Physiology and Pharmacology, 18 (3), 292-303
Autumn 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Cytoplasmic acidification reduces potassium channel activities in the endoplasmic reticulum of rat hepatocytes

Naser Khodaee[1], Maedeh Ghasemi[1,2], Javad Fahanik-Babaei[1], Reza Saghiri[3], Afsaneh Eliassi[1,2*]

1. Dept. of Physiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Neurobiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Evin, Tehran, Iran.
3. Dept. of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 20 May 2014 **Accepted: 8 Jul 2014**

Abstract

Introduction: Intracellular pH (pH_i) regulates essentially all aspects of cellular activities. However, it is unknown how endoplasmic reticulum (ER) potassium channels sense pH_i. In this study, we investigate the direct effects of pH_i on ER potassium channels.

Methods: We used channel incorporation into the bilayer lipid membrane method. L-α-phosphatidylcholine, a membrane lipid, was extracted from fresh egg yolk. Bilayer lipid membrane was formed in a 150 µm diameter hole. Rough endoplasmic reticulum vesicles were obtained from the liver after homogenization and several centrifugations. All single channel recordings were filtered at 1 kHz and stored at a sampling rate of 10 kHz for offline analysis by PClamp10. The purity of cell fractions was confirmed by western blot using specific markers of mitochondria, plasma membrane, endoplasmic reticulum, and Golgi. The pH was measured with a pH meter (0.001 unit accuracy). Statistical analysis was performed based on Markov noise free single channel analysis.

Results: Western blotting and antibodies directed against various cellular proteins revealed that ER fractions did not contain specific proteins of the other subcellular compartments. Single channel recordings revealed a 596 pS K^+ channel, which was inhibited by 2.5 mM ATP, 100 µM glibenclamide and 400 µM tolbutamide. No effect of increasing pH_i to 8.2 was found but decreasing pH_i to below about 6.7 produced a marked inhibition of channel activity, with complete block being observed at pH_i 6.2.

Conclusion: Our results indicate that intracellular acidification inhibits ER K^+ channel activities. The direct regulation of ER K^+ channels by pH_i has important implications for ER homeostasis.

Key words: Cytoplasmic pH, KATP channel, bilayer lipid membrane, endoplasmic reticulum, hepatocyte

* Corresponding author e-mail: af.eliassi@sbmu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (۳)، ۲۹۲ - ۳۰۳
پاییز ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

سیتوپلاسم اسیدی سبب کاهش فعالیت کانال پتاسیم استخراج شده از شبکه آندوپلاسمی هپاتوسیت های رت می گردد

ناصر خدایی[۱]، مائده قاسمی[۱،۲]، جواد فحانیک بابایی[۱]، رضا صغیری[۳]، افسانه الیاسی[۱،۲*]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران

دریافت: ۳۰ اردیبهشت ۹۳ پذیرش: ۱۷ تیر ۹۳

چکیده

مقدمه: اساساً pH داخل سلولی (pH_i) تمام فعالیت های سلول را تنظیم می کند. اما مشخص نیست که کانال پتاسیم شبکه آندوپلاسمی (ER) چگونه به pH_i پاسخ می دهد. در این مطالعه، اثر مستقیم pH_i بر کانال پتاسیم ER مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: در این مطالعه از روش الحاق کانال به داخل غشاء دو لایه لیپیدی استفاده گردید. لیپید فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ تازه استخراج گردید. غشاء بر روی منفذ ۱۵۰ µm تشکیل گردید. وزیکول های ER پس از هموژنیزه کردن و چند مرحله سانتریفوژ بدست آمد. تمام ثبت های بدست آمده از روش ثبت تک کانال با فرکانس ۱ kHz فیلتر شد و با سرعت ۱۰kHz نمونه برداری گردید و توسط نرم افزار PClamp10 آنالیز شد. از وسترن بلات برای تایید خلوص نمونه استخراج شده استفاده گردید. آنالیز آماری بر اساس آنالیز تک کانال عاری از نویز Markov انجام گردید.

یافته ها: آنتی بادی های استفاده شده در وسترن بلات نشان داد که نمونه‌های ER خالص بوده است. ثبت از کانال، حضور یک کانال پتاسیم با کنداکتانس ۵۹۶ pS را نشان داد که توسط ۲/۵ mM ATP، گلی بن کلامید ۱۰۰ µM و تولبوتامید ۴۰۰ µM مهار گردید. افزایش pH_i به ۸/۲ اثری بر فعالیت کانال نداشت. کاهش pH_i به ۶/۷ و ۶/۲ بترتیب باعث کاهش و مهار کامل فعالیت کانال گردید.

نتیجه گیری: اسیدی شدن داخل سلول فعالیت کانال پتاسیم ER را مهار می کند. احتمالاً تنظیم مستقیم فعالیت کانال پتاسیم ER توسط pH_i اهمیت زیادی جهت درک ما در فرایند هومئوستاز ER دارد.

واژه‌های کلیدی: pH سیتوپلاسمی، کانال K_{ATP}، غشاء دو لایه لیپیدی، شبکه آندوپلاسمی، هپاتوسیت

مقدمه

در غشاء پلاسمایی و غشاء ارگانل های سلول های تحریک پذیر و تحریک ناپذیر پروتئین های متعددی مانند کانال های یونی، ناقل ها، گیرنده ها و پمپ ها وجود دارند. این پروتئین ها تحت تاثیر تغییرات pH محیط خارج سلولی و سیتوپلاسمی قرار می گیرند. تغییرات pH می تواند تحریک پذیری و بدنبال آن پاسخ دهی این سلول ها (و ارگانل ها) را تحت تاثیر قرار بدهد [۲۸]. در حالت طبیعی مقدار pH مایع خارج سلولی در حدود ۷/۴ و سیتوپلاسم ۷/۲ می باشد. در شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک pH محیط داخل سلولی (pH_i) همانند pH مایع خارج سلولی تغییر می کند [۱۸، ۲۸، ۳۱، ۳۲، ۳۵، ۳۶، ۳۸]. کاهش pH_i می تواند فعالیت

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: af.eliassi@sbmu.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

کانال های یونی را تحت تاثیر قرار بدهد. در غشاء پلاسمایی بسیاری از سلول ها، فعالیت تعدادی از کانال های پتاسیم مانند کانال های پتاسیم یکسو کننده به داخل (Kir)، کانال پتاسیم حساس به کلسیم با کنداکتانس بالا(BK)، کانال های دو منفذی TASK-1 ، TASK-2 و TASK-3 [۱۱، ۲۲، ۳۹] و یک کانال پتاسیم در غشاء باکتری [۳۳] بوسیله pH مایع خارج و داخل سلولی تنظیم می شود. کانال پتاسیم حساس به ATP (K_{ATP}) در غشاء پلاسمایی سلول های بتا پانکراس، میوسیت قلب، عضله اسکلتی، عضله صاف و مغز بیان می شود [۴, ۱۳]. این کانال نقش مهمی در کنترل پتانسیل غشاء، تحریک پذیری سلول ها، کنترل تون بستر عروقی و ترشح انسولین ایفا می کند [۴]. فعالیت کانال K_{ATP} در غشاء پلاسمایی سلول ها علاوه بر ATP، ADP و فسفو لیپیدها، توسط pH_i نیز کنترل می شود [۹، ۳۰، ۳۸]. مطالعات انجام شده در عضله اسکلتی قورباغه [۹] ، غشاء بازولترال توبول پروگزیمال کلیه خرگوش [۲۳] ، سلول بتا پانکراس موش [۲۶]، عضله قلبی خوکچه هندی [۲۱] و در عضله اسکلتی موش [۱] نشان می دهد که کاهش pH_i از ۷/۲ تا ۵/۸ بسته به نوع بافت و گونه حیوان باعث کاهش یا مهار کامل فعالیت کانال K_{ATP} غشاء پلاسمایی می شود.

