

Aleksandra Sęk

**Regulacja aktywności mitochondrialnego kanału
potasowego przez niskocząsteczkowe związki
syntetyczne oraz pochodzenia roślinnego**

Rozprawa doktorska
wykonana w Pracowni Wewnątrzkomórkowych
Kanałów Jonowych
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
oraz w Pracowni Stereokontrolowanej
Syntezy Organicznej
Wydziału Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

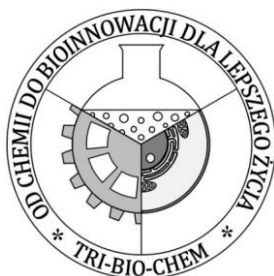
PROMOTORZY:

Prof. dr hab. Adam Szewczyk
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Prof. dr hab. Tomasz Bauer
Wydział Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa, 2022

Niniejsza rozprawa doktorska powstała dzięki finansowaniu interdyscyplinarnych studiów doktoranckich TRI-BIO-CHEM. Projekt "Od chemii do bioinnowacji dla lepszego życia - interdyscyplinarne studia doktoranckie TRI-BIO-CHEM" realizowany przez trzy jednostki partnerskie (Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego) w ramach Projektu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, POWR.03.02.00-00-I007/16-00 (POWER 2014-2020).



Pragnę serdecznie podziękować moim promotorom:

*Prof. dr hab. Adamowi Szewczykowi za opiekę naukową,
przekazaną wiedzę oraz pomoc w przygotowaniu tej rozprawy.*

*Prof. dr hab. Tomaszowi Bauerowi za cenne rady,
życzliwość i poświęcony czas.*

*Dziękuję także Dr hab. Piotrowi Bednarczykowi, Prof. SGGW
za wsparcie naukowe i wartościowe rady.*

*Wszystkim Pracownikom i Doktorantom Pracowni Wewnątrzkomórkowych
Kanałów Jonowych za pomoc, miłą atmosferę pracy i okazaną życzliwość.*

*Szczególne podziękowania składam:
Mojej rodzinie, Rodzicom, którzy zawsze
wspierali mnie w dążeniu do pogłębiania wiedzy.*

Spis treści

Indeks skrótów	9
Streszczenie w języku polskim	14
Streszczenie w języku angielskim	16
1. Wstęp	18
1.1. Nabłonek dolnych dróg oddechowych	18
1.2. Rola jonów potasu w metabolizmie komórki	19
1.3. Budowa i funkcje mitochondriów	21
1.3.1. Znaczenie transportu jonów potasu w mitochondriach	24
1.3.2. Kanały potasowe w mitochondriach: występowanie i funkcje.....	26
1.4. Udział mitochondrialnych kanałów potasowych w cytoprotekcji oraz śmierci komórkowej	28
1.5. Kanał potasowy o dużym przewodnictwie typu BK _{Ca}	30
1.5.1. Struktura i izoformy kanału	31
1.5.2. Regulacja kanału przez zmiany napięcia oraz jony wapnia	33
1.5.3. Inne substancje regulujące aktywność kanału BK _{Ca}	33
1.6. Właściwości i funkcje niskocząsteczkowych związków syntetycznych i pochodzenia naturalnego	34
1.6.1. Pochodne flawonoidu naringeniny	34
1.6.2. Antocyjany	37
1.6.3. Związki o strukturze zbliżonej do paksyliny	39
2. Założenia i cele	43
3. Materiały i metody	45
3.1. Niskocząsteczkowe związki chemiczne wykorzystywane w badaniach	45
3.2. Modele badawcze wykorzystane w badaniach mitochondrialnych kanałów potasowych	50
3.2.1. Komórki nabłonka oskrzelowego (HBE)	50
3.2.2. Embrionalne komórki nerki zawierające mitochondrialną VEDEC izoformę kanału BK _{Ca} (HEK293-BK_DEC)	51
3.3. Pomiary elektrofizjologiczne.....	53
3.3.1. Otrzymywanie preparatu mitoplastów	53
3.3.2. Technika <i>patch-clamp</i>	54
3.3.3. Analiza danych uzyskanych techniką <i>patch-clamp</i>	56
3.4. Identyfikacja kanału BK _{Ca} w liniach komórkowych	56
3.4.1. Analiza poziomu ekspresji genów	57

3.4.1.1.	Izolowanie RNA	57
3.4.1.2.	Synteza cDNA	58
3.4.1.3.	Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	59
3.4.1.4.	Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)	60
3.4.2.	Analiza białek metodą Western blot	61
3.4.2.1.	Oczyszczanie mitochondriów oraz przygotowanie lizatów komórkowych	61
3.4.2.2.	Pomiar stężenia białka	62
3.4.2.3.	Elektroforetyczny rozdział białek	63
3.5.	Znakowanie immunofluorescencyjne komórek z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego	66
3.6.	Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej	67
3.7.	Analiza oddychania komórkowego	68
3.7.1.	Pomiar szybkości zużycia tlenu z wykorzystaniem oksygrafu	68
3.7.2.	Analiza oddychania komórkowego z wykorzystaniem urządzenia Seahorse	69
3.8.	Ocena przeżywalności komórek	70
3.9.	Analiza statystyczna wyników	71
4.	Wyniki	72
4.1.	Identyfikacja mitochondrialnego kanału BK _{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego	72
4.1.1.	Analiza prawdopodobieństw otwarć kanału mitoBK _{Ca}	74
4.1.2.	Właściwości biofizyczne kanału mitoBK _{Ca} : zależność prądowo-napięciowa oraz średnie czas otwarć i zamknięć	75
4.2.	Regulacja aktywności kanału mitochondrialnego w komórkach HBE	78
4.2.1.	Wpływ modulatorów na kanał mitoBK _{Ca}	78
4.2.2.	Regulacja aktywności przez zmiany stężenia jonów wapnia	85
4.3.	Charakterystyka biochemiczna kanału mitoBK _{Ca} linii komórkowej HBE87	87
4.3.1.	Analiza poziomu transkryptów genów kodujących podjednostki kanału BK _{Ca}	87
4.3.2.	Identyfikacja białek tworzących kanał BK _{Ca} z zastosowaniem techniki Western blot	88
4.3.3.	Wpływ mitochondrialnego kanału BK _{Ca} na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej	89
4.3.4.	Ocena oddychania komórkowego w obecności modulatorów kanału BK _{Ca}	92

4.4.	Analiza biofizyczna izoformy VEDEC kanału mitoBK _{Ca} z linii komórkowej HEK293-BK_DEC	93
4.4.1.	Charakterystyka prądowo-napięciowa mitochondrialnego kanału mitoBK_DEC	93
4.4.2.	Prawdopodobieństwo otwarć kanału	94
4.4.3.	Regulacja aktywności kanału mitoBK_DEC przez jony wapnia i inne modulatory w komórkach HEK293-BK_DEC	95
4.5.	Biochemiczna charakterystyka izoformy VEDEC kanału mitoBK _{Ca} z linii komórkowej HEK293-BK_DEC	100
4.5.1.	Subkomórkowe lokalizacje podjednostki α kanału BK _{Ca} w transfekowanych komórkach linii HEK293-BK_DEC – obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej	100
4.5.2.	Analiza poziomu transkryptów izoformy VEDEC podjednostki α kanału BK _{Ca}	102
4.5.3.	Identyfikacja podjednostki α kanału BK _{Ca} z zastosowaniem techniki Western blot	103
4.5.4.	Ocena związku pomiędzy oddychaniem komórkowym a obecnością kanału mitoBK_DEC	104
4.6.	Wpływ niskocząsteczkowych związków syntetycznych i pochodzenia roślinnego na aktywność kanału mitoBK _{Ca}	108
4.6.1.	Wpływ pochodnych naringeniny na endogenną i egzogenną izoformę kanału mitoBK _{Ca}	108
4.6.1.1.	Ocena przeżywalności komórek HBE po inkubacji z pochodnymi naringeniny	109
4.6.1.2.	Regulacja aktywności kanału mitoBK _{Ca} przez pochodne naringeniny	112
4.6.1.3.	Wpływ pochodnych naringeniny na przeżywalności komórek HEK293-BK_DEC	119
4.6.1.4.	Ocena aktywności kanału izoformy VEDEC kanału mitoBK _{Ca} z linii komórkowej HEK293-BK_DEC po podaniu pochodnych naringeniny	121
4.6.2.	Regulacja kanału mitoBK _{Ca} w komórkach linii HBE przez naturalnie występujące antocyjany	132
4.6.2.1.	Przeżywalność komórek linii HBE	132
4.6.2.2.	Wpływ naturalnie występujących antocyjanów na aktywność kanału mitoBK _{Ca} w komórkach linii HBE	135
4.6.3.	Wpływ związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na izoformę VEDEC kanału mitoBK _{Ca}	138
4.6.3.1.	Wpływ terpenoidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na przeżywalność komórek linii HEK293-BK_DEC	138

4.6.3.2.	Analiza wpływu alkaloidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na przeżywalność komórek linii HEK293-BK_DEC.....	140
4.6.3.3.	Wpływu terpenoidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na aktywność kanału mitoBK_DEC	143
4.6.3.4.	Określenie wpływu alkaloidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na aktywność kanału mitoBK_DEC	147
4.6.3.5.	Wpływu związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej w komórkach HEK293-BK_DEC.....	151
5.	Dyskusja	155
5.1.	Charakterystyka mitochondrialnych kanałów typu BK _{Ca}	156
5.1.1.	Endogennie występujący kanał mitoBK _{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego	156
5.1.2.	Egzogenna izoforma VEDEC kanału mitoBK_DEC w otrzymanej linii komórkowej HEK293-BK_DEC	161
5.2.	Wpływ pochodnych naringeniny na aktywność mitochondrialnego kanału BK _{Ca}	164
5.2.1.	Regulacje endogennie występującego kanału mitoBK _{Ca} w komórkach HBE oraz egzogennej izoformy VEDEC kanału BK _{Ca} w komórkach HEK293-BK_DEC	165
5.3.	Wpływ związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na złożoną aktywność kanału mitoBK_DEC.....	172
6.	Podsumowanie i wnioski	175
7.	Bibliografia	176
	Lista publikacji	189

Indeks skrótów

$\Delta\Psi_m$	potencjał elektrochemiczny błony mitochondrialnej (<i>ang. electrochemical potential</i>)
5-HD	kwask 5-hydroksydekanowy (<i>ang. 5-hydroxydecanoic acid</i>)
AA	antymycyna A (<i>ang. antimycin A</i>)
Ad5	adenowirus typu 5 (<i>ang. adenovirus serotype 5</i>)
APS	nadsiarczan amonu (<i>ang. ammonium persulfate</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (<i>ang. adenosine-5'-triphosphate</i>)
ATCC	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (<i>ang. American Type Culture Collection</i>)
BK _{Ca}	kanał potasowy regulowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie (<i>ang. large conductance calcium - regulated K⁺ channel</i>)
BLM	technika czarnych błon lipidowych (<i>ang. black lipid membrane</i>)
BSA	surowicza albumina bydlęca (<i>ang. bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang. complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CGS7184	1-[[4-chlorofenylo]amino]okso]-2-hydroksy-6-trifluorometylo-1H-indolo-3-karboksylan etylu (<i>ang. ethyl 1-[[4-chlorophenyl]amino]oxo]-2-hydroxy-6-trifluoromethyl-1H-indole-3-carboxylate</i>)
CMV	promotor cytomegalowirusa (<i>ang. promoter cytomegalovirus</i>)
COXIV	IV podjednostka mitochondrialnej oksydazy cytochromu c (<i>ang. mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV</i>)
DMEM	płyn hodowlany Dulbecco's Modified Eagle's (<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek (<i>ang. dimethyl sulfoxide</i>)
dNTP	deoksynukleotydy (<i>ang. deoxy nucleoside triphosphate</i>)
DTT	ditiotreitól (<i>ang. dithiothreitol</i>)

EGTA	kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'tetraoctowy (<i>ang. ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>)
ER	siateczka śródplazmatyczna (<i>ang. endoplasmic reticulum</i>)
ETC	białka łańcucha oddechowego (<i>ang. electron transport chain</i>)
FBS	płodowa surowica bydlęca (<i>ang. fetal bovine serum</i>)
FCCP	p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu (<i>ang. carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>)
GAPDH	dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa (<i>ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
HBE	linia komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego (<i>ang. Human Bronchial Epithelial Cells</i>)
HEK293	linia komórkowa ludzkich embrionalnych komórek nerki (<i>ang. Human Embryonic Kidney 293 Cells</i>)
HEK293-BK_DEC	linia komórkowa ludzkich embrionalnych komórek nerki zawierająca mitochondrialną VEDEC izoformę kanału BK _{Ca}
HEPES	kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy (<i>ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid</i>)
IbTx	iberiotoksyna (<i>ang. iberiotoxin</i>)
JC10	fluorescencyjna sonda potencjału mitochondrialnego (<i>ang. Mitochondrial Membrane Potential Kit</i>)
KCNMA1	gen kodujący podjednostkę α kanału BK _{Ca} (<i>ang. potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1</i>)
KCNMB1	gen kodujący podjednostkę β 1 kanału BK _{Ca} (<i>ang. potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 1</i>)
KCNMB2	gen kodujący podjednostkę β 2 kanału BK _{Ca} (<i>ang. potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 2</i>)
KCNMB3	gen kodujący podjednostkę β 3 kanału BK _{Ca} (<i>ang. potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 3</i>)

<i>KCNMB4</i>	gen kodujący podjednostkę $\beta 4$ kanału BK_{Ca} (<i>ang. potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 4</i>)
MICOS	kompleks mitochondrialnego miejsca kontaktu i system organizowania grzebienia (<i>ang. mitochondrial contact site and cristae-organizing system</i>)
mitoBK_DEC	mitochondrialna izoforma kanału potasowego regulowanego jonami wapnia o dużym przewodnictwie (<i>ang. large conductance calcium -regulated K^+ channel</i>)
mitoBK _{Ca}	mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia (<i>ang. mitochondrial large conductance calcium -regulated K^+ channel</i>)
mitoK	mitochondrialny kanał potasowy (<i>ang. mitochondrial K^+ channel</i>)
mitoK _{ATP}	mitochondrialny kanał potasowy hamowany przez ATP (<i>ang. ATP-regulated mitochondrial potassium channel</i>)
mitoKv1.3	mitochondrialny kanał potasowy bramkowany napięciem (<i>ang. mitochondrial voltage-gated potassium channels</i>)
mitoSlo2	aktywowany sodem mitochondrialny kanał potasowy (<i>ang. mitochondrial sodium-activated potassium channel</i>)
mitoTASK-3	mitochondrialny dwuporowy kanał potasowy TASK-3 (<i>ang. tandem pore domain acid-sensitive K channels</i>)
mPTP	mitochondrialny megakanał (<i>ang. mitochondrial permeability transition pore</i>)
mtDNA	mitochondrialny kwasu deoksyrybonukleinowego (<i>ang. mitochondrial deoxyribonucleic acid</i>)
Na ⁺ -K ⁺ -ATP-aza	adenozynotrifosfataza Na ⁺ -K ⁺ -zależna, pompa sodowo-potasowa (<i>ang. Na⁺-K⁺-ATPase, sodium-potassium pump</i>)
nBK _{Ca}	jądrowy kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia (<i>ang. nuclear BK_{Ca}</i>)
NP _o	prawdopodobieństwo otwarcia N kanałów (<i>ang. N channels open probability</i>)
NS11021	N'-[3,5-bis (trifluorometylo) fenylo]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-ilo) fenylo]-tiomocznik (<i>ang. N'-[3,5-Bis (trifluoromethyl) phenyl]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-yl) phenyl] -thiourea</i>)

NS1619	1,3-dihydro-1-[2-hydroksy-5-(trifluorometylo)fenylo]-5(trifluorometylo) -2H-benzimidazol-2-on (<i>ang. 1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5- (trifluoromethyl) phenyl] -5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one</i>)
P4HB	podjednostka β hydroksylazy prolilowej (<i>ang. β-subunit of prolyl 4-hydroxylase</i>)
Pax	paksylina (<i>ang. paxilline</i>)
PBS	sól fizjologiczna w buforze fosforanowym (<i>ang. phosphate-buffered saline</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>ang. polymerase chain reaction</i>)
PEI	polietylenoimina (<i>ang. polyethylenimine</i>)
PFA	paraformaldehyd (<i>ang. paraformaldehyde</i>)
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu (<i>ang. phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
P _o	prawdopodobieństwo otwarć kanału (<i>ang. channel open probability</i>)
PVDF	polifluorek winylidenu (<i>ang. polyvinylidene fluoride</i>)
pz	pary zasad
RCK1	domena wiążąca wapń 1, domena regulatorowa przewodnictwa potasu 1 (<i>ang. regulator of conductance of K⁺</i>)
RCK2	domena wiążąca wapń 2, domena regulatorowa przewodnictwa potasu 2 (<i>ang. regulator of conductance of K⁺</i>)
RFT	reaktywne formy tlenu (<i>ang. reactive oxygen species</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (<i>ang. ribonucleic acid</i>)
RT-qPCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (<i>ang. quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu (<i>ang. sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących z wykorzystaniem SDS (<i>ang. SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Slo1	podjednostka α (<i>ang. alpha member 1; Slo1 homolog</i>)

TBST	sól fizjologiczna buforowana TRIS z Tween 20 - monolaurynian polioksyetyleno (20) sorbitanu (<i>ang. tris-buffered saline with Tween 20 - polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (<i>ang. N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)
VDAC	kanał anionowy zależny od napięcia (<i>ang. voltage - dependent anion channel</i>)
VEDEC	gen kodujący izoformę VEDEC podjednostki α kanału mitoBK _{Ca}
VSD	domena wykrywająca napięcie (<i>ang. voltage sensing domain</i>)

Streszczenie w języku polskim

Kanały potasowe obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej zaangażowane są w regulację wielu procesów komórkowych. Aktywacja mitochondrialnego kanału o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca^{2+} (mitoBK_{Ca}) ochrania komórki mięśnia sercowego i mózgu w czasie niedokrwienia/reperfuzji. Natomiast hamowanie aktywności mitochondrialnego kanału Kv1.3 w komórkach nowotworowych zwiększa ich śmiertelność. Doświadczenia opisane w niniejszej rozprawie koncentrowały się na badaniach elektrofizjologicznych i biochemicznych dotyczących identyfikacji i charakterystyki mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} w wybranych liniach komórkowych oraz poszukiwaniu nowych skutecznych niskocząsteczkowych modulatorów (aktywatorów i inhibitorów) aktywności tego kanału. Scharakteryzowanie nowych modulatorów kanału mitoBK_{Ca} może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów prowadzących zarówno do zjawiska cytoprotekcji jak śmierci komórek.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zidentyfikowanie mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego oraz porównanie wpływu związków niskocząsteczkowych na aktywności tego kanału i egzogennej izoformy VEDEC.

W pierwszej części rozprawy przedstawiono wyniki badań elektrofizjologicznych z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*, które pozwoliły scharakteryzować kanał mitoBK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego. Warto podkreślić, że jest to pierwsza w literaturze identyfikacja mitochondrialnego kanału potasowego w tym rodzaju komórek. Następnie opisano doświadczenia dotyczące właściwości mitochondrialnej izoformy VEDEC kanału BK_{Ca} w opracowanym modelu badawczym, komórkach HEK293-BK_DEC.

W następnej części niniejszej rozprawy zbadano wpływ niskocząsteczkowych związków syntetycznych oraz pochodzenia roślinnego na aktywność opisanych kanałów mitoBK_{Ca}. Wykazano, że jedna z badanych pochodnych naringeniny, 7-*O*-prenylo-naringenina aktywuje kanał mitochondrialny występujący endogennie w komórkach nabłonka oskrzelowego oraz egzogenie w komórkach HEK293-BK_DEC. Stwierdzono również, że inna pochodna flawonoidów - chalkon 4', 5, 7 -tri-*O*-metylo-naringeniny, hamuje całkowicie aktywność obu badanych kanałów. Przeprowadzono również doświadczenia mające na celu identyfikację nowych inhibitorów kanałów potasowych

o strukturze zbliżonej do inhibitora: paksyliny. Wyselekcjonowane związki zmniejszały prawdopodobieństwo otwarć kanałów mitoBK_DEC, lecz nie tak skutecznie jak powszechnie wykorzystywana paksylina.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej opisano nową lokalizację mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego oraz zbadano właściwości izoformy VEDEC tego kanału w nowo opracowanym modelu komórkowym HEK293-BK_DEC. Zaprezentowano również efekt potencjalnych modulatorów, związków syntetycznych i pochodzenia roślinnego na aktywność kanałów mitoBK_{Ca}.

Streszczenie w języku angielskim

Potassium channels present in the inner mitochondrial membrane are involved in the regulation of many cellular processes. Activation of the mitochondrial large conductance calcium regulated potassium channel (mitoBK_{Ca}) protects the cardiomyocytes and brain cells during ischemia/reperfusion. On the other hand, inhibition of the mitochondrial Kv1.3 channel activity increases the cancer cells death. The experiments described in this dissertation focused on electrophysiological and biochemical studies on identification and characterization of the mitochondrial BK_{Ca} channels in selected model cell lines and the search for new low molecular weight modulators (activators and inhibitors) of this channel activity. Characterization of new mitoBK_{Ca} channel modulators could contribute to a better understanding of the mechanisms leading to both cytoprotection and cell death.

The aim of this dissertation was to identify the mitochondrial BK_{Ca} channel in human bronchial epithelial cells and to compare the activity of this channel with the exogenous mitochondrial VEDEC isoform of BK_{Ca} channel.

The first part of the dissertation presents the results of electrophysiological studies using the patch-clamp technique, which allowed to characterize the mitoBK_{Ca} channel in bronchial epithelial cells. It is worth noting that this is the first description of a mitochondrial potassium channel in this type of cell in the literature. Then, experiments on the properties of the mitochondrial VEDEC isoform of the BK_{Ca} channel were described in the new developed research model HEK293-BK_DEC cells.

In the next part of this dissertation, the influence of low molecular weight synthetic compounds and of plant origin on the activity of the described mitoBK_{Ca} channels was examined. One of the investigated naringenin derivatives, 7-*O*-prenyl-naringenin, has been shown to activate the mitochondrial channel that occurs endogenously in bronchial epithelial cells and exogenously in HEK293-BK_DEC cells. It was also found that another derivative of flavonoids - chalcone 4', 5, 7-tri-*O*-methyl-naringenin completely inhibits the activity of both tested channels. Experiments were also carried out to identify new potassium channel inhibitors with a structure similar to the channel inhibitor - paxilline. Selected compounds reduced the open probability of the mitoBK_DEC channel but not as effectively as the commonly used paxilline.

In conclusion, this dissertation presents the new localization of the mitochondrial BK_{Ca} channel in bronchial epithelial cells and investigates the properties of the VEDEC isoform of this channel in the newly developed HEK293-BK_DEC cell model. The effect of potential new modulators, synthetic and natural compounds on the activity of mitoBK_{Ca} channels are also presented.

1. Wstęp

Błony biologiczne oddzielają środowisko wewnętrzne komórki od jej otoczenia. Zaliczmy do nich zarówno błony komórkowe oraz błony organelli wewnątrzkomórkowych tworzące przedziały subkomórkowe. Mimo różnych lokalizacji w komórce błony biologiczne składają się z tych samych dwóch podstawowych budulców: lipidów i białek [1]. Błony pełnią wiele funkcji zapewniając odrębność i integralność komórki. Pozwalają utrzymać specyficzną przestrzeń w komórce z odmiennym niż w cytozolu środowiskiem. Bariera tworzona przez błony biologiczne jest półprzepuszczalna, tzn. dzięki wyspecjalizowanym systemom transportu umożliwia kontrolowany przepływ substancji oraz jonów. Transport cząsteczek przez błony biologiczne zapewnia komórce funkcjonalny kontakt ze środowiskiem zewnętrznym oraz jest niezbędny w utrzymaniu procesów życiowych [2].

1.1. Nabłonek dolnych dróg oddechowych

Komórki nabłonka dolnych dróg oddechowych stanowią pierwszą linię obrony przed szkodliwymi czynnikami. Komórki te tworzą barierę fizyczną i biologiczną oddzielającą wnętrze układu oddechowego od środowiska zewnętrznego [3]. Zapobiegając tym samym uszkodzeniom na skutek działania czynników zewnętrznych, np. cząsteczek pyłów zawieszonych we wdychanym powietrzu lub drobnoustrojom chorobotwórczym. Ścisłe ułożenie komórek nabłonka oskrzelowego tworzy naturalną barierę biologiczną uniemożliwiającą wnikaniu patogenów. Inną charakterystyczną cechą jest wydzielanie śluzu przez komórki nabłonka, który umożliwia usuwanie, np. bakterii, grzybów czy alergenów, z układu oddechowego. Nadmiar patogenów i substancji toksycznych może doprowadzać do uszkodzenia bariery komórkowej w nabłonku oskrzelowym, tworząc stany zapalne [4, 5]. Komórki nabłonka oskrzelowego w sytuacji stresowej muszą uruchomić mechanizmy obronne przeciwdziałające śmierci. Znanym mechanizmem protekcji komórek serca i neuronów jest aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych. W związku z tym interesujące jest zbadanie obecności kanałów potasowych w mitochondriach komórek nabłonka oskrzelowego.

1.2. Rola jonów potasu w metabolizmie komórki

Większość komórek eukariotycznych posiada podobny skład jonowy w cytoplazmie: niskie stężenie jonów wapnia i sodu oraz wysokie stężenie jonów potasu [6]. Stężenie jonów K^+ w komórce osiąga 150 mM, natomiast w przestrzeni zewnątrzkomórkowej stężenie wynosi około 4 mM [7, 8]. Różnica stężeń jonów potasu w cytoplazmie i środowisku zewnątrzkomórkowym wpływa na polaryzację błony komórkowej i decyduje o powstaniu różnicy potencjałów. Zjawisko to ma fundamentalne znaczenie w procesach komórkowych, takich jak przewodzenie impulsów nerwowych czy skurcz mięśni (w tym mięśnia sercowego) [9, 10]. Zmiany gradientu jonów K^+ mogą powodować hiperpolaryzację lub depolaryzację błony komórkowej [11]. Wykazano, że niewielkie zmiany stężenia jonów potasu w osoczu krwi mogą prowadzić do poważnej dysfunkcji mięśni, powodującej niewydolność oddechową, a nawet zatrzymanie akcji serca [12]. Zatem regulacja transportu jonów K^+ przez błonę komórkową jest jednym ze sposobów utrzymywania tzw. równowagi potasowej organizmu [10].

Błony biologiczne stanowią półprzepuszczalną barierę dla transportu cząsteczek w komórkach [2, 13]. Cząsteczki nieposiadające ładunku elektrycznego mogą dyfundować przez błony zgodnie z gradientem stężeń [10, 14]. Natomiast transport, naładowanych cząsteczek jest możliwy z wykorzystaniem błonowych białek transportujących, m. in.: kanałów jonowych, nośników oraz pomp. Obecność błonowych białek transportujących umożliwia dyfuzję ułatwioną cząsteczek zarówno zgodnie jak i wbrew ich gradientowi stężeń [15].

Kanały jonowe tworzą pory, które umożliwiają szybkie przenikanie kationów lub anionów przez błony biologiczne. Białka błonowe takie jak nośniki oraz pompy zapewnią relatywnie wolniejszy transport cząsteczek, związany ze zmianą konformacji białek transportujących [16, 17]. Dyfuzja z wykorzystaniem białek kanałowych zachodzi zgodnie z gradientem elektrochemicznym jonów i nie wymaga dostarczenia energii. Natomiast transport aktywny, z udziałem pomp, zachodzi z wykorzystaniem energii uwolnionej w wyniku hydrolizy cząsteczki ATP (adenozynotryfosforanu), podczas którego jony przemieszczają się wbrew gradientowi stężeń [18-20].

Zachowanie odpowiedniej homeostazy jonowej w komórce jest niezbędne do prawidłowego jej funkcjonowania. Wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe stężenie jonów potasu jest znacząco różne, dlatego do utrzymania tej różnicy wymagany jest

transport aktywny. W 1957 roku odkryta została pompa sodowo-potasowa ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-aza}$), znajdująca się w błonie plazmatycznej w zdecydowanej większości komórek eukariotycznych [21-23]. Pompa sodowo-potasowa katalizuje transport jonów Na^+ i K^+ przez błonę wbrew gradientowi ich stężeń. Pompuje ona 3 jony sodu z komórki i 2 jony potasu do komórki, zużywając energię z hydrolizy 1 cząsteczki ATP [24, 25]. Pompa sodowo-potasowa utrzymuje wyższe stężenie jonów potasu w komórce oraz wyższe zewnątrzkomórkowe stężenie jonów sodu. Gradient stężeń tych jonów ma kluczowe znaczenie, między innymi dla procesów metabolicznych zachodzących w komórkach oraz jest niezbędny w stabilizowaniu spoczynkowego potencjału błonowego komórek [26].

Kanały potasowe umożliwiają selektywny transport jonów potasu zgodnie z gradientem elektrochemicznym. Kanały potasowe występują w większości typów komórek eukariotycznych oraz stanowią najliczniejszą rodzinę błonowych białek transportujących [27]. Aktywacja kanałów potasowych umożliwia szybki i selektywny transport jonów potasu z komórki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, wpływając tym samym na zmianę potencjału błonowego, powodując hiperpolaryzację błony komórkowej [28]. Kanały te są zatem niezbędne dla funkcjonowania komórek pobudliwych, takich jak kardiomiocyty, neurony. Jednak są również zaangażowane w wiele procesów w komórkach niepobudliwych [29].

Ponadto, jony potasu wpływają na funkcje komórki, między innymi przez regulację białek zależnych od jonów jednowartościowych. Na przykład enzym biorący udział w glikolizie - kinaza pirogronianowa, przekształcająca fosfoenolpirogronian do pirogronianu i ATP, wymaga do przeprowadzenia reakcji obecności jonów potasu [30]. W ostatnim czasie wykazano również, że działanie katalityczne innego enzymu – heksokinazy, biorącego udział w glikolizie, jest także zależne od jonów K^+ . Udowodniono, że proces katalizowany przez ten enzym, czyli fosforylacja glukozy do glukozy-6-fosforanu jest znacznie utrudniony, kiedy jony potasu są nieobecne [31, 32].

Kanały potasowe, oprócz błony komórkowej, obecne są również w błonach organelli wewnątrzkomórkowych, takich jak, np. jądro komórkowe, siateczka śródplazmatyczna oraz mitochondria. Kanały jonowe w błonach przedziałów subkomórkowych umożliwiają transport jonów potasu do wnętrza organelli. Jony K^+ w organellach

komórkowych zaangażowane są w prawidłowe funkcjonowanie komórki. Udział tych jonów w procesach komórkowych opisano w dalszej części rozprawy.

Siateczka śródplazmatyczna to wewnątrzkomórkowe organellum, odpowiedzialne głównie za syntezę, fałdowanie i dojrzewanie białek [33]. Inną funkcją siateczki jest magazynowanie jonów wapnia, których stężenie jest 1 000 – 10 000 razy większe niż w cytozolu. Wysokie stężenie jonów wapnia w siateczce śródplazmatycznej jest niezbędne do działania enzymów, podczas fałdowania białek [34]. Funkcje siateczki śródplazmatycznej mogą być zakłócone przez napływ jonów potasu. Ich nadmiar uniemożliwia gromadzenie jonów wapnia, w konsekwencji powodując dysfunkcję enzymów [35].

Inną strukturą wewnątrzkomórkową, w której błonach zidentyfikowano kanały potasowe to wewnętrzna błona jądra komórkowego [36]. Wykazano, że jony potasu obecne w jądrze komórkowym stabilizują struktury przestrzenne, wytworzone przez sekwencje bogate w guaninę, umożliwiając oddziaływanie łańcuchów G-kwadrupleksów między sobą [37]. Kolejną funkcją jonów potasu obecnych w jądrze komórkowym jest regulacja aktywności czynników transkrypcyjnych. Na przykład, wykazano, że jony K^+ wpływają na transkrypcję niektórych genów [38, 39].

Mitochondria to kolejne organelle subkomórkowe w błonach których zlokalizowane są kanały potasowe. Obecność jonów potasu w mitochondriach ma kluczową rolę dla funkcjonowania komórki [40]. Poniżej opisano budowę mitochondriów oraz znaczenie transportu jonów potasu w tych organellach.

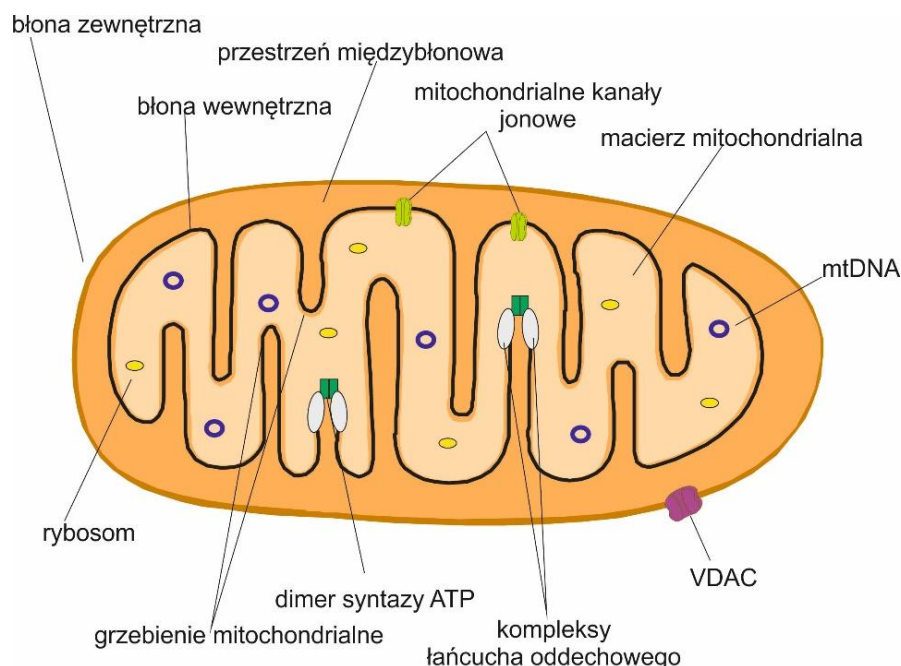
1.3. Budowa i funkcje mitochondriów

Mitochondria to struktury wewnątrzkomórkowe obecne w większości eukariotycznych komórek. Ich główną funkcją jest synteza cząsteczek ATP. Mitochondria najliczniej występują w komórkach tkanek o zwiększonym zapotrzebowaniu energetycznym, np. wątroby, mięśni szkieletowych, mózgu czy sercu. Organelle te różnią się między sobą kształtem czy wielkością, która wynosi od 2 do 8 μm [41]. Wykazano, że mitochondria nie występują w komórce pojedynczo a tworzą złożone struktury dzięki zdolności przemieszczania się, łączenia i rozdzielania się. Struktury te są wysoce dynamiczne, przechodzące skoordynowane cykle podziałów i fuzji z innymi

mitochondriami. Pozwala to utrzymać ich kształt, rozmiar oraz określone rozmieszczenie w komórce [42].

Mitochondria otoczone są dwiema błonami, które tworzą dwa różne przedziały: przestrzeń międzybłonową i macierz mitochondrialną. Przestrzeń międzybłonowa znajduje się między zewnętrzną i wewnętrzną błoną mitochondrialną. Natomiast macierz mitochondrialna to przedział ograniczony przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, który zawiera enzymy zaangażowane w proces przekształcania energii [41]. W macierzy mitochondrialnej znajduje się kilka cząsteczek mitochondrialnego kwasu deoksyrybonukleinowego (mtDNA, *ang. mitochondrial deoxyribonucleic acid*). Na jedno mitochondrium przypada od 2 do 10 kopii tego genomu, który zawiera 37 genów kodujących białka, m.in. 13 polipeptydów wchodzących w skład mitochondrialnego łańcucha oddechowego [43, 44]. Mitochondrialny materiał genetyczny jest bardziej narażony na powstawanie mutacji niż jądrowe DNA, ze względu na obecność reaktywnych form tlenu (RFT; *ang. reactive oxygen species, ROS*), syntetyzowanych przez mitochondrialny łańcuch oddechowy [45]. Jednak zdecydowana większość białek mitochondrialnych kodowana jest przez genom jądrowy. Oprócz mtDNA, w macierzy mitochondrialnej zlokalizowane są również białka enzymatyczne zaangażowane w cykl kwasu cytrynowego oraz β -oksydację kwasów tłuszczowych [46]. Schemat budowy mitochondrium przedstawiono na Rycinie 1.

Wewnętrzna błona mitochondrialna otaczająca macierz jest silnie pofałdowana tworząc charakterystyczne wgłębienia błony zwane grzebieniami. W wyniku tego powierzchnia błony jest znacznie większa w porównaniu do zewnętrznej błony mitochondrialnej [41]. Organizację wewnętrzną błony mitochondrialnej umożliwia obecność, m. in. białka OPA1, dimerów syntazy ATP oraz kompleksu mitochondrialnego miejsca kontaktu i systemu organizowania grzebienia (MICOS, *ang. mitochondrial contact site and cristae-organizing system*) [47, 48]. Błona grzebieni mitochondrialnych charakteryzuje się wysoką zawartością białek (około 80%) w stosunku do fosfolipidów, znajdują się w niej: białka łańcucha oddechowego, syntazy ATP oraz błonowe białka transportujące, m.in. transportery substratów mitochondrialnych, translokaza ATP/ADP itd.



Rycina 1. Schemat budowy mitochondrium. Zaznaczono zewnętrzną i wewnętrzną błonę, przestrzeń międzybłonową, macierz mitochondrialną, mitochondrialne kanały jonowe, mtDNA (mitochondrialne DNA), VDAC (kanał anionowy zależny od napięcia), kompleksy łańcucha oddechowego, dimer syntazy ATP, grzebienie mitochondrialne oraz rybosomy. Rysunek własny na podstawie publikacji [41, 48].

Mitochondrialny łańcuch oddechowy (ETC, *ang. electron transport chain*) składa się z białkowych kompleksów. Posiadają one zdolność przenoszenia elektronów oraz transportu protonów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla jonów H^+ . Białka łańcucha oddechowego transportują protony do przestrzeni międzybłonowej, tworząc gradient elektrochemiczny na wewnętrznej błonie. Do w/w białkowych kompleksów należą oksydoreduktaza NADH – koenzymu Q (kompleks I), reduktaza bursztynianowa – koenzymu Q (kompleks II), oksydoreduktaza koenzymu Q - cytochromu c (kompleks III) oraz oksydaza cytochromu c (kompleks IV). Trzy z czterech kompleksów łańcucha oddechowego (kompleks I, III i IV) transportują protony przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Powrotny przepływ protonów do macierzy mitochondrialnej zachodzi poprzez kanał protonowy w syntazie ATP, dzięki czemu możliwa jest reakcja syntezy cząsteczki ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego P_i [49, 50].

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej występują również kanały jonowe, które umożliwiają transport jonów pomiędzy macierzą a przestrzenią międzybłonową.

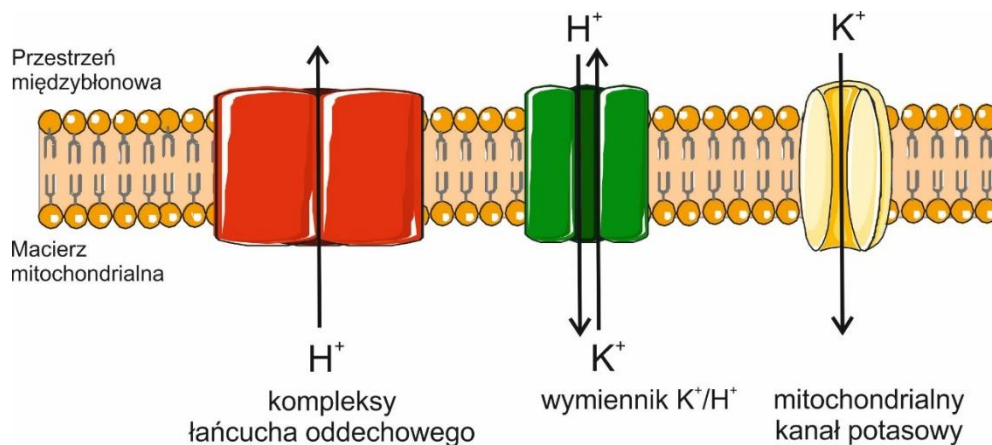
Najnowsze badania sugerują, że zmiany konformacyjne w wielobiałkowym kompleksie syntazy ATP odgrywają znaczącą rolę w konstytuowaniu mitochondrialnego megakanalu - mitoPTP (*ang. mitochondrial permeability transition pore*) [51]. Otwarcie mitoPTP umożliwia swobodny transport do macierzy cząsteczek o masie <1,5 kDa, powodując pęcznienie mitochondriów. Stres oksydacyjny, wysokie stężenie jonów wapnia, fosforanów i zaburzenia stężenia nukleotydów adeninowych, sprzyja otwarciu mitoPTP w wewnętrznej błonie. Wykazano również, że aktywacja mitoPTP powiązana jest z indukcją apoptozy w komórce [52, 53].

Zewnętrzna błona mitochondrialna oddzielająca mitochondria od cytoplazmy, jest przepuszczalna dla stosunkowo dużych cząsteczek o masie <5kDa. Transport jonów oraz metabolitów jest możliwy m.in. przez kanał anionowy zależny od napięcia VDAC (*ang. voltage - dependent anion channel*) [54]. Kanał VDAC, zwany także poryną mitochondrialną, przez swoją dużą przepuszczalność dla różnych substancji pełni ważną funkcję. Między innymi, kontroluje wzajemne funkcjonalne oddziaływanie między mitochondriami a wnętrzem komórki oraz warunkuje proces apoptozy [53, 55].

1.3.1. Znaczenie transportu jonów potasu w mitochondriach

Wewnątrzkomórkowe stężenie jonów potasu jest wyższe w porównaniu do środowiska zewnątrzkomórkowego, jak opisano w Rozdziale 1.2. *Rola jonów potasu w metabolizmie komórki*. W mitochondriach stężenie tych jonów jest porównywalne do ich zawartości w cytozolu. Jony potasu mogą przenikać przez obie błony mitochondrialne. Wewnętrzną błonę mitochondrialną charakteryzuje potencjał elektrochemiczny w zakresie od -180 do -200 mV (ujemny wewnątrz mitochondrionu), powstały w wyniku różnicy stężeń protonów po obu stronach błony. Ujemny potencjał po wewnętrznej stronie błony ułatwia szybki transport jonów K^+ do macierzy mitochondrialnej, mimo ograniczonej przepuszczalności tej błony. W mitochondrialnej błonie wewnętrznej zlokalizowanych jest wiele kanałów selektywnie transportujących jony potasu do macierzy mitochondrialnej. W błonie tej występuje również białko tzw. wymiennik K^+/H^+ (*ang. K^+/H^+ exchanger*) transportujący protony do macierzy a jony potasu do przestrzeni międzybłonowej [56, 57]. Białko to zabezpiecza mitochondria przed nadmierną akumulacją jonów potasu w macierzy mitochondrialnej, co może prowadzić do zbytniego pęcznienia mitochondriów.

Transport jonów potasu przez błony mitochondrialne odgrywa bardzo ważną rolę w fizjologii komórki, decydując o prawidłowej objętości mitochondriów. W 1961 roku Peter Mitchell sformułował teorię chemiosmotyczną, zgodnie z którą transport elektronów przez łańcuch oddechowy mitochondriów prowadzi do przepływu protonów z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Proces ten umożliwia tworzenie gradientu H^+ , który jest bezpośrednio związany z syntezą ATP [58]. Natomiast aby zapobiec pęcznieniu i lizie mitochondriów, musi istnieć zrównoważony transport jonów. Transport protonów jest powiązany z przepływem innych kationów. Na Rycinie 2 przedstawiono przykład jak transport jonów potasu przez wewnętrzną błonę mitochondrialną jest związany z transportem protonów. Teoria chemiosmotyczna znalazła odzwierciedlenie w badaniach prowadzonych wiele lat później, w których wykazano, że zarówno kanały potasowe w wewnętrznej błonie mitochondrialnej jak i wymiennik K^+/H^+ są ważne dla funkcjonowania mitochondriów [57, 59].



Rycina 2. Schemat tzw. „cyklu potasowego” w mitochondriach opisanego w ramach teorii chemiosmotycznej. Na schemacie zaznaczono kompleksy łańcucha oddechowego transportujące protony do przestrzeni międzybłonowej, wymiennik K^+/H^+ oraz mitochondrialny kanał potasowy. Rysunek własny na podstawie publikacji [40].

Mitochondrialny „cykl potasowy” składa się z następujących etapów zachodzących w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Potencjał elektrochemiczny wytworzony podczas transportu protonów przez białka kompleksów łańcucha oddechowego, sprzyja napływowi K^+ do macierzy mitochondrialnej przez kanały potasowe (mitoK). W wyniku działania łańcucha oddechowego dochodzi do zmiany pH w macierzy mitochondrialnej na bardziej zasadowe, co sprzyja również transportowi grupy fosforanowej (P_i) wraz

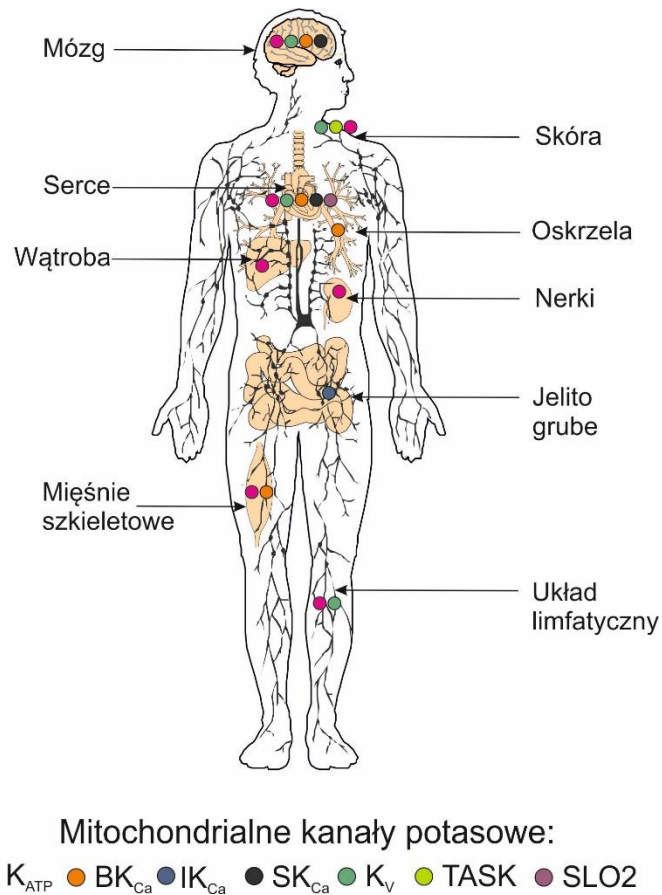
z protonem, na zasadzie symportu. Aby zapobiec pęcznieniu mitochondriów nadmiar K^+ z macierzy jest usuwany przez wymiennik K^+/H^+ [40, 58].

1.3.2. Kanały potasowe w mitochondriach: występowanie i funkcje

Mitochondrialne kanały potasowe zostały zidentyfikowane w latach dziewięćdziesiątych XX wieku z wykorzystaniem techniki elektrofizjologicznej *patch-clamp*. Pierwszym opisanym kanałem był kanał potasowy hamowany przez ATP (kanał $mitoK_{ATP}$, ang. *ATP-regulated mitochondrial potassium channel*) z mitochondriów komórek wątroby szczura [60]. W ostatnich trzydziestu latach dzięki intensywnym badaniom, mitochondrialne kanały potasowe zostały odkryte w tkankach pochodzących z różnych organizmów, w tym człowieka. Na Rycinie 3 przedstawiono lokalizację mitochondrialnych kanałów potasowych w organizmie ludzkim. Podczas przeprowadzanych badań zaobserwowano, że $mitoK$ wpływają na integralność wewnętrznej błony mitochondrialnej, prowadząc do regulacji funkcji mitochondriów, takich jak szybkość oddychania oraz synteza reaktywnych form tlenu [40, 59]. Kanały potasowe w mitochondriach mogą oczywiście także regulować potencjał błonowy. Doniesienia literaturowe wykazują również, że mitochondrialne kanały potasowe wpływają na złożone procesy zachodzące w komórce, takie jak cytoprotekcja oraz apoptoza [61-64].

Mitochondrialne kanały potasowe są podobne do kanałów potasowych zlokalizowanych w błonie komórkowej, są ich „lustrzanym odbiciem”. Podobieństwo dotyczy ich budowy molekularnej, właściwości biofizycznych oraz farmakologicznych. Za pomocą techniki elektrofizjologicznej *patch-clamp* oraz z wykorzystaniem specyficznych modulatorów kanałów potasowych możliwa stała się ich identyfikacja w mitochondriach. Scharakteryzowano kilka kanałów potasowych znajdujących się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, m.in. hamowany przez ATP (kanał $mitoK_{ATP}$) [60], mitochondrialne kanały potasowe regulowane jonami wapnia o dużym/średnim/małym przewodnictwie (kanały $mitoBK_{Ca}/mitoIK_{Ca}/mitoSK_{Ca}$, ang. *mitochondrial large-/intermediate-/small- conductance calcium-regulated K^+ channel*) [65-67], mitochondrialny kanał potasowy bramkowany napięciem, np. $mitoKv1.3$ (kanał $mitoKv1.3$ ang. *mitochondrial voltage-gated potassium channels*) [68], mitochondrialny tzw. dwuporowy kanał potasowy TASK-3 (kanał $mitoTASK-3$, ang. *tandem pore domain*

acid-sensitive K channels) [69] oraz aktywowany jonami sodu mitochondrialny kanał potasowy (kanał mitoSlo2, *ang. mitochondrial sodium-activated potassium channel*) [70].



Rycina 3. Lokalizacja tkankowa mitochondrialnych kanałów potasowych (mitoK) w organizmie człowieka. Rysunek własny na podstawie [71].

Kanały mitoK obecne są w wielu tkankach i prawdopodobnie istnieją tkanki, w których nie odkryto jeszcze mitoK. Kompletowanie danych na ten temat jest trudne i wymaga, m. in. informacji dotyczących ekspresji genu kodującego konkretne białko kanałowe, lokalizacji białka w wewnętrznej błonie mitochondrialnej oraz potwierdzenia tej informacji poprzez pomiar aktywności kanałów z wykorzystaniem techniki elektrofizjologicznej *patch-clamp*. Ponadto ekspresja mitochondrialnych kanałów potasowych jest stosunkowo niska w porównaniu do innych białek mitochondrialnych, takich jak kompleksy łańcucha oddechowego, poryna mitochondrialna czy translokaza

ATP/ADP [72]. Obecność kanału mitoK_{ATP} została potwierdzona, m.in. w wątrobie [60], fibroblastach skóry [73], sercu [74], mózgu [75], mięśniach szkieletowych [76] i nerkach [77].

1.4. Udział mitochondrialnych kanałów potasowych w cytoprotekcji oraz śmierci komórkowej

Aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych, tzn. ich aktywacja lub hamowanie może regulować procesy komórkowe prowadzące do przeżycia lub śmierci komórki. Pomimo intensywnych badań, szczegółowa rola kanałów mitoK w tych procesach nie jest w pełni poznana. Wykazano, że otwarcie (aktywacja) mitochondrialnych kanałów potasowych i napływ jonów potasu do macierzy, indukuje szereg zdarzeń prowadzących do cytoprotekcji, czyli ochrony komórki przed śmiercią [40]. Zastosowanie diazoksydu, związku będącego aktywatorem kanału mitoK_{ATP}, indukowało cytoprotekcję komórek serca. Efekt ten był zahamowany po zastosowaniu kwasu 5-hydroksydekanowego (5-HD, *ang. 5-hydroxydecanoic acid*) – inhibitora kanału mitoK_{ATP}. [78, 79]. Dalsze badania wykazały, że kanał mitoK_{ATP} indukuje cytoprotekcję również w mózgu, podczas niedokrwienia aktywator kanałów potasowych - diazoksyd zmniejszał śmierć neuronów [80]. Stąd konkluzja, że mitochondrialny kanał potasowy mitoK_{ATP} zaangażowany jest w zjawisko kardio- i neuroprotekcji.

Aktywacja kanału mitoBK_{Ca}, zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej prowadzi do indukcji procesów ochronnych w komórkach. Wykazano, że zastosowanie aktywatora kanałów potasowych NS1619 zapobiegło uszkodzeniom komórek serca pochodzących ze świnki morskiej w modelu niedokrwienia/reperfuzji. Dobroczynny efekt był hamowany przez paksylinę (pax) - inhibitor kanału mitoBK_{Ca} [81] Aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie mitoBK_{Ca} powiązana jest również ze zmniejszoną śmiercią komórek neuronalnych, co oznacza, że indukuje on także proces neuroprotekcji [82].

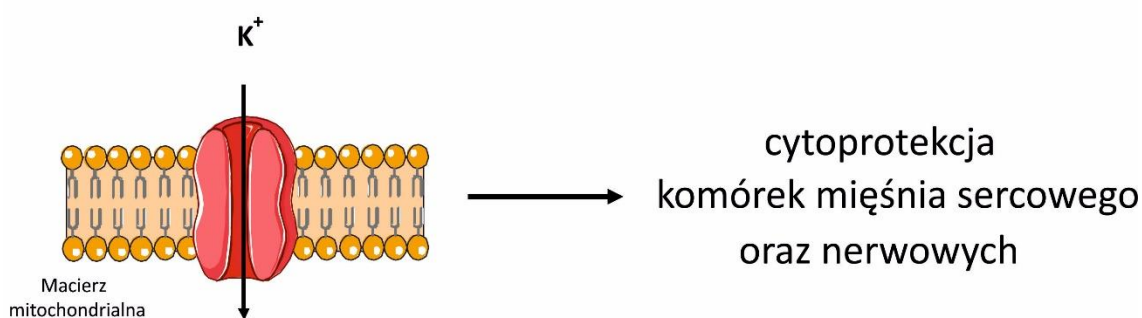
Mechanizm cytoprotekcji z udziałem mitochondrialnych kanałów potasowych jest skomplikowany i nadal wymaga pełnego wyjaśnienia. Jedną z hipotez wskazuje powiązanie aktywacji kanałów mitoK z regulacją syntezy reaktywnych form tlenu (RFT). Podczas niedotlenienia/reperfuzji tkanek obserwowano zwiększoną syntezę RFT, po powtórny przywróceniu krążenia [83]. Efekt ten jest pośrednio związany z potencjałem

wewnętrznej błony mitochondrialnej, a napływ jonów potasu po otwarciu kanałów mitoK, prowadził do zmniejszenia syntezy mitochondrialnych RFT [62, 83]. Innym efektem aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych jest ograniczenie napływu jonów wapnia do macierzy mitochondrialnej. Akumulacja jonów wapnia w macierzy skutkuje otwieraniem, tzw. mitochondrialnego megakanalu (mitoPTP) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej czy pęcznieniem mitochondriów. W efekcie akumulacji jonów Ca^{2+} obserwowano również, pęknięcie zewnętrznej błony mitochondrialnej co prowadzi do uwalniania cytochromu c. Proces ten indukuje śmierć komórkową na drodze apoptozy. Aktywacja kanałów potasowych oraz zwiększony napływ jonów K^+ do wnętrza mitochondrium depolaryzuje błonę mitochondrialną i zmniejsza nadmierną akumulację jonów wapnia, co w konsekwencji chroni komórkę przed apoptozą [84, 85].

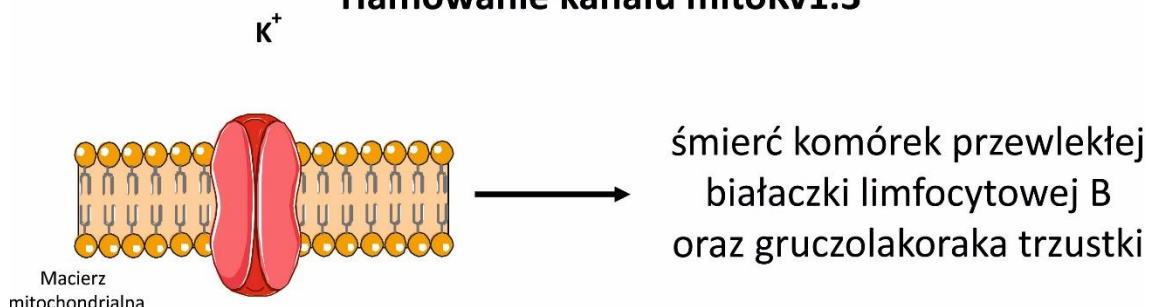
Kanały potasowe z wewnętrznej błony mitochondrialnej regulują nie tylko proces cytoprotekcji, ale również mogą indukować śmierć komórki. Zaobserwowano, że mitochondrialny kanał Kv1.3 wykazuje znacznie wyższą ekspresję w komórkach nowotworowych, a bezpośrednie hamowanie kanału przez specyficzne inhibitory prowadzi do zmian w funkcjonowaniu mitochondriów oraz apoptozy komórek [86]. Inhibitory tego kanału spowodowały selektywną śmierć komórek nowotworowych przewlekłej białaczki limfocytowej B, nie wpływając na zdrowe komórki. Natomiast w innym modelu badawczym, hamowanie aktywności kanału mitoKv1.3 wykazało zmniejszenie rozmiarów guza gruczolaka trzustki, jednocześnie nie wpływając na funkcjonowanie układu odpornościowego oraz serca [64]. Proponowany mechanizm indukcji apoptozy przez zahamowanie kanału mitoKv1.3 opiera się na regulacji poziomu RFT. Hamowanie kanału mitoKv1.3, a więc brak napływu jonów potasu, prowadzi do hiperpolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej, następnie dochodzi do wzrostu syntezy RFT, co indukuje otwarcie megakanalu mPTP. Efektem wymienionych zdarzeń jest uwolnienie cytochromu c, cząsteczki inicjującej proces śmierci komórkowej [64, 86].

Odkrycia ostatnich lat sugerują, że mitochondrialne kanały potasowe mogą stanowić bardzo ważny cel w kontrolowaniu funkcji różnych komórek. Specyficznie działające związki chemiczne, powodujące aktywację kanału mitoK w tkankach podatnych na uszkodzenie lub hamowanie w komórkach nowotworowych, mogą stać się obiecującymi lekami. Dlatego w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto badania dotyczące scharakteryzowania nowych modulatorów mitochondrialnych kanałów potasowych.

Aktywacja kanału $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ i $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$



Hamowanie kanału mitoKv1.3



Rycina 4. Schemat efektów regulacji mitochondrialnych kanałów potasowych. Górny panel przedstawia aktywację kanałów $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ i $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, która powoduje napływ jonów potasu do macierzy mitochondrialnej, w konsekwencji cytoprotekcję komórek mięśnia sercowego oraz nerwowych. Natomiast dolny panel prezentuje hamowanie kanału mitoKv1.3 oraz efekt prowadzący do śmierci komórek przewlekłej białaczki limfocytowej oraz gruczolakoraka trzustki. Rysunek własny na podstawie informacji z publikacji [64,78].

1.5. Kanał potasowy o dużym przewodnictwie typu BK_{Ca}

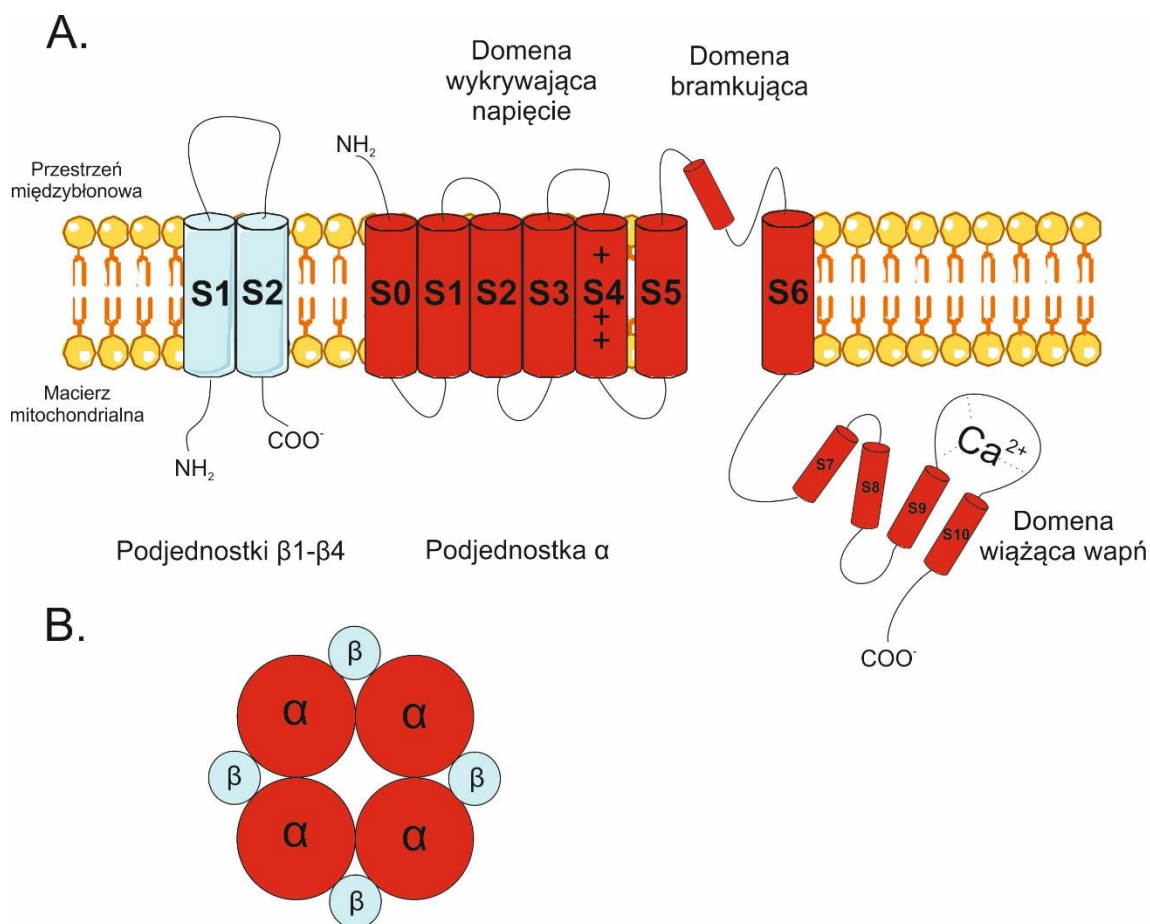
W 1981 roku po raz pierwszy w błonie plazmatycznej w szczurzych komórkach mięśniowych został opisany kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia (kanał BK_{Ca}) [87]. Obecnie wiadomo, że kanał ten występuje zarówno w komórkach pobudliwych jak i niepobudliwych. Kanał BK_{Ca} bierze udział w wielu procesach komórkowych, m. in. w repolaryzacji potencjału czynnościowego, pobudliwości komórek neuronalnych, uwalnianiu neuroprzebieżników czy wydzielaniu hormonów [88]. Udział w tych procesach jest możliwy ze względu na wysokie przewodnictwo kanału wynoszące ok. 300 pS oraz wpływ na zmiany potencjału błony komórkowej [89]. Ponadto, kanał ten zidentyfikowano w wewnątrzkomórkowych przedziałach otoczonych podwójną błoną. Jego obecność potwierdzono w jądrze

komórkowym - nBK_{Ca} (*ang. nuclear BK_{Ca}*, jądrowy kanał BK_{Ca}) oraz w mitochondrium - mitoBK_{Ca} [90].

Kanał mitoBK_{Ca} w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, został zidentyfikowany w ludzkich komórkach glejaka linii LN229, z wykorzystaniem techniki elektrofizjologicznej *patch-clamp* [65]. Kolejne badania wykazały obecność kanału mitoBK_{Ca} również w mózgu [91], mięśniach szkieletowych [92], sercu [81], komórkach endotelialnych [93] oraz fibroblastach skóry [94].

1.5.1. Struktura i izoformy kanału

Struktura mitochondrialnego kanału BK_{Ca} jest podobna do kanału występującego w błonie komórkowej. Funkcjonalny kanał występuje w postaci tetrameru podjednostek α , tworzącego por kanału, przez który możliwy jest transport jonów potasu. Każda podjednostka α zawiera siedem przezbłonowych domen S0-S6, przedstawionych na Rycinie 5A. Wśród nich opisano regiony wpływające na regulację kanału, wyróżniono domenę wrażliwą na napięcie (VSD, S0-S4; *ang. voltage sensing domain*), domenę bramkującą (PGD, S5-S6; *ang. pore-gate domain*) oraz domenę S7-S10 znajdującą się w macierzy mitochondrialnej wiążącą wapń (RCK1 i RCK2, *ang. regulator of conductance of K⁺*) [88, 95]. Poszczególne domeny obecne w strukturze podjednostki α odpowiadają za właściwości biofizyczne kanału. Odpowiedzialne są za regulację przenikania jonów potasu w zależności od zmian napięcia błony, obecności jonów wapnia czy ligandów. Ponadto kanał BK_{Ca} może być zależny od podjednostek regulatorowych β (β 1- β 4) [96] oraz γ (γ 1- γ 4) [97]. Podjednostki β składają się z dwóch segmentów przezbłonowych S1-S2 (Rycina 5A), które wpływają na właściwości kanału. Wykazano, że zwiększają wrażliwość kanału na jony Ca²⁺ i napięcie, spowalniając tym samym aktywację kanału BK_{Ca} [98]. Podjednostki regulatorowe β towarzyszą kanałowi BK_{Ca} w większości tkanek, w których są obecne, modyfikując właściwości bramkowania kanału. Obecność podjednostek β w mitochondrialnym kanale BK_{Ca}, jest specyficzna tkankowo, co oznacza, że kanały mitoBK_{Ca} z różnych tkanek, charakteryzują się odmiennym składem podjednostek regulatorowych, np. w kardiomiocytach zidentyfikowano podjednostkę β 1, która wpływa na aktywność kanału mitoBK_{Ca} [99].



Rycina 5. Schemat przedstawiający strukturę kanału BK_{Ca}. **(A)** Budowa podjednostki α (czerwona) z zaznaczonymi segmentami przezbłonowymi S0-S6 wraz z wyszczególnieniem domeny wrażliwej na napięcie, domeny bramkującej i segmentami S7-S10 znajdującą się w macierzy mitochondrialnej wiążącą oraz podjednostki β 1- β 4 (niebieska); **(B)** Przedstawiono schemat tetrameru podjednostek α , tworzących por kanału wraz z obecnością podjednostek regulatorowych β . Rysunek własny na podstawie [100].

Podjednostki α i β 1- β 4 kanału BK_{Ca} kodowane są przez geny, odpowiednio *KCNMA1* oraz *KCNMB1-4* [101]. Gen kodujący podjednostkę α podlega alternatywnemu składaniu w wyniku czego powstają izoformy kanału BK_{Ca}, których występowanie wiąże się ze specyficznością tkankową. Zaobserwowano, że izoforma kanału BK_{Ca}-VEDEC podjednostki α jest obecna w mitochondriach wyizolowanych z komórek serca. Ta izoforma kanału charakteryzuje się specyficzną sekwencją 50 aminokwasów, gdzie 5 ostatnich aminokwasów na C-końcu białka podjednostki α to VEDEC. Wykazano również, że ta specyficzna obecność aminokwasów stanowi sekwencję kierującą kanał mitoBK_{Ca} do wewnętrznej błony mitochondrialnej [102]. Innym zaobserwowanym

wariantem mitoBK_{Ca} w komórkach glejaka mózgu jest wariant STREX, który jest mechanoczuły [103].

