\text{K}_{\text{ATP}}$  میتوکندریایی بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱۰ اثر افزودن 5-HD را در محفظه cis در غلظت 1mM بر روی فعالیت کانال به ترتیب در دو ولتاژ +۲۰ و -۴۰ میلی ولت نشان می دهد. میزان جریان برای ولتاژ +۲۰ و -۴۰ میلی ولت قبل از اضافه کردن 5-HD برابر با  $6 \pm 2$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۸۵ و برای ولتاژ -۴۰ میلی ولت میزان جریان  $3 \pm 1$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۳ است. پس از اضافه کردن 5-HD تغییر معنی داری در فعالیت کانال در هر دو ولتاژ +۲۰ و -۴۰ میلی ولت ایجاد نشد (شکل ۱۰).

## بحث

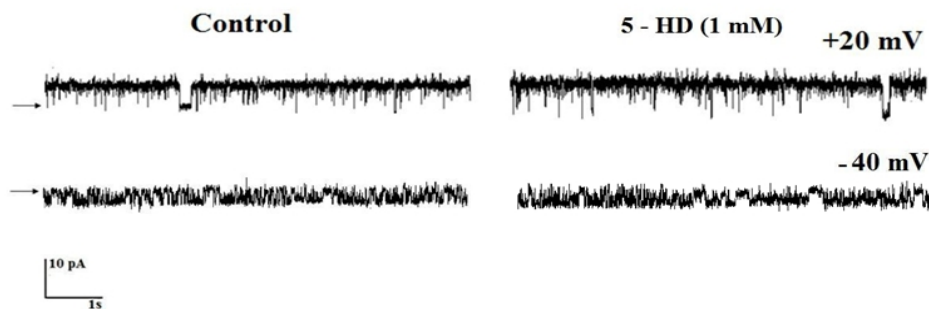
کانالهای یونی بخصوص کانالهای پتاسیمی در غشاء داخلی میتوکندری دارای نقش مهمی از جمله تنظیم حجم سلول

ATP را در محفظه cis در غلظت ۲/۵ mM بر روی فعالیت کانال به ترتیب در دو ولتاژ +۲۰ و -۴۰ میلی ولت نشان می دهد. همانطور که شکل ۷ نشان می دهد میزان جریان برای ولتاژ +۲۰ میلی ولت قبل از اضافه کردن ATP برابر با  $6 \pm 2$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۸۵ و برای ولتاژ -۴۰ میلی ولت میزان جریان  $3 \pm 1$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۳ است. پس از اضافه کردن ATP فعالیت کانال در هر دو ولتاژ +۲۰ و -۴۰ میلی ولت مهار گردید (شکل ۸).

۲. اثر گلیسین کلامید بر روی فعالیت کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ : اثر گلیسین کلامید به عنوان مهار کننده کانالهای پتاسیمی حساس به ATP بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۹ اثر افزودن گلیسین کلامید را در محفظه cis در غلظت ۷۰nM بر روی فعالیت کانال به در دو ولتاژ +۳۰ و -۱۰ میلی ولت نشان می دهد. همانطور که شکل ۹ نشان می دهد میزان جریان برای ولتاژ +۳۰ میلی ولت قبل از اضافه کردن گلیسین کلامید برابر با  $8 \pm 1$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۸ (شکل ۵) و برای ولتاژ -۱۰ میلی ولت میزان جریان  $2 \pm 0.5$  پیکو آمپر و احتمال باز بودن آن ۰/۷ بود پس از اضافه کردن



شکل ۹



شکل ۱۰

اسکلتنی ۱۹ (Debeska et al., 2002)، لنفوسیت‌های T انسان [۱۷] و مغز [۵] با کنداکتانس ۱۰~۱۱۰ پیکوسیمنس نشان داده شده است. گزارش‌هایی مبنی بر حضور یک کانال پتاسیمی میتوکندریایی (کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ ) در سلول‌های مختلف نیز با استفاده از تکنیک غشاء لیپیدی دو لایه ارائه شده است. چنانکه Bednarczyk و همکاران کانالی با کنداکتانس  $103 \pm 9$  پیکوسیمنس در شرایط غلظتی برابر  $\text{cis}/150 \text{ mM KCl trans}$  و همکاران کانالی با کنداکتانس  $150 \text{ mM KCl}$  را در سلول‌های قلبی گزارش نموده‌اند که توسط  $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$  مهار گردید [۶].

