

# Rafał Paweł Kampa

# Flawonoidy kardioprotekcyjne: nowe regulatory mitochondrialnych kanałów potasowych

Rozprawa doktorska

wykonana w Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR: Dr hab. Piotr Bednarczyk, Prof. SGGW

Warszawa, 2021

Badania niniejszej rozprawy doktorskiej powstały dzięki finansowemu wsparciu Narodowego Centrum Nauki w Krakowie w ramach grantu badawczego OPUS 11 nr 2016/21/B/NZ1/02769 przyznanego dr hab. Piotrowi Bednarczykowi, Prof. SGGW (konsorcjum: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu)

Autor uzyskał środki finansowe w ramach finansowania stypendium doktorskiego z Narodowego Centrum Nauki - grant ETIUDA 8 nr 2020/36/T/NZ1/00116



Pragnę podziękować Promotorowi rozprawy Dr. hab. Piotrowi Bednarczykowi, Prof. SGGW za opiekę naukową w trakcie studiów doktoranckich oraz pomoc w przygotowaniu tej rozprawy

Dziękuję także Prof. dr hab. Adamowi Szewczykowi za możliwość realizacji badań niniejszej rozprawy doktorskiej i cenne wskazówki oraz współpracownikom z Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Rodzicom

# SPIS TREŚCI

INDEKS SKRÓTÓW	9
1. Wprowadzenie	14
1.1 Mitochondria w chorobach układu sercowo-naczyniowego	14
1.1.1 Rola śródbłonka naczyniowego	15
1.1.2 Dysfunkcje mitochondriów w patogenezie chorób układu krążenia	16
1.2 Budowa i funkcje mitochondriów	18
1.3 Mitochondrialne kanały potasowe	20
1.3.1 Mitochondrialny kanał potasowy BK <sub>Ca</sub>	22
1.3.1.1 Substancje regulujące aktywność kanału mitoBK <sub>Ca</sub>	23
1.3.1.2 Znaczenie fizjologiczne regulacji kanału mitoBK <sub>Ca</sub>	24
1.3.1.3 Rola mitochondrialnego cyklu potasowego w cytoprotekcji	24
1.4 Właściwości i funkcje flawonoidów kardioprotekcyjnych	27
1.4.1 Naringenina i jej pochodne	28
1.4.1.1 Naringenina-TPP <sup>+</sup>	29
1.4.1.2 Chalkon naringeniny	29
1.4.1.3 Pochodna cukrowa naringeniny	30
1.4.2 Luteolina: flawonoid z grupy flawonów	30
1.4.3 Cyjanidyna: naturalny barwnik z grupy antocyjanów	31
1.4.4 Kwercetyna: związek z grupy flawonoli	31
1.5 Rola flawonoidów w kardioprotekcji	32
2. Założenia i cel rozprawy	34
3. Materiały i metody	36
3.1 Substancje chemiczne wykorzystane w badaniach	36
3.2 Komórki śródbłonka naczyniowego jako model badawczy	41
3.3 Pomiary elektrofizjologiczne	42
3.3.1 Procedura oczyszczania mitochondriów	42
3.3.2 Otrzymywanie mitoplastów do pomiarów elektrofizjologicznych	43
3.3.3 Technika patch-clamp	43
3.4 Pomiar potencjału błonowego mitochondriów	45
3.5 Pomiar oddychania komórkowego	46
3.6 Ocena przeżywalności komórek	46
3.6.1 Badanie właściwości cytoprotekcyjnych flawonoidów	48

3.7 Ocena migracji komórek	48
3.8 Ocena poziomu ekspresji genów	49
3.8.1 Izolacja RNA	49
3.8.2 Pomiar stężenia RNA w eluacie	50
3.8.3 Reakcja odwrotnej transkrypcji	50
3.8.4 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym	51
3.9 Analiza poziomu białek metodą Western blot	52
3.9.1 Oczyszczanie mitochondriów metodą permeabilizacji	53
3.9.2 Przygotowanie lizatów białkowych	54
3.9.3 Pomiar stężenia białka	55
3.9.4 Elektroforetyczny rozdział białek i ich detekcja	55
4. Wyniki	59
4.1 Charakterystyka biofizyczna i farmakologiczna kanału mitoBK <sub>Ca</sub>	59
4.2 Regulacja kanału mito $BK_{Ca}$ przez flawonoidy kardioprotekcyjne	63
4.2.1 Naringenina	63
4.2.1.1 Wpływ naringeniny na aktywność mitoBK <sub>Ca</sub>	63
4.2.1.2 Potencjał błonowy mitochondriów w obecności naringeniny	65
4.2.1.3 Przeżywalność komórek	66
4.2.1.4 Rola naringeniny w cytoprotekcji	69
4.2.1.5 Udział naringeniny w migracji komórkowej	72
4.2.2 Pochodne naringeniny	74
4.2.2.1 Naringenina-TPP <sup>+</sup>	74
4.2.2.1.1 Zmiany aktywności kanału mitoBK <sub>Ca</sub> pod wpływem naringeniny-TPP <sup>+</sup>	75
4.2.2.1.2 Regulacja potencjału błonowego mitochondriów przez naringeninę-TPP <sup>+</sup>	76
4.2.2.1.3 Ocena cytotoksyczności naringeniny-TPP <sup>+</sup>	77
4.2.2.1.4 Wpływ naringeniny-TPP <sup>+</sup> na migrację komórek	78
4.2.2.2 Chalkon naringeniny	80
4.2.2.2.1 Ocena aktywności kanału mitoBK <sub>Ca</sub> w obecności chalke	onu80
4.2.2.3 Pochodna cukrowa naringeniny	81
4.3.2.3.1 Wpływ 6-C-glukozydu naringeniny na aktywność mitoBK <sub>Ca</sub>	kanału 82
4.2.3 Luteolina	83

	4.2.3.1 Regulacja aktywności mitoBK <sub>Ca</sub> przez luteolinę w warunkach kontrolnych i w obecności DTT83
	4.2.3.2 Wpływ luteoliny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej .86
	4.2.3.3 Cytotoksyczność luteoliny
	4.2.3.4 Ocena właściwości protekcyjnych luteoliny88
	4.2.3.5 Udział luteoliny w migracji komórek90
	4.2.4 Cyjanidyna
	4.2.4.1 Zmiany aktywności kanału mitoBK <sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych i zredukowanych92
	4.2.4.2 Udział cyjanidyny w zmianach potencjału błony mitochondrialnej94
	4.2.4.3 Ocena toksyczności cyjanidyny95
	4.2.4.4 Rola cyjanidyny w cytoprotekcji97
	4.2.4.5 Wpływ cyjanidyny na migrację komórek98
	4.2.5 Kwercetyna
	4.2.5.1 Efekt kwercetyny na aktywność kanału mitoBK <sub>Ca</sub> 99
	4.2.5.2 Analiza aktywności kanału mitoBK <sub>Ca</sub> w obecności kwercetyny, paksyliny i izoramnetyny101
	4.2.5.3 Udział kwercetyny i izoramnetyny w depolaryzacji mitochondriów i oddychaniu komórkowym106
	4.2.5.4 Ocena cytotoksyczności kwercetyny108
	4.2.5.5 Cytoprotekcyjne działanie kwercetyny
	4.2.5.6 Analiza migracji komórek w obecności kwercetyny113
	4.2.5.7 Wpływ kwercetyny na ekspresję genów i poziom białek kanału mitoBKca
5. Dv	skusia
5.1	Udział kanału mitoBK <sub>Ca</sub> w cytoprotekcji
5.2	Regulacia aktywności kanału mitoBK <sub>Ca</sub> przez flawonojdy kardioprotekcyjne118
	5.2.1 Naringenina i jej pochodne
	5.2.2 Luteolina i cyjanidyna jako aktywatory mitoBK <sub>Ca</sub> w warunkach zredukowanych
	5.2.3 Regulacja kanału mitoBK <sub>Ca</sub> przez kwercetynę, izoramnetynę i paksylinę 123
5.3	Wpływ flawonoidów na potencjał błony mitochondrialnej i oddychanie komórkowe
5.4	Rola flawonoidów w procesach apoptozy, nekrozy i migracji komórek

5.5 Zmiany ekspresji genów i poziomu białka kanału mitoBK <sub>Ca</sub> w obecności	
kwercetyny	132
6. Wnioski	134
7. Streszczenie w języku polskim	137
8. Streszczenie w języku angielskim	138
SPIS PUBLIKACJI	139
BIBLIOGRAFIA	141

## INDEKS SKRÓTÓW

A549	linia komórek ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc				
AKT	kinaza serynowo-treoninowa AKT; ang. serine-threonine kinase				
APS	nadsiarczan amonu; ang. ammonium persulfate				
ATP	adenozyno-5'-trifosforan; ang. adenosine-5'-triphosphate				
ATCC	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych, ang. American Type Culture Collection				
Bcl-2	regulator apoptozy komórek B chłoniaka 2; ang. B-cell lymphoma 2 apoptosis regulator				
BK <sub>Ca</sub>	kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia; <i>ang. large- conductance calcium-regulated potassium channel</i>				
BSA	surowicza albumina bydlęca; ang. bovine serum albumin				
cDNA	komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy; ang. complementary deoxyribonucleic acid				
CGS7184	[(4-chlorofenylo) amino] okso]-2-hydroksy-6-trifluorometylo-1H-indolo- 3-karboksylan etylu); ang. ethyl [(4-chlorophenyl) amino] oxo]-2- hydroxy-6-trifluoromethyl-1H-indole-3-carboxylate)				
CHX	cykloheksymid; ang. cycloheximide				
COXIV	podjednostka IV mitochondrialnej oksydazy cytochromu c; ang. mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV				
СҮА	cyjanidyna; ang. cyanidin				
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenyloindol; ang. 4',6-diamidin-2-phenylindole				
DMEM	płyn hodowlany Dulbecco's Modified Eagle's; ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium				
DMSO	dimetylosulfotlenek; ang. dimethylsulfoxide				
DNaza	enzym tnący DNA, deoksyrybonukleaza; ang. deoxyribonucleases				
dNTP	trifosforan deoksyrybokukleotydów; ang. deoxy nucleoside triphosphat				
DTT	ditiotreitol; ang. dithiothreitol				
EA.hy926	hybryda komórek somatycznych śródbłonka naczyniowego (z komórkami A549); ang. human umbilical vein endothelial somatic cell hybrid				
EGTA	kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy; ang. ethylene glycol-O-O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid				

ER	siateczka śródplazmatyczna, ang. endoplasmic reticulum				
ET	transport elektronów; ang.electron transport				
FBS	płodowa surowica bydlęca; ang. fetal bovine serum				
FCCP	p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu, ang. carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone				
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; ang. glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase				
GSB	0,075% Saponina, 5% NDS (surowica ośla, <i>ang. normal donkey serum</i> ), 1% BSA (surowicza albumina bydlęca, <i>ang. bovine serum albumin</i> )				
НАТ	hipoksantyna-aminopteryna-tymidyna; ang. hypoxanthine-aminopterin- thymidine				
HBSS	roztwór zrównoważonej soli Hanksa; ang. Hanks' Balanced Salt solution				
HCF	linia ludzkich fibroblastów mięśnia sercowego; ang. human cardiac fibroblasts				
HEPES	kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy; <i>ang.</i> 4-(2- <i>hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid</i>				
hERG	ludzkie kanały potasowe genu Ether-à-go-go; ang. the human Ether-à-go-go-related gene channels				
Hsp	białko szoku termicznego; ang. heat shock protein				
IB	roztwór do izolacji mitochondriów o składzie: 210 mM mannitol; 70 mM sacharoza; 0,5 mM roztwór HEPES z ustalonym pH 7,2 wodorotlenkiem potasu KOH				
KCNE2	podjednostka regulatorowa 2 kanałów potasowych bramkowanych napięciem typu E, ang. potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 2				
KCNMA1	podjednostka $\alpha$ kanału BK <sub>Ca</sub> ; ang. potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1				
KCNMB1	podjednostka regulatorową $\beta$ 1 kanału BK <sub>Ca</sub> ; ang. potassium calcium- activated channel subfamily M regulatory beta 1				
KCNMB2	podjednostka regulatorową $\beta 2$ kanału BK <sub>Ca</sub> ; ang. potassium calcium- activated channel subfamily M regulatory beta 2				
KCNMB3	podjednostka regulatorową $\beta$ 3 kanału BK <sub>Ca</sub> ; ang. potassium calcium- activated channel subfamily M regulatory beta 3				
KCNMB4	podjednostka regulatorową β4 kanału BK <sub>Ca</sub> ; ang. potassium calcium- activated channel subfamily M regulatory beta 4				

Kv1.3 kanał potasowy bramkowany napięciem 1.3 zlokalizowany w błonie komórkowej; ang. plasma membrane voltage-gated potassium channel 1.3 **KWE** kwercetyna; ang. quercetin LDL lipoproteiny niskiej gęstości; ang. low-density lipoprotein LN229 symbol linii komórkowej glejaka lipaza lipoproteinowa; ang. lipoprotein lipase LPL LUT luteolina; ang. luteolin mito**BK**Ca mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia; ang. large-conductance calcium-regulated mitochondrial potassium channel mitoK<sub>ATP</sub> mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP; ang. ATPregulated mitochondrial potassium channel mitoKv1.3 mitochondrialny kanał potasowy bramkowany napięciem; ang. voltagegated mitochondrial potassium channel mitochondrialny kanał potasowy o małym/średnim przewodnictwie mitoS/IK<sub>Ca</sub> regulowany jonami wapnia; ang. low/medium-conductance calciumregulated mitochondrial potassium channel mitoSlo2 mitochondrialny kanał potasowy regulowany jonami sodu; ang. mitochondrial sodium-activated potassium channel mitoTASK-3 mitochondrialny wrażliwy na kwasy kanał potasowy związany z TWIK; ang. mitochondrial TWIK-related acid sensitive potassium channel mtDNA mitochondrialny kwas deoksyrybokukleinowy; ang. mitochondrial deoxyribonucleic acid mPTP megakanał mitochondrialny; ang. mitochondrial permeability transition pore NAR naringenina; ang. naringenin NDS surowica ośla; ang. normal donkey serum kotransporter 1 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>; ang Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> kotransporter 1 NKCC1 Nrf2 jądrowy czynnik erytroidu 2; ang. nuclear erythroid related factor 2 Nrf2-Keap-1 szlak jądrowego czynnika erytroidu 2 Kelch-podobnego związanego z hydratazą enoyl koenzymu A białka 1; ang. nuclear erythroid related factor 2 Kelch-like Eenoyl coenzyme A hydratase-associated protein 1