1.5.2. Regulacja kanału przez zmiany napięcia oraz jony wapnia

Mitochondrialny kanał BK_{Ca} różni się od wszystkich innych kanałów potasowych wysoką wrażliwością na zmiany stężeń jonów wapnia w macierzy mitochondrialnej oraz zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Za regulację odpowiadają wspomniane w poprzednim Rozdziale 1.5.1. *Struktura i izoformy kanału* domeny obecne w strukturze podjednostki α oraz obecność podjednostek β . Domena wykrywająca napięcie, reaguje na zmiany potencjału błony, podczas gdy domena bramkująca powoduje otwieranie i zamykanie kanału, aby kontrolować przepływ jonów potasu. W przezbłonowym segmencie S4 obecne są dodatkowo naładowane aminokwasy, będące czujnikiem zmian napięcia błony mitochondrialnej, które wpływają na otwieranie lub zamykanie kanału [88, 104]. Ponadto obecność domen wiążących jony wapnia (RCK1 i RCK2) oraz podjednostek β reguluje aktywności mitoBK_{Ca} w zależności od stężenia jonów wapnia. W domenach RCK zlokalizowanych w macierzy mitochondrialnej, zidentyfikowano dwa przypuszczalne miejsca wiązania jonów Ca²⁺: jedno w domenie RCK1 i drugie w domenie RCK2 [105]. Wzrost stężenia jonów wapnia w macierzy mitochondrialnej powoduje zwiększenie aktywności kanału mitoBK_{Ca} [94].

1.5.3. Inne substancje regulujące aktywność kanału BK_{Ca}

Aktywności kanału mitoBK_{Ca} oprócz endogennych czynników jest regulowana również przez związki syntetyczne oraz pochodzenia naturalnego. Specyficznie aktywatory kanału to między innymi NS11021 (N'-[3,5-Bis (trifluorometylo) fenylo]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-ilo) fenylo]-tiomocznik) [93] oraz NS1619 (1,3-Dihydro-1[2-hydroksy-5-(trifluorometylo)fenylo]-5-(trifluorometylo)-2H-benzimidazol-2-on) [102] aktywujące kanał w mitochondriach odpowiednio komórek endotelialnych oraz komórek serca. Innym opisanym związkiem zwiększającym aktywność mitoBK_{Ca} jest CGS7184 (1 - [[(4-chlorofenylo) amino] okso]-2-hydroksy-6-trifluorometylo-1H-indolo-3-karboksylan etylu) w komórkach glejaka mózgu [106]. Ponadto do regulatorów pochodzenia naturalnego zaliczyć można flawonoid – naringeninę, zwiększającą prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_{Ca} w fibroblastach skóry [107] oraz

kwercetynę aktywującą kanał mitochondrialny w komórkach śródbłonka [108]. Do selektywnie hamujących substancji zalicza się, paksylinę, blokującą kanał mitoBK_{Ca} między innymi w komórkach glejaka mózgu [109]. Zaobserwowano, że inne substancje, pochodzenia naturalnego, takie jak iberiotoksyna (IbTx, *ang. iberiotoxin*), charybdotoksyna (ChTx, *ang. charybdotoxin*), również zmniejszają prawdopodobieństwo otwarć kanału potasowego typu BK_{Ca} [110, 111]. Pomimo zidentyfikowania wielu substancji regulujących aktywność kanałów BK_{Ca} nadal poszukuje się substancji działających specyficznie na aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych.

1.6. Właściwości i funkcje niskocząsteczkowych związków syntetycznych i pochodzenia naturalnego

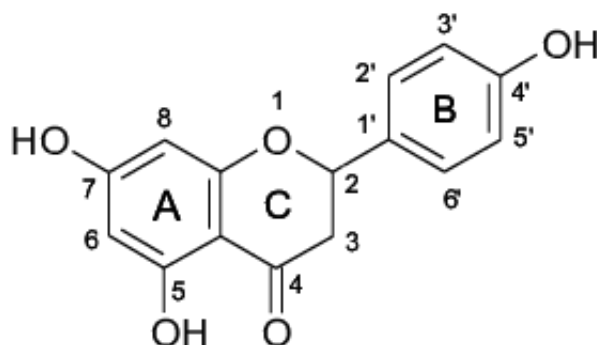
Związki chemiczne niskocząsteczkowe charakteryzują się ilością około 100 atomów w cząsteczce a ich pochodzenie może być naturalne albo syntetyczne. Związki naturalne to takie, których źródłem są żywe organizmy, np. rośliny. Natomiast związki syntetyczne zostały pozyskane na drodze syntezy chemicznej w laboratorium. W wyniku reakcji chemicznej prowadzącej do syntezy związku chemicznego otrzymywane są również substancje występujące w przyrodzie oraz możliwa jest ich modyfikacja poprzez dodanie grup funkcyjnych lub tworzenie zupełnie nowych związków.

Badanie wpływu niskocząsteczkowych związków syntetycznych i pochodzenia roślinnego na aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych jest kluczowe dla lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów prowadzących zarówno do zjawiska cytoprotekcji jak śmierci komórek. Scharakteryzowanie nowych aktywatorów i inhibitorów mitochondrialnych kanałów potasowych może przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób niedokrwiennych serca i mózgu oraz nowotworów.

1.6.1. Pochodne flawonoidu naringeniny

Naringenina zaliczana do flawonoidów jest naturalnie występującym związkiem w roślinach, między innymi w grejpfrucie, któremu nadaje charakterystyczny smak [112]. Na Rycinie 6 przedstawiono wzór strukturalny naringeniny. Badania

z wykorzystaniem tego związku wykazały, m. in. właściwości przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne i kardioprotekcyjne [113]. Jednak najważniejszym odkryciem ostatnich lat był aktywacyjny wpływ naringeniny na kanał BK_{Ca} znajdujący się w błonie plazmatycznej [114] oraz w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [107, 115]. Badania flawonoidów wykazały wiele potencjalnie korzystnych właściwości tych związków oraz ich pochodnych, posiadających różne grupy funkcyjne, takie jak grupa prenylowa, metylowa oraz butylowa [116].



Rycina 6. Struktura naturalnie występującego flawonoidu – naringeniny.

W literaturze istnieją doniesienia sugerujące, że modyfikacja flawonoidów między innymi przez prenylację wzmacnia aktywność biologiczną i biodostępność flawonoidów. Grupa prenylowa składa się z łańcucha opartego na 5 węglach, wiąże się z różnymi pozycjami pierścienia aromatycznego flawonoidów przez działanie transferazy prenylowej. Modyfikacja ta występuje podczas syntezy metabolitów wtórnych w roślinach [117].

Jedną z możliwych pochodnych naringeniny jest 8-prenylo-naringenina, która występuje w chmielu [108]. Prenylacja naringeniny spowodowała znacznie większą selektywność i cytotoksyczność wobec nowotworowych linii komórkowych w porównaniu do niezmodyfikowanego związku. Ponadto właściwości przeciwnowotworowe 8-prenylo-naringeniny korelowały również z jej większą akumulacją w komórkach glejaka niż w normalnych fibroblastach [118]. Natomiast badania przeprowadzone na myszach z zanikiem mięśni łydek, wykazały przyrost narządu po zastosowaniu 8-prenylo-naringeniny, przy jednocześnie nieskutecznej terapii samą naringeniną. Przeprowadzone analizy zasugerowały, iż prenylacja znacząco udoskonalała właściwości naringeniny, które prowadzą do zwiększonej akumulacji

w komórkach i biodostępności związku [119]. Modyfikacja naringeniny przez dodanie grupy prenylowej wydaje się być obiecującą zmianą zwiększającą aktywność biologiczną związku.

Inną modyfikacją naringeniny występującą w roślinach jest produkt reakcji metylacji, czyli przyłączenia reszty metylowej (-CH₃) przez tlen z grupy hydroksylowej z pierścienia aromatycznego. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że 7-O-metylonaringenina, pozyskana z rośliny (*Rhododendron speciferum*) ma właściwości przeciwzapalne. Pochodna naringeniny spowodowała obniżanie poziomu czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) oraz interleukiny 6 (IL-6) i interleukiny 1 β (IL-1 β) w mysich makrofagach stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) w warunkach in vitro [120].

Naringenina może również występować w postaci chalkonu, który jest produktem pośrednim podczas biosyntezy flawonoidu w roślinie. Cechą charakterystyczną dla chalkonu naringeniny jest otwarty pierścień heterocykliczny, który zostaje zamknięty w ostatnim etapie syntezy naringeniny [121, 122]. Chalkon naringeniny został wykryty w skórce pomidorów. Analizy wykazały wzrost stężenia chalkonu naringeniny w organizmie ludzkim po spożyciu pomidorów, jednak jego przyswajalność oceniono jako niską [123]. Przeprowadzono również badania dotyczące wpływu naringeniny i chalkonu naringeniny na stan zapalny i alergiczny [124]. Obie substancje wykazały działanie przeciwzapalne i przeciwalergiczne zarówno poprzez podanie bezpośrednio na skórę jak i dożylnie. Wyniki tego badania sugerują, że flawonoidy naringenina i chalkon naringeniny mogą być wykorzystywane w miejscowym leczeniu stanów zapalnych i alergicznych skóry [124].

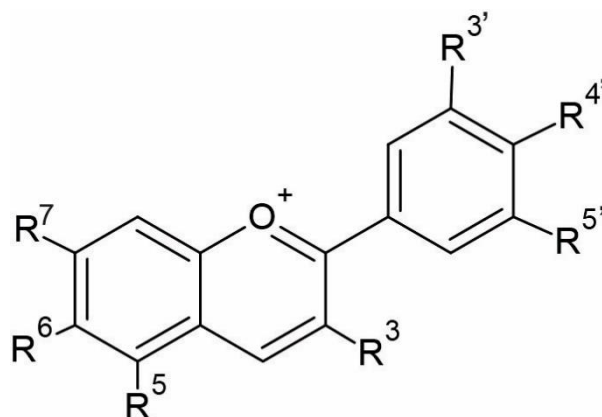
Istnieją również doniesienia literaturowe opisujące różnice w działaniu flawonoidów w zależności od miejsca modyfikacji. Doświadczenia przeprowadzone przez grupę prof. Calderone wykazały, że najskuteczniejszy efekt kardioprotekcyjny zaobserwowano dla 5-hydroksyflawonu i 5-metoksyflawonu w porównaniu do pozostałych badanych pochodnych flawonoidów. Wyniki te sugerują, że właściwości flawonoidów mogą być ściśle powiązane z ich strukturą, poprzez interakcję związków z określonymi celami farmakologicznymi w komórkach [125].

Przedstawione powyżej przykłady modyfikacji naringeniny sugerują, że dodanie grup funkcyjnych może zmieniać znacząco właściwości wyjściowego związku. W niniejszej

rozprawie doktorskiej wykorzystano do badań następujące pochodne naringeniny: 8-prenylo-naringenina; 5-*O*-prenylo-naringenina; 7-*O*-prenylo-naringenina; 4',7-di-*O*-prenylo-naringenina; 7-*O*-metylo-naringenina; 4',7-di-*O*-metylo-naringenina oraz chalkon 4',5,7-tri-*O*-metylo-naringeniny. Większość związków zostało wyselekcjonowanych z unikatowej biblioteki związków z Laboratorium Chemii Organicznej, Wydziału Chemii i Technologii Leków, Uniwersytetu Sapienza w Rzymie, Włochy. Natomiast 5-*O*-prenylo-naringenina i 8-prenylo-naringenina zostały zsyntetyzowane w Pracowni Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

1.6.2. Antocyjany

Antocyjany należą do grupy naturalnie występujących polifenolowych związków organicznych - flawonoidów, pełniących funkcję barwników w roślinach. Owocom i warzywom nadają kolory czerwony, fioletowy i niebieski, jako pigmenty występują w postaci glikozylowanej czyli z przyłączoną resztą cukrową. Antocyjany są pochodną flawonolu, a rdzeń struktury chemicznej oparty jest na jonie flawilowym, którego strukturę przedstawiono na Rycinie 7. Podstawową częścią antocyjanów jest antocyjanidyna (część aglikonowa – bez cząsteczki cukru), składająca się z trzech pierścieni aromatycznych. Do części podstawowej przyłączane są różne boczne grupy chemiczne, na podstawie których rozróżnia się antocyjany, natomiast dołączenie reszty cukrowej (najczęściej w pozycji R³) prowadzi do powstania glikozydów antocyjanów. Do najczęściej występujących antocyjanidyn zaliczane są cyjanidyna, delfinidyna, pelargonidyna, petunidyna, peonidyna oraz malwinidyna [126-128].



Rycina 7. Struktura antocyjanów. Na schemacie zaznaczono 7 (R^1 - R^7) różnych bocznych grup chemicznych, które mogą stanowić atomy wodoru, grupa wodorotlenowa lub metoksylowa.

Badania przeprowadzane z wykorzystaniem antocyjanów wykazują, że związki z tej grupy mają działanie przeciwutleniające, przeciwdrobnoustrojowe oraz wpływają korzystnie na choroby metaboliczne zwłaszcza choroby układu krążenia lub otyłość [129-131]. Doniesienia literaturowe wskazują również, że antocyjany w organizmie wchłaniane są w postaci glikozydowej a w proces zaangażowany są transportery glukozy sGLT1 i GLUT2 w błonie komórkowej enterocytów [132]. Na tej podstawie wyselekcjonowano różniące się położeniem grupy hydroksylowej – 3- monoglikozydy antocyjanów (3-glukozyd malwidyny, 3-glukozyd petunidyny, 3-glukozyd peonidyny), w celu określenia wpływu naturalnie wstępujących związków na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} .

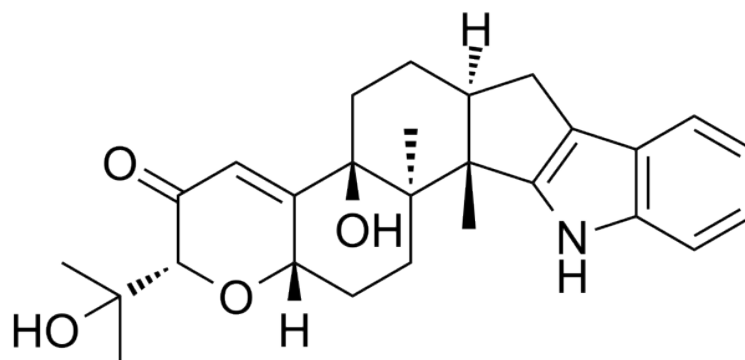
Malwidyna w postaci glukozydu występuje naturalnie między innymi w winogronach *Vitis vinifera* nadając im charakterystyczny kolor [133]. W najnowszych badaniach wykazano, że związek ten zmniejsza akumulację lipidów w niealkoholowym stłuszczeniu wątroby. Ponadto wykazano również, iż zastosowanie 3-glukozydu malwidyny spowodowało szereg zmian w hepatocytach prowadzących do zmniejszenia stresu oksydacyjnego w komórkach, redukcję reaktywnych form tlenu i nadprodukcję anionu ponadtlenkowego oraz zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych [134]. Ponadto dane literaturowe wskazują, że dieta bogata w naturalnie występujące antocyjany, w tym również w 3-glukozyd malwidyny prowadzi do zmniejszenia schorzeń kości, przez działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne [135].

Innym anotocyjanem, który również swoje źródło ma w skórce winogron jest 3-glukozyd petunidyny. Wykazano, że ta cukrowa pochodna petunidyny powoduje zmniejszenie proliferacji oraz migracji komórek raka wątroby [136]. Natomiast badania przeprowadzone na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, wykazują 3-glukozyd petunidyny wyizolowany z czerwonego wina spowodował znaczący przyrost drożdży [137].

W skórce ciemnych winogron występuje również 3-glukozyd peonidyny, który wpływa na komórki eukariotyczne [138]. Wykazano ochronne działanie tego antocyjanu, poprzez zmniejszenie śmiertelności komórek nerwowych pochodzących z mysiego mózgu [139]. Ponadto, przeprowadzone badania na komórkach raka płuc sugerują, że 3-glukozyd peonidyny zmniejsza migrację i proliferację komórek nowotworowych oraz powstawanie przerzutów [140].

1.6.3. Związki o strukturze zbliżonej do paksyliny

Paksylina (pax) to naturalnie występujący alkaloid pozyskiwany z grzybów *Penicillium paxilli*. Związek ten znalazł zastosowanie jako specyficzny inhibitor kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca^{2+} (BK_{Ca}). Paksylina hamuje kanał BK_{Ca} przez selektywną interakcję z tym białkiem w stanie zamkniętym kanału [141]. Niedawno zostało określone miejsca wiązania pax do kanału BK_{Ca} [142]. Wykazano, że paksylina oddziałuje z wnętrzem poru kanału. Pomimo specyficznego efektu działania pax jako inhibitora kanału potasowego, zaobserwowano jednak wyjątek. Podczas badania wpływu flawonoidu – kwercetyny na kanał $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w komórkach endotelialnych wykazano, że paksylina nie powoduje całkowitego zamknięcia kanału [143]. Poszukiwanie nowych substancji będących specyficznymi inhibitorami kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ wydaje się być ważne w badaniach kanałów jonowych w związku z możliwym wykorzystaniem terapeutycznym.



Rycina 8. Wzór strukturalny paksyliny – inhibitora kanału BK_{Ca}.

We współpracy z Laboratorium prof. Bruna Botta z Uniwersytetu Sapienza w Rzymie, wyselekcjonowano 8 substancji będących potencjalnymi nowymi inhibitorami kanału mitoBK_{Ca}. Związki zostały wybrane na podstawie obliczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem programu ROCS (OpenEye) spośród unikatowych zbiorów biblioteki zawierającej około tysiąc naturalnych substancji. W większości wyizolowanych z rodzimych roślin zebranych w krajach bogatych w bioróżnorodność, zwłaszcza z obszarów tropikalnych i subtropikalnych oraz powiększonych o ich półsyntetyczne i syntetyczne pochodne. Biblioteka zawierała również inne naturalne związki z dostępnych na rynku źródeł, które są przechowywane w Laboratorium Chemii Organicznej Wydziału Chemii i Technologii Leków Uniwersytetu Sapienza w Rzymie, Włochy. Za pomocą programu przeszukiwano bazy danych w celu wyselekcjonowania substancji najbardziej podobnych do naturalnie występującej paksyliny pod względem struktury oraz grup funkcyjnych. Wyselekcjonowano związki należące do terpenoidów (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β-amiryna, pristimerina) oraz alkaloidów (chlorowodrek weratryny, homatropina, chlorowodrek semperwiryny, jerwina).

Jednym z wyselekcjonowanych terpenoidów jest ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, wyizolowany z rośliny *Fabiana densa* var. *ramulosa*. Dane literaturowe wykazują, że bakterie *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* hamują swój wzrost po zastosowaniu ent-beyer-15-en-18-O-bursztynianu [144].

20-hydroksyekdyson jest najpowszechniej występującym i biologicznie czynnym związkiem z grupy ekdysonów – hormonów steroidowych. Badania przeprowadzane

w ostatnim czasie wykazały, że związek ten prowadzi do zmniejszenia masy ciała i akumulacji tłuszczu w jamie brzusznej szczurów oraz wspomaga utrzymywanie prawidłowego ciśnienia krwi wraz z niskim poziomem cholesterolu LDL (lipoproteina o niskiej gęstości) [145]. Ponadto zaobserwowano, że 20-hydroksyekdyson prowadzi do ochrony neuronów myszy poprzez zahamowanie szlaków apoptozy [146].

Kolejnym wyselekcjonowanym związkiem jest β -amiryna, którą można pozyskać z roślin, między innymi z rzeżuchy krzyżowej (*Berberis vulgaris*) oraz pieprzu (*Capsicum baccatum*) [147]. Dane literaturowe wskazują liczne właściwości tego związku. W badaniach wykazano działania zmniejszające otyłość [148], przeciwłkowe i przeciwdepresyjne [149], chroniące wątrobę i układ trawienny [150] oraz przeciwpalne [151].

Innym związkiem z grupy naturalnie występujących terpenoidów jest pristimerina wyizolowana z roślin z rodziny Dławiszowate (*Celastraceae R. Br.*) [152]. Badania z wykorzystaniem tego związku skupiają się głównie na procesie kancerogenezy. Wykazano, że pristimerina poprzez hamowanie cyklu komórkowego [153], indukcję apoptozy [154] oraz zwiększenie syntezy reaktywnych form tlenu [155] posiada właściwości przeciwnowotworowe.

Natomiast ze związków będącymi alkaloidami wyselekcjonowano chlorowoderek weratryny, której wpływ na aktywność kanałów jonowych został zbadany. Doświadczenia farmakologiczne i elektrofizjologiczne przeprowadzane w latach 90 wykazały, że weratryna powoduje trwałą depolaryzację błony komórek pobudliwych poprzez aktywację zależnych od napięcia kanałów Na^+ , co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności jonów Na^+ [156-158] oraz napływ Ca^{2+} przez wymiennik $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [159]. Prowadzone są badania dotyczące wykorzystania weratryny jako leku w chorobach neurologicznych [160, 161]. Ponadto, wykazano również wpływ weratryny na mitochondria poprzez interakcję z białkami łańcucha oddechowego, powodując zmniejszenie zużycia tlenu [162].

Homatropina należąca do alkaloidów jest lekiem antycholinergicznym, który działa jako antagonist acetylocholino w wiązaniu do receptorów muskarynowych zlokalizowanych w błonie komórkowej [163]. Natomiast bromowoderek homatropiny jest wykorzystywany w diagnostyce okulistycznej, ponieważ wywołuje rozszerzenie źrenic [164].

Innym związkiem będącym alkaloidem indolowym jest semperwiryna, występująca naturalnie między innymi w kłączach *Gelsemium sempervirens*. Semperwiryna opisywana jest w literaturze jako substancja hamująca wzrost raka wątrobokomórkowego w wyniku zatrzymania cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy poprzez regulację białka p53 [165, 166]. W niniejszej pracy do badań wykorzystywano chlorowoderek semperwiryny.

Jerwina została również wyselekcjonowana jako związek o strukturze podobnej do paksyliny, należący do związków pochodzenia roślinnego, występujący w kłączach ciemniżycy (*Veratrum*). Badania wskazują, że jerwina działa przeciwzapalne [167], protekcyjnie na komórki wątroby podczas radioterapii [168] oraz przeciwnowotworowo [169].

2. Założenia i cele

Mitochondrialne kanały potasowe (mitoK) pełnią kluczową rolę w homeostazie jonów potasu w komórce. Badania ostatnich lat wykazały, że ich aktywność wpływa na procesy fizjologiczne komórki zarówno związane z przeżyciem jak i śmiercią komórek. Dokładny mechanizm udziału kanałów potasowych z wewnętrznej błony mitochondrialnej w cytoprotekcji oraz apoptozie komórki, nie jest poznany. W ostatnich latach zidentyfikowano wiele różnych kanałów potasowych w mitochondriach tkanek narażonych na uszkodzenia, gdzie aktywność kanałów mitoK pełni kluczową rolę w ich ochronie. Pomimo intensywnie trwających badań wciąż nie opisano mitochondrialnych kanałów potasowych w tkankach bezpośrednio poddawanych wpływowi czynników uszkodzających. Opublikowane badania wykazują, że cytoprotekcja komórek powiązana jest z aktywacją mitoK poprzez substancje pochodzenia naturalnego lub syntetyczne.

W związku z powyższymi badaniami w ramach rozprawy doktorskiej miały na celu zidentyfikowanie mitochondrialnego kanału potasowego w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego, stanowiącego barierę oddzielającą od wdychanego powietrza, w którym zawieszane mogą być czynniki uszkodzające. Ponadto porównano aktywności endogennie występującego mitoK z egzogennym kanałem (izoformą VEDEC kanału potasowego), wprowadzonego do wewnętrznej błony mitochondrialnej komórek, niewykazujących jego obecności. Przeprowadzono również eksperymenty w celu zbadania jak na aktywność pochodzącego endogennie i egzogennie mitochondrialnego kanału potasowego wpływają związki pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego, będące pochodnymi naringeniny oraz podobnymi do znanego inhibitora kanału – paksyliiny. Realizując szczegółowe cele badań skupiono się na:

- A. Identyfikacji kanału potasowego BK_{Ca} w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego (HBE) za pomocą techniki elektrofizjologicznej *patch-clamp* oraz technik biochemicznych.
- B. Charakterystyce właściwości biofizycznych i farmakologicznych kanału mito BK_{Ca} z komórek nabłonka oskrzelowego oraz zbadanie regulacji aktywności kanału przez jony wapnia, aktywator - NS11021, inhibitory – paksyliinę i iberiotoksynę.

- C. Ocenie właściwości biofizycznych izoformy kanału mitoBK_DEC z transfekowanych ludzkich komórek embrionalnych nerki (HEK293-BK_DEC) za pomocą techniki *patch-clamp*, analiza wpływu jonów wapnia oraz modulatorów kanałowych na prawdopodobieństwo otwarć kanału.
- D. Określeniu metodą *patch-clamp* wpływu pochodnych naringeniny na aktywność endogennego kanału mitoBK_{Ca} oraz egzogennej izoformy VEDEC tego kanału.
- E. Ocenie zmian aktywności kanału mitoBK_{Ca} z komórek nabłonka oskrzelowego w odpowiedzi na działania antocyjanów.
- F. Poszukiwaniu inhibitorów kanału mitoBK_{Ca} wśród związków o strukturze podobnej do paksyliny z wykorzystaniem modelu komórkowego HEK293-BK_DEC.

3. Materiały i metody

3.1. Niskocząsteczkowe związki chemiczne wykorzystywane w badaniach

Związki niskocząsteczkowe, których wpływ na mitochondrialny kanał BK_{Ca} i BK_{DEC} badano w niniejszej rozprawie doktorskiej, pogrupowano i przedstawiono w tabelach: antocyjany (Tabela 1), pochodne naringeniny (Tabela 2) oraz związki o strukturze zbliżonej do paksyliny (Tabela 3). Zaprezentowano nazwy chemiczne związków zgodne z obowiązującą nomenklaturą chemiczną, wzory strukturalne oraz sumaryczne. Wszystkie badane związki zostały rozpuszczone w dimetylosulfotlenku (DMSO, *ang. dimethyl sulfoxide*).

Tabela 1. Charakterystyka antocyjanów wykorzystywanych w badaniach: 3-glukozyd malwidyny, 3-glukozyd petunidyny, 3-glukozyd peonidyny.

Antocyjany		
3-glukozyd malwidyny	Nazwa chemiczna	(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -2- [5,7-dihydroksy-2- (4-hydroksy-3,5-dimetoksyfenilo) chromenylium-3-ylo] oksy-6- (hydroksymetylo) oksano-3,4,5-triol
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂ ⁺
3-glukozyd petunidyny	Nazwa chemiczna	(2S,3R,4S,5S,6R)-2-[2-(3,4-dihydroksy-5-metoksyfenyl)-5,7-chromenylium-3-ylo]oksy-6-(hydroksymetylo)oksano-3,4,5-triol
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂ ⁺
	Nazwa chemiczna	(2S,3R,4S,5S,6R) -2- [5,7-dihydroksy-2- (4-hydroksy-3-metoksyfenilo) chromenylium-3-ylo] oksy-6- (hydroksymetylo) oksano-3,4,5-triol

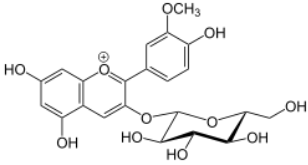
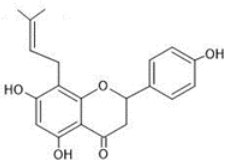
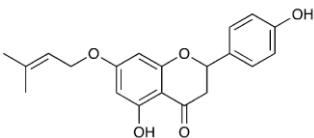
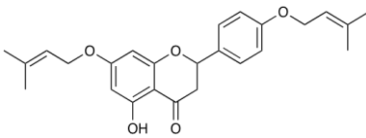
3-glukozyd peonidyny	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{22}H_{23}O_{11}^+$

Tabela 2. Metylowane i prenylowane pochodne naringeniny: 8-prenylo-naringenina, 7-*O*-prenylo-naringenina, 4', 7 –di-*O*-prenylo-naringenina, 5-*O*-prenylo-naringenina, 7-*O*-metylo-naringenina, 4', 7 –di-*O*-metylo-naringenina, chalkon 4', 5, 7 –tri-*O*-metylo-naringeniny.

Pochodne naringeniny		
8-prenylo-naringenina	Nazwa chemiczna	5,7-dihydroksy-2-(4-hydroksyfenylo)-8-(3-metylobut-2-en-1-yl)chroman-4-on
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{20}H_{20}O_5$
7-<i>O</i>-prenylo-naringenina	Nazwa chemiczna	5-hydroksy-2-(4-hydroksyfenylo)-7-((3-metylobut-2-en-1-yl)oksy)chroman-4-on
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{20}H_{20}O_5$
4', 7 –di-<i>O</i>-prenylo-naringenina	Nazwa chemiczna	5-hydroksy-7-((3-metylobut-2-en-1-yl)oksy)-2-(4-((3-metylobut-2-en-1-yl)oksy)fenylo)chroman-4-on
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{25}H_{28}O_5$
	Nazwa chemiczna	7-hydroksy-2-(4-hydroksyfenylo)-5-((3-metylobut-2-en-1-yl)oksy)-2,3-dihydro-4H-8l3-pyrano[2,3-b]pyran-4-on

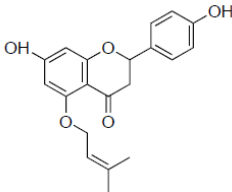
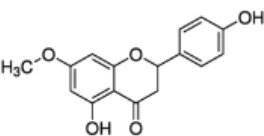
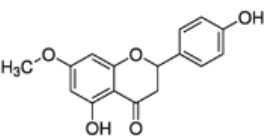
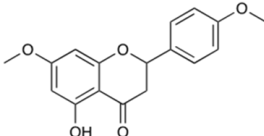
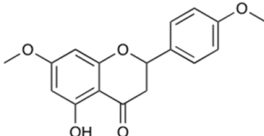
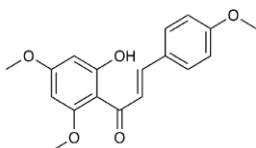
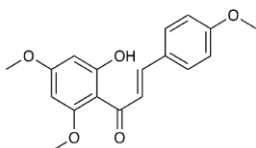
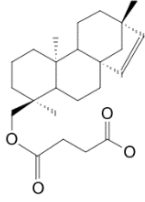
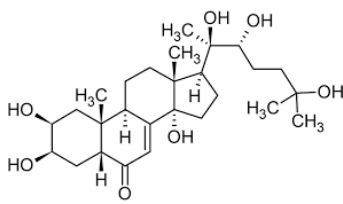
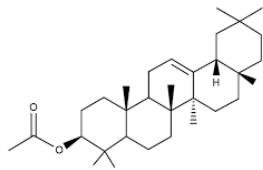
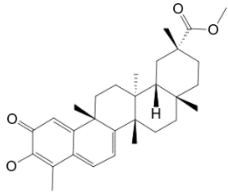
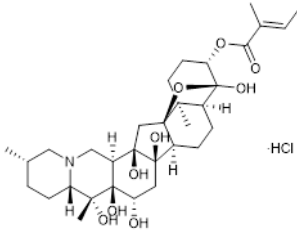
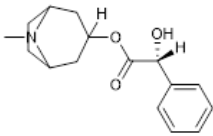
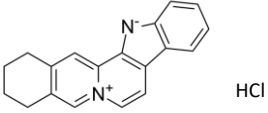
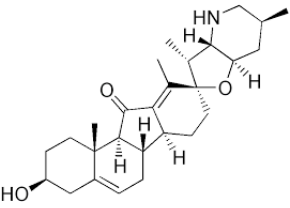
5-O-prenylo-naringenina	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₂₀ H ₂₀ O ₅
7-O-metylo-naringenina	Nazwa chemiczna	5-hydroksy-2-(4-hydroksyfenylo)-7-methoksychroman-4-on
	Wzór strukturalny	
7-O-metylo-naringenina	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₁₆ H ₁₄ O ₅
4', 7-di-O-metylo-naringenina	Nazwa chemiczna	5-hydroksy-7-metoksy-2-(4-metoksyfenylo)chroman-4-on
	Wzór strukturalny	
4', 7-di-O-metylo-naringenina	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₁₇ H ₁₆ O ₅
chalkon 4', 5, 7-tri-O-metylo-naringeniny	Nazwa chemiczna	(E)-1-(2-hydroksy-4,6-dimetoksyfenylo)-3-(4-metoksyfenylo)prop-2-en-1-on
	Wzór strukturalny	
chalkon 4', 5, 7-tri-O-metylo-naringeniny	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₁₉ H ₁₈ O ₅

Tabela 3. Charakterystyka związków o strukturze zbliżonej do paksyliny z grupy terpenoidów (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β-amiryna, pristimerina) oraz alkaloidów (chlorowoderek weratryny, homatropina, chlorowoderek seperwiryny, jerwina).

Związki o strukturze zbliżonej do paksyliny		
Terpenoidy		
ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian	Nazwa chemiczna	4-okso-4-(((4S,6aR,9S,11bS)-4,9,11b-trimetylo-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,11,11a,11b-dodekahydro-6a,9-metanocyklohepta[a]naftalen-4-yl)metoksy)maślan
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₂₄ H ₃₆ O ₄
20-hydroksy-ekdyson	Nazwa chemiczna	(2S,3R,5R,9R,10R,13R,14S,17S)-2,3,14-trihydroksy-10,13-dimetylo-17-[(2R,3R)-2,3,6-trihydroksy-6-metyloheptan-2-yl]-2,3,4,5,9,11,12,15,16,17-dekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-6-on
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₂₇ H ₄₄ O ₇
β-amiryna	Nazwa chemiczna	(3S,4aR,6aR,6bS,8aR,12aR,14aR,14bR)-4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-octametylo-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a-tetradekahydropicen-3-ol
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	C ₃₀ H ₅₀ O
	Nazwa chemiczna	Metylo (2R,4aS,6aR,6aS,14aS,14bR)-10-hydroksy-2,4a,6a,6a,9,14a-heksametylo-11-okso-1,3,4,5,6,13,14,14b-oktahydropiceno-2-karboksylan

pristimerina	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{30}H_{40}O_4$
Alkaloidy		
chlorowodorek weratryny	Nazwa chemiczna	(3S,4S,4aS,6aS,6bR,8S,8aS,9R,9aS,12S,15aS,15bR,16aR,16bS)-4,6b,8,8a,9,15b-heksahydroksy-9,12,16b-trimetylodokosahydro-2H-4,16a-epoksybenzo[4,5]indeno[1,2-h]pyrido[1,2b]isoquinolin-3-yl (E)-2-metylbut-2-enoate chlorowodorek
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{32}H_{49}NO_9 \cdot HCl$
homatropina	Nazwa chemiczna	8-metyl-8-azabicyklo[3.2.1]octan-3-yl (2R)-2-hydroksy-2-fenyloctan
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{16}H_{21}NO_3$
chlorowodorek seperwiryny	Nazwa chemiczna	1,2,3,4-tetrahydroindolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-b]isoquinolin-6-ium-13-ide chlorowodorek
	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{19}H_{16}N_2 \cdot HCl$
	Nazwa chemiczna	(3S,3'R,3'aS,6'S,6aS,6bS,7'aR,9R,11aS,11bR)-3-hydroksy-3',6',10,11b-tetrametylospiro[1,2,3,4,6,6a,6b,7,8,11a-dekahydrobenzo[a]fluorono-9,2'-3a,4,5,6,7,7a-heksahydro-3H-furo[3,2-b]pyridine]-11-on

jerwina	Wzór strukturalny	
	Wzór sumaryczny	$C_{27}H_{39}NO_3$

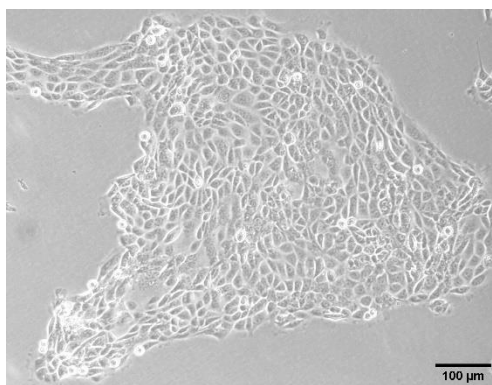
3.2. Modele badawcze wykorzystane w badaniach mitochondrialnych kanałów potasowych

W badaniach wykorzystano linie komórkowe, różniące się z uwagi na obecność białka kanałowego mitoBK_{Ca}. Zastosowano model badawczy ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego (HBE), charakteryzujących się występowaniem endogennego plazmatycznego kanału BK_{Ca} oraz ludzkie embrionalne komórki nerki 293 (HEK293), które nie wykazują ekspresji tego kanału. Wykorzystano techniki molekularne, które umożliwiły wprowadzenie do komórek HEK293 genu kodującego mitochondrialną izoformę VEDEC kanału BK_{Ca}. W Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych otrzymano nową linię komórkową (HEK293-BK_DEC) posiadającą egzogenny mitochondrialny kanał potasowy.

3.2.1. Komórki nabłonka oskrzelowego (HBE)

Linia komórkowa ludzkiego nabłonka oskrzelowego 16HBE14o- (HBE, *ang. Human Bronchial Epithelial Cells*) została wyprowadzona przez prof. Dieter Gruenert z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco, o numerze katalogowym UC Case No.SF1992-A66. Pierwotne komórki nabłonka oskrzelowego, pochodzące z wycinków bronchoskopowych, zostały unieśmiertelnione poprzez transformację onkogennym wirusem SV40 [170]. Komórki dzięki temu zyskały zdolność do nieograniczonych podziałów w warunkach hodowli *in vitro*, umożliwiając tym samym przeprowadzanie eksperymentów na powtarzalnym modelu badawczym. Na Rycinie 9 zaprezentowano fotografię mikroskopową przedstawiającą morfologię komórek. Komórki HBE

hodowano w zmodyfikowanym płynie Minimum Essential Medium Eagle (nr kat. M4655; Sigma-Aldrich), uzupełnionym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, *ang. fetal bovine serum*), 1% mieszaniną antybiotyków penicyliny z streptomycyną, w sterylnej, wilgotnej atmosferze 5% CO₂, w temperaturze 37 °C. W celu oderwania komórek od podłoża płukano hodowlę dwukrotnie, ciepłym (37 °C) roztworem PBS (sól fizjologiczna w buforze fosforanowym, *ang. phosphate-buffered saline*), a następnie wykorzystywano trypsynę. Komórki pasażowano co trzy dni, w momencie osiągnięcia 90–100% konfluencji naczynia hodowlanego. Eksperymenty wykonywano z zastosowaniem komórek pomiędzy 6 a 25 pasażem.



Rycina 9. Fotografia mikroskopowa przedstawiająca komórki nabłonka oskrzelowego (HBE), wykonana z użyciem mikroskopu optycznego ze światłem przechodzącym i kontrastem fazowym (Olympus IX71) oraz kamery (DLT-Cam PRO 8 MP USB 3.0.).

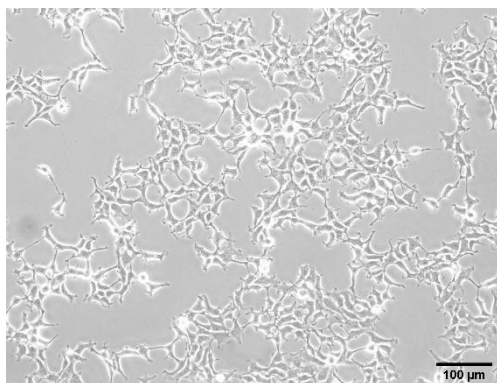
3.2.2. Embrionalne komórki nerki zawierające mitochondrialną VEDEC izoformę kanału BK_{Ca} (HEK293-BK_DEC)

Ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK293, *ang. Human Embryonic Kidney 293 Cells*) pozyskano z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC, *ang. American Type Culture Collection*), o numerze katalogowym CRL-2922™. Komórki HEK293 są stabilną linią komórkowa, unieśmiertelnioną na drodze transformacji adenowirusem 5 (Ad5), w celu zakłócenia cyklu komórkowego oraz zapobiegania apoptozy. Obecność wirusa Ad5 umożliwia wysoki poziom produkcji rekombinowanych białek, w szczególności białek w wektorach plazmidowych zawierających promotor CMV [171]. Dzięki tej właściwości komórki HEK293 stanowią doskonały model eksperymentalny do przeprowadzania transfekcji komórkowych.

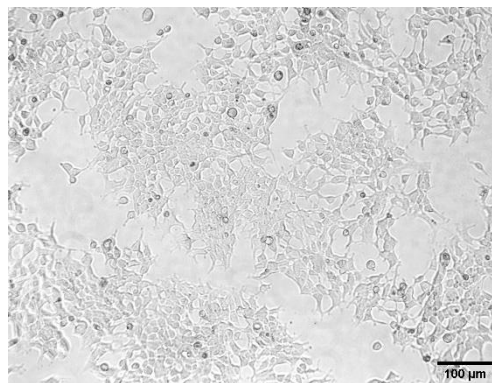
Wykorzystując komórki HEK293 opracowano nową linię komórkową HEK293-BK_DEC, zawierającą mitochondrialny kanał BK_{Ca}. Wykorzystując plasmid pcDNA3.1 zawierający gen kodujący mitochondrialny (VEDEC) wariant podjednostki α kanału BK_{Ca} oraz transfektant - polietylenoimina (PEI), przeprowadzono transfekcję komórek HEK293 [102, 172]. Otrzymano stabilną linię komórkową HEK293-BK_DEC, odporną na działanie antybiotyku genetycyny.

Embrionalne komórki nerki hodowano w zmodyfikowanej pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium (4,5 g/l glukozy; nr kat. L0106-500, Biowest) wraz z 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 1% mieszaniną antybiotyków penicyliny z streptomycyną oraz 1% L-glutaminą. Do płynu hodowlanego dedykowanego dla komórek HEK293-BK_DEC, dodawano również 1% genetycyny, w celu weryfikacji komórek z plazmidem pcDNA3.1 zawierający wprowadzany gen. Obie linie komórkowe HEK293 hodowano w temperaturze 37 °C oraz w sterylnej, wilgotnej atmosferze 5% CO₂. Do badań wykorzystano komórki pomiędzy 4 a 25 pasażem. Na Rycinie 10 przedstawiono przykładowe fotografie dwóch linii komórkowych HEK293, różniących się obecnością kanału potasowego BK_{Ca}.

A.



B.



Rycina 10. Fotografie mikroskopowe przedstawiają komórki embrionalne nerki *HEK293* przed transfekcją (A) oraz po transfekcji (HEK293-BK_DEC) plazmidem zawierającym gen kodujący mitochondrialny kanał potasowy BK_{Ca} (B). Fotografie wykonane za pomocą mikroskopu optycznego ze światłem przechodzącym i kontrastem fazowym (Olympus IX71) oraz kamery (DLT-Cam PRO 8 MP USB 3.0.).

3.3. Pomiary elektrofizjologiczne

Identyfikację i regulację kanału potasowego mitoBK_{Ca} wykonano z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*. Poniżej opisano poszczególne etapy otrzymywania preparatu mitoplastów do pomiarów elektrofizjologicznych.

3.3.1. Otrzymywanie preparatu mitoplastów

Izolowanie mitochondriów wykonywano z dwóch linii komórkowych nabłonka oskrzelowego (HBE) oraz transfekowanych embrionalnych komórek nerki (HEK293-BK_DEC), w temperaturze 4 °C. W celu zebrania komórek z naczyń hodowlanych, płukano warstwę komórek zimnym roztworem PBS, następnie zdrapywano oraz wirowano w probówce stożkowej o pojemności 50 ml. Proces osadzania komórek zachodził przy 400 x g, przez 8 min w temperaturze 4 °C. Uzyskany osad komórkowy zawieszono w roztworze do izolacji (250 mM sacharoza, 5 mM HEPES i 1 mM EGTA, pH 7,2), w celu dezintegracji komórek za pomocą homogenizatora. Następnie wykonano wirowania różnicowe otrzymanej zawiesiny, każde trwające 10 min w 4 °C. W wyniku pierwszego wirowania przy 9 200 x g, odlano nadsącz i ponownie zawieszono osad w celu kolejnego wirowania. Po drugim wirowaniu przy 750 x g, supernatant przeniesiono do nowej probówki i wykonano ostatnie wirowanie przy 9 200 x g. Mitochondria zawieszono w około 0,3 ml roztworu do izolacji. Wszystkie etapy izolacji przeprowadzono na lodzie w 4 °C. Procedurę oczyszczenia mitochondriów wykonywano bezpośrednio przed pomiarami elektrofizjologicznymi.

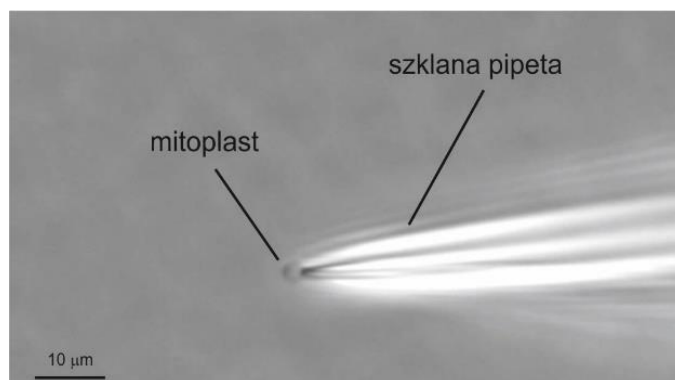
Do pomiarów elektrofizjologicznych pobierano 30 µl zawiesiny mitochondriów i rozcieńczano w 1 000 µl roztworu izotonicznego (150 mM KCl, 10 mM HEPES, 100 µM CaCl₂, pH 7,2). Następnie przygotowywano zawiesinę mitoplastów, poprzez inkubację mitochondriów w roztworze hipotonicznym (5 mM HEPES i 100 µM CaCl₂, pH 7,2), przez około 1–2 minuty, w celu wywołania pęcznienia i przerwania zewnętrznej błony mitochondrialnej. Następnie aby zahamować proces pęcznienia mitochondriów, dodawano roztwór hipertoniczny (750 mM KCl, 30 mM HEPES i 100 µM CaCl₂, pH 7,2), uzyskując mieszaninę izotoniczną z zawieszonymi mitoplastami. Otrzymane struktury charakteryzowały się rozfałdowaną wewnętrzną błoną mitochondrialną,

wyglądem przypominające przezroczyste pęcherzyki z widoczną pozostałością zewnętrznego błony mitochondrialnej.

3.3.2. Technika *patch-clamp*

Pomiary elektrofizjologiczne wykonywano z wykorzystaniem techniki stabilizacji skrawka błony (technika *patch-clamp*), która umożliwia pomiar przepływu jonów przez białka zlokalizowane w dwuwarstwie lipidowej. Technika ta pozwala mierzyć aktywność kanałów jonowych, a dokładnie zmiany prądu jonowego w czasie rzeczywistym. Wykonywane pomiary są bardzo precyzyjne oraz umożliwiają ocenę przepływu jonów przez pojedynczy kanał jonowy zlokalizowany w obłonionych organellach komórkowych oraz błonie plazmatycznej. W roku 1991, za odkrycie tej metody, dwóch naukowców E. Neher i B. Sakmann otrzymało Nagrodę Nobla [173].

Eksperymenty z użyciem mitoplastów przeprowadzono zgodnie z opisem w dotychczas opublikowanych pracach [107, 174, 175]. Pomiary wykonywano za pomocą szklanej mikropipety o bardzo małej średnicy, którą zasysano pływające pęcherzyki mitoplastów. Pipety posiadały otwartą oporność końcówki wynoszącą ok. 15-18 M Ω . Wnętrze mikropipety wypełniano roztworem izotonicznym (150 mM KCl, 10 mM HEPES i 100 μ M CaCl₂, pH 7,2), o składzie zbliżonym do płynu w przestrzeni międzybłonowej w mitochondriach. Mitoplasty przygotowywano zgodnie z opisem powyżej, pod mikroskopem rozpoznawano je obserwując wielkość, przezroczystość, okrągły kształt oraz charakterystyczne występowanie pozostałości zewnętrznej błony mitochondrialnej. Podczas wykonywania doświadczeń końcówka mikropipety styka się z powierzchnią błony mitoplastu tworząc stabilny kontakt, tak jak na Rycinie 11. W momencie obecności kanału jonowego w skrawku błony, w świetle pipety możliwy jest pomiar prądu jonowego w czasie.



Rycina 11. Fotografia przedstawiająca szklaną pipetę (mikropipetę) wraz z zassanym mitoplastem. Fotografia wykonana za pomocą mikroskopu optycznego ze światłem przechodzącym i kontrastem fazowym (Olympus IX71) oraz kamery (DLT-Cam PRO 8 MP USB 3.0.).

Sygnał prądu jonowego rejestrowano poprzez zastosowanie wzmacniacza Axopatch 200B, przekształcano przez przetwornik analogowo-cyfrowy Digidata 1440A, próbkowano przy częstotliwości 100 kHz i filtrowano przy 1 kHz. Oprogramowanie Clampex 10.7 umożliwiała zapis zmian przepływającego prądu jonowego. Identyfikację kanału jonowego wykonano poprzez analizę zarejestrowanej aktywności kanału, ocenę prawdopodobieństw otwarć (P_o , *ang. channels opening probability*) oraz amplitudy. Do badania wpływu substancji na aktywność kanału wykorzystywano system perfuzji. Badane związki chemiczne były rozcieńczane w roztworze izotonicznym i podawane za pomocą szklanej rurki o znacznie większej średnicy niż mikropipeta wraz z mitoplastem. Układ perfuzyjny napędzany przez pompę perystaltyczną, umożliwiał stały przepływ roztworu wraz z modulatorami kanałowymi do naczynia, w którym odbywał się pomiar elektrofizjologiczny. Za pomocą systemu perfuzji, badane substancje aplikowano na kanał od strony macierzy mitochondrialnej. Natomiast podczas wykonywania eksperymentów z iberiotoksyną (IbTx), napełniano szklaną pipetę roztworem z badanym modulatorem w celu aplikacji od strony przestrzeni międzybłonowej. Podczas analiz zarejestrowanych aktywności oceniano ciąg zdarzeń polegających na otwieraniu (stan otwarty; moment w którym przepływają jony) i zamykaniu kanału (stan zamknięty, brak przepływu jonów). Porównywano rejestracje kontrolne, czyli przed podaniem badanego związku chemicznego i po płukaniu roztworem zawierającym modulator kanału potasowego. Na Rycinie 12 przedstawiono schemat doświadczeń z zastosowaniem techniki *patch-clamp* w konfiguracji „inside-out”.



Rycina 12. Schemat techniki *patch-clamp* przedstawiający poszczególne etapy: izolowanie mitochondriów, przygotowanie mitoplastów, zassanie skrawka błony mitoplastu przez mikropipetę, dodanie badanej substancji oraz przykładowa rejestracja.

3.3.3. Analiza danych uzyskanych techniką *patch-clamp*

Dane uzyskane podczas eksperymentów analizowano poprzez określenie prawdopodobieństwa otwarcia kanału (P_o). P_o jest stosunkiem sumarycznego czasu otwarć kanału do całkowitego czasu trwania rejestracji aktywności kanału. Wynik eksperymentów w których obserwowano jeden kanał przedstawiono jako P_o , natomiast doświadczenia z obecnością dwóch do ośmiu kanałów w tym samym skrawku błony wyliczano jako NP_o (prawdopodobieństwo otwarcia N liczby kanałów). W rejestracjach z ilością kanałów większej niż 8, prawdopodobieństwo otwarć wyliczano z stosunku prądu elektrycznego przepływającego przez kanały do maksymalnego prądu, który może przepłynąć przez kanały, w danym wycinku czasowym. Doświadczenia elektrofizjologiczne wykonywano w n powtórzeniach. W obrębie jednego doświadczenia analizowano kilka wybranych rejestracji elektrofizjologicznych w określonych warunkach eksperymentalnych (kontrolnych lub po dodaniu badanego związku).

3.4. Identyfikacja kanału BK_{Ca} w liniach komórkowych

Ocenę obecności mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w badanych liniach komórkowych przeprowadzono również za pomocą technik molekularnych. Poniżej przedstawiono poszczególne techniki analizy poziomu ekspresji genów oraz białek budujących kanał potasowy BK_{Ca} w komórce.

3.4.1. Analiza poziomu ekspresji genów

Ocenę poziomu ekspresji genów analizowano poprzez ilościową łańcuchową reakcję polimerazy oraz w czasie rzeczywistym. Opisano etapy począwszy od izolowania materiału genetycznego z badanych linii komórkowych, poprzez odwrotną transkrypcję oraz łańcuchową reakcję polimerazy.

3.4.1.1. Izolowanie RNA

Badane linie komórkowe hodowano według procedury opisanej w Rozdziale 3.2. *Modele badawcze wykorzystane w badaniach mitochondrialnych kanałów potasowych.* Znad komórek znajdujących się w naczyniach hodowlanych 75 cm² zlewano płyn hodowlany, przepłukiwano roztworem PBS, zdrapywano i odwirowano przy 400 x g przez 8 minut. Do izolowania kwasu rybonukleinowego (RNA, *ang. ribonucleic acid*) zastosowano komercyjnie dostępny zestaw RNeasy Mini Kit (nr kat. 74104; QIAGEN). Osad komórkowy zawieszano w 350 µl buforu RLT, następnie dodawano taką samą ilość 70% etanolu, całość mieszano za pomocą pipety automatycznej. Uzyskaną gęstą zawiesinę komórkową nakładano na kolumnienki ze złożem do oczyszczania. Następnie wirowano przy 10 000 x g, przez 15 sekund, przesącz wylewano do odpadów. Ponownie na złożę dodawano 350 µl buforu RW1, wirowano w tych samych warunkach (10 000 x g, przez 15 sekund), przesącz odlewano. Do kolumnienki dodawano 10 µl enzymu deoksyrybonukelazy (DNase), przecinającego kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, *ang. deoxyribonucleic acid*) wraz z 70 µl buforu RDD, roztwór pozostawiono na 15 minut inkubacji ze złożem. W następnym etapie dodawano 350 µl buforu RW1 i ponownie wirowano jak uprzednio, przesącz wylewano. Na złożę nanoszono 500 µl buforu RPE, wirowano (10 000 x g przez 15 sekund), następnie czynność powtarzano. Do sterylnej probówki o pojemności 1,5 ml przenoszono kolumnienkę ze złożem, przeprowadzono elucję RNA z wykorzystaniem czystej wody (wolnej od nukleaz) i wirowaniem z prędkością 10 000 ×g przez 1 minutę. Otrzymany eluat przechowywano w temperaturze 4 °C w celu oznaczenia stężenia.

Pomiar stężenia RNA wykonywano za pomocą spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies). Stężenie mierzono przy długościach fali 260 nm i 280 nm, jako kontrolę używano czystą wodę, na adapter nanoszono 2 µl badanych roztworów. Wyznaczono stosunek wartości absorbancji przy obu długościach fali (A₂₆₀/A₂₈₀),

parametr definiujący czystość próbki. O doskonałej czystości wyizolowanego RNA świadczyła wartość parametru w granicach 2. Wyliczano stężenie otrzymanego RNA.

3.4.1.2. Synteza cDNA

Przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji z otrzymanego RNA w celu syntezy jednoniciowego cDNA (*ang. complementary DNA*). Wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (nr kat. K1622; Thermo Fisher Scientific Inc.). Przygotowywano mieszaninę, w skład której wchodziło: 5 µg matrycy RNA, 1 µl polinukleotydowych starterów (Random Hexamer Primer) oraz ultra czysta woda, następnie mieszano i inkubowano w temperaturze 65 °C przez 5 minut. W kolejnym etapie sporządzono mieszaninę reakcyjną, do przygotowanej wcześniej matrycy wraz ze starterami dodawano: 1 µl enzymu katalizującego reakcję odwrotnej transkrypcji (RevertAid M-MuLV RT 200 U/µl), 2 µl roztworu deoksynukleotydów (10 mM dNTP Mix; *ang. deoxy nucleoside triphosphate*), 4 µl buforu reakcyjnego (5x Reaction Buffer), 1 µl inhibitora RNazy (zahamowanie enzymu trawiącego RNA; RiboLock RNase Inhibitor). Przygotowaną mieszaninę zwirowywano oraz przenoszono do bloku grzejnego z otworami na probówki (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc.). Reakcję przeprowadzono w następujących etapach: inkubowano mieszaninę w temperaturze 25 °C przez 5 minut, następnie w 42 °C przez 60 minut oraz w końcowym kroku w 70 °C przez 5 min, po czym schłodzono próbkę do temperatury 4 °C. Otrzymaną mieszaninę z matrycą cDNA wykorzystywano do dalszych eksperymentów lub przechowywano w temperaturze -80 °C.

3.4.1.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Otrzymaną matrycę cDNA wykorzystywano do przeprowadzenia doświadczeń łańcuchowej reakcji polimerazy. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną dodając 12,5 µl mieszaniny polimerazy DNA wraz z dedykowanym buforem (REDTaq® DNA Polymerase, nr kat. MFCD01635818; Sigma-Aldrich), 1 µl matrycy cDNA, 2 µl starterów przednich i wstecznych (w stosunku 1:1; przedstawione w Tabeli 4) specyficzne dla badanych genów oraz 9,5 µl wody. Reakcję przeprowadzano w objętości 25 µl w następujących warunkach:

- denaturacja wstępna w temperaturze 94 °C przez 5 minut
 - denaturacja w temperaturze 94 °C przez 40 sekund
 - przyłączanie starterów w temperaturze 58-65 °C przez 40 sek.
 - wydłużanie syntetyzowanej nici DNA w 72 °C przez 1 minutę
 - zakończenie reakcji w 72 °C przez 10 minut
 - schłodzenie mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 4 °C
- } 35cykli

Obecność produktu łańcuchowej reakcji polimerazy sprawdzano z wykorzystaniem 2% żelu agarozowego z dodatkiem 5 µl Midori Green Advance (nr kat. MG04, Genetics) w świetle UV w obecności standardu wielkości (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Mix; nr kat. SM0241, Thermo Scientific, zakres od 100 - 1 000 par zasad). Po potwierdzeniu obecności produktów amplifikacji wykonywano zdjęcia za pomocą urządzenia do dokumentacji żeli agarozowych wraz z oprogramowaniem (Syngene USA). W Tabeli 4 przedstawiono sekwencję użytych do badań specyficznych starterów.

Tabela 4. Sekwencje starterów przednich i wstecznych specyficznych dla odpowiednich genów.

Nazwa genu	Kodowane białko	Sekwencja startera przedniego (5'-3')	Sekwencja startera wstecznego (3'-5')	Wielkość produktu
<i>KCNMA1</i>	podjednostka α kanału BK _{Ca}	CCGCAGACACTGGCC AATAG	GAGCATCTCTCAGC CGGTAA	167 pz

VEDEC	izoforma VEDEC podjednostki α kanału mitoBK _{Ca}	GGGACAAACAGAATG CAACA	GGTACTCATGGGCT TGATTT	452 pz
KCNMB1	podjednostka β 1 kanału BK _{Ca}	CCAGAACCAGCAGTG CTCCTACAT	GCTCTTGGGAATTTG GCTCTGAC	95 pz
KCNMB2	podjednostka β 2 kanału BK _{Ca}	CACACTCCTGCGCTCA TAC	ACCTGGAGGCAGG GGTAC	147 pz
KCNMB3	podjednostka β 3 kanału BK _{Ca}	ATATCATGGACGACT GGCTG	CTATCTTGGTGGCA CTTAGG	178 pz
KCNMB4	podjednostka β 4 kanału BK _{Ca}	GTTCGAGTGCACCTTC ACCT	AGGAGCACTTGGG GTTGGT	169 pz
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego	TCAAGACACCATGG GGAAGGTGAA	GAATCATATTGGA ACATGTAAACCAT G	161 pz

3.4.1.4. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Przeprowadzone doświadczenia RT-qPCR umożliwiły analizę i wizualizację produktów w trakcie trwania reakcji w porównania do ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Podczas eksperymentów wykorzystywano matrycę cDNA otrzymaną według procedury opisanej w Rozdziale 3.4.1.2. *Synteza cDNA*. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną składającą się z 6 μ l rozcieńczonej wodą matrycy, 2 μ l starterów przednich i wstecznych (w stosunku 1:1; przedstawione w Tabeli 4) specyficzne dla badanych genów oraz 12 μ l Power SYBR™ Green Master Mix (mieszanina polimerazy wraz ze znakowanymi fluoroforem oligonukleotydowymi sondami; Thermo Fisher Scientific, Inc). Całość przenoszono do studzienki w płytce 96-dołkowej (MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml, Applied Biosystems). Następnie płytkę zaklejano za pomocą specjalnej folii (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems). Zamkniętą płytkę wytrząsano za pomocą vortexu oraz wirowano przy 500 x g przez 5 minut. Następnie wykorzystano urządzenie 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) w celu przeprowadzenia reakcji w warunkach (2 minuty w temperaturze 50-60 °C, 10 minut w temperaturze 95 °C i następnie 45 powtórzeń: 15 sekund w temperaturze 95 °C oraz 1 minuta w temperaturze 60 °C). Otrzymane wyniki analizowano metodą $\Delta\Delta$ Ct, badaną próbę odnoszono do warunków kontrolnych (woda

zamiast cDNA) i genu referencyjnego – GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego, *ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

3.4.2. Analiza białek metodą Western blot

Ocena ilościowa białka za pomocą techniki Western blot umożliwia badanie obecność produktu translacji mRNA. Podczas przeprowadzonych eksperymentów zbadano białka tworzące kanał BK_{Ca} w badanych liniach komórkowych oraz we frakcji mitochondrialnej.

3.4.2.1. Oczyszczanie mitochondriów oraz przygotowanie lizatów komórkowych

W celu przygotowania preparatów białkowych wysiewano komórki na naczynia hodowlane o dużej powierzchni (szalki Petriego o średnicy 150 mm). Komórki zbierano z 20 szalek, aby otrzymać jedną próbkę zawierającą białka z frakcji mitochondrialnej, frakcji niemitochondrialnej (lizat komórkowy pozbawiony mitochondriów) oraz lizatu komórkowego. Komórki będące w ok. 90% konfluencji odklejjano za pomocą ciepłej trypsyny, po wcześniejszym dwukrotnym przepłukaniu roztworem PBS. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano poprzez dodawanie do pływających komórek, medium hodowlanego zawierającego 10% FBS. Zawiesinę komórek zbierano do próbówki stożkowej i wirowano przy 800 x g przez 10 minut. Nadsącz zlewano do odpadów a osad zawieszano w 50 ml roztworu PBS, w celu przepłukania komórek oraz policzenia za pomocą licznika komórek (TC20 Auto cell counter, BioRad Laboratories, Inc). W celu osiągnięcia lepszej efektywności zliczania komórek, wybarwiono je za pomocą błękitu trypanu. Zawiesinę powtórnie zwirowano w tych samych warunkach jak uprzednio. Przeniesiono komórki na lód, podczas kolejnych etapów doświadczenia utrzymywano temperaturę 4 °C. Osad komórkowy zawieszono w 16 ml buforu IB+BSA (210 mM mannitol, 70 mM sacharozy, 0,5 M HEPES-KOH, pH 7,2 oraz 0,25% BSA) z dodatkiem 1 mM fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF) oraz mieszaniny inhibitorów proteaz (mini cOmplete™, Roche). Następnie przerywano ciągłość błony komórkowej poprzez dodanie digitoniny (16 µl na 300-500 mln komórek). Ponownie wybarwiano komórki błękitem trypanu w celu oceny dezintegracji błony plazmatycznej pod mikroskopem, komórki z uszkodzoną błoną barwiły się na kolor niebieski. Zawiesinę komórek wirowano przy 3 000 x g, przez 5 minut w temperaturze 4 °C. Nadsącz wylano do odpadów a uzyskany

osad o żelowatej konsystencji zawieszono w 8 ml buforu IB+BSA. Zawiesinę przenoszono do szklanego homogenizatora w celu dezintegracji komórek, po homogenizacji pobierano 1 ml próbki lizatu komórkowego, odkładano na lód do późniejszych wirowań. Pozostałe 7 ml ponownie wirowano zawiesinę przez 5 minut, z prędkością $600 \times g$ ($4^\circ C$). Nadsącz przelano do nowej probówki stożkowej i poddano godzinnemu wirowaniu przy $10\,000 \times g$ w temperaturze $4^\circ C$. Frakcja mitochondrialna charakteryzowała się jasnobrązowym osadem pokrytym niewielką ilością jasnego nalotu, z nadsączu pobierano próbkę frakcji niemitochondrialnej, pozostałość odlano. Za pomocą pipety automatycznej delikatnie zebrano zewnętrzną, jasną warstwę znad docelowego osadu. Pozostałą zawartość zawieszono w 5 ml buforu IB+BSA i zwirowano ($10\,000 \times g$, 30 minut w $4^\circ C$). Ponownie zawieszono osad w buforze IB+BSA ($700\mu l$) i wirowano przy tych samych parametrach w celu poprawienia czystości preparatu, czynność wykonano dwukrotnie. Pozyskany osad wraz z osadami pozostałych frakcji (lizat komórkowy oraz frakcja niemitochondrialna) zawieszono w buforze IB, w celu odpłukania BSA z próbek białkowych, zwirowano ($10\,000 \times g$, 15 minut, $4^\circ C$), ostatni etap oczyszczania również wykonywano dwukrotnie. Otrzymaną białkową frakcję mitochondrialną, niemitochondrialną oraz lizatu komórkowego przygotowywano do pomiaru stężenia białka lub mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w $-80^\circ C$, do dalszych doświadczeń.

3.4.2.2. Pomiar stężenia białka

Stężenie białka w otrzymanych preparatach pozyskanych z różnych frakcji komórkowych mierzono za pomocą metody Bradford. Na podstawie białka referencyjnego albuminy bydlęcej (BSA) wyliczano stężenie badanych próbek. Jako standard używano 2 mg/ml BSA, sporządzano krzywą standardową oparta na różnych stężeniach ($0, 1, 3, 5, 7, 10\ \mu\text{g/ml}$). Pobierano 1 i $2\ \mu\text{l}$ z badanych preparatów, które umieszczano w probówkach pomiarowych, następnie dodawano $50\ \mu\text{l}$ NaOH (100 mM) w celu denaturacji białek, inkubowano przez 5 minut. Następnie dodawano 1 ml rozcieńczonego ($1:5$) komercyjnie dostępnego barwnika (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad Laboratories, Inc.), umożliwiającego pomiar zmian absorbancji. Mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Pomiar absorbancji przeprowadzano z wykorzystaniem spektrofotometru (UV-160A, Shimadzu,

Japonia) przy długości fali 595 nm. Na podstawie uzyskanych danych, pochodzących z dwóch powtórzeń dla 1 i 2 μl obliczano końcowe stężenie białka w badanych próbkach.

3.4.2.3. Elektroforetyczny rozdział białek

Po uzyskaniu preparatu białkowego przystępowano do przygotowania próbek w celu nałożenia na żel umożliwiający elektroforetyczny rozdział białek. Znając stężenie próbek, rozcieńczano je w stosunku 4:1 (próbka:bufor) poprzez dodanie buforu obciążającego (bufor Laemmli, Bio-Rad Laboratories, Inc) z dodatkiem 2 M ditiotreitola (DTT) oraz 10 mM PMSF. Przygotowywane próbki mieszano i podgrzewano w 95 °C przez 5 minut w celu denaturacji. Aby nałożyć odpowiednią ilość próbki na żel, wyliczano ponownie stężenie próbki z uwzględnieniem rozcieńczenia buforem obciążającym.

Rozdział białek wykonywano za pomocą jednokierunkowej, denaturującej elektroforezy w żelu poliakryloamidowym - metoda SDS-PAGE. Przygotowywano żel poliakryloamidowy składający się z 12,5% żelu rozdzielającego i 4% żelu zagęszczającego, skład przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Skład żelu poliakryloamidowego stosowanego do rozdzielania białek metodą jednokierunkowej elektroforezy w warunkach denaturujących.