فعالیت وابسته به pH باعث می شود که کانال K_{ATP} غشاء پلاسمایی در بسیاری از اختلالات پاتوفیزیولوژیک برای کنترل تون بستر عروقی، ترشح انسولین، تحریک پذیری نرون ها نقش مهمی ایفا کند.

کانال K_{ATP} علاوه بر غشاء پلاسمایی، در غشاء ارگانل های داخل سلول مانند میتوکندری وجود دارد. حضور کانال K_{ATP} میتوکندریایی ($mitoK_{ATP}$) در غشاء داخلی میتوکندری کبد، قلب، مغز، کلیه، عضله اسکلتی، لنفوسیت T انسانی و آمیب تایید شده و بنظر می رسد که نقش حمایتی در برابر ایسکمی، کنترل حجم ماتریکس، پتانسیل غشاء میتوکندری، مصرف اکسیژن و بصورت غیر مستقیم در جذب کلسیم توسط میتوکندری نقش داشته باشد [۵، ۶]. اخیراً گزارش شده است که فعالیت $mitoK_{ATP}$ همانند کانال K_{ATP} غشاء پلاسمایی توسط pH سیتوپلاسمی تنظیم می شود. در این مطالعه مشخص شده است که کاهش pH سیتوپلاسم از ۷/۲ به ۶/۲ باعث کاهش کنداکتانس و احتمال باز بودن کانال K_{ATP} می شود و قلیایی کردن ماتریکس میتوکندری از ۷/۲ به ۸/۲ میزان باز بودن و کنداکتانس کانال را افزایش می دهد [۶]. در شرایط فیزیولوژیک ماتریکس میتوکندری pH قلیایی دارد. کاهش pH و مهار کانال K_{ATP} در شرایط ایسکمی باعث حمایت کاردیومیوسیت در برابر ایسکمی می شود [۶].

شبکه آندوپلاسمی (ER) به عنوان یک ارگانل مهم داخل سلولی، دارای نقش اساسی در ساخت و بلوغ پروتئین ها، سنتز فسفولیپیدها و ذخیره یون کلسیم مورد نیاز برای فرایندهای سیگنالی سلولی می باشد [۳، ۱۲، ۱۷]. جذب و رهایش کلسیم از ER نیاز به حفظ پتانسیل غشاء ER و دور نگه داشتن آن از پتانسیل تعادل نرست کلسیم دارد این عمل با ورود و خروج پتاسیم از طریق کانال های پتاسیمی انجام می گیرد [۲۰]. بنابراین، نقش کانال های پتاسیمی غشاء ER برای حفظ شرایط محیط داخلی ER و عملکرد صحیح آن مهم می باشد. مطالعات قبلی آزمایشگاه ما حضور سه نوع کانال پتاسیمی با کنداکتانس ۵۶۹، ۳۴۶ و ۲۱۱ پیکوسیمنس در غشاء ER هپاتوسیت رت را نشان داده است [۲۹]. اخیراً مطالعه در دو زمینه مولکولی و الکتروفیزیولوژی نشان داد که کانال پتاسیمی با کنداکتانس ۵۶۹ پیکوسیمنس فوق کانال K_{ATP} می باشد [۱۰]. بنظر می رسد این کانال در کنترل pH، حجم ارگانل، پتانسیل غشا و هومئوستاز یون کلسیم نقش داشته باشد [۲, ۳۰]. اگر این کانال چنین نقشی را در ER داشته باشد شناخت فاکتورهایی که تنظیم کننده نحوه باز و بسته شدن و فعالیت کانال باشد می تواند راه گشایی جهت درک اتیولوژی بیماریها و درمان باشد. از طرفی، کانال های پتاسیمی به عنوان مکانی برای عبور یونها می تواند pH سیتوپلاسمی و یا لومن ارگانل را تنظیم نماید. اما مشخص نیست کانال پتاسیم چگونه pH را حس می نماید. در این مطالعه، ما اثر مستقیم pH سیتوپلاسمی را روی فعالیت و نحوه باز و بسته شدن کانال $rerK_{ATP}$ الحاق شده به داخل غشا دو لایه لیپیدی مورد مطالعه قرار دادیم.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده برای استخراج لیپید فسفاتیدیل کولین شامل: کلروفرم، متانل، اتانل، استن، پترولیوم اتر، آلومینیم

اکساید، TCL-Kieselgel، یدید و دکان (n-decane) از شرکت Merck خریداری شد. مواد مورد استفاده برای استخراج ER شامل: سوکروز از شرکت Sigma، ایمیدازول، پیروفسفات و اسید کلریدریک از شرکت Merck تهیه گردید. مواد مورد استفاده برای ثبت تک کانال شامل: KCl، HEPES، Tris HCL و KOH از شرکت Sigma خریداری گردید. محلول های مورد استفاده برای استخراج ER شامل محلول سوکزوز ۰/۲۵، ۱و ۲ مولار، محلول سوکروز ایمیدازول و محلول سوکروز ایمیدازول پیروفسفات بود. آنتی بادی های Calnexin, 90kDa (SC-11397)، Actin (SC-1615) و Cox1 (SC-58347) از شرکت سانتاکروز و آنتی بادی Golgi (58 kDa) (AB6284) از شرکت ABCAM خریداری شد.

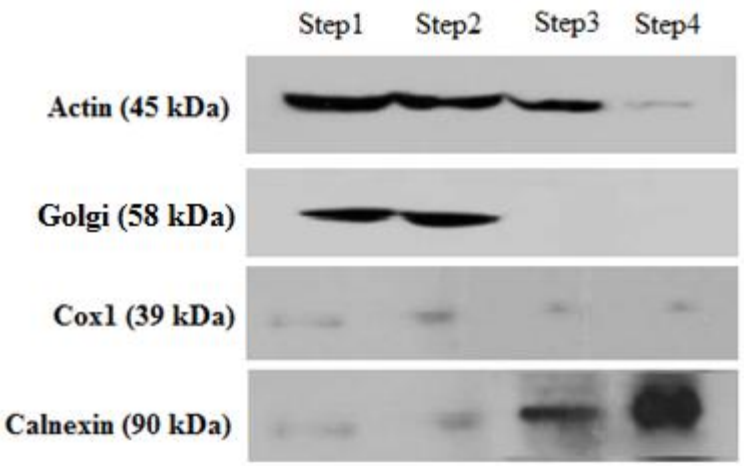
در این مطالعه برای تشکیل غشاء لیپیدی دولایه از فسفاتیدیل کولین استفاده شد. جهت استخراج لیپید فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ بر اساس روش Singleton و همکاران [۳۰] استفاده شد. بطور خلاصه با استفاده از حلال‌های آلی لیپید زرده از پروتئین ها و پیگمان ها جدا شد. سپس فسفاتیدیل کولین با استفاده از ستون کروماتوگرافی از سایر فسفاتید ها جدا گردید. فاز ثابت ستون کروماتوگرافی آلومینیوم اکساید و فاز متحرک آن محلول متانل- کلروفرم با نسبت ۹:۱ بود. میزان خلوص فسفاتیدیل کولین بدست آمده با استفاده از TLC[1] سنجیده شد. فسفاتیدیل کولین استخراج شده در میکرو تیوب ها جمع آوری و تا زمان استفاده در دمای $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری گردید.