N'-[3,5-Bis (trifluorometylo) fenylo]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-ilo) NS11021 fenylo]-tiomocznik; ang. N'-[3,5-Bis (trifluoromethyl) phenyl]-N-[4bromo-2-(2H-tetrazol-5-yl) phenyl] -thiourea NS1619 1,3-Dihydro-1-[2-hydroksy-5-(trifluorometylo)fenylo]-5(trifluorometylo) -2H-benzimidazol-2-on; 1,3-Dihydro-1-[2-hydroxy-5ang. (trifluoromethyl) phenyl] -5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one PAX paksylina; ang. paxilline PBS sól fizjologiczna w buforze fosforanowym; ang. phosphate-buffered saline PCR reakcja łańcuchowa polimerazy; ang. polymerase chain reaction **PMSF** fluorek fenylometylosulfonylu; ang. phenylmethylsulfonyl fluoride prawdopodobieństwo otwarć kanału; ang. channels open probability Po PS fosfatydyloseryna; ang. phosphatidyloserine **PVDF** polifluorek winylidenu; ang. polyvinylidene fluoride RCK1 domena regulatorowa przewodnictwa potasu 1; ang. regulator subunit of conductance of potassium ions 1 RCK2 domena regulatorowa przewodnictwa potasu 2; ang. regulator subunit of conductance of potassium ions 2 **RFU** względne jednostki fluorescencji; ang. relative fluorescence units RFT reaktywne formy tlenu; ang. reactive oxygen species **RIPA** bufor do lizy komórek; ang. lysis buffer RLT bufor do izolacji RNA RLU względne jednostki luminescencji; ang. relative luminescence units **RNaza** enzym przecinające kwas rybonukleinowy; ang. enzyme cutting ribonucleic acid RPE bufor do izolacji RNA RT-qPCR ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym; ang. quantitative real-time polymerase chain reaction RW1 bufor do izolacji RNA SARS-CoV-2 koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2; ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 SD odchylenie standardowe; ang. standard deviation **SDS** siarczan dodecylu sodu; ang. sodium dodecyl sulfate

TBST	sól fizjologiczna buforowana TRIS z Tween 20 - monolaurynian polioksyetyleno (20) sorbitanu; ang. tris-buffered saline with Tween 20 - polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate				
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina; <i>ang. N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N'- Tetramethylethylenediamine</i>				
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ ; ang. tumor necrosis factor $\alpha$				
UCP	białko rozprzęgające; ang. uncoupling protein				
VDAC	kanał anionowy regulowany przez zmianę potencjału; ang. voltage - dependent anion channel				
ΔΔCt	metoda wyznaczania cyklu progowego PCR analizą maksimum drugiej pochodnej; ang. a method of determining the PCR threshold cycle by analysis of the second derivative maximum				

#### 1. Wprowadzenie

#### 1.1 Mitochondria w chorobach układu sercowo-naczyniowego

Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią główną przyczynę zgonów na świecie. Wysoki odsetek na tle innych zespołów chorobowych notuje się zarówno w Europie (ok. 45%), jak i w Stanach Zjednoczonych, gdzie choroby układu krążenia stanowią ok. 1/3 wszystkich przypadków śmiertelnych [1]. Zalicza się je do chorób cywilizacyjnych obok cukrzycy, otyłości, osteoporozy, chorób nowotworowych, depresji czy innych chorób dotyczących zdrowia psychicznego [2,3]. Spowodowane są w głównej mierze stresogennym trybem życia, niezdrową dietą (bogatą w substancje konserwujące, wzbogacaną sztucznymi aromatami i polepszaczami smaku), niekorzystnym wpływem środowiska (np. zanieczyszczenia powietrza), niską aktywnością fizyczną czy używkami. Większości z nich można zapobiegać poprzez wdrożenie odpowiedniej diety, bogatej w naturalne składniki oraz aktywność fizyczną [4,5].

Do chorób układu sercowo-naczyniowego zalicza się między innymi uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjne: zawał mięśnia sercowego, niewydolność serca, nadciśnienie, miażdzyce tętnic, polekowe uszkodzenie mięśnia sercowego, chorobę wieńcową, chorobę naczyń obwodowych, chorobę naczyń mózgu czy zwapnienie naczyń krwionośnych [6,7]. Ich etiologia jest bardzo złożona. Zaczynając od poziomu podstawowej jednostki budulcowej organizmu – komórki, gdzie dochodzi do nieprawidłowości metabolicznych, nadmiernej syntezy reaktywnych form tlenu (RFT, ang. reactive oxygen species), deficytów energetycznych, stresu retikularnego, rozregulowania mechanizmów autofagii czy indukcji apoptozy. Wszystkie z wymienionych procesów bezpośrednio lub pośrednio związane są z mitochondriami. Można zatem wnioskować, że dysfunkcja mitochondriów odgrywa kluczową rolę w indukcji zaburzeń komórkowych i dalej – w rozwoju schorzeń układu krążenia [1,8]. Powyżej przytoczone procesy na poziomie komórkowym wskazują, dlaczego zaburzenia wynikające z nieprawidłowego działania mitochondriów wykazują na ogół złożone objawy kliniczne i dlaczego przede wszystkim występują w tkankach wymagających zwiększonego zapotrzebowania energetycznego. Takimi bez wątpienia są tkanki układu sercowo-naczyniowego [9].

#### 1.1.1 Rola śródbłonka naczyniowego

Układ krążenia jest układem zamkniętym składającym się z żył i tętnic oraz naczyń włosowatych. Przepływ krwi w układzie krwionośnym jest wymuszony przez mięsień sercowy. Serce jest pompą zalewowo-tłoczącą, które pomimo tego, że jest wypełnione krwią, posiada własny system dostarczania substancji odżywczych w postaci sieci naczyń wieńcowych. U ssaków zbudowane jest ono z dwóch komór – prawej i lewej oraz znajdujących się nad nimi przedsionków – prawego i lewego. Kierunek przepływu krwi jest utrzymywany dzięki zastawkom, które zapobiegają jej cofaniu. Skoordynowany skurcz mięśnia sercowego możliwy jest dzięki wyspecjalizowanym układom komórek oraz układowi bodźcowo-przewodzącemu. Naczynia krwionośne zbudowane są z kilku warstw: wewnętrznej (najbliższa światłu naczynia) utworzonej z komórek śródbłonka zakotwiczonych w kolagenowej błonie podstawnej; warstwy środkowej zbudowanej z komórek mięśni gładkich i włókien kolagenowe, fibroblasty, makrofagi i komórki tuczne. Poszczególne warstwy oddzielają błony sprężyste. [10-12].

Przez długi okres czasu uważano, że śródbłonek naczyniowy stanowi jedynie mechaniczną barierę w naczyniu krwionośnym oddzielającą przepływającą krew od komórek położonych w głębi tkanek. Dziś jednak przypisuje się mu znacznie więcej funkcji. Komórki śródbłonka syntetyzują czynniki wzrostu i cząsteczki regulatorowe mogące zwężać (np. angiotensyna II) lub rozszerzać (np. tlenek azotu) ściany naczyń, a także wpływające na koagulację (czynniki krzepnięcia) czy fibrynolizę (np. prostaglandyny). Poprzez wydzielanie cytokin i cząsteczek adhezyjnych kontrolują procesy zapalne i immunologiczne zachodzące w naczyniach krwionośnych. Substancje odżywcze i inne mogą przenikać przez połączenia między sąsiadującymi komórkami śródbłonka lub być wchłaniane przez nie [13]. Prawidłowo funkcjonujący śródbłonek naczyniowy hamuje migrację i proliferację komórek mięśni gładkich oraz adhezję i migrację leukocytów. W normalnych warunkach promuje rozszerzanie naczyń krwionośnych oraz działanie przeciwzapalne czy przeciwutleniające chroniąc naczynia przed miażdzycą [14,15]. Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego wiąże się z występowaniem miażdżycy, zwiększonego ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych, nadciśnienia tętniczego. Zmniejszenie biodostępności tlenku azotu oraz zwiększenie stężenia RFT uważa się za główne czynniki dysfunkcji komórek śródbłonka [13,16]. Upośledzenie funkcji śródbłonka związane jest z ograniczeniem funkcji rozszerzania

naczynia krwionośnego. Zmiana światła naczynia prowadzi do przebudowy naczyń (stają się one węższe), a to wiąże się z nadciśnieniem [17].

Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego związana między innymi z nadciśnieniem, cukrzycą, przewlekłym stresem, używkami czy przewlekłymi stanami zapalnymi sprzyja odkładaniu się w tej warstwie nadmiaru lipidów LDL (lipoproteiny niskiej gęstości, *ang. low-density lipoprotein*). Prowadzi to stopniowo do dalszego nagromadzania się tych lipidów, dalszego nacieku i gromadzenia macierzy zewnątrzkomórkowej, aż do interakcji z makrofagami. Te z kolei mają zdolność przekształcania się w komórki piankowate. Jednocześnie komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych zyskują zdolność do migracji do błony wewnętrznej gdzie syntetyzują macierz zewnątrzkomórkową i sprzyjają tworzeniu się czapeczki włóknistej. Tym samym światło naczynia sukcesywnie zmniejsza się. W miarę rozwoju miażdżycy, liczba komórek mięśni gładkich naczyń ulega zmniejszeniu, a komórki piankowate ulegają apoptozie uwalniając metaloproteazy. Te z kolei degradują czapeczkę włóknistą, a ta odrywając się tworzy zakrzepy i może doprowadzić do zawału mięśnia sercowego [18]. <u>Ochrona śródbłonka naczyniowego przed uszkodzeniami prowadzącymi do jego dysfunkcji i dalszych tego konsekwencji wydaje się być ważnym działaniem w kontekście przeciwdziałania chorób układu krążenia.</u>

#### 1.1.2 Dysfunkcje mitochondriów w patogenezie chorób układu krążenia

Układ sercowo-naczyniowy jest układem heterogennym pod względem budowy komórkowej jego tkanek. Wyróżnia się wiele typów komórek od śródbłonkowych, poprzez nabłonki i fibroblasty, po komórki mięśni gładkich i poprzecznie prążkowane [10,12]. Łączy je duże zapotrzebowanie na energię w postaci ATP (adenozyno-5'-trifosforan), która syntetyzowana jest w mitochondriach. Dlatego prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów ma ogromne znaczenie dla wydajności pracy mięśnia sercowego [19,20]. Dysfunkcja mitochondriów coraz częściej wiązana jest z procesami miażdżycowymi. Wiąże się to ze zwiększeniem syntezy RFT, uszkodzeniami związanymi ze stresem oksydacyjnym, zmniejszeniem wydajności procesów generujących energię oraz zaburzoną dynamiką mitochondriów [21]. Wykazano również, że wraz ze starzeniem komórek, mitochondria ulegają zmianom, ograniczającym ich wydajne funkcjonowanie. Ponadto, stare, dysfunkcyjne mitochondria podlegają mitofagii, czyli degradacji na skutek autofagii [22].

Utrzymanie prawidłowego funkcjonowania mitochondriów ma duże znaczenie dla fizjologii szczególnie tych o wysokim zapotrzebowaniu komórek, energetycznym, np. kardiomiocytach. Mitochondria zajmują ok. 30 % ich całkowitej objętości i wytwarzają ogromna ilość energii na drodze fosforylacji oksydacyjnej (ok. 6 kg ATP dziennie) [23]. W przypadku mięśni poprzecznie prążkowanych serca wykazano, że nieprawidłowości w funkcjonowaniu i strukturze mitochondriów powodują znaczne upośledzenie energetyczne podczas wysiłku. Sugeruje to jednoznacznie, że dysfunkcja tych organelli może przyczyniać się do obniżonej tolerancji wysiłku, co w efekcie prowadzi do niewydolności serca. Istotną rolę w tym procesie przypisuje się reaktywnym formom tlenu, których wzrost stężenia koreluje z uszkodzeniem mitochondriów, a co z kolei wiąże się z zachwianiem równowagi energetycznej. Zaobserwowano zbyt niską produkcję ATP w stosunku do zapotrzebowania na energię [24]. Ponadto zakłócenia dotyczące procesów podziału mitochondriów, jak również ich fuzji mogą prowadzić do nagromadzenia organelli, które są uszkodzone, nie spełniają swoich funkcji. Zostają one wtedy usunięte w procesie mitofagii, jednakże nadmiernie występująca mitofagia, obok częstych podziałów mitochondriów, prowadzi do osłabienia zdolności metabolicznych komórki [23]. Wykazano również, że mitochondria odgrywają ważną rolę w przywróceniu warunków fizjologicznych po niedokrwieniu mięśnia sercowego/zawale mięśnia sercowego. Podczas tego typu stanów chorobowych dochodzi do nagłego zaburzenia metabolizmu kardiomiocytów w wyniku braku dostępu do tlenu i składników odżywczych, jak również zakwaszenia wewnątrzkomórkowego [25]. W tej sytuacji przywrócenie właściwego funkcjonowania serca po urazie niedokrwiennym zależne jest w wysokim stopniu od funkcji mitochondriów [26].

Wzmożona synteza reaktywnych form tlenu powoduje nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów śródbłonka naczyniowego w efekcie czego dochodzi do dysfunkcji tej warstwy budującej naczynia krwionośne. Efektem niniejszej kaskady procesów jest indukcja zmian miażdżycowych [27]. Mitochondrialne wytwarzanie RFT jest dotychczas najdokładniej udokumentowanym związkiem pomiędzy mitochondriami, a chorobami układu krążenia [28-30]. Uważa się, że wpływ na metabolizm i syntezę energii w mitochondriach śródbłonka naczyniowego może być obiecującym celem terapii chorób układu sercowo-naczyniowego. Dlatego upatruje się istotnej roli mitochondriów w procesach cytoprotekcyjnych śródbłonka obejmujących cykl potasowy czy transport wapnia do tych organelli, a które to wpływają na syntezę reaktywnych form tlenu [31].