	12,5% żel rozdzielający	4% żel zagęszczający
woda	6 320 μl	2 840 μl
0,8 M Tris pH 6,8	-	1 250 μl
1,875 M Tris pH 8,8	3 500 μl	-
10% SDS	170 μl	100 μl
akryloamid / bis-akryloamid (30% / 0,8%,)	6 900 μl	750 μl
10% APS	100 μl	45 μl
TEMED	10 μl	15 μl
końcowa objętość	17 ml	5 ml

Po przygotowaniu dwóch mieszanin żelu, przystępowano do wylewania roztworu pomiędzy odtłuszczone 96% etanolem szyby. Wykorzystywano zestaw do wylewania

żeli oraz rozdziału pionowego MiniPROTEAN Tetra Handcast System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). W uszczelnione szyby zestawu umieszczano w pierwszej kolejności 12,5% żel rozdzielający, do $\frac{3}{4}$ wysokości szyb, od góry zalewano wodą. Po godzinie, gdy żel rozdzielający spolimeryzował wylewano 4% żel zagęszczający i umieszczano „grzebień”, który tworzy studzienki, umożliwiające nakładanie próbek. Po spolimeryzowaniu żelu nakładano standard wielkości (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa; nr kat. 26616, Thermo Scientific) oraz próbki w odpowiednim stężeniu. Do aparatu wlewano bufor glicynowy o pH 8,3 (25 mM Tris; 200 mM glicyna; 0,1% SDS). Rozdział białek prowadzono początkowo przez 10 minut przy napięciu stałym 80 V, a następnie zwiększano napięcie do 100 V przez 1 – 1,5 godziny. Po zakończeniu żel usuwano i przystępowano do transferu białek na membranę PVDF (z polifluorku winylidenu; Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Transfer białek z żelu poliakryloamidowego na membranę PVDF wykonano prowadząc mokry elektrotransfer z użyciem buforu do transferu o pH 8,3 (20 mM Tris; 150 mM glicyna; 0,02% SDS; 20% metanol) w uprzednio wykorzystywanym aparacie do rozdziału z uwzględnieniem zestawu do transferu Mini-Trans Blot Cell (Bio-Rad). Transfer prowadzono przy natężeniu 250 mA przez 2 godziny w temperaturze 4 °C. Po zakończeniu oceniano efektywność transferu poprzez detekcję białek na membranie, używano barwnika do znakowania białek (Gel Code™ Blue Safe Protein Stain). Barwnik wiąże się nietrwale do polipeptydów, pozwalając na wizualizację białek. Zaznaczano na membranie wysokość prążków standardu. Następnie membranę odbarwiano roztworem (50 % metanol, 10 % kwas octowy, woda) aż do całkowitego zniknięcia barwnika. Membranę płukano wodą oraz roztworem TBST (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20).

Po dokonaniu oceny jakości transferu, membranę blokowano 5% odtłuszczonym mlekiem w roztworze TBST przez 1 godzinę, na kołysce laboratoryjnej. Następnie płukano membranę trzykrotnie przez 10 minut w TBST, aby usunąć nadmiar mleka. W kolejnym etapie przystępowano do identyfikacji wybranych białek, poprzez nocną inkubację z przeciwciałami I-rzędowymi (spis przeciwciał przedstawiono w Tabeli 6; pochodzenia mysiego lub króliczego) w temperaturze 4 °C, na kołysce laboratoryjnej. Następnego dnia usuwano nadmiar przeciwciał oraz odpłukiwano przeciwciała I-rzędowe poprzez trzykrotne 10-minutowe przemywanie membrany buforem TBST w temperaturze pokojowej. W kolejnym kroku membranę inkubowano przez 1 godzinę

z odpowiednio dobranymi przeciwciałami II-rzędowymi (anty-mysim w rozcieńczeniu 1:5 000 lub anty-króliczym w rozcieńczeniu 1:10 000). Używano przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową (HRP). Po zakończonej inkubacji, membranę przepłukiwano TBST i przenoszono do kasety umożliwiającej przeprowadzenie reakcji chemiluminescencji. Na membranę z białkami nakrapiano roztwór wywołujący (ECL™ Prime, Amersham™), zgodnie z zaleceniami producenta, inkubowano 2 minuty. Następnie przystąpiono do ekspozycji membrany z kliszą fotograficzną w ciemni, w celu przeniesienia sygnału z wyznakowanych przeciwciałami białek na kliszę oraz wywoływania. W kolejnym etapie dokumentowano klisze za pomocą skanera, a otrzymane obrazy poddawano analizie densytometrycznej (ocena gęstości prążków) z wykorzystaniem programu ImageJ.

Tabela 6. Informacje dotyczące używanych przeciwciał do identyfikacji podjednostek kanału BK_{Ca}. Przedstawiono numer katalogowy wraz z firmą, pochodzenie odzwierzęce przeciwciała, rozcieńczenie oraz przewidywaną masę białka.

Przeciwciało	Numer katalogowy; firma	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Masa wykrywanego białka
Anty-slo1 (podjednostka α)	L6/60 (NeuroMab)	Mysie	1:400	100-130 kDa
Anty-sloβ1 (podjednostka β1)	APC-036 (Alomone labs)	Królicze	1:200	25 kDa
Anty-sloβ2 (podjednostka β2)	APC-034 (Alomone labs)	Królicze	1:200	27 kDa
Anty-sloβ3 (podjednostka β3)	N40/18 (NeuroMab)	Mysie	1:200	32 kDa
Anty-sloβ4 (podjednostka β4)	APC-061 (Alomone labs)	Królicze	1:200	25 kDa
Anty-COXIV (IV podjednostka oksydazy cytochromu c)	4844C (Cell Signaling)	Królicze	1:1 000	17 kDa

3.5. Znakowanie immunofluorescencyjne komórek z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego

Analiza obecności podjednostki α kanału BK_{Ca} została również przeprowadzona za pomocą znakowań fluorescencyjnych i oceny mikroskopowej. Badane komórki wysiewano w ilości 150 tysięcy na szalki ze szklanym dnem (Glass Bottom Dish 35 mm; nr kat. D35-20-1-N, Cellvis), umożliwiające bezpośrednią obserwację pod mikroskopem konfokalnym. Po upływie 48 godzin przystępowano do znakowania immunofluorescencyjnego. W pierwszej kolejności w celu wyznakowania przyżyciowo mitochondriów, komórki inkubowano z 100 nM MitoRed (nr kat. 53271-8X50UG-F, Sigma-Aldrich) zawieszonym w płynie hodowlanym DMEM (bez czerwieni fenolowej), przez 30 minut w inkubatorze (37 °C, 5% CO₂), następnie odciągano medium z nad komórek i płukano dwukrotnie roztworem PBS. Komórki utrwalano 4% roztworem paraformaldehydem (PFA; nr kat. 47746S, Cell Signaling Technology), poprzez 15 minutową inkubację w 4 °C. Odpłukano PFA, poprzez dwukrotne dodanie roztworu PBS. Następnie komórki permeabilizowano przy użyciu roztworu 0,05% Triton X-100 w PBS, poprzez dwukrotne płukanie przez 3 minuty za pomocą kołyski laboratoryjnej. W kolejnym kroku przeprowadzono nocną inkubację (w 4 °C) komórek z odpowiednimi I-rzędowymi przeciwciałami (Tabela 7), tak aby w jednym preparacie zobrazować dwie struktury komórkowe. Następnego dnia płukano preparaty roztworem PBS (3x po 5 minut) z nadmiaru przeciwciał I-rzędowych, aby umożliwić inkubację z dobranymi II-rzędowymi przeciwciałami wyznakowanymi fluorescencyjnie (1:1 000, anty-mysie Alexa 555, anty-królicze Alexa 488). Po upływie 2 godzin, zlewano przeciwciała i płukano preparaty roztworem PBS. Użyte przeciwciała rozcieńczano w roztworze 4% FBS w PBS. Otrzymane preparaty zamykano za pomocą odczynnika Vectashield (nr kat. H-1000-10; Vector Laboratories) w celu ochrony sygnału fluorescencyjnego przed wygaśnięciem. Przygotowane preparaty mikroskopowe obserwowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FV 1200, z oprogramowaniem FLUOVIEW 4.2.1.20. Zdjęcia preparatów mikroskopowych wykonano przy tych samych ustawieniach oraz użyciu obiektywu 60x. Analizę zdjęć przeprowadzono za pomocą programu ImageJ.

Tabela 7. Informacje dotyczące używanych przeciwciał do barwień immunofluorescencyjnych. Przedstawiono numer katalogowy wraz z firmą, pochodzenie przeciwciała, rozcieńczenie.

Przeciwciało	Numer katalogowy; firma	Pochodzenie	Rozcieńczenie
Anty-sło1 (podjednostka α)	APC-021 (Alomone labs)	Królicze	1:200
Anty – podjednostka β P4HB (disulfidoizomeraza białek w ER)	Ab2792 (Abcam)	Mysie	1:500
Anty - podjednostka α Na⁺-K⁺ ATPazy	Ab7671 (Abcam)	Mysie	1:500

3.6. Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej

Zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$) mierzono w oparciu o agregację sondy fluorescencyjnej JC10 (*ang. Mitochondrial Membrane Potential Kit - Flow Cytometry*; Abcam nr. kat. ab112133). JC10 jest lipofilnym kationem, który selektywnie gromadzi się w mitochondriach w zależności od potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. W sytuacji gdy błona mitochondrialna jest spolaryzowana (wysoki potencjał) sonda tworzy agregaty, emitujące światło przy długości fali 570 nm. Natomiast gdy dochodzi do zmiany potencjału błony (spadku potencjału, depolaryzacji) barwnik występuje w postaci monomerów emitujących światło 520 nm. Zmiana sondy JC10 z formy agregatów do monomerów wiąże się z przesunięciami w jego widmie fluorescencyjnym oraz zmianą fluorescencji z czerwonej na zieloną. Barwnik ten jest selektywnym i czułym markerem zmian potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Pomiar zmian fluorescencji sondy JC10 wykonywano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Komórki wysiewano w ilość 200-250 tysięcy na naczynia hodowlane 25 cm². Po osiągnięciu około 80% konfluencji wymieniano płyn hodowlany na płyn z dodatkiem badanej substancji (modulator kanału potasowego). Komórki inkubowano przez 1 godzinę, a następnie przystępowano do odklejania komórek za pomocą trypsyny, po wcześniejszym odplukaniu roztworem PBS (bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺). Działanie trypsyny neutralizowano płynem hodowlanym z dodatkiem FBS, zawieszając komórek wirowano przy 400 x g przez 5 minut w probówce stożkowej. Osad zawieszano w 1 ml roztworu PBS w celu policzenia komórek. Do eksperymentu wykorzystywano 500 tysięcy komórek, które zawieszano w 500 μ l przygotowanego wcześniej roztworu

barwnika JC10 (zgodnie z zaleceniami producenta). Następnie zawiesinę komórek inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37 °C, z ograniczeniem dostępu światła. Maksymalny spadek potencjału mitochondrialnego uzyskano po zastosowaniu p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu (FCCP, *ang. carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*), który dodawano równocześnie z roztworem barwnika. Po zakończonej inkubacji zawiesinę przenoszono do probówek przystosowanych do pomiarów z wykorzystaniem cytometru przepływowego (Cytometr przepływowy LSR Fortessa™, BD). Pomiarów wykonywano w Pracowni Cytometrii, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Próbkę oświetlano światłem przy długości fali 490 nm, a następnie odbierano przez barwnik JC10, który emitował światło przy długości fali 570 nm lub 520 nm. W każdej próbce zbierano dane z 10 000 komórek i analizowano porównując różnice intensywności fluorescencji z dwóch populacji komórek, różniących się emisją światła (przy długości fali 570 nm lub 520 nm).

3.7. Analiza oddychania komórkowego

Ocenę oddychania komórkowego (pomiar zużycia tlenu) wykonywano za pomocą dwóch technik laboratoryjnych, różniących się zasadą działania oraz przygotowaniem preparatu komórkowego.

3.7.1. Pomiar szybkości zużycia tlenu z wykorzystaniem oksygrafu

Badane linie komórkowego hodowano według procedury opisanej w Rozdziale 3.2. *Modele badawcze wykorzystane w badaniach mitochondrialnych kanałów potasowych* w naczyniach hodowlanych 75 cm². Komórki, które osiągnęły konfluencję 80-90% wykorzystywano do pomiarów, płukano roztworem PBS, odrywano za pomocą trypsyny, aktywność enzymu hamowano dodając płyn hodowlany z 10% FBS. Następnie komórki wirowano (5 min/400 x g), płukano roztworem PBS i ponownie wirowano. Otrzymany osad komórkowy zawieszano w 1 ml podstawowego płynu hodowlanego (odpowiednio dla komórek MEM lub DMEM bez dodatków: FBS, antybiotyki, glutamina) w celu zliczenia komórek za pomocą licznika komórkowego. Wykonywano pomiary w dwóch wariantach, mierzono oddychanie komórek z dezintegrowaną błoną poprzez digitoninę (10 µg/ml). W doświadczeniach 1,5 mln komórek zawieszano w 2,2 ml buforu (0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂·6 H₂O, 60 mM kwas laktobionowy, 20 mM tauryna, 10 mM

KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM D-sacharoza i 1 g/l BSA, pH 7,1), całość przenoszono do komory pomiarowej urządzenia (O₂k-respirometr, Oroboros Instruments). W momencie osiągnięcia zużycia tlenu na stałym poziomie, dodawano modulatory łańcucha oddechowego i/lub modulatory kanału potasowego typu BK_{Ca}.

Schemat wykonywania pomiarów zużycia tlenu w czasie w obu typach eksperymentów:

- 1) szybkość podstawowego zużycia tlenu (przed dodaniem substancji)
- 2) szybkość zużycia tlenu po dodaniu inhibitora syntazy ATP (1 μM oligomycyny)
- 3) szybkość zużycia tlenu po dodaniu inhibitorów łańcucha oddechowego kompleksów I (0,5 μM rotenon) i III (0,5 μM antymycyna)
- 4) szybkość zużycia tlenu po dodaniu modulatorów kanału BK_{Ca} (NS11021, NS1619, paksylina w odpowiednich stężeniach z zakresu 1-5 μM)
- 5) szybkość zużycia tlenu po dodaniu rozpręgniacza fosforylacji oksydacyjnej (1 μM FCCP)

Wyniki analizowano porównując zużycie tlenu w warunkach kontrolnych i po dodaniu substancji.

3.7.2. Analiza oddychania komórkowego z wykorzystaniem urządzenia Seahorse

W celu określenia zużycia tlenu komórek przyklejonych do podłoża wykorzystano urządzenie Seahorse XF (Agilent). Komórki HEK293 oraz HEK293-BK_DEC wysiewano na dołki płytki 96 dołkowej Seahorse XF96 Cell Culture Microplate w pełnym medium hodowlanym. Po upływie 24 godzin, bezpośrednio przed pomiarem zmieniano płyn hodowlany na XF DMEM medium (nr kat. 103575-100, Agilent Technologies). Następnie płytkę hodowlaną wraz z płytką w której umieszczano modulatory łańcucha oddechowego (1 μM oligomycyny, 0,5 μM rotenon/antymycyna oraz 1 μM FCCP) umieszczano w inkubatorze 37 °C bez CO₂ na 1 godzinę. Urządzenie pomiarowe Seahorse XF zostało zaprogramowane tak, aby w pierwszej kolejności przeprowadzić 3 pomiary w odstępach 5 min, bez żadnej stymulacji, co pozwoliło na

wyznaczenie oddychania podstawowego. Następnie urządzenie automatycznie dodawało oligomycynę do dołka z komórkami. Po wytrząsaniu płytki i 5 minutach inkubacji, wykonywano pomiar, inkubację wraz z pomiarem wykonywano 3 razy. W kolejnym kroku wprowadzano FCCP, pomiar wykonywano w takich samych warunkach jak opisano wcześniej, ostatnim dodawanym modulatorem była mieszanina rotenonu i antymycyny. Po zakończonym eksperymencie z nad komórek zlewano płyn i zawieszano w 100 mM NaOH w celu wykonania pomiaru stężenia białka jak opisano w Rozdziale 3.4.2.2. *Pomiar stężenia białka.*

3.8. Ocena przeżywalności komórek

Analizę przeżywalności komórek wykonano z wykorzystaniem zestawu do pomiaru apoptozy i nekrozy (RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay, Promega). Ocenę procesu apoptozy umożliwia aneksyna V, która wiąże się z zewnętrznie występującą, ujemnie naładowaną fosfatydyloseryną. Przemieszczenie tego fosfolipidu do zewnętrznej warstwy błony komórkowej jest charakterystyczne dla procesu programowanej śmierci komórki. Aneksyna V połączona jest z dwoma różnymi (większą i mniejszą) podjednostkami czynnika luminescencyjnego, który po fuzji obu podjednostek emituje sygnał. Związanie mniejszej i większej podjednostki możliwe jest w momencie gdy aneksyna V oddziałuje z fosfatydyloseryną. Pomiar procesu nekrozy umożliwia sygnał fluorescencyjny generowany przez cząsteczkę, która po związaniu z DNA komórki fluoryzuje.

Komórki wysiewano w gęstości 15 tys. na dołek czarnej płytki 96-dołkowej (Corning Incorporated Costar) po osiągnięciu konfluencji ok. 80% przystępowano do wykonywania pomiarów. W pierwszym etapie wymieniano płyn hodowlany (100 µl), bezpośrednio przed eksperymentem a następnie dodawano do dołków w 3-krotnym powtórzeniu badany związek. Zgodnie z zaleceniem producenta przygotowywano mieszaninę reakcyjną, następnie do każdego dołka dodawano 100 µl roztworu, zawierającego czynniki luminescencyjne i fluorescencyjne. Po zakończeniu dodawania reagentu, wykonywano pierwszy pomiar z wykorzystaniem czytnika płytek Infinite m200 pro (Tecan). Kolejne pomiary przeprowadzano w następujących punktach pomiarowych: 0, 1, 3, 7, 9, 11, 13 oraz 24 godziny. Urządzenie rejestrowało sygnał fluorescencyjny przy długość fali wzbudzenia: 485 nm oraz emisji: 520 nm.

3.9. Analiza statystyczna wyników

W niniejszej pracy analizowane dane przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD, *ang. standard deviation*). Większość eksperymentów wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach. Obliczenia statystyczne wykonywano za pomocą programów Excel (Microsoft Office), GraphPad Prism 4 oraz 9 (GraphPad Software). W analizie istotności otrzymanych wyników wykorzystano test t-Studenta lub jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem Tukey'a. Różnice między średnimi uznawano za istotne statystycznie gdy wartość $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) lub $p < 0,0001$ (****).

4. Wyniki

W celu uzyskania odpowiedzi na postawione założenia, przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem technik biofizycznych oraz biochemicznych. Podstawową metodą badawczą była technika elektrofizjologiczna *patch-clamp*, umożliwiająca identyfikację mitochondrialnych kanałów potasowych oraz badanie wpływu związków niskocząsteczkowych na ich aktywność. Otrzymane wyniki można podzielić na trzy obszary:

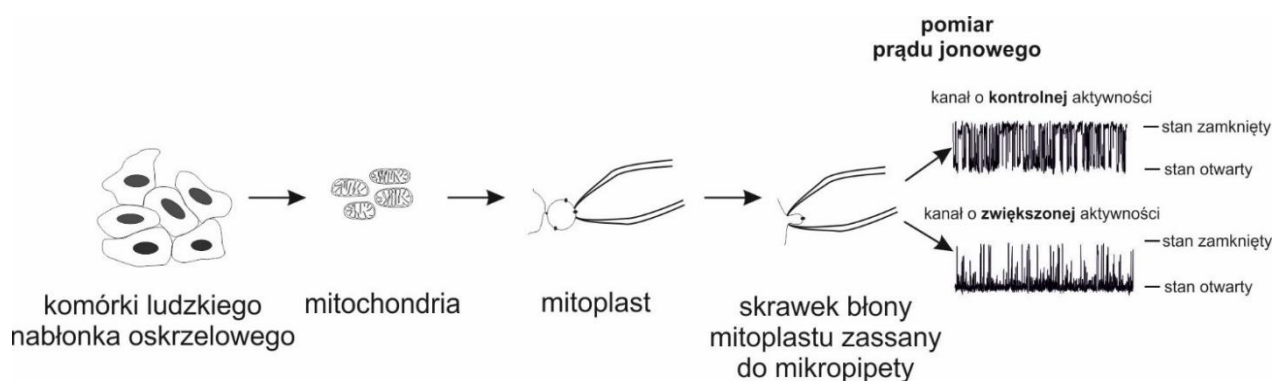
- identyfikację oraz charakterystykę mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} pochodzącego z linii komórkowych HBE oraz HEK293-BK_DEC,
- badanie wpływu flawonoidów oraz ich pochodnych na aktywność kanału mitoBK_{Ca},
- regulację kanału mitoBK_{Ca} przez związki niskocząsteczkowe o strukturze zbliżonej do paksyliny (inhibitor kanału potasowego).

4.1. Identyfikacja mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego

Komórki nabłonka oskrzelowego stanowią pierwszą linię obrony przed szkodliwymi czynnikami środowiska, ściśle do siebie przylegając tworzą barierę biologiczną. Narazone na uszkodzenia komórki jako mechanizm obronny, posiadają zdolność wydzielania śluzu. Warto zaznaczyć, iż komórki (kardiomiocyty, neurony) w warunkach stresowych wiążą swój mechanizm obronny z aktywacją mitochondrialnych kanałów potasowych.

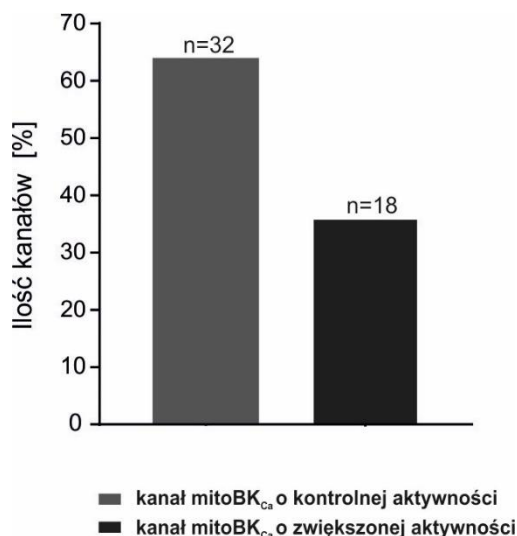
Wykorzystując technikę *patch-clamp* w mitochondriach ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego zidentyfikowano kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia (kanał mitoBK_{Ca}). Do identyfikacji białka kanałowego wykorzystano kilka parametrów biofizycznych, między innymi wyznaczano przewodnictwo kanału. Dodatkowo zbadano regulację aktywności białka kanałowego przez zastosowanie znanych i specyficznych modulatorów kanałów potasowych. Podczas prowadzonych doświadczeń elektrofizjologicznych izolowano mitochondria z komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego, następnie przygotowano mitoplasty, zgodnie z opisem przedstawionym w *Rozdziale 3.3.2. Technika patch-clamp*. W mitoplastach

pochodzących z tej samej izolacji zaobserwowano dwie różne aktywności kanału mitoBK_{Ca} w tych samych warunkach doświadczalnych. Rejestracje, które charakteryzowały się w warunkach wyjściowych (przed dodaniem modulatorów kanału potasowego) niskim prawdopodobieństwem otwarć kanału (P_o) nazwano kontrolną aktywnością. Natomiast te z wysokim P_o , zwiększoną aktywnością kanału mitoBK_{Ca}. Na Rycinie 13 przedstawiono schemat techniki *patch-clamp* z uwzględnieniem dwóch aktywności (kontrolnej i zwiększonej) kanału mitoBK_{Ca}.



Rycina 13. Schemat przedstawiający etapy doświadczalne pozwalające na pomiar kanałów potasowych (obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej), z zastosowaniem techniki elektrofizjologicznej *patch-clamp*. Pomiar wykonany z wykorzystaniem komórek HBE pozwoliły zaobserwować dwie różne aktywności (nazwane w rozprawie jako kontrolna i zwiększona) kanału BK_{Ca} obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego, różniące się P_o .

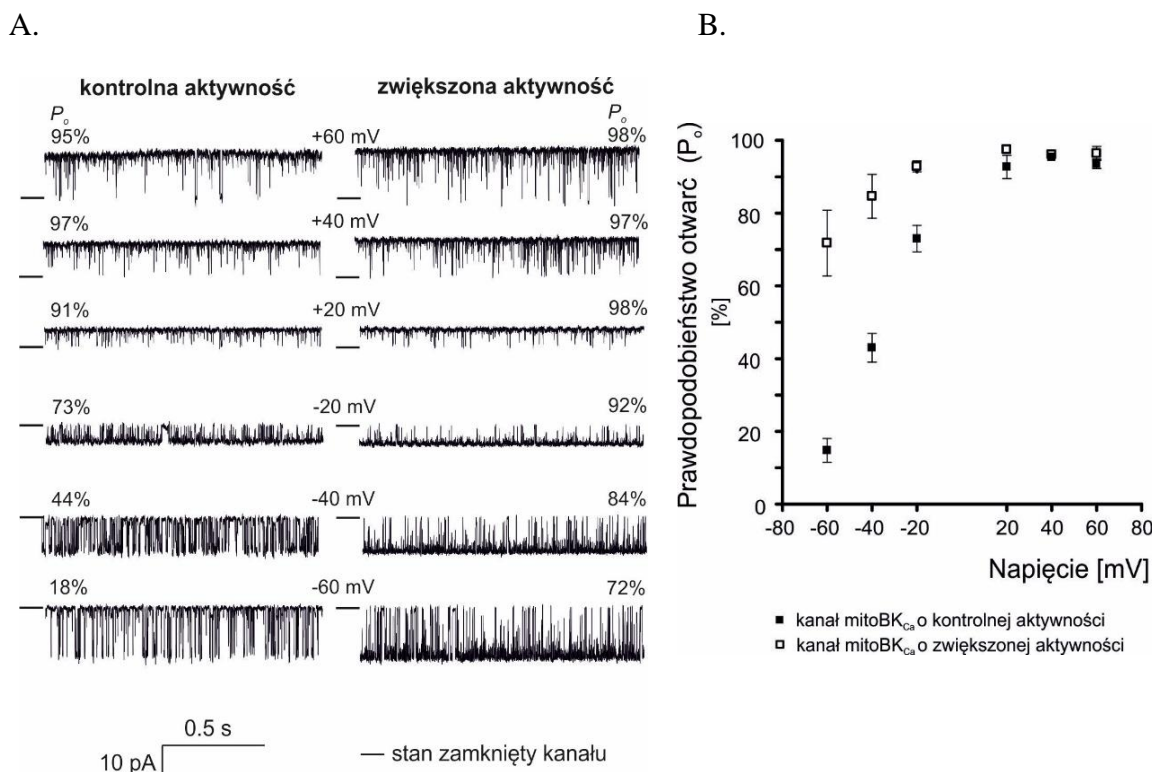
W warunkach wyjściowych (roztwór izotoniczny, zawierający m.in. 100 μ M stężenie Ca²⁺), przy tym samym napięciu -40 mV, wartość P_o poniżej 60% oznaczała kontrolną aktywność kanału, natomiast powyżej 60% - kanał mitoBK_{Ca} o zwiększonej aktywności. Występowanie aktywności kontrolnej było niemalże dwukrotnie wyższe (n=32) w porównaniu do zwiększonej aktywności (n=18). Na Rycinie 14 przedstawiono porównanie ilości obu aktywności (kontrolnej i zwiększonej) kanału mitoBK_{Ca}, podczas wykonywania eksperymentów *patch-clamp*. W tym celu zanalizowano 50 losowo wybranych doświadczeń elektrofizjologicznych, wśród których zaobserwowano dwie populacje aktywności kanału mitoBK_{Ca}.



Rycina 14. Wykres przedstawiający porównanie ilości kanałów mitoBK_{Ca} o kontrolnej i zwiększonej aktywności, różniących się prawdopodobieństwem otwarć (P_o). Analizowano 50 eksperymentów przeprowadzanych z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*, które zostały wybrane losowo.

4.1.1. Analiza prawdopodobieństw otwarć kanału mitoBK_{Ca}

Na podstawie wykonanych eksperymentów techniką *patch-clamp*, wyznaczono biofizyczne właściwości obu (wcześniej zdefiniowanych) aktywności (kontrolnej i zwiększonej) kanałowych zaobserwowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego. W pierwszej kolejności porównano prawdopodobieństwo otwarć dwóch populacji kanałów, w tych samych warunkach oraz przy tych samych napięciach z zakresu od +60 mV do -60 mV. Przykładowe rejestracje zmian przepływającego prądu jonowego w czasie przedstawiono na Rycinie 15A. Prawdopodobieństwo otwarć kanału o kontrolnej aktywności wynosiło 18% przy napięciu -60 mV, natomiast wzrost napięcia do +60 mV spowodował zwiększenie otwarcia kanału do poziomu 95%. Druga aktywność kanału charakteryzowała się wysokim P_o przy napięciu -60 mV, które wyniosło 72%, podczas gdy zmiana napięcia z ujemnego na dodatnie, spowodowała wzrost aktywności kanału do 98% przy +60 mV. Natomiast przy napięciu -40 mV prawdopodobieństwo otwarć aktywności kontrolnej kanału mitochondrialnego wynosiło 44% podczas gdy drugiej aktywności było prawie dwukrotnie wyższe – 84%.



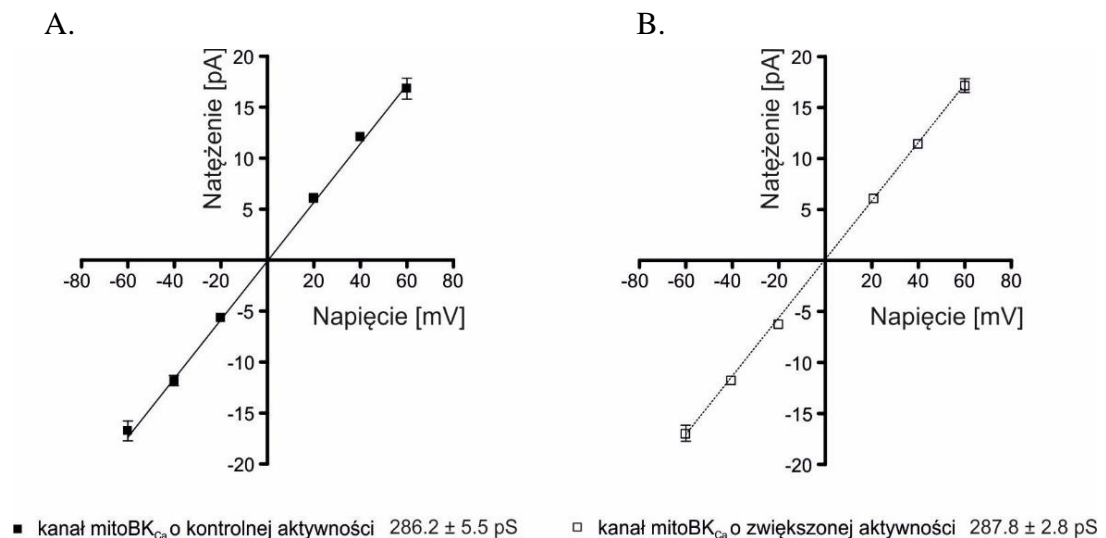
Rycina 15. Porównanie prawdopodobieństwa otwarć obu aktywności (kontrolnej i zwiększonej) kanału mitoBK_{Ca}. **(A)** Przykładowe rejestracje aktywności kanałów przy różnym napięciu (-60, -40, -20, +20, +40, +60 mV) w warunkach symetrycznych stężeń 150/150mM KCl, pH 7,2. „—” oznacza stan zamknięty kanału. **(B)** Wykres prawdopodobieństw otwarć kanału mitoBK_{Ca} o kontrolnej i zwiększonej aktywności w zależności od napięcia (n=3).

Analiza otrzymanych danych umożliwiła przygotowanie wykresu przedstawionego na Rycinie 15B, porównującego prawdopodobieństwo otwarć obu populacji (kontrolnej i zwiększonej aktywności) kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE. Kanał o zwiększonej aktywności charakteryzuje się znacznie większym prawdopodobieństwem otwarć przy napięciach ujemnych w porównaniu do kontrolnej aktywności kanału.

4.1.2. Właściwości biofizyczne kanału mitoBK_{Ca}: zależność prądowo-napięciowa oraz średnie czas otwarć i zamknięć.

Na podstawie zależności płynącego prądu od przyłożonego napięcia wyznaczono przewodnictwo obu populacji kanału. Przewodnictwo pośrednio świadczy o wielkości poru kanału i jest biofizyczną właściwością, charakteryzującą kanał za pomocą, której można zakwalifikować badany kanał do odpowiedniej grupy kanałów. Analiza

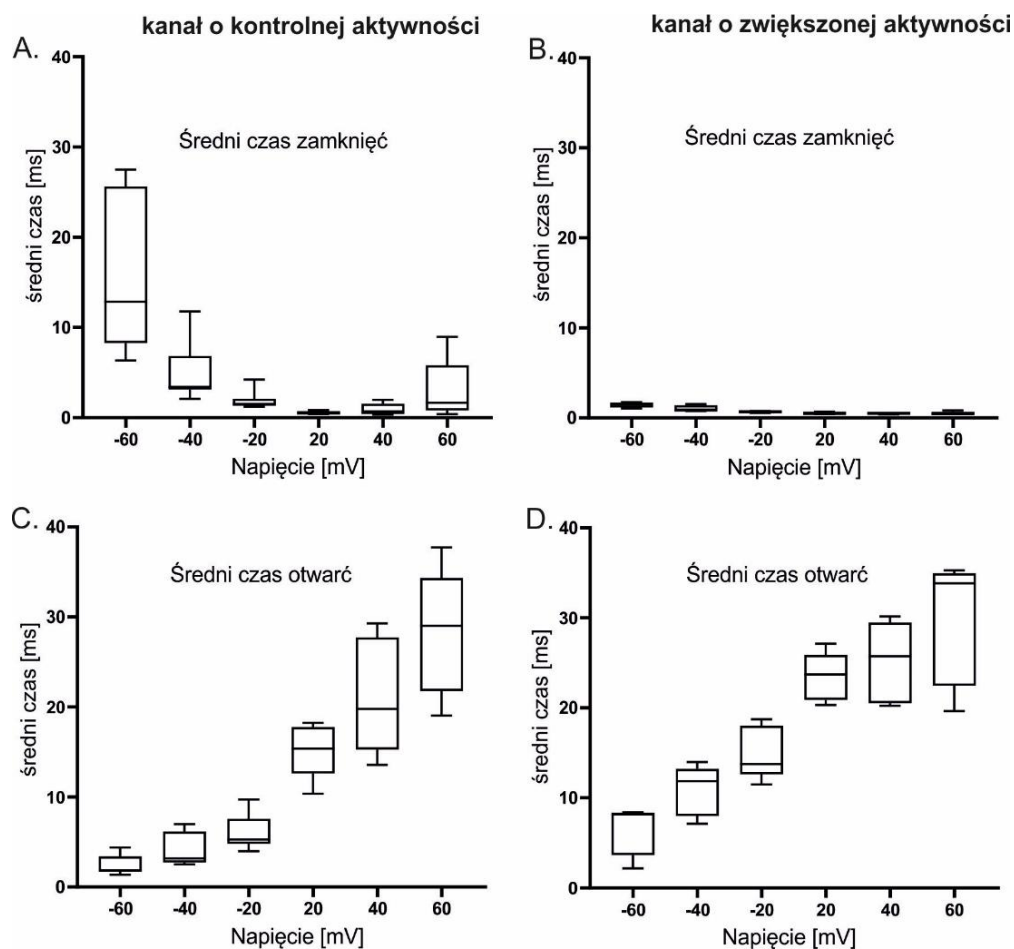
nachylenia wyznaczonej prostej do osi napięcia umożliwiła obliczenie przewodności kanałów w warunkach symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl. Uzyskane wartości wykazują, że przewodnictwo obu aktywności (kontrolnej i zwiększonej) jest bardzo zbliżone do opisywanego w literaturze [93] przewodnictwa kanałów BK_{Ca}. Przewodnictwo wynosi odpowiednio dla kanału o kontrolnej aktywności $286,2 \pm 5,5$ pS (S – Simens; jednostka przewodności elektrycznej), natomiast przewodność kanału o zwiększonej aktywności to $287,8 \pm 2,8$ pS (n=4). Otrzymane dane wskazują, że obie populacje należą do tej samej rodziny kanałów potasowych o dużym przewodnictwie. Na Rycinie 16 przedstawiono wykresy zależności natężenia [pA] prądu jonowego przepływającego przez kanał, od napięcia [mV] dla obu populacji (kontrolnej i o zwiększonej aktywności) kanału mitoBK_{Ca}, na podstawie którego wyliczono przewodnictwo kanałów.



Rycina 16. Wykresy zależność prądowo-napięciowej obu populacji kanałów mitoBK_{Ca}. Wykres wraz z przewodnictwem (A) kanału mitoBK_{Ca} o kontrolnej aktywności $286,2 \pm 5,5$ pS oraz (B) kanału mitoBK_{Ca} o zwiększonej aktywności to $287,8 \pm 2,8$ pS. Wykresy przygotowano na podstawie danych uzyskanych z doświadczeń przy różnym napięciu (-60, -40, -20, +20, +40, +60 mV) w warunkach symetrycznych stężeń 150/150mM KCl, pH 7,2 (n=4).

Wykonano również analizę rozkładu średnich czasów otwarć i zamknięć kanału w zależności od napięcia dla kontrolnej i zwiększonej aktywności. Zaobserwowano, że średnie czasy zamknięć kanału o zwiększonej aktywności są bardzo niskie, bliskie 1 ms, niezależnie od napięcia (Rycina 17B). Natomiast kanał o kontrolnej aktywności charakteryzuje się wzorem średnich czasów zamknięć (Rycina 17A) podobnym do kanału

mitoBK_{Ca} z ludzkich fibroblastów skóry [94]. Średni czas zamknięcia kanału jest najwyższy przy napięciu -60 mV i wynosi około 15 ms, a następnie zmniejsza się do około 2 ms przy napięciu dodatnim +60 mV. Natomiast widoczny na Rycinie 17C i D rozkład czasów otwarć dla obu populacji (kontrolnej i zwiększonej aktywności) kanału wygląda bardzo podobnie. Średnie czasy otwarć wzrastają z około 4 do 30 ms, wraz ze wzrostem napięcia od -60 do +60 mV dla obu aktywności kanału, a zależność ta jest charakterystyczna dla kanału mitoBK_{Ca} [93].



Rycina 17. Wykresy z rozkładem średnich czasów zamknięć i otwarć dla kanału o kontrolnej aktywności odpowiednio panel (A) i (C) oraz dla kanału o zwiększonej aktywności panel (B) i (D). Doświadczenia wykonywano przy różnym napięciu (-60, -40, -20, +20, +40, +60 mV) w symetrycznym roztworze izotonicznym 150/150 mM KCl (100 μ M Ca²⁺), (n = 4).

Podsumowując doświadczenia elektrofizjologiczne z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* wykazały obecność mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w ludzkich komórkach

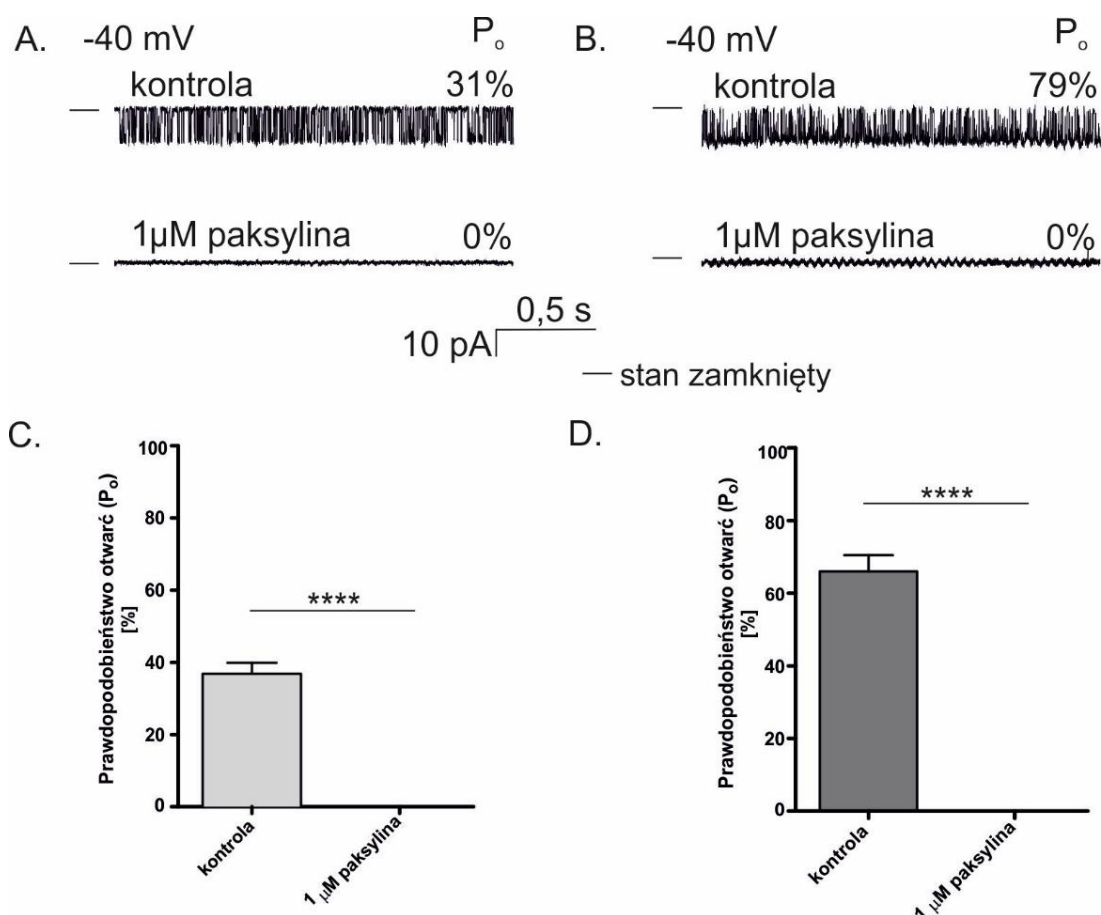
nabłonka oskrzelowego. Ponadto, zaobserwowano występowanie kanału mitoBK_{Ca} w dwóch aktywnościach kontrolnej i zwiększonej, różniące się prawdopodobieństwem otwarć kanału.

4.2. Regulacja aktywności kanału mitochondrialnego w komórkach HBE

W celu dokładniejszej charakterystyki mierzonego kanału należącego do rodziny kanałów o dużym przewodnictwie, zastosowano znane modulatory kanałów BK_{Ca}. Z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* oraz układu perfuzyjnego (opisanego w *Rozdziale 3.2.2. Technika patch-clamp*) wykonano doświadczenia prowadzące do zbadania wpływu substancji regulujących aktywność kanału takich jak: paksylina, NS11021, NS1619, iberiotoksyna. Substancje te stanowią kanoniczne regulatory kanałów potasowych typu BK_{Ca}. Zbadano także wpływ jonów wapnia na aktywność mierzonego kanału.

4.2.1. Wpływ modulatorów na kanał mitoBK_{Ca}

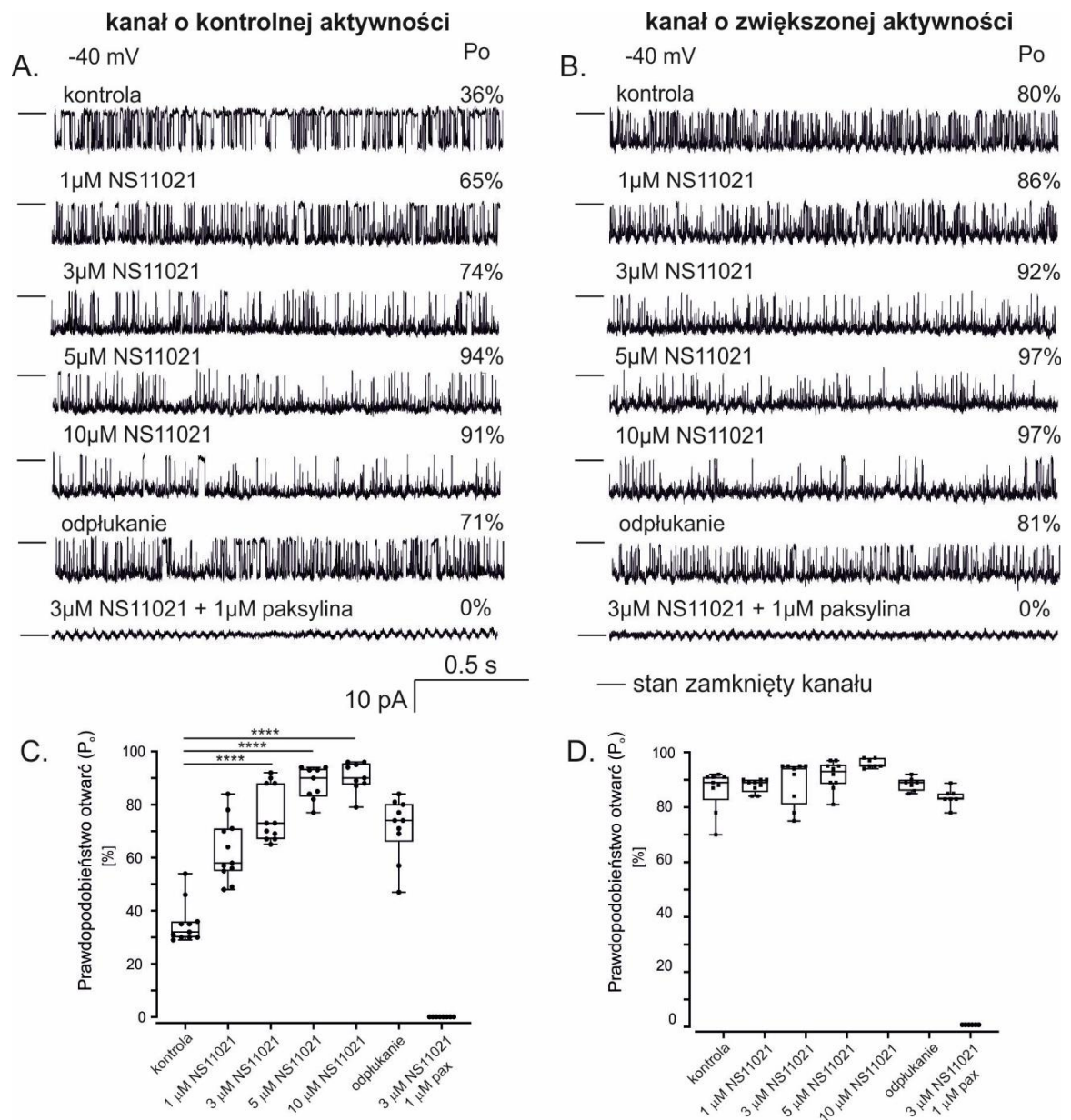
Jednym z dobrze poznanych i opisanych inhibitorów kanału BK_{Ca} jest naturalnie występująca paksylina. Zaobserwowano, że obie populacje kanału mitoBK_{Ca} o kontrolnej oraz zwiększonej aktywności, wykazują wrażliwość na ten specyficzny inhibitor. Prawdopodobieństwo otwarć mitochondrialnego kanału BK_{Ca} o kontrolnej aktywności zmieniło się z 31% do 0% po zastosowaniu 1 μM paksyliny (Rycina 18A i C). Ten sam efekt obserwowano dla kanału mitoBK_{Ca} o zwiększonej aktywności, paksylina w tym samym stężeniu 1 μM, zmniejszyła P_o z 79% do 0% (Rycina 18B i D). Na Rycinie 18 przedstawiono przykładowe rejestracje z doświadczeń *patch-clamp* wraz z analizą prawdopodobieństw otwarć kanału.



Rycina 18. Hamowanie obu aktywności (kontrolnej i zwiększonej) kanału mitoBK_{Ca} przez paksylinę. Przykładowe rejestracje o kontrolnej (A) i o zwiększonej aktywności (B) kanału mitoBK_{Ca}, przez który przepływa prąd jonowy przy napięciu -40 mV w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl, pH 7,2, w obecności 100 μM Ca²⁺ przed (warunki kontrolne) oraz po dodaniu 1 μM paksyliny. „-” oznacza stan zamknięty kanału. (C) i (D) wykresy analizy prawdopodobieństw otwarć (P_o) odpowiednio dla kanału o kontrolnej i zwiększonej aktywności przed (warunki kontrolne) i po dodaniu 1 μM paksyliny. Istotność statystyczną wyznaczono testem t-Studenta (p < 0,0001 (****)).

W przeprowadzonych badaniach, zastosowano specyficzny aktywator kanału BK_{Ca}, NS11021. Wykonano analizę wpływu NS11021 na obie aktywności (kontrolną i zwiększoną) mierzonego kanału. Na Rycinie 19 zestawiono przykładowe wyniki doświadczenia przedstawiające aktywację kanału o kontrolnej (Rycina 19A i C) i zwiększonej aktywności (Rycina 19B i D). Zaobserwowano, że 1 μM NS11021 zwiększa prawdopodobieństwo otwarć kanału o kontrolnej aktywności o 30%. Natomiast maksymalny wzrost aktywności kanału następuje po dodaniu 5 i 10 μM NS11021 (Rycina 19A i C). Kanał o zwiększonej aktywności również jest wrażliwy na aktywator kanału BK_{Ca}, lecz w znacznie mniejszym stopniu. NS11021 w stężeniu 3 μM zwiększa

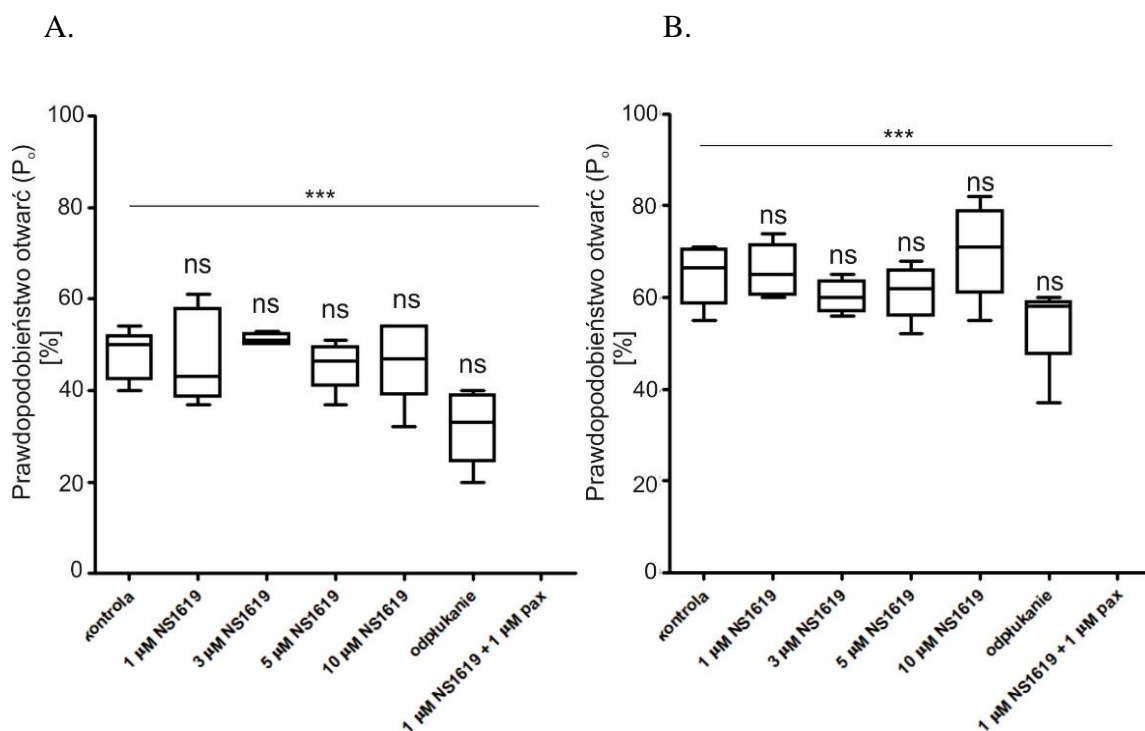
prawdopodobieństwo otwarcia kanału o około 10%, następnie najwyższe badane stężenia 5 oraz 10 μM powodują wzrost o około 17%. Zaobserwowano również, że odpłukanie, które ma na celu przywrócenie warunków wyjściowych (roztwór izotoniczny zawierający m.in. 100 μM Ca^{2+}), powoduje zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarć obu populacji kanałów jednakże nie do poziomu pierwotnego, tzn. przed zastosowaniem aktywatora. W ostatnim etapie doświadczenia zastosowano mieszaninę inhibitora kanału BK_{Ca} – paksylinę wraz z 3 μM NS11021, zaobserwowano całkowite zamknięcie kanału.



Rycina 19. Wpływ aktywatora NS11021 na obie (kontrolną i zwiększoną) aktywności kanału mitob K_{Ca} w komórkach ludzkiego nabłonka oskrzelowego. (A) i (B) przykładowe rejestracje przepływu prądu jonowego przy napięciu -40 mV w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl,

100 μM Ca^{2+} oraz pH 7,2 odpowiednio dla kanału o kontrolnej (**A**) i o zwiększonej (**B**) aktywności. Sekwencję zastosowanych modulatorów (NS11021 i paksyliny) kanału BK_{Ca} wraz z użytymi stężeniami, przedstawiono na schemacie, „-” oznacza stan zamknięty kanału. (**C**) i (**D**) wykresy analizy prawdopodobieństwa otwarć (P_o) odpowiednio dla kanału o kontrolnej i zwiększonej aktywności w warunkach: kontrolnych (przed dodaniem aktywatora), różnych stężeń NS11021 (1, 3, 5, 10 μM), odpłukanie oraz 3 μM NS11021 wraz z 1 μM paksyliną (pax), (n=3). Wykresy zawierają pola z pojedynczymi wartościami dla P_o zaznaczone jako kropki, linia w poprzek prostokąta wskazuje medianę, wąsy oznaczają minimalne i maksymalne wartości P_o . Zaznaczono również poziom istotności statystycznej przy pomocy analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z zastosowaniem testem Tukey’a ($p < 0,0001$ (****)).

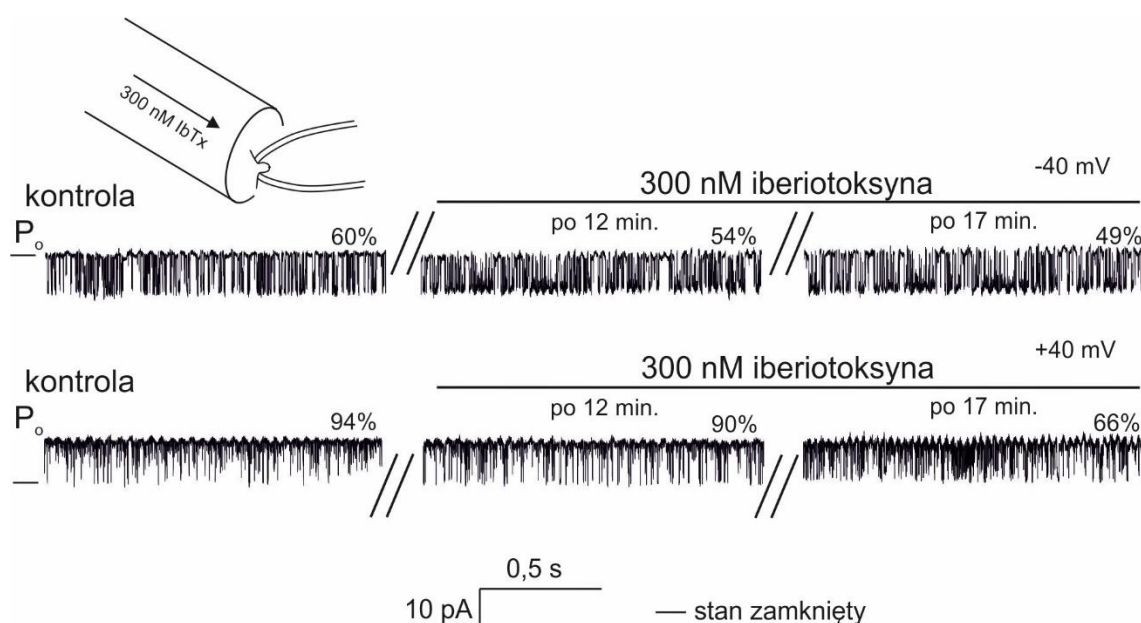
Kolejnym wykorzystanym modulatorem kanału BK_{Ca} był aktywator kanałów potasowych NS1619. Zaobserwowano, że zarówno kontrolna (Rycina 20A) jak i zwiększona (Rycina 20B) aktywność mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w komórkach HBE nie została zaktywowana. Zastosowanie NS1619 w stężeniach 1, 3, 5, 10 μM nie spowodowało znacznego wzrostu prawdopodobieństwa otwarć obu populacji kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$. Po odpłukaniu związku, P_o obu aktywności (zwiększonej i kontrolnej) kanału pozostała bez zmian. Natomiast roztwór NS1619 z paksyliną, zahamował kanał $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ o kontrolnej i zwiększonej aktywności. Na Rycinie 20 przedstawiono analizę prawdopodobieństw otwarć kanału o kontrolnej i zwiększonej aktywności po zastosowaniu różnych stężeń NS1619, przy napięciu -40 mV w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl, w obecności 100 μM Ca^{2+} oraz pH 7,2. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że NS1619 nie jest skutecznym aktywatorem kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w komórkach ludzkiego nabłonka oskrzelowego.



Rycina 20. Wpływ aktywatora NS1619 na mitochondrialny kanał BK_{Ca} o kontrolnej (A) oraz zwiększonej aktywności (B). Wykresy analizy prawdopodobieństwa otwarć (P_o) kanału w warunkach: kontrolnych (przed dodaniem aktywatora), różnych stężeń NS1619 (1, 3, 5, 10 μ M), odplukanie oraz 3 μ M NS1619 wraz z 1 μ M paksyliną (pax), (n=3). Wykresy zawierają pola, która wyznaczają zakres wartości dla P_o , linia w poprzek prostokąta wskazuje medianę, wąsy oznaczają minimalne i maksymalne wartości P_o . Poziom istotności statystycznej (względem kontroli) określono metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z zastosowaniem testem Tukey'a ($p < 0,001$ (***) ; $p > 0,05$ (ns)).

Następnie zbadano wpływ innego inhibitora – iberiotoksyny na kanał $mitoBK_{Ca}$ o kontrolnej aktywności. Z danych literaturowych wiadomo, że miejsce wiązania iberiotoksyny w kanale BK_{Ca} z błony plazmatycznej znajdują się po stronie zewnątrzkomórkowej [176]. Przeprowadzono doświadczenia w dwóch orientacjach, pierwsza polegała na dodaniu roztworu z inhibitorem od strony macierzy mitochondrialnej, natomiast druga od strony przestrzeni międzybłonowej. Na Rycinie 21 przedstawiono uzyskane rejestracje przepływu prądu jonowego w sytuacji dodania 300 nM iberiotoksyny na kanał $mitoBK_{Ca}$ od strony macierzy mitochondrialnej. Zaobserwowano, że przy napięciu -40 mV, po inkubacji 17 minutowej z 300 nM iberiotoksyną, prawdopodobieństwo otwarć kanału $mitoBK_{Ca}$ zmniejsza się z 60% w warunkach wyjściowych do 49%. Podobna zależność została odnotowana dla potencjału +40 mV, po ok. 17 minutach działania substancji na kanał $mitoBK_{Ca}$,

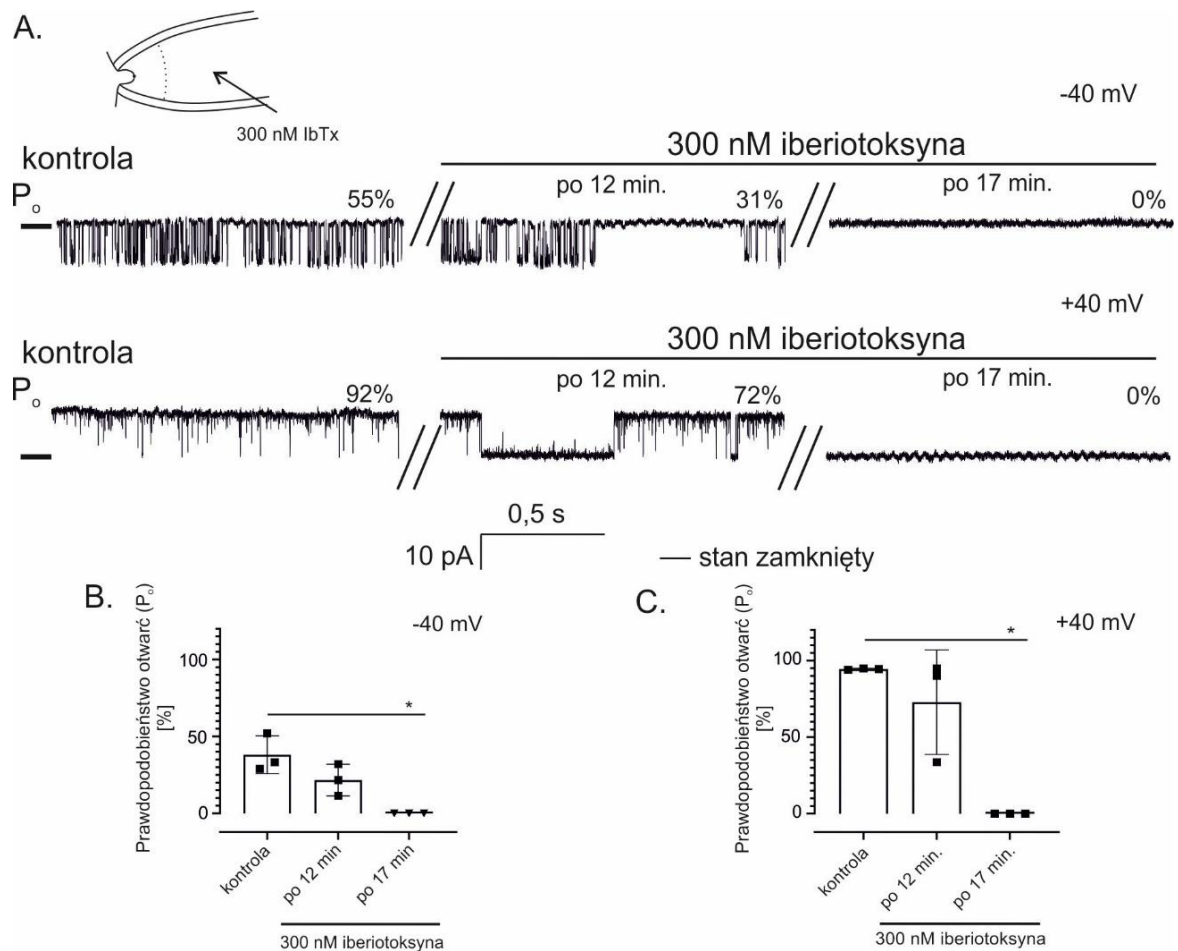
prawdopodobieństwo otwarcia kanału zmniejszyło się o około 30%. Rycina 21 przedstawia wyniki przeprowadzonych doświadczeń, wpływu iberiotoksyny od strony macierzy mitochondrialnej na kanał mitoBK_{Ca} o kontrolnej aktywności w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego.



Rycina 21. Wpływ inhibitora iberiotoksyny (IbTx) na kanał mitoBK_{Ca} o kontrolnej aktywności. W lewej górnej części widoczny uproszczony schemat przeprowadzonych doświadczeń z zaznaczoną orientacją dodawania 300 nM iberiotoksyny poprzez system perfuzyjny. Poniżej przedstawiono zapisy pomiarów elektrofizjologicznych przy napięciu -40 mV (górny panel) oraz +40 mV (dolny panel) w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl, 100 μ M Ca²⁺ oraz pH 7,2; „-” oznacza stan zamknięty kanału, n=3. Dodatkowo, zaznaczono punkty czasowe, z których pochodzą rejestracje techniką *patch-clamp*, podczas inkubacji z 300 nM iberiotoksyną.

Drugi schemat doświadczalny wymagał modyfikacji standardowego układu eksperymentalnego. Końcówkę mikropipety wypełniono roztworem izotonicznym zawierającym 100 μ M Ca²⁺ a następnie za pomocą igły i strzykawki dopełniano roztworem zawierającym 300 nM iberiotoksyny. Przygotowaną mikropipetą rejestrowano aktywność kanału przez cały czas trwania doświadczenia. Po upływie 12 minut, obserwowano charakterystyczne blokowanie kanału poprzez działanie iberiotoksyny, która przedyfundowała do końca mikropipety, a więc do miejsca styku z błoną mitochondrialną i kanałem mitoBK_{Ca}. Zmniejszenie prawdopodobieństw otwarcia kanału mitochondrialnego BK_{Ca} o kontrolnej aktywności, obserwowano przy napięciu

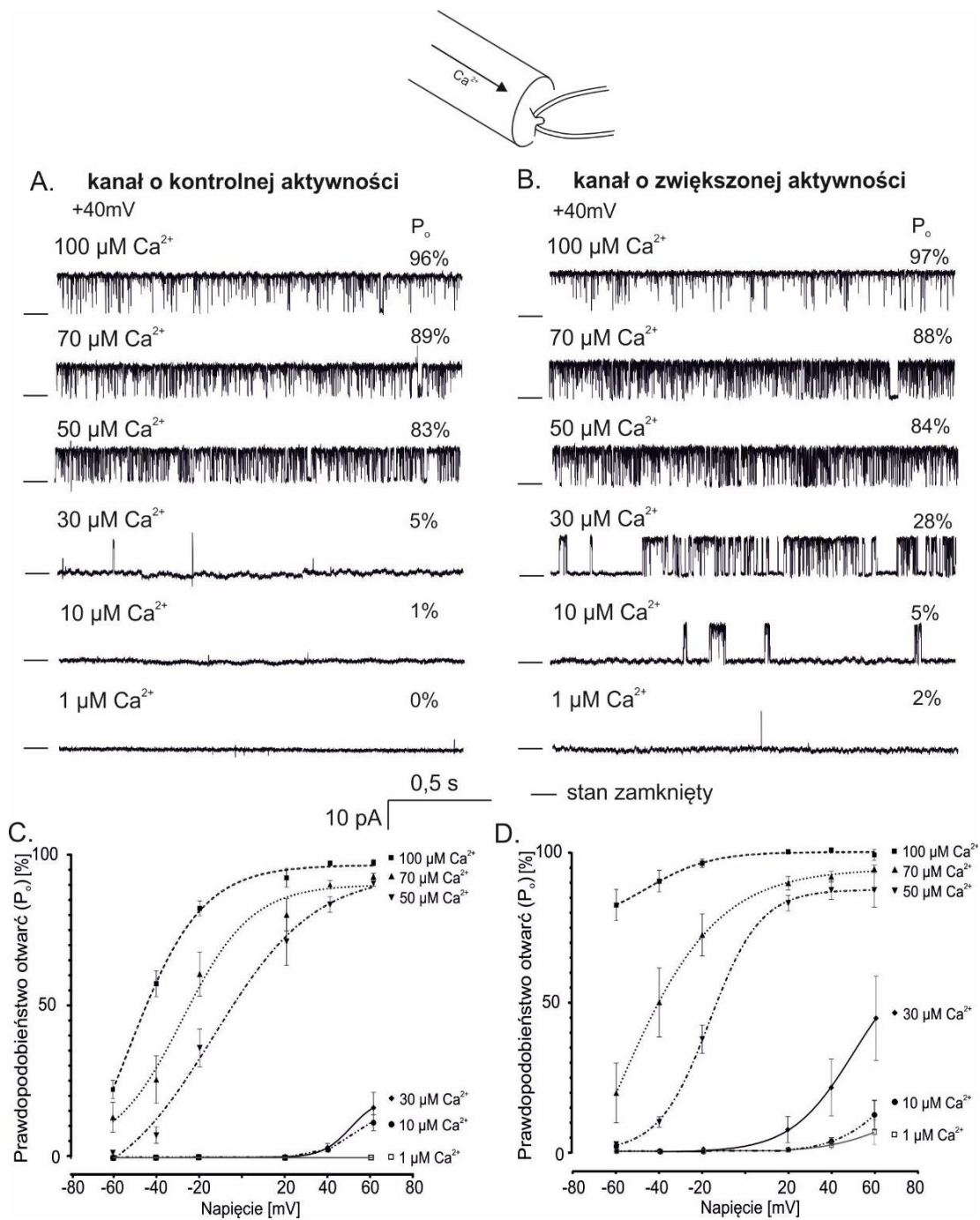
-40 mV oraz +40 mV. Wynosiło około 20% w porównaniu do początku doświadczenia. Następnie po upływie kolejnych 5 minut, obserwowano całkowite zamknięcie kanału mitoBK_{Ca} przy obu przyłożonych napięciach. Rycina 22 przedstawia wyniki doświadczeń dla kanału o kontrolnej aktywności wraz ze schematem obrazującym napełnienie mikropipety.