استخراج وزیکول های ER از هپاتوسیت رت بر اساس روش Kan و همکاران (۱۹۹۲) انجام گردید [۱۶]. پس از کشتن ۴ راس رت ناشتا، کبد آنها فوراً خارج و در ۵۰ ml محلول سرد سوکروز ۰/۲۵ مولار هموژنیزه گردید. مخلوط هموژنیزه به مدت ۱۳ دقیقه با سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول سطحی از رسوبات ته لوله ها جدا شد و با سرعت ۲۲۴۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۴ دقیقه اولترا سانتریفوژ گردید. محلول لوله ها مجدداً از رسوبات زیری جدا شده و با سرعت ۳۵۸۰۰ دور در دقیقه بمدت ۶۷ دقیقه اولترا سانتریفوژ گردید. رسوبات حاصله از اولتراسانتریفوژ در محلول سوکروز ۲ مولار هموژنیزه گردید و در ته لوله های حاوی محلول سوکروز ۱مولار تزریق گردید سپس لوله ها با سرعت ۵۴۸۰۰ دور در دقیقه بمدت ۶۷ دقیقه اولترا سانتریفوژ گردید. در مرحله چهارم رسوب حاصله با محلول سوکروز ایمیدازول پیروفسفات هموژیزه شده و پس از ۱۵ دقیقه استیرر کردن، مجدداً با سرعت ۴۰۴۰۰ دور در دقیقه بمدت ۴۷ دقیقه اولترا سانتریفوژ گردید. در دو مرحله باقیمانده رسوب بدست آمده از مرحله قبل در محلول سوکروز ایمیدازول حل شد و با پروتکل فوق اولترا سانتریفوژ شد. تمام مراحل سانتریفوژ و اولترا سانتریفوژ در دمای $۴\ ^{\circ}C$ انجام گردید. در نهایت رسوب ER تخلیص و تغلیظ بدست آمده در ۱ml محلول سوکروز ایمیدازول حل شد و با حجم های ۲۰µl در میکروتیوب هایی برای استفاده در دمای $-۸۰^{\circ}C$ نگهداری گردید.

برای تشکیل غشاء از روش Muller و همکاران استفاده شد [۲۴]. در این روش ظرفی از جنس تفلون با دو محفظه سیس (فضای سیتوپلاسمی) و ترانس (فضای لومنی) که به ترتیب حاوی محلول KCl با غلظت ۲۰۰mM و ۵۰ mM بود استفاده گردید. در دیواره بین محفظه سیس و ترانس منفذ به قطر ۲۵۰µm تعبیه شده بود. تشکیل غشاء دو لایه لیپیدی با قرار دادن محلول فسفاتیدیل کولین (با غلظت ۲۵ mg/ml در حلال n- دکان) توسط سوزن استیل بر روی منفذ انجام گردید. جهت ثبت الکتروفیزیولوژی از روش ثبت تک کانال استفاده شد. وزیکول های استخراج شده از ER توسط سوزن استیل با غشاء دولایه لیپیدی جهت الحاق کانال تماس داده شد. جریان عبوری از کانال توسط بای لایر کلمپ آمپلی فایر BC-525D (شرکت warner) اندازه گیری گردید. الکترودهای از جنس نقره/کلرید نقره و پل نمک/آگار یکی برای اعمال ولتاژ درمحفظه سیس و دیگری برای گراند در محفظه ترانس قرار داده شد تا ارتباط با آمپلی فایر را بر قرار کنند. جریان پتاسیم از سیس به ترانس بصورت جریان رو به بالا (مثبت) و از ترانس به سیس بصورت جریان رو به پایین (منفی) ثبت گردید. تمام ثبت ها پس از یک فیلتر کم گذر ۱ KHz با سرعت نمونه برداری ۱۰ KHz نمونه برداری و در کامپیوتر ذخیره گردید.

برای آنالیز ثبت ها از نرم افزار Pclamp10

1. Thin Layer Chromatography



شکل ۱- تعیین خلوص ER هپاتوسیت رت بوسیله وسترن بلات. حضور باندهای خیلی ضعیف Actin (نشانگر غشاء پلاسمایی)، Cox1 (نشانگر غشاء داخلی میتوکندری)، عدم حضور باند Golgi (نشانگر دستگاه گلژی)، و حضور باند خیلی قوی Calnexin (نشانگر ER) در نمونه مرحله نهایی استخراج ER (step4) نشان می دهد که نمونه استخراج شده ER خالص بوده است .

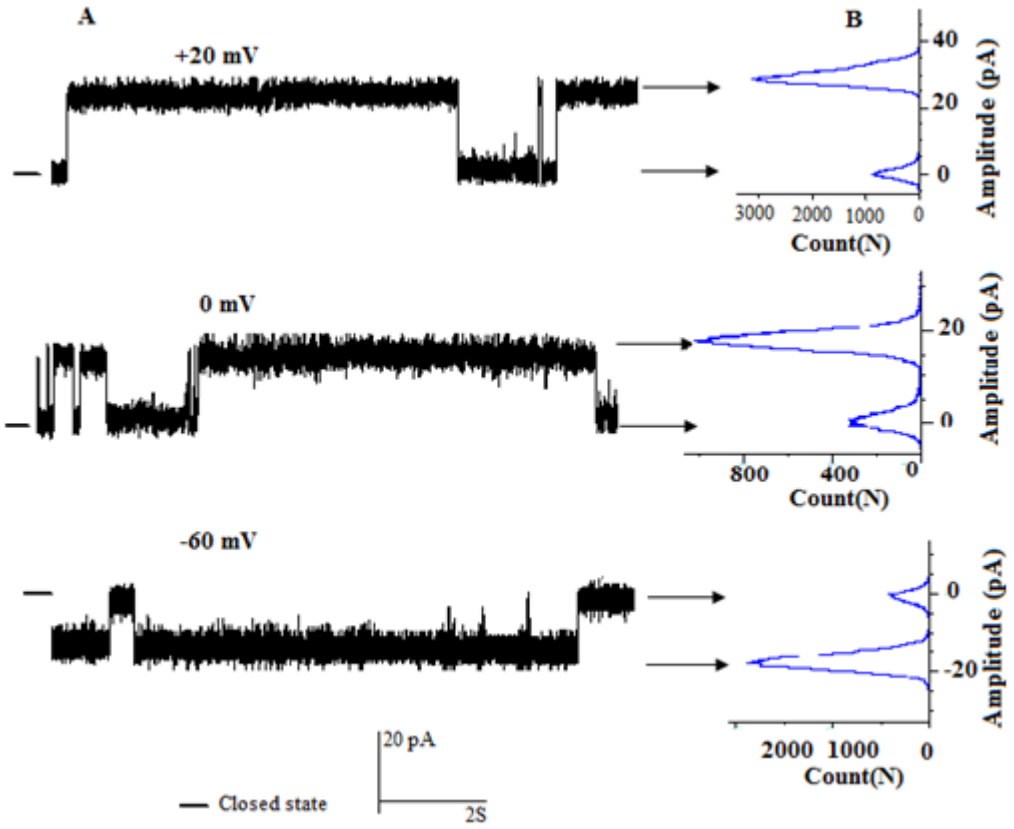
(شرکت Axon) استفاده گردید. پس از تعیین خط پایه برای شکل بسته و باز کانال، آمپلی تود میزان جریان عبوری از کانال (بر اساس پیکوآمپر) و احتمال باز بودن کانال در بیشتر ثبت ها از روی ثبت های یک دقیقه ای در هر ولتاژ اندازه گیری گردید. و سپس در هر ولتاژ هسیتوگرام آمپلی تود رسم گردید. دامنه جریان (کنداکتانس) تک کانال بر اساس شیب منحنی ولتاژ- جریان محاسبه گردید. معنی دار بودن اختلاف در دامنه جریان و احتمال باز بودن کانال در زمان بکارگیری دارو نسبت به گروه کنترل توسط Student T-Test بررسی شد. $P<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد و اطلاعات بصورت mean ± SEM گزارش گردید.

