

تحقیقی

ویژگی‌های فعالیت تک کانال کاتیونی شبکه آندوپلاسمی هپاتوسیت موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین

دکتر منوچهر اشرف پور*^۱، دکتر حمید سپهری^۲، دکتر افسانه الیاسی^۳، دکتر رضا صغیری^۴، جواد فحانیک بابایی^۵

۱- استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۲- استادیار گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، ۳- استادیار گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۴- استادیار گروه بوشیمی، انستیتو پاستور ایران، ۵- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

چکیده

زمینه و هدف: نقش کانال‌های یونی به‌طور فزاینده‌ای در پاتوژنز بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است و در این میان کانال‌های کاتیونی اهمیت ویژه‌ای دارند. دیابت ملیتوس بیماری شایعی است که ایجاد آن را به اختلال عملکرد کانال‌های یونی نسبت داده‌اند؛ ولی مشخص نیست که در دیابت چه تغییری در کانال‌های یونی ارگانل‌های داخل سلولی اتفاق می‌افتد. این مطالعه به منظور ارزیابی ویژگی‌های فعالیت تک‌کانال کاتیونی شبکه آندوپلاسمی هپاتوسیت موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی با استفاده از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 190 ± 10 گرم در دو گروه کنترل و دیابتی انجام شد. موش‌ها با تزریق یک دوز 65 mg/kg استرپتوزوسین (STZ) داخل صفاقی دیابتی شدند. استخراج وزیکول‌های شبکه آندوپلاسمی از طریق خارج کردن کبد موش صحرایی و هموژنیزه نمودن آن و سپس با انجام مراحل مختلف اولتراسانتریفیوژ صورت گرفت. غشاء دو لایه لیپیدی با استفاده از فسفاتیدیل کولین و بر روی منفذی به قطر 250 میکرومتر که بین دو محفظه *cis* و *trans* قرار داشت؛ تشکیل شد. الحاق وزیکول‌های RER در BLM با سوزن دندانپزشکی و با لمس ملایم و ظریف غشاء انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل برخی از ویژگی‌های الکتروفیزیولوژیک فعالیت کانال از نرم‌افزار PClamp9 و آزمون آماری من‌ویتنی استفاده گردید.

یافته‌ها: در گروه دیابتی دامنه جریانات عبوری از کانال در ولتاژهای بالاتر از $+30$ میلی‌ولت در مقایسه با گروه کنترل تغییر آماری معنی‌داری پیدا نکرد؛ اما احتمال بازبودن کانال (Po) در این گروه به‌طور قابل توجهی کاهش یافت ($P < 0/05$). تغییر شدیدتر فعالیت کانال مورد مطالعه در ولتاژهای پایین‌تر از پتانسیل معکوس دیده شد و علاوه بر افزایش آماری معنی‌دار Po کانال ($P < 0/05$)، دامنه جریان کانال نیز به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($P < 0/05$). میانگین دامنه جریان و احتمال باز بودن کانال در ولتاژ $+40$ میلی‌ولت در گروه کنترل به‌ترتیب $17 \pm 2/14$ پیکوآمپر و $0/68 \pm 0/01$ که در گروه دیابتی به $18/5 \pm 2/5$ و $0/26 \pm 0/03$ ($P < 0/05$) رسید؛ ولی در ولتاژ -10 میلی‌ولت متوسط دامنه جریان و Po کانال در گروه کنترل به‌ترتیب $22/3 \pm 2/14$ پیکوآمپر و $0/1$ بود که در گروه دیابتی این مقادیر $13/1 \pm 0/08$ و $0/62 \pm 0/03$ تعیین شد.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که کانال کاتیونی RER در تغییرات متابولیکی ناشی از دیابت قندی دچار تغییرات می‌شود و احتمالاً دیابت از طریق ایجاد استرس‌های متابولیسمی سبب تغییر رفتار و نحوه باز و بسته شدن کانال کاتیونی RER می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: شبکه آندوپلاسمی، کانال کاتیونی، ثبت از تک کانال، غشا دو لایه لیپیدی، دیابت ملیتوس

* نویسنده مسئول: دکتر منوچهر اشرف پور، پست الکترونیکی mnrashrafpour@yahoo.com

نشانی: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، تلفن ۰۵-۲۲۲۹۵۹۱-۲۲۲۹۹۳۶، نامبر ۲۲۲۹۹۳۶