#### 1.2 Budowa i funkcje mitochondriów

Mitochondria to przedziały komórkowe, których podstawową funkcją jest synteza ATP, związku niezbędnego dla prawidłowego funkcjonowania komórek oraz w procesach wymagających energii. Schemat budowy mitochondrium przedstawiono na Rycinie 1. Występują w zdecydowanej większości komórek eukariotycznych, a ich liczba i kształt zależne są od typu komórki i jej zapotrzebowania na ATP. Mitochondria to struktury dynamiczne, które mogą zmieniać swoją lokalizację w komórce, kształt oraz wielkość. Przyjmuje się, że średni rozmiar mitochondrium to od 2 do 8 µm. Wykazują zdolność do podziału oraz fuzji z innymi mitochondriami. Zbudowane są z dwóch błon (zewnętrznej i wewnętrznej) oddzielonych przestrzenią międzybłonową. Wnętrze to macierz mitochondrialna. [32]. Mitochondria mają własny genom, jednak zdecydowana większość białek występujących w tych organellach kodowana jest przez jądrowy DNA i następnie transportowana do mitochondriów [33].



**Rycina 1** Schemat budowy mitochondrium. Na rysunku zaznaczono zewnętrzną i wewnętrzną błonę, macierz mitochondrialną, grzebienie, kompleksy łańcucha oddechowego, syntazę ATP, rybosomy, białka transportowe i mitochondrialne kanały jonowe oraz mitochondrialny DNA (mtDNA). Rysunek własny na podstawie [34].

Zewnętrzna błona mitochondrialna oddziela mitochondria od cytoplazmy. Znajduje się w niej wiele białek, w tym kanał VDAC – poryna (kanał anionowy regulowany przez zmianę potencjału, *ang. voltage - dependent anion channel*), przez który swobodnie mogą przenikać

substancje o masie poniżej 5000 Daltonów. Większe cząsteczki transportowane są przez wyspecjalizowane białka błonowe. Z kolei cząsteczki o bardzo małych masach i niskiej polarności jak np. gazy mogą swobodnie dyfundować przez wszystkie błony biologiczne [35,36].

Wewnetrzna błona mitochondrialna jest pofałdowana, a w jej skład wchodzą między innymi białka łańcucha oddechowego, syntaza ATP oraz wiele różnych białek transportujących. Tworzy charakterystyczne tzw. grzebienie mitochondrialne co decyduje o jej relatywnie dużej powierzchni w porównaniu do błony zewnętrznej. Wykazano, że im większe jest zapotrzebowanie komórki na energię, tym bardziej jest ona pofałdowana tzn. obserwowane jest zagęszczenie grzebieni [36,37]. W tej błonie znajduje się również megakanał mitochondrialny (mPTP, ang. mitochondrial permeability transition pore), aktywowany wysokim stężeniem jonów wapnia w macierzy. Aktywacja mPTP umożliwia zwiększenie przepuszczalności błony, co może prowadzić do pęcznienia mitochondriów i śmierci komórki na drodze apoptozy lub nekrozy [38,39]. Ponadto występuje tu białko rozprzegające (UCP, ang. uncoupling protein) zdolne do rozpraszania gradientu protonów generowanego przez kompleksy łańcucha oddechowego pompujące protony z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. W momencie rozpraszania gradientu protonowego, ograniczana jest synteza ATP, a w zamian generowane jest ciepło. Nie wszystkie białka UCP są jednak związane z procesem termogenezy, a np. z transportem anionów. Ponadto białkom rozprzegającym przypisuje się zdolność zmniejszania syntezy reaktywnych form tlenu [40,41].

Macierz mitochondrialna ograniczona jest wewnętrzną błoną mitochondrialną. Stanowi złożony roztwór jonów, białek oraz metabolitów. Znajdują się tutaj między innymi enzymy cyklu Krebsa czy β-oksydacji kwasów tłuszczowych. W macierzy występuje ponadto kolisty mitochondrialny kwas deoksyrybonukleinowy (mtDNA, *ang. mitochondrial deoxyribonucleic acid*) stanowiący materiał genetyczny mitochondriów, a także rybosomy mitochondrialne [36]. Dowiedziono, że DNA mitochondrialne jest wielokrotnie bardziej podatne na uszkodzenia czy mutacje niż DNA jądrowe. Wynika to z powodu braku występowania intronów i histonów oraz bliskości miejsc syntezy RFT, które mają zdolności uszkadzania mtDNA [42].

Podstawową funkcją mitochondriów jest wytwarzanie energii w postaci ATP wykorzystywanego głównie w procesach metabolicznych komórki. Mitochondria biorą także udział w innych procesach fizjologicznych jak np. cykl kwasów trikarboksylowych (inaczej: cykl Krebsa lub cykl kwasu cytrynowego), metabolizm kwasów tłuszczowych (β-oksydacja), glukoneogeneza, buforowanie jonów wapnia czy programowana śmierć komórki - apoptoza [43]. W mitochondriach syntetyzowane są również reaktywne formy tlenu (RFT) przez kompleksy łańcucha oddechowego, w tym wolnych rodników tlenowych i nadtlenku wodoru. Obecność RFT może doprowadzać do uszkodzeń kwasów nukleinowych, białek oraz lipidów. Sugeruje się, że to reaktywne formy tlenu przyczyniają się do rozwoju chorób związanych z dysfunkcją mitochondriów [44].

Oprócz chorób wynikających z metabolicznej dysfunkcji mitochondriów, występują również choroby mitochondrialne powstałe na skutek mutacji w DNA mitochondrialnym i/lub jądrowym. Genetyczne choroby mitochondrialne diagnozowane są na różnym etapie rozwoju, mogą dotyczyć każdego z narządów, objawy mogą dawać w każdym wieku i bywają dziedziczone. Obecnie są to zaburzenia, których leczenie polega głównie na łagodzeniu objawów chorobowych [45,46].

#### 1.3 Mitochondrialne kanały potasowe

Technikę patch-clamp, do identyfikacji mitochondrialnego kanału potasowego, po raz pierwszy zastosowano na początku lat dziewięćdziesiątych XX wieku. Potwierdzono wtedy jego obecność w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek wątroby szczura [47]. Obecnie wiele grup bada wewnątrzkomórkowy transport jonów potasu [48-50]. Zaobserwowano, że zmiany przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej dla jonów potasowych są istotne dla indukcji mechanizmów ochronnych zmniejszających uszkodzenia tkanek powstałych wskutek niedokrwienia czy też stresu oksydacyjnego [51-53]. Coraz więcej doniesień wskazuje na udział mitochondrialnych kanałów potasowych w regulacji procesów fizjologicznych w komórce. Jednym z nich jest ich rola w cytoprotekcji związanej z niedokrwieniem/reperfuzją w mięśniu sercowym czy mózgu ssaków [54,55]. Wykazano, że aktywacja kanałów potasowych, przed lub w trakcie wystąpienia niedokrwienia, jest powiązana z cytoprotekcją. Mechanizmy ochronne

związane z aktywacją mitochondrialnych kanałów potasowych nie są jeszcze poznane, ale zaproponowano kilka hipotez je wyjaśniających [56-58].

Aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego ATP (kanał mitoK<sub>ATP</sub>, ang. *ATP-regulated mitochondrial potassium channel*) jest ważna dla ochrony układu sercowo-naczyniowego [59,60], natomiast mitochondrialny kanał potasowy o dużej przewodności regulowany jonami wapnia (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>) jest ważny także dla ochrony mózgu przed uszkodzeniem wynikającym np. z udaru [61,62]. Stąd też próby farmakologicznej regulacji mitochondrialnych kanałów potasowych stały się obiecującym, a zarazem nowatorskim podejściem leczenia chorób sercowo-naczyniowych czy neurodegeneracyjnych. Jednakże, właściwości biofizyczne i farmakologiczne kanałów potasowych w mitochondriach nie są wciąż w pełni poznane. Co więcej, substancje stosowane do identyfikacji i charakterystyki kanałów zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mają ograniczone zastosowanie. Na przykład wykazano, że mają one dodatkowe miejsca oddziaływania na poziomie komórki [63,64].

Do tej pory w wewnętrznej błonie mitochondrialnej różnych typów komórek opisano kilka rodzajów kanałów potasowych między innymi: mitochondrialny kanał potasowy regulowany ATP (kanał mitoKATP), mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez Ca<sup>2+</sup> małej/średniej/dużej przewodności (kanały mitoS/I/BK<sub>Ca</sub>, ang. mitochondrial 0 low/medium/high conductance calcium-regulated potassium channel), mitochondrialne kanały potasowe bramkowane napięciem Kv1.3 i Kv7.4 (kanał mitoKv1.3 i mitoKv7.4, ang. mitochondrial voltage-gated potassium channels) czy dwuporowy kanał potasowy TASK-3 (kanał mitoTASK-3, mitochondrialny wrażliwy na kwasy kanał potasowy związany z TWIK; ang. mitochondrial TWIK-related acid sensitive potassium channel) oraz aktywowany sodem mitochondrialny kanał potasowy (mitoSlo2, ang. mitochondrial sodium-activated potassium channel). W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano inhibitory oraz aktywatory kanałów mitoK, z których większość stanowią substancje sztucznie syntetyzowane lub będące toksynami pochodzenia zwierzęcego [49,65]. Na Rycinie 2 przedstawiono mitochondrialne kanały potasowe wraz z ich endogennymi aktywatorami i inhibitorami.



**Rycina** 2 Mitochondrialne kanały potasowe (mitoK). Zaznaczono daty identyfikacji oraz endogenne modulatory kanałów mitoK. (+) oznaczono aktywatory, zaś (-) inhibitory,  $\Delta \psi$  – oznacza różnicę potencjału. Wyróżniono kanały regulowane jonami wapnia (mitoS/I/BK<sub>Ca</sub>), przez ATP (mitoK<sub>ATP</sub>), jonami sodu (mitoSlo2), bramkowane napięciem (mitoKv1.3 i mitoKv7.4) oraz kanał mitoTASK-3. Rysunek własny na podstawie [66].

#### 1.3.1 Mitochondrialny kanał potasowy BK<sub>Ca</sub>

Mitochondrialny kanał potasowy o dużej przewodności, regulowany jonami wapnia (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>) po raz pierwszy został opisany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich komórek glejaka linii LN229 [67]. Następnie został zidentyfikowany także w mitochondriach mięśni szkieletowych [68], mózgu [69], sercu [70], komórkach śródbłonka naczyniowego [71] czy fibroblastach skóry [72].

Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> jest strukturalnie podobny do tego z błony plazmatycznej. Funkcjonalny kanał BK<sub>Ca</sub> jest tetramerem podjednostki  $\alpha$  tworzącej por kanału, z których każda składa się z siedmiu domen przezbłonowych S0-S6. Wyróżnia się także dwa regiony RCK1 i RCK2 (*ang. regulator of conductance of K*<sup>+</sup>), znane jako regulatory przewodnictwa potasu [73,74]. Ponadto występują cztery podjednostki regulatorowe  $\beta$  ( $\beta$ 1-4) i cztery podjednostki  $\gamma$  ( $\gamma$ 1-4), które mogą modulować aktywność kanału. W zależności od tkanki, podjednostki  $\alpha$  mogą występować z innymi podjednostkami regulatorowymi  $\beta$ , które określają właściwości biofizyczne i farmakologiczne kanału [63,75]. Przykładem mogą być mitochondria ludzkich fibroblastów skórnych, w których zidentyfikowano głównie podjednostkę  $\beta$ 3, podczas gdy pozostałe  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 i  $\beta$ 4 występują w znikomych ilościach [72]. Strukturę kanału typu BK<sub>Ca</sub> przedstawiono schematycznie na Rycinie 3. Przewodnictwo pojedynczego kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wynosi około 150-300 pS [63,74].



**Rycina** 3 Struktura kanału potasowego o dużym przewodnictwie zależnego od jonów wapnia. (a) Budowa podjednostki a tworzącej por kanału z wyszczególnieniem N- końca, domen przezbłonowych S0 -S6 oraz jednostek wiążących jony wapnia (RCK1 i RCK2). (b) Przekrój pionowy przez wewnętrzną błonę mitochondrialną z uwzględnieniem tetrameru jednostek a formujących por kanału  $BK_{Ca}$  oraz jednostek regulatorowych  $\beta$  i  $\gamma$  [76].

#### 1.3.1.1 Substancje regulujące aktywność kanału mitoBKca

Mitochondrialny kanał BK<sub>Ca</sub>, aktywowany jest przez jony wapnia. Wraz ze wzrostem ich stężenia, kanał wykazuje zwiększone prawdopodobieństwo otwarć, co wiąże się ze wzrostem jego aktywności - wzrostem ilości przepływających jonów potasu [71,72]. Kanał NS1619 (1,3-Dihydro-1-[2-hydroksy-5aktywowany jest również przez ten (trifluorometylo) fenylo]-5-(trifluorometylo)-2H-benzimidazol-2-on), zaś blokowany przez paksylinę nawet w obecności aktywatora [77,78]. Stwierdzono, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> opisany w mitoplastach komórek serca świnki morskiej może być blokowany również przez charybdotoksynę [70]. Innym aktywatorem mitoBK<sub>Ca</sub> jest syntetyczny związek NS11021 (N'-[3,5-Bis (trifluorometylo) fenylo]-N-[4-bromo-2-(2H-tetrazol-5-ilo) fenvlo]tiomocznik) [71,79]. Jeszcze innym związkiem otwierającym kanał jest CGS7184 (1 - [[(4chlorofenylo) amino] okso]-2-hydroksy-6-trifluorometylo-1H-indolo-3-karboksylan etylu), którego właściwości potwierdzono w komórkach glejaka mózgu [57]. Oprócz powyższych, warto wspomnieć, że istnieją także endogenne modulatory kanału BK<sub>Ca</sub>, poza wspomnianymi wcześniej jonami wapnia. Do fizjologicznych czynników pobudzających aktywność kanału zalicza się m.in. depolaryzację błony, tlenek azotu, tlenek węgla jak również fosforylację przez kinazy białkowe A i G. Z kolei hiperpolaryzacja i działanie kinazy białkowej C, należą do endogennych inhibitorów kanału [80]. Wśród nowo odkrytych modulatorów mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub> szczególnie interesujące wydają się być te pochodzenia naturalnego – flawonoidy. Dowiedziono, że naringenina aktywuje ten kanał w komórkach serca szczura [81].