یافته ها

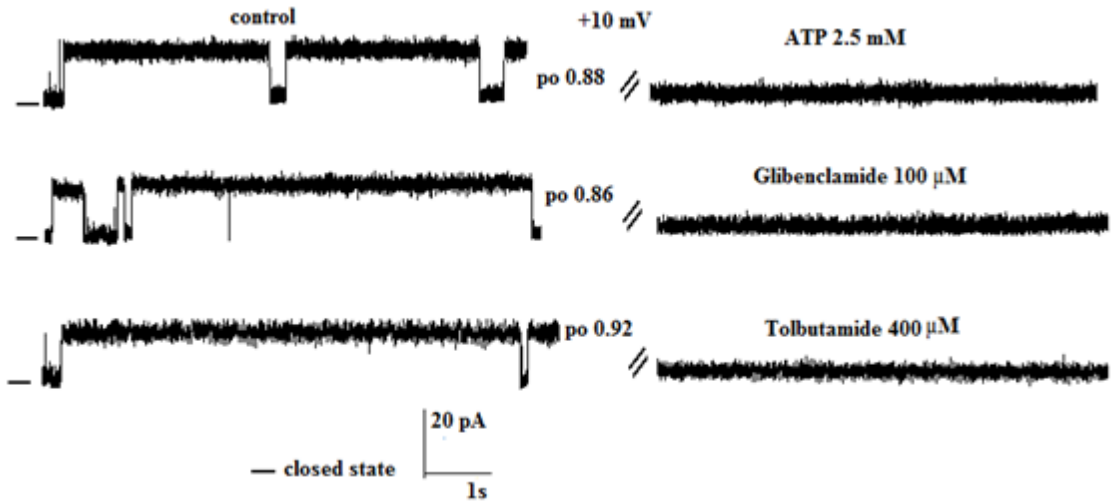
برای تعیین خلوص ER استخراج شده از هپاتوسیت رت از روش وسترن بلات استفاده گردید. برای این منظور نمونه هایی از مراحل چندگانه استخراج ER یعنی هموژنیزه بافت کبد (step 1)، مرحله اول اولترا سانتریفوژ (step2)، مرحله سوم یا گرادیان سوکروز (step3) و مرحله آخر اولترا سانتریفوژ (step4) برداشته شد و در روی غشاء نیتروسلولز در مجاورت آنتی بادی های Actin (نشانگر غشاء پلاسمایی)، Golgi (نشانگر دستگاه گلژی)، Cox1 (نشانگر غشاء داخلی میتوکندری) و Calnexin (نشانگر ER) قرار داده شد. حضور باند خیلی ضعیف اکتین و Cox1 و عدم حضور باند گلژی از یک طرف و از طرف دیگر حضور باند خیلی قوی ER در نمونه های مرحله نهایی استخراج ER (step4) نشان می دهد که نمونه استخراج شده ER تقریبا خالص بوده است (شکل ۱).

پس از تشکیل غشاء لیپیدی و الحاق کانال K_{ATP} به غشاء لیپیدی از فعالیت کانال در ولتاژ های ۶۰- تا ۶۰+ میلی ولت ثبت گرفته شد. سه نمونه ثبت گرفته شده از فعالیت کانال در ولتاژهای ۶۰- ، ۰ و ۲۰+ میلی ولت بهمراه هیستوگرام آنها در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان جریان یون عبوری از کانال در ولتاژهای ۶۰- ، ۰ و ۲۰+ میلی ولت بترتیب ۱۷/۵- ، ۱۷ و ۲۸ پیکوآمپر و احتمال باز بودن کانال در ولتاژهای فوق بترتیب ۰/۹۴، ۰/۹۱ و ۰/۸۸ بود. در هر ولتاژ، قله بزرگ در هیستوگرام نشانگر باز بودن کانال و میزان عبور یون پتاسیم از کانال می باشد و قله کوچک حالت بسته کانال را نشان می دهد. رسم منحنی جریان/ولتاژ ثبت های بدست آمده در محدوده ۶۰- الی ۶۰+ میلی ولت نشان می دهد که کانال K_{ATP} غشاء ER کنداکتانس ۴±۵۶۹ پیکوسیمنس را دارد (منحنی جریان/ولتاژ نشان دا ده نشده است).

برای تایید کانال K_{ATP}، اثر ATP و دو نوع مهارکننده گیرنده سولفونیل اوره، گلیبن کلامید و تولبوتامید بر کانال K_{ATP} غشاء ER هپاتوسیت بررسی شد. ATP به مقدار ۲/۵ میلی مول در محفظه سیس (سیتوپلاسم) میزان جریان عبوری از کانال و همینطور میزان P_o را تا حد صفر کاهش داد. گلیبن

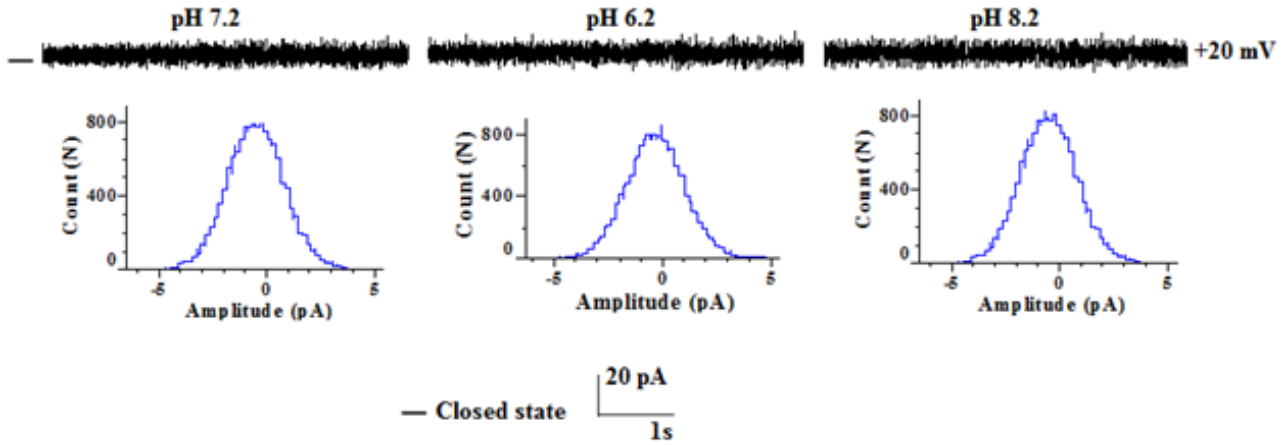


شکل ۲- ثبت از فعالیت کانال K_{ATP} غشاء ER. (A)سه نمونه ثبت گرفته شده از فعالیت کانال K_{ATP} در ولتاژهای ۶۰- ، ۰ و ۲۰+ میلی ولت در شرایط کنترل (pH برابر ۷/۴)، (B) هیستوگرام ثبت کانال K_{ATP} غشاء ER در ولتاژهای ۶۰- ، ۰ و ۲۰+ میلی ولت.