وصول مقاله: ۸۹/۱۰/۲۰، اصلاح نهایی: ۹۰/۲/۳، پذیرش مقاله: ۹۰/۲/۶

مقدمه

کانال‌های پتاسیمی گروه متنوعی از کانال‌های یونی هستند که در کنترل طیفی از اعمال فیزیولوژیکی نظیر پاسخ‌های سلولی به استرس‌های متابولیکی مشارکت دارند (۲۰۱). اختلالات کانال‌های یونی با پاتوژنز انواعی از بیماری‌ها از جمله دیابت ملیتوس (۳ و ۴) مرتبط هستند. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که جریان‌های یونی عبوری از کانال‌های یونی در دیابت تغییر می‌یابند (۷-۵). علاوه بر تاثیر اختلالات کانال‌های یونی بر ایجاد دیابت، مطالعات الکتروفیزیولوژیکی نشان داده‌اند که جریان‌های یونی به‌ویژه جریان‌های کانال‌های پتاسیمی به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر فرآیند پاتوفیزیولوژیکی دیابت ملیتوس قرار می‌گیرند (۸ و ۹). اختلال عملی کانال‌های پتاسیمی ولتاژی و کانال KCa و نیز کانال پتاسیمی حساس به ATP در دیابت گزارش شده است (۳ و ۱۰ و ۱۱).

نتایج مطالعات نشان داده‌اند که عمل ارگانل‌ها در دیابت کاهش می‌یابد (۲). نوعی ارتباط میان عملکرد ارگانل‌ها و دیابت وجود دارد و نقایص ارگانل‌هایی مانند ER (۲۰۶ و ۱۳) خطر ایجاد دیابت ملیتوس را افزایش می‌دهد. براساس مطالعه Shoshan-Barmatz و Israelson بین سیتوزول، ER و میتوکنندری رابطه عملی متقابلی وجود دارد که ممکن است مسیرهای مهمی برای اعمال سلولی مانند کنترل هومئوستاز کلسیم و ایجاد دیابت باشند (۱۴). شواهد فزاینده‌ای ارائه شده‌اند که بر نقش استرس شبکه آندوپلاسمی در پاتوژنز دیابت ملیتوس دلالت می‌نمایند و مسیرهای پیام‌رسانی اولیه در گیر در پاتوژنز دیابت ملیتوس احتمالاً از استرس شبکه آندوپلاسمی، اختلال میتوکنندری و تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) آغاز می‌شوند (۱۲ و ۱۳). ER ارگانل مهمی است که در اعمال متعددی مانند هومئوستاز کلسیم دخالت دارد (۲) و تنظیم کلسیم سلولی عمل شناخته شده مهم ER است که نقش برجسته‌ای در آپوپتوز سلولی ایفا می‌کند (۱۵).

اگرچه تحقیقات زیادی تغییر فعالیت کانال‌های یونی در دیابت را نشان داده‌اند (۱۱-۷)؛ ولی تاثیر دیابت بر جریان‌ها و فعالیت کانال‌های غشاهای داخل سلولی تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در مطالعات قبلی وجود نوعی کانال پتاسیمی با کنداکتانس بالا که توسط نوکلئوتیدها و 4-AP

مهار می‌شود؛ در غشاء Rough Endoplasmic Reticulum (RER) هپاتوسیت‌های موش صحرایی گزارش شدند (۱۶ و ۱۷). مدل دیابت ناشی از استرپتوزوسین اطلاعات زیادی از تغییرات فعالیت کانال‌های یونی به‌ویژه توسط دیابت به‌دست می‌دهد (۱۸). این مطالعه به منظور تعیین فعالیت کانال کاتیونی RER هپاتوسیت موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی با استفاده از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 190 ± 10 گرم در مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال ۱۳۸۸ انجام شد. موش‌ها در دو گروه کنترل و دیابتی قرار گرفتند. موش‌ها از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. حیوانات در شرایط محیطی مناسب ($22 \pm 0.5^\circ\text{C}$) و ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی نگهداری شدند و ۲۴ ساعت قبل از خارج کردن کبد، ناشتا بودند. استانداردها و موازین اخلاقی مربوط به مراقبت و کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

ایجاد دیابت

برای این منظور به موش‌های با وزن حدود ۱۸۰ گرم یک دوز 65 mg/kg استرپتوزوسین داخل صفاقی تزریق گردید (۲۱). سپس یک هفته بعد از تزریق و با حصول اطمینان از ایجاد دیابت از طریق اندازه‌گیری قندخون، موش‌ها برای استخراج شبکه آندوپلاسمی مورد استفاده قرار گرفتند. قندخون ناشتا بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر خون مبنای دیابتی شدن حیوان در نظر گرفته شد (۲۱). موش‌های گروه دیابتی علاوه بر قندخون بالا علائم و شواهد تیپیک دیابت مانند پلی‌اور، پرنوشی و کاهش وزن را نیز نشان دادند.

استخراج لیپید

L-آلفا-فسفاتیدیل کولین (L-لسیتین) با استفاده از پروتکل Singleton از زرده تخم‌مرغ تازه استخراج گردید (۱۹). KCl، Tris، HEPES و سوکروز از شرکت سیگما و n-decane از شرکت مرک خریداری شدند. از آب مقطر دیونیزه برای آماده کردن کلیه محلول‌ها استفاده شد.