#### 1.3.1.2 Znaczenie fizjologiczne regulacji kanału mitoBKCa

Zmiany cytozolowego stężenia wapnia mają duży wpływ na metabolizm i przeżywalność komórek. Zaobserwowano, że dodanie  $Ca^{2+}$  do izolowanych mitochondriów mózgu szczura indukuje obniżenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, a w konsekwencji zwiększone oddychanie mitochondrialne [82]. Kanał mitoBK<sub>Ca</sub>, jest wrażliwy na jony wapnia i wraz ze wzrostem ich stężenia ulega aktywacji, obserwuje się zwiększone prawdopodobieństwo otwarć kanału, co sprzyja napływowi jonów potasu [71]. Dane funkcjonalne, mikroskopia świetlna i elektronowa, rekonstytucja do dwuwarstwy lipidowej oraz badania immunologiczne wykazały również, że kanały typu BK<sub>Ca</sub> znajdują się w mitochondrialnej błonie wewnętrznej włókien mięśni szkieletowych szczura. Zwiększenie napływu jonów potasu poprzez otwarcie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> może być ważne dla ochrony mioblastów, wykazano bowiem, że aktywatory kanałów chronią mioblasty przed stresem oksydacyjnym [68]. Dodatkowo inne obserwacje mogą wskazywać na możliwą rolę kanału mitoBK<sub>Ca</sub> podczas niedotlenienia, którą można interpretować jako mechanizm antyapoptotyczny [67].

#### 1.3.1.3 Rola mitochondrialnego cyklu potasowego w cytoprotekcji

Mitochondrialny cykl jonów potasu, złożony jest ze szlaków jego napływu, jak i wypływu z mitochondriów. Do utrzymania homeostazy jonowej, poza jonami potasu, istotne są

również przepływy innych jonów (np. jonów wapnia), w tym anionów (np. chlorkowych, wodorowęglanowych). Transport potasu przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, głównie przez mitochondrialne kanały potasowe, powoduje zmiany w objętości macierzy, zatem regulacja tego cyklu jest istotna dla prawidłowego funkcjonowania tych organelli, jak również utrzymania ich integralności strukturalnej. Otwarcie kanału potasowego w mitochondriach, umożliwiające napływ jonów K<sup>+</sup> przed lub w trakcie niedokrwienia, chroni serce przed uszkodzeniami niedokrwienno-reperfuzyjnymi. Obserwowano, że aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych indukuje szereg zdarzeń prowadzących do cytoprotekcji [83]. Uproszczony schemat cytoprotekcji z udziałem mitochondrialnych kanałów potasowych zaprezentowano na Rycinie 4.



**Rycina** 4 Schemat prezentujący indukcję cytoprotekcji z udzialem aktywatorów mitochondrialnych kanałów potasowych.

Teoria chemiosmotyczna Petera Mitchella pozwala zrozumieć znaczenie mitochondrialnego cyklu potasowego. Wysoka wartość potencjału błony mitochondrialnej jest wymagana do przeprowadzenia procesów fosforylacji oksydacyjnej, których wynikiem jest generowanie energii w postaci ATP. Hiperpolaryzacja wewnętrznej błony mitochondrialnej, nie tylko powoduje zwiększony wychwyt jonów potasu, ale sprawia też, że fizjologiczne zmiany potencjału są wrażliwe na ruch jonów potasu przez błonę. Świadczy to o zasadniczej roli cyklu potasowego w utrzymaniu strukturalnej jak i funkcjonalnej integralności mitochondriów, co jest niezbędne w produkcji energii drogą fosforylacji oksydacyjnej [84].

Mitochondrialny cykl potasowy (przedstawiony schematycznie na Rycinie 5) składa się z szeregu ścieżek napływu i wypływu K<sup>+</sup>, jonów wodorowych H<sup>+</sup> oraz anionów. Wymiana

tych jonów zachodzi pomiędzy macierzą mitochondrialną, a mitochondrialną przestrzenią międzybłonową. Wyrzut protonów H<sup>+</sup> przez system transportu elektronów (ETC, *ang. electron transport chain*) generuje potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, który to umożliwia napływ K<sup>+</sup> do macierzy przez mitochondrialne kanały potasowe. Z kolei nadmiar jonów potasu w macierzy mitochondrialnej może m.in. doprowadzać do jej pęcznienia. Dlatego obecność antyportera K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> jest kluczowa w usuwaniu K<sup>+</sup> z macierzy [85].



**Rycina** 5 Schemat mitochondrialnego cyklu potasowego obrazujący przepływ jonów potasu i wodoru. Na schemacie zaznaczono: łańcuch transportu elektronów (ETC, ang. electron transport chain), wymiennik jonów  $K^+/H^+(KHE, ang. K^+/H^+ exhanger)$  oraz mitochondrialny kanał potasowy (mitoK); PMB – przestrzeń międzybłonowa [86].

Istnieją doniesienia świadczące, że napływ jonów potasu do mitochondriów w momencie aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych jest skorelowany ze spadkiem syntezy reaktywnych form tlenu. Stwierdzono, że otwarcie kanału potasowego o dużym przewodnictwie aktywowanego przez Ca<sup>2+</sup>, zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, hamuje syntezę RFT w mitochondriach mózgu szczura [87].

Efekty cytoprotekcyjne wywołane przez aktywację mitochondrialnych kanałów potasowych są poprzedzone wieloma procesami (patrz Rycina 6). Między innymi obserwuje się pęcznienie mitochondriów oraz spadek potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (depolaryzacja). Ponadto aktywacja np. kanału mitoBK<sub>Ca</sub> powoduje wzrost oddychania komórkowego. Co więcej, konsekwencją otwarcia kanału jest również obniżenie syntezy reaktywnych form tlenu w mitochondriach oraz regulacja napływu jonów wapnia do macierzy mitochondrialnej [88].



**Rycina** 6 Na schemacie przedstawiono konsekwencje otwarcia mitochondrialnych kanalów potasowych (mitoK). Aktywacja kanalów mitoK może być wywołana przez działanie substancji syntetycznych bądź tych pochodzenia naturalnego [89].

#### 1.4 Właściwości i funkcje flawonoidów kardioprotekcyjnych

Tradycyjna medycyna chińska od wielu pokoleń wykorzystuje lecznicze działanie roślin i ich ekstraktów. Substancje pozyskiwane z kwiatów, ziół czy owoców są wykorzystywane w terapiach wielu schorzeń, w tym kardiologicznych [90]. Jednymi z tych substancji są flawonoidy – organiczne związki chemiczne, spełniające cały szereg funkcji w roślinach – od barwników przez insektycydy (związki owadobójcze) czy fungicydy (substancje grzybobójcze). Dzieli się je na różne klasy jak flawony, flawonole, flawanony i inne. Struktura flawonoidów jest oparta na piętnastowęglowym szkielecie zbudowanym z dwóch pierścieni benzenowych i jednego pierścienia piranowego, który je łączy, jak przedstawiono na Rycinie 7 [91,92].



Rycina 7 Struktura flawonoidów. A, B – pierścienie benzenowe, C- pierścień piranowy.

Do badań, na podstawie literatury, wyselekcjonowano kilka flawonoidów o właściwościach kardioprotekcyjnych, a także naringeninę i jej pochodne, celem określenia nowych ścieżek cytoprotekcji związanych z aktywacją mitochondrialnych kanałów potasowych.

#### 1.4.1 Naringenina i jej pochodne

Naringenina (5,7-dihydroksy-2-(4-hydroksyfenylo)chroman-4-on) – metabolit naringiny, występuje między innymi w grejpfrucie, któremu nadaje charakterystyczny, gorzki posmak. Jej obecność potwierdzono również w kumkwacie, bergamocie, skórce pomidora, a także w ziołach i innych owocach [81,93]. Dotychczas potwierdzono jej korzystne działanie zarówno w badaniach in vitro, w modelach komórkowych, jak również in vivo. Wykazuje właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, kardioprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, przeciwnowotworowe, a także przeciwwirusowe [94]. Jako flawonoid cechuje ja wysoka biodostępność i niska toksyczność, dzięki czemu może być szeroko stosowana, zarówno w tradycyjnej diecie, ale także, jako potencjalny środek terapeutyczny. Działanie przeciwutleniające naringeniny uważa się za jedno z głównych, mających wpływ na komórki i szlaki mitochondrialne, w tym mitochondrialne kanały potasowe [95,96]. Może zatem mieć zastosowanie w chorobach sercowo-naczyniowych, uwzględniając strategie zapobiegające niedokrwieniu, ale także ochraniające mitochondria przed dysfunkcjami prowadzącymi do chorób serca i układu krążenia [1,97]. Dowiedziono także, że naringenina ma zdolność rozluźniania mięśni gładkich, dlatego z powodzeniem jest stosowana w chińskich lekach ziołowych, mających działanie relaksacyjne [98]. U myszy, potwierdzono również jej działanie na kanały potasowe błony komórkowej, gdzie ich aktywacja powodowała zmniejszenie bólu związanego z zapaleniem [99], a także wpływ na

czynność neuronów [100]. Innym proponowanym działaniem naringeniny jest zmniejszanie adhezji monocytów do komórek śródbłonka naczyniowego, co ogranicza indukcję początkowych procesów tworzenia blaszki miażdżycowej [101].

#### 1.4.1.1 Naringenina-TPP+

Poszukiwania nowych, a zarazem specyficznych aktywatorów kanałów jonowych wciaż trwają. Jednym z pomysłów było zaprojektowanie związku, który będzie akumulowany w mitochondriach. Z uwagi na wysoki ujemny potencjał po stronie macierzy mitochondrialnej dodanie  $TPP^+$ wydaje się, że jonu (bromek (3bromopropylo)trifenylofosfanu) do flawonoidu może spowodować gromadzenie takiego związku w mitochondriach. Z uwagi na powyższe zaplanowano syntezę naringeniny-TPP<sup>+</sup> (3-[(5-hydroksy-2-(4-hydroksyfenylo)-4-okso-3,4-dihydro-2H-1-benzopiran-(bromek 7ylo)oksy]propylo)trifenylofosfanowy). Związek uzyskano w reakcji alkilacji jonu TPP+ do struktury naringeniny w obecności weglanu potasu. Substancja ta nie jest dostępna komercyjnie. Po raz pierwszy, uzyskane dane interakcji naringeniny-TPP+ w modelach komórkowych zostały przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej.

#### 1.4.1.2 Chalkon naringeniny

Pochodne chalkonowe flawonoidów charakteryzują się nienasyconym elementem strukturalnym  $\alpha$ - $\beta$ , który wykazuje zdolność do reagowania z grupami tiolowymi, aktywując np. szlak Nrf2-Keap-1 (szlak jądrowego czynnika erytroidu 2 Kelch-podobnego związanego z ECH białka 1, *ang. Nuclear erythroid related factor 2 Kelch-like ECH-associated protein 1*), będący szlakiem antyoksydacyjnego mechanizmu obronnego przed uszkodzeniem komórki. Chalkon naringeniny jest obecny w diecie, np. w pomidorach [102,103]. Wykazuje działanie przeciwzapalne i przeciwalergiczne [104,105], a także poprawia funkcje metaboliczne adipocytów [106].

#### 1.4.1.3 Pochodna cukrowa naringeniny

6-C-glukozyd naringeniny jest pochodną zawierającą resztę cukrową. Obecność tego flawonoidu potwierdzono w liściach i łodydze rośliny *Ardisia pusilla* rosnącej w krajach azjatyckich oraz korze *Ulmus wallichiana* zwanej wiązem himalajskim [107,108]. W literaturze niewiele jest informacji o tej pochodnej naringeniny, szczególnie w kontekście regulacji kanałów potasowych. Jednakże charakteryzuje się dobrą biodostępnością w podaniu doustnym. Wykazano, że stymuluje funkcje osteoblastów i anaboliczne kości, co może okazać się alternatywą w leczeniu osteoporozy [109].

#### **1.4.2** Luteolina: flawonoid z grupy flawonów

Luteolina (3,4,5,7-tetrahydroksyflawon), jest flawonoidem, który w warunkach naturalnych występuje w wielu gatunkach roślin, między innymi w selerze, marchwi, papryce słodkiej, brokułach, pietruszce, zielonych częściach cebuli i kwiatach chryzantemy [110,111]. działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwalergiczne Wykazuje i przeciwnowotworowe. W zwalczaniu komórek rakowych wykorzystuje działanie indukujące procesy apoptozy lub hamujące cykl komórkowy, co skutkuje ograniczeniem zdolności tych komórek do tworzenia przerzutów, jak również ogranicza angiogenezę, proces istotny dla progresji guza nowotworowego – unaczynienie dostarcza mu substancji odżywczych, niezbędnych do dalszego rozwoju. Działanie takie potwierdzono między innymi w raku sutka, okrężnicy, płuc i trzustki [112]. Ponadto luteolina zapobiega zwłóknieniom płuc i watroby [113,114]. Również w układzie sercowo-naczyniowym wykazuje dobroczynne działanie. Dowiedziono, że jej zastosowanie łagodzi sam proces jak i skutki niedokrwienia/reperfuzji mięśnia sercowego w wyniku aktywacji szlaku przeciwutleniającego Nrf2, podobnie jak chalkon naringeniny, a także pełni funkcję w utrzymaniu integralności mitochondriów. Wykazano również, że luteolina zapobiega zwłóknieniu i przerostowi mięśnia sercowego u myszy z cukrzycą. Zatem wykazuje działanie kardioprotekcyjne [115].

#### 1.4.3 Cyjanidyna: naturalny barwnik z grupy antocyjanów

(2-(3,4-dihydroksyfenylo)chromenylo-3,5,7-triol) Cyjanidyna należy do grupy antocyjanów, wchodzących w skład flawonoidów. Są to związki, które nadają roślinom intensywny kolor, zazwyczaj bordowy, czerwony, niebieski czy pomarańczowy. Są powszechnie spożywane w diecie bogatej w owoce, warzywa i czerwone wino. Występuje między innymi w czarnej fasoli czy jagodach. Wykazuje działanie antyoksydacyjne, antymutagenne, przeciwzapalne czy przeciwnowotworowe [116,117]. Mechanizm antyoksydacyjny wynika z aktywacji szlaku Nrf2. Zaś w nieprawidłowo funkcjonujących komórkach, cyjanidyna indukuje procesy apoptotyczne. Ponadto, co istotne w kontekście leczenia chorób nowotworowych, cyjanidyna osłabia działanie kardiotoksyczne cisplatyny, szeroko stosowanej w chemioterapii. Mechanizm tego działania polega na obniżaniu akumulacji reaktywnych form tlenu i depolaryzacji błony mitochondrialnej. Ponadto indukcja apoptozy komórek mięśnia sercowego wywołanej cisplatyną polega na translokacji apoptotycznych białek regulatorowych z cytoplazmy do błon mitochondriów, który to proces cyjanidyna jest w stanie blokować [118]. Flawonoid ten odgrywa również istotną rolę we wchłanianiu jonów magnezu. Niedobory tego pierwiastka związane są z chorobami układu krążenia, nadciśnieniem czy cukrzycą. Dowiedziono, że cyjanidyna wzmacnia przepływ jonów magnezu do i z komórek oraz zwiększa jego wchłanianie jelitowe, co skutkuje zmniejszeniem niedoborów Mg<sup>2+</sup>[117].