Kulawiak و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ با استفاده از تکنیک الحاق کانال به غشاء دو لایه لیپیدی کانال پتاسیمی با کنداکتانس ۷۰ - ۹۰ پیکوسیمنس را تحت شرایط غلظتی  $\text{cis}/450 \text{ mM KCl trans}$  و غلظت برابر  $450 \text{ mM KCl cis}/450 \text{ mM KCl trans}$  در سلول‌های مغز گزارش نمودند [۳۷] و این در حالی بود که خواص فارماکولوژیک کانال مورد بررسی قرار نگرفت. مطالعات ما نیز یک کانال پتاسیمی را در غشاء داخلی میتوکندری مغز نشان داد که نمودار جریان-ولتاژ آن در دامنه ولتاژی +۴۰ تا -۴۰ میلی‌ولت با شیب کنداکتانس ۱۴۳ pS، خطی است. نتایج ما هم چنین بیان می‌کند که احتمال باز بودن کانال، وابسته به

[۷، ۲۶] پتانسیل غشایی [۱۹]، ذخیره کلسیم، تنظیم pH [۷] و فرآیندی موسوم به آپوپتوز [۶۴] می‌باشند. بعلاوه این کانال‌ها هدف بسیاری از داروها بوده و تنظیم عملکرد آنها موجب حفاظت سلولی در سلول‌های قلبی و نورونها می‌گردد. در این مطالعه ما خواص بیوفیزیکی و الکتروفارماکولوژیک کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  را در سلول‌های مغز مورد بررسی قرار داده‌ایم.

قسمتی از نتایج ما یک کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ با کنداکتانس ۱۴۳ پیکوسیمنس را در شرایط غلظتی  $\text{cis}/50 \text{ mM KCl trans}$  200 mM KCl نشان می‌دهد. احتمال باز بودن کانال وابسته به ولتاژ بوده و در ولتاژهای منفی پایین و با افزایش به سمت ولتاژهای مثبت مقدار آن افزایش یافت. هم چنین آنالیز توزیع زمانی نشان داد که با کاهش ولتاژ یک حالت بسته طولانی به تعداد حالت‌های بسته کانال اضافه می‌گردد.

بررسی کانال‌های پتاسیمی  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  با استفاده از تکنیک‌های مختلف الکتروفیزیولوژیک و بیولوژی مولکولی صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۱ Inoue و همکاران حضور کانال پتاسیمی حساس به ATP در غشاء داخلی میتوکندری کبد را با استفاده از روش پیچ کلمپ نشان دادند [۲۹]. همچنین حضور این کانال در غشاء داخلی میتوکندری سلول عضله

مورد مطالعه قرار دادیم.

در ابتدا اثر ۴-آمینوپیریدین را مورد مطالعه قرار دادیم. نتایج ما نشان داد؛ 4-AP بعنوان مهار کننده غیر اختصاصی کانالهای پتاسیمی با دوز ۱۰ mM در ناحیه سیتوپلاسمی (محفظه cis)، فعالیت کانال را به طور کامل و غیر وابسته به ولتاژ مهار می نماید (شکل ۵). مطالعه مشابهی توسط Inoue و همکاران نشان داده که این کانال در غشاء داخلی میتوکندری کبد با دوز 5mM از 4-AP مهار می گردد [۲۹]. ما هم چنین در بررسی خود نشان دادیم  $TEA^+$  بعنوان داروی مهارکننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ولتاژ با دوز ۳۰ mM سبب مهار غیر وابسته به ولتاژ کانال می گردد. اثر مهاری غیر وابسته به ولتاژ TEA بر روی کانال پتاسیمی میتوکندری مشابه اثر آن در مطالعه قبلی ما بر روی کانال پتاسیمی حساس به کلسیم بود [۲۳]. با توجه به کندکانتانس نسبتاً بالای کانال و هم چنین نتایج مطالعات قبلی ما مبنی بر حضور دو نوع کانال پتاسیمی حساس به کلسیم [۲۳، ۲۲] و گزارشهایی مبنی بر اثر ATP بر روی کانالهای پتاسیمی حساس به کلسیم [۲۷، ۴۴، ۴۹] اثر IbTx بر روی فعالیت کانال مورد بررسی قرار گرفت. مهار کننده های فارماکولوژیکی چندی جهت شناسایی کانالهای پتاسیمی حساس به کلسیم شناسایی شده که شامل پپتیدهای مشتق از اسکورپینون نامهای کریبوتوکسین (ChTx) و ایبریوتوکسین (IbTx) می باشند [۶۱، ۶۲]. بنابراین در این مطالعه اثر IbTx بر روی کانال مورد مطالعه قرار گرفت و هیچگونه اثری بر روی فعالیت کانال مشاهده نگردید. چندین مهار کننده اختصاصی در بررسی های مربوط به رفتار کانالهای  $mitoK_{ATP}$  بکار می روند که شامل ATP، ترکیبات سولفونیل اوره مانند گلی بنکلامید و 5-hydroxydecanoic acid (5-HD) هستند. نتایج ما نشان داد که تجویز ATP با دوز ۲/۵ mM فعالیت کانال را در هر دو ولتاژ مثبت و منفی مهار می نماید. هم چنین نتایج ما نشان می دهد که وارد کردن گلی بن کلامید با دوز ۷۰ nM در ناحیه سیس کانال پتاسیمی الحاق یافته به غشاء دو لایه لیپیدی در هر دو ولتاژ مثبت و منفی بدون وابستگی به ولتاژ موجب مهار کانال می گردد و این حضور کانال پتاسیمی نوع  $mitoK_{ATP}$  را در غشاء داخلی میتوکندری مغز تایید می نماید. گلی بن کلامید بر روی کانال با اتصال به گیرنده سولفونیل اوره مانع از جریان یافتن یون ها پتاسیمی از داخل