Rycina 22. Hamowanie kanału mitoBK_{Ca} o kontrolnej aktywności przez inhibitor iberiotoksynę obecną w mikropipecie pomiarowej. (A) Przykładowe zapisy pomiarów elektrofizjologicznych w warunkach wyjściowych oraz po przedyfundowaniu 300 nM iberiotoksyny. Rejestracje wykonano przy napięciu -40 mV oraz +40 mV, w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl, 100 μ M Ca²⁺ oraz pH 7,2, „-” oznacza stan zamknięty kanału. (B) Analiza prawdopodobieństw otwarć (P_o) kanału mitoBK_{Ca} dla warunków wyjściowych i dwóch punktów czasowych 12 oraz 17 minuta trwania eksperymentu, n=3. Istotność statystyczną względem kontroli wyznaczono metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’*a* ($p < 0,05$ (*)).

4.2.2. Regulacja aktywności przez zmiany stężenia jonów wapnia

W celu dalszej charakterystyki mierzonego kanału sprawdzono regulację obu populacji o kontrolnej i zwiększonej aktywności przez różne stężenia jonów wapnia (100, 70, 50, 30, 10, 1 $\mu\text{M Ca}^{2+}$). Wykazano, iż obie aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ są zależne od jonów wapnia. Zaobserwowano, że wraz ze spadkiem stężenia jonów Ca^{2+} prawdopodobieństwo otwarć kanałów maleje. Obserwowano również różnice, kanał o kontrolnej aktywności w stężeniu 30 $\mu\text{M Ca}^{2+}$ wykazywał prawdopodobieństwo otwarć na poziomie 5%, natomiast bardziej aktywny kanał przy tym samym stężeniu wapnia pozostawał otwarty w 28%. Z kolei najniższe badane stężenie jonów wapnia 1 μM blokowało całkowicie obie populacje kanału, takie zmiany prawdopodobieństw otwarć są charakterystyczne dla kanału BK_{Ca} . Na Rycinie 23 przedstawiono otrzymane wyniki.



Rycina 23. Wpływ jonów wapnia na kontrolną i zwiększoną aktywność kanału mitoBK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. (A i B) przykładowe rejestracje zmian prawdopodobieństwa otwarć (P_o) odpowiednio dla kanału o kontrolnej (A) i zwiększonej (B) aktywności w układzie symetrycznym roztworu 150/150 mM KCl, pH 7,2 oraz w obecności 100, 70, 50, 30, 10 i 1 μM Ca^{2+} , przy napięciu +40 mV. „-” oznacza stan zamknięty kanału. (C i D) analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału w roztworach o różnym stężeniu jonów wapnia przy napięciach -60, -40, -20, +20, +40, +60 mV. Wyznaczono krzywą dopasowania, n=3.

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia elektrofizjologiczne z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*, wykazały, że obie aktywności (kontrolna i zwiększona) kanału są tożsame z kanałem mitoBK_{Ca}. Ponadto potwierdzono również, że kanał o kontrolnej i zwiększonej aktywności jest wrażliwy na inhibitor (paksylinę), aktywator (NS11021) oraz zmiany stężenia jonów wapnia.

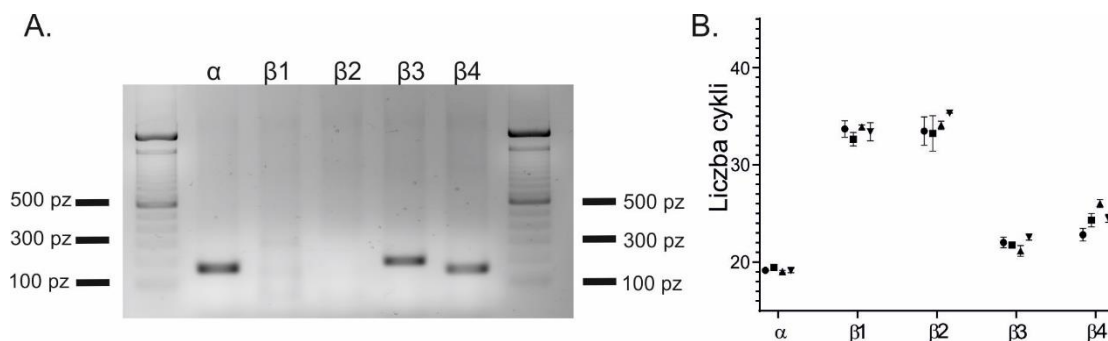
4.3. Charakterystyka biochemiczna kanału mitoBK_{Ca} linii komórkowej HBE

Kolejnym etapem identyfikacji kanału z wewnętrznej błony mitochondrialnej komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego było zbadanie właściwości biochemicznych. W tym celu wykonano doświadczenia pozwalające wyznaczyć poziom transkryptów genów kodujących podjednostki kanału BK_{Ca}, białek tworzących kanał, a także ocenić wpływ modulatorów kanału na potencjał mitochondrialny oraz oddychanie komórkowe.

4.3.1. Analiza poziomu transkryptów genów kodujących podjednostki kanału BK_{Ca}

Wykorzystując łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) określono poziom transkryptów genów kodujących podjednostki kanału BK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. Zaobserwowano ekspresję transkryptu genu kodującego podjednostkę α kanału BK_{Ca}, pojedynczy dobrze widoczny prążek o masie 167 pz (pary zasad) wskazuje na ekspresję genu *KCNMA1* (Rycina 24A). Ponadto zidentyfikowano również dwie podjednostki regulatorowe kanału BK_{Ca} β 3 i β 4 (*KCNMB3* i *KCNMB4*). Produkty ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy odnotowano na żelu agarozowym, na wysokości 178 pz dla podjednostki β 3 oraz 149 pz – podjednostka β 4 kanału BK_{Ca}. Natomiast nie wykryto transkryptów genów odpowiadających podjednostkom β 1 oraz β 2. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 24A, które odpowiadają rezultatom uzyskanym za pomocą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Transkrypty genów *KCNMA1*, *KCNMB3* i *KCNMB4* zostały wykryte we wczesnych cyklach RT-qPCR, podczas gdy *KCNMB1* i *KCNMB2* wykryto w bardzo późnych cyklach łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (numery cykli > 33, co jest zbliżone do wartości tła). Analizę wyników otrzymanych techniką RT-qPCR przedstawiono na wykresie (panel B) Ryciny 24. Obie wykorzystane techniki

umożliwiający analizę ekspresji genów, potwierdziły obecność transkryptów genów kodujących podjednostki α , $\beta 3$ i $\beta 4$ kanału BK_{Ca} w komórkach HBE.

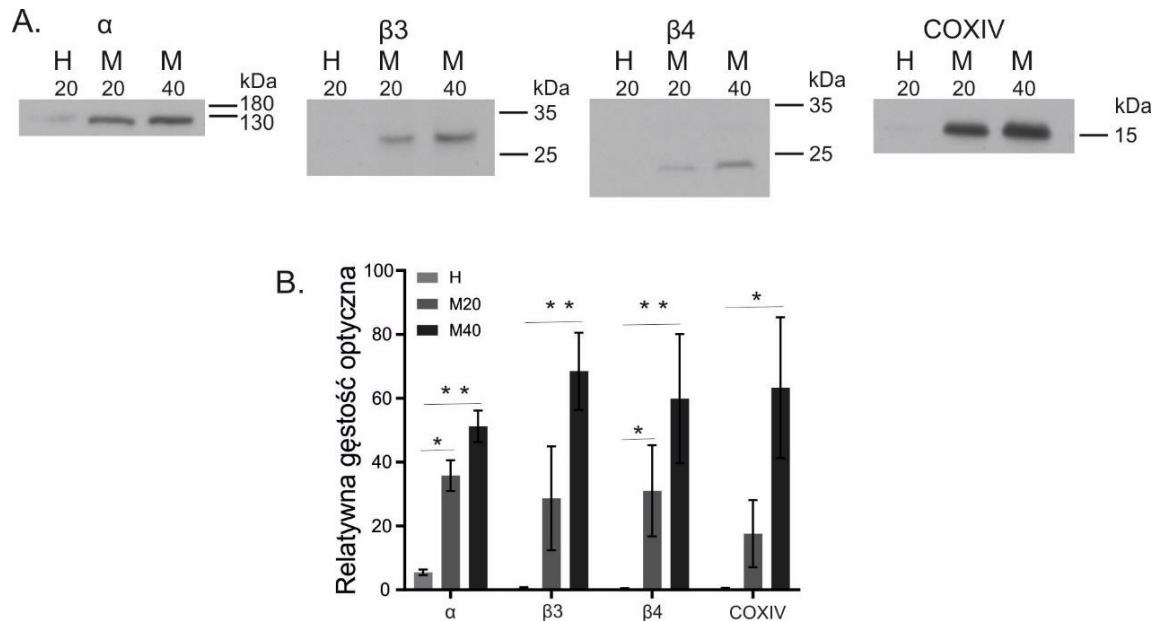


Rycina 24. Analiza ekspresji genów podjednostek kanałów BK_{Ca}. (A) Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiającego obecność produktów PCR, widoczne są sygnały dla podjednostki tworzącej por kanału – α (167 pz) oraz podjednostek regulatorowych $\beta 3$ (178 pz) oraz $\beta 4$ (149 pz) kanału BK_{Ca}; n=3 (B) Wykres przedstawiający analizę doświadczeń RT-PCR, zaznaczono liczbę cykli w których ukazywały się produkty reakcji dla podjednostek kanału BK_{Ca}: α (cykle 18-19), $\beta 1$ (cykle 33-35), $\beta 2$ (cykle 34-36), $\beta 3$ (cykle 21-22), $\beta 4$ (cykle 22-24), n=4.

4.3.2. Identyfikacja białek tworzących kanał BK_{Ca} z zastosowaniem techniki Western blot

W kolejnym etapie doświadczeń biochemicznych wykorzystano technikę Western blot w celu identyfikacji produktów syntezy białka, na podstawie zidentyfikowanych transkryptów genów podjednostek kanału BK_{Ca}. Zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 3.4.2.1. *Oczyszczanie mitochondriów oraz przygotowanie lizatów komórkowych*, przygotowano dwie frakcje komórkowe, jedna zawierająca białka z homogenatu komórkowego (H), natomiast druga frakcja białka mitochondrialne (M). Otrzymane frakcje białek rozdzielono na żelu poliakryloamidowym i znakowano za pomocą specyficznych przeciwciał. Zaobserwowano, że przeciwciało (anty-slo1) skierowane przeciwko białku tworzącego por kanału BK_{Ca} (podjednostka α), wykrywa białko o masie ~120 kDa, odpowiadającemu masie pojedynczej podjednostki α we frakcji mitochondrialnej M20 (20 μ g białka) oraz M40 (40 μ g białka). Ponadto przeciwciała anty-slo $\beta 3$ i anty-slo $\beta 4$ wykazały również obecność białka, czyli prążków ~27 kDa i ~24 kDa we frakcjach mitochondrialnych. Opisane wyniki przedstawiono na Rycinie 25A. Analizę densytometryczną uzyskanych wyników Western blot zaprezentowano na Rycinie 25B. Porównanie ilości białek między homogenatem a frakcjami mitochondrialnymi wykazały stosunkowo wysoki poziom podjednostek kanału BK_{Ca}

w mitochondriach, wyizolowanych z ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego. Ponadto zaobserwowano korelację między wzrostem sygnału badanych podjednostek kanału BK_{Ca} ze wzrostem sygnału markera mitochondrialnego COXIV czyli IV podjednostki mitochondrialnej oksydazy cytochromu c (ang. *mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV*; 17 kDa).

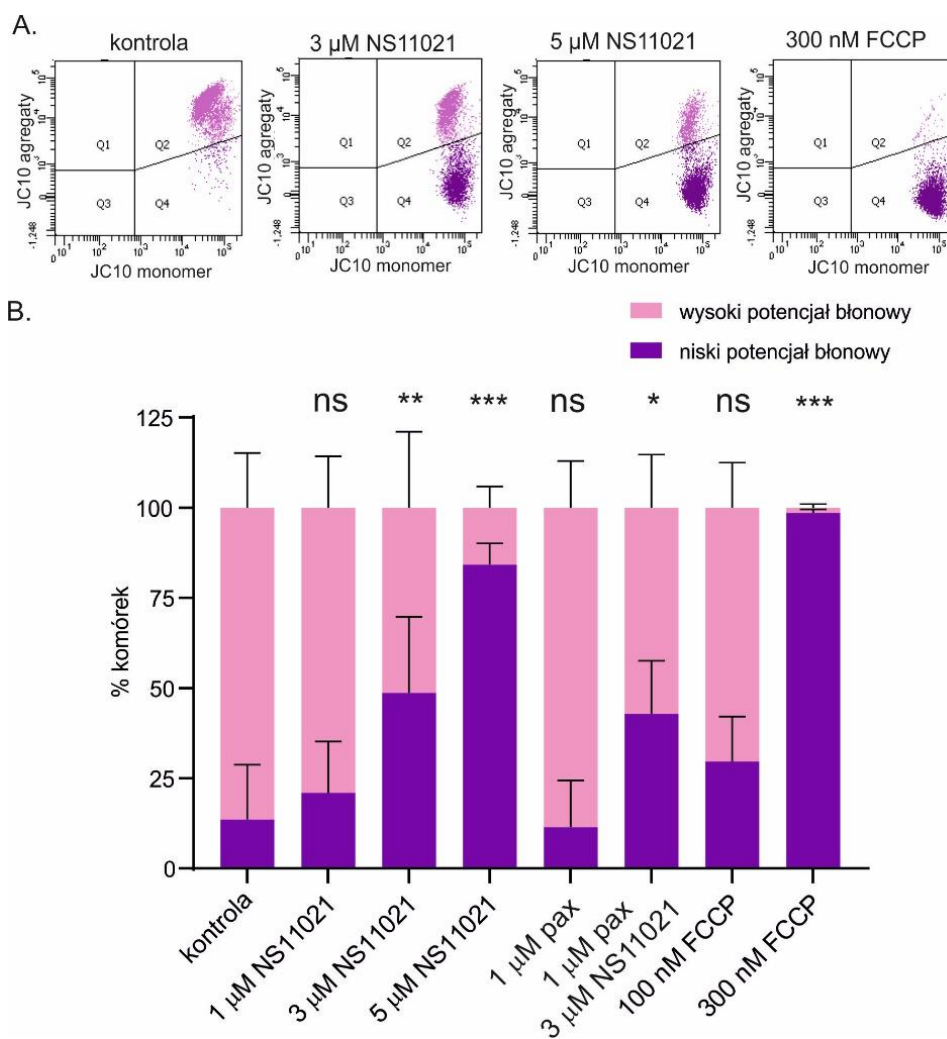


Rycina 25. Analiza techniką Western blot podjednostek kanału BK_{Ca}. **(A)** Przykładowe zdjęcia klisz z wyznakowania immunologicznego podjednostek kanału BK_{Ca}: α (~120 kDa), $\beta 3$ (~27 kDa) i $\beta 4$ (~24 kDa) oraz markera mitochondrialnego - podjednostki IV oksydazy cytochromu c (~17 kDa). Zaznaczono frakcje homogenatu komórkowego (H; 20 μ g białka całkowitego) oraz mitochondrialne (M w dwóch stężeniach, 20 μ g i 40 μ g), (n = 3). **(B)** Analiza densytometryczna intensywności prążków podjednostek kanału BK_{Ca} oraz podjednostki IV oksydazy cytochromu c przeprowadzono przy pomocy oprogramowania ImageJ. Przeanalizowano trzy niezależne doświadczenia Western blot. Istotność statystyczną wykonano przy pomocy testu t-Studenta dla n=3, (p < 0,05 (*), p < 0,01 (**)).

4.3.3. Wpływ mitochondrialnego kanału BK_{Ca} na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej

Zbadano również jak obecność kanału mitoBK_{Ca} wpływa na potencjał mitochondrialny w komórkach linii HBE. Aktywny kanał potasowy zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej transportując jony potasu do macierzy mitochondrialnej, powoduje depolaryzację (spadek potencjału) wewnętrznej błony

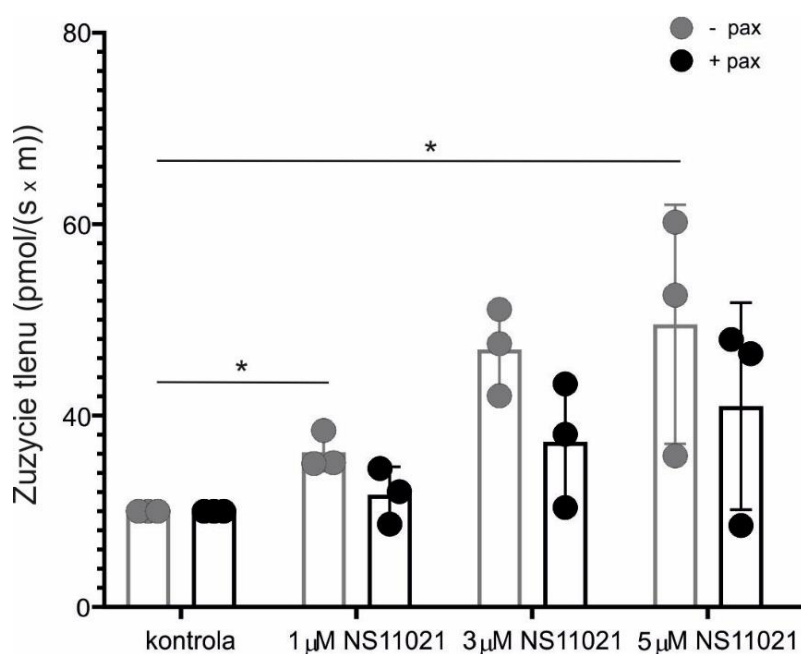
mitochondrialnej. Przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej JC10 oraz cytometrii przepływowej, procedura wykonywania eksperymentów została opisana szczegółowo w Rozdziale 3.6. *Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej*. JC10 jest lipofilnym kationem, selektywnie gromadzącym się w mitochondriach ze zdolnością do agregacji. Kiedy wewnętrzna błona mitochondrialna jest spolaryzowana (wysoki potencjał) barwnik tworzy agregaty i emituje światło przy długości fali 570 nm. Natomiast gdy potencjał błonowy spada (niski potencjał), maleje ilość agregatów, pojawia się więcej monomerów barwnika, które emitują światło przy długości fali 520 nm. Otrzymane wyniki zaprezentowano na Rycinie 26. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia aktywatora kanału BK_{Ca} – NS11021 (1, 3, 5 μM) zachodzi depolaryzacja wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ponadto inkubacja komórek z inhibitorem kanału – 1 μM paksyliną w obecności 3 μM NS11021 zmniejsza efekt depolaryzacji wywołanej aktywatorem. Komórki nabłonka oskrzelowego inkubowano również z 100 nM i 300 nM FCCP (rozpręgacz potencjału mitochondrialnego), wykorzystywanego jako kontrola pozytywna dla maksymalnej depolaryzacji mitochondriów. Na wykresach punktowych (Rycina 26A) przedstawiono rozkład dwóch populacji komórek otrzymanych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Populacje różnią się potencjałem błony mitochondrialnej, różowe punkty oznaczają komórki z wysokim potencjałem (agregaty JC10), natomiast fioletowe – komórki o niskim potencjale błonowym (monomery JC10).



Rycina 26. Efekt modulatorów kanału BK_{Ca} na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. **(A)** Przykładowe wykresy punktowe barwionych komórek HBE przez barwnik JC10 dla komórek kontrolnych (nietraktowanych) oraz inkubowanych z 3 i 5 μM NS11021, 1 μM pax oraz 300 nM FCCP. Analizę intensywność fluorescencji agregatów i monomerów sondy JC10 wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (LSR Fortessa™). Komórki znajdujące się w polu Q2, reprezentują komórki z wysokim potencjałem błonowym mitochondriów. Natomiast w polu Q4 znajduje się populacja komórek z niskim potencjałem mitochondriów. **(B)** Analiza pomiaru potencjału błony mitochondrialnej za pomocą JC10 z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, komórek kontrolnych i inkubowanych z NS11021 (1, 3, 5 μM), paksyliną (1 μM), mieszaniną NS11021 (3 μM) i paksyliny (1 μM) oraz FCCP (100 nM, 300 nM). Kolor różowy oznacza komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym, natomiast fioletowy komórki z depolaryzowanymi mitochondriami, $n=3$. Istotność statystyczną określono z wykorzystaniem testu t-Studenta względem kontroli ($p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*) $p > 0,05$ (ns)).

4.3.4. Ocena oddychania komórkowego w obecności modulatorów kanału BK_{Ca}

W kolejnym etapie określono wpływ modulatorów kanału BK_{Ca} na oddychanie komórek nabłonka oskrzelowego. Pomiarzy szybkości zużycia tlenu wykonano z wykorzystaniem oksygrafu w obecności 5 mM bursztynianu (substrat oddechowy dla kompleksu II), 0,5 μM rotenonu (inhibitor kompleksu I), 2,5 μM oligomycyny (inhibitor syntazy ATP) oraz 0,15 mM ATP. Błonę komórkową fragmentowano detergentem – 10 μg/ml digitoniną. Dodanie 1 μM NS11021, aktywatora kanału BK_{Ca}, znacząco zwiększyło zużycie tlenu, szybkość oddychania wzrosła dwukrotnie w porównaniu z warunkami kontrolnymi (przed dodaniem aktywatora). Zaobserwowano korelację zużycia tlenu ze wzrostem stężenia zastosowanego aktywatora. Otrzymane wyniki zamieszczono na Rycinie 27. Ponadto wykazano, że obecność inhibitora kanału 10 μM paksyliny, dodanego wraz z NS11021 zmniejszyło oddychanie komórek HBE.



Rycina 27. Wpływ modulatorów kanału BK_{Ca} na oddychanie komórkowe. Wykres przedstawia zmiany zużycia tlenu w zależności od stężeń NS11021 (1,3,5 μM) w obecności (•) lub braku (◦) inhibitora kanału 10 μM paksyliny. Dane przedstawiono jako średnie ± SD (n = 3) a każda kropka reprezentuje osobny eksperyment. Wyniki zaprezentowano w odniesieniu do kontroli jako wartości procentowe. Analizę statystyczną wykonano testem t-Studenta, względem kontroli (p < 0,05 (*)).

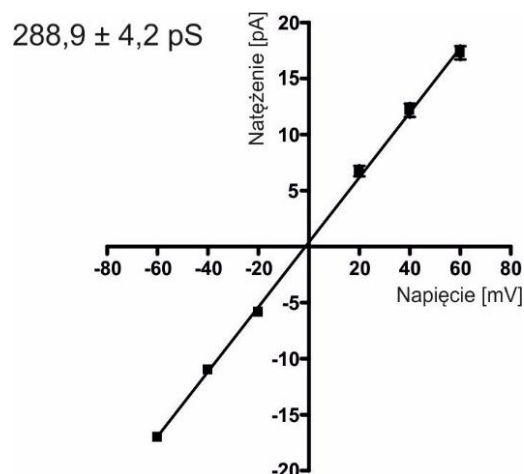
Podsumowując, wykazano obecność zarówno transkryptów genu jak i białek dla podjednostek α , $\beta 3$ i $\beta 4$ kanału BK_{Ca} w komórkach ludzkiego nabłonka oskrzelowego. Ponadto zaobserwowano, że aktywator kanału BK_{Ca} – NS11021 powoduje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz zwiększa zużycie tlenu w komórkach HBE. Natomiast paksylina, będąca inhibitorem kanału BK_{Ca} znosi efekt NS11021, zmniejszając depolaryzację mitochondriów oraz zużycie tlenu.

4.4. Analiza biofizyczna izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca} z linii komórkowej HEK293-BK_DEC

Drugim modelem eksperymentalnym wykorzystywanym w badaniach była nowo wyprowadzona, stabilna linia komórkowa HEK293-BK_DEC, charakteryzująca się obecnością izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca}. Poniżej przedstawiono analizę biofizyczną otrzymanego kanału mitoBK_DEC, będącego wariantem mitochondrialnego kanału opisywanego dotychczas tylko w komórkach serca.

4.4.1. Charakterystyka prądowo-napięciowa mitochondrialnego kanału mitoBK_DEC

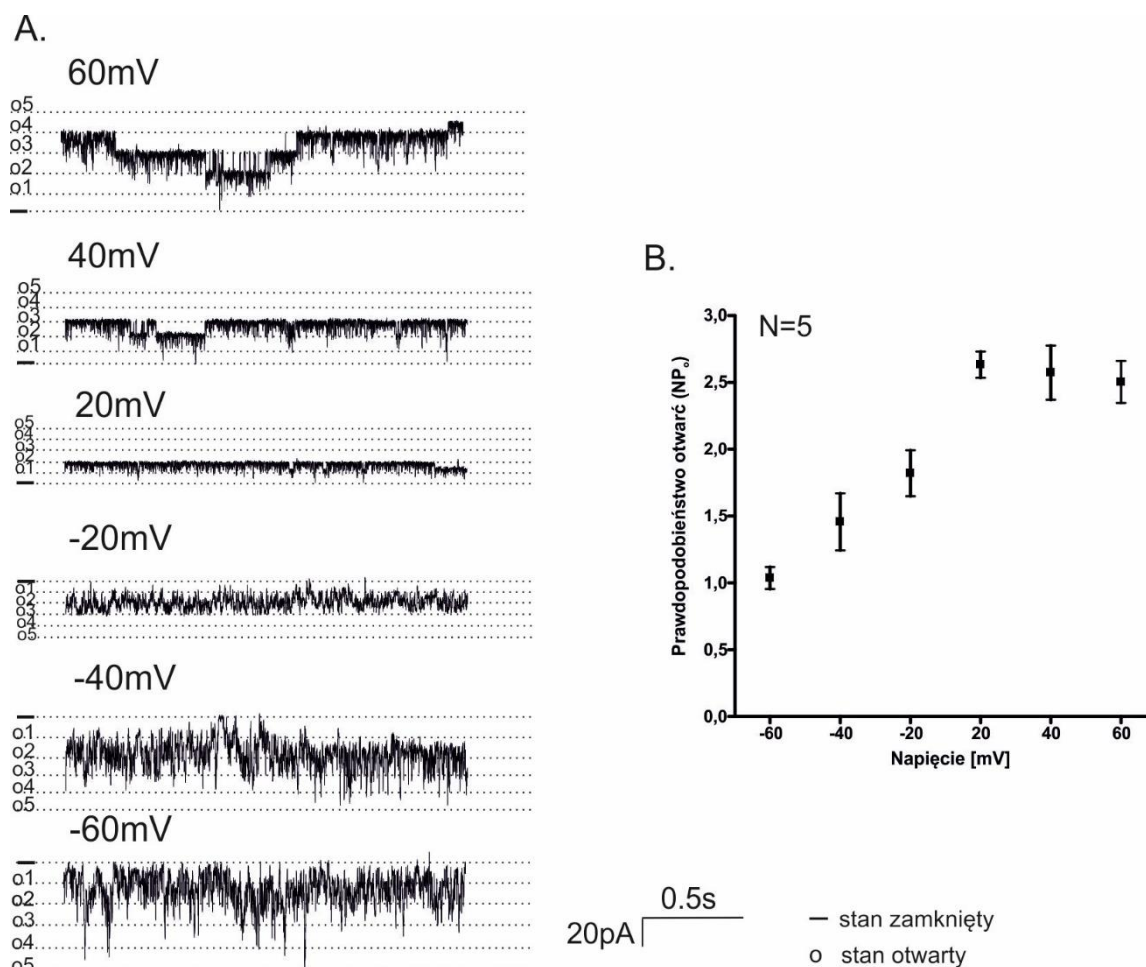
Wykorzystując technikę *patch-clamp* określono parametry biofizyczne kanału mitoBK-DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. Na podstawie zależności płynącego prądu jonowego od napięcia wyznaczono przewodnictwo kanału w warunkach symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl. Przeprowadzając analizę nachylenia wyznaczonej prostej do osi napięcia, obliczono przewodnictwo izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca}, które wynosi $288,9 \pm 4,2$ pS. Uzyskana wartość pokrywa się z przewodnictwem kanału BK_{Ca} opisywanego w literaturze [93]. Rycina 28 przedstawia wykres zależności natężenia [pA] prądu jonowego przepływającego przez kanał, od napięcia [mV] wraz z wyznaczonym przewodnictwem kanału.



Rycina 28. Wykres zależności prądowo-napięciowej kanału mitoBK_DEC obecnego w komórkach HEK293-BK_DEC. Oszacowane przewodnictwo kanału mitoBK_DEC wynosi $288,9 \pm 4,2$ pS, ($n=3$). Wykres przygotowano na podstawie danych uzyskanych z doświadczeń przy różnym napięciu (-60, -40, -20, +20, +40, +60 mV) w warunkach symetrycznych stężeń 150/150mM KCl, pH 7,2.

4.4.2. Prawdopodobieństwo otwarć kanału

Kolejna analiza właściwości biofizycznych dotyczyła wyznaczenia prawdopodobieństwa otwarć kanału w zależności od zmiany napięcia. Przeprowadzone doświadczenia elektrofizjologiczne wykazały obecność obserwowanej dotychczas w komórkach HBE, aktywności pojedynczego kanału oraz aktywności kilku kanałów w tym samym badanym skrawku wewnętrznej błony mitochondrialnej. Na Rycinie 29A zaprezentowano przykładowe zapisy pomiarów elektrofizjologicznych dla wspomnianych aktywności kilku kanałów, zaznaczono 5 stanów otwarć (o1-o5), oznaczających obecność 5 ($N=5$) kanałów oraz stan zamknięty „-”. Zaobserwowano, że prawdopodobieństwo otwarć kilku kanałów (NP_o) mitoBK_DEC, jest zależne od zmiany napięcia i rośnie wraz ze wzrostem napięcia. Na Rycinie 29B zaprezentowano analizę przykładowej aktywności kilku kanałów w jednym skrawku błony, tendencja zmian aktywności w zależności od napięcia była obserwowana również dla innych kanałów mitoBK_DEC różniących się ilością (N).

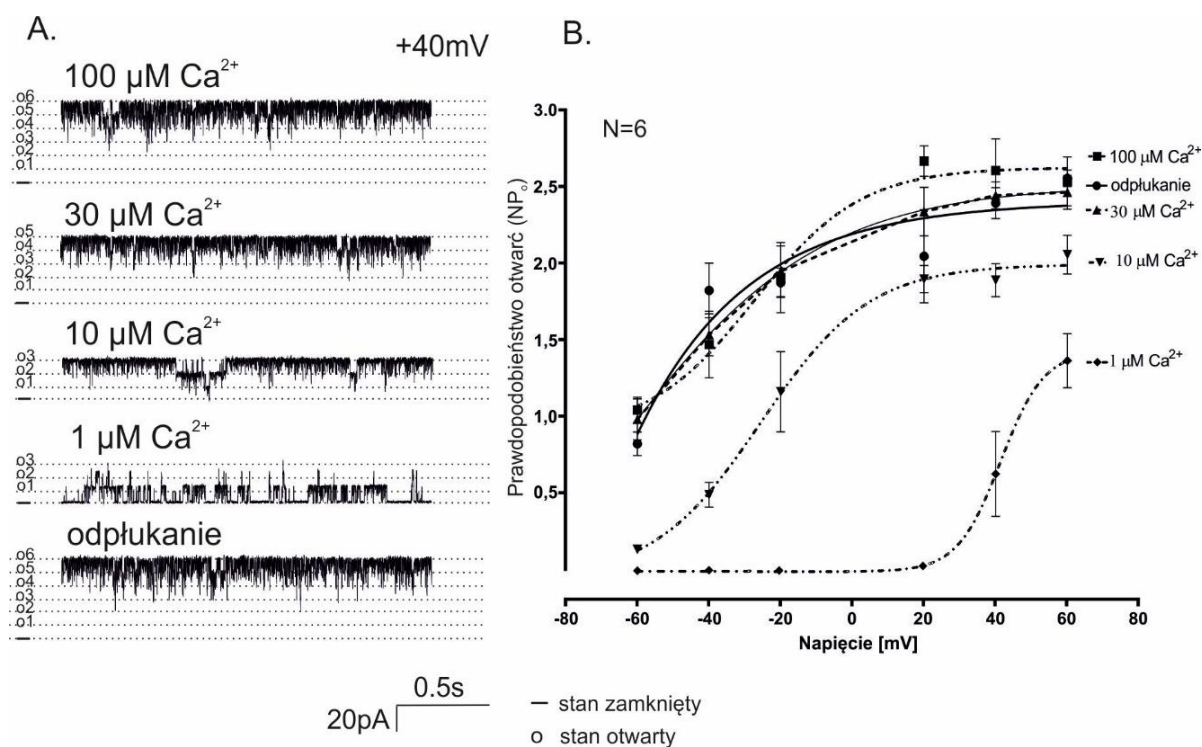


Rycina 29. Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK_DEC. (A) Przykładowe rejestracje aktywności kilku kanałów przy różnym napięciu (-60, -40, -20, 20, 40, 60 mV) w warunkach symetrycznych stężeń 150/150mM KCl, pH 7,2. „-” oznacza stan zamknięty kanału, (o1-o5) oznaczają stany otwarć kanału. (B) Wykres prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK_DEC (NP_o) w zależności od napięcia, N oznacza ilość analizowanych kanałów w jednym badanym skrawku błony mitochondrialnej, (N=5).

4.4.3. Regulacja aktywności kanału mitoBK_DEC przez jony wapnia i inne modulatory w komórkach HEK293-BK_DEC

W kolejnym etapie badań określono wpływ różnych stężeń jonów wapnia (100, 30, 10, 1 μM Ca^{2+}), aktywatora NS11021 (1 oraz 3 μM) oraz inhibitora (1 μM paksyliny) kanału BK_{Ca} na prawdopodobieństwo otwarć (NP_o) izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca}. Zaobserwowano, że aktywność kilku kanałów w jednym skrawku błony są regulowane poprzez zmiany stężeń jonów Ca^{2+} . Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 30. Prawdopodobieństwo otwarć kanałów (NP_o) mitoBK_DEC zmniejsza się wraz ze

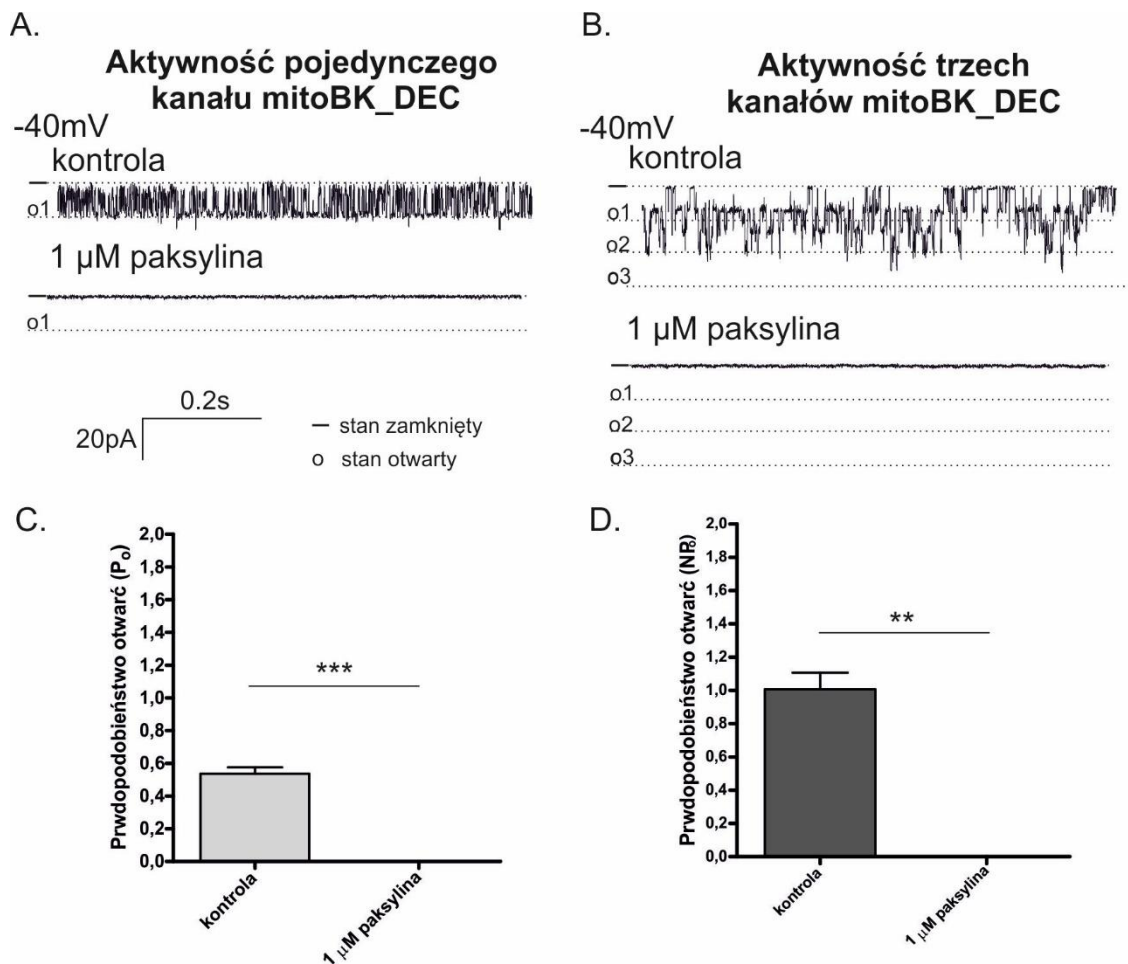
spadkiem stężenia jonów wapnia. Na Rycinie 30A zaprezentowano przykładowe rejestracje pomiarów elektrofizjologicznych przy napięciu +40 mV, w warunkach 100, 30, 10, 1 μM Ca^{2+} oraz odpłukania, czyli ponownego dodania wapnia w najwyższym stężeniu (100 μM Ca^{2+}). Analiza aktywności sześciu (N=6) kanałów mitoBK_DEC (Rycina 30B) wykazała, że przy napięciach +40 i +60 mV, w najniższym badanym stężeniu 1 μM Ca^{2+} wciąż pozostają aktywne pojedyncze lub podwójne kanały. Rycina 30 przedstawia przykładową analizę aktywności kilku kanałów mitoBK_DEC w jednym skrawku błony mitochondrialnej, tą samą wrażliwość na zmienne stężenia jonów wapnia obserwowano również dla kanałów o innej liczbie N.



Rycina 30. Wpływ jonów wapnia na aktywność kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) Przykładowe rejestracje zmian prawdopodobieństwa otwarć (NP_o) w układzie symetrycznym roztworu 150/150 mM KCl, pH 7,2 oraz w obecności 100, 30, 10 i 1 μM Ca^{2+} przy napięciu +40mV. „-” oznacza stan zamknięty kanału, „o” oznacza stan otwarty (o1-o6), N=6. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć sześciu aktywnych kanałów mitoBK_DEC w roztworach o różnym stężeniu jonów wapnia przy napięciach -60, -40, -20, 20, 40, 60 mV. Wykres przygotowany przy pomocy programu GraphPad z wykorzystaniem funkcji sigmoidalnej.

Następnie sprawdzono wpływ inhibitora – paksyliny w stężeniu 1 μM na aktywność kanału mitoBK_DEC. Pomiar dokonywano z wykorzystaniem aktywności pojedynczego kanału oraz kilku kanałów mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC.

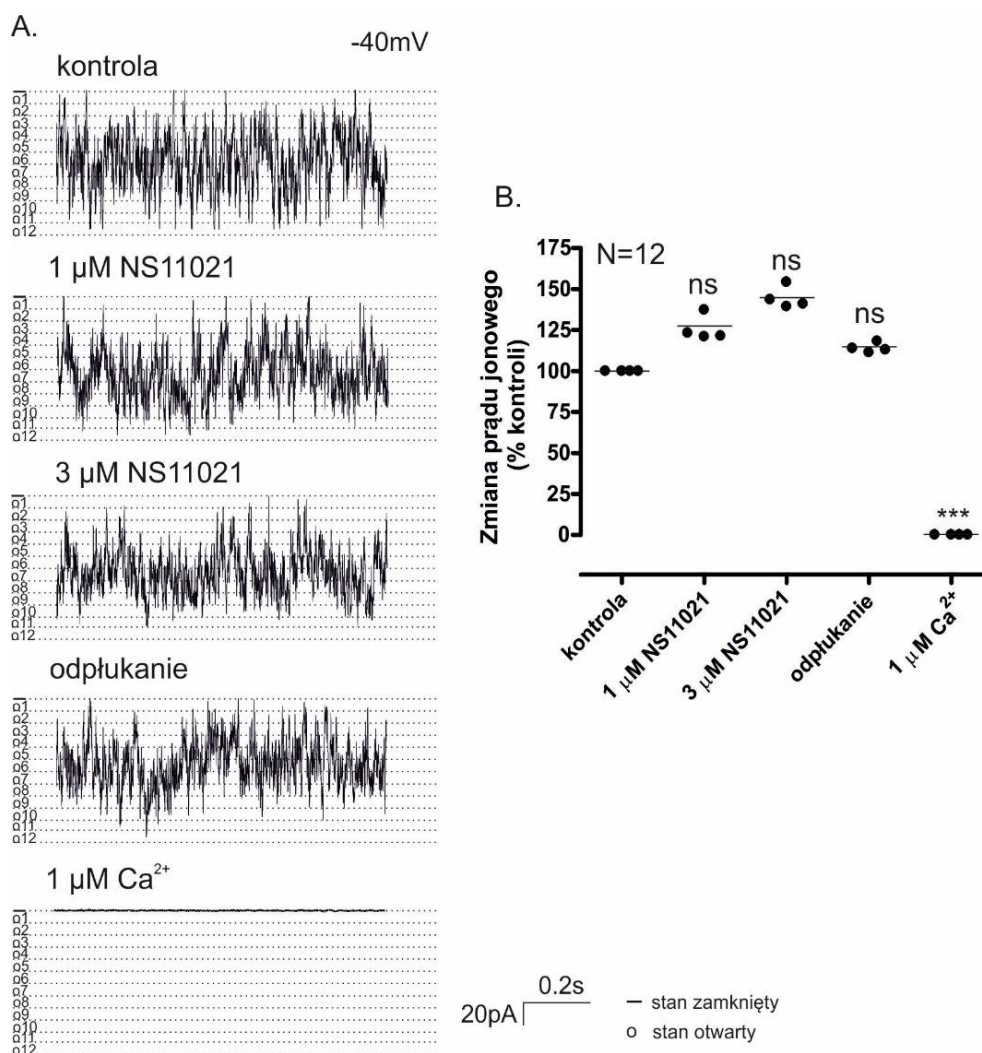
Zaobserwowano, że w obu przypadkach kanał jest blokowany przez paksylinę, specyficzny inhibitor kanałów potasowych o dużym przewodnictwie regulowanych jonami wapnia. Wpływ paksyliny na kanał mitoBK_DEC przedstawiono na Rycinie 31, przykładowe zapisy doświadczeń z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* prezentują aktywność pojedynczą (A) oraz trzy aktywności kanału (B) mitoBK_DEC zablokowanych przez paksylinę.



Rycina 31. Wpływ 1 μM paksyliny na aktywność kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) i (B) Przykładowe rejestracje przepływu prądu jonowego przy napięciu -40 mV w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl, pH 7,2 odpowiednio dla jednego i trzech mitochondrialnych kanałów BK_DEC, w obecności 100 μM Ca²⁺ (kontrola) oraz po dodaniu 1 μM paksyliny. „-” oznacza stan zamknięty kanału natomiast „o” – stan otwarty. (C) i (D) Wykresy analizy prawdopodobieństwa otwarć odpowiednio dla jednego kanału (P_o) i trzech kanałów (NP_o ; N=3) przed (kontrola) i po dodaniu 1 μM paksyliny. Istotności statystyczną wyznaczono testem t-Studenta ($p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**)), n=2.

W kolejnym doświadczeniu elektrofizjologicznym określono wpływ aktywatora kanału BK_{Ca} - NS11021. Przeprowadzona analiza wykonanych doświadczeń przy

napięciu -40 mV wykazała zwiększenie prawdopodobieństw otwarć (NP_o) kanału mitoBK_DEC po dodaniu 1 μM NS11021. Obserwowano zwiększoną aktywność kanału mitoBK_DEC po dodaniu aktywatora. Na Rycinie 32 zaprezentowano przykładowe wyniki zwiększenia prawdopodobieństw otwarć kilku kanałów w jednym skrawku wewnętrznej błony mitochondrialnej ($N=12$). Wykres (Rycina 32B) przedstawia analizę stosunku prądu jonowego przepływającego przez kanały do maksymalnego prądu, który może przepłynąć przez te kanały, w danym odcinku czasowym. Zmiana w przeprowadzonej analizie związana jest z ograniczeniami programu, który umożliwia pomiar prawdopodobieństwa otwarć maksymalnie 8 kanałów w czasie jednej rejestracji. Wykonano analizę aktywności kilku kanałów ($N=12$). Wyliczono stosunek prądu przepływającego przez kanały do maksymalnego prądu, który może przepłynąć przez aktywne kanały ($N=12$), w danym wycinku czasowym. Ponadto zaobserwowano również efekt odpłukania NS11021, po dodaniu roztworu kontrolnego (zawierającego m. in. 100 μM Ca^{2+}), prawdopodobieństwo otwarć zmniejszyła się znacznie. W końcowym etapie eksperymentu dodano roztwór zawierający 1 μM Ca^{2+} , który spowodował zamknięcie kanału.



Rycina 32. Aktywacja kanału mitoBK_DEC przez aktywator NS11021 (1 i 3 μM). **(A)** Przykładowe rejestracje przepływu prądu jonowego przy napięciu -40 mV w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl w pH 7,2. Zaznaczono warunki doświadczalne kontrola (zawierająca 100 μM Ca^{2+}), 1 i 3 μM NS11021, odpłukanie (roztwór z 100 μM Ca^{2+}) oraz roztwór z 1 μM Ca^{2+} ; „-” oznacza stan zamknięty, „o” oznacza stan otwarty kanału (o1-o12), N=12. **(B)** Wykres analizy stosunku prądu elektrycznego przepływającego przez kanały do maksymalnego prądu, który może przepłynąć przez kanały, w danym wycinku czasowym. Wyniki odniesiono do poziomu kontroli; kreską zaznaczono wartości średnie. Istotność statystyczną wyznaczono metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z zastosowaniem testem Tukey’a względem kontroli ($p < 0,001$ (***) ; $p > 0,05$ (ns)).

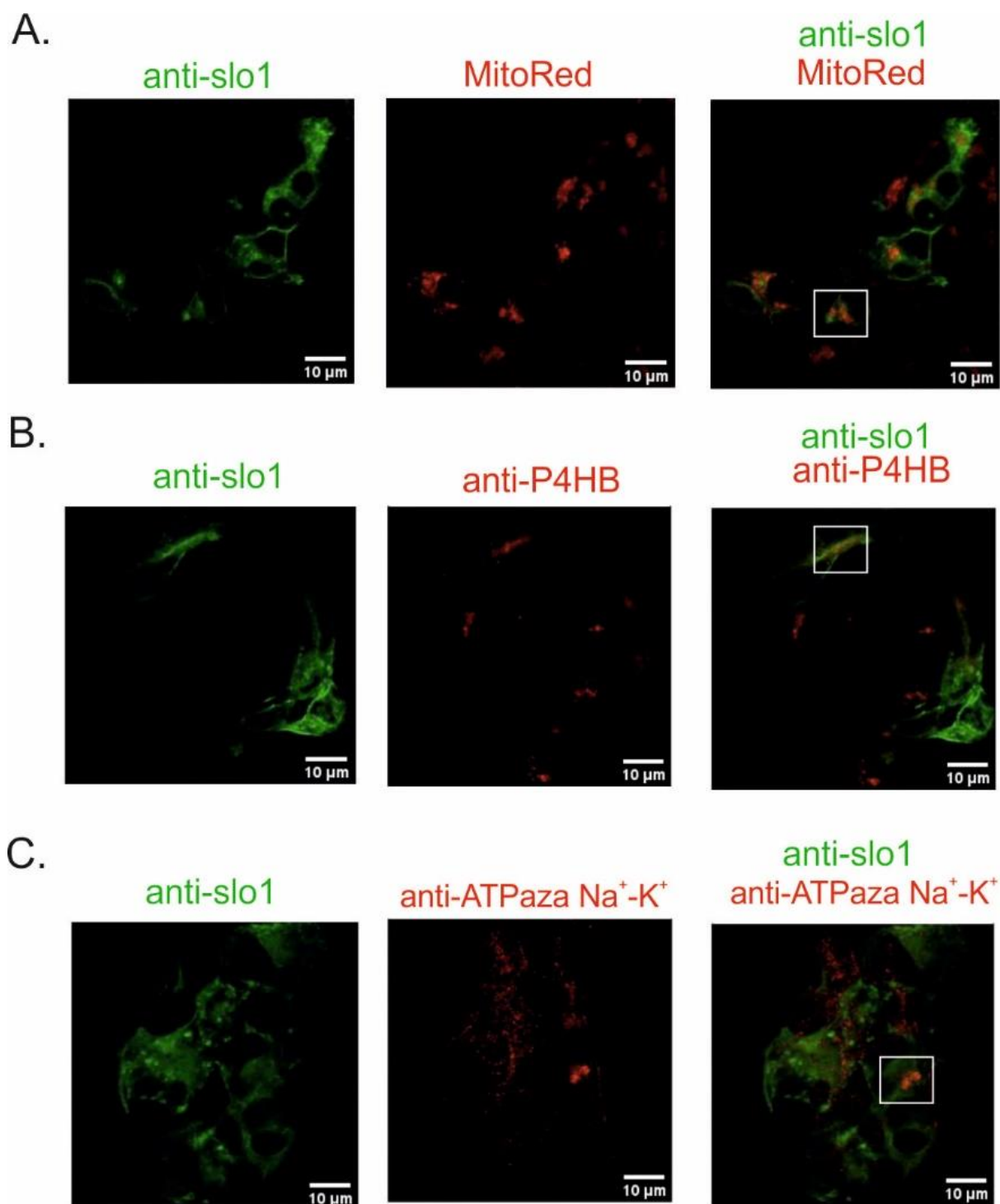
Przeprowadzone doświadczenia z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* wykazały obecność mitochondrialnej izoformy VEDEC kanału BK_{Ca} w transfekowanych komórkach HEK293. Nowa otrzymana linia komórkowa HEK293-BK_DEC charakteryzuje się funkcjonalnym kanałem mitoBK_DEC, wrażliwym na zmiany stężenia jonów wapnia, paksylinę (inhibitor) oraz NS11021 (aktywator).

4.5. Biochemiczna charakterystyka izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca} z linii komórkowej HEK293-BK_DEC

W następnym etapie charakterystyki wprowadzonego kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293 wykonano doświadczenia z zakresu biochemii. Eksperymenty miały na celu potwierdzenie obecności izoformy VEDEC podjednostki α , tworzącej por kanału mitoBK_{Ca}.

4.5.1. Subkomórkowe lokalizacje podjednostki α kanału BK_{Ca} w transfekowanych komórkach linii HEK293-BK_DEC – obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej

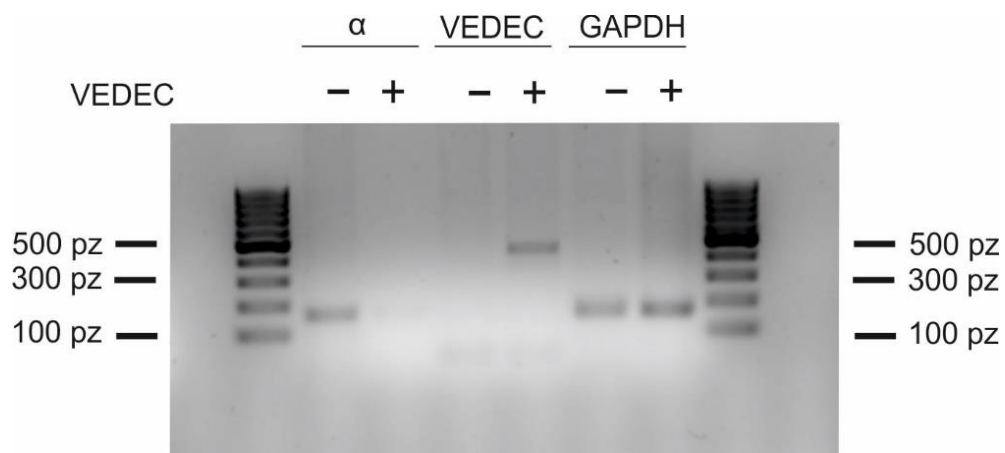
Ocenę skuteczności przeprowadzonej transfekcji komórek HEK293 wykonano z wykorzystaniem znakowania fluorescencyjnego. Komórki HEK293-BK_DEC znakowano przyżyciowo w celu wizualizacji mitochondriów za pomocą specyficznego barwnika fluorescencyjnego MitoRed, wyznaczone struktury widoczne są na Rycinie 33A. Pozostałe znakowania wykonano na utrwalonych komórkach według protokołu opisanego w Rozdziale 3.5. *Znakowanie immunofluorescencyjne komórek z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego*. Izoformę VEDEC podjednostki α (slo1) kanału BK_{Ca} wyznakowano specyficznym przeciwciałem I-rzędowym oraz II-rzędowym sprzężonym z fluoroforem, wynik znakowania zaprezentowano na Rycinie 33. Ponadto w celu porównania występowania podjednostki α w innych przedziałach komórki, wyznakowano również podjednostkę β hydroksylazy prolilowej (P4HB) lokalizującą się w siateczce śródplazmatycznej (Rycina 33B) oraz podjednostkę α ATPazy Na⁺-K⁺ z błony komórkowej (Rycina 33C). Na Rycinie 33 ostatnia kolumna zdjęć z mikroskopii konfokalnej przedstawia nałożenie dwóch wyznakowanych obrazów: slo1 - podjednostki α BK_{Ca} oraz odpowiednio wybarwione mitochondria, ER, błona komórkowa. Wyznakowanie podjednostki α kanału BK_{Ca} w komórkach HEK293-BK_DEC potwierdza skutecznie przeprowadzoną transfekcję, mającą na celu wprowadzenie do komórek HEK293 genu kodującego mitochondrialną izoformę VEDEC kanału BK_{Ca}. Analiza nałożenia wyznakowanych obrazów umożliwiła ocenę kolokalizacji znakowanych białek, występowanie podjednostki α zarówno w mitochondriach jak i w siateczce śródplazmatycznej oraz błonie komórkowej.



Rycina 33. Subkomórkowe lokalizacje podjednostki α kanału BK_{Ca} w komórkach HEK293-BK_DEC. Obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej. Komórki HEK293-BK_DEC wyznakowano fluorescencyjnie: barwnikiem MitoRed jako markerem mitochondrialnym (panel górny **A**), znakowanymi przeciwciałami anti-P4HB jako marker siateczki śródplazmatycznej (panel środkowy **B**) oraz anti-ATPaza Na^+K^+ - marker błony komórkowej (panel dolny **C**). Tworząca por kanału BK_{Ca} podjednostka α została wybarwiona znakowanym przeciwciałem anti-slo1, n=3.

4.5.2. Analiza poziomu transkryptów izoformy VEDEC podjednostki α kanału BK_{Ca}

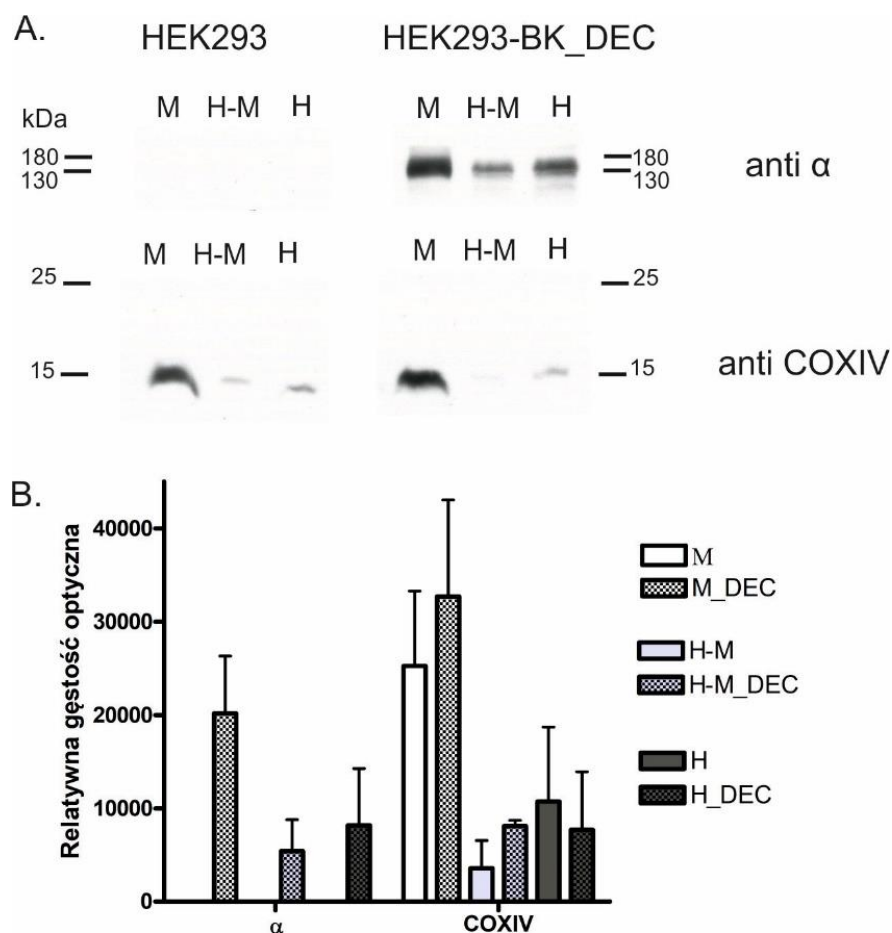
W kolejnym etapie wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) w celu określenia poziomu transkryptów genów kodujących podjednostkę α kanału BK_{Ca} oraz izoformę VEDEC podjednostki α kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HEK293-BK_DEC. Wykorzystano materiał genetyczny (cDNA) wyizolowany z komórek kontrolnych HEK293 oraz z komórek po transfekcji – HEK293-BK_DEC. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń zaprezentowano na Rycinie 34, produkty reakcji w których użyto cDNA z komórek HEK293 (przed transfekcją) zaznaczono jako VEDEC -, natomiast pochodzący z komórek transferowanych jako VEDEC +. W komórkach HEK293 zaobserwowano widoczny pojedynczy prążek o masie 167 pz wskazujący na ekspresję transkryptu genu kodującego podjednostkę α kanału BK_{Ca}. Natomiast w komórkach po transfekcji HEK293-BK_DEC (VEDEC +), wykazano obecność produktu reakcji PCR o masie 452 pz odpowiadającemu izoformie VEDEC podjednostki α kanału mitoBK_{Ca}, nieobserwowanej w komórkach HEK293.



Rycina 34. Analiza ekspresji genów podjednostek α kanału BK_{Ca} w dwóch liniach komórek HEK293 (VEDEC -) i HEK293-BK_DEC (VEDEC +). Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiającego obecność produktów PCR dla podjednostki tworzącej por kanału – α (167 pz) i jej izoformy VEDEC (452 pz) oraz markera komórkowego GAPDH (dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa; 161 pz), n=3.

4.5.3. Identyfikacja podjednostki α kanału BK_{Ca} z zastosowaniem techniki Western blot

Do identyfikacji podjednostki α kanału BK_{Ca} wykorzystano technikę Western blot. Zgodnie z opisaną w Rozdziale 3.4.2.1. *Oczyszczanie mitochondriów oraz przygotowanie lizatów komórkowych* procedurą, przygotowano trzy frakcje białkowe: mitochondria (M), homogenat komórkowy (H) oraz homogenat pozbawiony mitochondriów (H-M). Frakcje białkowe pochodziły z obu linii komórkowych HEK293 i HEK293-BK_DEC. Na Rycinie 31A przedstawiono porównanie rozdziału białek na żelu poliakryloamidowym, wyznakowano za pomocą specyficznego przeciwciała (anty-slo1) podjednostkę tworzącą por kanału BK_{Ca}. Zaobserwowano wyraźnie intensywniejszy prążek (~120 kDa) we frakcji mitochondrialnej komórek HEK293-BK_DEC w porównaniu do pozostałych frakcji białkowych. Ponadto nie wykazano sygnału podjednostka α w komórkach HEK293. COXIV (IV podjednostka mitochondrialnej oksydazy cytochromu c ; ~17 kDa) wykorzystano jako marker mitochondrialny. Zaobserwowano również korelację między wzrostem sygnału badanej podjednostki kanału BK_{Ca} z wzrostem sygnału markera mitochondrialnego. Wykonaną analizę densytrometryczną uzyskanych wyników Western blot przedstawiono na Rycinie 35B.



Rycina 35. Identyfikacja podjednostki α kanału BK_{Ca} w komórkach HEK293 przed i po transfekcji w wykorzystaniem techniki Western blot. **(A)** Przykładowe zdjęcia żelu poliakryloamidowego dla podjednostki α kanału BK_{Ca} (~120 kDa) oraz markera mitochondrialnego - IV podjednostki oksydazy cytochromu c (~17 kDa). Zaznaczono badane frakcje mitochondriów (M), homogenatu komórkowego (H) oraz homogenatu pozbawionego mitochondriów (H-M). Na żel nakładano 20 μ g białka całkowitego do każdej ścieżki (n = 3). **(B)** Analiza densytometryczna intensywności prążków podjednostek α kanału BK_{Ca} oraz podjednostki IV oksydazy cytochromu c przeprowadzono za pomocą oprogramowania ImageJ. Przeanalizowano trzy niezależne doświadczenia Western blot. Nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy analizowanymi powtórzeniami.

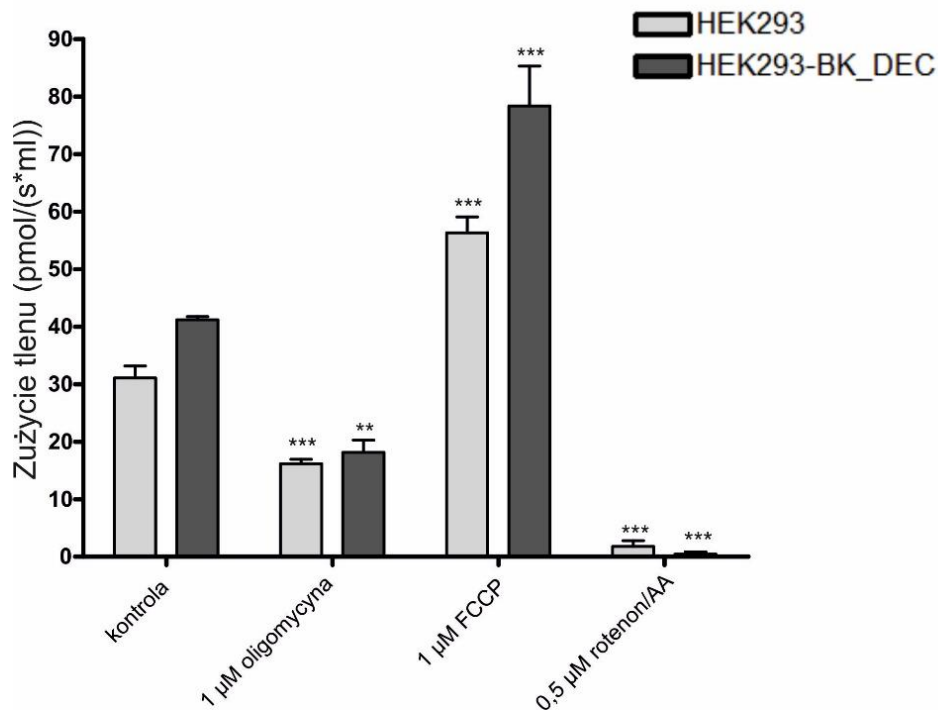
4.5.4. Ocena związku pomiędzy oddychaniem komórkowym a obecnością kanału mitoBK_DEC

W kolejnym etapie badań wykonano analizę oddychania komórkowego. Mierzono szybkość zużycia tlenu dla obu linii komórkowych HEK293 oraz HEK293-BK_DEC. Pomiar wykonywano w czterech następujących etapach:

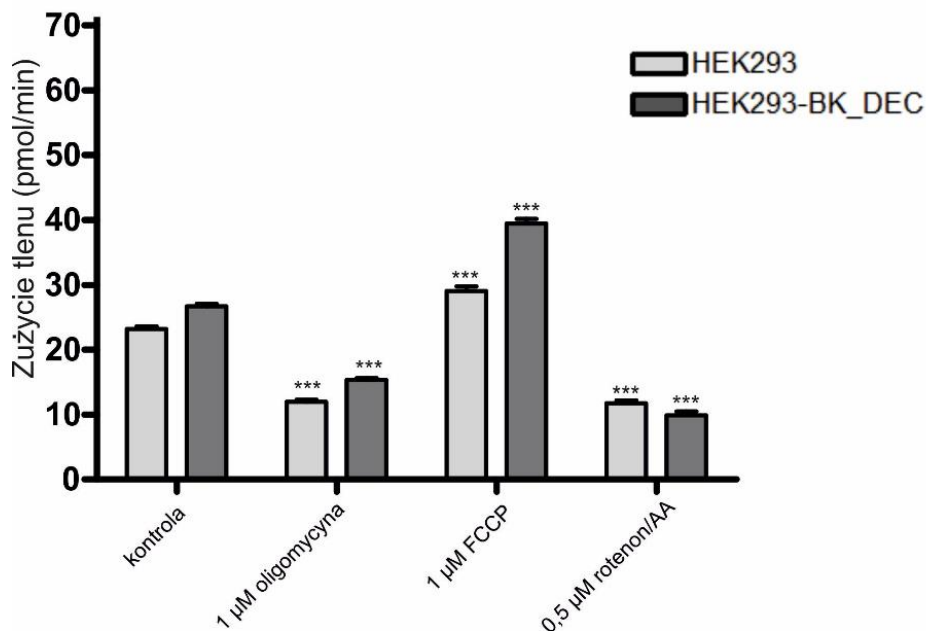
- 1) szybkość zużycia tlenu w warunkach kontrolnych (przed dodaniem modulatorów oddechowych),
- 2) szybkość zużycia tlenu po dodaniu 1 μM oligomycyny (inhibitor syntazy ATP),
- 3) szybkość zużycia tlenu po dodaniu 1 μM FCCP (rozpręgacz fosforylacji oksydacyjnej),
- 4) szybkość zużycia tlenu po dodaniu mieszaniny 0,5 μM rotenonu (inhibitor kompleksu I) i antymycyny (AA, inhibitor kompleksu III łańcucha oddechowego).