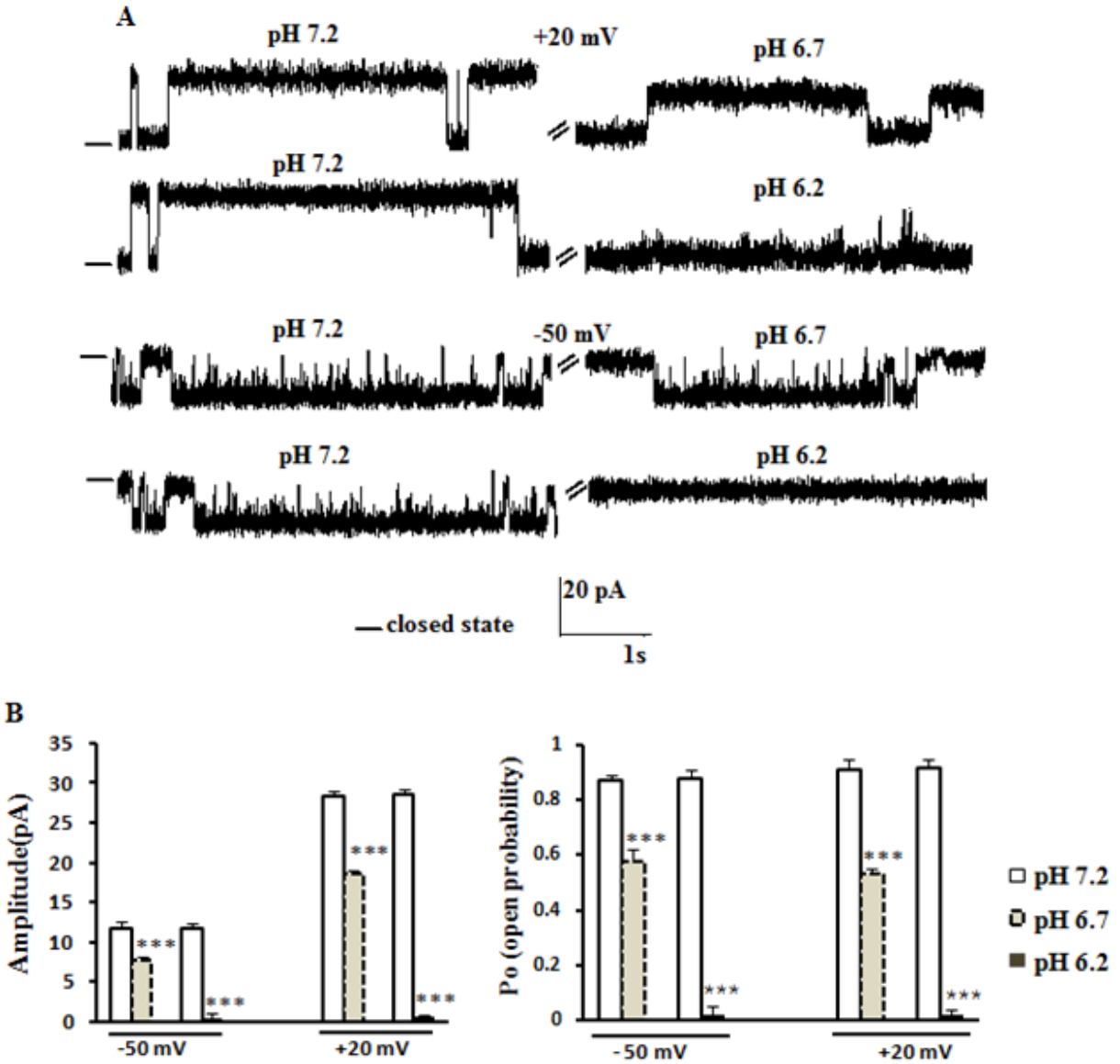


شکل۳- اثر ATP ،گلیبن کلامید و تولبوتامید بر کانال K_{ATP} غشاء ER هپاتوسیت. ATP با دوز ۲/۵ mM ، گلی بنکلامید با دوز ۱۰۰µM و تولبوتامید با دوز ۴۰۰µM سبب مهار فعالیت کانال در ولتاژ ۱۰+ میلی ولت گردید. P_o احتمال باز بودن کانال را نشان می دهد.

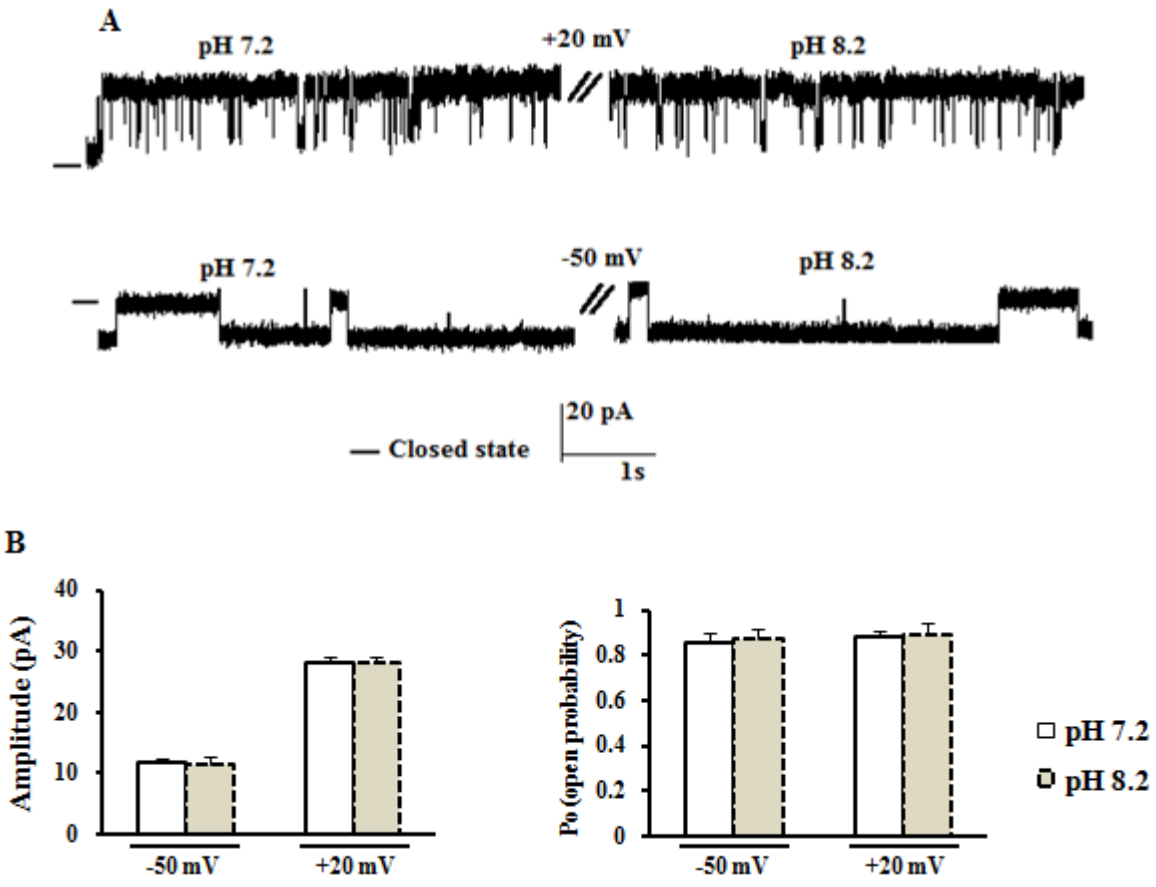
کلامید به مقدار ۱۰۰ میکرو مول در محیط سیس مقادیر آمپلی تود و P_o کانال K_{ATP} را تا حد صفر کاهش داد و فعالیت کانال را کاملاً مهار نمود. دیگر مهارکننده گیرنده سولفونیل اوره یعنی تولبوتامید به مقدار ۴۰۰ میکرو مول در محیط سیس اثر مهاری مانند ATP و گلیبن کلامید بر فعالیت کانال K_{ATP} داشت. در شکل ۳ اثر مهاری این سه نوع مهارکننده ها بر کانال K_{ATP} غشاء ER هپاتوسیت نشان داده شده است. پس از اطمینان از اینکه کانال مورد مطالعه در