#### 1.4.4 Kwercetyna: związek z grupy flawonoli

Kolejnym flawonoidem, występującym w dużych stężeniach zarówno w owocach jak i w warzywach, jest kwercetyna (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon). Jej obecność potwierdzono w winogronach, żurawinie, borówkach, wiśniach, jabłkach, papryce, czerwonej cebuli, a także w winie i herbacie [119]. Jest jednym z głównych metabolitów roślinnych powszechnie stosowanych w tradycyjnej medycynie chińskiej, w terapii nadciśnienia, astmy czy nawet nowotworów [120]. Posiada właściwości proapoptotyczne względem komórek zmienionych nowotworowo i umożliwia monitorowanie ich wzrostu w różnych fazach, ograniczając tym samym ich zdolność do przerzutów, co potwierdzono w badaniach *in vivo* i *in vitro* [121]. Co ciekawe, w dobie globalnej pandemii okazała się mieć pozytywny wpływ na zakażenie SARS-CoV-2, wykazując działanie przeciwwirusowe

[122,123]. Dzięki działaniom przeciwutleniającym, przeciwzapalnym i obniżającym ciśnienie krwi, korzystnie wpływa na utrzymanie właściwej kondycji naczyń krwionośnych. Ponadto reguluje działanie transporterów komórkowych, w tym plazmatycznych kanałów jonowych co przekłada się na utrzymanie prawidłowej homeostazy jonowej komórek, a co za tym idzie, zapewnia ich prawidłowe funkcjonowanie w organizmie [124]. Poza silnym działaniem antyoksydacyjnym i redukującym syntezę RFT [125], jest inhibitorem peroksydacji lipidów, co przeciwdziała zmianom miażdżycowym [126] i promuje działanie ochronne względem układu nerwowego [127]. Jej działanie protekcyjne potwierdzono licznymi badaniami na liniach komórkowych, w modelach zwierzęcych i badaniach klinicznych, gdzie jednocześnie dowiedziono bezpieczeństwa jej stosowania, nie obserwując działania toksycznego i skutków ubocznych działania kwercetyny [128].

#### 1.5 Rola flawonoidów w kardioprotekcji

Flawonoidy kardioprotekcyjne, wykazują szereg właściwości, które wskazują na ich udział w procesach cytoprotekcyjnych w układzie sercowo-naczyniowym [129]. Jedną z głównych właściwości jest ich działanie przeciwutleniające, redukujące syntezę reaktywnych form tlenu, kontrolujące ich poziom zarówno w mitochondriach, gdzie są głównie syntetyzowane, ale również w komórce [130]. Jak wcześniej wspomniano, w proces ten zaangażowany jest między innymi mitochondrialny cykl potasowy, którego ważnym elementem są mitochondrialne kanały potasowe. Warto pamiętać, że RFT mają poniekąd pozytywny wpływ na procesy metaboliczne i są w komórce potrzebne do aktywacji szlaków cytoprotekcyjnych, jednakże ich zbyt wysoki poziom wywołuje wprost przeciwny efekt – działa szkodliwie [85].

Do innych strategii kardioprotekcyjnych flawonoidów, naśladujących działanie leków można zaliczyć ich właściwości obniżające ciśnienie krwi. Na przykład kwercetyna poprzez kotransporter 1 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (NKCC1) prowadzi do wzrostu cytozolowego stężenia jonów Cl<sup>-</sup> i reguluje ciśnienie krwi [124].

Rola flawonoidów została też potwierdzona w procesach ograniczania peroksydacji lipidów, będącej jednym z pierwszych etapów tworzenia blaszki miażdżycowej. Efekt ten odnosi się także do normalizowania profilu lipidów i lipoprotein we krwi (utrzymania ich właściwych stężeń i proporcji). Wykazano, że flawonoidy zmniejszają stężenie cholesterolu całkowitego, co ma istotne znaczenie w hamowaniu rozwoju np. choroby wieńcowej [131,132].

Istotną strategią ochronną układu krążenia jest również działanie stymulujące metabolizm glukozy, będącym równocześnie ważnym w kontekście ograniczania cukrzycy nabytej i innych schorzeń związanych z podwyższonym lub wprost przeciwnie – zbyt niskim stężeniem glukozy we krwi krążącej. Można w to włączyć zwiększenie wychwytu glukozy z krwi; hamowanie enzymu  $\alpha$ -glukozydazy, która zmniejsza wchłanianie glukozy w jelicie cienkim; stymulacja jej transportu do tkanek mięśniowych za pośrednictwem specyficznych transporterów; obniżanie poziomu cukrów prostych w surowicy i inne [131].

Inną, równie ważną, strategią ochronną wobec układu sercowo-naczyniowego jest działanie antyapoptotyczne flawonoidów. Badania dowiodły ograniczeniu indukcji procesów apoptotycznych w komórkach tego układu poprzez zwiększanie poziomu białek Bcl-2 (regulator apoptozy komórek B chłoniaka 2, *ang. B-cell lymphoma apoptosis regulator 2*), które to są inhibitorami w szlaku prowadzącym do apoptotycznej śmierci komórki. Zwiększone działanie antyapoptotycznych białek w przeciwieństwie do białek wywołujących apoptozę (proapoptotycznych), jest ważne, ponieważ ogranicza uszkodzenia mięśnia sercowego, wywołanego śmiercią komórek [133,134].

Te kilka, z wielu, strategii kardioprotekcyjnych flawonoidów, jest podobnych do mechanizmów działania leków chemicznie syntetyzowanych i powszechnie stosowanych w leczeniu różnych schorzeń układu sercowo-naczyniowego [135]. Wydaje się, że podjęcie badań opisujących regulację aktywności mitochondrialnych kanałów potasowych przez związki pochodzenia roślinnego przybliży nas do zrozumienia mechanizmów cytoprotekcyjnych. Dodatkowo, wskazanie naturalnych oraz specyficznych aktywatorów mitochondrialnych kanałów potasowych w znaczący sposób może przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych chroniących tkanki przed niekorzystnymi czynnikami przyczyniającymi się do rozwoju chorób cywilizacyjnych.

#### 2. Założenia i cel rozprawy

Podstawową funkcją mitochondriów jest dostarczanie energii w postaci ATP, wykorzystywanej w wielu procesach życiowych komórek. Dysfunkcja serca i układu krążenia, często jako efekt upośledzenia funkcji mitochondriów, prowadzi do indukcji zmian miażdżycowych, niewydolności serca czy innych jednostek chorobowych. Wyniki badań ostatnich lat wskazujące na aktywny udział mitochondriów w procesie apoptozy, stały się punktem wyjścia do poszukiwań mechanizmów ochronnych komórek. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej zidentyfikowano białka odpowiadające za przepływ jonów potasu - w tym mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia (mitoBK<sub>Ca</sub>). Opublikowane badania wskazują, że traktowanie tkanki mięśnia sercowego czy nerwowej aktywatorami kanałów potasowych zwiększa przeżywalność komórek podczas niedotlenienia/reperfuzji. Pomimo intensywnych badań, dokładny mechanizm cytoprotekcji z udziałem jonów potasu pozostaje nadal niewyjaśniony. Ponadto, przypuszczenia, co do ochronnego wpływu aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych, opierają się głównie na opisie wpływu syntetycznych substancji niskoczasteczkowych uważanych za aktywatory kanałów obecnych w błonie plazmatycznej. Coraz więcej uwagi poświęca się substancjom pochodzenia naturalnego jako potencjalnym regulatorom mitochondrialnych kanałów potasowych. W ich bardzo szerokim spektrum korzystnych właściwości znajdują się również te o potwierdzonym działaniu kardioprotekcyjnym. Jednakże na chwilę obecną nie ma danych literaturowych o ich bezpośrednim oddziaływaniu z mitochondrialnymi kanałami potasowymi, w tym z kanałem mitoBK<sub>Ca</sub>. Aktywacja tego kanału przez flawonoidy może okazać się nową, mitochondrialną ścieżką indukującą procesy związane z szerokorozumianą kardioprotekcją, na przykład w komórkach śródbłonka naczyniowego.

W związku z powyższym, <u>głównym celem rozprawy</u> była charakterystyka regulacji aktywności kanału mito $BK_{Ca}$  przez wybrane flawonoidy kardioprotekcyjne z wykorzystaniem techniki patch-clamp oraz określenie funkcjonalnych konsekwencji tej regulacji z zastosowaniem metod biochemicznych i biologii molekularnej.

Ogólne cele badań opisane w niniejszej rozprawie były następujące:

- I. Charakterystyka regulacji aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez flawonoidy (naringeninę i jej pochodne oraz inne flawonoidy kardioprotekcyjne) z wykorzystaniem techniki elektrofizjologicznej patch-clamp.
- II. Analiza wpływu aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w obecności flawonoidów (naringeniny i jej pochodnych oraz wybranych flawonoidów kardioprotekcyjnych) na procesy oddychania mitochondrialnego oraz na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej.
- III. Ocena właściwości protekcyjnych flawonoidów (naringeniny i jej pochodnych oraz cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny) jako aktywatorów mitochondrialnego kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w zjawisku apoptozy i nekrozy oraz roli w migracji komórek.

### Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

- Scharakteryzowanie podstawowych właściwości biofizycznych oraz farmakologicznych kanału BK<sub>Ca</sub> obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926 (badania regulacji kanału przez jony wapnia oraz znane modulatory: paksylinę i NS11021).
- Określenie metodą patch-clamp wpływu naringeniny, chalkonu naringeniny, naringeniny-TPP<sup>+</sup>, 6-C-glukozydu naringeniny, cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach śródbłonka linii EA.hy926.
- Ocenę zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej w obecności naringeniny i jej pochodnej TPP<sup>+</sup> oraz cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny, z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej JC-10.
- 4. Pomiar zmian zużycia tlenu w komórkach śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926 z wykorzystaniem oksygrafu pod wpływem naringeniny oraz kwercetyny.
- Zbadanie toksyczności oraz właściwości protekcyjnych naringeniny, naringeniny-TPP<sup>+</sup>, cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny w modelu komórek EA.hy926.
- Charakterystykę aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, zmian potencjału mitochondriów oraz szybkości oddychania komórek EA.hy926 pod wpływem izoramnetyny, analogu kwercetyny.
- Analizę tempa migracji komórek EA.hy926 pod wpływem naringeniny, cyjanidyny, luteoliny oraz kwercetyny w teście zarastania rysy.
- Ocenę wpływu kwercetyny na zmianę ekspresji genów i poziomu białka podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub> w mitochondriach komórek śródbłonka naczyniowego EA.hy926.

### 3. Materiały i metody

### 3.1 Substancje chemiczne wykorzystane w badaniach

Substancje wykorzystane w rozprawie pogrupowano i przedstawiono w tabelach: flawonoidy kardioprotekcyjne (Tabela 1), pochodne naringeniny (Tabela 2), modulatory mitochondrialnych kanałów potasowych (Tabela 3) oraz pozostałe substancje (Tabela 4). Zaprezentowano pełne nazwy chemiczne, wzory strukturalne, masy molowe, numery katalogowe oraz ich rolę w zaplanowanych badaniach. Wszystkie użyte w doświadczeniach flawonoidy i ich pochodne rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (DMSO, Sigma Aldrich, nr kat. D2650). Poza wspomnianymi w tabelach substancjami, w badaniach wykorzystano również czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *ang. tumor necrosis factor*  $\alpha$ , Sigma Aldrich, nr kat. T6674).

Tabela	1	Charakterystyka	flawonoidów	0	właściwościach	kardioprotekcyjnych	wykorzystanych
w doświadczeniach: naringenina, kwercetyna, cyjanidyna i luteolina.							

FLAWONOIDY KARDIOPROTEKCYJNE				
Naringenina	Nazwa	5,7-dihydroksy-2-(4-hydroksyfenylo) chroman-4-on		
	chemiczna			
	Wzór	OH		
	strukturalny	HOO		
N5893		он О		
Sigma-Aldrich	Masa [g/mol]	272,26		
Kwercetyna	Nazwa	3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon		
	chemiczna			
	Wzór	ОН		
	strukturalny	ОН		
		HO		
Q4951		Ϋ́ΎΟΗ		
Sigma-Aldrich	M f . / 11	OH 0		
	Masa [g/mol]	302,24		
Luteolina	Nazwa	3,4,5,7-tetrahydroksyflawon		
---------------	--------------	---	--	--
	chemiczna			
	Wzór	ОН		
	strukturalny	ОН		
L9283		он о		
Sigma-Aldrich	Masa [g/mol]	286,239		
Cyjanidyna	Nazwa	2-(3,4-dihydroksyfenylo)chromenylo-3,5,7-triol		
	chemiczna			
	Wzór	ОН		
	strukturalny	OH		
		HOO <sup>+</sup>		
70457		ОН		
Signa Aldrich	Masa [g/mol]	OH 0H		
Sigma-Alarich				
Izoramnetyna	Nazwa	3,5,7-trihydroksy-2-(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)-		
	chemiczna	chromen-4-on		
	Wzór	OCH₃		
	strukturalny	ОН		
		HO		
		ОН		
17794	Masa [g/mol]	OH 0		
Sigma-Aldrich	wasa [g/mor]	510,20		

POCHODNE NARINGENINY					
Naringenina-	Nazwa	Bromek (3-[(5-hydroksy-2-(4-hydroksyfenylo) -4-okso-			
$TPP^+$	chemiczna	3,4-dihydro-2H-1-benzopiran-7-ylo) oksy] propylo)			
		trifenylofosfanowy			
1121 105	Wzór strukturalny				
1121-105 Selvita		Ph			
Servita	Masa [g/mol]	655,514			
Chalkon	Nazwa	(E)-3-(4-hydroksyfenylo) -1-(2,4,6-trihydroksyfenylo)			
naringeniny	chemiczna	prop-2-en-1-on			
DUI 92977	Wzór strukturalny	НО ОН ОН ОН ОН ОН ОН ОН			
Sigma-Aldrich	Masa [g/mol]	272,256			
6-C-glukozyd	Nazwa	(2S)-5,7-dihydroksy-2- (4-hydroksyfenylo) -6-[(2S, 3R,			
naringeniny	chemiczna	4R, 5S, 6R)-3,4,5-trihydroksy-6- (hydroksymetylo)			
		oksan-2-ylo] -2,3-dihydrochromen-4-on			
SMB00137	Wzór strukturalny				
Sigma-Aldrich	Masa [g/mol]	HO			
0	wiasa [g/moi]	434,4			

**Tabela 2** Pochodne naringeniny: naringenina-TPP<sup>+</sup>, chalkon naringeniny oraz 6-C-glukozyd naringeniny – podstawowa charakterystyka chemiczna.