Doświadczenia wykonano z wykorzystaniem dwóch urządzeń oksygrafu (Oxygraph-2k Oroboros) oraz Seahorse w celu porównania oddychania komórkowego pomiędzy liniami komórkowymi różniącymi się obecnością kanału mitochondrialnego. Komórki do eksperymentów przygotowano według procedury opisanej w Rozdziale 3.7. *Analiza oddychania komórkowego.*

Analiza oddychania komórkowego wykazała, że w warunkach kontrolnych komórki z nadekspresją kanału mitoBK_DEC zużywają tlen szybciej w porównaniu do komórek HEK293. Ponadto zauważono różnicę w szybkości oddychania po podaniu rozpręgacza fosforylacji oksydacyjnej FCCP w obu badanych liniach, ze znaczną przewagą zużycia tlenu przez komórki HEK293-BK_DEC. Natomiast nie zaobserwowano znaczących różnic w poziomie zużycia tlenu po podaniu inhibitorów łańcucha oddechowego oligomycyny oraz mieszaniny rotenonu i antymycyny. Wyniki analizy porównania wydolności oddechowej badanych komórek przedstawiono na Rycinie 36 z wykorzystaniem oksygrafu oraz na Rycinie 37 z użyciem urządzenia Seahorse. Przeprowadzone analizy za pomocą obu urządzeń wykazują, że obecność kanału mitoBK_{Ca} zwiększa szybkość zużycia tlenu.



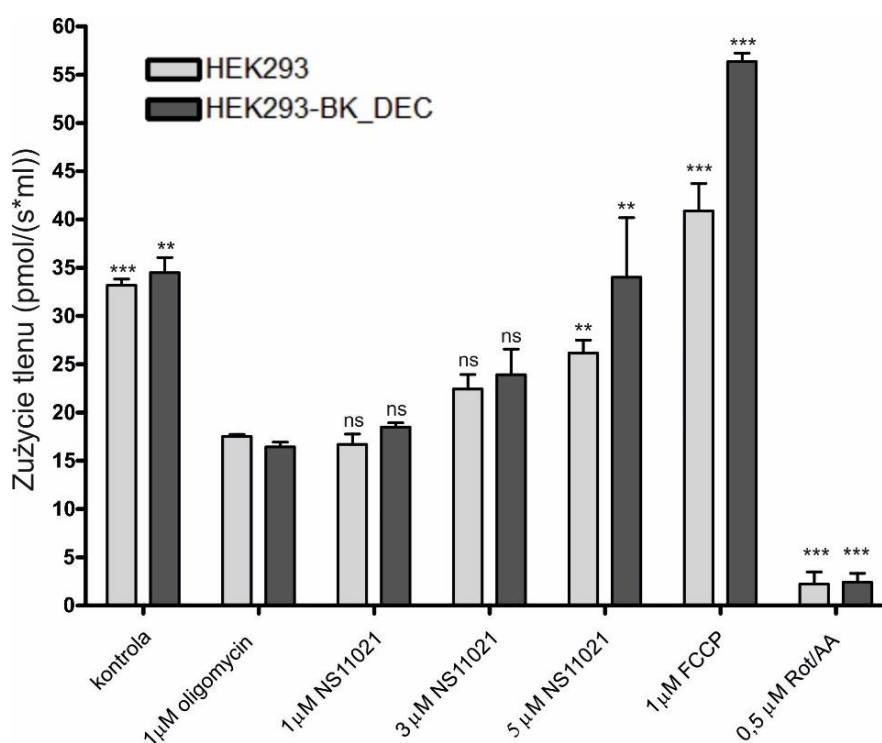
Rycina 36. Analiza szybkości oddychania komórek HEK293 oraz HEK293-BK_DEC z wykorzystaniem oksygrafu. Oddychanie komórkowe przedstawiono jako szybkość zużycia tlenu w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu modulatorów oddechowych 1 μM oligomycyny, 1 μM FCCP oraz mieszanki 0,5 μM rotenonu i antymycyny (AA); n=3. Analizę statystyczną wykonano testem t-Studenta, względem kontroli (p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)).



Rycina 37. Porównanie szybkości oddychania komórek HEK293 oraz HEK293-BK_DEC z wykorzystaniem Seahorse. Analiza szybkości zużycia tlenu w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu modulatorów oddechowych 1 μM oligomycyny, 1 μM FCCP oraz mieszanki 0,5 μM

rotenonu i antymycyny (AA); n=3. Istotność statystyczną wykonano testem t-Studenta, względem kontroli (p<0,001 (***)).

Ponadto wykonano analizę pomiaru zużycia tlenu w obecności aktywatora kanału BK_{Ca} - NS11021 z wykorzystaniem oksygrafu. Zaobserwowano znaczny wzrost zużycia tlenu po zastosowaniu aktywatora kanału, wykazano również różnicę między badanymi liniami komórkami. Komórki z obecnym kanałem mitoBK_DEC zużywają w szybszym tempie tlen w porównaniu do komórek HEK293. Wyniki analiz oddychania komórkowego po dodaniu NS11021 zaprezentowano na Rycinie 38.



Rycina 38. Analiza szybkości oddychania komórek HEK293 oraz HEK293-BK_DEC w obecności NS11021 z wykorzystaniem oksygrafu. Oddychanie komórkowe przedstawiono jako szybkość zużycia tlenu w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu modulatorów łańcucha oddechowego 1 µM oligomycyny, 1 µM FCCP, mieszanki 0,5 µM rotenonu i antymycyny (AA) oraz aktywatora kanału BK_{Ca} – NS11021 (1,3,5 µM), n=3. Analizę statystyczną wykonano testem t-Studenta, względem oligomycyny (p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p<0,001 (***), p>0,05 (ns)).

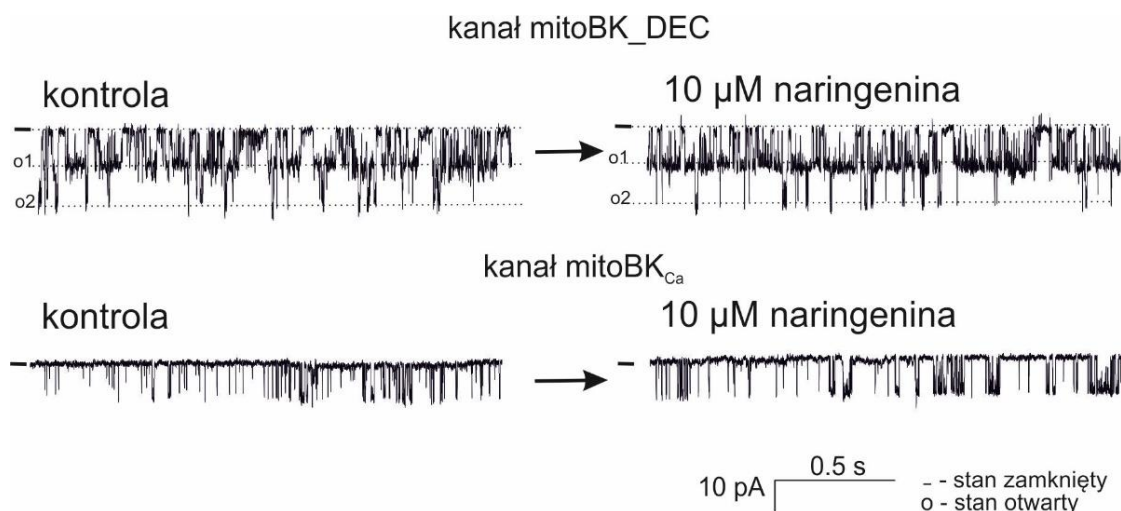
Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia wykazały obecność transkryptu genu oraz białka tworzącego por kanału BK_{Ca}, izoforny VEDEC podjednostki α, w komórkach HEK293-BK_DEC. Ponadto, wykazano, że obecność kanału mitoBK_DEC zwiększa oddychanie komórkowe, poprzez zwiększenie zużycia tlenu.

4.6. Wpływ niskocząsteczkowych związków syntetycznych i pochodzenia roślinnego na aktywność kanału mitoBK_{Ca}

Scharakteryzowanie mitochondrialnego kanału BK_{Ca} występującego endogennie w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego oraz egzogennie, w wyniku transfekcji ludzkich komórek embrionalnych nerki, było niezbędne do dalszych badań. Wykonano doświadczenia dotyczące wpływu niskocząsteczkowych związków syntetycznych i pochodzenia roślinnego na aktywność wspomnianych kanałów mitoK. Kanał występujący endogennie w komórkach HBE posłużył jako model do poszukiwania aktywatorów kanału mitoBK_{Ca}. Natomiast kanał mitoBK_DEC wykazujący aktywność kilku kanałów w jednym skrawku błony wykorzystano do badania potencjalnych inhibitorów kanału mitoBK_{Ca}. Podczas przeprowadzanych doświadczeń określono również toksyczność niskocząsteczkowych związków poprzez pomiar zmian prowadzących do apoptozy i nekrozy komórek.

4.6.1. Wpływ pochodnych naringeniny na endogenną i egzogenną izoformę kanału mitoBK_{Ca}

W pierwszym kroku postanowiono zbadać wpływ flawonoidów, a dokładnie związków będących pochodnymi naringeniny na aktywność obu izoform kanału mitoBK_{Ca} z komórek HBE oraz HEK293-BK_DEC. Wyjściowym doświadczeniem było sprawdzenie czy naringenina opisywana jako aktywator mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} reguluje aktywność badanych kanałów mitoBK_{Ca}. Wykazano, że naringenina będąca aktywatorem kanału mitoBK_{Ca} w ludzkich fibroblastach skóry oraz komórkach endotelialnych, nie wpływa na aktywność kanału mitoBK_{Ca} z komórek nabłonka oskrzelowego oraz nie aktywuje kanału mitoBK-DEC z transfekowanych komórek HEK293-BK_DEC. Na Rycinie 39 zaprezentowano przykładowe rejestracje obu badanych kanałów po dodaniu 10 μM naringeniny.



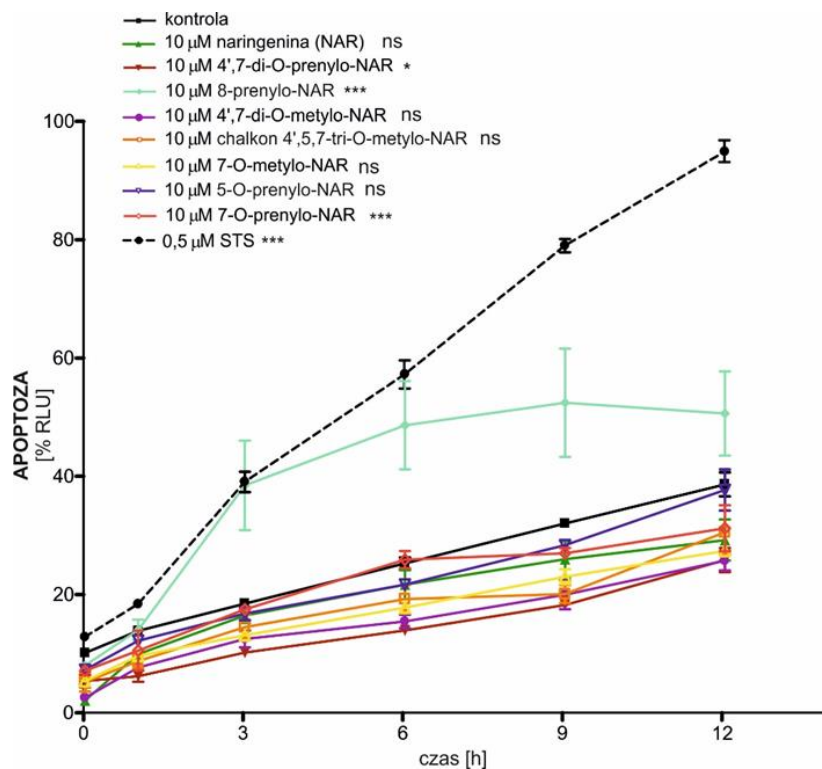
Rycina 39. Wpływ naringeniny na aktywność kanału mitoBK_DEC oraz mitoBK_{Ca}. Schemat przedstawia przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne przy napięciu -40 mV, w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl, pH 7,2 w warunkach kontrolnych (100 μM Ca²⁺) oraz po podaniu 10 μM naringeniny. „-” oznacza stan zamknięty kanału natomiast „o” stan otwarty kanału.

W kolejnym kroku zbadano wpływ siedmiu dostępnych pochodnych naringeniny (8-prenylo-naringeniny, 7-*O*-prenylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny, 5-*O*-prenylo-naringeniny, 7-*O*-metylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny) na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} w obu modelach badawczych komórkach nabłonka oskrzelowego (HBE) oraz transfekowanych embrionalnych komórkach nerki (HEK293-BK_DEC).

4.6.1.1. Ocena przeżywalności komórek HBE po inkubacji z pochodnymi naringeniny

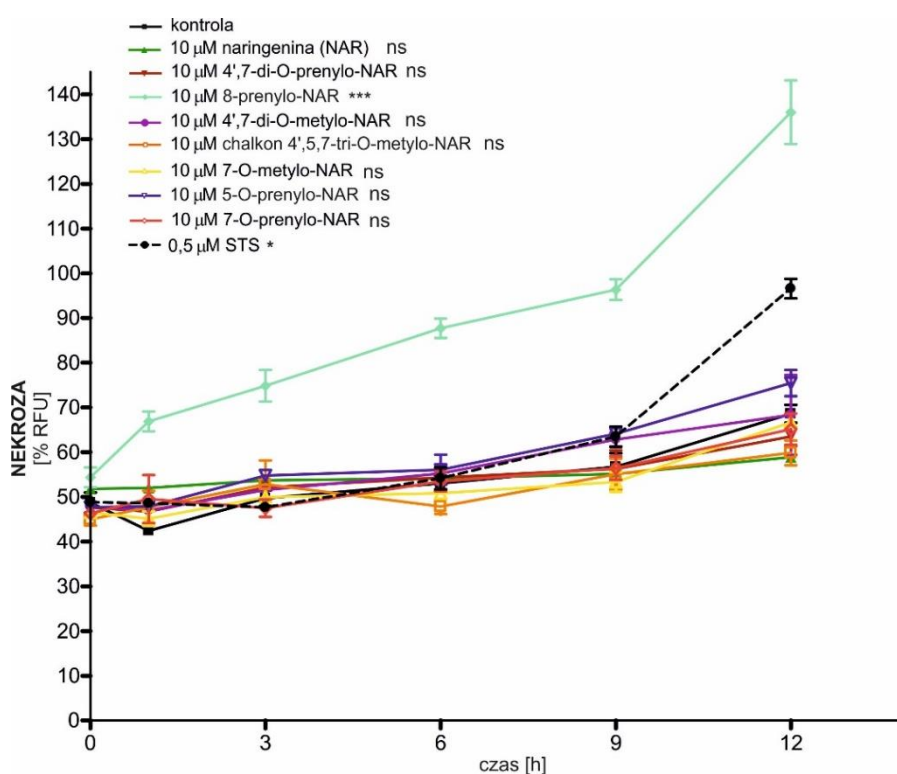
Toksyczność pochodnych naringeniny badano wykorzystując zestaw do pomiaru apoptozy i nekrozy opisany w rozdziale 3.8 *Ocena przeżywalności komórek*. Określono wpływ badanych pochodnych naringeniny na zapoczątkowanie procesów prowadzących do śmierci komórek. Pomiary wykonano w odstępach czasowych, co 3 godziny (0, 3, 6, 9, 12 h) dla obu typów eksperymentów, inkubując komórki z wybranym stężeniem (10 μM) pochodnych naringeniny. Apoptozę, czyli programowaną śmierć komórki określano poprzez pomiar luminescencji oraz przedstawiono jako % RLU (względna jednostka luminescencji, *ang. relative luminescence units*). Analiza przeprowadzonych

doświadczeń wykazała, że 10 μM 8-prenylo-naringeniny powoduje uszkodzenia komórek nabłonka oskrzelowego prowadzących do apoptozy. Wzrost sygnału luminescencji po inkubacji z tym związkiem był zbliżony do sygnału spowodowanego 0,5 μM staurosporyną (STS), czyli czynnikiem proapoptotycznym (Rycina 40). Staurosporyna jest naturalnie występującym antybiotykiem, wyizolowanym z bakterii *Streptomyces staurosporeus*. Wykazano, że STS jest bardzo silnym induktorem apoptozy, poprzez hamowanie aktywności różnych kinaz białkowych czyli enzymów katalizujących reakcję przeniesienia grupy fosforanowej [177]. Pozostałe sześć związków będących pochodnymi naringeniny (4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny, 7-*O*-prenylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny, 7-*O*-metylo-naringeniny, 5-*O*-prenylo-naringeniny) nie wykazywały toksycznego wpływu na komórki HBE.



Rycina 40. Wykres przedstawiający apoptozę komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego po inkubacji z pochodnymi naringeniny, wyrażoną zmianą luminescencji w czasie (0, 3, 6, 9, 12 h). Zaprezentowano kontrolę (komórki HBE nietraktowane), 10 μM naringeninę, 10 μM 4',7-di-*O*-prenylo-naringeninę, 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeninę, 10 μM 4',7-di-*O*-metylo-naringeninę, 10 μM chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeninę, 10 μM 7-*O*-metylo-naringeninę, 10 μM 5-*O*-prenylo-naringeninę oraz 0,5 μM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p<0,05$ (*), $p>0,05$ (ns)).

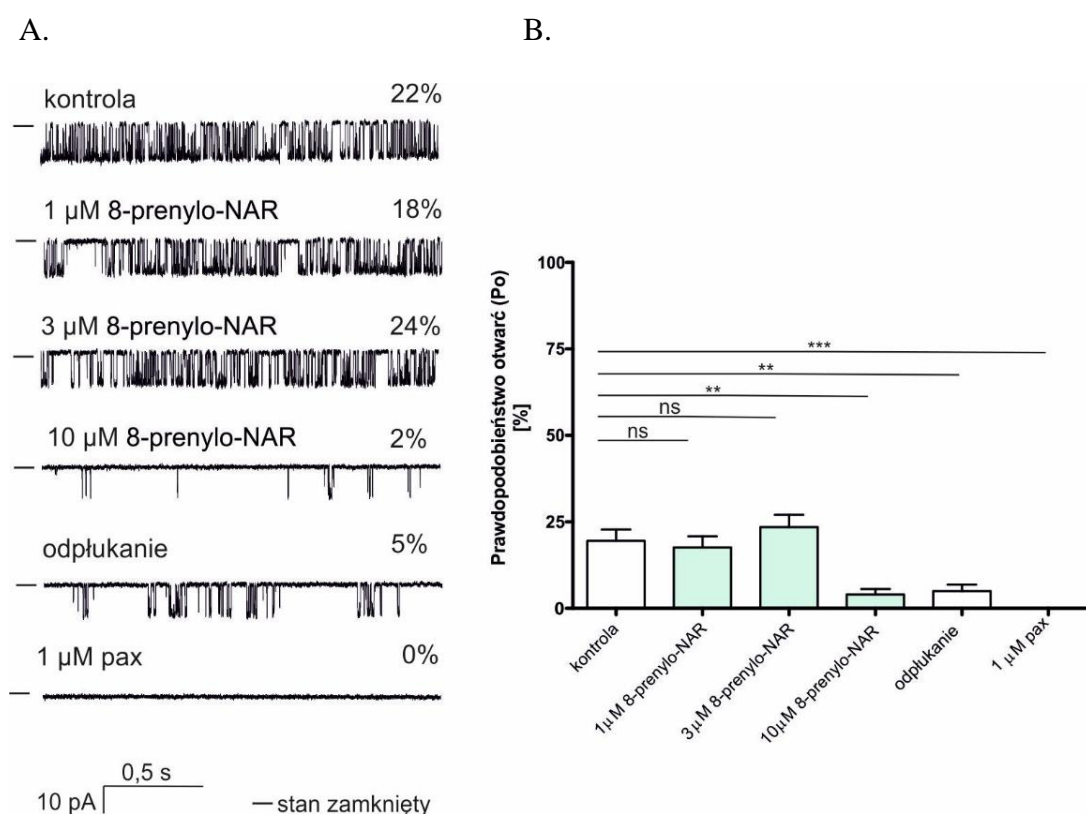
Równocześnie dokonywano pomiaru intensywności fluorescencji odpowiadającej zmianom nekrotycznym badanych komórek. Wykazano, że powodująca programowaną śmierć komórek, 10 μM 8-prenylo-naringeniny, również wpływa na indukcję nekrozy. Ten rodzaj śmierci charakteryzuje się pęcznieniem komórki oraz perforacjom błony komórkowej prowadzącym do nagłego rozpadu komórek. Jednostką pomiarową w przypadku zmian nekrotycznych była % RFT (względna jednostka fluorescencji, *ang. relative fluorescence units*). Rycina 41 przedstawia wpływ pochodnych naringeniny na nekrozę komórek HBE. Zaobserwowano, że 10 μM 8-prenylo-naringeniny powodowała znacznie większe uszkodzenia komórek w porównaniu do 0,5 μM staurosporyny, która po upływie 9 godzin od dodania zaczyna indukować zmiany prowadzące do nekrozy komórek HBE. Natomiast pozostałe pochodne naringeniny nie powodują zmian prowadzących do nekrozy komórek nabłonka oskrzelowego.



Rycina 41. Analiza wpływu pochodnych naringeniny na nekrozę komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego. Wykres przedstawia zmiany nekrotyczne komórek po inkubacji z pochodnymi naringeniny, wyrażoną zmianą fluorescencji w czasie (0, 3, 6, 9, 12 h). Zaprezentowano kontrole (komórki HBE nietraktowane), 10 μM naringeninę, 10 μM 4',7-di-O-prenylo-naringeninę, 10 μM 7-O-prenylo-naringeninę, 10 μM 4',7-di-O-metylo-naringeninę, 10 μM chalkonu 4',5,7-tri-O-metylo-naringeninę, 10 μM 7-O-metylo-naringeninę, 10 μM 5-O-prenylo-naringeninę oraz 0,5 μM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, $n=3$, ($p<0,001$ (***), $p<0,05$ (*), $p>0,05$ (ns)).

4.6.1.2. Regulacja aktywności kanału mitoBK_{Ca} przez pochodne naringeniny

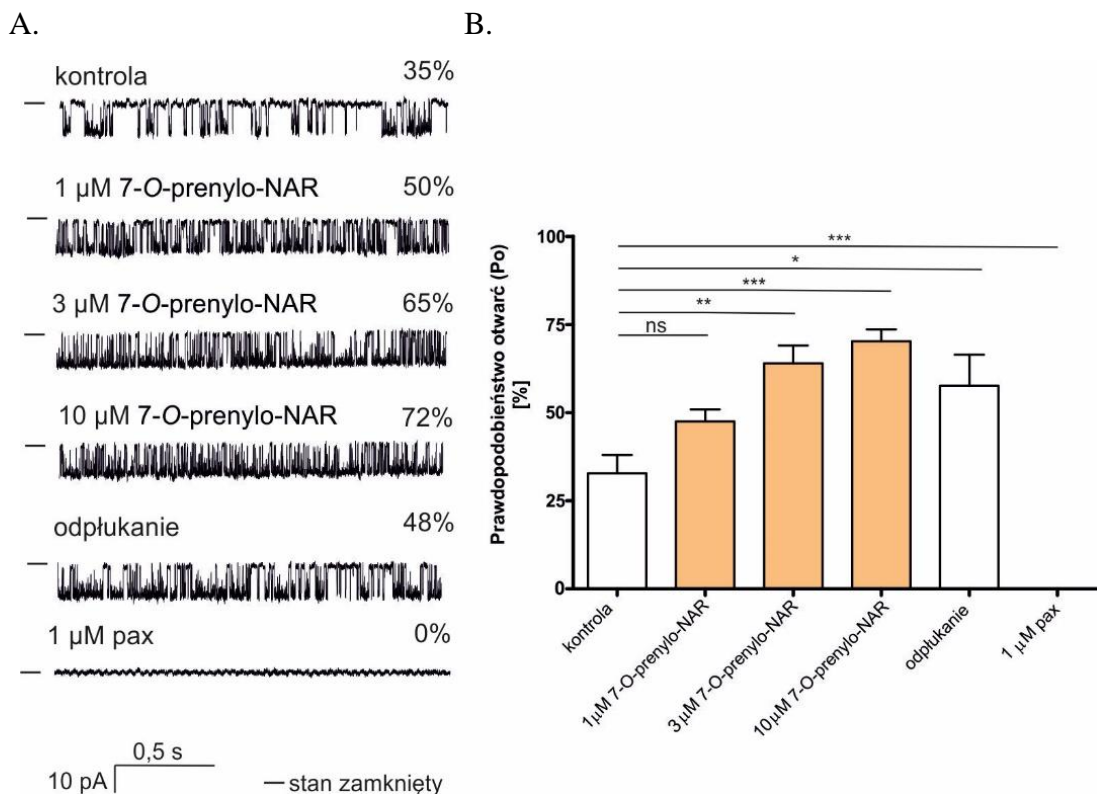
Wykorzystując technikę *patch-clamp* zbadano wpływ wszystkich pochodnych naringeniny na aktywność endogennie występującego mitochondrialnego kanału BK_{Ca} o niskim prawdopodobieństwie otwarć (kontrolna aktywność). W pierwszej kolejności zaprezentowano efekt 8-prenylo-naringeniny. Podczas analizy danych z pomiarów elektrofizjologicznych zaobserwowano, że związek ten w stężeniach 1 i 3 μM nie wpływa na zmianę aktywności kanału mitoBK_{Ca}. Natomiast obecność 10 μM 8-prenylo-naringeniny powoduje zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarć mitochondrialnego kanału BK_{Ca}, obniżając aktywności o około 20% w stosunku do kontroli. Rycina 42 przedstawia analizę wpływu 8-prenylo-naringeniny na kanał mitoBK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego.



Rycina 42. Efekt 8-prenylo-naringeniny na zmianę aktywności kanału mitoBK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (roztwór zawierający 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 8-prenylo-naringeniny, po odpłukaniu roztworem kontrolnym oraz podaniu 1 μM paksyli. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale

-40 mV; „-” oznacza stan zamknięty. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 8-prenylo-naringeniny, odpłukaniu oraz dodaniu 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***)), ($p<0,01$ (**)), ($p>0,05$ (ns)).

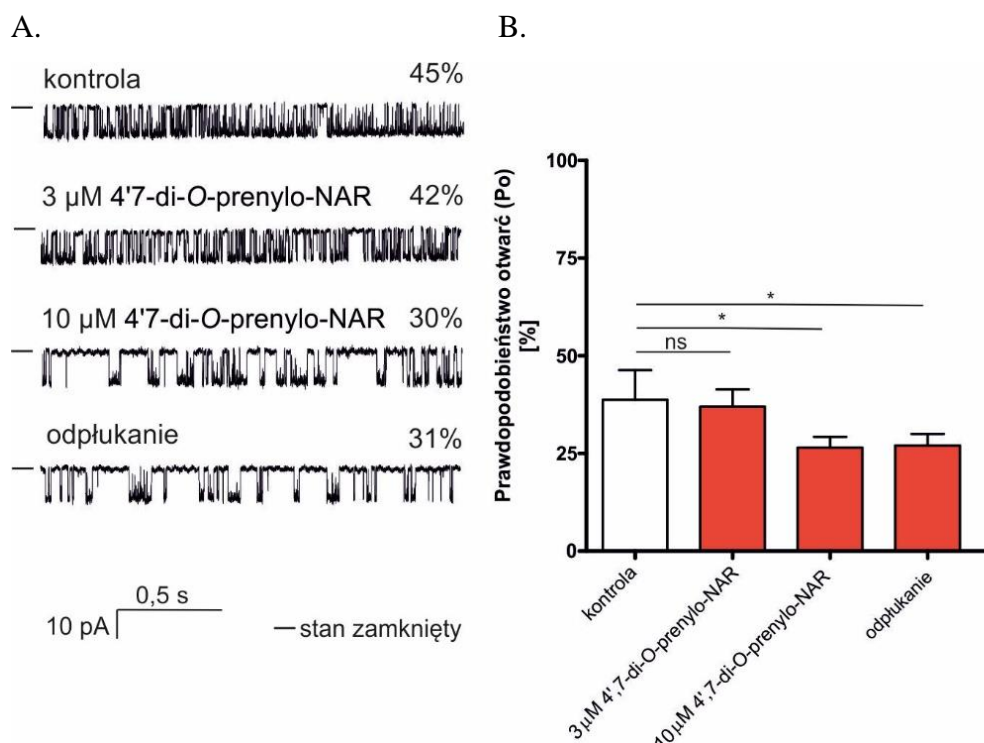
W następnym kroku zbadano wpływ 7-*O*-prenylo-naringeniny na aktywność kanału mitoBK_{Ca}. Wykazano, że związek aktywuje kanał, w sposób zależny od stężenia. Zaobserwowano, że podanie 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeniny powoduje największe zmiany prawdopodobieństwa otwarć kanału, o około 40% w stosunku do kontroli. Również 3 μM 7-*O*-prenylo-naringenina wykazuje aktywujący efekt, zwiększając prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_{Ca} o około 30%. Wykazano również, iż związek w nieznacznym stopniu jest odpłukiwany od miejsca wiązania w białku kanałowym. Natomiast dodanie 1 μM paksyliny, inhibitora kanału, powoduje zamknięcie kanału. Analizę doświadczeń przedstawiono na Rycinie 43.



Rycina 43. Regulacja aktywności kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE przez 7-*O*-prenylo-naringeniny. **(A)** przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeniny, po odpłukaniu roztworem kontrolnym oraz po dodaniu 1 μM paksyliny. Pomiar wykonywano

w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeniny, odpłukaniu i podaniu 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’*a* wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p<0,01$ (**), $p<0,05$ (*), $p>0,05$ (ns)).

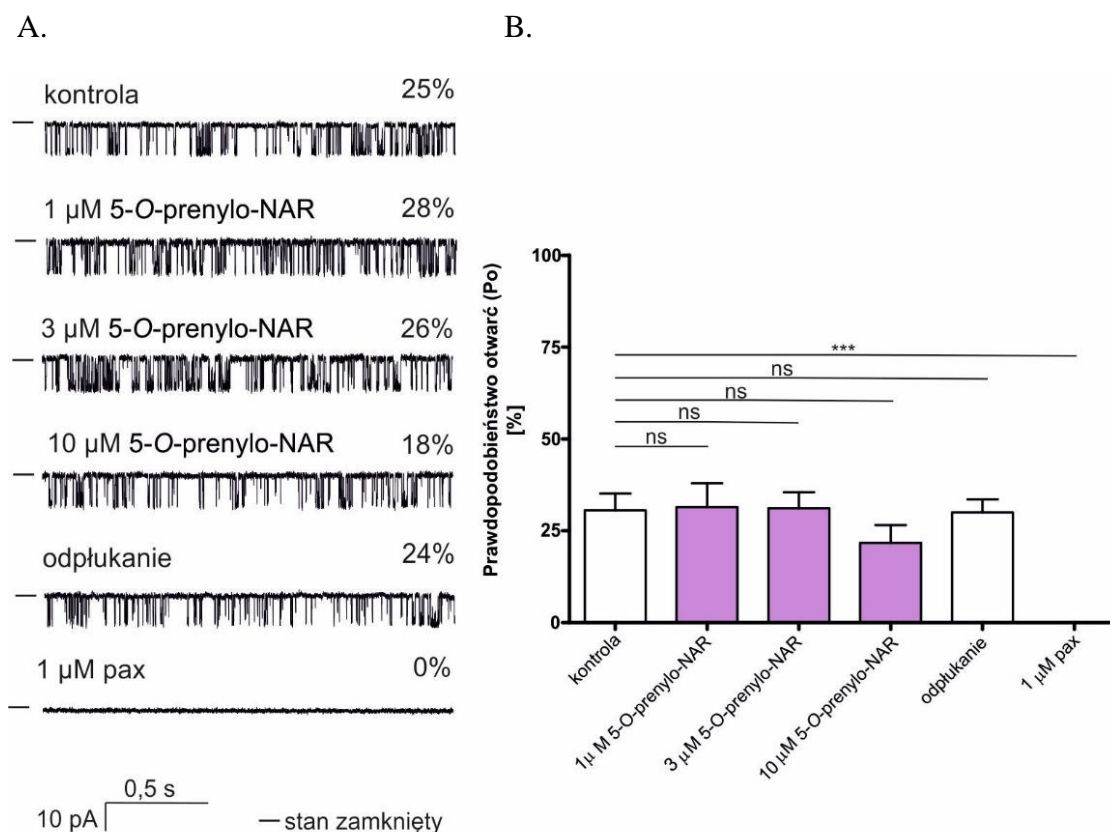
Następnie wykonano doświadczenia z wykorzystaniem kolejnej pochodnej naringeniny 4’,7-di-*O*-prenylo-naringeniny. Na Rycinie 44 przedstawiono zapisy elektrofizjologiczne, zmian aktywności kanału mitoBK_{Ca} w warunkach kontrolnych i po podaniu 3 oraz 10 μM 4’,7-di-*O*-prenylo-naringeniny. Podczas analizy pomiarów elektrofizjologicznych w warunkach symetrycznych stężeń 150/150mM KCl zaobserwowano, że badany związek w stężeniu 10 μM powoduje statystycznie istotne zmiany aktywności kanału. Prawdopodobieństwo otwarć mitochondrialnego kanału BK_{Ca} zmniejsza się w przybliżeniu o 10% po podaniu pochodnej naringeniny. Otrzymany efekt jest nieodwracalny po dodaniu roztworu kontrolnego zawierającego 100 μM Ca²⁺. Na Rycinie 44 zaprezentowano (A) przykładowe zapisy zmian aktywności kanału w warunkach kontrolnych i po podaniu 4’,7-di-*O*-prenylo-naringeniny oraz (B) analizę prawdopodobieństwa otwarć (P_o) kanału mitoBK_{Ca}.



Rycina 44. Wpływ 4’,7-di-*O*-prenylo-naringeniny na aktywność kanału mitoBK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. **(A)** przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych

w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 3 i 10 μM 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny oraz odpłukaniu roztworem kontrolnym. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 3 i 10 μM 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny oraz odpłukanie. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,05$ (*), $p>0,05$ (ns)).

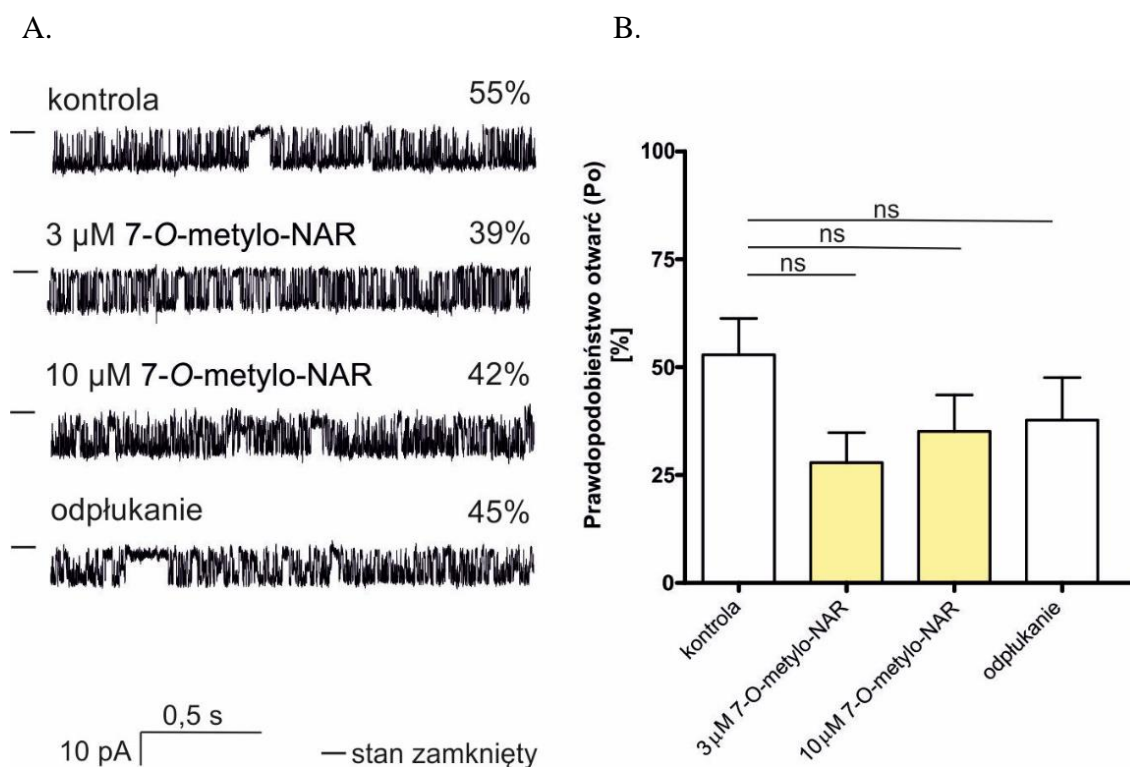
Kolejną badaną pochodną naringeniny na zmiany prawdopodobieństw otwarć kanału mitoBK_{Ca} był związek 5-*O*-prenylo-naringeniny. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że związek w stężeniu 1 i 3 μM nie wpływa na zmiany aktywności mitochondrialnego kanału. Natomiast najwyższe badane stężenie powoduje nieznaczne zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarć kanału z około 25% w warunkach kontrolnych do około 18% po zastosowaniu 10 μM 5-*O*-prenylo-naringeniny. Po dodaniu roztworu kontrolnego i odpłukaniu związku, zaobserwowano powrót prawdopodobieństw otwarć kanału do około 24%. Na Rycinie 45 przedstawiono analizę wykonanych doświadczeń.



Rycina 45. Regulacja aktywności kanału mitoBK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego przez 5-*O*-prenylo-naringeninę. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 5-*O*-

prenylo-naringeniny, po odplukaniu roztworem kontrolnym oraz dodaniu 1 μM paksyliny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV ; „-” oznacza stan zamknięty. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 5-*O*-prenylo-naringeniny, odplukaniu oraz dodaniu 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’*a* wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p>0,05$ (ns)).

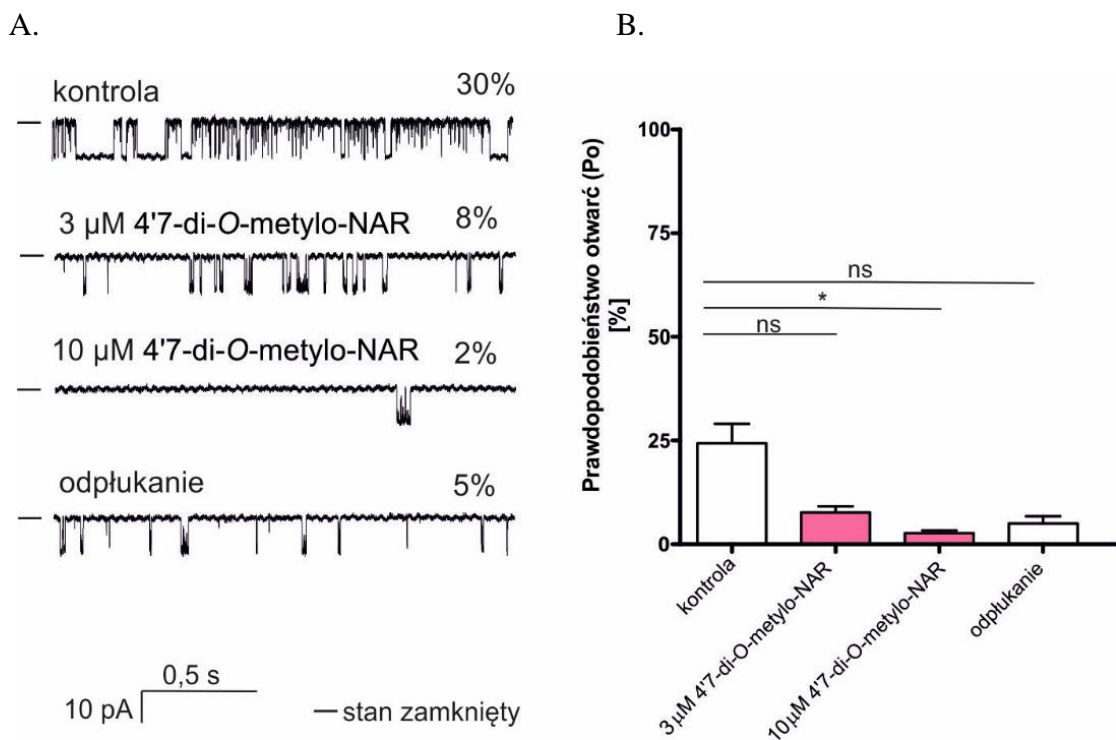
Następnie zbadano wpływ 7-*O*-metylo-naringeniny na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} . Wykazano, że związek ten powoduje nieistotne statystycznie, niewielkie zmniejszenie aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. Na Rycinie 46 zaprezentowano wyniki doświadczeń z wykorzystaniem 7-*O*-metylo-naringeniny, **(A)** przedstawia przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych, natomiast panel **(B)** to analiza zmian prawdopodobieństwa otwarć kanału.



Rycina 46. Wpływ 7-*O*-metylo-naringeniny na zmianę aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w komórkach HBE. **(A)** przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 3 i 10 μM 7-*O*-metylo-naringeniny oraz po odplukaniu roztworem kontrolnym. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV ; „-” oznacza stan zamknięty. **(B)** Analiza

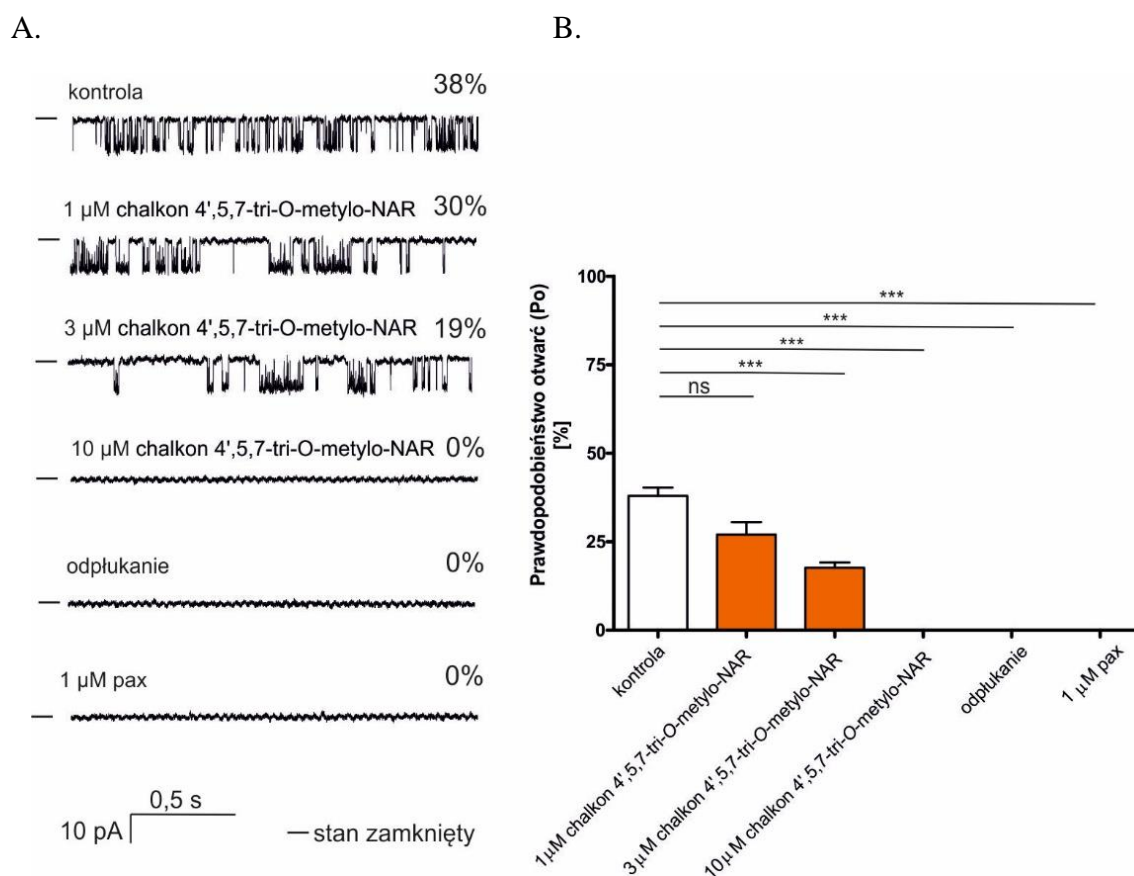
prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 3 i 10 μM 7-*O*-metylo-naringeniny oraz odpłukaniu. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=2$, $p>0,05$ (ns)).

Zbadano również wpływ 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny na aktywność kanału mitoBK_{Ca}. Zaobserwowano, znaczący wpływ badanej pochodnej na aktywność badanego kanału. Wykazano, iż aktywność kanału maleje wraz ze wzrostem zastosowanego stężenia związku. Natomiast 10 μM 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, zmniejsza prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_{Ca} o ponad 25%. Po odpłukaniu pochodnej naringeniny, nie zaobserwowano powrotu do aktywności wyjściowej. Wyniki zaprezentowano na Rycinie 47, (A) przedstawia zapisy elektrofizjologiczne z wybranego doświadczenia, natomiast w panel (B) analiz zmian prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK_{Ca}.



Rycina 47. Efekt 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny na zmianę aktywności kanału mitoBK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 3 i 10 μM 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny oraz po odpłukaniu roztworem kontrolnym. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 3 i 10 μM 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny oraz odpłukaniu. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=2$, ($p<0,05$ (*), $p>0,05$ (ns)).

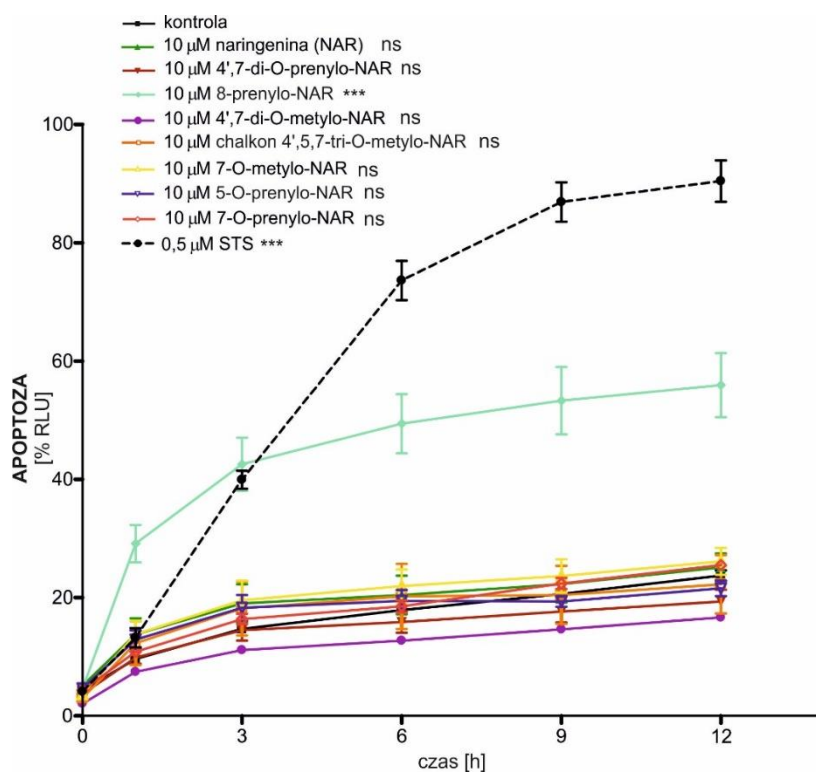
Ostatnią badaną pochodną naringeniny był chalkon 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny. Wykorzystując technikę *patch-clamp*, wykazano, że chalkon również powoduje znaczące zmniejszenie aktywności kanału mitochondrialnego. Podanie 3 μM chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny, redukuje prawdopodobieństwo otwarć kanału o około 20%. Natomiast najwyższe zastosowane stężenie związku 10 μM powoduje zamknięcie kanału mitoBK_{Ca}, po którym nie następuje powrót aktywności. Rycina 48 przedstawia uzyskane rezultaty po dodaniu chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny podczas doświadczeń *patch-clamp*.



Rycina 48. Zmiany aktywności kanału mitoBK_{Ca} po dodaniu chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego (**A**) przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 1, 3 i 10 μM chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny, odplukaniu roztworem kontrolnym oraz po podaniu 1 μM paksyliny (pax). Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV. „-” oznacza stan zamknięty. (**B**) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny, roztworu kontrolnego oraz 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, n=3, (p<0,001 (***) , p>0,05 (ns)).

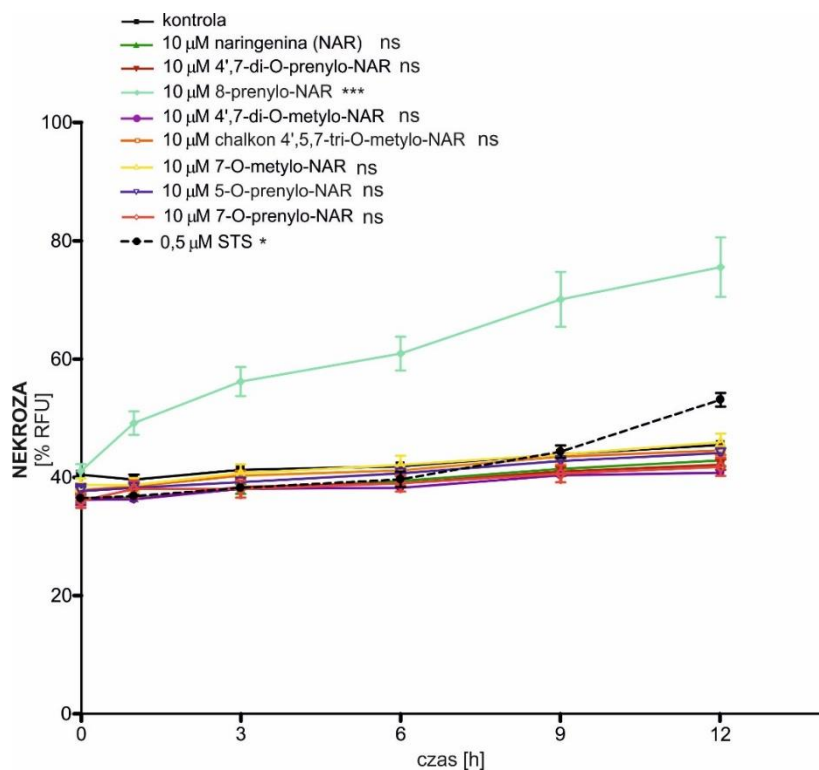
4.6.1.3. Wpływ pochodnych naringeniny na przeżywalności komórek HEK293-BK_DEC

Zbadano również wpływ wszystkich dostępnych pochodnych naringeniny (8-prenylo-naringeniny, 7-*O*-prenylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny, 5-*O*-prenylo-naringeniny, 7-*O*-metylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny) na przeżywalność komórek HEK293-BK_DEC wyrażających zdefiniowaną izoformę mitochondrialnego kanału BK_{Ca}. W tym celu wykorzystano opisany wcześniej w rozdziale 3.8 *Ocena przeżywalności komórek*, zestaw do pomiaru zmian zachodzących w komórkach świadczących o apoptozie oraz nekrozie komórek. Staurosporyna (STS) posłużyła jako związek powodujący apoptozę komórek HEK293-BK_DEC, będąc kontrolą pozytywną w doświadczeniach. Zaobserwowano, że w nowym modelu komórkowym czyli w transfekowanych komórkach HEK293, staurosporyna również prowadzi do apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórek. Komórki inkubowano z naringeniną i jej pochodnymi w stężeniu 10 μM oraz dokonywano pomiaru luminescencji w odstępach czasowych, po 3, 6, 9, i 12 godzinach. Analiza przeprowadzonych doświadczeń wykazała, że tylko jedna badana pochodna – 10 μM 8-prenylo-naringenina powoduje apoptozę komórek w sposób podobny do staurosporyny, poprzez zwiększenie sygnału luminescencji. Na Rycinie 49 przedstawiono zmiany apoptozy w czasie jako % RLU (względna jednostka luminescencji, *ang. relative luminescence units*).



Rycina 49. Wykres przedstawiający apoptozę komórek HEK-293-BK_DEC po dodaniu pochodnych naringeniny. Apoptoza wyrażona jako zmiana luminescencji w czasie (0, 3, 6, 9, 12 h). Zaprezentowano kontrolę (komórki HEK293-BK_DEC nietraktowane), 10 µM naringeninę, 10 µM 4',7-di-O-prenylo-naringeninę, 10 µM 8-prenylo-naringeninę, 10 µM 7-O-prenylo-naringeninę, 10 µM 4',7-di-O-metylo-naringeninę, 10 µM chalkonu 4',5,7-tri-O-metylo-naringeninę, 10 µM 7-O-metylo-naringeninę, 10 µM 5-O-prenylo-naringeninę oraz 0,5 µM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, n=3, (p<0,001 (***) , p>0,05 (ns)).

Określono również wpływ badanych związków będącymi pochodnymi naringeniny na nekrozę komórek HEK-BK_DEC. Do doświadczeń użyto tego samego zestawu, lecz mierząc fluorescencję. Pomiary wykonywano w tych samych odstępach czasowych 0, 1, 3, 6, 9 i 12 godzin. Otrzymane wyniki odpowiadają opisanym wyżej, a więc 10 µM 8-prenylo-naringenina, powoduje śmierć komórek również na drodze nekrozy. Zmiany fluorescencji dla tego związku przewyższają te odpowiadające komórkom inkubowanym z staurosporyną. Pozostałe pochodne naringeniny nie wpływają toksycznie na komórki HEK293-BK_DEC. Natomiast 0,5 µM staurosporyna, po upływie 9 godzin od dodania związku zaczyna indukować również zmiany prowadzące do nekrozy. Nekrozę wyrażono jako % RFT (względna jednostka fluorescencji, *ang. relative fluorescence units*) w czasie, wyniki przedstawiono na Rycinie 50.

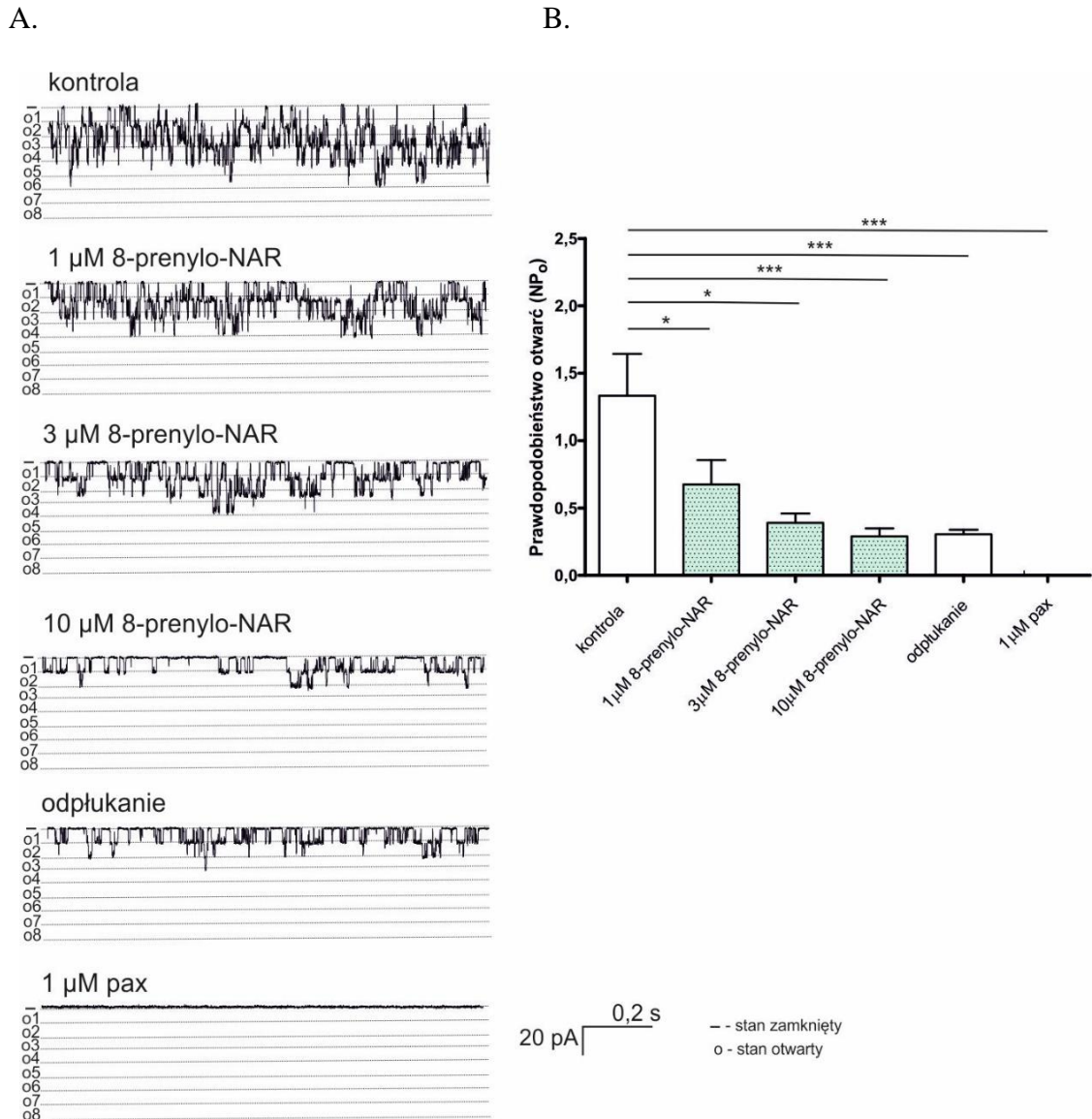


Rycina 50. Analiza wpływu pochodnych naringeniny na nekrozę komórek HEK293-BK_DEC. Wykres przedstawia zmiany nekrotyczne komórek po inkubacji z pochodnymi naringeniny, wyrażoną zmianą fluorescencji w czasie (0, 3, 6, 9, 12 h). Zaprezentowano kontrole (komórki HEK293-BK_DEC nietraktowane), 10 μM naringeninę 10 μM 4',7-di-O-prenylo-naringeninę, 10 μM 7-O-prenylo-naringeninę, 10 μM 8-prenylo-naringeninę, 10 μM 4',7-di-O-metylo-naringeninę, 10 μM chalkonu 4',5,7,-tri-O-metylo-naringeninę, 10 μM 7-O-metylo-naringeninę, 10 μM 5-O-prenylo-naringeninę oraz 0,5 μM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, n=3, ($p < 0,001$ (***) , $p < 0,05$ (*), $p > 0,05$ (ns)).

4.6.1.4. Ocena aktywności kanału izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca} z linii komórkowej HEK293-BK_DEC po podaniu pochodnych naringeniny

Wykorzystując technikę *patch-clamp* zbadano wpływ pochodnych naringeniny (8-prenylo-naringeniny, 7-O-prenylo-naringeniny, 4',7-di-O-prenylo-naringeniny, 5-O-prenylo-naringeniny, 7-O-metylo-naringeniny, 4',7-di-O-metylo-naringeniny, chalkonu 4',5,7,-tri-O-metylo-naringeniny) na aktywność egzogennej izoformy kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. W pierwszej kolejności przedstawiono wyniki doświadczeń z wykorzystaniem 8-prenylo-naringeniny, indukującej śmierć

komórek HEK293-BK_DEC. Zaobserwowano, że ta pochodna naringeniny zmniejsza aktywność izoformy VEDEC kanału mitoBK_{Ca}, obniżając NP_(o) kanałów. Rycina 51 prezentuje (A) przykładowe zapisy elektrofizjologiczne kilku aktywności kanału mitoBK_DEC w jednym skrawku błony mitochondrialnej oraz (B) analizę zmian prawdopodobieństw otwarć kanału po podaniu 1, 3 i 10 μM 8-prenylo-naringeniny.

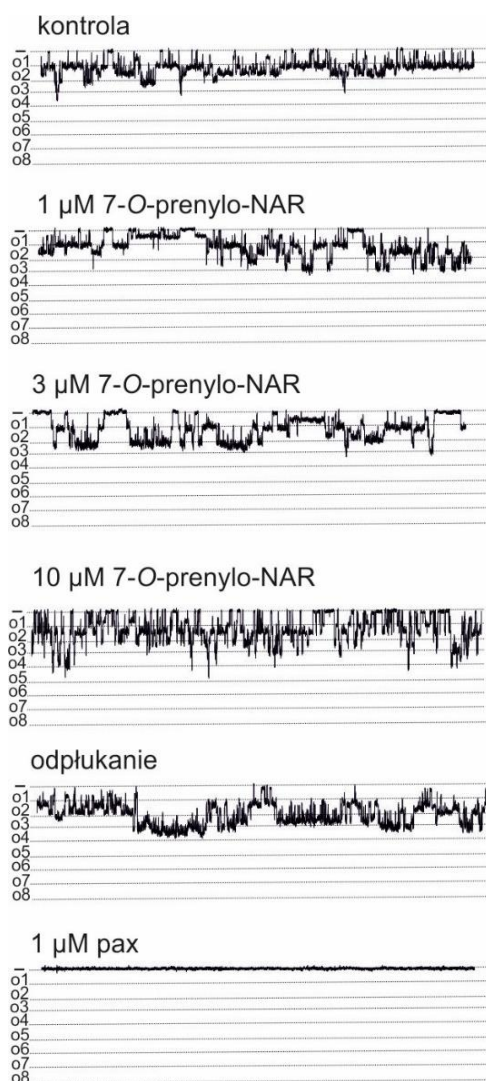


Rycina 51. Efekt 8-prenylo-naringeniny na zmianę aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (zawierających m.in. 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 8-prenylo-naringeniny, po odplukaniu roztworem kontrolnym oraz podaniu 1 μM paksyliny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. (B) Analiza prawdopodobieństw otwarć kanału (NP_o, N=6) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 8-prenylo-naringeniny, odplukaniu oraz dodaniu 1 μM paksyliny. Metodą analizy

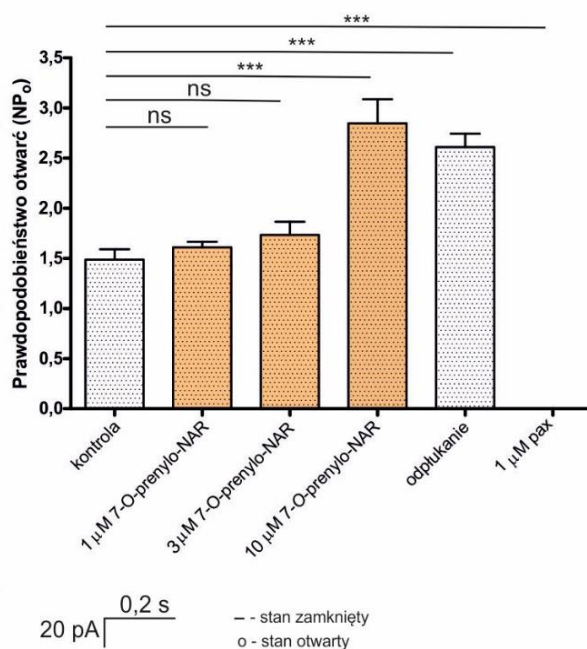
jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,05$ (*), $p>0,05$ (ns)).

Kolejną badaną pochodną była 7-*O*-prenylo-naringenina. Wykazano, że po dodaniu 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeniny prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_DEC znacząco rośnie. Zmiana spowodowana tym związkiem jest istotna statystycznie i koreluje z efektem obserwowanym podczas badań z wykorzystaniem endogenego kanału w komórkach HBE. Po podaniu 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeniny, zaobserwowano otwieranie się większej liczby kanałów ($N=4$) w porównaniu do warunków kontrolnych ($N=5$) oraz zwiększenie ich aktywności. Ponadto dodanie 1 μM paksyliny powodował zamknięcie wszystkich kanałów mitoBK_DEC w badanym skrawku błony mitochondrialnej. Rycina 52 prezentuje wyniki z wykorzystaniem 7-*O*-prenylo-naringeniny.

A.



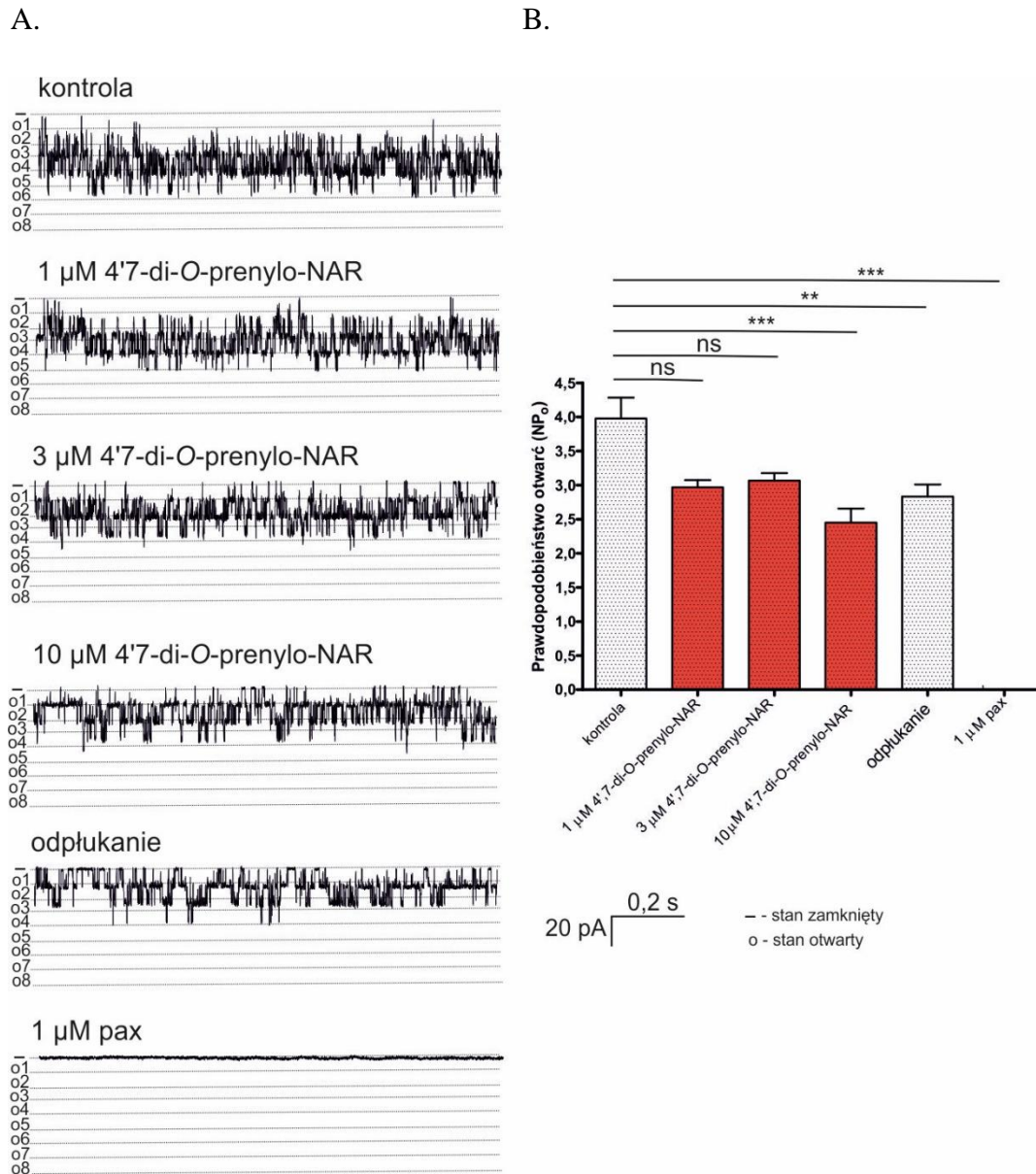
B.