شکل ٤- اثر تغییرات pH سیتوپلاسم بر غشاء دو لایه لیپیدی. کاهش pH سیتوپلاسم از ۷/۲ به ۶/۲ و افزایش آن به ۸/۲ اثری بر غشاء نداشت. هیستوگرام ثبت هـای گرفتـه در pH خنثی، اسیدی و قلیایی در ولتاژ ۲۰+ میلی ولت نشان می دهد که میزان جریان عبوری از غشاء بدون کانال صفر می باشد.



شکل ٥- اثر pH اسیدی سیتوپلاسم بر کانال K_{ATP} غشاء ER هپاتوسیت. (A) ثبت از فعالیت کانال در pH کنترل ۷/۲ و در pH های اسیدی ۶/۷ و ۶/۲ در ولتاژ هـای mV ۵۰- و ۲۰mV+ (B) در نمودار سمت راست احتمال باز بودن کانال و در نمودار سمت چپ مقادیر جریان یون از کانـال در pH کنتـرل ۷/۲ و pH هـای اسـیدی ۶/۷ و ۶/۲ در ولتاژ های ۵۰- و ۲۰mV+ با هم مقایسه گردیده است. $P < 0.001$ *** نسبت به گروه کنترل (pH برابر ۷/۲).



شکل٦- اثر pH قلیایی سیتوپلاسم بر کانال K_{ATP} غشاء ER هپاتوسیت. (A) ثبت فعالیت کانال در pH کنترل ۷/۲ و در pH قلیایی ۸/۲ در ولتاژ های ۵۰- mV و ۲۰mV+ (B) نمودار سمت راست احتمال باز بودن کانال و نمودار سمت چپ مقادیر جریان یون از کانال در pH کنترل ۷/۲ و pH قلیایی ۸/۲ در ولتاژ های ۵۰- و ۲۰mV+ با هم مقایسه گردیده است.

غشاء ER کانال پتایسمی حساس به ATP مشاهده شده در مطالعه قبلی می باشد [۱۰]، اثر pH اسیدی و قلیایی سیتوپلاسم بر فعالیت این کانال بر رسی گردید. برای این منظور ابتدا اثر احتمالی pH اسیدی و قلیایی سیتوپلاسم (محفظه سیس) بر غشاء دو لایه لیپیدی بدون کانال بررسی شد. اسیدی کردن محیط سیس و کاهش pH آن از ۷/۲ به ۶/۲ اثری بر غشاء دو لایه لیپیدی بدون کانال نداشت. هم چنین قلیایی کردن محیط سیس توسط KOH و رساندن pH از ۷/۲ به ۸/۲ نیز بر روی غشا اثر معنی داری نداشت. اثر pH خنثی، اسیدی و قلیایی سیتوپلاسم بر غشا فاقد کانال در شکل ۴ نشان داده شده است.

در ادامه مطالعه اثر pH اسیدی و قلیایی سیتوپلاسم بر کانال K_{ATP} بررسی شد. پس از تشکیل غشا و الحاق وزیکول ER حاوی کانال K_{ATP} از فعالیت کانال در ولتاژهای مختلف ثبت گرفته شد. سپس pH محیط سیس توسط HCl از ۷/۲ به ۶/۷ کاهش داده شد و فعالیت کانال در ولتاژهای مختلف بررسی شد. همچنانکه شکل ۵ (A و B) نشان می دهد در ثبت ولتاژهای۵۰- و ۲۰+ میلی ولت میزان جریان یون از کانال بترتیب از ۱۱/۷ و ۲۸/۳ به ۷/۷ و ۱۸/۶ پیکو آمپر کاهش یافت بعبارت دیگر حدود ۳۴٪ کاهش نشان می دهد. در خصوص احتمال باز بودن کانال نیز بترتیب از ۰/۹۱ و ۰/۸۷ به ۰/۵۶ و ۰/۵۳ تقلیل پیدا کرد که حدود ۴۰٪ کاهش را نشان می دهد. همچنانچه بار گراف شکل ۵ قسمت B نشان می دهد مقادیر کاهش در آمپلی تود و P_o کانال با ارزش $p<0.001$ معنی دار می باشد. همچنین شکل ۵ نشان می دهد که کاهش pH از ۷/۲ به ۶/۲ سبب مهار فعالیت کانال گردید.

در قسمت بعد مطالعه اثر pH قلیایی محیط سیس بررسی شد. پس از تشکیل غشاء و الحاق کانال K_{ATP} از فعالیت تک کانال در ولتاژهای مختلف ثبت گرفته شد. سپس pH محیط

سیس توسط KOH از ۷/۲ به ۸/۲ افزایش داده شد و فعالیت کانال در ولتاژهای مختلف بررسی شد. با قلیایی شدن pH محیط سیس تا ۸/۲ تغییرات معنی داری در میزان جریان یون از کانال (آمپلی تود) و احتمال باز بودن کانال در هیچ یک از ولتاژهای مثبت و منفی دیده نشد. یعنی قلیایی شدن pH محیط سیس تا ۸/۲ تاثیری بر فعالیت کانال K_{ATP} غشاء ER نداشت. در شکل ۶ قسمت A ثبت گرفته شده در دو ولتاژ ۵۰- و ۲۰+ میلی ولت در pH کنترل ۷/۲ و pH قلیایی ۸/۲ نشان داده شده است و در قسمت B احتمال باز بودن و میزان جریان یون از کانال در pH ۷/۲ و ۸/۲ با هم مقایسه شده است. همچنانکه نتایج نشان می دهد pHهای اسیدی باعث کاهش و مهار فعالیت کانال K_{ATP} غشاء ER می گردد در حالیکه pH قلیایی تاثیری بر فعالیت کانال ندارد.