MODULATORY MITOCHONDRIALNYCH KANAŁÓW POTASOWYCH					
Paksylina	Nazwa	(2R,4bS,6aS,12bS,12cR,14aS)-4b-hydroksy-2-(1-			
chemiczna		hydroksy-1-metyloetylo)-12b,12c-dimetylo-5,6,6a,			
		7,12,12b,12c,13,14,14a-dekahydro-2H-chromeno [5`,			
		6`: 6,7] indeno [1,2-b] indol-3 (4bH) -on			
	Wzór	H			
	strukturalny	H <sub>3</sub> C OH CH <sub>3</sub> N H			
P2928	Masa [g/mol]	435,56			
Sigma-Aldrich	Rola	inhibitor mitoBK <sub>Ca</sub>			
NS11021	Nazwa	N <sup>-</sup> [3,5-Bis (trifluorometylo) fenylo]-N-[4-bromo-2-			
	chemiczna	(2H-tetrazol-5-ilo) fenylo]-tiomocznik			
	Wzór	н			
	strukturalny	F <sub>3</sub> C H N S			
		CF <sub>3</sub> N			
		N N H			
SML0622	Masa [g/mol]	511,24			
Sigma-Aldrich	Rola	syntetyczny aktywator mitoBK <sub>Ca</sub>			

**Tabela 3** Modulatory mitochondrialnych kanałów potasowych wykorzystane w doświadczeniach – paksylina oraz NS11021. Ich pełne nazwy chemiczne, wzory strukturalne, masy molowe i funkcja.

POZOSTAŁE				
cykloheksymid	Nazwa	4-[(2R)-2-[(1S,3S,5S)-3,5-dimetylo-2-		
	chemiczna	oksocykoloheksan]-2-hydroksyetylo]piperydyn-2,6-dion		
	Wzór	0 		
	strukturalny	H <sub>3</sub> C <sub>m,</sub> CH <sub>3</sub>		
C7698	Masa [g/mol]	281,35		
Sigma-Aldrich	Rola	czynnik indukcji apoptozy w EA.hy926		
FCCP	Nazwa	p-trifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu		
	chemiczna			
	Wzór strukturalny	F F F		
C2920	Masa [g/mol]	254,168		
Sigma-Aldrich	Rola	rozprzęgacz mitochondriów		
DTT	Nazwa	ditiotreitol		
	chemiczna			
	Wzór	QH		
	strukturalny	HS		
	Masa [g/mal]	OH		
D0632	wiasa [g/iii01]	134,25		
Sigma-Aldrich	Rola	reduktor		

**Tabela 4** Pozostałe substancje chemiczne wykorzystane w badaniach. Podano ich nazwy systematyczne, wzory strukturalne, masy molowe i rolę.

### 3.2 Komórki śródbłonka naczyniowego jako model badawczy

W badaniach wykorzystano stabilna ludzką linię komórek śródbłonka naczyniowego EA.hy926 z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych ATCC (ang. American Type Culture Collection), o numerze katalogowym ATCC<sup>®</sup>CRL-2922<sup>TM</sup>, pierwotnie pochodzącą z ludzkiej żyły pępowinowej połączonej z opornym na tioguaninę klonem A549 (ludzka linia nowotworu płuc, komórki nabłonkowe) [71,136]. Na Rycinie 8 zaprezentowano fotografie przedstawiającą morfologię komórek. Wykazują one cechy zróżnicowanych komórek śródbłonka naczyniowego, zachowując ich funkcje w zakresie angiogenezy, homeostazy, utrzymywania ciśnienia krwi czy stanu zapalnego. Unieśmiertelniona linia w wyniku fuzji z komórkami nowotworu płuc A549, wykazuje zniesienie ograniczenia replikacyjnego i starzenia się komórek w hodowli, jednocześnie zachowując cechy śródbłonka wraz z obecnościa ciał Weibela-Palade'a [137]. Dzieki tym właściwościom, komórki podczas doświadczeń nie zmieniają fenotypu czy genotypu i niezależnie od pasażu, wykazują te same cechy, co ważne jest w kontekście badań aktywności kanałów potasowych. Komórki hodowano w zmodyfikowanym płynie Eagle'a Dulbecco (1 g/l D-glukozy; nr kat. D5546; Sigma Aldrich) uzupełnionym 10 % płodowa surowicą bydlęcą (FBS, ang. fetal bovine serum), 1 % L-glutaming, 2 % dodatkiem hipoksantyny-aminopteryny-tymidyny (HAT, ang. hypoxanthine-aminopterin-thymidine), 1 % mieszanką penicyliny z streptomycyną, wwilgotnej atmosferze 5 % CO<sub>2</sub>, w 37 °C. Komórki odklejano od podłoża z wykorzystaniem trypsyny w temperaturze 37 °C, poprzedzając przepłukaniem komórek roztworem PBS (sól fizjologiczna w buforze fosforanowym ang. phosphate-buffered saline). Komórki wysiewano co trzeci dzień, aż osiągnęły około 90 – 100 % konfluencji. Do badań \_\_wykorzystywano komórki pomiędzy pasażami 11 i 25.



**Rycina** 8 Fotografia mikroskopowa przedstawiająca komórki śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926, wykonana z użyciem mikroskopu optycznego ze światłem przechodzącym i kontrastem fazowym (Olympus IX71) oraz kamery (DLT-Cam PRO 8 MP USB 3.0.).

## 3.3 Pomiary elektrofizjologiczne

Do oceny regulacji kanału mito $BK_{Ca}$  przez flawonoidy wykorzystano technikę patch-clamp. Poniżej szczegółowo opisano poszczególne jej etapy z uwzględnieniem izolacji mitochondriów, przygotowania mitoplastów i pomiarów elektrofizjologicznych.

#### 3.3.1 Procedura oczyszczania mitochondriów

Izolację mitochondriów z komórek przeprowadzano bezpośrednio przed pomiarami elektrofizjologicznymi, w temperaturze 4 °C. Z butelek hodowlanych, po uprzednim przepłukaniu warstwy komórek roztworem PBS, komórki EA.hy929 zdrapywano i przenoszono do probówki stożkowej o pojemności 15 ml lub 50 ml. Kolejno wirowano je z prędkością 400 ×g w celu uzyskania osadu komórkowego. Komórki te zawieszano w roztworze do izolacji (250 mM sacharoza, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA - kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N`,N`-tetraoctowy) i przenoszono do homogenizatora celem dezintegracji. Kolejno następowało kilka wirowań różnicowych, każde z nich trwało 10 minut. Pierwsze szybkie (9200 ×g), w którym usuwano roztwór znad osadu tzw. supernatant. Po drugim, wolnym wirowaniu (750 ×g) w nadsączu zawieszone są mitochondria. Po ostatnim szybkim wirowaniu (ponownie 9200 ×g) w uzyskanym osadzie otrzymywano wyizolowane mitochondria, które zawieszano w ok. 300  $\mu$ l roztworu do

izolacji. Do eksperymentów typu patch-clamp pobierano ok. 30 μl zawiesiny mitochondriów i rozcieńczano ją w 1000 μl roztworu izotonicznego.

### 3.3.2 Otrzymywanie mitoplastów do pomiarów elektrofizjologicznych

Przed każdym doświadczeniem patch-clamp, z wyizolowanych mitochondriów przygotowywano mitoplasty. Otrzymywano je poprzez inkubację mitochondriów przez około 1,5 minuty w roztworze hipotonicznym (5 mM HEPES, 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2) na szalce pomiarowej (szalka Petriego o średnicy 30 mm). W tym czasie mitochondria pęczniały na skutek szoku osmotycznego. W ten sposób otrzymywano mitoplasty – mitochondria pozbawione zewnętrznej błony, wewnętrzna błona mitochondrialna ulegała w tym czasie rozfałdowaniu (obserwowano zanik grzebieni). Mitoplasty w powiększeniu wyglądem przypominają transparentne, szare pęcherzyki. Proces pęcznienia mitochondriów monitorowano pod mikroskopem, gdyż długa inkubacja w roztworze hipotonicznym doprowadza do pękania mitoplastów, co wiąże się z uniemożliwieniem przeprowadzenia doświadczenia. Pęcznienie zatrzymywano dodając do szalki roztwór hipertoniczny (750 mM KCl, 30 mM HEPES i 100  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>). Kolejno zasysano mitoplast do pipety i przystępowano do dalszych etapów pomiarów elektrofizjologicznych patch-clamp.

## 3.3.3 Technika patch-clamp

Metoda stabilizacji potencjału skrawka błony (patch-clamp), jest jedną z najczęściej wykorzystywanych obecnie technik pozwalających na bezpośredni pomiar przepływu prądu jonowego przez struktury przezbłonowe, w tym kanały potasowe. Dzięki tej technice możliwa jest obserwacja zmian przepływu prądu jonowego w czasie rzeczywistym, w warunkach fizjologicznych, jak również pod wpływem modulatorów białek kanałowych. Pomiary mogą być wykonywane na całych komórkach, a także fragmentach błony czy pojedynczym kanale jonowym, badając przepływ zarówno od strony cytoplazmy/macierzy mitochondrialnej jak i od zewnątrz komórki/mitochondriów. Technika ma szczególne zastosowanie w badaniu komórek pobudliwych, jak komórki układu nerwowego, ale sprawdza się również w badaniu aktywności kanałów obecnych w wewnętrznej błonie

mitochondrialnej. Za opracowanie tej metody, Neher i Sakmann otrzymali w 1991 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii [138,139].

Doświadczenia typu patch-clamp z użyciem mitoplastów opracowano na podstawie opublikowanych prac [71,140]. Mitoplasty uzyskiwano z mitochondriów na skutek szoku osmotycznego. Następnie pojedynczy mitoplast zasysano szklaną pipetą pomiarową (wykonaną z użyciem wyciągarki pipet firmy Narishige) napełnioną izotonicznym roztworem zawierającym 150 mM KCl, 10 mM HEPES (kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1piperazynoetanosulfonowy) i 100 µM CaCl<sub>2</sub> o pH 7,2. W przypadku obecności w zassanym do pipety skrawku wewnętrznej błony mitochondrialnej kanału, który identyfikowano na podstawie analizy amplitud i prawdopodobieństwa otwarć, dokonywano rejestracji jego aktywności. Sygnał był wzmacniany przez Axopatch 200B oraz konwertowany przez Digidata 1440A (próbkowanie 100 kHz, filtrowanie 1 kHz). Do zapisu zmian przepływającego prądu jonowego wykorzystywano program Clampex. Następnie przystępowano do podawania badanych substancji i oceny ich wpływu na aktywność kanału. Wszystkie modulatory kanału mitoBK<sub>Ca</sub> podawano jako rozcieńczenia w roztworze izotonicznym z wykorzystaniem systemu perfuzyjnego. W tym celu pipetę pomiarową wraz z kanałem przenoszono do otworów systemu rurek, będących pipetami szklanymi o większej średnicy niż pipeta pomiarowa patch-clamp (układ perfuzyjny). Bieżącą aktywność pojedynczego kanału nagrywano, a następnie porównywano z aktywnością kontrolną kanału. Aktywność kanału stanowi ciąg zdarzeń polegających na otwieraniu (kiedy przez kanał płynie prąd jonowy) i zamykaniu kanału (brak przepływu prądu jonowego). fragmenty nagrań, pokazujące najczęściej obserwowaną Przykładowe podczas eksperymentu aktywność kanału, zaprezentowano w rozdziale Wyniki. Z kolej prawdopodobieństwo otwarć kanału (Po, ang. channels opening probability) określano dla całej długości nagrania przy użyciu oprogramowania Clampfit 10.7. Schemat eksperymentu patch-clamp przedstawiono na Rycinie 9.



**Rycina** 9 Schemat techniki patch-clamp z uwzględnieniem poszczególnych etapów: część biochemiczna (izolacja mitochondriów, przygotowanie mitoplastów wskutek szoku osmotycznego) oraz część

elektrofizjologiczna (zassanie błony mitoplastu do pipety pomiarowej, aplikacja badanych substancji za pomocą perfuzji, rejestracja aktywności kanału).

# 3.4 Pomiar potencjału błonowego mitochondriów

Zmiany potencjału błony mitochondrialnej mierzono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i sondy flourescencyjnej JC-10 (ang. Mitochondrial Membrane Potential Kit - Flow Cytometry; Abcam). W tym celu, komórki hodowano do osiągnięcia konfluencji około 80 %, a następnie zmieniano płyn hodowlany (DMEM) i wstępnie inkubowano 1,5 godziny z flawonoidami i wybranymi modulatorami kanałów. Następnie komórki odklejano od podłoża naczynia hodowlanego przy użyciu trypsyny, wirowano (4 min 400 ×g) i szacowano ich liczbę (TC20<sup>™</sup> Automated Cell Counter, Bio-Rad). Łącznie 500 000 komórek z danej próbki przenoszono do próbówki stożkowej, ponownie wirowano (4 min, 400 × g) i zawieszano we wcześniej przygotowanym roztworze JC-10 (zgodnie z protokołem producenta - do 5 ml buforu oznaczonego jako B, dodawano 25 µl komponentu A). Przygotowano również kontrolę nietraktowaną i pozytywną - z dodatkiem FCCP (ptrifluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu, ang. carbonyl cyanide-ptrifluoromethoxyphenylhydrazone) - klasycznego rozprzęgacza mitochondriów, którego obecność wpływa na depolaryzację błony mitochondrialnej [141]. Wszystkie próbki następnie poddawano inkubacji z wcześniej przygotowanym roztworem JC-10 (po 500 µl), w inkubatorze do hodowli komórkowej (wilgotna atmosfera, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) przez 20 min. Pomiary potencjału wykonano przy użyciu cytometru przepływowego (Cytometr przepływowy LSR Fortessa™, BD) w Laboratorium Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Właściwości sondy flourescencyjnej JC-10 wynikają z odwracalnego tworzenia agregatów JC-10 po polaryzacji błony, która to powoduje przesunięcie emitowanego światła od 520 nm (tj. emisja formy monomerycznej JC-10) do 570 nm (emisja formy JC-10 jako agregatów). Po wzbudzeniu przy 490 nm, kolor JC-10 zmienia się odwracalnie z zielonego na zielonkawo-pomarańczowy, gdy błona mitochondrialna staje się bardziej spolaryzowana. Na tej podstawie cytometr rozróżnia dwie populacje komórek: z mitochondriami wysoko spolaryzowanymi i zdepolaryzowanymi.