Rycina 52. Regulacja aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC przez 7-*O*-prenylo-naringeninę. (A) przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach kontrolnych (zawierających 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeniny, po odpłukaniu roztworem kontrolnym oraz po dodaniu 1 μM paksyliny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o, N=5) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 7-*O*-prenylo-naringeniny, odpłukaniu i podaniu 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, n=3, (p<0,001 (***) , p>0,05 (ns)).

Następnym zbadanym związkiem była podwójnie prenylowana naringenina. Zaobserwowano zmiany aktywności kanału mitoBK_DEC po dodaniu badanego związku. 4',7-di-*O*-prenylo-naringenina w stężeniu 10 μM zmniejszyła istotnie statystycznie prawdopodobieństwo otwarć mitochondrialnego kanału. Wykazano

również, iż związek jest nieodpływany z miejsca wiązania w kanale, natomiast 1 μM paksylina powoduje zamknięcie aktywności kanału mitoBK_DEC. Rycina 53 przedstawia analizę danych wpływu 4',7-di-O-prenylo-naringeniny na aktywność kilku kanałów mitoBK_DEC w jednym skrawku błony mitochondrialnej.

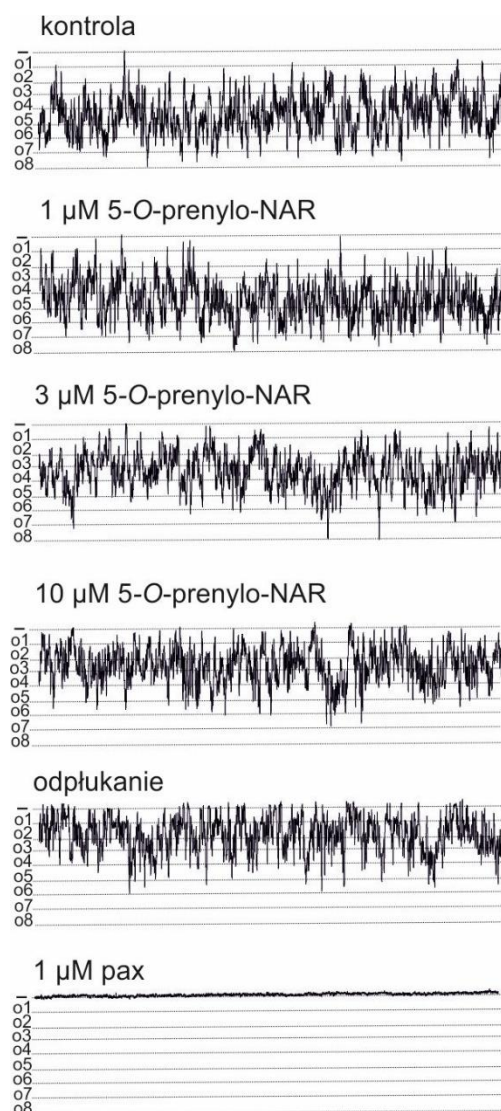


Rycina 53. Wpływ 4',7-di-O-prenylo-naringeniny na aktywność kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 4',7-di-O-prenylo-naringeniny, po odpłukaniu roztworem kontrolnym oraz dodaniu 1 μM paksyliny. Doświadczenia wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o, N=5) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10

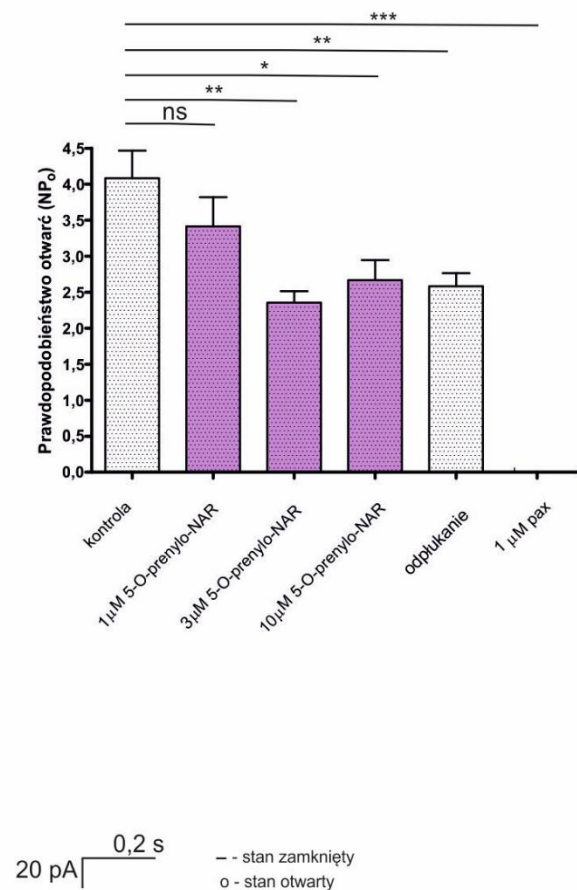
μM 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny, po odpłukaniu oraz dodaniu 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p<0,01$ (**), $p>0,05$ (ns)).

Kolejne doświadczenia z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* dotyczyły 5-*O*-prenylo-naringeniny. Rycina 54 przedstawia brak znaczących zmian aktywności kanału mitoBK_DEC po dodaniu pochodnej naringeniny. Również dodaniu roztworu kontrolnego nie powodowało znaczących zmian. Natomiast kanał mitochondrialny z komórek HEK293-BK_DEC został zahamowany po podaniu 1 μM paksyliny.

A.



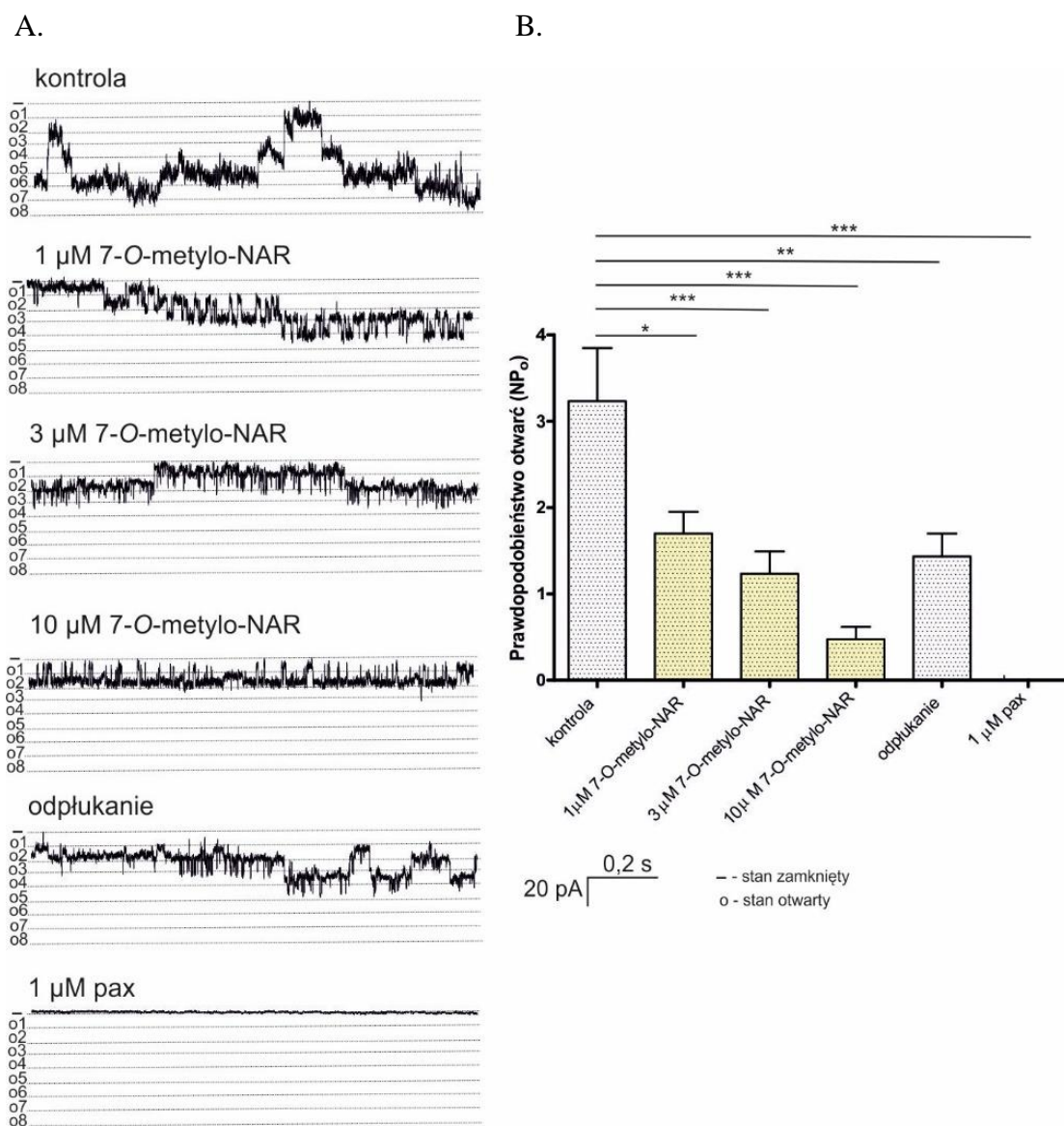
B.



Rycina 54. Regulacja aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC przez 5-*O*-prenylo-naringeninę. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 3 i 10 μM

5-*O*-prenylo-naringeniny, po odpłukaniu roztworem kontrolnym oraz dodaniu 1 μM paksyliny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. **(B)** Analiza prawdopodobieństw otwarć kanału (NP_o ; $N=8$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 5-*O*-prenylo-naringeniny, odpłukaniu oraz podaniu 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,05$ (*), $p>0,05$ (ns)).

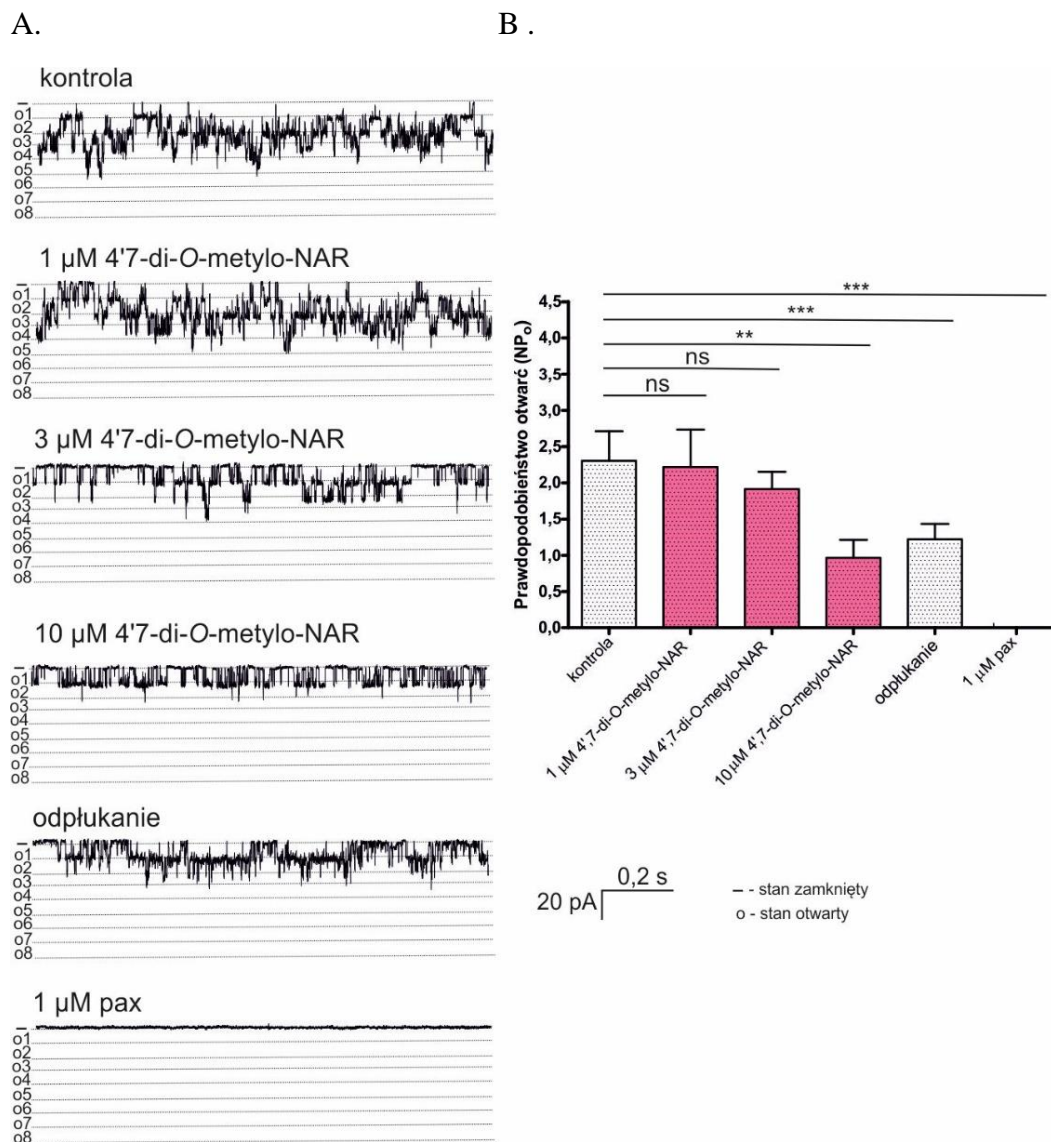
Zbadano również wpływ pojedynczo metylowanej naringeniny na aktywność egzogennego kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$. Wykazano, że związek zmniejsza prawdopodobieństwo otwarć kanału w sposób zależny od stężenia. 7-*O*-metylo-naringenina wraz ze wzrostem stężenia powodowała zamykanie kanałów mitoBK_DEC występujących w jednym badanym skrawku błony. W warunkach kontrolnych zaobserwowano 8 ($N=8$) aktywnych kanałów, natomiast po dodaniu 10 μM 7-*O*-metylo-naringeniny aktywność zmniejszyła się do 2 kanałów. Wykazano, że po dodaniu roztworu kontrolnego, kanały powtórnie są aktywne ($N=5$), lecz nie w takiej ilości jak na początku doświadczenia. Na Rycinie 55 przedstawiono zmiany aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293- BK_DEC po zastosowaniu 7-*O*-metylo-naringeniny, (A) przedstawia przykładowe zapisy elektrofizjologiczne, natomiast (B) to analiza zmian prawdopodobieństwa otwarć kanałów.



Rycina 55. Wpływ 7-*O*-metylo-naringeniny na zmianę aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. **(A)** przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 7-*O*-metylo-naringeniny, po odpłukaniu roztworem kontrolnym oraz dodaniu 1 μM paksyliny (pax). Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „—” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o, N=8) w warunkach kontrolnych, po dodaniu 1, 3 i 10 μM 7-*O*-metylo-naringeniny, odpłukaniu oraz 1 μM pax. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, n=2, (p<0,001 (***), p<0,01 (**), p<0,05 (*)).

Kolejnym badanym związkiem była podwójnie metylowana naringenina. Wykazano, że 4',7-di-*O*-metylo-naringenina wpływa na zmniejszenie aktywności kanału, w sposób zależny od wzrastającego stężenia. Związek w stężeniu 1 i 3 μM nieznacznie zmniejszył

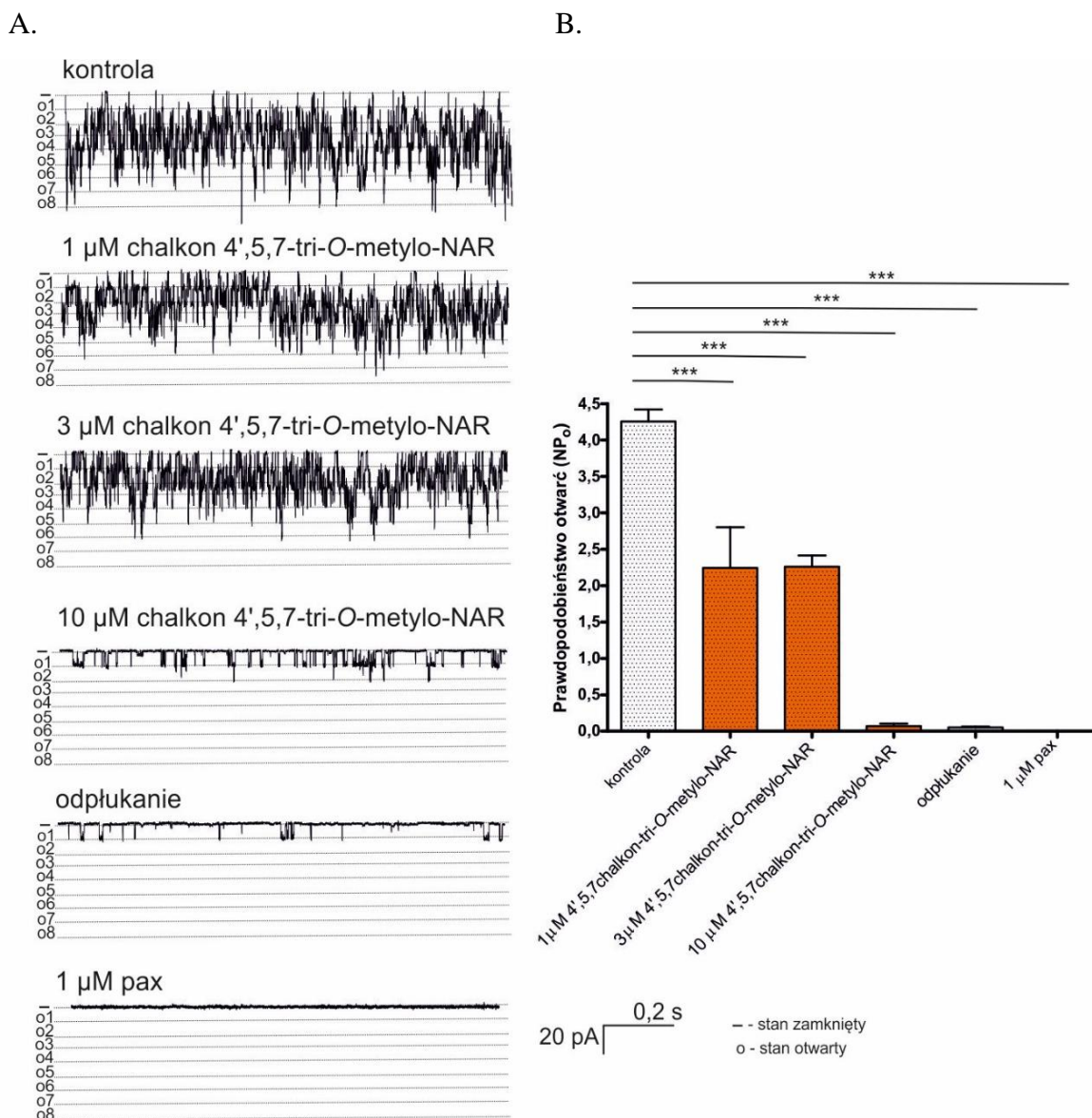
prawdopodobieństwo otwarć kanałów (N=5). Natomiast 10 μM 4',7-di-*O*-metylo-naringenina istotnie statystycznie zmniejszyła ilość kanałów mitoBK_DEC do 2 w jednym badanym skrawku błony mitochondrialnej. Na Rycinie 56 przedstawiono wyniki doświadczeń z wykorzystaniem 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, (A) przedstawia przykładowe zapisy elektrofizjologiczne kilku aktywnych kanałów w jednym skrawku błony, natomiast panel (B) to analiza zmian prawdopodobieństwa otwarć kanałów (NP_o).



Rycina 56. Efekt 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny na zmianę aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, po odpłukaniu roztworem kontrolnym oraz dodaniu 1 μM paksyliiny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. (B) Analiza

prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o, N=5) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, odpłukaniu oraz 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, n=3, (p<0,001 (***) , p<0,01 (**), p>0,05 (ns)).

Ostatnim badanym związkiem należącym do flawonoidów był chalkon 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny, który znacząco zmieniał aktywność kanału mitoBK_{Ca} obecnego w pierwszym badanym modelu, komórkach nabłonka oskrzeli. Zaobserwowano, że chalkon również reguluje aktywność kanału mitoBK_DEC. Chalkon 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny w stężeniu 1 i 3 μM zmniejszył prawdopodobieństwo otwarć kanałów oraz powodował zamknięcie części z nich w stosunku do kontroli. Natomiast najwyższe badane stężenie 10 μM spowodowało zamknięcie kanałów, pozostawiając 2 aktywne kanały. Związek był nieodpukiwany co może świadczyć o jego trwałym związaniu w kanale. Na Rycinie 57 przedstawiono analizę doświadczeń *patch-clamp* dotyczącą wpływu chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny na regulację aktywności kanału mitoBK_DEC.



Rycina 57. Zmiany aktywności kanału mitoBK_DEC po dodaniu chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny w komórkach HEK293-BK_DEC (**A**) przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 3 i 10 μM chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny, odplukaniu roztworem kontrolnym oraz po podaniu 1 μM paksyliny (pax). Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. (**B**) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o, N=8) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny, roztworu kontrolnego oraz 1 μM paksyliny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, n=3, (p<0,001 (***)).

Podsumowując, doświadczenia dotyczące pochodnych naringeniny, wykazano, że tylko jedna 8-prenylo-naringenina powodowała zmniejszenie przeżywalności zarówno komórek HBE jak i HEK293-BK_DEC. Pozostałe badane związki: 7-*O*-prenylo-

naringeniny, 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny, 5-*O*-prenylo-naringeniny, 7-*O*-metylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny nie wpływały na indukcję apoptozy i nekrozy komórek HBE i HEK293-BK_DEC. Ponadto, wykazano, że jedna z badanych pochodnych 7-*O*-prenylo-naringenina powoduje aktywację kanału mitoBK_{Ca} występującego endogennie oraz egzogennie. W badaniach elektrofizjologicznych z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*, wykazano również, że 8-prenylo-naringenina, 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny, 5-*O*-prenylo-naringeniny, 7-*O*-metylo-naringeniny oraz 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny nie powodują zwiększania prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK_{Ca} i mitoBK_DEC. Natomiast chalkon 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny w obu modelach badawczych wykazuje hamujący efekt na aktywność kanału mitoBK_{Ca} i mitoBK_DEC.

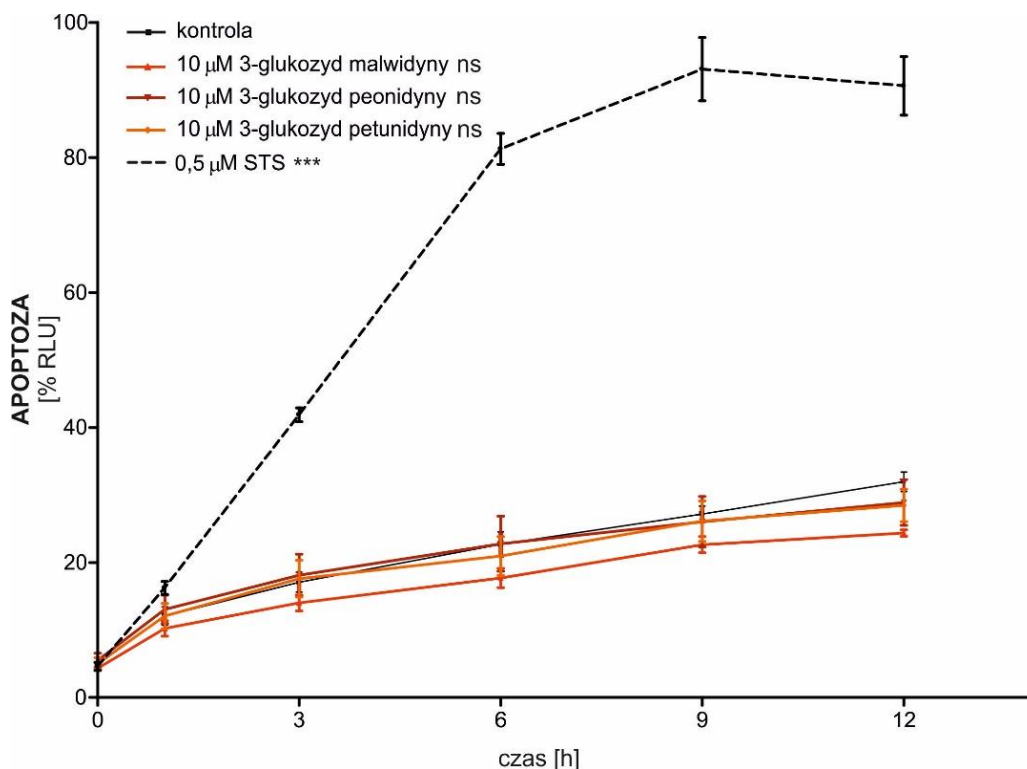
4.6.2. Regulacja kanału mitoBK_{Ca} w komórkach linii HBE przez naturalnie występujące antocyjany

Kolejną badaną grupą związków były antocyjany, naturalnie występujące w roślinach, należące do flawonoidów. Określono wpływ trzech wyselekcjonowanych związków należące do antocyjanów: 3-glukozyd malwidyny, 3-glukozyd peonidyny oraz 3-glukozyd petunidyny na aktywność kanału mitoBK_{Ca} z komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego.

4.6.2.1. Przeżywalność komórek linii HBE

W pierwszym etapie zbadano wpływ antocyjanów na przeżywalność komórek HBE. W tym celu wykorzystano opisywany już wcześniej zestaw do pomiaru apoptozy i nekrozy opisany w rozdziale 3.8 *Ocena przeżywalności komórek*. Określono wpływ badanych niskcząsteczkowych związków pochodzenia roślinnego na indukowanie procesu apoptozy i nekrozy, prowadzącej do śmierci komórki. Pomiarów wykonano w odstępach czasowych, co 3 godziny (0, 3, 6, 9, 12 h) dla obu typów eksperymentów. Nie zaobserwowano aby komórki HBE traktowane 10 μM 3-glukozydem malwidyny, 10 μM 3-glukozydem peonidyny oraz 10 μM 3-glukozydem petunidyny wykazywały cechy charakterystyczne dla procesów apoptotycznych i nekrotycznych w porównaniu do

0,5 μM staurosporyny (STS), czynnika proapoptotycznego (Rycina 58). Apoptozę, czyli programowaną śmierć komórki określano poprzez pomiar luminescencji oraz przedstawiono jako % RLU (względna jednostka luminescencji, *ang. relative luminescence units*).

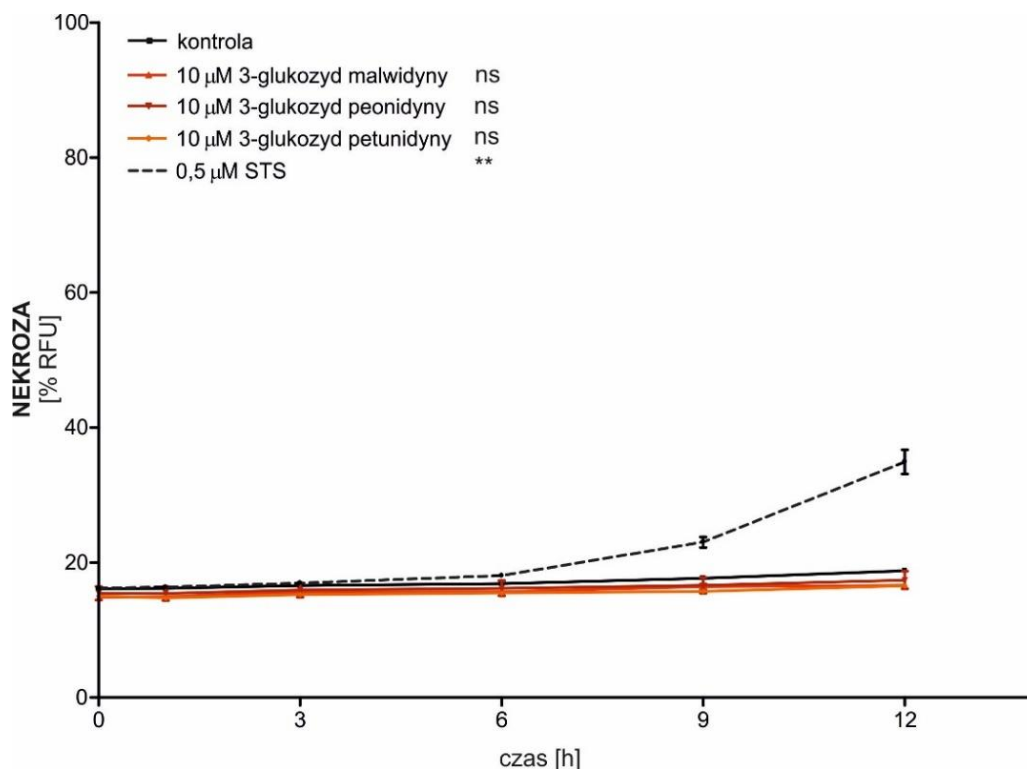


Rycina 58. Wykres przedstawiający apoptozę komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego po inkubacji z antocyjanami, wyrażoną jak zmianę luminescencji w czasie (0, 3, 6, 9, 12 h). Zaprezentowano kontrolę (komórki HBE nietraktowane), 10 μM 3-glukozyd malwidyny, 10 μM 3-glukozyd peonidyny, 10 μM 3-glukozyd petunidyny oraz 0,5 μM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p>0,05$ (ns)).

Otrzymane wyniki sugerują, że badane antocyjany: 10 μM 3-glukozyd malwidyny, 10 μM 3-glukozyd peonidyny oraz 10 μM 3-glukozyd petunidyny nie prowadzą do apoptozy komórek nabłonka oskrzeli, w porównaniu do zastosowanego czynnika proapoptotycznego.

Używając tego samego zestawu, równolegle wykonano pomiary fluorescencji odpowiadające zmianom nekrotycznym. Pomiary wykonywano w takich samych

odstępach czasowych jak w przypadku eksperymentu dotyczącego apoptozy komórki. Jednostka pomiarową w przypadku zmian nekrotycznych była % RFT (względna jednostka fluorescencji, *ang. relative fluorescence units*).

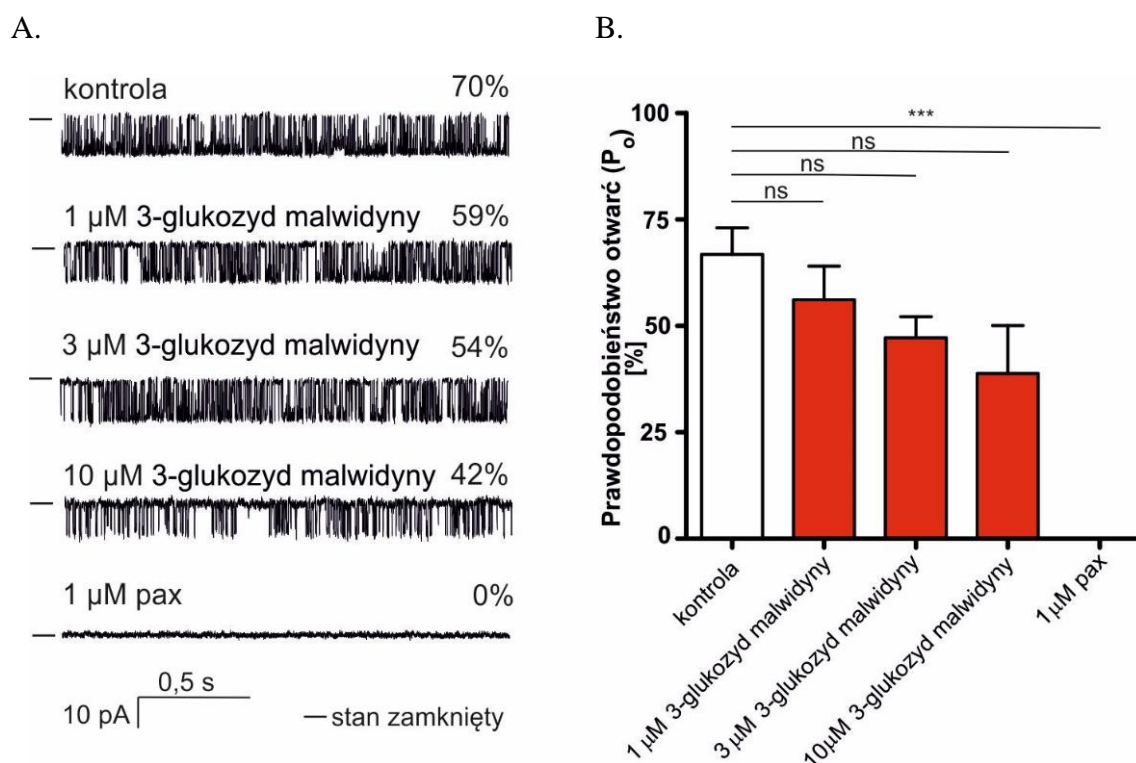


Rycina 59. Analiza wpływu antocyjanów (3-glukozyd malwidyny, 3-glukozyd peonidyny, 3-glukozyd petunidyny) na nekrozę komórek HBE. Przedstawiono kontrolę (komórki HBE nietraktowane), 10 µM 3-glukozyd malwidyny, 10 µM 3-glukozyd peonidyny, 10 µM 3-glukozyd petunidyny oraz 0,5 µM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p>0,05$ (ns)).

Po przeanalizowaniu wyników nie odnotowano istotnych statystycznie zmian prowadzących do nekrozy po inkubacji komórek HBE z 10 µM 3-glukozydem malwidyny, 10 µM 3-glukozydem peonidyny oraz 10 µM 3-glukozydem petunidyny. Poziom nekrozy w komórkach traktowanych antocyjanami jest taki sam jak dla komórek nietraktowanych. Natomiast wykazano, że czynnik proapoptotyczny (0,5 µM STS), po upływie 6 godzin od dodania związku zaczyna indukować również zmiany prowadzące do nekrozy (Rycina 59).

4.6.2.2. Wpływ naturalnie występujących antocyjanów na aktywność kanału mitoBK_{Ca} w komórkach linii HBE

Wykorzystując technikę *patch-clamp* zbadano wpływ antocyjanów na aktywność endogennie występującego mitochondrialnego kanału BK_{Ca}. Eksperymenty przeprowadzono w obecności 1, 3 i 10 μM antocyjanów. W pierwszej kolejności przedstawiono wyniki dotyczące 3-glukozydu-malwidyny. Podczas pomiarów elektrofizjologicznych w warunkach symetrycznych stężeń 150/150mM KCl zaobserwowano nieistotnie statystycznie, zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarć kanału, dla każdego zastosowanego stężenia. Na Rycinie 60 zaprezentowano (A) przykładowe zapisy zmian aktywności kanału w warunkach kontrolnych i po podaniu 3-glukozydu malwidyny oraz (B) analizę prawdopodobieństwa (P_o) kanału mitoBK_{Ca}.

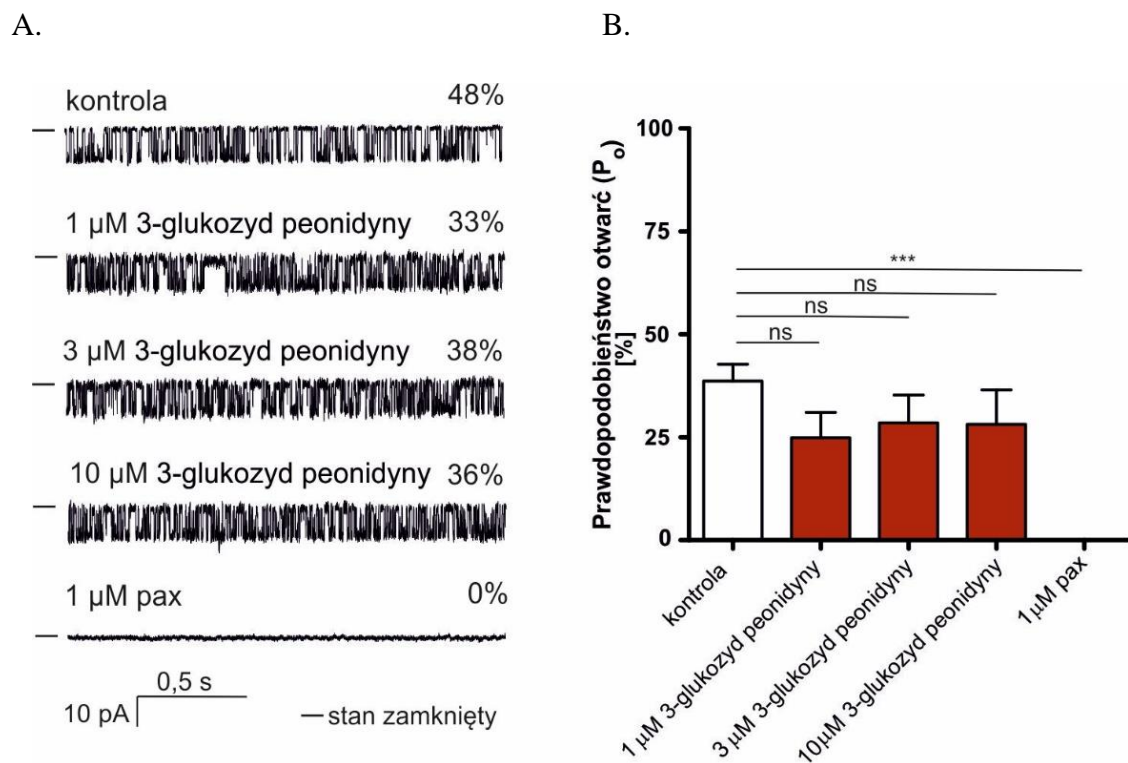


Rycina 60. Wpływ 3-glukozydu malwidyny na aktywność kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych wykonanych w warunkach: kontrolnych (roztwór zawierający 100 μM Ca²⁺), po podaniu 1, 3 i 10 μM 3-glukozydu malwidyny oraz inhibitora kanału – 1 μM paksyli (pax). Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μM 3-glukozydu malwidyny oraz 1 μM paksyli. Metodą analizy

jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli ($p < 0,001$ (***) , $p > 0,05$ (ns)).

Zastosowanie najwyższego stężenie 10 μM 3-glukozydu malwidyny powodowało zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarcia aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ o około 30%. Natomiast 1 μM paksylina indukowała zamknięcie kanału.

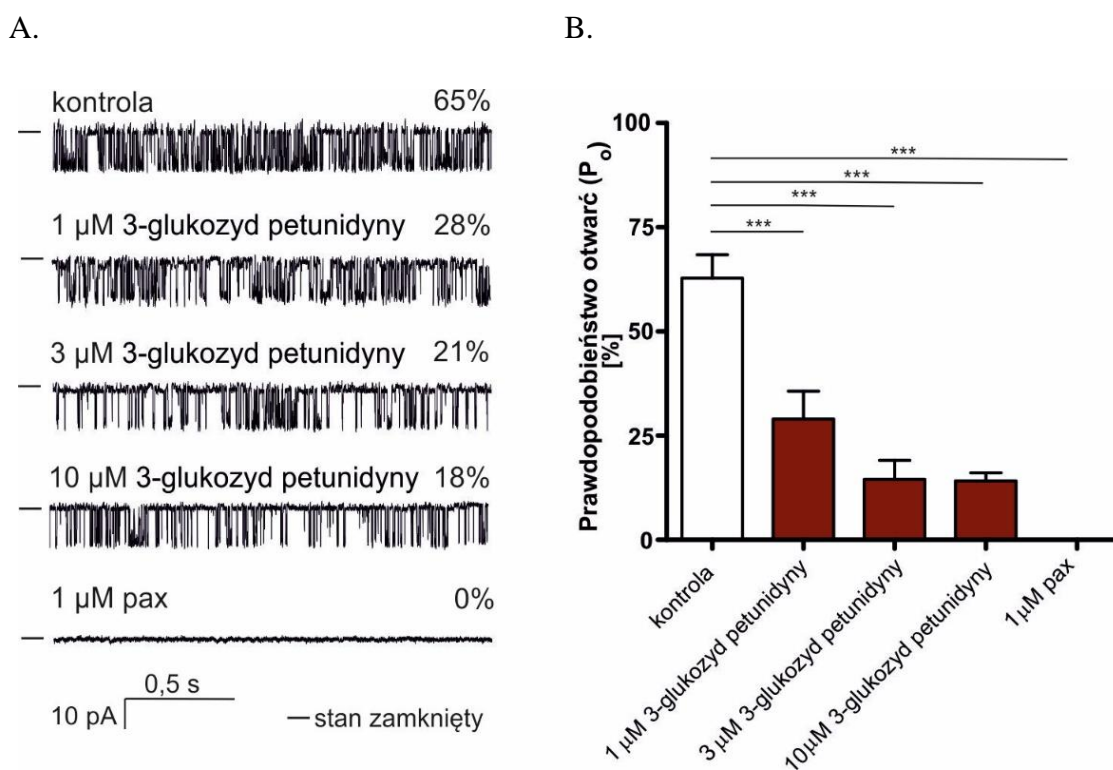
W kolejnym kroku zbadano wpływ tych samych stężeń 3-glukozydy peonidyny na zmiany aktywności kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w komórkach HBE. Zaobserwowano podobny wpływ tego antocyjanu do poprzednio opisanego 3-glukozydu-malwidyny. Po podaniu trzech różnych stężeń 1, 3, i 10 μM 3-glukozydu peonidyny, prawdopodobieństwo otwarcia kanału obniżyło się z około 48% do około 35% przy napięciu -40 mV (Rycina 61). Następnie podanie inhibitora kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, 1 μM paksyliny zmniejszyło P_o do 0%, powodując zamknięcie kanału.



Rycina 61. Wpływ 3-glukozydu peonidyny na aktywność kanału $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ w komórkach HBE. (A) przykładowe rejestracje w warunkach: kontrolnych (roztwór zawierający 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 3 i 10 μM 3-glukozydu peonidyny oraz po dodaniu 1 μM paksyliny (pax). Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarcia kanału

(P_o) przy napięciu -40 mV w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1 , 3 i 10 μM 3-glukozydu peonidyny oraz 1 μM paksyliiny. Istotność statystyczną określono względem kontroli za pomocą metody analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a ($p < 0,001$ (***) , $p > 0,05$ (ns)).

Ostatnim badanym związkiem należącym do antocyjanów był 3-glukozyd petunidyny. Na Rycinie 62 (A) przedstawiono rejestracje aktywności kanału mitoBK_{Ca} w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1 , 3 i 10 μM 3-glukozydu petunidyny oraz 1 μM paksyliiny przy napięciu -40 mV. Natomiast w części (B) zaprezentowano analizę prawdopodobieństwa otwarć kanału po podaniu niskocząsteczkowych związków pochodzenia naturalnego. Zaobserwowano istotne statystyczne zmiany aktywności kanału w komórkach ludzkiego nabłonka oskrzelowego po podaniu 3-glukozydu petunidyny. Prawdopodobieństwo otwarć kanału zmniejszyło się z około 70% w warunkach kontrolnych do około 30% po podaniu 1 μM 3-glukozydu petunidyny. Zaobserwowano również zmniejszenie P_o kanału wprost proporcjonalnie do wzrostu zastosowanego stężenia badanego antocyjan. Podanie 10 μM 3-glukozydu petunidyny zmniejszyło aktywność kanału o około 40% .



Rycina 62. Efekt 3-glukozydu petunidyny na aktywność kanału mitoBK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. (A) przykładowe rejestracje w warunkach: kontrolnych (roztwór z 100 μM Ca^{2+}), podczas podania 1 , 3 i 10 μM 3-glukozydu petunidyny oraz 1 μM paksyliiny (pax).

Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P_o) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 3 i 10 μ M 3-glukozydu petunidyny oraz 1 μ M paksyliny. Istotność statystyczną wyznaczono względem kontroli za pomocą metody analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a ($p < 0,001$ (***)).

Podsumowując badane antocyjany 3-glukozyd malwidyny, 3-glukozyd peonidyny oraz 3-glukozyd petunidyny nie wpływają na przeżywalność komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego. Również badane związki nie wykazują właściwości aktywujących kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE.

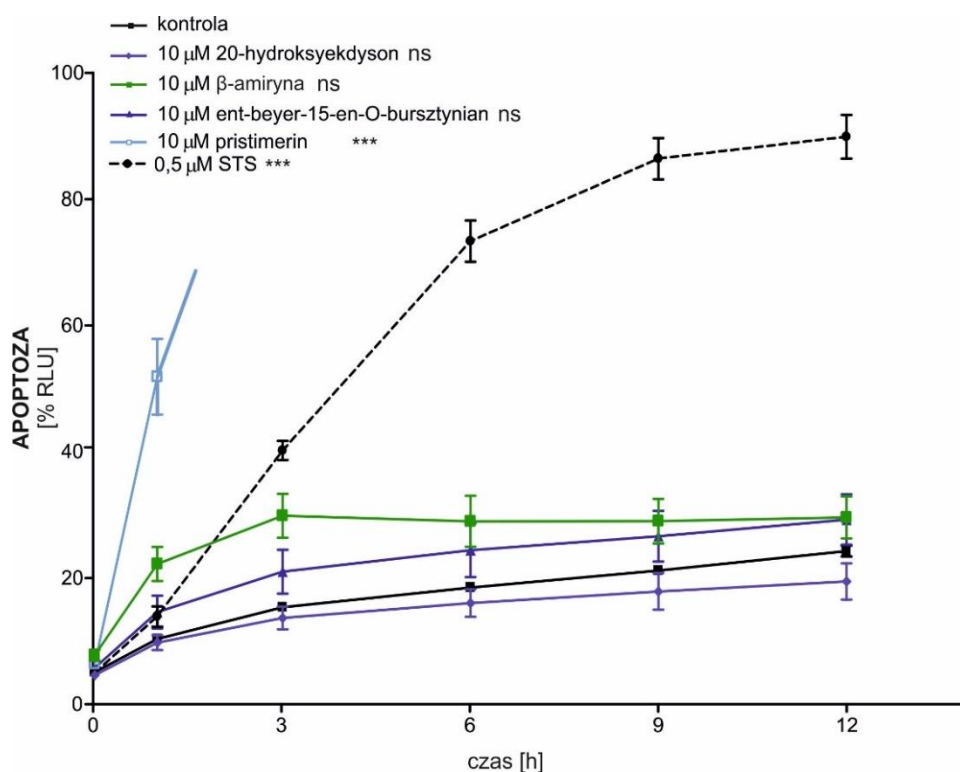
4.6.3. Wpływ związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na izoformę VEDEC kanału mitoBK_{Ca}

Ostatnią badaną grupą związków niskocząsteczkowych były związki o strukturze zbliżonej do paksyliny. Podczas wyboru związków sugerowano się ich podobieństwem do naturalnie występującej paksyliny pod względem struktury oraz grup funkcyjnych. Wyselekcjonowano związki, które podzielono na dwie grupy należące do terpenoidów (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimerina) oraz alkaloidów (chlorowoderek weratryny, homatropina, chlorowoderek semperwiryny, jerwina). Zbadano wpływ 8 związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na aktywność kanału mitoBK_DEC z transfekowanych ludzkich komórek embrionalnych nerki (HEK293-BK_DEC). Izoforma VEDEC kanału mitoBK_{Ca} charakteryzująca się aktywnością kilku kanałów w jednym skrawku błony mitochondrialnej, stała się odpowiednim modelem doświadczalnym do poszukiwania potencjalnych inhibitorów tego kanału.

4.6.3.1. Wpływ terpenoidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na przeżywalność komórek linii HEK293-BK_DEC

Zbadano wpływ następujących terpenoidów: ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimeriny, należących do grupy związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na komórki HEK293-BK_DEC. W tym celu użyto opisany już wcześniej zestaw do pomiaru apoptozy i nekrozy, jako induktora apoptozy

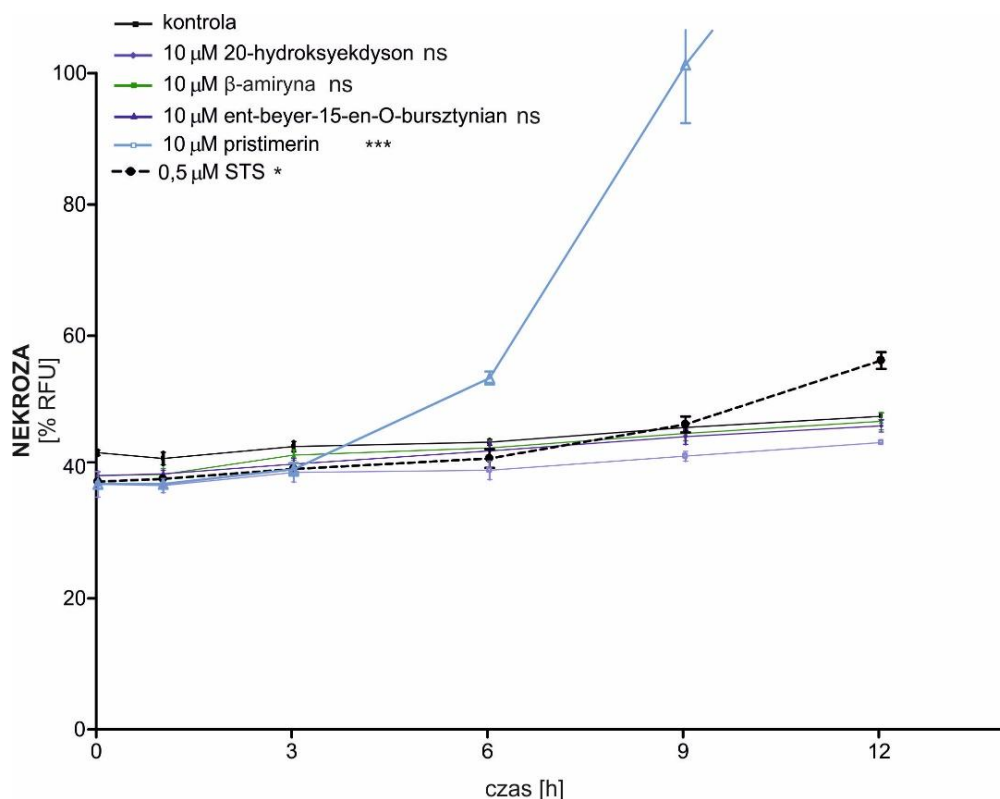
również użyto 0,5 μM staurosporyny (STS) a pomiary wykonywano w tych samych punktach czasowych (0, 3, 6, 9, 12 h). Apoptozę, określano poprzez pomiar luminescencji oraz przedstawiono jako % RLU (względna jednostka luminescencji, *ang. relative luminescence units*). Badane związki o strukturze zbliżonej do paksyliny 10 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 10 μM 20-hydroksyekdyson oraz 10 μM β -amiryne nie wpływały na przeżywalność komórek (Rycina 63). Natomiast 10 μM pristimerina już w pierwszej godzinie po dodaniu do komórek powodowała uszkodzenia, znacząco przewyższając efekt staurosporyny.



Rycina 63. Wykres przedstawiający apoptozę komórek HEK293-BK_DEC po inkubacji z terpenoidami, wyrażoną zmianą luminescencji w czasie (0, 3, 6, 9, 12 h). Zaprezentowano kontrolę (komórki HEK293-BK_DEC nietraktowane), 10 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 10 μM 20-hydroksyekdyson, 10 μM β -amiryne, 10 μM pristimerinę oraz 0,5 μM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, $n=3$, ($p<0,001$ (***), $p>0,05$ (ns)).

W kolejnym etapie doświadczenia określono wpływ związków na nekrozę. Na Rycinie 64 przedstawiono efekt indukcji nekrozy komórek HEK293-BK_DEC przez

10 μM pristimerinę. Toksyczny efekt działania pristimerina spowodował, że po 6 godzinach inkubacji komórki wykazywały zmiany nekrotyczne, związane z uszkodzeniem DNA. Natomiast pozostałe badane terpenoidy 10 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 10 μM 20-hydroksyekdyson oraz 10 μM β -amiryne nie powodowały indukcji nekrozy komórek transfekowanych genem kodującym mitochondrialny kanał BK_{Ca} .

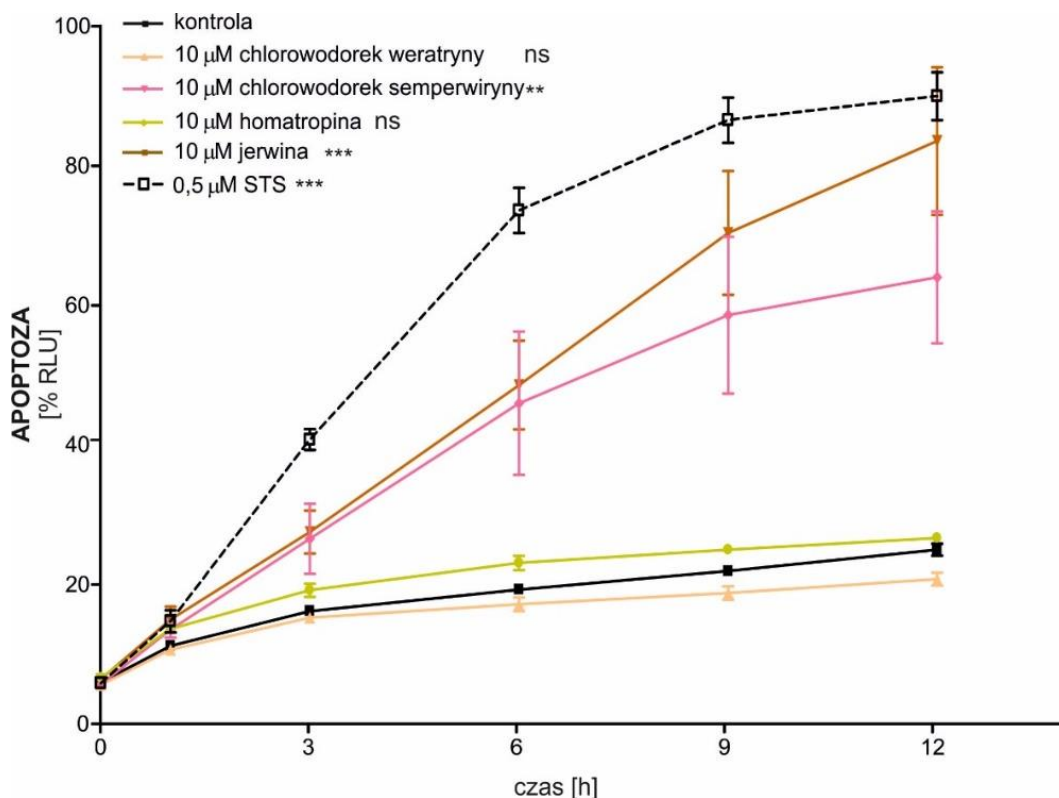


Rycina 64. Zmiany fluorescencji w czasie związane z nekrozą komórek HEK293-BK_DEC po inkubacji z terpenoidami. Przedstawiono kontrole (komórki HEK293-BK_DEC nietraktowane), 10 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 10 μM 20-hydroksyekdyson, 10 μM β -amiryne, 10 μM pristimerinę oraz 0,5 μM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p>0,05$ (ns)).

4.6.3.2. Analiza wpływu alkaloidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na przeżywalność komórek linii HEK293-BK_DEC

Drugą grupą badanych związków należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny były wyselekcjonowane alkaloidy. Określono wpływ czterech alkaloidów:

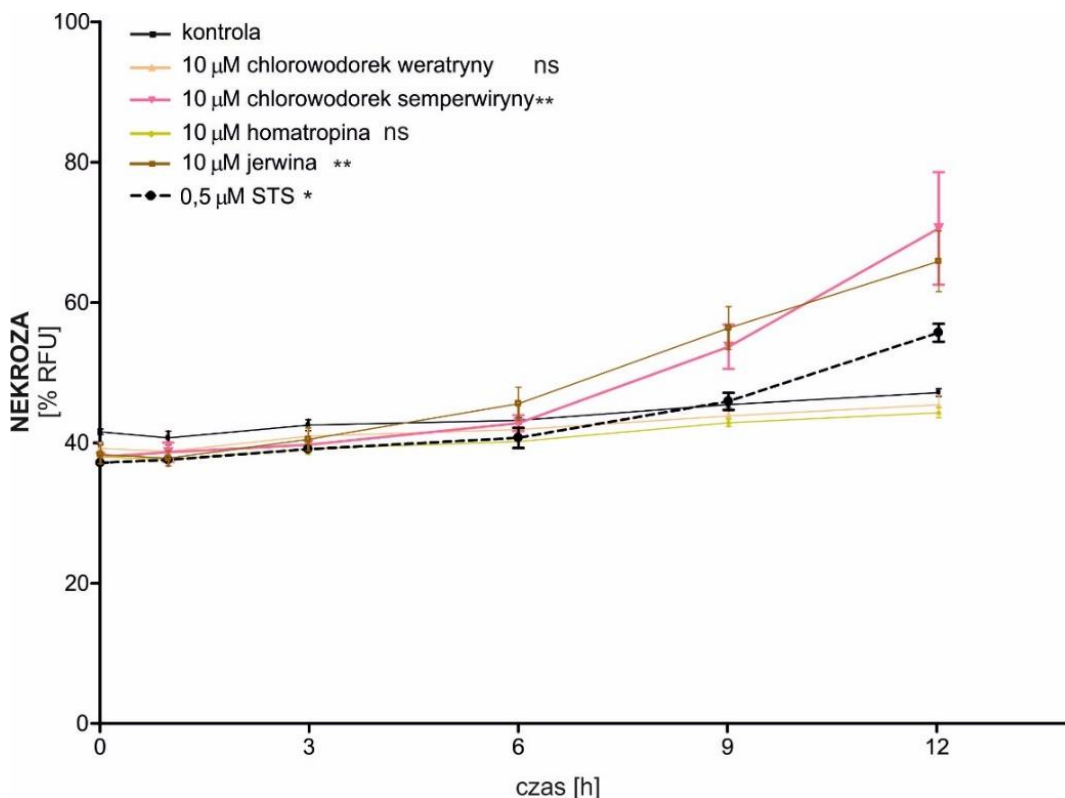
chlorowodoru weratryny, homatropiny, chlorowodoru semperwiryny oraz jerwiny na przeżywalność komórek linii HEK293-BK_DEC. Wykonywano równoległy pomiar luminescencji odpowiadający zmianom apoptotycznym oraz fluorescencji świadczące o procesie nekrozy.



Rycina 65. Zmiany apoptotyczne komórek HEK293-BK_DEC po traktowaniu z alkaloidami o strukturze zbliżonej do paksyliny. Przedstawiono kontrolę (komórki HEK293-BK_DEC nietraktowane), 10 µM chlorowodorek weratryny, 10 µM homatropinę, 10 µM chlorowodorek semperwiryny, 10 µM jerwinę oraz 0,5 µM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, n=3, ($p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**), $p > 0,05$ (ns)).

Wykazano, że dwa alkaloidy 10 µM chlorowodorek semperwiryny i 10 µM jerwina prowadzą do indukcji apoptozy w bardzo podobnym stopniu jak znany induktor apoptozy - 0,5 µM staurosporyna. Natomiast pozostałe dwa badane związki o strukturze zbliżonej do paksyliny: 10 µM chlorowodorek weratryny, 10 µM homatropina, nie wpływały na przeżywalność komórek (Rycina 65).

Badania zmian fluorescencji, potwierdziły toksyczny wpływ 10 μM chlorowodoru semperwiryny i 10 μM jerwiny na komórki HEK293-BK_DEC, efekt przewyższył zmiany wywołane staurosporyną. Zaobserwowano również, że 10 μM chlorowodorek weratryny, 10 μM homatropina nie wykazywały indukcji nekrozy w komórkach transfekowanych (Rycina 66).



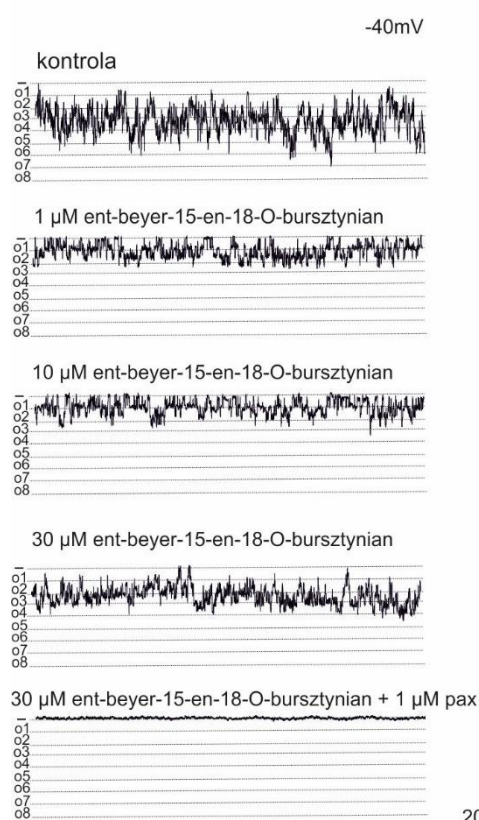
Rycina 66. Wykres prezentujący zmiany nekrotyczne komórek HEK293-BK_DEC po inkubacji z alkaloidami. Przedstawiono kontrolę (komórki HEK293-BK_DEC nietraktowane), 10 μM chlorowodorek weratryny, 10 μM homatropinę, 10 μM chlorowodorek semperwiryny, 10 μM jerwinę oraz 0,5 μM staurosporynę (STS; induktor apoptozy). Analizę statystyczną względem kontroli wykonano z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a, $n=3$, ($p<0,01$ (**), $p>0,05$ (ns)).

Podsumowując wykazano, że nie wszystkie wyselekcjonowane związki o strukturze zbliżonej do paksyliny są bezpieczne dla komórek HEK-293_DEC. Z pośród badanych 8 związków, 3 z nich: pristimerina, chlorowodorek semperwiryny i jerwina wykazywały toksyczny wpływ na komórki, indukując apoptozę i nekrozę. Natomiast 3 terpenoidy entbeyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amirylna oraz 2 alkaloidy 10 μM chlorowodorek weratryny oraz 10 μM homatropina nie wpływały na przeżywalność komórek HEK293-BK_DEC.

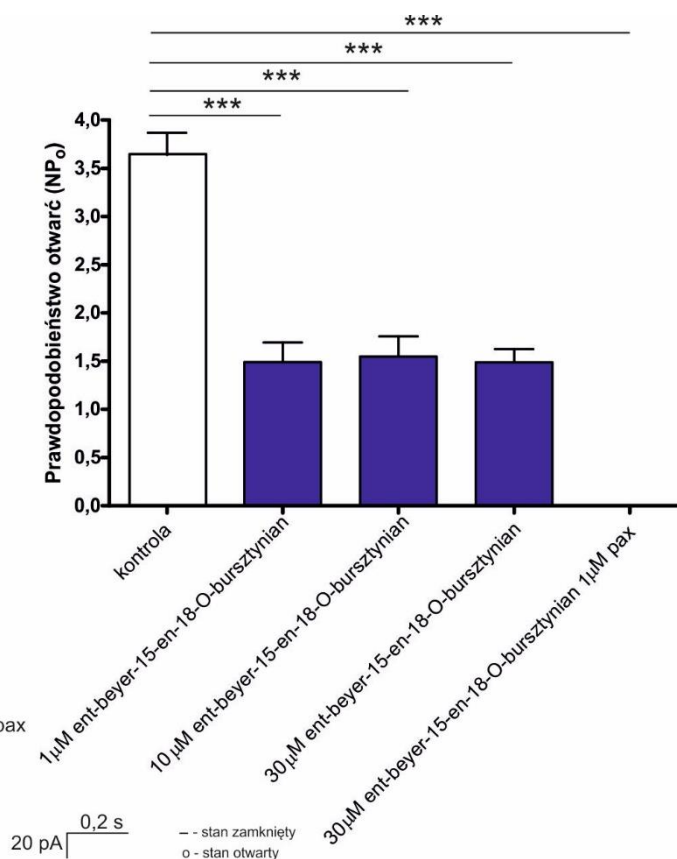
4.6.3.3. Wpływu terpenoidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na aktywność kanału mitoBK_DEC

Wykorzystując technikę *patch-clamp* zbadano wpływ wyselekcjonowanych terpenoidów (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimerina) na aktywność kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. Pierwszym badanym związkiem o strukturze zbliżonej do paksyliny, należącym do terpenoidów był ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian. Podanie tego związku w stężeniach 1, 10 i 30 μM spowodowało taki sam efekt, zmniejszenie aktywności kanału mitoBK_DEC. Prawdopodobieństwo otwarć kanału zmalało o ponad połowę w stosunku do kontroli. Ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian spowodował zamknięcie mitochondrialnych kanałów z 7 do 4 w komórkach HEK293-BK_DEC. Na Rycinie 67 zaprezentowano (A) przykładowe zapisy zmian aktywności kanału w warunkach kontrolnych i po podaniu ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian oraz (B) analizę prawdopodobieństwa (NP_o) kanału mitoBK_DEC.

A.



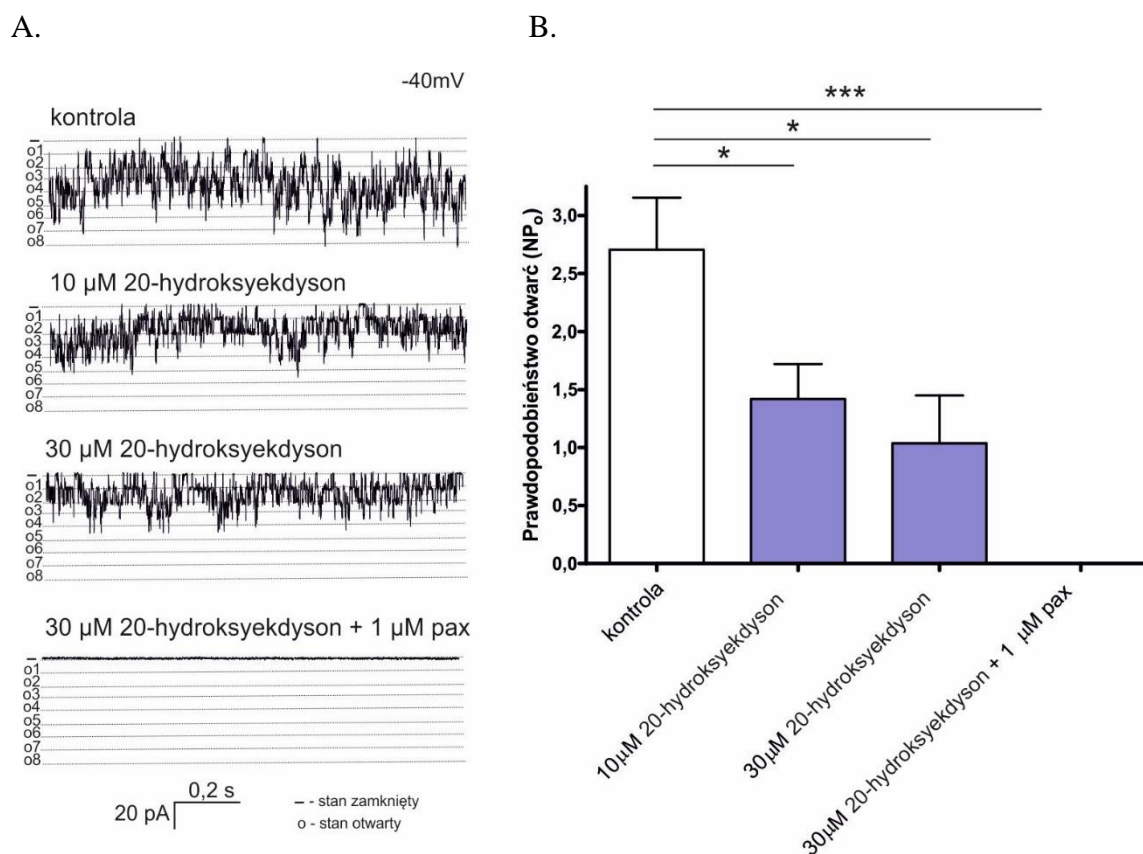
B.