بحث

در غشاء پلاسمایی فعالیت تعدادی از کانال های پتاسیم مانند کانال های پتاسیم یکسو کننده به داخل (Kir)، کانال پتاسیم حساس به کلسیم با کنداکتانس بالا (BK)، کانال های دو منفذی TASK-1 ، TASK-2 و TASK-3 [۱۱، ۲۰، ۳۹] و یک کانال پتاسیم در غشاء باکتری [۳۳] بوسیله pH مایع خارج و داخل سلولی تنظیم می شود. بغیر از کانال های پتاسیم فوق، فعالیت کانال پتاسیم K_{ATP} غشاء پلاسمایی نیز توسط pH سیتوپلاسمی تنظیم می شود [۳۸]. نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که فعالیت کانال K_{ATP} غشاء در pHهای مختلف سیتوپلاسمی پاسخ‌های متفاوتی مانند افزایش فعالیت کانال [۳۶] کاهش فعالیت [۱، ۲۱، ۳۷] و یا بدون اثر بر فعالیت کانال [۸، ۹] در بافت‌های مختلف داشته است.

نتایج مطالعه ما نشان داد که کاهش pH سیتوپلاسمی (سیس) از ۷/۲ به ۶/۷ باعث کاهش معنی دار میزان جریان یون و کاهش احتمال باز بودن کانال K_{ATP} غشاء ER می شود و افزایش pH سیتوپلاسمی (سیس) از ۷/۲ به ۸/۲ باعث ایجاد تغییرات معنی داری در میزان جریان یون و میزان باز بودن کانال نمی شود. در مطالعه انجام شده توسط Peter و همکاران [۲۶] در غشاء پلاسمایی سلول بتای پانکراس موش افزایش pH سیتوپلاسمی از ۷/۲ به۷/۶ تاثیری بر فعالیت کانال نداشته است ولی با افزایش pH به ۹ توانسته مقدار آمپلی تود کانال را ۱۶ درصد افزایش دهد. در دیگر مطالعه انجام شده توسط Bednarczyk و همکاران [۵] بر روی کانال $mitoK_{ATP}$ افزایش pH محیط سیتوزولی از ۷/۲ به ۸/۲ تاثیری بر فعالیت کانال نداشته و قلیایی کردن محیط ترانس (ماتریکس میتوکندری) فعالیت کانال را افزایش داده است. در مطالعه ما نیز با افزایش pH سیس تا ۸/۲ تغییرات معنی‌داری در فعالیت کانال دیده نشد هر چند که در pH بالاتر یک کاهش جریان یون در کانال مشاهده گردید (اطلاعات نشان داده نشده است). با توجه به نتایج مطالعه ما و دیگران [۶، ۲۶] بنظر می رسد که قلیایی شدن pH محیط سیس در محدوده فیزیولوژیک یک فاکتور تنظیم کننده کانال KATP غشاء ارگانل ها محسوب نمی شود و تاثیری بر فعالیت کانال ندارد.

بعلاوه نتایج ما نشان می دهد که کاهش pH محیط سیس از ۷/۲ به ۶/۷ باعث کاهش ۳۴٪ آمپلی تود و ۴۰٪ احتمال باز بودن کانال K_{ATP} غشاء ER می شود و کاهش pH به ۶/۲ باعث مهار فعالیت کانال می گردد. کاهش فعالیت کانال پتاسیمی K_{ATP} غشاء پلاسمایی اعم از کاهش جریان یونی و احتمال باز بودن کانال [۱، ۴، ۹] در بافت های مختلف مانند عضله اسکلتی انسان [۲۵]، سلول بتا پانکراس [۲۶] و عضله اسکلتی خوکچه هندی [۲۱] مشاهده شده است. همچنین نتایج مشابهی در مطالعه Bednarczyk و همکاران [۵] روی کانال $mitoK_{ATP}$ نشان داده شده است. مکانیزم مهار کانال K_{ATP} توسط پروتون شناخته نشده است. فرضیه های مختلفی در خصوص تغییر ساختار کانال و نفوذ پذیری مطرح می باشند. کانال K_{ATP} بعنوان یک پروتئین هترومر از زیر واحدهای اصلی kir6.1, kir6.2 بعنوان سازنده منفذ و زیر واحد های فرعی تنظیمی SUR-1 ، SUR-2A و SUR-2B حساس به مهار کننده ها تشکیل شده است. تنوع ترکیب این زیر واحد ها برای ایجاد تترامر منفذ و تترامر تنظیمی کانال باعث ایجاد کانال K_{ATP} متنوع در بافت های مختلف می شود. بنابر این اثر مهاری پروتون بر فعالیت کانال K_{ATP} غشاء ER ممکن است بر اساس فرضیات احتمالی زیر باشد: ۱- ورود پروتون به داخل منفذ و پیوند با مکان های اتصالی داخل

کانـال [۹]، ۲ – اتصـال پروتـون بـه بارهـای منفـی دهانـه سیتوپلاسمی کانال و خنثی کردن بار سطحی دهانـه [۱۵، ۲۶] و ۳– شاید کاهش یون پتاسیم در دهانه کانال بعلـت افـزایش پروتون و یا نفوذ و عبور سریع پروتون در رقابت با یون پتاسیم مطرح باشند [۲۶]. ضمناً این احتمال را باید در نظر داشت کـه اتصال پروتون به زیر واحدهای SURs نیز ممکن است سـبب کاهش فعالیـت کانـال شـده باشـد. چنانکـه مطالعـات نشـان می‌دهد زیر واحدهای SURs تعیین کننـده میـزان حساسـیت کانال به داروها و احتمال باز بودن کانال می باشد [۲۱، ۴۰].

مهار کانـال K_{ATP} غشـاء پلاسـمایی توسـط pH اسـیدی سیتوپلاسم در عروق [۳۶] و یا در لوله های کلیـوی [۲۳] بـه عنوان یک مکانیزم حفاظتی و حمایتی در بافت عمل می کند. با توجه به اینکه کانـال K_{ATP} غشـاء ER در تنظـیم اعمـالی مانند خنثی سازی شارژ الکتریکی حاصل از رهـایی کلسـیم از شبکه سارکوپلاسمی، تسهیل ورود و خـروج یـون کلسـیم بـه ER، تنظیم pH، کنترل جحم ارگانـل هـا و هومئوسـتاز یـون کلسیم دخالت دارد [۷، ۱۴]، شاید مهار این کانـال توسـط pH اسیدی در غشاء ER برای تنظیم مجدد اعمال هومئوستازی و حفظ عملکرد سلول اهمیت داشته باشد.

در نهایت تغییـرات pH سیتوپلاسـم یکـی از فاکتورهـای تنظیم کننده کانال K_{ATP} غشـاء ER مـی‌باشـد. کـاهش pH سیتوپلاسمی باعث کاهش و یا مهار فعالیت کانال مـی شـود. این نتایج ممکن است کمکی در جهت درک مـا از مکـانیزم–های حفظ هومئوستاز و تنظیم کلسیم داخل ER باشد.