جریانات تک کانال در ولتاژهای مختلف صورت گرفت. در تجزیه و تحلیل نهایی ثبت‌ها با فیلتر نرم‌افزاری ۴۰۰-۲۰۰ Hz فیلتر شدند. نسبت نفوذپذیری کانال مورد مطالعه برای یون‌های پتاسیم و کلر (P_k/P_{Cl}) با استفاده از معادله گلدمن-هوچکین-کاتز (GHK) محاسبه گردید (۲۱). تجزیه و تحلیل منحنی‌های ثبت فعالیت کانال، با استفاده از نرم‌افزار Pclamp9 شرکت Axon و بعد از فیلتر نرم‌افزاری ۴۰۰-۲۰۰ Hz انجام شد. نتایج به صورت $Mean \pm SD$ بیان گردید.

برای مقایسه تغییرات مقادیر دو گروه کنترل و دیابتی از آزمون آماری غیرپارامتریک Mann-Whitney استفاده شد و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

در حضور محلول کلرید پتاسیم ۲۰۰ و ۵۰ میلی‌مولار نواحی سیس و ترانس، کانال کاتیونی مورد مطالعه براساس رابطه نرنست از پتانسیل معکوس معادل ۳۰+ میلی‌ولت برخوردار بود. مطابق معادله گلدمن-هوچکین-کاتز نسبت نفوذپذیری پتاسیم/کلر (P_k/P_{Cl}) ۱۵/۱ بود که معرف نفوذپذیری بالای کانال مورد مطالعه نسبت به پتاسیم می‌باشد. با توجه به پتانسیل معکوس کانال که نزدیک به پتانسیل تعادلی پتاسیم قرار دارد و نیز نسبت نفوذپذیری بالا کانال به پتاسیم می‌توان گفت جریانات یونی ثبت شده در این مطالعه ناشی از جریان پتاسیمی است. در طی تحقیق علاوه بر کانال کاتیونی نوعی کانال کلری نیز به دست آمد که رفتار و مشخصات بیوفیزیکی کاملاً متمایزی از کانال پتاسیمی داشت.

شکل یک منحنی‌های ثبت فعالیت کانال کاتیونی RER در پتانسیل‌های مختلف از ۲۰- تا ۵۰+ میلی‌ولت را در گروه کنترل (شکل 1A) و گروهی که با STZ دیابتی شده بودند (شکل 1B) نشان می‌دهد. همانطور که در شکل دیده می‌شود؛ پتانسیل معکوس فعالیت کانال در هر دو گروه ولتاژ +30 mV بود.

شکل ۲ نمودار ستونی متوسط دامنه جریان و متوسط احتمال بازبودن کانال (P_o) را در ولتاژهای مختلف برای دو گروه مورد مطالعه نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل‌ها دیده می‌شود؛ ویژگی‌های فعالیت کانال کاتیونی ER

جداسازی RER

برای استخراج ER ابتدا موش‌ها با استفاده از اتر بیهوش شدند و بعد از خارج کردن کبد استخراج میکروزم‌ها با روش Kan و از طریق هموژنیزاسیون و اولتراسانتریفیوژ در مراحل مختلف انجام گرفت (۲۰). وزیکول‌ها در محلول بافر حاوی سوکروز ۲۵۰ mM و ایمیدازول ۳ mM حل شد و در میکروتیوب‌های ۱۰ میکرولیتر و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تشکیل BLM (Bilayer Lipid Membrane) و الحاق وزیکول‌ها