Rycina 67. Regulacja aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC przez ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych

w warunkach: kontrolnych (roztwór z 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 10 i 30 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian oraz dodaniu 1 μM paksyliny z 30 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o , $N=7$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 10 i 30 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, oraz podaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***)).

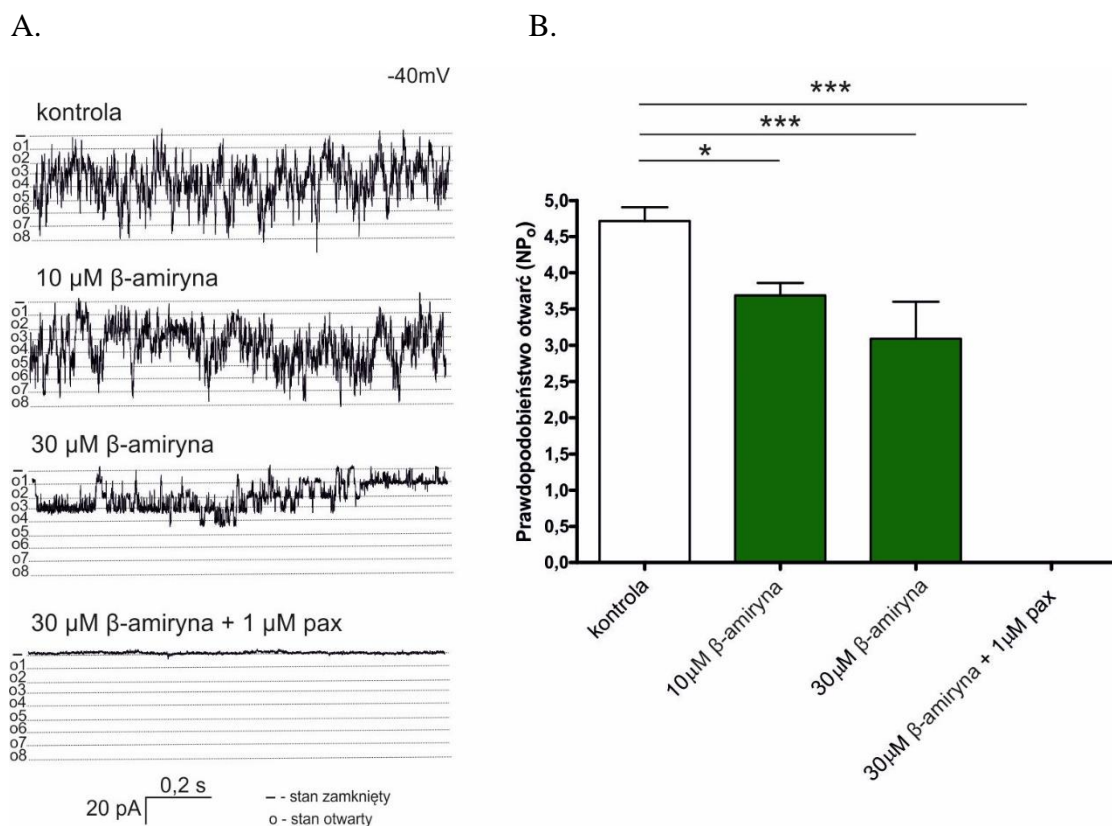
Innym badanym terpenoidem był 20-hydroksyekdyson, którego podanie podczas doświadczeń elektrofizjologicznych spowodowało zmniejszenie ilości otwartych kanałów w badanym skrawku wewnętrznej błony mitochondrialnej. W warunkach kontrolnych (z zawartością m.in. 100 μM Ca^{2+}) zaobserwowano 8 ($N=8$) kanałów mitoBK_DEC w badanym kawałku błony mitochondrialnej, po dodaniu 30 μM 20-hydroksyekdysonu ilość kanałów została zredukowana o połowę ($N=4$). Związek działa hamująco na aktywność mitochondrialnego kanału z komórek HEK293-BK_DEC. Zmiany ilości otwartych kanałów po zastosowaniu 20-hydroksyekdysonu przedstawiono na Rycinie 68.



Rycina 68. Efekt 20-hydroksyekdysonu na zmianę aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (zawierających 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 10 i 30 μM 20-

hydroksyekdysonu oraz podaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM 20-hydroksyekdysonu. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o , $N=8$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 10 i 30 μM 20-hydroksyekdysonu oraz dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM 20-hydroksyekdysonu. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p<0,05$ (*)).

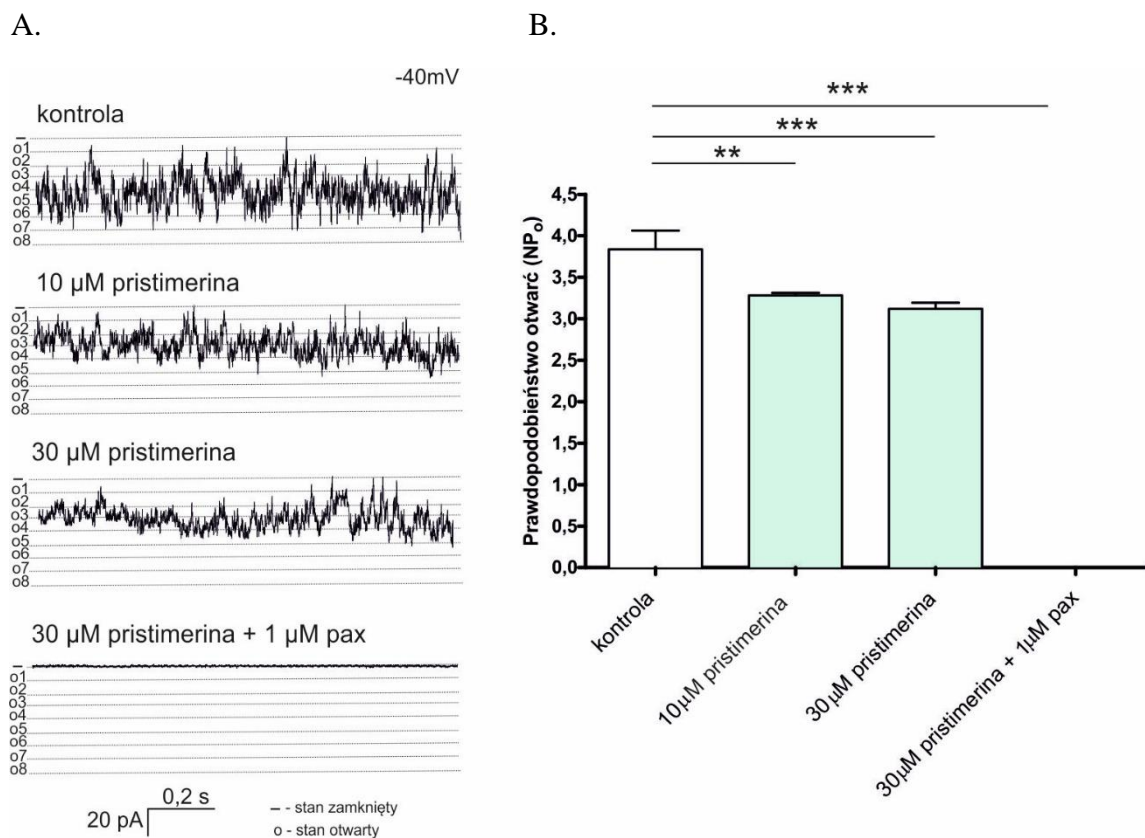
β -amiryna to kolejny badany związek o strukturze podobnej do paksyliny, który nie powoduje całkowitego zamknięcia kanału mitoBK_DEC. Natomiast zaobserwowano, że powoduje zmniejszenie aktywności kanałów znajdujących się w jednym skrawku błony. Wykazano, że β -amiryna zmniejszenie ilość aktywnych kanałów proporcjonalne do dodanego stężenia. Po analizie danych wykazano, że największy hamujący efekt zauważono dla najwyższego badanego stężenia - 30 μM β -amiryny. Na Rycinie 69 przedstawiono zmiany aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC po zastosowaniu β -amiryny, **(A)** przedstawia przykładowe zapisy elektrofizjologiczne, natomiast **(B)** to analiza zmian prawdopodobieństwa otwarć kanałów (NP_o).



Rycina 69. Wpływ β -amiryny na aktywność kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. **(A)** przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (roztwór

z 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 10 i 30 μM β -amiryiny oraz dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM β -amiryiny. Doświadczenia wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o , $N=8$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 10 i 30 μM β -amiryiny oraz dodaniu 1 μM paksyliny z 30 μM β -amiryiny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p<0,05$ (*)).

Ostatnim badanym związkiem należącym do terpenoidów była pristimerina. Wykazano, że związek ten powoduje zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK_DEC. Po podaniu 30 μM pristimeriny ilość otwartych kanałów zmniejszyła się, powodując nieduże zmiany w prawdopodobieństwie otwarć kanałów w badanym skrawku błony (Rycina 70). Całkowite zamknięcie kanału osiągnięto po dodaniu 1 μM paksyliny.

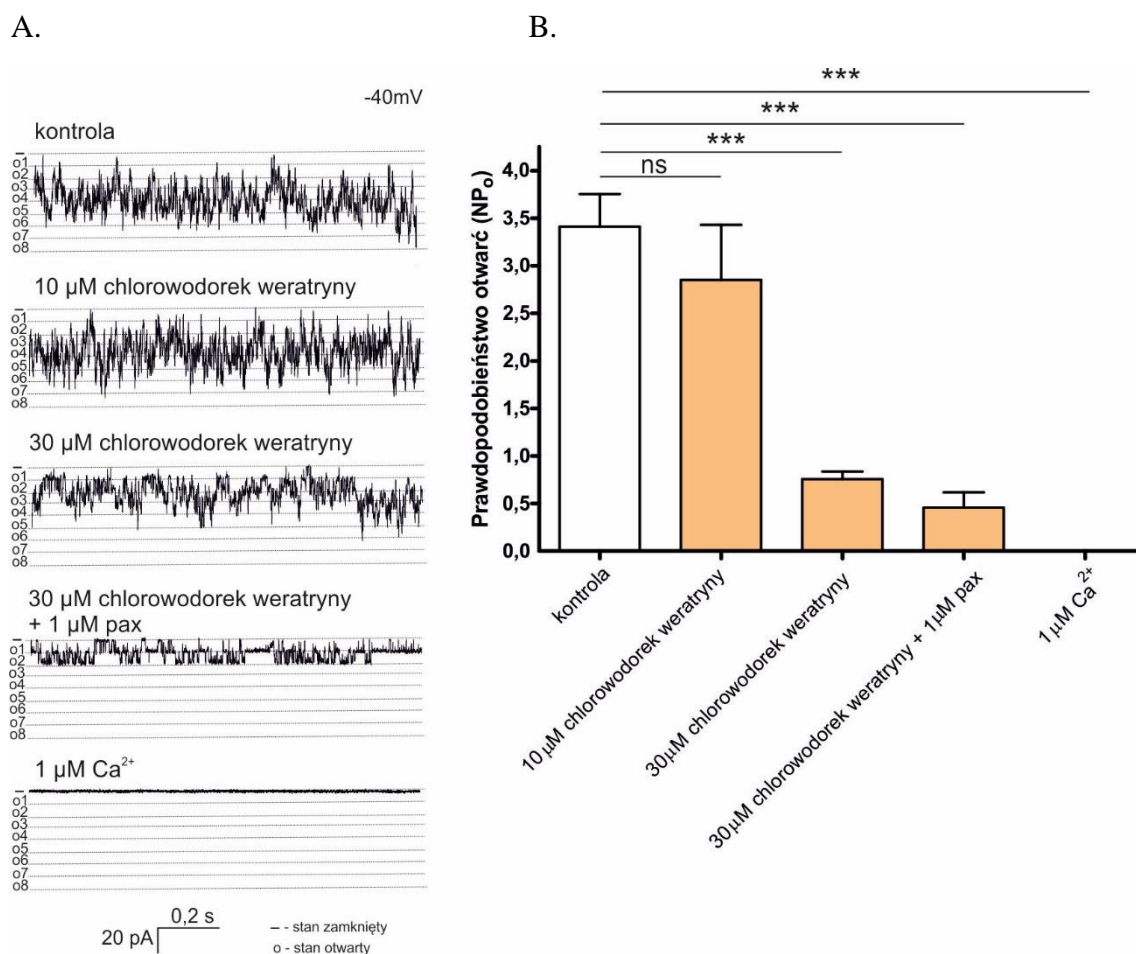


Rycina 70. Efekt pristimeriny na zmianę aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. **(A)** przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (roztwór z 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 10 i 30 μM pristimeriny oraz dodaniu 1 μM paksyliny i 30 μM pristimeriny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza

stany otwarte. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o , $N=8$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 10 i 30 μM pristimeriny oraz dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM pristimeriny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p<0,01$ (**)).

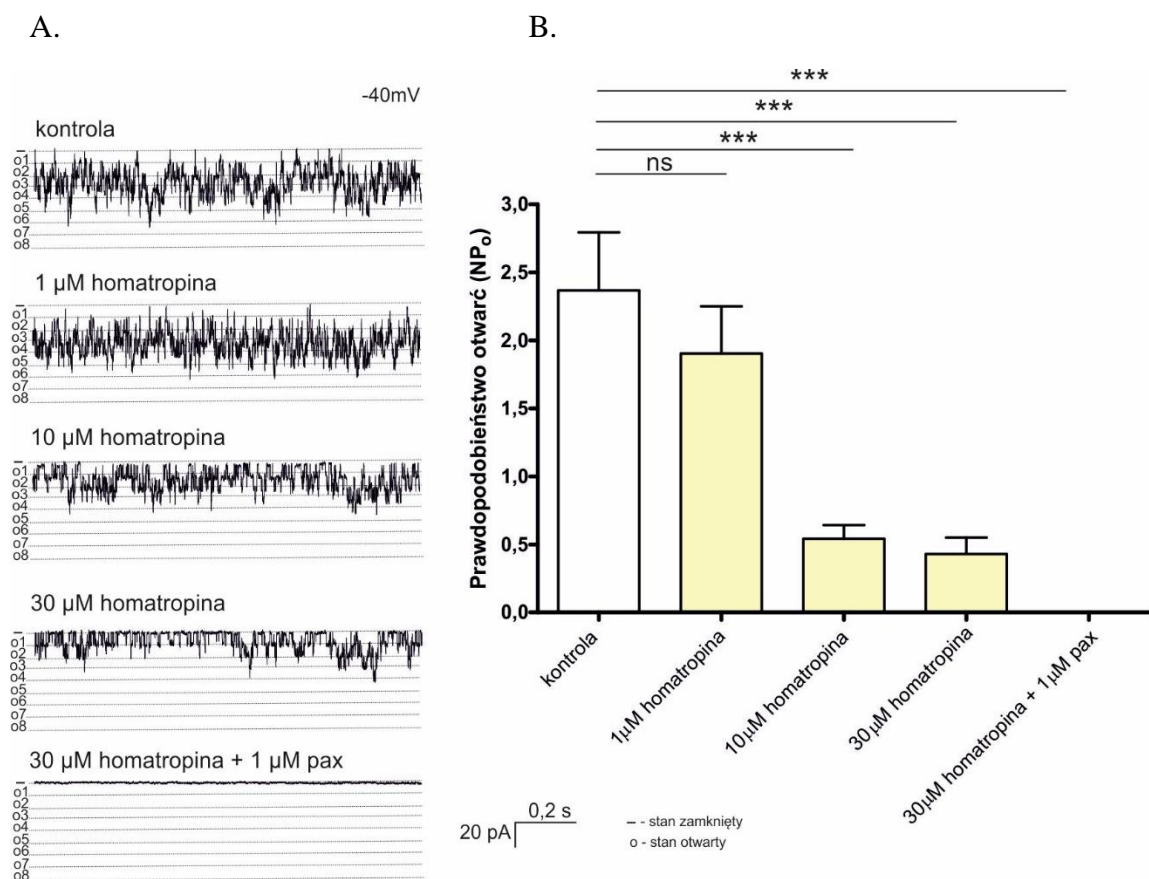
4.6.3.4. Określenie wpływu alkaloidów należących do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na aktywność kanału mitoBK_DEC

Kolejną badaną grupą związków o strukturze zbliżonej do paksyliny były alkaloidy (chlorowodrek weratryny, homatropina, chlorowodrek semperwiryny, jerwina). W pierwszej kolejności przedstawiono wyniki doświadczeń dla chlorowodoru weratryny. Związek ten znacznie hamował aktywność kanału mitoBK_DEC, powodując zmniejszenie ilości otwartych kanałów w badanym skrawku błony, lecz nie powodował całkowitego zahamowania kanału. Dodanie chlorowodoru weratryny wraz z paksyliną nie zahamowało kanału całkowicie. Sugerując tym, że chlorowodrek weratryny uniemożliwiał zadziałaniu inhibitora kanału. Do zamknięcia kanału mitoBK_DEC użyto roztwór z 1 μM Ca^{2+} , który skutecznie zablokował kanał. Na Rycinie 71 przedstawiono zmiany aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC po zastosowaniu chlorowodoru weratryny, (A) przedstawia przykładowe zapisy elektrofizjologiczne, natomiast (B) to analiza zmian prawdopodobieństwa otwarć kanałów (NP_o).



Rycina 71. Wpływ chlorowodoru weratryny na aktywność kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. **(A)** przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (zawierający 100 μM Ca²⁺), podczas obecności 10 i 30 μM chlorowodoru weratryny, po dodaniu 1 μM paksyliny z 30 μM chlorowodoru weratryny oraz dodaniu roztworu z 1 Ca²⁺. Doświadczenia wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o, N=8) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 10 i 30 μM chlorowodoru weratryny, po dodaniu 1 μM paksyliny z 30 μM chlorowodorkiem weratryny oraz dodaniu roztworu z 1 Ca²⁺. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’ a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, n=3, (p<0,001 (***)).

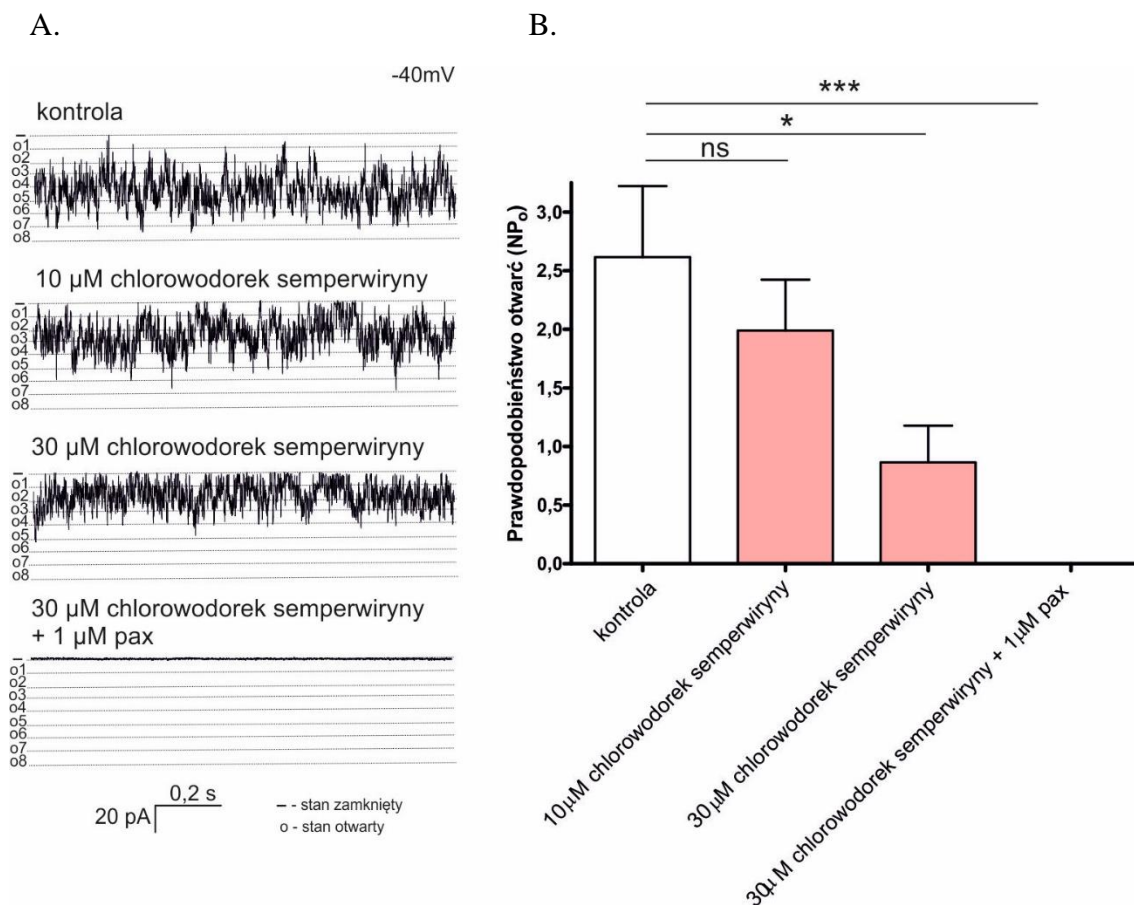
Następny badany związek również powodował zmniejszenie ilości otwartych kanałów mitoBK_DEC. Homatropina w stężeniu 1 μM nieznacznie zmniejszyła aktywność kanału, natomiast wyższe stężenia 10 i 30 μM, wykazały redukcję ilości kanałów w komórkach HEK293-BK_DEC. Najwyższe badane stężenie, nie wykazywało najbardziej hamującego efektu, sugerując, że największy efekt osiągnięto już po dodaniu 10 μM homeotropiny (Rycina 72).



Rycina 72. Regulacja aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC przez homatropinę. **(A)** przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (roztwór z 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 1, 10 i 30 μM homatropiny oraz dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM homatropiny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. **(B)** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o , $N=6$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 1, 10 i 30 μM homatropiny oraz dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM homatropiny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’ a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p<0,001$ (***) , $p>0,05$ (ns)).

Zbadano również wpływ chlorowodoru semperwiryny na aktywność kanału mitoBK_DEC. Wykazano, że związek również powoduje zmniejszenie prawdopodobieństw otwarć kanału w zależności od stężenia. Największy hamujący efekt wykazuje 30 μM chlorowodorek semperwiryny, zmniejszając o ponad połowę prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_DEC w stosunku do kontroli. Kanał został całkowicie zamknięty po dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM chlorowodoru semperwiryny. Rycina 73 przedstawia zmiany aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC po zastosowaniu chlorowodoru semperwiryny, (A) to

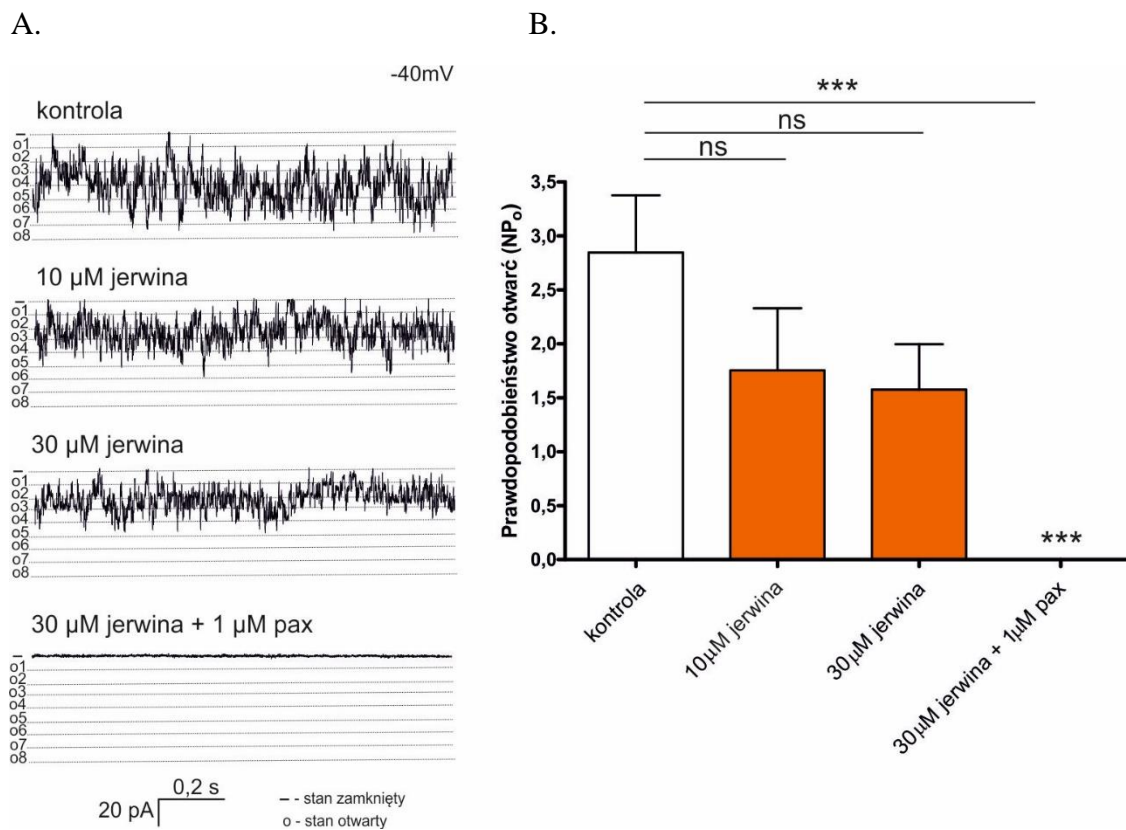
przykładowe zapisy elektrofizjologiczne, natomiast (B) analiza zmian prawdopodobieństwa otwarć kanałów (NP_o).



Rycina 73. Wpływ chlorowodoru semperwiryny na aktywność kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) przykładowe rejestracje elektrofizjologiczne w warunkach: kontrolnych (zawierających $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$), podczas obecności 10 i 30 μM chlorowodoru semperwiryny oraz dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM chlorowodoru semperwiryny. Doświadczenia wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o , $N=7$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 10 i 30 μM chlorowodoru semperwiryny oraz dodaniu 1 μM paksyliny w obecności 30 μM chlorowodoru semperwiryny. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p < 0,001$ (***) , $p < 0,05$ (*), $p > 0,05$ (ns)).

Ostatnim badanym związkiem należącym do związków o strukturze zbliżonej do paksyliny była jerwina. Związek ten również, jak pozostałe nie spowodował, że prawdopodobieństwo otwarć kanału wynosiło 0. W doświadczeniach wykonanych z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* wykazano, że jerwina zmniejszyła nieistotnie statystycznie ilość otwartych kanałów mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC.

Natomiast dodanie 1 μM paksyliny zamknęło kanał, powodując, że transport jonów potasu był niemożliwy (Rycina 74).



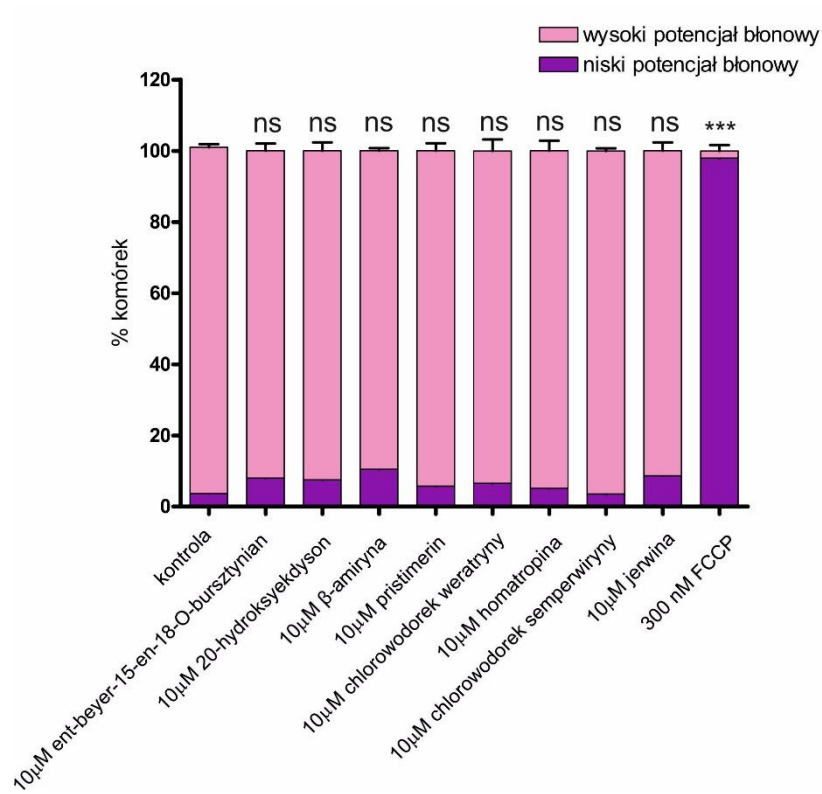
Rycina 74. Efekt jerviny na zmianę aktywności kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC. (A) przykładowe zapisy rejestracji elektrofizjologicznych w warunkach: kontrolnych (roztwór zawierający 100 μM Ca^{2+}), podczas obecności 10 i 30 μM jerviny oraz dodaniu 1 μM paksyliny z 30 μM jerviny. Pomiar wykonywano w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH 7,2, przy potencjale -40 mV; „-” oznacza stan zamknięty, „o1-o8” oznacza stany otwarte. (B) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (NP_o , $N=8$) w warunkach kontrolnych i po dodaniu 10 i 30 μM jerviny oraz dodaniu 1 μM paksyliny z 30 μM jerviną. Metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey’a wyznaczono istotność statystyczną względem kontroli, $n=3$, ($p < 0,001$ (***) , $p > 0,05$ (ns)).

4.6.3.5. Wpływu związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej w komórkach HEK293-BK_DEC

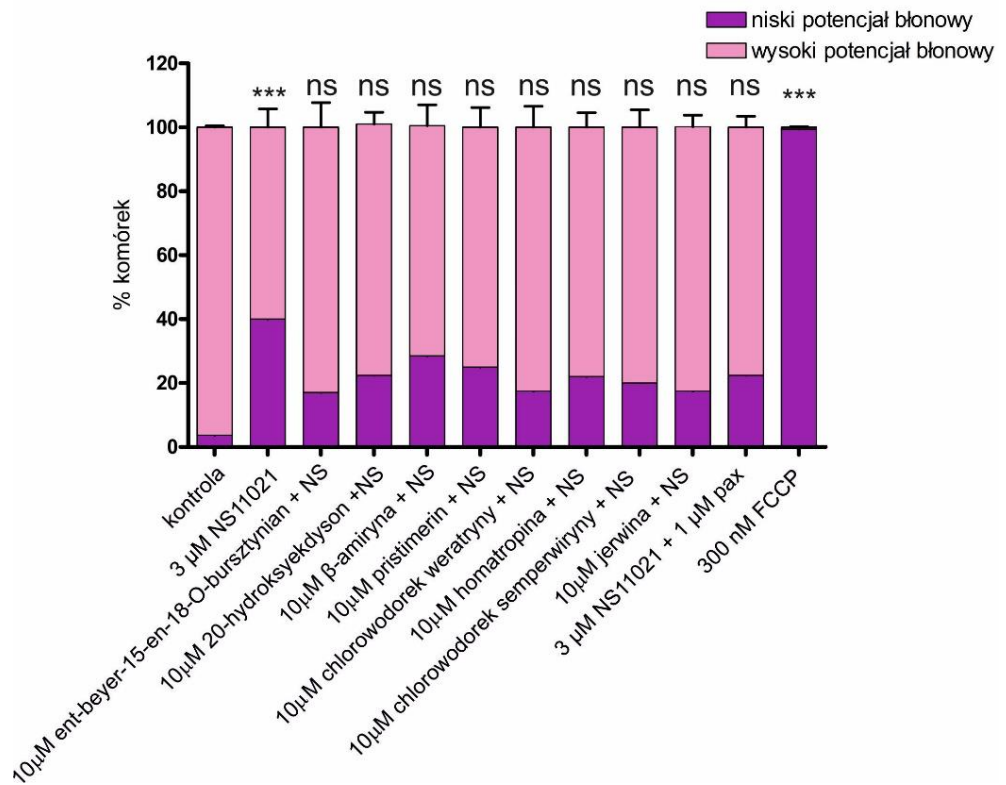
Zbadano również wpływ związków o strukturze podobnej do paksyliny na zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem barwnika (sondy) JC10, selektywnie gromadzącej się

w mitochondriach ze zdolnością do agregacji. Procedura wykonywania eksperymentów została opisana w Rozdziale 3.6. *Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej*. Mitochondrialny kanał potasowy zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej transportując potas do macierzy mitochondrialnej powoduje zmianę potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 75. Zaobserwowano, że kanał mitBK_DEC aktywowany 3 μ M NS11021, powoduje depolaryzację błony mitochondrialnej, zmianę potencjału błony po stronie macierzy na bardziej dodatnią. Spowodowane jest to napływem jonów potasu do macierzy, przez aktywowany kanał. Związki o strukturze zbliżonej do paksyliny nie wykazują depolaryzacji błony (Rycina 75 (A)). Natomiast podczas inkubacji komórek z mieszaniną 3 μ M NS11021 oraz 10 μ M związkami o strukturze podobnej do paksyliny (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimerina, chlorowodorek weratryny, homatropina, chlorowodorek semperwiryny, jerwina), zaobserwowano obniżenie efektu wywołanego NS11021. Efekt ten jest prawdopodobnie związany z zmniejszeniem prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK_DEC w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Rycina 75 (B)). Komórki HEK293-BK_DEC inkubowano również z 300 nM FCCP (rozpręgacz potencjału mitochondrialnego), wykorzystywanego jako kontrola pozytywna dla maksymalnej depolaryzacji mitochondriów.

A.



B.



Rycina 75. Efekt modulatorów kanału mitBK_{Ca} na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wykresy przedstawiają analizę danych otrzymanych z pomiaru potencjału

błony mitochondrialnej za pomocą JC10 z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. **(A)** Komórki HEK293-BK_DEC inkubowano z 10 μM terpenoidów (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimerina), 10 μM alkaloidów (chlorowoderek weratryny, homatropina, chlorowoderek semperwiryny, jerwina) oraz z 300 nM FCCP **(B)** Komórek transfekowane zawierające kanał mitoBK_DEC inkubowano z 3 μM NS11021, 10 μM związkami o strukturze podobnej do paksyliny (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimerina, chlorowoderek weratryny, homatropina, chlorowoderek semperwiryny, jerwina) w obecności 3 μM NS11021, z mieszaniną NS11021 (3 μM) i paksyliny (1 μM) oraz 300 nM FCCP. Kolor różowy oznacza komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym natomiast fioletowy komórki z depolaryzowanymi mitochondriami; n=3. Istotność statystyczną określono z wykorzystaniem testu t-Studenta względem kontroli ($p < 0,0001$, $p < 0,001$ (***) , $p > 0,05$ (ns)).

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia z zastosowaniem związków o strukturze zbliżonej do paksyliny, wykazano, że wśród wybranych związków trzy: pristimerina, chlorowoderek semperwiryny i jerwina wpływają na przeżywalność komórek HEK293-BK_DEC. Ponadto, wyselekcjonowane związki: ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimerina, chlorowoderek weratryny, homatropina, chlorowoderek semperwiryny, jerwina zmniejszają prawdopodobieństwo otwarć (NP_o), kilku kanałów w skrawku wewnętrznej błony mitochondrialnej komórek HEK293-BK_DEC.

5. Dyskusja

Badania przeprowadzane od lat 90-tych potwierdzają obecność kanałów potasowych (mitoK) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dodatkowo opisano zjawisko cytoprotekcji, w którym zaangażowane są białka kanałowe [178]. Właściwości biofizyczne i farmakologiczne kanałów mitoK są bardzo podobne do właściwości kanałów potasowych obecnych w błonie komórkowej. Natomiast funkcje kanałów potasowych wewnętrznej błony mitochondrialnej są ściśle związane z rolą mitochondriów w komórce i wciąż nie są do końca poznane. Liczne badania wykazały, że aktywacja kanałów mitoK przez działanie specyficznych substancji - aktywatorów kanałów potasowych, indukuje procesy ochronne w komórkach, np. w kardiomiocytach [63]. Dokładny mechanizm cytoprotekcji powiązany z mitochondrialnymi kanałami potasowymi nie jest do końca poznany. Istnieją jednak hipotezy próbujące wyjaśnić udział kanałów mitoK w tym procesie. Jedna z hipotez wskazuje na znaczący udział kanałów w tzw. mitochondrialnym cyklu potasowym [40] oraz regulacji syntezy reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach [179]. Ponadto, dane literaturowe wskazują, że również zahamowanie aktywności kanałów mitoK przyczynia się do zmian w funkcjonowaniu komórek, powodując ich śmierć [86]. Opisane wyżej odkrycia zainicjowały poszukiwania mitochondrialnych kanałów potasowych w dotychczas niebadanych tkankach. Poznanie mechanizmów cytoprotekcji i śmierci komórki z udziałem potasowych kanałów mitochondrialnych stało się celem badań wielu laboratoriów [84]. Ważnym wątkiem tych badań jest także poszukiwanie nowych (specyficznych dla mitochondriów) aktywatorów i inhibitorów mitochondrialnych kanałów potasowych, które mogą być zaangażowane we wspomniane powyżej procesy komórkowe.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie podzielono na trzy główne obszary:

- identyfikację i charakterystykę mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} pochodzącego z linii komórkowej HBE oraz kanału mitoBK_DEC z komórek HEK293-BK_DEC,
- badanie wpływu wybranych flawonoidów oraz ich pochodnych na aktywność obu izoform kanału mitoBK_{Ca},

- opisanie regulacji kanału mitoBK_DEC przez związki niskocząsteczkowe o strukturze zbliżonej do paksyliny (inhibitor kanału potasowego).

Przedstawiona poniżej dyskusja otrzymanych wyników została podzielona na odpowiednie części w celu jaśniejszej polemiki z istniejącymi danymi literaturowymi.

5.1. Charakterystyka mitochondrialnych kanałów typu BK_{Ca}

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej wielu różnych komórek, zlokalizowany jest kanał potasowy o dużym przewodnictwie, regulowany jonami Ca²⁺ (mitoBK_{Ca}). Aktywacja kanału mitoBK_{Ca} chroni komórki mózgu podczas udaru [62] oraz komórki mięśnia sercowego w czasie niedotlenienia [180]. Przepływ jonów K⁺ przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, indukuje niewielki spadek potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, który jest powiązany pośrednio z transportem elektronów przez kompleksy łańcucha oddechowego i syntezą ATP. Aktywność kanału mitoBK_{Ca} wydaje się być również ważnym elementem kontroli integralności błon mitochondrialnych wpływając na syntezę RFT przez mitochondria [181, 182].

5.1.1. Endogennie występujący kanał mitoBK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego

Pomimo trwających badań w obszarze mitochondrialnych kanałów potasowych, niewiele wiadomo było na temat transportu potasu przez wewnętrzną błonę mitochondrialną komórek nabłonkowych (HBE). Odkrycie kanału mitoBK_{Ca} w mitochondriach ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego identyfikowało nową lokalizację tkankową tego białka. W niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy w literaturze światowej opisano elektrofizjologiczne i farmakologiczne właściwości endogennie występującego kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE. Badania elektrofizjologiczne z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* pozwoliły zauważyć interesujące właściwości badanego kanału potasowego. Zaobserwowano dwa rodzaje aktywności kanałów potasowych o podobnym przewodnictwie ($286,2 \pm 5,5$ pS i $287,8 \pm 2,8$ pS) ale różniących się prawdopodobieństwem otwarć (P_o), (Rycina 15-16). Z tego powodu w niniejszej rozprawie zdefiniowano dwie populacje kanału mitoBK_{Ca}. Pierwsza

występująca częściej, nazwana została aktywnością kontrolną, natomiast druga populacja, pojawiająca się rzadziej, aktywnością o zwiększonym prawdopodobieństwie otwarć (Rycina 14). Obecność dwóch populacji (kontrolnej i o zwiększonej aktywności) kanału mitoBK_{Ca} opisana została również w kardiomiocytach [99]. Kanały w mitochondriach kardiomiocytów charakteryzowały się zbliżonym przewodnictwem, ich główną różnicą była odmienna wrażliwość na jony wapnia. Zaobserwowane w niniejszej rozprawie populacje kanału mitoBK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego charakteryzują się zmianą aktywności w zależności od zastosowanego napięcia, wykazując wyższe prawdopodobieństwo otwarć przy dodatnich potencjałach. Obie populacje kanału mitoBK_{Ca} są wrażliwe na modulatory kanałów potasowych tzn. na inhibitor paksylinę (Rycina 18), na aktywator kanałów potasowych NS11021 (Rycina 19) oraz jony Ca²⁺ (Rycina 23). Właściwości elektrofizjologiczne obu kanałów o kontrolnej i zwiększonej aktywności z komórek HBE są podobne do kanałów mitoBK_{Ca} w izolowanych mitochondriach ssaków z serca [183], mózgu [62], mięśni szkieletowych [92], śródbłonna [93] oraz fibroblastów skóry [94]. Wrażliwość kanału BK_{Ca} na jony wapnia wynika z obecności domen wiążących jony wapnia, zlokalizowanych na C-końcu podjednostki α białka kanałowego. W strukturze kanału BK_{Ca} znajdują się dwa regiony wrażliwe na zmiany stężeń jonów Ca²⁺, opisywane jako domeny wiążące wapń (RCK1 i RCK2) czyli domeny regulujące przewodnictwo jonów potasu. Domeny te są ważne dla aktywacji kanału BK_{Ca} w fizjologicznych stężeniach jonów Ca²⁺ [184]. Obserwowane zmniejszenie prawdopodobieństw otwarć obu typów kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE, następowało w niskich stężeniach jonów wapnia. Zmiana ta jest charakterystyczną właściwością kanału mitoBK_{Ca} i została opisana wcześniej w podobnych kanałach potasowych pochodzących z fibroblastów [94] oraz śródbłonna [93]. Zaobserwowano również aktywację obu populacji kanałów przez specyficzny aktywator kanału BK_{Ca} NS11021 [185]. Zwiększenie prawdopodobieństw otwarć kanału o kontrolnej aktywności było dużo większe w porównaniu do drugiej aktywności kanału mitoBK_{Ca} (Rycina 15). W warunkach kontrolnych P_o kanału o zwiększonej aktywności jest wysokie (około 80%), dlatego aktywacja przez NS11021 była nieznaczna i spowodowała niewielką zmianę aktywności (P_o około 97%, przy -40 mV, po potraktowaniu 5 μ M NS11021). Dane literaturowe sugerują, że aktywacja kanału BK_{Ca} przez NS11021 jest możliwa poprzez stabilizację stanu otwartego przez domenę bramkującą (PGD) [186]. Zatem możliwe jest, że domena PGD odpowiada za trwale wyższą aktywność kanału mitoBK_{Ca} o zwiększonej aktywności. Natomiast zastosowanie innego aktywatora kanału

potasowego NS1619, nie powodowało zwiększania P_o w obu populacjach. O ile różnice w wyjściowej aktywności badanego białka kanałowego mogą wynikać, np. z różnego stopnia utlenienia białka lub jego fosforylacji to brak efektu aktywatora NS1619 może mieć inne przyczyny. Efekt ten, może być powiązany ze składem molekularnym kompleksu białek tworzących kanał, które różnią się w zależności od lokalizacji kanału w różnych tkankach. Różnice mogą wynikać, np. z innego składu podjednostek regulatorowych β kanału mitoBK_{Ca}.

Związki będące specyficznymi inhibitorami kanałów potasowych również są kluczowe w identyfikacji badanych kanałów mitochondrialnych. Obserwacje z wykorzystaniem określonych inhibitorów kanałów potasowych pozwalają jednoznacznie przypisać mierzoną aktywność do określonej klasy kanałów. Na przykład hamowanie kanału potasowego przez kwas 5-hydroksydekanowy może wskazywać na obecność kanału regulowanego przez ATP [187]. Do doświadczeń służących charakterystyce obu populacji (kontrolnej i o zwiększonej aktywności) kanałów mitoBK_{Ca} wykorzystano paksylinę – klasyczny inhibitor kanałów potasowych o dużym przewodnictwie [188]. Zaobserwowano, że oba typy kanałów były hamowane po zastosowaniu paksyliny (Rycina 18). Innym inhibitorem kanału potasowego o dużym przewodnictwie jest peptyd, iberiotoksyna [176]. Wykazano, że związek ten posiada wysokie powinowactwo do kanału BK_{Ca} z błony komórkowej wiążąc się z białkiem kanałowym od strony zewnątrzkomórkowej. Następstwem czego jest zahamowanie aktywności kanału BK_{Ca} w błonie komórkowej [176]. Podczas przeprowadzonych badań w czasie realizacji rozprawy doktorskiej, zaobserwowano, że iberiotoksyna podana od strony przestrzeni międzybłonowej, spowodowała również zamknięcie mitochondrialnego kanału BK_{Ca} (o tzw. kontrolnej aktywności) w komórkach nabłonka oskrzelowego (Rycina 22). Natomiast zastosowanie iberiotoksyny w przeciwnej orientacji tzn. od strony macierzy mitochondrialnej, powodowała nieznaczne zmiany P_o kanału (Rycina 21). Uzyskany wynik sugeruje określoną topologię kanału mitoBK_{Ca} w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a dokładnie lokalizację C-końca białka kanałowego w macierzy mitochondrialnej. Ta obserwacja potwierdza również miejsce regulatorowe dla jonów wapnia znajdujące się od strony macierzy mitochondrialnej. Taka topologia wydaje się tłumaczyć regulację kanału mitochondrialnego przez mikromolowe stężenia jonów wapnia. Interesujące, że zaobserwowano również nieznaczne zmniejszenie P_o kanału po dodaniu inhibitora od strony macierzy mitochondrialnej, efekt

ten opisano już wcześniej w innych komórkach, astrocytomy [189]. Prawdopodobnie oznacza to, że toksyna będąca peptydem, może do pewnego stopnia dyfundować przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Nie można także wykluczyć, że obserwowano alternatywny (w stosunku do kanału z błony plazmatycznej) mechanizm interakcji z kanałem mitoBK_{Ca}. Ponadto odnotowano również, że inne kanały potasowe typu ROMK i mitoSK_{Ca} są hamowane przez inhibitory peptydowe zastosowane w przeciwnej orientacji niż dotychczas przypuszczano [190, 191]. Innym mechanizmem działania inhibitorów będących peptydami jest interakcja reszt aminokwasowych z jonami potasu, ta hipoteza wymaga jednak dalszych badań [192]. Reasumując, w rozprawie doktorskiej opisano właściwości biofizyczne i farmakologiczne aktywności mitochondrialnego kanału, tym samym potwierdzono identyfikację kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanym jonami Ca²⁺ w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek HBE.

Dodatkowo analizowano skład białkowy podjednostek mitochondrialnego kanału BK_{Ca}, który może różnić się w zależności od rodzaju badanych komórek [193]. Kanał BK_{Ca} tworzą cztery podjednostki α formujące por kanału, które są kodowane przez gen *Slo1*[194]. Alternatywne składanie produktu genu *Slo1* oraz obecność podjednostek pomocniczych β powoduje powstawanie „różnorodności” funkcjonalnej kanału BK_{Ca} [195]. Występują cztery podjednostki β ($\beta 1-4$), ich ekspresja jest specyficzna dla danej tkanki, modyfikując właściwości bramkowania kanału BK_{Ca} oraz zwiększając jego wrażliwość na jony Ca²⁺ [196]. W niniejszej pracy zidentyfikowano produkty ekspresji mRNA podjednostek α , $\beta 3$ i $\beta 4$ kanału BK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego (HBE) (Rycina 24). Wyniki zostały potwierdzone za pomocą techniki immunodetekcji białek, podjednostek kanału BK_{Ca} w frakcji mitochondrialnej i homogenacie komórek HBE (Rycina 25). Występowanie podjednostki pomocniczej $\beta 1$ stwierdzono w kanale mitoBK_{Ca} w sercu [99], natomiast obecność podjednostki $\beta 3$ zaobserwowano w ludzkich fibroblastach skórnych [94]. Jak przedstawiono powyżej, analiza doświadczeń elektrofizjologicznych potwierdziła obecność dwóch populacji kanału mitoBK_{Ca} (kontrolna i o zwiększonej aktywności) w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. Zatem występowanie dwóch populacji kanału, może mieć ścisły związek z obecnością dwóch różnych podjednostek pomocniczych $\beta 3$ i $\beta 4$ kanału BK_{Ca}. Wrażliwość kanału na iberiotoksynę jest powiązana z występowaniem podjednostki $\beta 3$ w mitochondriach komórek HBE. Wykazano, że obecność podjednostki $\beta 4$ w kanale

BK_{Ca} z błony komórkowej neuronów, powoduje, że iberiotoksyna nie wpływa na zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarcia kanału [197]. Na tej podstawie można przypuszczać, że kanał o kontrolnej aktywności, który jest wrażliwy na iberiotoksynę zawiera podjednostkę β_3 , natomiast kanał o zwiększonej aktywności - podjednostkę β_4 .

Aktywność mitochondrialnego kanału potasowego umożliwia transport jonów potasu do macierzy mitochondrialnej, wpływając na funkcję mitochondriów przez zmianę polaryzacji błony [93, 94]. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki doświadczeń wpływu aktywatora kanału BK_{Ca} NS11021 na zmianę potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej $\Delta\Psi_m$ oraz oddychanie komórkowe. W zakresie mikromolowych stężeń NS11021 wpływał na proces oddychania mitochondriów, poprzez przyspieszenie zużycia tlenu (Rycina 27). Natomiast zaobserwowano, że w obecności inhibitora kanału mitoBK_{Ca}, paksyliny, efekt ten został zmniejszony. Otrzymany wynik koreluje z danymi uzyskanymi z wykorzystaniem komórek śródbłonka oraz dwóch aktywatorów kanałów BK_{Ca} NS1619 i NS11021 [93]. NS11021 w mikromolowych stężeniach nie tylko zwiększa zużycie tlenu, ale również indukuje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej w sposób zależny od stężenia. Wykazano, że efekt ten był częściowo odwracany przez działanie inhibitora kanału mitoBK_{Ca} - paksylinę (Rycina 26). Ponadto dane literaturowe wskazują, że aktywatory kanału mitoBK_{Ca}, zarówno syntetyczne (NS1619 i NS11021) jak i pozyskane z roślin (np. flawonoid - naringenina), zwiększają oddychanie komórkowe oraz powodują depolaryzację $\Delta\Psi_m$ mitochondriów w różnych tkankach, np. mięśniach szkieletowych [92], mózgu [110], śródbłonku [93] oraz fibroblastach skóry [94]. Obserwacje te oznaczają, że aktywacja kanału potasowego prowadzi do napływu jonów potasu do macierzy mitochondrialnej, przyspieszając oddychanie i powodując depolaryzację mitochondriów. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej potwierdzają hipotezę, że aktywacja mitochondrialnego kanału BK_{Ca} powoduje zwiększony transport jonów K⁺ i indukuje depolaryzację mitochondriów $\Delta\Psi_m$ [48]. Dodatkowo, aktywacja kanału mitoBK_{Ca} pośrednio reguluje syntezę reaktywnych form tlenu w mitochondriach [62], istnieje prawdopodobieństwo, że właściwości te są istotne dla ochrony komórek podczas uszkodzenia indukowanego RFT.

5.1.2. Egzogenna izoforma VEDEC kanału mitoBK_DEC w otrzymanej linii komórkowej HEK293-BK_DEC

Trwające od wielu lat badania kanałów mitochondrialnych wciąż nie przyniosły odpowiedzi na szczegółowe pytania dotyczące struktury oraz funkcji mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca^{2+} (mitoBK_{Ca}). W literaturze opisano występowanie specyficznej izoformy VEDEC kanału BK_{Ca} zlokalizowanej w mitochondriach kardiomiocytów [102]. Natomiast nie wykazano eksperymentalnie aby białko we wspomnianych komórkach, tworzyło aktywny kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dopiero badania (z wykorzystaniem techniki *patch-clamp*) przeprowadzone w Laboratorium Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych wykazały, że przejściowa transfekcja komórek HEK293T, plazmidem zawierającym gen kodujący izoformę VEDEC kanału BK_{Ca}, tworzy aktywny kanał [172]. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki dotyczące charakterystyki elektrofizjologicznej i farmakologicznej kanału mitoBK_DEC z nowo otrzymanej linii komórkowej HEK293-BK_DEC, z tzw. stabilną ekspresją badanego białka kanałowego.

Wykorzystując technikę *patch-clamp* zmierzono aktywność kanału potasowego, zależnego od napięcia, którego przewodnictwo wynosiło $288,9 \pm 4,2$ pS (Rycina 28). Obliczone przewodnictwo izoformy VEDEC kanału po transfekcji jest podobne do opisywanych wcześniej przewodności obu populacji kanałów mitoBK_{Ca} w komórkach HBE. W przejściowo transfekowanych komórkach HEK293T plazmidem zawierającym VEDEC izoformę kanału BK_{Ca}, przewodnictwo kanału mitochondrialnego wynosiło 290 ± 3 pS [172]. Zbliżoną wartość przewodnictwa odnotowano również dla kanału BK_{Ca} w błonie plazmatycznej (~ 250 pS) transfekowanych komórek HEK293 [198]. Zaobserwowano również, że prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_DEC jest zależne od przyłożonego napięcia (Rycina 29) w sposób charakterystyczny dla kanału BK_{Ca}. Wykazano, że wraz ze wzrostem przyłożonego napięcia, prawdopodobieństwo otwarć kilku kanałów w badanym skrawku błony mitochondrialnej (NP_o) rośnie. Mitochondrialny kanał BK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC charakteryzuje się aktywnością kilku kanałów, w skrawku błony analizowanym techniką *patch-clamp*. Wykazano, że mierzone kanały miały taką samą amplitudę. Prawdopodobnie świadczy to o bardzo wydanej ekspresji białka kanałowego w mitochondriach, po przeprowadzonej transfekcji. Podobne zjawisko opisano dla kanału VDAC z zewnętrznej błony

mitochondrialnej, wykorzystując technikę *patch-clamp* mitochondriów drożdży *Sacharomyces cerevisiae* [199].

Właściwości farmakologiczne kanału mitoBK_DEC również świadczą o przynależności tego kanału do określonej klasy kanałów potasowych. Zaobserwowano, że aktywność kilku kanałów w badanym skrawku błony jest zależna od obecności jonów wapnia, prawdopodobieństwo otwarć (NP_o), zmniejsza się wraz z obniżeniem stężenia jonów Ca^{2+} (Rycina 30). Obserwacja ta wskazuje na obecność kluczowej dla kanału BK_{Ca} , domeny wiążącej wapń (RCK). Powyżej podczas omawiania wyników uzyskanych dla endogennie występującego kanału mito BK_{Ca} w komórkach HBE, opisano zależność domen RCK od jonów Ca^{2+} . Wykazano również wrażliwość kanału mitoBK_DEC na modulatory kanałów potasowych, paksylinę (inhibitor) oraz NS11021 (aktywator). Zarówno aktywność pojedynczego kanału jak i kilku kanałów mitoBK_DEC były hamowane przez 1 μ M paksylinę (Rycina 31). Natomiast zastosowanie aktywatora, NS11021 w zakresie stężeń mikromolowych, indukowało wzrost płynącego prądu jonowego (Rycina 32). Z wcześniejszych doniesień wiadomo, że w transfekowanych komórkach HEK293, aktywator NS11021 stymulował kanał BK_{Ca} obecny w błonie komórkowej [185].

Powyższe dane potwierdzają hipotezę, że w linii komórkowej otrzymanej w wyniku transfekcji plazmidem zawierającym gen kodujący mitochondrialną VEDEC izoformę kanału BK_{Ca} , występuje funkcjonalny kanał mitoBK_DEC w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Doświadczenia z wykorzystaniem technik biologii molekularnej również potwierdziły obecność genu kodującego izoformę VEDEC kanału w komórkach HEK293-BK_DEC w porównaniu do komórek nietransfekowanych (Rycina 34). Zaobserwowano, że badania z wykorzystaniem techniki Western blot, dotyczące obecności białka kanałowego wykazały, że ekspresja genu izoformy VEDEC skutkuje pojawieniem się podjednostki α w komórkach (Rycina 35). Izoforma VEDEC opisywana jest jako izoforma kanału BK_{Ca} , który lokalizuje się w mitochondriach. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły, że jednak nie jest to jedyne miejsce lokalizacji tego białka w komórce. Barwienia immunofluorescencyjne i wykorzystanie mikroskopii konfokalnej ujawniły również obecność podjednostki α w błonie komórkowej oraz siateczce śródplazmatycznej (Rycina 33). Wyniki te sugerują, że produkt genu kodujący izoformę VEDEC lokalizuje się w różnych przedziałach komórkowych i prawdopodobnie nie jest specyficzny tylko dla wewnętrznej błony mitochondrialnej jak sądzono dotychczas.

Wykorzystany system ekspresji białka kanałowego może prowadzić także do nadmiernej jego akumulacji w komórce, co może sprzyjać segregowaniu białka do różnych przedziałów komórkowych. Stąd może wynikać, „złożona” lokalizacja badanego białka kanałowego w komórce.

Badania pomiaru szybkości oddychania za pomocą oksygrafu również potwierdziły hipotezę, iż obecność kanałów potasowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wpływa na ten proces. Zaobserwowano, że komórki wykazujące obecność kanału mitoBK_DEC szybciej zużywają tlen w porównaniu do komórek nietransfekowanych (Rycina 36 i 37). Wyniki te korelują z wyżej przedstawionymi obserwacjami dotyczącymi kanału mitoBK_{Ca} w komórkach ludzkiego nabłonka oskrzelowego. Zarówno obecność endogennego jak i egzogenego kanału mitoBK_{Ca} przyspiesza zużycie tlenu przez mitochondria. Wynika to z depolaryzacji potencjału mitochondrialnego co sprawia, że łańcuch oddechowy zwiększa swoją aktywność w celu „skompensowania” depolaryzacji. Również dodanie aktywatora kanału NS11021 powoduje zwiększenie szybkości oddychania komórek HEK293-BK_DEC (Rycina 38). Efekt ten koreluje z danymi pozyskanymi z różnych tkanek i komórek, opisywanymi w literaturze [92-94, 110].

Wszystkie powyższe doniesienia wskazują, że komórki HEK293 mogą być odpowiednim i przydatnym modelem eksperymentalnym do ekspresji i pomiarów elektrofizjologicznych (techniką *patch-clamp*) mitochondrialnych kanałów potasowych. Przeprowadzone doświadczenia za pomocą techniki *patch-clamp* potwierdzają hipotezę, że komórki HEK293 nie wykazują obecności kanałów potasowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Dlatego też stały się idealnym modelem do wprowadzenia genu kodującego izoformę VEDEC kanału BK_{Ca}. Ponadto komórki te są powszechnie wykorzystanym modelem w badaniach aktywności kanału BK_{Ca} w błonie plazmatycznej [200-202]. Wcześniejsze badania sugerowały, że w komórkach HEK293 nie występuje podjednostka tworząca por kanału BK_{Ca} [203]. Z drugiej strony, niedawno przeprowadzone doświadczenia wykazały natywną ekspresję genu kodującego prawdopodobnie podjednostkę α kanału BK_{Ca} w komórkach HEK293 [204]. Ponadto badania elektrofizjologiczne dowiodły istnieniu prądów w błonie plazmatycznej, które mogą odpowiadać aktywności kanału BK_{Ca}. Doniesienia te korelują z otrzymanym wynikiem w niniejszej pracy doktorskiej (Rycina 34), gdzie wykazano ekspresję genu podjednostki α kanału BK_{Ca} w komórkach nietransfekowanych HEK293.

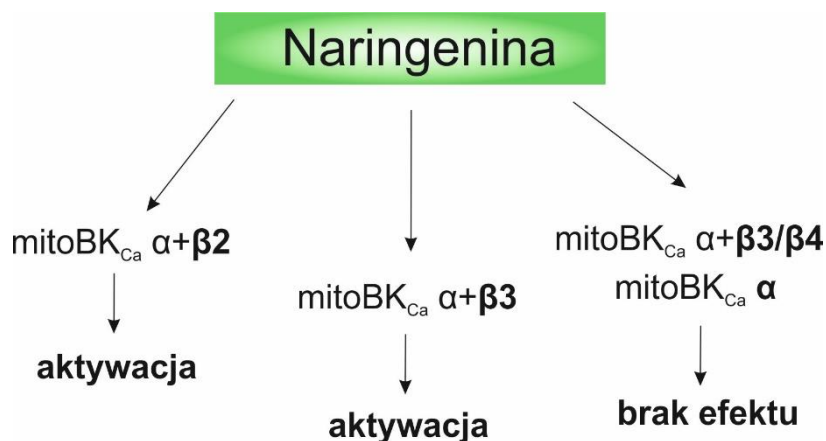
Omówione powyżej badania sugerują, że otrzymana nowa stabilna linia komórkowa HEK293-BK_DEC, charakteryzująca się egzogenną obecnością funkcjonalnego mitochondrialnego kanału BK_DEC. Stanowi ona przydatny model do badań aktywności elektrofizjologicznych i charakterystyki farmakologicznej kanału potasowego.

5.2. Wpływ pochodnych naringeniny na aktywność mitochondrialnego kanału BK_{Ca}

Scharakteryzowanie mitochondrialnego kanału potasowego BK_{Ca} w komórkach nabłonka oskrzelowego oraz izoformy VEDEC tego kanału w nowej linii komórkowej HEK293-BK_DEC, umożliwiło przeprowadzenie badań dotyczących wpływu niskocząsteczkowych związków na aktywność badanego kanału potasowego.

Pierwszą zbadaną grupą związków w prezentowanej rozprawie były flawonoidy, powszechnie występujące w roślinach związki polifenolowe. Badania flawonoidów w ostatnich latach są bardzo intensywne. Dostępna literatura wskazuje na wykorzystywanie flawonoidów w medycynie, sugerując ich dobroczynny wpływ m.in. na przewlekłe stany zapalne, powikłania sercowo-naczyniowe czy hipoglikemię [205]. W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiono się na badaniu wpływu pochodnych flawonoidu – naringeniny. Wykorzystując technikę *patch-clamp* wykazano, że naringenina nie wpływa znacząco na aktywność zarówno kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE jak i kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC (Rycina 39). Natomiast w literaturze istnieją doniesienia opisujące stymulujący efekt tego flawonoidu na mitochondrialny kanał BK_{Ca} w fibroblastach skóry [107] i śródbłonku [115]. Ponadto wykazano również zwiększenie prawdopodobieństw otwarć kanału BK_{Ca} w błonie komórkowej mięśni gładkich tchawicy [206] oraz naczyń mięśni gładkich [114] po podaniu naringeniny. Różnorodny efekt tego flawonoidu na mitochondrialny kanał BK_{Ca}, może być powiązany z odmiennym składem molekularnym kanału potasowego w różnych lokalizacjach tkankowych. W komórkach śródbłonka kanał mitoBK_{Ca} charakteryzuje się obecnością podjednostki pomocniczej $\beta 2$ [115], natomiast ten sam kanał mitochondrialny w ludzkich fibroblastach skóry regulowany jest przez podjednostką $\beta 3$ [107]. Z drugiej strony na aktywność kanału mitoBK_{Ca} znajdującego się w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego wpływa podjednostka $\beta 3$ lub/i $\beta 4$. Natomiast w modelu badawczym komórek HEK293-BK_DEC brakuje podjednostek

regulacyjnych kanału mitoBK_{Ca}. Dane te sugerują, że aktywacja mitochondrialnego kanału BK_{Ca} przez naringeninę zależy od obecności określonych podjednostek regulatorowych (Rycina 76).



Rycina 76. Schemat możliwej zależności efektu naringeniny na aktywność kanału potasowego od obecności określonych podjednostek β kanału mitoBK_{Ca}. Rysunek własny.

Opisane wyżej obserwacje przyczyniły się do postawienia hipotezy, dotyczącej wpływu pochodnych naringeniny na aktywność endogennego kanału mitoBK_{Ca} z komórek HBE i egzogenego kanału mitoBK_DEC z komórek HEK293-BK_DEC. Modyfikacje chemiczne naringeniny, poprzez dodanie grup funkcyjnych, takich jak prenylowa, metylowa mogą wpływać na jej właściwości biologiczne. W niniejszej rozprawie doktorskiej dokonano analizy wpływu następujących pochodnych naringeniny: 8-prenylo-naringeniny, 7-*O*-prenylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-prenylo-naringeniny, 5-*O*-prenylo-naringeniny, 7-*O*-metylo-naringeniny, 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny, chalkonu 4',5,7,-tri-*O*-metylo-naringeniny na aktywność kanału mitoBK_{Ca}.

5.2.1. Regulacje endogennie występującego kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE oraz egzogennej izoforny VEDEC kanału BK_{Ca} w komórkach HEK293-BK_DEC

Aktywność kontrolna mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca²⁺ z komórek nabłonka oskrzelowego posłużyła

jako model badawczy w poszukiwaniach nowych modulatorów kanału BK_{Ca}. Izofорма VEDEC kanału BK_{Ca} również została wykorzystana jako zdefiniowany model, pozbawiony podjednostek pomocniczych kanału BK_{Ca}. Uzyskane wyniki z doświadczeń badających wpływ pochodnych naringeniny na przeżywalność obu linii komórkowych HBE oraz HEK293-BK_DEC wykazały, że z siedmiu wyselekcjonowanych związków, sześć nie wpływa na żywotność komórek (7-*O*-prenylo-naringenina; 4',7-di-*O*-prenylo-naringenina; 5-*O*-prenylo-naringenina; 7-*O*-metylo-naringenina; 4',7-di-*O*-metylo-naringenina; chalkon 4',5,7-tri-*O*-metylo-naringeniny). Natomiast w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że 8-prenylo-naringenina zmniejsza przeżywalność komórek ludzkiego nabłonka oskrzelowego oraz komórek embrionalnych nerki wyrażających kanał mitoBK_DEC (Rycina 40-41 oraz Rycina 49-50). W dostępnej literaturze wykazano, że związek ten działa cytotoksycznie na komórki nowotworowe, gromadząc się w znacznie większym stopniu w komórkach glejaka niż w komórkach prawidłowych, fibroblastach [118]. Efekt ten jest prawdopodobnie związany z modyfikacją naringeniny w pozycji 8 pierścienia, w wyniku dodania grupy prenylowej. Zmiana ta znacznie wpływa na właściwości naringeniny prowadząc do jej toksyczności. Pozostałe badane pochodne naringeniny nie posiadają modyfikacji w opisanej wyżej pozycji, co może powodować brak toksyczności tych związków w badanych komórkach.

W doświadczeniach elektrofizjologicznych zauważono, że po dodaniu 8-prenylo-naringeniny aktywności kilku kanałów mitoBK_DEC zmniejszają się (Rycina 51). Natomiast najwyższe badane stężenie 8-prenylo-naringeniny powodowało zahamowanie aktywności kanału mitoBK_{Ca} (Rycina 42). Badania przeprowadzone przez inną grupę badawczą wykazały, że 8-prenylo-naringenina reguluje aktywność kanału potasowego Kv1.3 znajdującego się w błonie komórkowej [207]. Wykorzystując technikę *whole-cell patch-clamp* mierzono aktywność kanału Kv1.3 w komórkach Jurkat będących nieśmiertelną linią ludzkich limfocytów T. Wyniki pokazały, że kanał potasowy z błony komórkowej Kv1.3 jest hamowany w sposób zależny od stężenia badanego związku. Natomiast całkowite zahamowanie kanału Kv1.3 nastąpiło po podaniu 10 μM 8-prenylo-naringeniny, takie samo stężenie hamowało kanał mitoBK_{Ca} w komórkach HBE. W literaturze istnieją doniesienia dotyczące zwiększania biodostępności flawonoidów w wyniku modyfikacji grupą prenylową. Również spekuluje się, że prenylacja flawonoidów ułatwia ich oddziaływanie z białkami w wyniku zwiększenia hydrofobowości cząsteczki [116]. Prawdopodobnie występowanie łańcuchów

prenylowych przyczynia się do łatwiejszego wiązania cząsteczek do miejsc hydrofobowych w białkach receptorowych lub kanałowych [208].