ولتاژ بوده و در ولتاژهای مثبت به حدود ۰/۹ می رسد. شکل ۴ نیز نشان می دهد که توزیع زمانی وضعیت باز کانال با دو تابع توانی به عبارتی وجود حداقل دو حالت باز برای تک کانال است که غیر حساس به ولتاژ می باشد. توزیع زمانی بسته کانال حاکی از یک تابع اکسپوننشیل (یک وضعیت بسته) در ولتاژهای مثبت و دو تابع اکسپوننشیل (حداقل دو وضعیت بسته) در ولتاژهای منفی است. این نتایج بیان می دارند که یک حالت بسته طولانی در کانال در پتانسیل های منفی تر ظاهر می شود و سبب کاهش احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای منفی می گردد. انطباق وابستگی احتمال باز بودن کانال به ولتاژ با رابطه بولتزمن، میزان بار لازم جهت رفتار باز و بسته شدن کانال را ۳ بار و میزان ولتاژ موثر جهت ۵۰٪ حداکثر فعالیت را برابر ۱۸- میلی ولت نشان داد. مطالعات ما به موازات مطالعه Choma و همکارانش صورت گرفت. آنها کانالی پتاسیمی در میتوکندری سلولهای مغزی در شرایط (50 mM KCl cis/450 mM KCl trans) با کندکانتاسی برابر با ۲۱۹ پیکوسیمنس مشاهده کردند [۱۴]. نتایج آنها بر خلاف نتایج ما نشان می دهد که کانال پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری مغز در ولتاژهای مثبت و منفی دارای یک حالت باز و یک حالت بسته بوده و احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای منفی افزایش می یابد. مطالعه ای نشان داده است که میزان بار موثر جهت باز شدن کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ می تواند توسط غلظت پتاسیم بویژه پتاسیم داخل سلولی تحت تاثیر قرار گیرد [۷۸]، بنابراین، منطقی است فرض نماییم که اختلاف گرادیان شیمیایی دلیلی برای این تفاوت باشد. جهت حل این مسئله، باید مطالعه بیشتری بر روی رفتار کانال و ارتباط عملکرد کانال و ساختمان آن صورت گیرد. کانالهای  $K_{ATP}$  در غشا پلاسمایی بسیاری از اندامها [۱، ۱۵، ۴۶، ۴۷] و هم چنین در غشا داخلی میتوکندری [۳۴، ۷۴] یافت شده است. از ویژگی این کانال مهار آن توسط ATP است. اخیراً نیز ما کانال پتاسیمی را در غشا اندوپلاسمیک ریکلوم گزارش نمودیم که توسط ATP و  $ATP\gamma S$  مهار می گردید، این کانالها در فرآیندهایی همچون سیگنالینگ کلسیم و تنظیم پتانسیل غشاء بویژه در شرایط استرسهای متابولیک نقش مهمی را دارا می باشند [۳]. در قسمت دوم نتایج، ما خصوصیات فارماکولوژیک کانال پتاسیمی غشاء داخلی میتوکندری مغز را

اوره (SURx) تشکیل می‌شوند.