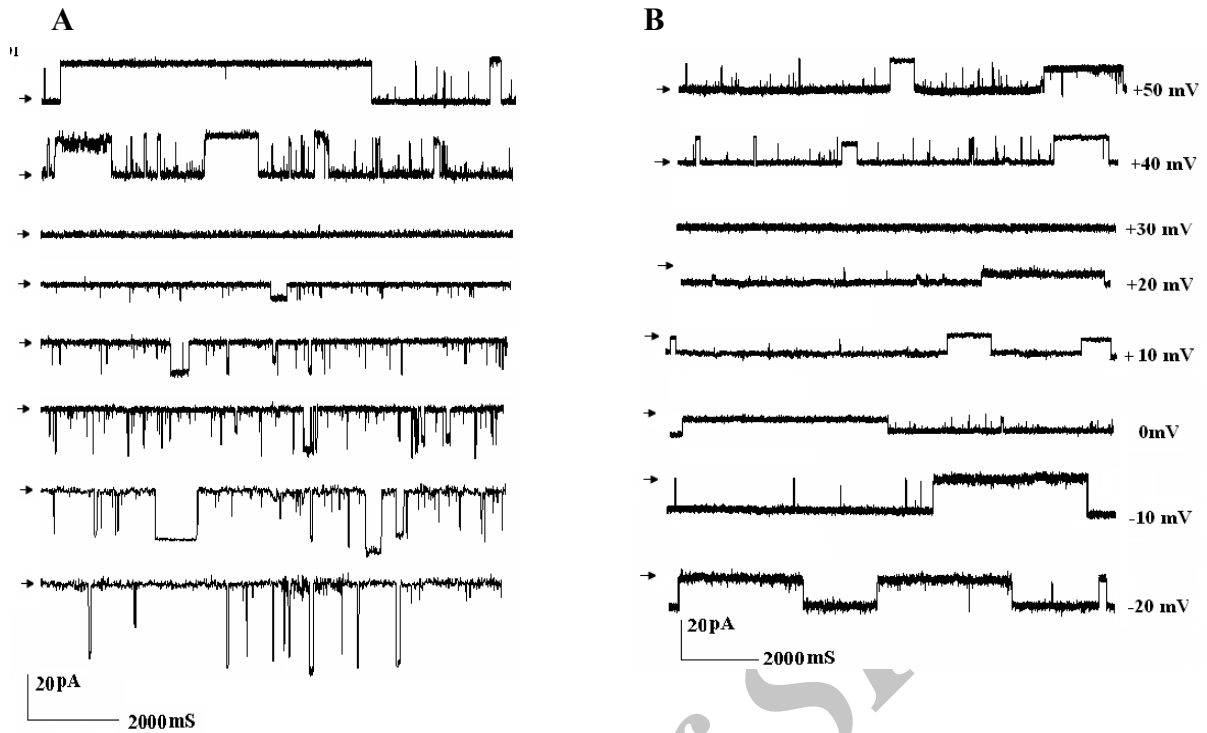
غشاء دولایه لیپیدی با استفاده از فسفاتیدیل کولین غلظت ۲۵mg/mL در n-دکان و در دمای اتاق بر روی منفذ $250 \mu\text{M}$ حدفواصل ناحیه سیس و ترانس محفظه BLM به روش painting تشکیل شد (۱۴). محفظه‌های سیس و ترانس به ترتیب حاوی ۵ و ۳ میلی‌لیتر کلرید پتاسیم غلظت ۲۰۰ و ۵۰ میلی‌مولار بودند. pH محلول با Tris-HEPES در حد ۷/۴ تنظیم شد. ظرفیت خازنی غشاها ۲۰۰-۴۰۰ پیکوفاراد بود. الحاق وزیکول‌های ER در غشاء با استفاده از لمس ملایم غشاء با سوزن قطر ۱۵۰ میکرومتر صورت گرفت. تشکیل و ضخامت غشاء به‌طور الکتریکی از طریق اسیلوسکوپ کنترل گردید.

برای ترسیم منحنی ولتاژ-احتمال باز بودن کانال، نقاط آن با استفاده از معادله زیر، ($Zd=3/47$) فیت گردید.

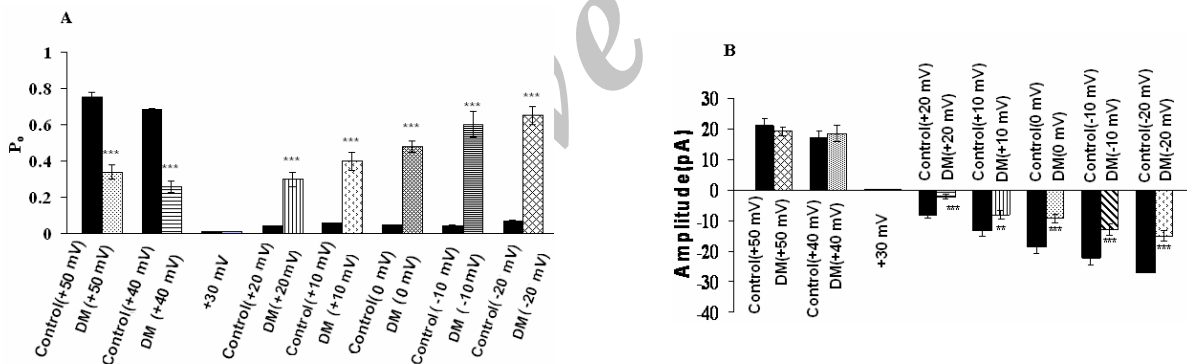
$$P_o = V_{\min} + \frac{V_{\max} - V_{\min}}{1 + e^{\frac{ZdF(V - V_{mid})}{RT}}} \quad \text{Boltzman } -Z \text{ delta}$$