#### 3.5 Pomiar oddychania komórkowego

Komórki do pomiarów zużycia tlenu (oddychania komórkowego), pod wpływem testowanego flawonoidu, hodowano jak w opisie linii komórkowej EA.hy926. Eksperymenty wykonywano z użyciem oksygrafu (O2k-respirometr, Oroboros Instruments<sup>®</sup>). Po uruchomieniu urządzenia przepłukiwano i stabilizowano jego elektrody w poszczególnych komorach (ok. 30 min), najpierw wodą, a następnie płynem hodowlanym (DMEM bez dodatku FBS, HAT, glutaminy oraz penicyliny i streptomycyny) w temperaturze 37 °C. Kolejno przystępowano do odklejenia komórek z naczyń hodowlanych za pomocą trypsyny, które kolejno wirowano 5 min (300 ×g). Osad komórkowy zawieszano w DMEM bez dodatków (37 °C). Komórki zliczano, zawieszano w 2,1 ml DMEM i przenoszono do komór oksygrafu w liczbie 2 miliony na komorę, które następnie zamykano nie pozostawiając wewnątrz pęcherzyków powietrza. Po kolejnym ustabilizowaniu systemu pomiarowego przez 20 min, przystępowano do miareczkowania badanego flawonoidu. Eksperyment zakończono poprzez rozprzęgnięcie mitochondriów w komórkach dodaniem do komory FCCP (500 nM). Otrzymane wyniki porównywano z oddychaniem komórek przed traktowaniem flawonoidami.

#### 3.6 Ocena przeżywalności komórek

W celu określenia żywotności komórek pod wpływem testowanych flawonoidów, wykonano testy apoptozy i nekrozy oparte na transpozycji fosfatydyloseryny wykrywanej przez aneksynę V oraz barwniku DNA jądrowego (*RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay*, Promega) pozwalające jednocześnie zbadać wpływ substancji na indukcję śmierci apoptotycznej i nekrotycznej oraz ich potencjalne właściwości ochronne przed czynnikami uszkadzającymi. W tym celu na czarną płytkę 96-dołkową (Corning Incorporated Costar<sup>®</sup>) wysiewano komórki w liczbie 9000 na dołek, zaś po osiągnięciu przez nie konfluencji ok. 80 % przystępowano do procedury eksperymentalnej. Rozpoczynano od zmiany medium hodowlanego (DMEM) w studzienkach płytki (100 µl). Kolejno dodawano testowane flawonoidy celem jednogodzinnej wstępnej inkubacji z komórkami. Rozcieńczenia flawonoidów przygotowywano z roztworu wyjściowego w DMSO, dlatego do doświadczeń wprowadzono dodatkową kontrolę (DMSO 0,1 %), odzwierciedlając

rzeczywisty wpływ substancji na komórki. Następnie przygotowywano roztwór testowy zgodnie z protokołem załączonym przez producenta i dodawano do poszczególnych studzienek płytki w stosunku 1:1 do płynu hodowlanego. Kontrolą pozytywną – czynnikiem uszkadzającym dla komórek śródbłonka była kombinacja 1 ng/ml TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$ , *ang. tumor necrosis factor*  $\alpha$ ) i 0,05 µg/ml cykloheksymidu [142]. Pomiary wykonano za pomocą czytnika płytek Infinite m200 pro firmy Tecan (Tecan<sup>®</sup> Austria) w następujących punktach pomiarowych: 0, 1, 3, 7, 9, 11, 13, 24 [h]. Pomiędzy pomiarami, płytki przechowywano w inkubatorze do hodowli komórkowych. Każde z badań wykonano 3-krotnie, z kolei każde niezależne doświadczenie stanowiły 3 powtórzenia dla danej próby.

Pomiar sygnału apoptozy jest możliwy ze względu na zdolność ekspozycji fosfatydyloseryny (PS, *ang. phosphatidyloserine*) na zewnątrz błony komórkowej. W momencie indukcji śmierci apoptotycznej, PS z wewnętrznej strony błony komórkowej ulega transpozycji na jej stronę zewnętrzną. Wtedy, dwie podjednostki aneksyny V mogą się do niej związać. Dochodzi do ich fuzji. Do każdej z podjednostek aneksyny dołączona jest komplementarna jednostka lucyferazy. Połączenie tych podjednostek daje sygnał luminescencyjny, który odbiera i zapisuje czytnik płytek. Dane przedstawiono w postaci znormalizowanej jako procent RLU (względne jednostki luminescencji, *ang. relative luminescence units*), gdzie 100 % stanowi najwyższa wartość uzyskana w danym doświadczeniu.

W momencie indukcji martwicy – śmierci nekrotycznej, dochodzi do przerwania błony komórkowej i uwolnienia zawartości komórek. We wspomnianym teście RealTime-Glo<sup>TM</sup> znajduje się również nieprzepuszczalny dla komórek barwnik DNA jądrowego, który dopiero w przypadku przerwania błony komórkowej i jądrowej, wiąże się z DNA. Jest to barwnik fluorescencyjny, wykrywający nekrozę. Czytnik płytek rejestruje sygnał fluorescencyjny (długość fali wzbudzenia: 485 nm, emisji: 520 nm), zaś wyniki przedstawione są jako procent RFU (względne jednostki fluorescencyjne, *ang. relative fluorescence units*).

Z wykorzystaniem niniejszego testu zbadano również toksyczność rozpuszczalnika stosowanych w doświadczeniach flawonoidów, którym był dimetylosulfotlenek. DMSO w stężeniu 0,1 % nie wykazał toksyczności względem komórek EA.hy926. Jego wpływ na wyniki doświadczeń określono jako neutralny.

### 3.6.1 Badanie właściwości cytoprotekcyjnych flawonoidów

Wykorzystując komercyjnie dostępny test apoptozy i nekrozy określano właściwości cytoprotekcyjne badanych flawonoidów. Na początku, testowaną substancję inkubowano z komórkami przez godzinę, następnie dodawano czynnik uszkadzający TNFα/cykloheksymid (1 ng/ml/ 0,05 µg/ml) i roztwór testu RealTime-Glo<sup>™</sup>. Pomiary apoptozy i nekrozy wykonano jak wspomniano wcześniej (patrz rozdział *3.6 Ocena przeżywalności komórek*). W przypadku ochrony komórek przed uszkodzeniem, obserwowano obniżenie sygnału apoptozy/nekrozy względem sygnału dla czynnika indukującego uszkodzenie komórek, w tym samym punkcie pomiarowym. Dodatkowo, po 24h, z wykorzystaniem mikroskopu optycznego ze światłem przechodzącym i kontrastem fazowym (Olympus IX71) oraz kamery (DLT-Cam PRO 8 MP USB 3.0.), wykonano zdjęcia wybranych prób, obrazujące uzyskane w pomiarach rezultaty.

### 3.7 Ocena migracji komórek

Migrację komórkową zbadano z zastosowaniem testu gojenia rany/zarastania rysy (*ang. wound healing/scratch assay*). Komórki wysiewano na 24-studzienkową płytkę i hodowano w DMEM aż do uzyskania całkowitej konfluencji. Następnie w każdym dołku wykonywano rysę pod tym samym kątem i w tym samym miejscu, z użyciem nakładki na pipetę automatyczną o pojemności 100 µl. Testowane substancje dodawano w punkcie czasowym 0 h, tuż po wykonaniu rysy. Następnie obserwowano migrację komórek w czasie 48 godzin. Schemat "zarastania rysy" zobrazowano na Rycinie 10. Zdjęcia wykonywano bezpośrednio po utworzeniu rysy (czas 0 h) oraz po 6, 12, 24 i 48 godzinach, z użyciem mikroskopu optycznego ze światłem przechodzącym i kontrastem fazowym (Olympus IX71) oraz kamery (DLT-Cam PRO 8 MP USB 3.0.). Jednocześnie dokonywano pomiarów szerokości rysy, za pomocą oprogramowania kamery (DLT-Cam Viewer), natychmiast po wykonaniu zdjęcia. Następnie dane zbierano do arkuszy kalkulacyjnych i analizowano. Przedstawiane w rozdziale *Wyniki* dane stanowią wyniki trzech niezależnych doświadczeń dla każdej z testowanej substancji, gdzie każde pojedyncze doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.



**Rycina 10** Schemat zarastania rany/rysy w teście służącym do oceny migracji komórkowej. Wraz z upływem czasu (0-48 h) obserwuje się zmniejszenie odległości pomiędzy dwoma brzegami rysy. Szerokość rysy punkcie 0 h (tuż po wykonaniu rysy) przyjmuje się jako 100 %.

#### 3.8 Ocena poziomu ekspresji genów

Oceny ekspresji wybranych genów w badanych próbach dokonywano techniką ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, uprzednio izolując RNA z komórek, dokonując pomiaru jego stężenia i utrwalając informację genetyczną w procesie odwrotnej transkrypcji. Każdy niezależny eksperyment wykonywano w trzykrotnym powtórzeniu.

#### 3.8.1 Izolacja RNA

Komórki hodowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale *3.2. Komórki śródblonka naczyniowego jako model badawczy*, po czym usuwano płyn hodowlany, przepłukiwano roztworem PBS, zdrapywano je z powierzchni naczynia i wirowano 5 minut z prędkością 500 ×g. Izolację RNA (kwas rybonukleinowy, *ang. ribonucleic acid*) przeprowadzano w warunkach sterylnych z użyciem zestawu RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit firmy Qiagen, w temperaturze pokojowej. Osad komórkowy zawieszono w buforze RLT (350 µl) i dodawano 350 µl 70 % etanolu, a następnie mieszano. Całość przenoszono na złoże w kolumience dołączonej do zestawu i wirowano 15 sekund (10000 ×g), przesącz odlewano. Na złoże dodawano 350 µl buforu RW1 i wirowano jak uprzednio, a przesącz wylewano do odpadów. Następnie dodawano do kolumny 10 µl DNazy (enzym przecinający DNA) wymieszanej z 70 µl buforu RDD i pozostawiano do inkubacji (15 minut, temperatura pokojowa), po czym dodawano 350 µl buforu RW1 i wirowano jak poprzednio. Przesącz odlewano, a na złoże nakrapiano 500  $\mu$ l odczynnika RPE i wirowano 15 sekund (10000 ×g), po czym czynność tę powtarzano, za drugim razem wirując 2 minuty. Kolumnę ze złożem przenoszono do probówki o pojemności 1,5 ml, a na złoże dodawano 30  $\mu$ l wody wolnej od RNaz (enzymów przecinających RNA). Wirowano 1 minutę z prędkością 10000 ×g wymywając RNA ze złoża. Eluat (wyizolowane RNA) umieszczano na lodzie i przystępowano do oznaczania jego stężenia.

#### 3.8.2 Pomiar stężenia RNA w eluacie

Pomiary stężeń uzyskanych eluatów RNA wykonywano wykorzystując spektrofotometr Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies). Na specjalny adapter nakrapiano 3 µl próbki, nakrywano nakładką "factor 50" i dokonywano pomiaru stężenia RNA w próbce (po uprzednim pomiarze zerowym dla eluentu RNA – ultra czystej wody, mającym na celu ustawienie parametrów odniesienia dla prób badanych). Stężenie mierzono przy długościach 260 nm i 280 nm oraz określano stosunek tych dwóch wartości (A260/A280) będący miarą czystości próbki. Prawidłowo wykonana izolacja powinna cechować się współczynnikiem w granicach 2. Współczynnik poniżej tej wartości świadczy o zanieczyszczeniu białkami i DNA. Obliczeń stężeń w próbkach dokonywano z użyciem wzoru:

#### OD260 x 40 (dla RNA) × Factor (50) = stężenie [µg/ml]

## 3.8.3 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Po przeliczeniach, przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji RNA na cDNA (komplementarne DNA, *ang. complementary DNA*; cząsteczka DNA będąca kopią RNA), gdyż RNA jest niestabilne w temperaturach przeprowadzania eksperymentów oceny ekspresji genów. Do tej reakcji wykorzystywano zestaw RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Przeliczano RNA tak, by na jedną reakcję odwrotnej transkrypcji przypadało 5 µg. Ponadto, w temperaturze 4 °C, do jednej reakcji dodawano 1 µl starterów reakcji Random Hexamer primer – (polinukleotydowe fragmenty

RNA, konieczne do inicjacji reakcji) oraz dopełniono do 12 μl wodą (pozbawioną nukleaz – enzymów przecinających kwasy nukleinowe). Mieszaninę tę dokładnie mieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 65 °C. Następnie dodawano na każdą reakcję po 4 μl buforu reakcyjnego (5x Reaction Buffer), 1 μl inhibitora RNazy (inhibitor enzymu przecinającego RNA; RiboLock RNase Inhibitor), 2 μl mieszaniny deoksynukleotydów (10 mM dNTP Mix; *ang. deoxy nucleoside triphosphate*) i 1 μl odwrotnej transkryptazy (enzymu katalizującego reakcję odwrotnej transkrypcji; RevertAid M-MuLV RT 200U/μl). Mieszaninę dokładnie mieszano i wirowano. Probówki przenoszono na blok grzejny (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc.) i ustawiono parametry reakcji. Najpierw inkubowano przez 5 min w 25 °C, następnie 60 min w 42 °C, a na końcu 5 minut w 70 °C, po czym schładzano do 4 °C. Tak przygotowaną matrycę, od razu wykorzystywano do oceny ekspresji genów lub mrożono w temperaturze -20 °C.