دو نوع زیر واحد Kir6.x (Kir6.1, Kir6.2) و سه نوع زیر واحد SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B) در ساختمان این کانالها شرکت می‌کنند. زیر واحدهای Kir6.x منفذ کانال را می‌سازند و زیر واحد مسئول پاسخ کانال به ATP می‌باشد. زیر واحدهای SUR نقش تنظیمی داشته و باعث تعدیل خصوصیات بیوفیزیکی و فارماکولوژی کانال می‌شوند. این زیر واحدها جایگاه عملکرد داروی گلی بن کلامید می‌باشد [۸، ۲۱] و تنوع این زیرواحدها باعث ایجاد تنوع در خصوصیات باز و بسته شدن و فارماکولوژی این کانالها شده است.

مشاهدات متعددی بر اساس تحقیقات فارماکولوژیک و مولکولی پیشنهاد می‌کنند که کانالهای  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  قلب و کبد متعلق به خانواده کانالهای پتاسیمی یکسویه ساز Kir6.1 می‌باشند [۴۱، ۵۸].

مطالعات Lacza و همکاران (۲۰۰۳) زیر واحد 51kDa Kir6.1 را در میتوکندری قلب [۴۰] و مطالعات Suzuki و همکاران (۱۹۹۷) باند ۵۱ kDa را در میتوکندری عضله اسکلتی یافته‌اند [۶۳]. قبل از این مطالعات نیز Zhou و همکاران (۱۹۹۹) هر دو زیر واحد Kir6.1 و Kir6.2 را در مغز شناسایی نموده بودند [۷۹]. اخیراً Foster و همکاران نیز در مغز، کبد و Ng و همکاران در سلول‌های ماهیچه ای نشان دادند که Kir6.1 حضور دارد [۲۴، ۲۵]. نتایج ما نیز با استفاده از آنتی بادی Kir6.1 حضور آن را در مغز تایید می‌نماید. زیر واحدهای مربوط به گیرنده سولفونیل اوره (SUR2A و SUR2B) نیز در  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  اندامهای مختلف از جمله عضله قلبی شناسایی شده است. Chen و همکاران با استفاده از آنتی بادی و بررسی بیان ژن زیر SUR2A را در عضله قلبی شناسایی نموده اما SUR2B را مشاهده نمودند [۱۳]. اما نتایج آزمایشهای ما نشان داد که در بین زیر واحدهای مربوط به گیرنده سولفونیل اوره در مغز احتمالاً SUR2B حضور دارد که می‌تواند ناشی از تفاوت‌های زیر واحدها و نقش آنها در بافت‌ها و سلولهای مختلف باشد [۴۰، ۵۶].

در خصوص نقش فیزیولوژیک کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  بعنوان مثال در ایسکمی مطالعات نشان می‌دهند که کانالهای  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  نورونهای عصبی در طی دوره ایسکمی باز شده و بدین وسیله از این سلولها در برابر ایسکمی حفاظتی می‌کنند