ثبت فعالیت کانال و آنالیز آماری

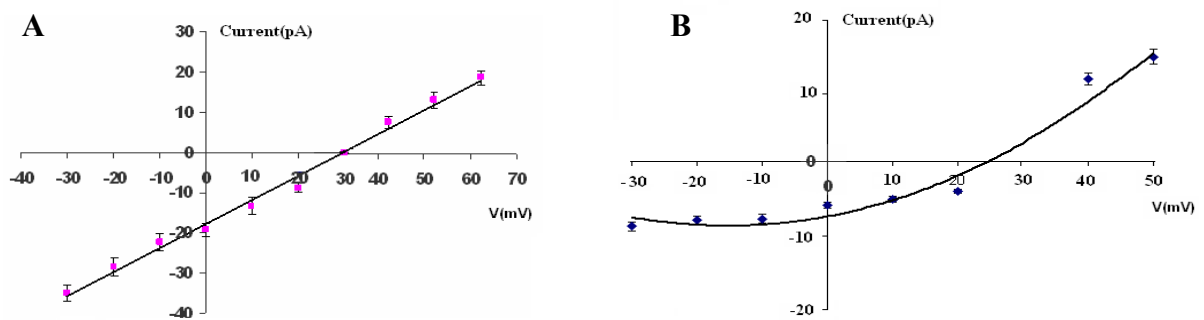
از امپلی فایر مدل BC-525A شرکت وارنر (ساخت آمریکا) برای ثبت جریانات تک کانال استفاده شد. ولتاژ به محفظه ترانس اعمال و محفظه سیس به‌عنوان ناحیه مرجع در نظر گرفته شد. محفظه‌های سیس و ترانس با الکترودهای Ag/AgCl و محلول آگار در کلرید پتاسیم ۳ مولار به head stage امپلی فایر منتقل شدند. سیگنال‌های خروجی از امپلی فایر با فیلتر پائین گذر 8-pole Bessel یک کیلوهرتز فیلتر گردید. جریانات با دامنه نمونه‌گیری ۱۰ KHZ دریافت و با کامپیوتر مجهز به Digidata 1200 AD/DA ذخیره شد. ثبت



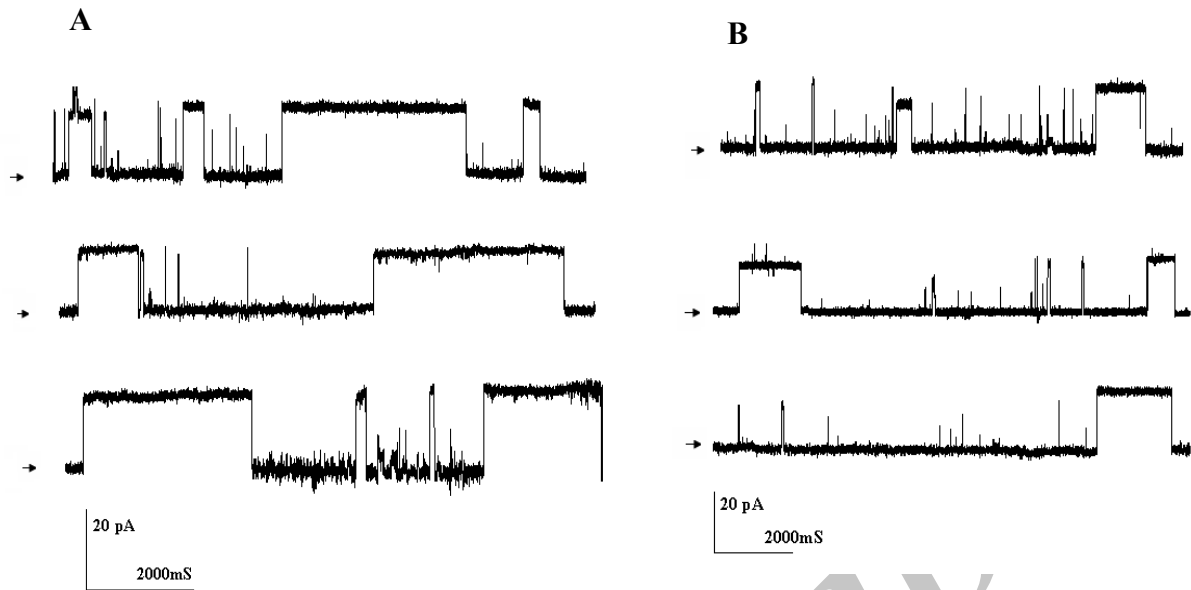
شکل ۱: ثبت از کانال کاتیونی شبکه آندوپلاسمی در ولتاژهای مختلف در گروه کنترل (1A) و گروه دیابتی شده با STZ (1B)، محیط حاوی $KCl\ 200\ mM\ cis/50\ mM\ trans$. وضعیت بسته کانال را نشان می‌دهد.



شکل ۲: مقایسه میانگین P_o (A) و دامنه جریان (B) کانال کاتیونی ER در موش‌های کنترل و موش‌های دیابتی شده با STZ



شکل ۳: منحنی جریان-ولتاژ کانال کاتیونی RER برای گروه کنترل (3A) و گروه دیابتی (3B) در محیط $KCl\ 200\ mM\ cis/50\ mM\ trans$. نقاط به صورت $Mean \pm SD$ نمایش داده شدند ($n=8$).