Kolejna badana pochodna, która posiada grupę prenylową w sąsiedniej pozycji do opisanej powyżej, 7-*O*-prenylo-naringenina, wykazywała odmienne właściwości. Zaobserwowano, że związek ten jako jedyny zwiększał prawdopodobieństwo otwarcie kanału mitoBK_{Ca} w obu modelach komórkowych (Rycina 43 i 52). Najwyższe badane stężenie 7-*O*-prenylo-naringeniny powodowało największy efekt aktywacyjny zarówno kanału mitoBK_{Ca} jak i izoformy VEDEC mitoBK_{Ca}. Wydaje się, że pojedyncza prenylacja naringeniny w pozycji 7 jest najkorzystniejszą modyfikacją tej cząsteczki, pod względem aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych. Dotychczas w obecnej literaturze nie wykazano wpływu prenylowanej pochodnej flawonoidu w pozycji 7, która zwiększa aktywność kanałów jonowych. Natomiast, badania zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej sugerują, iż 7-*O*-prenylo-naringenina, może być wykorzystywana jako potencjalny aktywator kanału mitoBK_{Ca}.

Natomiast inna modyfikacja, która polegała na dodaniu kolejnej grupy prenylowej w pozycji 4' do 7-*O*-prenylo-naringeniny, zmieniła właściwości związku. W wyniku modyfikacji powstał nowy związek 4',7-di-*O*-prenylo-naringenina. Zaobserwowano, że taka modyfikacja nie wykazuje właściwości aktywacyjnych kanału mitoBK_{Ca} zarówno w komórkach HBE (Rycina 44) jak i HEK293-BK_DEC (Rycina 53). Uzyskane wyniki sugerują, że dodanie grupy prenylowej w pozycji 4' do 7-*O*-prenylo-naringeniny, powoduje utratę aktywacyjnych właściwości związku.

Przeprowadzono również doświadczenia mające na celu zbadanie 5-*O*-prenylo-naringeniny. Związek ten różni się od wyżej opisanych miejscem modyfikacji w pozycji 5. W literaturze istnieją doniesienia sugerujące, że właśnie ta pozycja w cząsteczce flawonoidów odpowiada za właściwości kardioprotekcyjne tych związków [125]. Przypuszczenia te stały się interesującym aspektem w wyborze miejsca modyfikacji w cząsteczce naringeniny. Uzyskane wyniki sugerują, że 5-*O*-prenylo-naringenina nie wpływa na zmianę aktywności mitochondrialnych kanałów BK_{Ca} obecnych w komórkach nabłonka oskrzelowego (Rycina 45) oraz w komórkach HEK293-BK_DEC (Rycina 54). Dane te sugerują, że zarówno naringenina jak i potencjalnie protekcyjny flawonoid - 5-*O*-prenylo-naringenina, nie wpływają na aktywność badanych kanałów mitoBK_{Ca}. Efekt

ten może być powiązany z obecnością podjednostek regulatorowych kanału mitoBK_{Ca}, tak jak dyskutowano powyżej.

Warto wspomnieć, że w literaturze opisywane są efekty 6-prenylo-naringeniny na zmiany aktywności kanałów jonowych. Przeprowadzane badania przez inne grupy badawcze sugerują, że 6-prenylo-naringenina hamuje kanały wapniowe Cav3.2 T w błonie komórkowej [209]. Doświadczenia przeprowadzono na transfekowanych komórkach HEK293. Jako model badawczy posłużyła wyprowadzona linia komórkowa Cav3.2-HEK posiadająca egzogenny kanał wapniowy Cav3.2 T. W innych badaniach wykazano, natomiast, iż 6-prenylo-naringenina blokowała aktywność kanału potasowego Kv1.3 w błonie komórkowej ludzkich limfocytów T [210].

Rezultaty otrzymane w niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzają dane literaturowe dotyczące hamowania kanałów jonowych przez prenylowane pochodne naringeniny za wyjątkiem 7-*O*-prenylo-naringeniny. Z dostępnej literatury wynika, że prenylacja flawonoidów zwiększa ich hamujący wpływ na niektóre enzymy. Wykazano również, że prenylowane flawonoidy występujące naturalnie w roślinie *Sophora flavescens* zmniejszają aktywność enzymu tyrozynazy, uczestniczącego w procesie melanogenezy [211, 212]. Innym przykładem są badania dotyczące prenylacji flawonoidów: luteoliny w pozycji 3 i apigeniny w pozycji 6, modyfikacje te zwiększają hamujący wpływ tych związków na aktywność enzymów [213, 214]. Ponadto opisano również, że pochodna kwercetyny, 8-prenylo-kwercetyna powoduje osłabienie aktywności kinaz SEK1-JNK1/2 i MEK1-ERK1/2 biorących udział w procesie przeciwzapalnym [215]. Z drugiej strony zaobserwowano, że flawonoidy z grupami prenylowymi wykazywały większą aktywność antyoksydacyjną w komórkach wątroby HepG2 [216]. Hošek i współautorzy zasugerowali, że grupy prenylowe w flawonoidach mają kluczowe znaczenie dla aktywności antyoksydacyjnej w linii komórek mysich makrofagów [217]. Podsumowując, odkrycia te sugerują, że grupy prenylowe dodane w różnych pozycjach pierścieni flawonoidów zmieniają znacząco ich właściwości.

Kolejną badaną modyfikacją flawonoidów była metylacja, przyłączenie reszty metylowej przez grupę hydroksylową naringeniny. Metylacja jest naturalnie występującą reakcją wśród flawonoidów, metylowane pochodne flawonoidów można pozyskać z roślin. Istnieją doniesienia wykazujące, że 7-*O*-metylo-naringenina pozyskana z rośliny (*Rhododendron speciferum*) działa przeciwzapalnie obniżając poziom czynnika martwicy

nowotworów (TNF- α) oraz interleukin w mysich makrofagach [120]. Zastosowanie grupy lipofilowej, takiej jak grupa metylowa, pomiędzy grupami polarnymi naringeniny może pomóc w zmniejszeniu polarności cząsteczki i poprawie jej ogólnej biodostępności [218]. Podczas badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wykazano, że prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE zmniejszyło się nieznacznie po dodaniu posiadającej w pozycji 7 grupę metylową, 7-*O*-metylo-naringeniny (Rycina 46). Natomiast aktywność VEDEC izoformy kanału mitoBK_{Ca} po aplikacji 7-*O*-metylo-naringeniny zahamowało aktywność kanału (Rycina 55). W dostępnej literaturze nie znaleziono prac opisujących wpływ 7-*O*-metylo-naringeniny na kanały jonowe. Zaobserwowany efekt jest odwrotny w porównaniu do 7-*O*-prenylo-naringeniny, która jak opisano wyżej, zwiększała aktywność obu izoform kanału mitoBK_{Ca}. Wyniki te mogą sugerować, że o właściwościach pochodnych naringeniny nie decyduje tylko pozycja w której została zmodyfikowana cząsteczka, ale również obecność grupy funkcyjnej.

Również tak jak w przypadku pochodnych prenylowanych, zbadano wpływ cząsteczki naringeniny z dwiema resztami metylowymi na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego. Badany związek 4',7-di-*O*-metylo-naringenina, posiadał modyfikację w dwóch (4' oraz 7) pozycjach pierścienia aromatycznego naringeniny. Zaobserwowano, że aktywność zarówno kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE (Rycina 47) jak kanału mitoBK_DEC w komórkach HEK293-BK_DEC (Rycina 56) została istotnie zahamowana. Ponadto warto wspomnieć o doświadczeniach przeprowadzanych z wykorzystaniem 4',7-di-*O*-metylo-naringeniny w badaniu choroby neurologicznej. Związek ten wykazywał wysoką skuteczność w przeciwdziałaniu napadów padaczkowych wywołanych u larw *Danio pręgowanego* i myszy w porównaniu do naringeniny [219]. Autorzy podkreślają, że metylowane flawonoidy w tym 4',7-di-*O*-metylo-naringenina wykazywały większy potencjał w leczeniu napadów padaczki. Nie można zatem wykluczyć, że pozytywny efekt terapeutyczny może być powiązany z hamowaniem aktywności kanałów jonowych przez 4',7-di-*O*-metylo-naringeninę. Doniesienia literaturowe sugerują, że blokowanie kanałów sodowych, bramkowanych napięciem jest kluczowe w leczeniu chorób ośrodkowego układu nerwowego, w tym padaczki [220]

Ostatnią modyfikacją, w której również występują reszty metylowe był związek -chalkon 4',5,7-tri-*O*-metylo-naringeniny. Chalkon charakteryzuje się otwartym

pierścieniem heterocyklicznym, gdyż występuje naturalnie jako produkt pośredni w syntezie flawonoidów w roślinach. Chalkon naringeniny opisywany jest jako związek o właściwościach przeciwzapalnych oraz przeciwalergicznych [124]. Uzyskane wyniki wykazały, że obecność trimetylowanego chalkonu naringeniny prowadzi do całkowitego zamknięcia kanału mitoBK_{Ca} (Rycina 48) oraz kanału mitoBK_DEC (Rycina 57) badanych modelach komórkowych. W literaturze brakuje informacji dotyczącej wpływu chalkon 4',5,7-tri-O-metylo-naringeniny na kanały jonowe. Natomiast opisany został efekt ksantohumolu, czyli związku należącego do flawonoidów, który również posiada strukturę chalkonu. Zaobserwowano blokowanie aktywność kanału Kv1.3 (mierzonego techniką *whole cell patch-clamp*) w błonie komórkowej ludzkich limfocytów T przez ksantohumol [221]. Rezultaty te sugerują, że chalkon 4',5,7-tri-O-metylo-naringenina może być potencjalnym nowym inhibitorem kanałów potasowych.

Przedstawione w rozprawie wyniki po raz pierwszy sugerują, że pochodne naringeniny różniące się grupami funkcyjnymi wykazują różnorodne efekty na aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych. Dodanie pojedynczej reszty prenylowej w pozycji 7 pierścienia aromatycznego (7-O-prenylo-naringenina) wykazuje aktywację kanału mitoBK_{Ca} w komórkach HBE i HEK293-BK_DEC w porównaniu do niezmodyfikowanego związku naringeniny. Natomiast modyfikacja naringeniny w postaci trimetylowanego chalkonu naringeniny powoduje hamowanie (4',5,7-tri-O-metylo-naringeniny) aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych typu BK_{Ca}.

Drugą badaną grupą związków w niniejszej rozprawie doktorskiej, należących również do flawonoidów były antocyjany, zaliczane do roślinnych barwników. Dzięki swoim właściwościom nadają barwę owocom i warzywom, np. kolor truskawek jest określony przez 3-glukozyd pelargonidyny a winogron przez 3-glukozyd malwidyny [126]. Antocyjany pochodzące z roślin obecne są również w przetworzonych sokach lub winie. W literaturze opisano liczne badania dotyczące tzw. „paradoksu francuskiego”, zjawiska dotyczącego mniejszej śmiertelności na skutek choroby sercowo-naczyniowej francuskiego społeczeństwa, pomimo takich samych czynników środowiskowych jak w innych krajach. Efekt powiązано z dobroczynnym wpływem umiarkowanego spożycia czerwonego wina [222, 223]. Istnieją doniesienia opisujące wpływ bezalkoholowego ekstraktu z czerwonego wina na aktywację mitochondrialnego kanału potasowego K_{ATP}. Autorzy pracy zaproponowali, że aktywacja mitoK_{ATP} przez ekstrakt winny prowadziła

do kardioprotekcji w wyniku, której obserwuje się mniejszą zachorowalność na choroby układu krążenia [224].

W niniejszej rozprawie doktorskiej przeprowadzono badania wpływu antocyjanów obecnych w skórkach winogron jako potencjalnych aktywatorów endogennie występującego mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w komórkach HBE. Wyselekcjonowane antocyjany 3-glukozyd malwidyny, 3-glukozyd peonidyny oraz 3-glukozyd petunidyny nie wpływały toksycznie na komórki ludzkiego nabłonka oskrzelowego (Rycina 58-59). Z danych literaturowych wynika, że antocyjany zapobiegają indukowanej czynnikiem proapoptotycznym śmierci szczurzych komórek nabłonka płuc [225]. Ponadto antocyjany są opisywane jako antyoksydanty, zdolne do neutralizowania wolnych rodników [226]. Związki te posiadają zdolność przeciwutleniającą, która może wynikać między innymi z takich mechanizmów jak: zmiatanie wolnych rodników oraz hamowanie utleniania lipidów. Natomiast utworzony rodnik antocyjanowy jest stabilny oraz hamuje łańcuchową reakcję rodnikową [227, 228].

Ponadto w badaniach elektrofizjologicznych z wykorzystaniem techniki *patch-clamp* nie zaobserwowano aktywacji kanału mitoBK_{Ca} przez wybrane antocyjany. Wykazano zmniejszenie prawdopodobieństw otwarć (P_o) zarówno kanału mitoBK_{Ca} o kontrolnej jak i zwiększonej aktywności po dodaniu antocyjanów. Zaobserwowano największy istotny statystycznie, hamujący efekt aktywności kanału przez 3-glukozyd petunidyny (Rycina 62). Pozostałe dwa antocyjany 3-glukozyd malwidyny (Rycina 60) oraz 3-glukozyd peonidyny (Rycina 61) w podobny sposób wpływały na zmniejszenie aktywności mitochondrialnego kanału BK_{Ca} w komórkach HBE. Dostępna literatura opisuje badania elektrofizjologiczne dotyczące wpływ innego antocyjanu pelargonidyny, wyizolowanej z kwiatów *Pelargonium* na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego K_{ATP} [229]. W badaniach z wykorzystaniem techniki czarnych błon lipidowych (BLM, *ang. black lipid membrane*) mierzono aktywność kanału. W dwuwarstwą lipidową wbudowywano oczyszczone białko kanałowe K_{ATP} z wewnętrznej błony mitochondrialnej wątroby szczura. Wykazano całkowite zahamowanie aktywności kanału mitoK_{ATP} po dodaniu 100 μ M peralgoniny. Prawdopodobnie kanały potasowe zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej nie ulegają aktywacji poprzez antocyjany. Z kolei inne badania dotyczące pochodnej antocyjanów, cyjanidyno-3-rutynozydu wykazały, że związek ten może pośrednio aktywować kanał wapniowy bramkowany napięciem (VGCCs, *ang. voltage-gated calcium channel*) [230]. Cyjanidyno-3-rutynozyd powodował tym

samym zwiększanie wydzielania insuliny z komórek β -trzustki. Pomimo niewielu dostępnych prac dotyczących wpływu antocyjanów lub ich pochodnych na kanały jonowe, można zaobserwować ich niejednoznaczny wpływ na aktywność różnych kanałów.

5.3. Wpływ związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na złożoną aktywność kanału mitoBK_DEC

Paksylina (pax) jest powszechnie, od wielu lat, wykorzystywanym inhibitorem kanałów potasowych typu BK_{Ca} [188]. Związek ten posiada właściwość selektywnego wiązania się z kanałem BK_{Ca} czego efektem jest brak przepływu jonów potasu przez por kanału. W ostatnim czasie opublikowano badania opisujące dokładne miejsce wiązania paksyliny we wnętrzu poru kanału BK_{Ca} [142]. Paksylina jako kanoniczny inhibitor kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca²⁺ jest wykorzystywana podczas badań dotyczących identyfikacji oraz charakterystyki tego kanału [188]. Natomiast z ostatnich doniesień wynika, że paksylina nie zawsze blokuje aktywność kanału potasowego. Taka sytuacja została zaobserwowana podczas badań wpływu kwercetyny będącej flawonoidem na zmiany aktywność kanału mitoBK_{Ca} w komórkach endotelialnych. Wykazano, że zaktywowany kanał mitoBK_{Ca} przez dodanie kwercetyny nie jest hamowany paksyliną, jest to prawdopodobnie spowodowane wiązaniem się tych substancji w tym samym miejscu w cząsteczce kanału [143]. Postanowiono przeszukać dostępne bazy związków w celu zidentyfikowania nowych substancji, które będą blokować w sposób specyficzny mitochondrialny kanał BK_{Ca}. Dzięki współpracy z Laboratorium prof. Bruna Botta z Uniwersytetu Sapienza w Rzymie, wyselekcjonowano 8 substancji. Związki te są podobne do naturalne występującej paksyliny pod względem struktury oraz grup funkcyjnych. Nazwano je związkami o strukturze zbliżonej do paksyliny, wśród których znajdują się terpenoidy (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, pristimerina) oraz alkaloidy (chlorowoderek weratryny, homatropina, chlorowoderek semperwiryny, jerwina).

Poszukiwanie nowych inhibitorów kanałów potasowych w tym również mitochondrialnych, wydaje się być obiecującym celem farmakologicznym. Terapie ukierunkowane na kanały potasowe mogą odgrywać ważną rolę w leczeniu chorób nowotworowych. Badania wykazały, że terapia guza mózgu, szczególnie glejaka

wielopostaciowego jest możliwe za pomocą inhibitorów kanału potasowego Kv1.3 [231]. Przeprowadzone eksperymenty na mysich i ludzkich liniach glejak dowiodły prawie 90% śmiertelność komórek po zastosowaniu związków hamujących aktywność kanału Kv1.3. Odnotowano również, że inhibitory mitochondrialnego kanału Kv1.3 wydają się skutecznym lekiem w leczeniu przewlekłej białaczki limfocytowej [232]. Wykazano selektywne działanie inhibitorów kanału mitoKv1.3 na limfocytów B, które prowadziło do zwiększenia śmiertelności tych komórek w porównaniu do komórek nienowotworowych.

Biorąc pod uwagę powyższe informację, wykonano badania wpływu związków o strukturze zbliżonej do paksyliny, terpenoidów (ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian, 20-hydroksyekdyson, β -amiryna, prystymeryna) oraz alkaloidów (chlorowoderek weratryny, homatropina, chlorowoderek semperwiryny, jerwina) na aktywność mitochondrialnej VEDEC izofory kanału BK_{Ca}. W pierwszym etapie badań sprawdzono wpływ związków na toksyczność komórek HEK293-BK_DEC. Wykazano, że związek z grupy terpenoidów, pristimerina powoduje indukcję zarówno apoptozy jak i nekrozy badanych komórek (Rycina 63-64). W dostępnej literaturze, znajdują się informacje dotyczące silnego wpływu pristimeriny na apoptozę komórek raka płuca [154]. Porównując badania można zauważyć nioselektywne działanie związku powodującego śmierć komórek zarówno nowotworowych jak i prawidłowych. Negatywny efekt na przeżywalność komórek HEK293-BK_DEC wykazały również dwa alkaloidy: chlorowoderek semperwiryny i jerwina (Rycina 65-66). Dane te korelują z informacjami w literaturze, semperwirina opisywana jest jako czynnik indukujący śmierć komórek guzów jąder [166]. Natomiast jerwina powoduje apoptozę komórek raka jamy nosowo-gardłowej [233]. Pozostałe badane związki o strukturze zbliżonej do paksyliny nie wpływały toksycznie na komórki HEK293-BK_DEC.

Otrzymane w rozprawie wyniki elektrofizjologiczne wykazywały obniżenie aktywności kanału mitoBK_DEC po dodaniu związków o strukturze zbliżonej do paksyliny. Wśród badanych terpenoidów β -amiryna (Rycina 69) oraz toksyczna pristimerina (Rycina 70) nieznacznie obniżały prawdopodobieństwo otwarć (NP_o) kilku kanałów mitoBK_DEC w badanym skrawku błony. Natomiast ent-beyer-15-en-18-O-bursztynian (Rycina 67) oraz 20-hydroksyekdyson (Rycina 68) w znacznym stopniu wpływały na aktywność, powodując zmniejszenie ilość aktywnych kanałów w badanym skrawku błony. W literaturze istnieją sprzeczne doniesienia dotyczące wpływu

pristimeriny na kanał wapniowy w plemnikach. Pierwsza publikacja wskazują na hamujące działanie badanego terpenoidu na aktywność kanałów wapniowych, tzw. kanałów CatSper [234]. Natomiast późniejsza publikacja podważa te obserwacje wskazując, że pristimerina nie powoduje zamknięcia kanału CatSper w porównaniu do zastosowania znanego inhibitora RU1968 [235]. W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowano po raz pierwszy wpływ pristimeriny na kanał potasowy. Obecnie nie opublikowano badań dotyczących wpływu β -amiryny, ent-beyer-15-en-18-O-bursztynianu, 20-hydroksyekdysonu na regulację aktywności kanałów jonowych.

Wśród badanych alkaloidów zauważono, że chlorowoderek weratryny (Rycina 71) oraz homatropina (Rycina 72) w najwyższym badanym stężeniu powodują znaczne zmiany aktywności kanału mitoBK_DEC. Weratryna opisywana jest w literaturze jako związek zwiększający aktywność kanału sodowego [156, 158]. Natomiast brak jest doniesień wskazujących o aktywacji kanałów potasowych. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazują, że chlorowoderek weratryny zmniejsza prawdopodobieństwo otwarć kanałów mitoBK_DEC w badanym skrawku błony. Natomiast dwa pozostałe badane alkaloidy chlorowoderek semperwiryny (Rycina 73) i jerwina (Rycina 74) wykazujące toksyczne działanie na komórki powodując również obniżają aktywność kanału mitoBK_DEC, lecz w mniejszym stopniu niż związki opisane wyżej. W dostępnej literaturze nie znaleziono danych wskazujących na wpływ chlorowodoru semperwiryny i jerwiny na kanały jonowe.

Przedstawione w rozprawie wyniki opisują działanie związków o strukturze zbliżonej do paksyliny na aktywność kanału mitoBK_DEC. Dotychczas w dostępnej literaturze nie znaleziono badań prezentujących działanie wyżej wymienionych związków na mitochondrialne kanały potasowe. Badane związki obniżają prawdopodobieństwo otwarć kanałów mitoBK_DEC w jednym skrawku błony, ale nie tak skutecznie jak paksylina. Prawdopodobnie modyfikacje tych substancji, ich pochodne, mogą stanowić skuteczne inhibitory kanałów potasowych w mitochondriach. Otrzymane wyniki w niniejszej rozprawie doktorskiej mogą służyć jako punkt wyjściowy do dalszych badań analizowanych związków niskocząsteczkowych w kontekście cytoprotekcji i śmierci komórek.

6. Podsumowanie i wnioski

Z przeprowadzonych badań w niniejszej rozprawie wysnuto następujące wnioski:

- 1) Zidentyfikowano i scharakteryzowano mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami Ca^{2+} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego. Zaobserwowano, że aktywność kanału jest zależna od stężenia jonów wapnia oraz od modulatorów kanału mitoBK_{Ca} (NS11021, paksylina, iberiotoksyna).
- 2) Dowiedziono, że komórki HEK293 stanowią przydatny i wiarygodny model badawczy do transfekcji plazmidem zawierającym gen kodujący VEDEC izoformę kanału mitoBK_{Ca}. Uzyskana nowa linia komórkowa HEK293-BK_DEC zawierała w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, funkcjonalny kanał mitoBK_DEC, wrażliwy na kanoniczne modulatory tego typu kanału.
- 3) Zaobserwowano aktywujący wpływ flawonoidu 7-*O*-prenylo-naringeniny na aktywność mitochondrialnych kanałów potasowych mitoBK_{Ca}. Pochodna naringeniny aktywowała kanał występujący zarówno endogennie (mitoBK_{Ca}) w komórkach HBE jak i egzogennie (mitoBK_DEC) w komórkach HEK293-BK_DEC.
- 4) Wykazano, że chalkon 4', 5, 7 –tri-*O*-metylo-naringeniny blokuje aktywność obu badanych kanałów mitoBK_{Ca} zarówno z komórek HBE jak i HEK293-BK_DEC.
- 5) Opisano, że antocyjany, związki pochodzenia naturalnego zmniejszają prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK_{Ca} w ludzkich komórkach nabłonka oskrzelowego HBE.
- 6) Zaobserwowano, że aktywność kanału mitoBK_DEC ulega hamowaniu po dodaniu związków o strukturze zbliżonej do paksyliny. Badane związki zmniejszały znacząco prawdopodobieństwo otwarć kanałów potasowych, jednak nie tak skutecznie jak kanoniczny inhibitor – paksylina.

7. Bibliografia

1. Simkiss, K., *Cell membranes; barriers, regulators and transducers?* Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, **1998**. 120(1): p. 17-22.
2. Sigler, K. and M. Höfer, *Biotechnological Aspects of Membrane Function*. Critical Reviews in Biotechnology, **1997**. 17(2): p. 69-86.
3. Bigot, J., et al., *Bronchial Epithelial Cells on the Front Line to Fight Lung Infection-Causing Aspergillus fumigatus*. Front Immunol, **2020**. 11: p. 1041.
4. Gon, Y. and S. Hashimoto, *Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma*. Allergol Int, **2018**. 67(1): p. 12-17.
5. Wiegman, C.H., et al., *Oxidative Stress in Ozone-Induced Chronic Lung Inflammation and Emphysema: A Facet of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Front Immunol, **2020**. 11: p. 19-57.
6. Mulikdjanian, A.Y., et al., *Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **2012**. 109(14): p. E821-E830.
7. Melkikh, A.V. and M.I. Sutormina, *Model of active transport of ions in cardiac cell*. J Theor Biol, **2008**. 252(2): p. 247-54.
8. Burnett, R., et al., *Clinical laboratory medicine*. Williams and Wilkins, Philadelphia, US, **1994**. 1: p. 113-1120.
9. Palmer, B.F., *Regulation of Potassium Homeostasis*. Clin J Am Soc Nephrol, **2015**. 10(6): p. 1050-60.
10. Udensi, U.K. and P.B. Tchounwou, *Potassium Homeostasis, Oxidative Stress, and Human Disease*. International journal of clinical and experimental physiology, **2017**. 4(3): p. 111-122.
11. McDonough, A.A. and J.H. Youn, *Potassium Homeostasis: The Knowns, the Unknowns, and the Health Benefits*. Physiology (Bethesda), **2017**. 32(2): p. 100-111.
12. Rodan, A.R., *Potassium: friend or foe?* Pediatr Nephrol, **2017**. 32(7): p. 1109-1121.
13. Lee, A., *Membrane structure*. Current Biology, **2001**. 11(20): p. R811-R814.
14. Noinaj, N. and S.K. Buchanan, *Structural insights into the transport of small molecules across membranes*. Curr Opin Struct Biol, **2014**. 27: p. 8-15.
15. Dołowy K, S.A., Pikuła S, *Błony biologiczne*. **2003**: Wydawnictwo "Śląsk"
16. Nikonenko, V. and N. Pismenskaya, *Ion and Molecule Transport in Membrane Systems*. International Journal of Molecular Sciences, **2021**. 22(7): p. 3556.
17. Tosolini, M., P. Pengo, and P. Tecilla, *Biological Activity of Trans-Membrane Anion Carriers*. Curr Med Chem, **2018**. 25(30): p. 3560-3576.
18. Bosshart, P.D. and D. Fotiadis, *Secondary Active Transporters, in Bacterial Cell Walls and Membranes*, A. Kuhn, Editor. **2019**, Springer International Publishing: Cham. p. 275-299.
19. Finkelstein, A., *Carrier model for active transport of ions across a mosaic membrane*. Biophys J, **1964**. 4(6): p. 421-40.
20. Abuammar, H., et al., *Ion Channels and Pumps in Autophagy: A Reciprocal Relationship*. Cells, **2021**. 10(12).
21. Askari, A., *The other functions of the sodium pump*. Cell Calcium, **2019**. 84: p. 102-105.
22. Skou, J.C., *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves*. Biochimica et Biophysica Acta, **1957**. 23: p. 394-401.

23. Skou, J.C., *Further investigations on a Mg^{2+} Na^+ -activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane.* *Biochimica et biophysica acta*, **1960**. 42: p. 6-23.
24. Kopeck, W., et al., *Molecular mechanism of Na^+ , K^+ -ATPase malfunction in mutations characteristic of adrenal hypertension.* *Biochemistry*, **2014**. 53(4): p. 746-754.
25. Geering, K., *Functional roles of Na,K -ATPase subunits.* *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **2008**. 17(5): p. 526-32.
26. Pirahanchi Y, J.R., Aeddula NR. , *Physiology, Sodium Potassium Pump.* . StatPearls [Internet]. Vol. Treasure Island (FL). **2022** Jan.
27. Martelli, A., *Potassium Channels: A Big Family, Many Different Targets, Great Pharmacological Opportunities.* *Curr Med Chem*, **2018**. 25(23): p. 2626.
28. Kuang, Q., P. Purhonen, and H. Hebert, *Structure of potassium channels.* *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2015**. 72(19): p. 3677-3693.
29. Minor, D.L., *Potassium channels: life in the post-structural world.* *Current Opinion in Structural Biology*, **2001**. 11(4): p. 408-414.
30. Gohara, D.W. and E. Di Cera, *Molecular Mechanisms of Enzyme Activation by Monovalent Cations.* *J Biol Chem*, **2016**. 291(40): p. 20840-20848.
31. Bischof, H., et al., *Potassium ions promote hexokinase-II dependent glycolysis.* *iScience*, **2021**. 24(4): p. 346-468.
32. Bischof, H., et al., *Unveiling the K^+ -sensitivity of cell metabolism using genetically encoded, FRET-based K^+ , glucose, and ATP biosensors.* *STAR protocols*, **2021**. 2(4): p. 100843-100843.
33. Schwarz, D.S. and M.D. Blower, *The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling.* *Cell Mol Life Sci*, **2016**. 73(1): p. 79-94.
34. Bischof, H., et al., *Live-Cell Imaging of Physiologically Relevant Metal Ions Using Genetically Encoded FRET-Based Probes.* *Cells*, **2019**. 8(5).
35. Kuum, M., et al., *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*, **2012**. 125(Pt 3): p. 625-633.
36. Garner, M.H., *Na,K -ATPase in the nuclear envelope regulates Na^+ : K^+ gradients in hepatocyte nuclei.* *J Membr Biol*, **2002**. 187(2): p. 97-115.
37. Marathias, V.M. and P.H. Bolton, *Structures of the potassium-saturated, 2:1, and intermediate, 1:1, forms of a quadruplex DNA.* *Nucleic Acids Res*, **2000**. 28(9): p. 1969-77.
38. Li, B., et al., *Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling.* *Nat Neurosci*, **2014**. 17(8): p. 1055-63.
39. Quesada, I., et al., *Nuclear K_{ATP} channels trigger nuclear Ca^{2+} transients that modulate nuclear function.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2002**. 99(14): p. 9544-9549.
40. Garlid, K.D. and P. Paucek, *Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **2003**. 1606(1): p. 23-41.
41. Solomon PE, B.L., Martin DW, *Biologia Ville.* Multico, **2014**.
42. Tilokani, L., et al., *Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms.* *Essays in Biochemistry*, **2018**. 62(3): p. 341-360.
43. Holt, I.J. and A. Reyes, *Human mitochondrial DNA replication.* *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2012**. 4(12): p. a012971.

44. P. Brągoszewski, J.O., *Medycyna mitochondrialna*. Borgis - Postępy Nauk Medycznych, **2009**. 2: p. 138-148.
45. Kauppila, J.H. and J.B. Stewart, *Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations*. Biochim Biophys Acta, **2015**. 1847(11): p. 1354-61.
46. Alabduladhem, T.O. and B. Bordoni, *Physiology, Krebs Cycle*, StatPearls Publishing Copyright © **2022**, Treasure Island (FL).
47. Klecker, T. and B. Westermann, *Pathways shaping the mitochondrial inner membrane*. Open Biol, **2021**. 11(12): p. 210-238.
48. Kühlbrandt, W., *Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes*. BMC Biology, **2015**. 13(1): p. 89.
49. Nolfi-Donagan, D., A. Braganza, and S. Shiva, *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement*. Redox biology, **2020**. 37: p. 101674-101674.
50. Sousa, J.S., E. D'Imprima, and J. Vonck, *Mitochondrial Respiratory Chain Complexes*, in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, J.R. Harris and E.J. Boekema, Editors. **2018**, Springer Singapore: Singapore. p. 167-227.
51. Mnatsakanyan, N. and E.A. Jonas, *ATP synthase c-subunit ring as the channel of mitochondrial permeability transition: Regulator of metabolism in development and degeneration*. J Mol Cell Cardiol, **2020**. 144: p. 109-118.
52. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, **2009**. 46(6): p. 821-31.
53. Szabo, I. and M. Zoratti, *Mitochondrial channels: ion fluxes and more*. Physiol Rev, **2014**. 94(2): p. 519-608.
54. Shoshan-Barmatz, V., et al., *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death*. Mol Aspects Med, **2010**. 31(3): p. 227-85.
55. Colombini, M., *Mitochondrial outer membrane channels*. Chem Rev, **2012**. 112(12): p. 6373-87.
56. Kravenska, Y., V. Checchetto, and I. Szabo, *Routes for Potassium Ions across Mitochondrial Membranes: A Biophysical Point of View with Special Focus on the ATP-Sensitive K⁺ Channel*. Biomolecules, **2021**. 11(8): p. 1172.
57. Pereira, O., Jr. and A.J. Kowaltowski, *Mitochondrial K⁺ Transport: Modulation and Functional Consequences*. Molecules (Basel, Switzerland), **2021**. 26(10): p. 2935.
58. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature, **1961**. 191: p. 144-8.
59. Laskowski, M., et al., *What do we not know about mitochondrial potassium channels?* Biochim Biophys Acta, **2016**. 1857(8): p. 1247-1257.
60. Inoue, I., et al., *ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane*. Nature, **1991**. 352(6332): p. 244-7.
61. Kicińska, A. and A. Szewczyk, *Protective effects of the potassium channel opener-diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes*. Gen Physiol Biophys, **2003**. 22(3): p. 383-95.
62. Kulawiak, B., et al., *BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria*. Experimental Neurology, **2008**. 212(2): p. 543-547.
63. O'Rourke, B., *Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection*. Circ Res, **2004**. 94(4): p. 420-32.
64. Leanza, L., et al., *Direct Pharmacological Targeting of a Mitochondrial Ion Channel Selectively Kills Tumor Cells In Vivo*. Cancer Cell, **2017**. 31(4): p. 516-531.

65. Siemen, D., et al., *Ca²⁺-Activated K Channel of the BK-Type in the Inner Mitochondrial Membrane of a Human Glioma Cell Line*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **1999**. 257(2): p. 549-554.
66. De Marchi, U., et al., *Intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channel (K_{Ca}3.1) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells*. Cell Calcium, **2009**. 45(5): p. 509-16.
67. Dolga, A.M., et al., *Mitochondrial small conductance SK2 channels prevent glutamate-induced oxytosis and mitochondrial dysfunction*. Journal of Biological Chemistry, **2013**. 288(15): p. 10792-10804.
68. Szabò, I., et al., *A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria*. Journal of Biological Chemistry, **2005**. 280(13): p. 12790-12798.
69. Toczyłowska-Mamińska, R., et al., *Potassium channel in the mitochondria of human keratinocytes*. J Invest Dermatol, **2014**. 134(3): p. 764-772.
70. Smith, C.O., K. Nehrke, and P.S. Brookes, *The Slo(w) path to identifying the mitochondrial channels responsible for ischemic protection*. Biochemical Journal, **2017**. 474(12): p. 2067-2094.
71. Augustynek, B., W.S. Kunz, and A. Szewczyk, *Guide to the Pharmacology of Mitochondrial Potassium Channels*, in *Pharmacology of Mitochondria*, H. Singh and S.-S. Sheu, Editors. **2017**, Springer International Publishing: Cham. p. 103-127.
72. Szewczyk, A., et al., *Mitochondrial potassium channels - an overview*. Postepy Biochem, **2018**. 64(3): p. 196-212.
73. Bednarczyk, P., et al., *Evidence for a mitochondrial ATP-regulated potassium channel in human dermal fibroblasts*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, **2018**. 1859(5): p. 309-318.
74. Er, F., et al., *Testosterone Induces Cytoprotection by Activating ATP-Sensitive K⁺ Channels in the Cardiac Mitochondrial Inner Membrane*. Circulation, **2004**. 110(19): p. 3100-3107.
75. Bajgar, R., et al., *Identification and Properties of a Novel Intracellular (Mitochondrial) ATP-sensitive Potassium Channel in Brain **. Journal of Biological Chemistry, **2001**. 276(36): p. 33369-33374.
76. Debska, G., et al., *Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, **2002**. 1556(2): p. 97-105.
77. Cancherini, D.V., et al., *ATP-sensitive K⁺ channels in renal mitochondria*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, **2003**. 285(6): p. F1291-F1296.
78. Garlid, K.D., et al., *Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection*. Circ Res, **1997**. 81(6): p. 1072-82.
79. Fryer, R.M., et al., *Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, **2000**. 278(1): p. H305-12.
80. Domoki, F., et al., *Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal-vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs*. Stroke, **1999**. 30(12): p. 2713-8.
81. Xu, W., et al., *Cytoprotective role of Ca²⁺- activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane*. Science, **2002**. 298(5595): p. 1029-33.

82. Piwońska, M., et al., *Effectors of large-conductance calcium-activated potassium channel modulate glutamate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **2016**. 76(1): p. 20-31.
83. Heinen, A., et al., *Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca^{2+} -sensitive K^+ channels*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2007**. 293(3): p. H1400-7.
84. Liu, Y., et al., *Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?* *Circulation*, **1998**. 97(24): p. 2463-9.
85. Murata, M., et al., *Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection*. *Circ Res*, **2001**. 89(10): p. 891-8.
86. Checchetto, V., et al., *Mitochondrial potassium channels in cell death*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2018**. 500(1): p. 51-58.
87. Pallotta, B.S., K.L. Magleby, and J.N. Barrett, *Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^+ currents in rat muscle cell culture*. *Nature*, **1981**. 293(5832): p. 471-474.
88. Lee, U.S. and J. Cui, *BK channel activation: structural and functional insights*. *Trends in neurosciences*, **2010**. 33(9): p. 415-423.
89. Ghatta, S., et al., *Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications*. *Pharmacology & Therapeutics*, **2006**. 110(1): p. 103-116.
90. González-Sanabria, N., et al., *BK in Double-Membrane Organelles: A Biophysical, Pharmacological, and Functional Survey*. *Frontiers in Physiology*, **2021**. 12.
91. Kulawiak, B. and P. Bednarczyk, *Reconstitution of brain mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **2005**. 65(3): p. 271-6.
92. Skalska, J., et al., *A novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, **2008**. 1777(7-8): p. 651-9.
93. Bednarczyk, P., et al., *Large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2013**. 304(11): p. H1415-27.
94. Kicinska, A., et al., *A large-conductance calcium-regulated K^+ channel in human dermal fibroblast mitochondria*. *Biochem J*, **2016**. 473(23): p. 4457-4471.
95. Sancho, M. and B.D. Kyle, *The Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel: A Big Key Regulator of Cell Physiology*. *Frontiers in Physiology*, **2021**. 12.
96. Brenner, R., et al., *Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel*. *Nature*, **2000**. 407(6806): p. 870-876.
97. Yan, J. and R.W. Aldrich, *LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium*. *Nature*, **2010**. 466(7305): p. 513-516.
98. Poulsen, A.N., et al., *Differential expression of BK channel isoforms and β -subunits in rat neuro-vascular tissues*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **2009**. 1788(2): p. 380-389.
99. Balderas, E., et al., *MitoBK(Ca) channel is functionally associated with its regulatory $\beta 1$ subunit in cardiac mitochondria*. *The Journal of physiology*, **2019**. 597(15): p. 3817-3832.
100. Wang, B., D.B. Jaffe, and R. Brenner, *Current understanding of iberiotoxin-resistant BK channels in the nervous system*. *Frontiers in Physiology*, **2014**. 5.

101. Sakai, Y., M. Harvey, and B. Sokolowski, *Identification and quantification of full-length BK channel variants in the developing mouse cochlea*. J Neurosci Res, **2011**. 89(11): p. 1747-60.
102. Singh, H., et al., *MitoBK(Ca) is encoded by the Kcnma1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2013**. 110(26): p. 10836-41.
103. Walewska, A., et al., *Mechanosensitivity of mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium channels*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, **2018**. 1859(9): p. 797-805.
104. Seoh, S.-A., et al., *Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel*. neuron, **1996**. 16(6): p. 1159-1167.
105. Shi, J., et al., *Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels*. Nature, **2002**. 418(6900): p. 876-80.
106. Augustynek, B., et al., *Mitochondrial BK Channel Openers CGS7181 and CGS7184 Exhibit Cytotoxic Properties*. International journal of molecular sciences, **2018**. 19(2): p. 353.
107. Kampa, R.P., et al., *Naringenin as an opener of mitochondrial potassium channels in dermal fibroblasts*. Experimental Dermatology, **2019**. 28(5): p. 543-550.
108. Kampa, R.P., et al., *Cytoprotective effects of the flavonoid quercetin by activating mitochondrial BK(Ca) channels in endothelial cells*. Biomed Pharmacother, **2021**. 142: p. 112039.
109. Olszewska, A.M., et al., *Mitochondrial potassium channels: A novel calcitriol target*. Cellular & Molecular Biology Letters, **2022**. 27(1): p. 3.
110. Skalska, J., et al., *Calcium ions regulate K⁺ uptake into brain mitochondria: the evidence for a novel potassium channel*. Int J Mol Sci, **2009**. 10(3): p. 1104-20.
111. Gao, Y.D. and M.L. Garcia, *Interaction of agitoxin2, charybdotoxin, and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and Maxi-K channels*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, **2003**. 52(2): p. 146-154.
112. Manchope, M.F., R. Casagrande, and W.A. Verri, Jr., *Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone*. Oncotarget, **2017**. 8(3): p. 3766-3767.
113. Salehi, B., et al., *The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials*. Pharmaceuticals, **2019**. 12(1): p. 11.
114. Saponara, S., et al., *(+/-)-Naringenin as large conductance Ca⁽²⁺⁾-activated K⁺ (BK_{Ca}) channel opener in vascular smooth muscle cells*. British journal of pharmacology, **2006**. 149(8): p. 1013-1021.
115. Kicinska, A., et al., *Regulation of the Mitochondrial BK(Ca) Channel by the Citrus Flavonoid Naringenin as a Potential Means of Preventing Cell Damage*. Molecules, **2020**. 25(13).
116. Mukai, R., *Prenylation enhances the biological activity of dietary flavonoids by altering their bioavailability*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **2018**. 82(2): p. 207-215.
117. Yazaki, K., K. Sasaki, and Y. Tsurumaru, *Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites*. Phytochemistry, **2009**. 70(15-16): p. 1739-45.
118. Stompor, M., Ł. Uram, and R. Podgórski, *In Vitro Effect of 8-Prenylnaringenin and Naringenin on Fibroblasts and Glioblastoma Cells-Cellular Accumulation and Cytotoxicity*. Molecules, **2017**. 22(7).
119. Mukai, R., et al., *8-Prenylnaringenin promotes recovery from immobilization-induced disuse muscle atrophy through activation of the Akt phosphorylation*

- pathway in mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, **2016**. 311(6): p. R1022-r1031.
120. Soromou, L.W., et al., *Regulation of Inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Murine Macrophage by 7-O-Methylnaringenin*. Molecules, **2012**. 17(3): p. 3574-3585.
 121. Tomás-Barberán, F.A. and M.N. Clifford, *Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, **2000**. 80(7): p. 1073-1080.
 122. Iwashina, T., *The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants*. Journal of Plant Research, **2000**. 113(3): p. 287-299.
 123. Kolot, C., et al., *Bioavailability of naringenin chalcone in humans after ingestion of cherry tomatoes*. Int J Vitam Nutr Res, **2020**. 90(5-6): p. 411-416.
 124. Escribano-Ferrer, E., et al., *In Vivo Anti-inflammatory and Antiallergic Activity of Pure Naringenin, Naringenin Chalcone, and Quercetin in Mice*. J Nat Prod, **2019**. 82(2): p. 177-182.
 125. Testai, L., et al., *Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, **2013**. 65(5): p. 750-756.
 126. Khoo, H.E., et al., *Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits*. Food & nutrition research, **2017**. 61(1): p. 1361779-1361779.
 127. Castañeda-Ovando, A., et al., *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chemistry, **2009**. 113(4): p. 859-871.
 128. Szaniawska M. , T.A., Szymczyk K., *Budowa, właściwości i zastosowanie antocyjanów*. Nauki Inżynierskie i Technologie, **2015**. 2(17): p. 63-78.
 129. Chuang, C.-C. and M.K. McIntosh, *Potential Mechanisms by Which Polyphenol-Rich Grapes Prevent Obesity-Mediated Inflammation and Metabolic Diseases*. Annual Review of Nutrition, **2011**. 31(1): p. 155-176.
 130. Guo, H. and W. Ling, *The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: experimental evidence and clinical perspectives*. Rev Endocr Metab Disord, **2015**. 16(1): p. 1-13.
 131. McGhie, T.K., et al., *Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats*. J Agric Food Chem, **2003**. 51(16): p. 4539-48.
 132. Solverson, P., *Anthocyanin Bioactivity in Obesity and Diabetes: The Essential Role of Glucose Transporters in the Gut and Periphery*. Cells, **2020**. 9(11).
 133. Durner, D., *12 - Improvement and Stabilization of Red Wine Color*, in *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, R. Carle and R.M. Schweiggert, Editors. **2016**, Woodhead Publishing. p. 239-264.
 134. Xu, Y., et al., *Malvidin-3-O-Glucoside from Blueberry Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Transcription Factor EB-Mediated Lysosomal Function and Activating the Nrf2/ARE Signaling Pathway*. J Agric Food Chem, **2021**. 69(16): p. 4663-4673.
 135. Sakaki, J.R., M.M. Melough, and O.K. Chun, *Chapter 14 - Anthocyanins and anthocyanin-rich food as antioxidants in bone pathology*, in *Pathology*, V.R. Preedy, Editor. **2020**, Academic Press. p. 145-158.
 136. Shin, D.Y., et al., *Induction of apoptosis and inhibition of invasion in human hepatoma cells by anthocyanins from meoru*. Ann N Y Acad Sci, **2009**. 1171: p. 137-48.

137. Jiménez, A., et al., *The biological activity of the wine anthocyanins delphinidin and petunidin is mediated through Msn2 and Msn4 in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, **2010**. 10(7): p. 858-69.
138. Crupi, P., et al., *HPLC-DAD-ESI-MS analysis of flavonoid compounds in 5 seedless table grapes grown in Apulian Region*. J Food Sci, **2012**. 77(2): p. C174-81.
139. Lossi, L., et al., *Protective Effects of Some Grapevine Polyphenols against Naturally Occurring Neuronal Death*. Molecules, **2020**. 25(12).
140. Ho, M.L., et al., *Peonidin 3-glucoside inhibits lung cancer metastasis by downregulation of proteinases activities and MAPK pathway*. Nutr Cancer, **2010**. 62(4): p. 505-16.
141. Zhou, Y. and C.J. Lingle, *Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism*. J Gen Physiol, **2014**. 144(5): p. 415-40.
142. Zhou, Y., X.-M. Xia, and C.J. Lingle, *The functionally relevant site for paxilline inhibition of BK channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **2020**. 117(2): p. 1021-1026.
143. Kampa, R.P., et al., *Flavonoid quercetin abolish paxilline inhibition of the mitochondrial BK_{Ca} channel*. Mitochondrion, **2022**. 65: p. 23-32.
144. Erazo, S., et al., *Antibacterial diterpenoids from Fabiana densa var. ramulosa*. Planta Med, **2002**. 68(4): p. 361-3.
145. Buniam, J., et al., *20-Hydroxyecdysone ameliorates metabolic and cardiovascular dysfunction in high-fat-high-fructose-fed ovariectomized rats*. BMC Complement Med Ther, **2020**. 20(1): p. 140.
146. Lim, H.S., et al., *The insect molting hormone 20-hydroxyecdysone protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity in a mouse model of Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, **2020**. 159: p. 23-36.
147. Günther, J., et al., *Reciprocal mutations of two multifunctional β -amyrin synthases from Barbarea vulgaris shift α/β -amyrin ratios*. Plant Physiol, **2022**. 188(3): p. 1483-1495.
148. de Melo, K.M., et al., *α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from Protium heptaphyllum suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells*. Biomedicine & Pharmacotherapy, **2019**. 109: p. 1860-1866.
149. Ching, J., et al., *Beta-amyrin from Ardisia elliptica Thunb. is more potent than aspirin in inhibiting collagen-induced platelet aggregation*. Indian Journal of Experimental Biology, **2010**. 48(3): p. 275-279.
150. Oliveira, F.A., et al., *Gastroprotective effect of the mixture of α -and β -amyrin from Protium heptaphyllum: Role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons*. Planta medica, **2004**. 70(08): p. 780-782.
151. Melo, C.M., et al., *Anti-inflammatory effect of α , β -amyrin, a triterpene from Protium heptaphyllum, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice*. Inflammation research, **2011**. 60(7): p. 673-681.
152. Huang, P., L.-Y. Sun, and Y.-Q. Zhang, *A Hopeful Natural Product, Pristimerin, Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Autophagy in Esophageal Cancer Cells*. Analytical Cellular Pathology, **2019**. p. 6127169.
153. Fujita, H., *The history of lymphadenectomy for esophageal cancer and the future prospects for esophageal cancer surgery*. Surgery today, **2015**. 45(2): p. 140-149.
154. Li, J., et al., *Pristimerin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration in H1299 Lung Cancer Cells*. J Cancer, **2020**. 11(21): p. 6348-6355.

155. Yan, Y.Y., et al., *The triterpenoid pristimerin induces U87 glioma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction*. *Oncol Lett*, **2013**. 5(1): p. 242-248.
156. Ulbricht, W., *Effects of veratridine on sodium currents and fluxes*. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Volume 133, **1998**: p. 1-54.
157. Brazil, O. and M. Fontana, *Unequal depolarization of the membrane of the rat diaphragm muscle fibres caused by veratrine*. *Pflügers Archiv*, **1985**. 404(1): p. 45-49.
158. Sutro, J.B., *Kinetics of veratridine action on Na channels of skeletal muscle*. *The Journal of general physiology*, **1986**. 87(1): p. 1-24.
159. Wermelskirchen, D., et al., *Flunarizine and R 56865 suppress veratridine-induced increase in oxygen consumption and uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in rat cortical synaptosomes*. *Neuropharmacology*, **1992**. 31(3): p. 235-241.
160. Bourin, M., F. Chenu, and M. Hascoët, *The role of sodium channels in the mechanism of action of antidepressants and mood stabilizers*. *Curr Drug Targets*, **2009**. 10(11): p. 1052-60.
161. Saitoh, A., et al., *The voltage-gated sodium channel activator veratrine induces anxiogenic-like behaviors in rats*. *Behav Brain Res*, **2015**. 292: p. 316-22.
162. Silva Freitas, E.M., M.M. Fagian, and M.A. da Cruz Höfling, *Effects of veratrine and veratridine on oxygen consumption and electrical membrane potential of isolated rat skeletal muscle and liver mitochondria*. *Toxicol*, **2006**. 47(7): p. 780-787.
163. Bradley, P.B., *Chapter 7 - Drugs affecting the parasympathetic system*, in *Introduction to Neuropharmacology*, P.B. Bradley, Editor. **1989**, Butterworth-Heinemann. p. 69-82.
164. Joshaghani, M., et al., *Effect of Homatropine eye drops on pain after photorefractive keratectomy: A pilot study*. *Saudi Journal of Ophthalmology*, **2013**. 27(2): p. 83-85.
165. Yue, R., et al., *Sempervirine Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis by Regulating Wnt/ β -Catenin Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma*. *Front Pharmacol*, **2021**. 12: p. 806091.
166. Caggiano, C., et al., *Sempervirine inhibits RNA polymerase I transcription independently from p53 in tumor cells*. *Cell Death Discov*, **2020**. 6(1): p. 111.
167. Dumlu, F.A., et al., *Anti-inflammatory and antioxidant properties of jervine, a steroidal alkaloid from rhizomes of *Veratrum album**. *Phytomedicine*, **2019**. 55: p. 191-199.
168. Yakan, S., et al., *The protective role of jervine against radiation-induced gastrointestinal toxicity*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, **2019**. 34(1): p. 789-798.
169. Lei, W. and Z. Huo, *Jervine inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) progression by suppressing Hedgehog and AKT signaling via triggering autophagy-regulated apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2020**. 533(3): p. 397-403.
170. Haws, C., et al., *CFTR channels in immortalized human airway cells*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **1992**. 263(6): p. L692-L707.
171. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, **1977**. 36(1): p. 59-74.
172. Gałecka, S., et al., *Single channel properties of mitochondrial large conductance potassium channel formed by BK-VEDEC splice variant*. *Sci Rep*, **2021**. 11(1): p. 10925.

173. Verkhatsky, A. and V. Pappas, *History of electrophysiology and the patch clamp*. Methods Mol Biol, **2014**. 1183: p. 1-19.
174. Bednarczyk, P., et al., *Patch-Clamp Recording of the Activity of Ion Channels in the Inner Mitochondrial Membrane*. Methods Mol Biol, **2021**. 2276: p. 235-248.
175. Sek, A., et al., *Identification of the Large-Conductance Ca^{2+} -Regulated Potassium Channel in Mitochondria of Human Bronchial Epithelial Cells*. Molecules, **2021**. 26(11).
176. Giangiacomo, K.M., M.L. Garcia, and O.B. McManus, *Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle*. Biochemistry, **1992**. 31(29): p. 6719-6727.
177. Malsy, M., et al., *Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway*. European Journal of Medical Research, **2019**. 24(1): p. 5.
178. O'Rourke, B., S. Cortassa, and M.A. Aon, *Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death*. Physiology (Bethesda), **2005**. 20: p. 303-15.
179. Krabbendam, I.E., et al., *Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels and their role in cell life and death pathways*. Cell Calcium, **2018**. 69: p. 101-111.
180. Borchert, G.H., M. Hlaváčková, and F. Kolář, *Pharmacological activation of mitochondrial BK(Ca) channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury*. Exp Biol Med (Maywood), 2013. 238(2): p. 233-41.
181. Szewczyk, A., W. Jarmuszkiewicz, and W.S. Kunz, *Mitochondrial potassium channels*. IUBMB Life, **2009**. 61(2): p. 134-43.
182. Rotko, D., et al., *Heme is required for carbon monoxide activation of mitochondrial BK(Ca) channel*. Eur J Pharmacol, **2020**. 881: p. 173191.
183. Sato, T., et al., *Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A*. Circulation, **2005**. 111(2): p. 198-203.
184. Xia, X.M., X. Zeng, and C.J. Lingle, *Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels*. Nature, **2002**. 418(6900): p. 880-4.
185. Bentzen, B.H., et al., *The small molecule NS11021 is a potent and specific activator of Ca^{2+} -activated big-conductance K^+ channels*. Mol Pharmacol, **2007**. 72(4): p. 1033-44.
186. Rockman, M.E., A.G. Vouga, and B.S. Rothberg, *Molecular mechanism of BK channel activation by the smooth muscle relaxant NS11021*. Journal of General Physiology, **2020**. 152(6).
187. Jabůrek, M., et al., *State-dependent inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate*. J Biol Chem, **1998**. 273(22): p. 13578-82.
188. Sanchez, M. and O.B. McManus, *Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel*. Neuropharmacology, 1996. 35(7): p. 963-8.
189. Bednarczyk, P., et al., *Putative Structural and Functional Coupling of the Mitochondrial BK_{Ca} Channel to the Respiratory Chain*. PLOS ONE, **2013**. 8(6): p. e68125.
190. Laskowski, M., et al., *Single-Channel Properties of the ROMK-Pore-Forming Subunit of the Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel*. Int J Mol Sci, **2019**. 20(21).

191. Stowe, D.F., et al., *Protection against cardiac injury by small Ca²⁺-sensitive K⁺ channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane*. *Biochim Biophys Acta*, **2013**. 1828(2): p. 427-42.
192. Zhao, R., et al., *Tethered peptide neurotoxins display two blocking mechanisms in the K⁺ channel pore as do their untethered analogs*. *Science Advances*, **2020**. 6(10): p. eaaz3439.
193. Li, Q. and J. Yan, *Modulation of BK Channel Function by Auxiliary Beta and Gamma Subunits*. *International review of neurobiology*, **2016**. 128: p. 51-90.
194. Butler, A., et al., *mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels*. *Science*, **1993**. 261(5118): p. 221-4.
195. Navaratnam, D.S., et al., *Differential distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel splice variants among hair cells along the tonotopic axis of the chick cochlea*. *Neuron*, **1997**. 19(5): p. 1077-85.
196. Orio, P., et al., *New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits*. *News Physiol Sci*, **2002**. 17: p. 156-61.
197. Shi, J., et al., *Inhibition of Martentoxin on Neuronal BK Channel Subtype: Implications for a Novel Interaction Model*. *Biophysical Journal*, **2008**. 94(9): p. 3706-3713.
198. Strøbaek, D., et al., *Modulation of the Ca²⁺-dependent K⁺ channel, hslo, by the substituted diphenylurea NS 1608, paxilline and internal Ca²⁺*. *Neuropharmacology*, **1996**. 35(7): p. 903-14.
199. Lohret, T.A. and K.W. Kinnally, *Multiple conductance channel activity of wild-type and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC)-less yeast mitochondria*. *Biophys J*, **1995**. 68(6): p. 2299-309.
200. Wang, X.-L., et al., *Membrane trafficking of large conductance Ca²⁺- and voltage-activated K⁺ (BK) channels is regulated by Rab4 GTPase*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **2020**. 1867(4): p. 118646.
201. Tian, L., et al., *Palmitoylation gates phosphorylation-dependent regulation of BK potassium channels*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2008**. 105(52): p. 21006-21011.
202. Duncan, P.J., et al., *S-Acylation controls functional coupling of BK channel pore-forming α -subunits and β 1-subunits*. *Journal of Biological Chemistry*, **2019**. 294(32): p. 12066-12076.
203. Ahring, P.K., et al., *Stable expression of the human large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel α - and β -subunits in HEK293 cells*. *FEBS Letters*, **1997**. 415(1): p. 67-70.
204. Du, X., et al., *Loss-of-function BK channel mutation causes impaired mitochondria and progressive cerebellar ataxia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2020**. 117(11): p. 6023-6034.
205. Wen, K., et al., *Recent Research on Flavonoids and their Biomedical Applications*. *Current Medicinal Chemistry*, **2021**. 28(5): p. 1042-1066.
206. R. Shi, J.X., ZT. Xiao., *Naringin and Naringenin Relax Rat Tracheal Smooth by Regulating BKCa Activation*. *Journal of Medicinal Food*, **2019**. 22(9): p. 963-970.
207. Gąsiorowska, J., et al., *The influence of 8-prenylnaringenin on the activity of voltage-gated Kv1.3 potassium channels in human Jurkat T cells*. *Cell Mol Biol Lett*, **2012**. 17(4): p. 559-70.
208. van de Schans, M.G., et al., *Involvement of a Hydrophobic Pocket and Helix 11 in Determining the Modes of Action of Prenylated Flavonoids and Isoflavonoids in the Human Estrogen Receptor*. *Chembiochem*, **2015**. 16(18): p. 2668-77.

209. Nguyen, H.D., et al., *Prenylflavanones as Novel T-Type Calcium Channel Blockers Useful for Pain Therapy*. Natural Product Communications, **2019**. 14(9).
210. Teisseyre, A., et al., *The Influence of 6-Prenylnaringenin and Selected Non-prenylated Flavonoids on the Activity of Kv1.3 Channels in Human Jurkat T Cells*. J Membr Biol, **2018**. 251(5-6): p. 695-704.
211. Kim, S.J., et al., *Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from Sophora flavescens*. Biol Pharm Bull, **2003**. 26(9): p. 1348-50.
212. Son, J.K., et al., *Prenylated flavonoids from the roots of Sophora flavescens with tyrosinase inhibitory activity*. Planta Med, **2003**. 69(6): p. 559-61.
213. Arung, E.T., et al., *3-Prenyl luteolin, a new prenylated flavone with melanin biosynthesis inhibitory activity from wood of Artocarpus heterophyllus*. Fitoterapia, **2010**. 81(6): p. 640-3.
214. Arung, E.T., K. Shimizu, and R. Kondo, *Structure-activity relationship of prenyl-substituted polyphenols from Artocarpus heterophyllus as inhibitors of melanin biosynthesis in cultured melanoma cells*. Chem Biodivers, **2007**. 4(9): p. 2166-71.
215. Hisanaga, A., et al., *Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of 8-prenyl quercetin*. Mol Nutr Food Res, **2016**. 60(5): p. 1020-32.
216. Kim, A.Y., et al., *Enhanced antioxidant effect of prenylated polyphenols as Fyn inhibitor*. Free Radical Biology and Medicine, **2012**. 53(5): p. 1198-1208.
217. Hošek, J., et al., *Prenylated and geranylated flavonoids increase production of reactive oxygen species in mouse macrophages but inhibit the inflammatory response*. J Nat Prod, **2013**. 76(9): p. 1586-91.
218. Isika, D., et al., *Novel quercetin and apigenin-acetamide derivatives: design, synthesis, characterization, biological evaluation and molecular docking studies*. RSC Adv, **2020**. 10(42): p. 25046-25058.
219. Copmans, D., et al., *Methylated flavonoids as anti-seizure agents: Naringenin 4',7-dimethyl ether attenuates epileptic seizures in zebrafish and mouse models*. Neurochemistry International, **2018**. 112: p. 124-133.
220. Pal, R., et al., *Voltage gated sodium channel inhibitors as anticonvulsant drugs: A systematic review on recent developments and structure activity relationship studies*. Bioorganic Chemistry, **2021**. 115: p. 105230.
221. Gąsiorowska, J., et al., *Inhibition of Kv1.3 Channels in Human Jurkat T Cells by Xanthohumol and Isoxanthohumol*. J Membr Biol, **2015**. 248(4): p. 705-11.
222. Haseeb, S., B. Alexander, and A. Baranchuk, *Wine and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review*. Circulation, **2017**. 136(15): p. 1434-1448.
223. Lippi, G., et al., *Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox"*. Semin Thromb Hemost, **2010**. 36(1): p. 59-70.
224. Aiello E. and Cingolani H., *A possible subcellular mechanism underlying the "French paradox": the opening of mitochondrial K_{ATP} channels*. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, **2011**. 36(5): p. 768-772.
225. Wang, Z., et al., *Protective Effect of Anthocyanin on Paraquat-Induced Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Type II Cells*. Med Sci Monit, **2018**. 24: p. 7980-7987.
226. Ullah, R., et al., *Natural Antioxidant Anthocyanins-A Hidden Therapeutic Candidate in Metabolic Disorders with Major Focus in Neurodegeneration*. Nutrients, **2019**. 11(6).
227. Garcia, C. and C.N. Blesso, *Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis*. Free Radical Biology and Medicine, **2021**. 172: p. 152-166.

228. Szaniawska, M., A. Taraba, and K. Szymczyk, *Budowa, właściwości i zastosowanie antocyjanów*. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, **2015**, 2(17): p. 63-78.
229. Grigoriev, S.M., et al., *Regulation of mitochondrial K_{ATP} channel by redox agents*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, **1999**. 1410(1): p. 91-96.
230. Kongthitlerd, P., et al., *Cyanidin-3-rutinoside stimulated insulin secretion through activation of L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels and the PLC-IP3 pathway in pancreatic β -cells*. Biomedicine & Pharmacotherapy, **2022**. 146: p. 112494.
231. Venturini, E., et al., *Targeting the Potassium Channel Kv1.3 Kills Glioblastoma Cells*. Neurosignals, **2017**. 25(1): p. 26-38.
232. Leanza, L., et al., *Clofazimine, Psora-4 and PAP-1, inhibitors of the potassium channel Kv1.3, as a new and selective therapeutic strategy in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, **2013**. 27(8): p. 1782-5.
233. Chen, J., et al., *Jervine exhibits anticancer effects on nasopharyngeal carcinoma through promoting autophagic apoptosis via the blockage of Hedgehog signaling*. Biomed Pharmacother, **2020**. 132: p. 110898.
234. Mannowetz, N., M.R. Miller, and P.V. Lishko, *Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2017**. 114(22): p. 5743-5748.
235. Rehfeld, A., *Revisiting the action of steroids and triterpenoids on the human sperm Ca^{2+} channel CatSper*. Mol Hum Reprod, **2020**. 26(11): p. 816-824.

Lista publikacji

Z tematyki rozprawy doktorskiej:

1. **Sęk A**, Kampa RP, Kulawiak B, Szewczyk A, Bednarczyk P. „Identification of the Large-Conductance Ca^{2+} -Regulated Potassium Channel in Mitochondria of Human Bronchial Epithelial Cells”. *Molecules*. 2021;26(11):3233. doi: 10.3390/molecules26113233. – praca doświadczalna.
2. Bednarczyk P, Kampa RP, Gałęcka S, **Sęk A**, Walewska A, Koprowski P. „Patch-Clamp Recording of the Activity of Ion Channels in the Inner Mitochondrial Membrane”. *Methods Mol Biol*. 2021;2276:235-248. doi: 10.1007/978-1-0716-1266-8_18. – praca przeglądowa.
3. Szewczyk A, Bednarczyk P, Jędraszko J, Kampa RP, Koprowski P, Krajewska M, Kucman S, Kulawiak B, Laskowski M, Rotko D, **Sęk A**, Walewska A, Żochowska M, Wrzosek A. „Mitochondrial potassium channels - an overview”. *Postepy Biochem*. 2018;64(3):196-212. doi: 10.18388/pb.2018_132. – praca przeglądowa.
4. **Sęk A**, Bednarczyk P, Botta B, Bauer T, Szewczyk A. „Regulation of mitochondrial BK_{Ca} channel by naringenin derivatives”, 2022 – praca doświadczalna (w przygotowaniu).

Pozostałe:

5. Kampa RP, **Sęk A**, Szewczyk A, Bednarczyk P. „Cytoprotective effects of the flavonoid quercetin by activating mitochondrial BK_{Ca} channels in endothelial cells”. *Biomed Pharmacother*. 2021;142:112039. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112039. Epub 2021 – praca doświadczalna.
6. Kicinska A, Kampa RP, Daniluk J, **Sęk A**, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A, Bednarczyk P. „Regulation of the Mitochondrial BK_{Ca} Channel by the Citrus Flavonoid Naringenin as a Potential Means of Preventing Cell Damage” *Molecules*. 2020;25(13):3010. doi: 10.3390/molecules25133010. – praca doświadczalna.
7. Kampa RP, Flori L, **Sęk A**, Spezzini J, Brogi S, Szewczyk A, Calderone V, Bednarczyk P, Testai L. „Luteolin-induced activation of mitochondrial BK_{Ca} channels undisclosed mechanism of cytoprotection”. *Antioxidants* 2022, 11(10), 1892; doi.org/10.3390/antiox11101892 – praca doświadczalna.
8. Kampa RP, **Sęk A**, Bednarczyk P, Szewczyk A, Calderone V, Testai L. „Flavonoids as new regulators of mitochondrial potassium channels: contribution to cardioprotection” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2022 – praca przeglądowa (złożona do druku).

Inne:

9. Paw M, Wnuk D, Kądziołka D, **Sęk A**, Lasota S, Czyż J, Madeja Z, Michalik M. „Fenofibrate Reduces the Asthma-Related Fibroblast-To-Myofibroblast Transition by TGF- β /Smad2/3 Signaling Attenuation and Connexin 43-Dependent Phenotype Destabilization”. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2571. doi: 10.3390/ijms19092571. – praca eksperymentalna.