کانال می‌گردد. اخیراً ما در مطالعه‌ای نشان داده‌ایم که کانال پتاسیمی حساس به ATP علاوه بر میتوکندری در غشاء اندوپلاسمیک رتیکلوم کبد نیز وجود دارد که بطور وابسته به ولتاژ توسط گلی بنکلامید مهار می‌گردد [۵۵]. 5-HD یک مهار کننده اختصاصی کانالهای  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  می‌باشد در حالیکه گلی بنکلامید یک مهار کننده غیر اختصاصی می‌باشد [۵۴]. این طبقه بندی بر اساس بررسی عملکرد میتوکندری قلب در سلولهای سالم [۳۹، ۵۲]، میتوکندری جدا شده [۳۵]، و روی ثبت‌های تک کانال [۳۲، ۷۷] می‌باشد. اما نتایج ما نشان داد که 5-HD اثری بر روی فعالیت کانال ندارد. مطالعات قبل اثر مهاری 5-HD را بر روی فعالیت کانال  $\text{K}_{\text{ATP}}$  میتوکندریایی [۱۹]، پروتولیپوزومها [۵] و بافت‌های نورونی که بدنبال به کارگیری دیازوکساید فعال شده بودند را توصیف کرده‌اند [۴۲، ۵۶، ۷۱]. هم چنین گزارشهایی دیگری نیز نشان می‌دهند که اثر این دارو بر روی کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  در قلب [۳۵، ۴۸]، عضله اسکلتی [۹]، کبد [۳۰]، کلیه [۱۲]، مغز و سلولهای کشت شده مغز [۱۱، ۷۱] مهاری می‌باشد. بر خلاف مطالعات فوق، مطالعات دیگر نشان می‌دهند کانالهای  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  در میتوکندری های غیر سیناپتوزومال حضور دارند که حساس به دیازوکساید و 5-HD نمی‌باشند [۹]. اخیراً نیز عدم تأثیر 5-HD روی متورم شدن میتوکندری مغز مشاهده شده است [۳۸]. احتمالاً این تفاوت علاوه بر تغییرات ویژه بافتی در ارتباط با زیر واحد های تشکیل دهنده کانال و تفاوت آنها در بافتهای مختلف و یا حذف عواملی در سلول مانند سایتواسکلتونها و دیگر پروتئینهای موجود در غشاء مانند بعضی از پروتئینهای داخل غشائی که مانند لنگر عمل می‌کنند، می‌باشد. از بین رفتن ارتباط کانال و این پروتئینها باعث تغییر در باز و بسته شدن و کنداکتانس آنها شده و خواص فارماکولوژیک آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۸، ۷۰]. مطالعات ایمونوهیستوشیمی و بیولوژی مولکولی حضور کانال پتاسیمی را در غشاء داخلی میتوکندری مغز نشان داده‌اند [۶۰]. با این حال ساختمان مولکولی کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  هنوز بطور دقیق شناسایی نشده است. اعتقاد بر این است که کانال  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  و کانالهای  $\text{K}_{\text{ATP}}$  غشاء پلاسمایی شباهت‌های زیادی با یکدیگر دارند. ساختمان کانال  $\text{K}_{\text{ATP}}$  ترکیب اکتامری است که از به هم پیوستن زیر واحدهای Kir6.x و سولفونیل

بنکلامید مهار شده در حالیکه 5-HD و ایبریوتوکسین بر آن اثری ندارند. بنظر می‌رسد این کانال، احتمالاً نقش مهمی در هموستازی میتوکندری مغز و حفاظت نرونی داشته باشد.

### سیاسگزاری

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی جهت حمایت مالی این پروژه، آقای دکتر وزیری از انستیتو پاستور ایران جهت راهنمایی‌های ارزنده در قسمت مولکولی و آقای دکتر سجاد سالاری که در استخراج لیپید مورد نیاز همکاری داشتند، تشکر بعمل می‌آید.

[۱۰، ۷۵]. به طوری که این کانالهای پتاسیمی متابولیسم میتوکندری را از طریق تنظیم حجم ماتریکس میتوکندری [۲۶] و اثر مستقیم ورود کلسیم و تولید گونه‌های اکسیژن واکنش دار تنظیم می‌نمایند [۲۶، ۳۷].

در تحقیق حاضر به دنبال الحاق وزیکول غشاء داخلی میتوکندری جدا شده از مغز موش صحرائی به داخل غشاء دو لایه لیپیدی فسفاتیدیل کولین، کانال کاتیونی مشاهده شد که متعلق به خانواده کانالهای پتاسیمی  $K_{ATP}$  و وابسته به ولتاژ می‌باشد که احتمالاً زیر واحدهای تشکیل دهنده آن Kir6.1 و SUR2B می‌باشد. کانال دارای کنداکتانس 143 pS، وابسته به ولتاژ که توسط داروهای TEA، 4-AP، ATP و گلی

conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 9017-22.

[9] Brustovetsky T, Shalbuyeva N, Brustovetsky N Lack of manifestation of diazoxide/5-hydroxydecanoate-sensitive  $K_{ATP}$  channel in rat brain nonsynaptosomal mitochondria. *J Physiol* 568 (2005) 47-59.

[10] Busija DW, Gaspar T, Domoki F, Katakam PV, Bari F, Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2008) 1471-7.

[11] Busija DW, Katakam P, Rajapakse NC, Kis B, Grover G, Domoki F, Bari F, Effects of ATP-sensitive potassium channel activators diazoxide and BMS-191095 on membrane potential and reactive oxygen species production in isolated piglet mitochondria. *Brain Res Bull* 66 (2005) 85-90.