شکل ۵: سه نمونه ثبت از کانال کاتیونی شبکه آندوپلاسمی در ولتاژ $+40\text{ mV}$ در گروه کنترل (A) و گروهی که با STZ دیابتی شدند (B) محیط حاوی $200\text{ mM cis/50 mM trans KCl}$. → وضعیت بسته کانال را نشان می‌دهد.

که در کلیه ولتاژهای ثبت، دیابت حاصل از تزریق STZ سبب تغییر در رفتار کانال می‌گردد. در برخی ولتاژها که به‌طور طبیعی کانال دوره‌های باز بودن طولانی‌تری دارد؛ احتمال بازبودن کانال تحت تاثیر قرار گرفت و کاهش یافت؛ ولی متوسط دامنه جریان عبوری از کانال تغییر آماری معنی‌داری نشان نداد؛ اما در ولتاژهایی که به‌طور معمول کانال احتمال بازبودن کوتاه‌تری داشت؛ Po کانال افزایش آماری معنی‌داری نشان داد و متوسط دامنه جریان کانال نیز در این ولتاژها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین نتایج نشان می‌دهند که کیتیک باز و بسته شدن کانال در دیابت حاصل از استرپتوزوسین تغییر می‌یابد. این مسأله حاکی از آن است که دیابت در سطح مولکولی بر فعالیت کانال کاتیونی شبکه آندوپلاسمی تاثیر می‌گذارد. تغییر مذکور را ممکن است بتوان به تاثیر دیابت بر رفتار وابسته به ولتاژ پروتئین کانال نسبت داد و به‌نظر می‌رسد که مکانیسم و نحوه باز و بسته شدن وابسته به ولتاژ در اثر این نوع دیابت تغییر می‌یابد. به‌عبارت دیگر ممکن است دیابت ملیتوس مزودج شدن مولکولی میان حسگر ولتاژ و ناحیه تنظیم باز و بسته شدن کانال و یا اسیدهای آمینه موجود در دیواره لومن کانال را تغییر دهد. به این صورت که در ولتاژهای مثبت که کانال از Po بالایی برخوردار است؛ تعادل باز- بسته کانال به سمت حالت بسته و

rectification نشان می‌دهد.

در شکل ۴ منحنی رابطه احتمال باز بودن کانال به‌عنوان تابعی از ولتاژ دیده می‌شود و کانال کاتیونی غشاء شبکه آندوپلاسمی در گروه دیابتی، فعالیت وابسته به ولتاژ را نشان می‌دهد. به این ترتیب که در ولتاژهای کمتر از پتانسیل معکوس ($+20$ تا -20 میلی‌ولت) احتمال بازبودن کانال به‌ترتیب به‌طور قابل توجه افزایش نشان داد. در ولتاژ -20 میلی‌ولت مقدار Po کانال کاتیونی شبکه آندوپلاسمی به 0.7 ± 0.08 رسید. ولی در ولتاژهای $+40$ و $+50$ میلی‌ولت احتمال باز بودن کانال در مقایسه با گروه کنترل پائین بود.

منحنی ولتاژ- احتمال باز بودن کانال در شکل ۴ نشان داده شده است. در شکل ۵ نمونه‌هایی از منحنی‌های ثبت فعالیت کانال کاتیونی شبکه آندوپلاسمی در گروه کنترل و گروهی که با تزریق STZ (B) دیابتی شدند؛ در ولتاژ $+40$ میلی‌ولت نشان داده شده است. در حالی که دامنه جریان‌ات دو گروه تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد. احتمال باز بودن کانال در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.01$).

بحث

در این مطالعه آنالیز ثبت فعالیت کانال کاتیونی شبکه آندوپلاستیک هیپاتوسیت‌ها در گروه کنترل و دیابتی نشان داد

محصولات متابولیسم غیرطبیعی تغییرات اکسیداتیو پروتئین‌هاست که به تغییرات عمل پروتئین‌ها از جمله کانال‌های یونی و در نتیجه به تغییر عملکرد سلولی منجر خواهند شد (۲۴). رابطه دیابت و کانال‌های یونی می‌تواند دوطرفه باشد. بدین معنی که علاوه بر این که ایجاد دیابت می‌تواند ثانویه به اختلال کانال‌های یونی باشد؛ تغییرات متابولیسمی ناشی از دیابت نیز می‌توانند موجب تغییر فعالیت کانال‌های یونی گردند. Jovanovic و همکاران نشان دادند که قندخون بالا جریان یونی کانال K_{ATP} غشاء پلاسمایی سلول‌های عضلانی را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (۱۱). از آنجایی که برخی از کانال‌های پتاسیمی به‌صورت وابسته به شرایط ردوکس سلولی تنظیم می‌شوند (۲۴ و ۲۵)؛ لذا در این مطالعه تغییرات به‌دست آمده در فعالیت کانال پتاسیمی غشاء شبکه آندوپلاسمی موش‌هایی که با STZ دیابتی شده‌اند؛ می‌تواند با این اثرات دیابت مرتبط باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی ممکن است دیابت ملیتوس ناشی از STZ از طریق ایجاد تغییر در عمل پروتئین کانال و یا مختل ساختن متابولیسم طبیعی سلول‌ها و ایجاد متابولیت‌ها و رادیکال‌های آزاد سبب نقص در تنظیم فعالیت و در نتیجه تغییر مشخصات و رفتار باز و بسته شدن کانال پتاسیمی ER گردد و احتمالاً کانال مزبور در کنترل متابولیسم سلول و پیام‌رسانی‌های داخل سلولی درگیر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب (شماره ۴۹/ع/الف) مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی بود. بدین وسیله به خاطر حمایت مالی از آن مرکز سپاس خود را اعلام می‌نمایم.