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشـتی که حمایت مالی این پژوهش را قبول کردند.

References

[1] Allard B, Lazdunski M, Rougier O, Activation of ATP-dependent K+ channels by metabolic poisoning in adult mouse skeletal muscle: role of intracellular Mg (2+) and pH. ***J Physiol*** 485 (1995) 283-296.

[2] 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) 50-56.

[3] Basseri S, Austin RC, Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. ***Biochem Res Int*** 84 (2012) 362-375.

[4] Baukrowitz T, Tucker SJ, Schulte U, Benndorf K, Ruppersberg JP, Fakler B, Inward rectification in KATP channels: a pH switch in the pore. ***EMBO J*** 18 (1999) 847-853.

[5] 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) 540-548.

[6] Bednarczyk P, Dolowy K, Szewczyk A, New properties of mitochondrial ATP-regulated potassium channels. ***J Bioenerg Biomembr*** 40 (2008) 325-335.

[7] Bednarczyk P, Potassium channels in brain mitochondria. ***Acta Biochim Pol*** 56 (2009) 385-392.

[8] Cook DL, Hales CN, Intracellular ATP directly blocks K+ channels in pancreatic B-cells. ***Nature*** 311 (1984) 271-273.

[9] Davies NW, Standen NB, Stanfield PR, The effect of intracellular pH on ATP-dependent potassium channels of frog skeletal muscle. ***J Physiol*** 445(1992) 549-568.

[10] Ghasemi M, Khodaei N, Salari S, Eliassi A, Saghiri R, Gating Behavior of Endoplasmic Reticulum Potassium Channels of Rat Hepatocytes in Diabetes. ***Iran Biomed J*** 18 (2014) 165-172.

[11] Hordejuk R, Lobanov NA, Kicinska, Szewczyk A, Dolowy K, pH modulation of large conductance potassium channel from adrenal chromaffin granules. ***Mol Membr Biol*** 21 (2004) 307-313.

[12] Hotamisligil GS, Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. ***Cell*** 140 (2010) 900-917.

[13] Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S, A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. ***Neuron*** 16 (1996) 1011-1017.

[14] Jourdon P, Feuvray D, Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. ***J Physiol*** 470 (1993) 411-429.

[15] Kajma A, Szewczyk A, A new pH-sensitive rectifying potassium channel in mitochondria from the embryonic rat hippocampus. ***Biochim Biophys Acta*** 1817 (2012) 1867-1878.

[16] Kan FW, Jolicoeur M, Paiement J, Freeze-fracture analysis of the effects of intermediates of the phosphatidylinositol cycle on fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. ***Biochim Biophys Acta*** 1107 (1992) 331-341.

[17] Kim MK, Kim HS, Lee IK, Park KG, Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. ***Exp Diabetes Res*** 2012 (2012) 437-444.

[18] Kim Y, Bang H, Kim D, TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. ***J Biol Chem*** 275 (2000) 9340-9347.

[19] Koyano T, Kakei M, Nakashima H, Yoshinaga M, Matsuoka T , Tanaka H, ATP-regulated K+ channels are modulated by intracellular H+ in guinea-pig ventricular cells. ***J Physiol*** 463 (1993) 747-766.

[20] Kuum M, Veksler V, Liiv J, Ventura-Clapier R, Kaasik A, Endoplasmic reticulum potassium-hydrogen exchanger and small conductance calcium-activated potassium channel activities are essential for ER calcium uptake in neurons and cardiomyocytes. ***J Cell Sci*** 125 (2012) 625-633.

[21] Liss B, Roeper J, Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). ***Mol Membr Biol*** 18 (2001) 117-127.

[22] Ma L, Zhang X, Zhou M, Chen H, Acid-sensitive TWIK and TASK two-pore domain potassium channels change ion selectivity and become permeable to sodium in extracellular acidification. ***J Biol Chem*** 287 (2012) 37145-37153.

[23] Mauerer UR, Boulpaep EL, Segal AS, Regulation of an inwardly rectifying ATP-sensitive K+ channel in the basolateral membrane of renal proximal tubule. ***J Gen Physiol*** 11 (1998) 161-180.

[24] 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.

[25] Pan JW, Hamm JR, Rothman DL, Shulman RG, Intracellular pH in human skeletal muscle by 1H NMR. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 85 (1988) 7836-7839.

[26] Proks P, Takano M, Ashcroft FM, Effects of intracellular pH on ATP-sensitive K+ channels in mouse pancreatic beta-cells. ***J Physiol*** 475 (1994) 33-44.

[27] Raupach T, Ballanyi K, Intracellular pHand KATP channel activity in dorsal vagal neurons of juvenile rats in situ during metabolic disturbances. **Brain Res** 1017 (2004) 137-145.

[28] Ruffin VA, Salameh AI, Boron WF, Parker MD, Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. ***Front Physiol*** 5 (2014)1-43.

[29] Salari S, Eliassi A, Saghiri R, Evidences on the existence of a new potassium channel in the rough endoplasmic reticulum (RER) of rat hepatocytes. ***Physiol Pharmacol*** 15 (2011)16-26.

[30] Sepehri H, Eliassi A, Sauve 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.

[31] Shi WW, Yang Y, Shi Y, Jiang C, K(ATP) channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases. ***Sheng Li Xue Bao*** 64 (2012) 1-13.

[32] Siesjo BK, von Hanwehr R, Nergelius G, Nevander G, Ingvar M, Extra- and intracellular pH in the brain during seizures and in the recovery period following the arrest of seizure activity. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 5 (1985) 47-57.

[33] Singleton WS, Gray MS, Brown ML, White JL, Chromatographically Homogeneous Lecithin from Egg Phospholipids. ***J Am Oil Chem Soc*** 42 (1965) 53-56.

[34] Thompson AN, Posson DJ, Parsa PV, Nimigean CM, Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 105 (2008) 6900-6905.

[35] Wang WZ, Chu XP, Li MH, Seeds, Simon RP, Xiong ZG, Modulation of acid-sensing ion channel currents, acid-induced increase of intracellular Ca2+, and acidosis-mediated neuronal injury by intracellular pH. ***J Biol Chem*** 281 (2006) 29369-29378.

[36] Wang X, Wu J, Li L, Chen F, Wang R, Jiang C, Hypercapnic acidosis activates KATP channels in vascular smooth muscles. ***Circ Res*** 92 (2003) 1225-1232.

[37] Wu J, Xu H, Yang Z, Wang Y, Mao J , Jiang C, Protons activate homomeric Kir6.2 channels by selective

suppression of the long and intermediate closures.***J Membr Biol*** 190 (2002) 105-116.

[38] Wu J, Cui N, Piao H, Wang Y, Xu H, Mao J, Allosteric modulation of the mouse Kir6.2 channel by intracellular H+ andATP. ***J Physiol*** 543 (2002) 495-504.

[39] Zhang X, Zeng X, Lingle CJ, Slo3 K+ channels: voltage and pH dependence of macroscopic currents. ***J Gen Physiol*** 128 (2006) 317-336.

[40] Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, He HJ , Yasuoka Y, Itoh H, ATP-sensitive K+-channel subunits on the mitochondria and endoplasmic reticulum of rat cardiomyocytes. ***J Histochem Cytochem*** 53 (2005) 1491-1500.