[12] Cancherini DV, Trabuco LG, Reboucas NA, Kowaltowski AJ, ATPsensitive  $K^+$  channels in renal mitochondria. *Am J Physiol Renal Physiol* 285 (2003) 1291-6.

[13] Chen FR, Zhang N, Liu P, Zhang YY, Han XH, Cai JF, Effects of Guanxinkang on expressions of ATP-sensitive potassium channel subunits Kir6.1, Kir6.2, SUR2A and SUR2B in ischemic myocytes of rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 8 (2010) 458-64.

[14] Choma K, Bednarczyk P, Koszela-Piotrowska I,

## References

- [1] Akrouh A, Halcomb SE, Nichols CG, Sala-Rabanal M, Molecular biology of  $K(ATP)$  channels and implications for health and disease. *IUBMB Life* 61 (2009) 971-8.
- [2] Ashley, RH, Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins. *Mol Membr Biol* 20 (2003) 1-11.
- [3] Ashrafpour M, Eliassi A, Sauve R, Sepehri H, Saghiri R, ATP regulation of a large conductance voltage-gated cation channel in rough endoplasmic reticulum of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 471 (2008) 50-6.
- [4] Averaimo S, Milton RH, Duchen MR, Mazzanti M Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): sensor and effector during oxidative stress. *FEBS Lett* 584 (2010) 2076-84.
- [5] Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, and Paucek P, Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* 276 (2001) 33369-74.
- [6] Bednarczyk P, Barker GD, Halestrap AP, Determination of the rate of  $K^+$  movement through potassium channels in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1777 (2008) 540-8.
- [7] Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A, New properties of mitochondrial ATP-regulated potassium channels. *J Bioenerg Biomembr* 40 (2008b) 325-35.
- [8] Brelidze TI, Niu X, Magleby KL, A ring of eight

- Kulawiak B, Kudin A, Kunz W, Dolowy K, Szewczyk A, Single channel studies of the ATP-regulated potassium channel in brain mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 41 (2009) 323-34.
- [15] Cole WC, Clement-Chomienne O, ATP-sensitive  $K^+$  channels of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14 (2003) 94-103.
- [16] 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) 41566-71.
- [17] Dahlem YA, Horn TF, Buntinas L, Gonoï T, Wolf G, Siemen D, The human mitochondrial  $K_{ATP}$  channel is modulated by calcium and nitric oxide: a patch clamp approach. *Biochim Biophys Acta* 1656 (2004) 46-56.
- [18] Davies LM, Purves GI, Barrett-Jolley R, Dart C. Interaction with caveolin-1 modulates vascular ATP-sensitive potassium ( $K_{ATP}$ ) channel activity. *J physiol* 588 (2010) 3255-66.
- [19] Debska G, Kicinska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS, Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1556 (2002) 97-105.
- [20] De Marchi U, Sassi N, Fioretti B, Catacuzzeno L, Cereghetti GM, Szabo I, Zoratti M, Intermediate conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel (KCa3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells. *Cell Calcium* 45 (2009) 509-516.
- [21] Edwards JC, Kahl CR, Chloride channels of intracellular membranes. *FEBS Lett* 584 (2010) 2102-11.
- [22] Fahanik-Babaei J, Eliassi A, Jafari A, Sauve R, Salari S, Saghiri R, Electro-pharmacological profile of a mitochondrial inner membrane big-potassium channel from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1808 (2011) 454-60.
- [23] Fahanik-Babaei J, Eliassi A, Saghiri R, How many types of large conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channels exist in brain mitochondrial inner membrane: evidence for a new mitochondrial large conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel in brain mitochondria. *Neuroscience* 199 (2011) 125-32.
- [24] Foster DB, Rucker JJ, Marban E, Is Kir6.1 a subunit of  $mitoK_{ATP}$ . *Biochem Biophys Res Commun* 366 (2008) 649-656.
- [25] Ng KE, Schwarzer S, Duchen MR, Tinker A, The intracellular localization and function of the ATP-sensitive  $K^+$  channel subunit Kir6.1. *J Membr Biol* 234 (2010) 137-47.
- [26] Halestrap AP, Regulation of mitochondrial metabolism through changes in matrix volume. *Biochem Soc Trans* 22 (1994) 522-9.
- [27] Hirano J, Nakamura K, Kubokawa M, Properties of a  $Ca^{2+}$ -activated large conductance  $K^+$  channel with ATP sensitivity in human renal proximal tubule cells. *Jpn J Physiol* 51 (2001) 481-9.
- [28] Hoppe UC, Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett* 584 (2010) 1975-81.
- [29] Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T, ATP-sensitive  $K^+$  channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352 (1991) 244-7.
- [30] Jaburek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD, State-dependent inhibition of the mitochondrial  $K_{ATP}$  channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate, *J Biol Chem* 273 (1998) 13578-13582.
- [31] Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R, Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417 (2002) 515-22.
- [32] Jiang MT, Ljubkovic M, Nakae Y, Shi Y, Kwok W-M, Stowe DF, Bosnjak ZJ, Characterization of human cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel and its regulation by phorbol ester in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (2006) 1770-76.
- [33] Kicinska A, Swida A, Bednarczyk P, Koszela-Piotrowska I, Choma K, Dolowy K, Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, ATP-sensitive potassium channel in mitochondria of the eukaryotic microorganism *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 282 (2007) 17433-17441.
- [34] Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS, Physiological roles of  $K^+$  channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* 44 (2008) 65-81.
- [35] Korge P, Honda HM, Weiss JN, Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 3312-17.
- [36] Kudin AP, Yaw BN, Bimpong B, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS, Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279 (2004) 4127-4135.
- [37] Kulawiak B, Bednarczyk P, Reconstitution of brain

- mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer. *Acta Neurobiol Exp* 65 (2005) 271-6.
- [38] Kupsch K, Parvez S, Siemen D, Wolf G, Modulation of the permeability transition pore by inhibition of the mitochondrial K(ATP) channel in liver vs brain mitochondria. *J Membr Biol* 215 (2007) 69-74.
- [39] Ichinose M, Yonemochi H, Sato T, Saikawa T, Diazoxide triggers cardioprotection against apoptosis induced by oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (2003) 2235-41
- [40] Lacza Z, Snipes JA, Kis B, Szabo C, Grover G, Busija DW, Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in the brain. *Brain Res* 994 (2003) 27-36.
- [41] Lacza Z, Snipes JA, Miller AW, Szabo C, Grover G, Busija DW, Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. *J Mol Cell Cardiol* 35 (2003) 1339-47.
- [42] Liang HW, Xia Q, Bruce IC, Reactive oxygen species mediate the neuroprotection conferred by a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener during ischemia in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 1042 (2005) 169-175.
- [43] Malinska D, Mirandola SR, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. *FEBS Lett* 584 (2010) 2043-48.
- [44] Marty A, Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291 (1981) 497-500.
- [45] Muller P, Donald O, Rudin B, Tien H, westcott w C, Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Circulation* 26 (1962) 1166-71.
- [46] Mayorga-Wark O, Dubinsky WP, Schultz SG, Reconstitution of a K<sub>ATP</sub> channel from basolateral membranes of Necturus enterocytes. *Am J Physiol* 269 (1995) 464-71.
- [47] Nichols CG, K<sub>ATP</sub> channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440 (2006) 470-6.
- [48] Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A, Potassium channel openers protect cardiac mitochondrial by attenuating oxidant stress at reoxygenation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282 (2002) 531-9.
- [49] Pallotta BS, N-bromoacetamide removes a calcium-dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channels in rat skeletal muscle. *J Gen Physiol* 86 (1985) 601-11.
- [50] Peixoto PM, Ryu SY, Kinnally KW, Mitochondrial ion channels as therapeutic targets. *FEBS Lett* 584 (2010) 2142-52.
- [51] Rusznak Z, Bakondi G, Kosztka L, Pocsai K, Diens B, Fodor J, Telek A, Gomczi M, Szucs G, Csernoch L, Mitochondrial xpression of the two-pore domain TASK-3 channels in malignantly transformed and nonmalignant human cells. *Virchows Arch* 452 (2008) 415-26.
- [52] Sato T, Li Y, Saito T, Nakaya H, Minoxidil opens mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels and confers cardioprotection. *Br J Pharmacol* 141 (2004) 360-66.
- [53] Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H, Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: A mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 111 (2005) 198-203.
- [54] Scholz A, Gruss M, Vogel W, Properties and functions of calcium-activated K<sup>+</sup> channels in small neurones of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *J Physiol* 513 (1998) 55-69.
- [55] Sepehri H, Eliassi A, Sauvé R, Ashrafpour M, Saghiri R, Evidence for a large conductance voltage gated cationic channel in rough endoplasmic reticulum of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 457 (2007) 35-40.
- [56] Shimizu K, Lacza Z, Rajapakse N, Horiguchi T, Snipes J, Busija DW, Mito (ATP) opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (2002) 1005-1011.
- [57] Siemen D LC, Borecky J, Gulbins E, Lang F, Ca<sup>2+</sup>-Activated K Channel of the BK-Type in the Inner Mitochondrial Membrane of a Human Glioma Cell Line. *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1999) 549-554.
- [58] Singh H, Hudman D, Lawrence CL, Rainbow RD, Lodwick D, Norm RI Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35 (2003) 433-435.
- [59] Singleton WS, Gray MS, Chromatographically homogenous lecithin from egg phospholipids. *J Am Oil Chem Soc* 24 (1965) 53-63.