References

- Gutterman D, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Apr;25(4):671-85.
- Kulawiak B, Kudin AP, Szewczyk A, Kunz WS. BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp Neurol.* 2008 Aug;212(2):543-7.
- Ashcroft FM. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):2047-58.
- Kass RS. The channelopathies: novel insights into molecular

در نتیجه کاهش Po سوق یابد و در ولتاژهای کمتر از پتانسیل معکوس، حالت باز غالب شده و با ایجاد دوره‌های بازبودن طولانی مقدار po افزایش یابد.

در مطالعه Proenza و Yellen روی کانال‌های یونی سلول‌های پیس‌میکری قلب، اختلال کانال یونی توانست سبب رفتار باز و بسته شدن غیرمعمول آن گردد (۲۱). در مطالعه Shimoni و Rattner روی فعالیت کانال پتاسیمی در دیابت حاصل از تزریق استرپتوزوسین، جریان یونی کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم در میوسیت‌های قلبی توسط دیابت ناشی از STZ نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۲). این یافته‌ها با نتایج ما مبنی بر کاهش دامنه جریان عبوری از کانال پتاسیمی ER در ولتاژهای کمتر از پتانسیل معکوس مطابقت دارند.

از دیدگاه دیگر، تغییرات فعالیت کانال کاتیونی مورد مطالعه در دیابت ملیتوس ممکن است؛ به اثر محصولات زائد متابولیسم غیرطبیعی ناشی از دیابت مربوط باشند. در این رابطه Gutterman و همکاران گزارش کردند که استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت سبب کاهش عملکرد کانال K_{ATP} می‌گردد (۱). استرس اکسیداتیو و در نتیجه تغییر شرایط ردوکس سلول سبب ایجاد تغییرات پاتولوژیک فعالیت کانال‌ها می‌شود (۲۳). اختلال متابولیسم گلوکز علت کلیدی تغییرات فعالیت کانال‌های پتاسیمی میوسیت‌های قلبی موش‌های دیابتی شده با STZ محسوب می‌شود (۲۴ و ۲۵). هیپرگلیسمی و نقص متابولیسم گلوکز ناشی از دیابت، محیط اکسیدشده‌تری در داخل سلول پدید آورده و موجب آسیب پروتئین‌های سلولی در طیفی از سلول‌ها گشته و از این طریق عمل کانال‌های پتاسیمی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲۶ و ۲۷). در دیابت ملیتوس پیامد اصلی و عمده تولید رادیکال‌های آزاد و

and genetic mechanisms of human disease. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):1986-9.

5. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Westcott WC. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature.* 1962 Jun; 194:979-80.

6. Nardai G, Korcsmáros T, Papp E, Csermely P. Reduction of the endoplasmic reticulum accompanies the oxidative damage of diabetes mellitus. *Biofactors.* 2003;17(1-4):259-67.

7. Schwanstecher C, Schwanstecher M. Nucleotide sensitivity of

- pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Dec;51 Suppl 3:S358-62.
8. Ito I, Hayashi Y, Kawai Y, Iwasaki M, Takada K, Kamibayashi T, Yamatodani A, Mashimo T. Diabetes mellitus reduces the antiarrhythmic effect of ion channel blockers. *Anesth Analg*. 2006 Sep;103(3):545-50.
9. Mokolke EA, Hu Q, Song M, Toro L, Reddy HK, Sturek M. Altered functional coupling of coronary K⁺ channels in diabetic dyslipidemic pigs is prevented by exercise. *J Appl Physiol*. 2003 Sep;95(3):1179-93.
10. Aguilar-Bryan L, Bryan J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev*. 1999 Apr;20(2):101-35.
11. Jovanović S, Jovanović A. High glucose regulates the activity of cardiac sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels via 1,3-bisphosphoglycerate: a novel link between cardiac membrane excitability and glucose metabolism. *Diabetes*. 2005 Feb;54(2):383-93.
12. Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 Nov;228(10):1213-7.
13. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2008 Feb;29(1):42-61.
14. Shoshan-Barmatz V, Israelson A. The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol*. 2005 Mar;204(2):57-66.
15. Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M. Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem*. 2003 Dec;278(52):52755-62.
16. 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*. 2008 Mar 1;471(1):50-6.
17. 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*. 2007 Jan 1;457(1):35-40.
18. Bouchard JF, Dumont EC, Lamontagne D. Modification of vasodilator response in streptozotocin-induced diabetic rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 1999 Dec;77(12):980-5.
19. Singleton W.S, Gray M.S. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J Am Oil Chem Soc*. 1965 Jan;42:53-6.
20. Kan FW, Jolicœur 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*. 1992 Jun 30;1107(2):331-41.
21. Proenza C, Yellen G. Distinct populations of HCN pacemaker channels produce voltage-dependent and voltage-independent currents. *J Gen Physiol*. 2006 Feb;127(2):183-90.
22. Shimoni Y, Rattner JB. Type 1 diabetes leads to cytoskeleton changes that are reflected in insulin action on rat cardiac K(+) currents. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Sep;281(3):E575-85.
23. Miedema H. Surface potentials and the calculated selectivity of ion channels. *Biophys J*. 2002 Jan; 82(1 Pt 1):156-9.
24. Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Mar;288(3):H1417-24.
25. Rozanski GJ, Xu Z. A metabolic mechanism for cardiac K⁺ channel remodeling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002 Jan-Feb; 29(1-2):132-7.
26. Bidasee KR, Nallani K, Besch HR Jr, Dincer UD. Streptozotocin-induced diabetes increases disulfide bond formation on cardiac ryanodine receptor (RyR2). *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jun;305(3):989-98.
27. de Cavanagh EM, Inserra F, Toblli J, Stella I, Fraga CG, Ferder L. Enalapril attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Hypertension*. 2001 Nov;38(5):1130-6.

Original Paper

Characteristics of hepatocyte rough endoplasmic reticulum single cationic channel in Streptozocin- induced diabetic Rats

Ashrafpour M (PhD)^{*1}, Sepehri H (PhD)², Eliassi A (PhD)³
Saghiri R (PhD)⁴, Fahanik Babaei J (MSc)⁵

¹Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Cellular and Molecular Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran. ²Assistant Professor, Department of Physiology, Neuroscience Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ³Assistant Professor, Neuroscience Research Center and Department of Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁴Assistant Professor, Department of Biochemistry, Pasteur Institute, Tehran, Iran. ⁵MSc in Biology, Neuroscience Research Center and Department of Physiology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: The role of ion channels and particularly cationic channels in the pathogenesis of various diseases are being considered carefully. The diabetes mellitus is a common disease which is initiated by ion channel disturbances. This study was done to determine the characteristics of hepatocyte rough endoplasmic reticulum single cationic channel in Streptozocin- induced diabetic rats.

Materials and Methods: This experimental study was done on 10 male adult Wistar rats and animals were randomly allocated into diabetic and control groups. Diabetes induced by STZ (65 mg/kg/bw) intraperitoneally. Rough endoplasmic reticulum vesicles were extracted following rat liver excision, homogenization and ultracentrifuging. The bilayer membrane formation was prepared by painting phosphatidylcholine on 250 μ M aperture in between Cis and Trans sides. The RER vesicles incorporation was performed through gentle and delicate touch of membrane using a dentistry needle. The Pclamp9 software was used for ion channel activity characteristic analysis.

Results: The cationic channel current amplitude did not change significantly in voltages more than +30 mV but their open probability (P_o) decreased in diabetic group ($P < 0.05$). More severe changes in channel activity were seen in potentials less than the reverse potential. In addition to significant increase of channel P_o ($P < 0.05$), also, the channel unitary currents were significantly decreased ($P < 0.05$). The mean current amplitude and channel open probability in voltage +40 mV were 17 ± 2.14 pA and 0.68 ± 0.01 in control group respectively, whereas, the values of these parameters reached to 18.5 ± 2.5 and 0.26 ± 0.03 , respectively. In voltage -10 mV, the values of mean current amplitude and P_o were -22.3 ± 2.14 pA and < 0.1 in control group, respectively but the values changed to -13.1 ± 0.08 and 0.62 ± 0.03 in diabetic group.

Conclusion: It seems that RER cationic channel is involved in metabolic changes which cause by diabetes mellitus and this disease can cause probably a channel gating kinetic and behavior change by inducing metabolic stresses.

Keywords: Endoplasmic Reticulum, Cationic Channel, Single Channel Recording, Bilayer Lipid Membrane, Diabetes mellitus

* Corresponding Author: Ashrafpour M (PhD), E-mail: mnrashrafpour@yahoo.com

Received 10 January 2011

Revised 23 April 2011

Accepted 26 April 2011

This paper should be cited as: Ashrafpour M, Sepehri H, Eliassi A, Saghiri R, Fahanik Babaei J. [Characteristics of hepatocyte rough endoplasmic reticulum single cationic channel in Streptozocin- induced diabetic Rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(1): 1-9. [Article in Persian]