- [60] Skalska J, Bednarczyk P, Piwonska M, Kulawiak B, Wilczynski G, Dolowy K, Kudin AP, Kunz WS, Szewczyk A, Calcium ions regulate K uptake into brain mitochondria: the evidence for a novel potassium channel. *Int J Mol Sci* 10 (2009) 1104-1120.
- [61] Song X, Su W, Chen L, Ji JJ, Functional expression of large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels in lateral globus pallidus neurons. *Neuroscienc* 169 (2010) 1548-56.
- [62] Su W, Song X, Ji JJ, Functional expression of a large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in mouse substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. *Neurosci lett* 471 (2010) 1-5.
- [63] Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaji N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K, Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 241(1997) 693-7.
- [64] Szabo I, Bock J, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, Zoratti M, Gulbins E, Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 14861-66.
- [65] Szabo I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E, A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *J Biol Chem* 280 (2005) 12790- 12798.
- [66] Szewczyk A, Just W, Intracellular ion channels. *FEBS Lett* 584 (2010) 1941-48
- [67] Szewczyk A, The intracellular potassium and chloride channels: properties, pharmacology and function (review). *Mol Membr Biol* 15 (1998) 49-58.
- [68] Szewczyk A, Jarmuszkiewicz W, Kunz WS, Mitochondrial potassium channels. *IUBMB Life* 61 (2009) 134-143.
- [69] Szewczyk A, Mikołajek B, Pikula S, Nalecz M, Potassium channel openers induce mitochondrial matrix volume changes via activation of ATP-sensitive K channel. *Pol J Pharmacol* 45 (1993) 437-443.
- [70] Terzic A, Kurachi Y, Actin microfilament disrupters enhance K (ATP) channel opening in patches from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 492 (1996) 395-404.
- [71] Teshima T, Akao M, Baumgartner WA, Marban E, Nicorandil prevents oxidative stress-induced apoptosis in neurons by activating mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Brain Res* 990 (2003) 45-50.
- [72] Thévenod F, Ion channels in secretory granules of the pancreas and their role in exocytosis and release of secretory proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 283 (2002) 651-672.
- [73] Thompson RJ, Nordeen MH, Howell KE, Caldwell JH, A large-conductance anion channel of the Golgi complex. *Biophys J* 83(2002) 278-289.
- [74] Tricarico D, Mele A, Lundquist AL, Desai RR, George AL Jr, Conte Camerino D, Hybrid assemblies of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels determine their muscle-type-dependent biophysical and pharmacological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 1118-23.
- [75] Watanabe M, Katsura K, Ohsawa I, Mizukoshi G, Takahashi K, Asoh S, Involvement of mitoKATP channel in protective mechanisms of cerebral ischemic tolerance. *Brain Res* 1238 (2008) 199-207.
- [76] Wolfgang F, Graier M, Frieden M, Malli R, Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch* 455 (2007) 375-396.
- [77] Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL, Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 89 (2001) 1177-1183.
- [78] Zingman LV, Alekseev AE, Hodgson-Zingman DM, Terzic A, ATP-sensitive potassium channels: metabolic sensing and cardioprotection. *J Appl Physiol* 103 (5) (2007) 1888-93.
- [79] Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, Sakabe K, Anzai M, Izumida I, Inoue T, Kawahara K, Abe H, Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/uK(ATP)-1) in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 74 (1999) 15-25.