#### 3.8.4 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

Po uzyskaniu stabilnego materiału genetycznego umożliwiającego ocenę ekspresji genów w próbie (matrycy), w warunkach sterylnych przygotowywano mieszaniny (1) matrycy rozcieńczonej wodą, (2) starterów (przednich i wstecznych, w stosunku 1:1) dla wybranych genów z Power SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.; odczynnik/sonda do bardzo czułego oznaczania ilościowego DNA, nawet w bardzo małej liczbie kopii genów). Następnie, do studzienek płytki 96-dołkowej (MircoAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-well Reaction Plate 0,1 ml, Applied Biosystems) dodawano przygotowane mieszaniny z użyciem pipety automatycznej, najpierw te z matrycą (po 8 µl na dołek), a następnie dodawano do nich po 12 µl odpowiedniej mieszaniny wykrywającej odpowiednie geny, po czym płytkę zaklejano folią optyczną (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems). Roztwory w dołkach mieszano na wytrząsarce typu vortex i wirowano 5 min 500 × g. Tak przygotowaną płytkę umieszczano w aparacie do RTqPCR (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) i ustawiano parametry reakcji (2 min w 50 °C, 10 min w 95 °C i następnie 45 powtórzeń: 15 s w 95 °C, 1 min 60 °C). Po zakończeniu procesu, wyniki analizowano w arkuszu kalkulacyjnym metoda  $\Delta\Delta$ Ct w odniesieniu do prób kontrolnych i genu referencyjnego - GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

Do oceny ekspresji genów w niniejszej rozprawie doktorskiej użyto sekwencji starterów dla genów przedstawionych w Tabeli 5.

Symbol gonu	Nogwo gonu	Sekwencja starteru	Sekwencja starteru	
Symbol genu	Tvazwa genu	przedniego (5'-3')	wstecznego (5'-3')	
KCNMA1	podjednostka α	CCGCAGACACT-	GAGCATCTCTCA-	
	kanału $BK_{Ca}$	GGCCAATAG	GCCGGTA	
KCNMB1	podjednostka β1	CCAGAACCAGCAG	GCTCTTGGAATTT	
	kanału $BK_{Ca}$	TGCTCCTACAT	GGCTCTGAC	
KCNMB2	podjednostka β2	CACACTCCTGCGCT	ACCTGGAGGCAGG	
	kanału $BK_{Ca}$	CATAC	GGTAC	
KCNMB3	podjednostka β3	GCTCAGCATTCAGA	GGATTTATCTGGA	
	kanału $BK_{Ca}$	GAGAAGA	CAGCCTCTTC	
KCNMB4	podjednostka β4	GTTCGAGTGCACCT	AGGAGCACTTGG	
	kanału $BK_{Ca}$	TCACCT	GGTTGGT	
GAPDH	dehydrogenaza	ACCACAGTCCATGC	TCCACCACCCTGT	
	aldehydu 3-	CATCAC	TGCTGTA	
	fosfoglicerynowego			

Tabela 5 Sekwencje starterów przednich i wstecznych specyficznych dla badanych genów.

## 3.9 Analiza poziomu białek metodą Western blot

Metoda Western blot służy do jakościowej oceny poziomu białek w badanych próbach, a przy użyciu oprogramowania do oceny gęstości uzyskanych prążków, także do oceny ilościowej. Metoda ta polega na przygotowaniu próbek białkowych w buforze obciążającym, tak by grawitacyjnie opadały do studzienek żelu, wyrównaniu próbek w żelu zagęszczającym (tak by białka wszystkich próbek zaczynały rozdział w tym samym momencie), a następnie rozdziale frakcji białek ze względu na ładunek białka oraz masę (lżejsze migrują szybciej) w żelu rozdzielającym. Kolejno następuje przeniesienie tak rozdzielonych białek na membranę, blokowanie jej i procedura wiązania przeciwciał Irzędowych do konkretnych białek, a następnie II-rzędowych, sprzężonych z peroksydazą chrzanową, dzięki czemu możliwa jest ich detekcja. Finalnie dochodzi do przeniesienia sygnału chemiluminescencji na klisze fotograficzne i wywoływania ich. Całość odbywa się bez dostępu światła białego. Tak wywołana klisza poddawana jest analizie i skanowaniu, a następnie pomiarom densytometrycznym uzyskanych prążków.

#### 3.9.1 Oczyszczanie mitochondriów metodą permeabilizacji

Oprócz ekstraktów białkowych z komórek, przygotowano próbki będące homogenatami mitochondriów. W tym celu zastosowano inną, niż w przypadku techniki patch-clamp, metodę izolacji mitochondriów, ze względu na potrzebę ich większej ilości i czystości otrzymanych preparatów. Komórki wysiano na szalki Petriego o średnicy 150 mm. Dla każdej próby (kontrolna oraz traktowana flawonoidem) przygotowano 20 takich szalek. Po osiągnięciu konfluencji ok. 90 %, do szalek przeznaczonych na przetestowanie wpływu wybranego flawonoidu, na 12 godzin przed izolacją mitochondriów, dodano odpowiednie stężenie badanej substancji pochodzenia naturalnego. Po tym czasie przystąpiono do odklejenia komórek z naczyń hodowlanych (z udziałem trypsyny), po uprzednim pozbyciu się płynu do hodowli oraz przepłukaniu roztworem PBS. Następnie komórki wirowano z prędkością 800 × g przez 10 minut, zawieszono w PBS, zliczono i ponownie wirowano, przy tych samych parametrach, pozostawiając osad komórkowy do dalszych etapów procedury. Poszczególne etapy wykonywano w temperaturze 4 °C. Kolejno dodano 16 ml buforu do izolacji IB (210 mM mannitol; 70 mM sacharoza; 0,5 mM roztwór HEPES z ustalonym pH 7,2 wodorotlenkiem potasu KOH) z BSA (250 mg BSA na 100 ml roztworu IB) (IB+BSA) na 300-500 mln komórek i 16 µl roztworu digitoniny (40 mg digitoniny rozpuszczono w 200 µl DMSO) celem permeabilizacji błony komórkowej, a następnie mieszano przez odwracanie probówki stożkowej o pojemności 50 ml przez kilka minut. Efekt permeabilizacji sprawdzano pod mikroskopem wybarwiając kilka mikrolitrów komórek roztworem błękitu trypanu (komórki z uszkodzoną błoną charakteryzowały się błękitnym kolorem). Jeśli nie osiągnięto co najmniej 80-90 % procent komórek z przedziurawiona błona komórkowa, dodawano kolejna porcje digitoniny (8-16 μl). Po procesie permeabilizacji komórek, pozbywano się digitoniny z próbek dodając roztworu IB+BSA do 50 ml i wirowano 5 min w 4 °C z prędkościa 3000 ×g. Pozbywano się nadsączu, osad powinien być biały i żelowej konsystencji, który następnie rozpuszczano w 8 ml IB+BSA i homogenizowano w szklanym homogenizatorze 10 razy góra-dół. Tak uzyskany homogenat przenoszono do probówki stożkowej i wirowano 5 min 600 ×g (4 °C) pozbywając się pozostałych w osadzie jąder komórkowych. Nadsącz przenoszono do nowej probówki i wirowano 10000 ×g (4 °C) przez 1 godzinę. Otrzymywano osad o jasnobrązowej barwie pokryty cienką warstwą białego nalotu. Po odlaniu nadsączu pozbywano się tego białego osadu z użyciem pipety automatycznej. Brązowy osad rozpuszczono w 5 ml IB+BSA i wirowano 30 min z prędkością 10000 ×g (4 °C). Ponownie pozbywano się nadsączu i białego osadu po czym zawieszono brązowy osad w 700 µl IB+BSA i wirowano w małej probówce o pojemności 1,5 ml przez 15 min 10000 ×g w 4 °C. Odlewano płyn znad osadu, zaś ten rozpuszczano w 1 ml IB+BSA i wirowano przy poprzednich ustawieniach wirówki. Kolejno z osadu pozbywano się BSA, rozpuszczając go tylko w IB (bez BSA) i wirując nadal przy danych ustawieniach. Tak otrzymane, w osadzie, wyizolowane mitochondria wykorzystane były do przygotowania homogenatów białkowych.

#### 3.9.2 Przygotowanie lizatów białkowych

Komórki hodowano z danym flawonoidem przez 12 godzin, po czym przystąpiono do procedury przygotowania z nich próbek białkowych. W tym celu, odlewano płyn hodowlany i przepłukiwano komórki zimnym (4 °C) roztworem soli fizjologicznej (PBS) i w tym roztworze zdrapywano je z powierzchni naczynia hodowlanego. Następnie zawiesinę tę wirowano przez 6 min z prędkością 400 ×g, a nadsącz odlano. Osad komórkowy zawieszano w 200 µl buforu lizującego (1x RIPA buffer – gotowy do użycia bufor do lizy komórek; Thermo Fisher Scientific Inc.) z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz (mini cOmplete<sup>TM</sup>, Roche) i homogenizowano 20 krotnie z użyciem cienkiej igły i strzykawki (z uwagi na obecność detergentu w buforze, uważano, aby nie doprowadzić do powstania piany). Następnie próbki wkładano do łaźni ultradźwiękowej (4 °C) na 1 minutę celem sonikacji – fragmentacji błon i uwolnienia zawartości komórek. Kolejno próbki wirowano z prędkością 12000 ×g w 4 °C, zebrano nadsącz (w nim obecne białka) i przystępowano do procedury oznaczenia stężenia białka w próbach.

Lizaty z mitochondriów przygotowano analogicznie jak lizaty białkowe z komórek, pomijając jednak etapy zdrapywania. Procedurę dla mitochondriów rozpoczynano od zawieszania osadu wyizolowanych organelli w buforze lizującym.

### 3.9.3 Pomiar stężenia białka

Do oznaczania stężenia białka wykorzystywano metodę Bradford opartą na wyznaczeniu krzywej wzorcowej dla standardów białkowych, gdzie wzorzec stanowiło białko albuminy bydlęcej o stężeniu wyjściowym 1 µg/µl i na jej podstawie wyliczeniu stężenia białka w próbce badanej. Przygotowywano zestaw stężeń albuminy: 0 (próba ślepa), 1, 3, 5, 7 oraz  $10 \,\mu\text{g/}\mu\text{l}$ . Do pomiaru wykorzystywano dwa różne stężenia badanych próbek (pobrano 1  $\mu\text{l}$ i 2 µl z próby). Do wszystkich próbek dodawano po 50 µl NaOH (wodorotlenek sodu) w celu denaturacji białek, a następnie do każdej z nich po 1 ml rozcieńczonego w stosunku 1:5 z ultraczystą wodą, koncentratu barwnika do oznaczania stężenia białek (ang. Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad Laboratories, Inc.). Mieszaniny te następnie dokładnie mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut, a kolejno mierzono ich absorbancję spektrofotometrem (UV-160A, Shimadzu, Japonia) przy długości fali 595 nm. Uzyskane dane wprowadzano do arkusza kalkulacyjnego, wyznaczano równanie regresji dla prób wzorcowych, według którego następnie obliczano stężenie białka w badanych próbkach. Otrzymane stężenie końcowe było średnią z dwóch prób dla każdego pomiaru. Po wyznaczeniu stężenia, do wyjściowych próbek dodawano bufor obciążający (bufor Laemmli, Bio-Rad Laboratories, Inc; 2M DTT – ditiotreitol; 10 mM PMSF – fluorek fenylometylosulfonylu, ang. phenylmethylsulfonyl fluoride) w stosunku 4:1 (próbka : bufor), próbki dokładnie mieszano i podgrzewano przez 15 minut w temperaturze 37 °C. W etapie końcowym dokonywano obliczeń końcowych stężeń białek w próbkach po rozcieńczeniu ich buforem obciążającym.

## 3.9.4 Elektroforetyczny rozdział białek i ich detekcja

W celu rozdzielenia otrzymanych frakcji białkowych przygotowano żel poliakrylamidowy składający się z dwóch części: żelu zagęszczającego i 10 % żelu rozdzielającego, ich skład przedstawiono w Tabeli 6.

składnik	żel zagęszczający	10 % żel rozdzielający
Woda	4,15 ml	2 ml
50 % glicerol	-	2,67 ml
3x bufor do żelu (3 M TRIS, 2-amino-2- (hydroksymetylo) propano-1,3-diol, 363,2g na 11; 20 % SDS, <i>ang. sodium</i> <i>dodecyl sulfate</i> , siarczan dodecylu sodu - 0,3 %; pH 8.45)	1,55 ml	3,33 ml
akrylamid	0,5 ml	2 ml
10 % APS ( <i>ang. ammonium persulfate</i> , nadsiarczan amonu)	60 µl	40 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina)	10-20 µl	3-6 µl

**Tabela 6** Składy żeli poliakrylamidowych - zagęszczającego i rozdzielającego wraz z proporcjami poszczególnych związków wykorzystanych do ich przygotowania.

Następnie składano zestaw do formowania żelu. Szyby odtłuszczano etanolem 96 %, pomiędzy krawędzie obu szyb wkładano plastikowe elementy w kształcie wąskich prostokątów, nakładano boczne elementy zaciskające szyby, wstawiano do statywu i uszczelniano, dokręcając śrubami. Pomiędzy szyby wlewano najpierw żel rozdzielający do ok. <sup>3</sup>/<sub>4</sub> wysokości i cienką warstwę izopropanolu celem wyrównania warstwy żelu, odczekano ok. 1 h, aż spolimeryzuje. Następnie odlewano izopropanol i wlewano żel zagęszczający oraz wkładano plastikowy "grzebień" formujący studzienki żelu. Po spolimeryzowaniu (15 min) zalewano studzienki buforem katodowym (1 M TRIS; 20 % SDS (1 %); 1 M TRICINE, N-(2-hydroksy-1,1-bis (hydroksymetylo) etylo) glicyna; pH 8,25) i nakładano próbki (lizaty) oraz marker (PageRuler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder, znacznik umożliwiający określnie masy białka na danej wysokości w żelu rozdzielającym). Do aparatu elektroforetycznego wlewano bufor anodowy (2 M TRIS), wkładano żel z nałożonymi próbkami, nakładano kuwetę z buforem katodowym nad żel i włączano aparat (120 V, prąd stały, ok. 1,5 h). Po rozdziale elektroforetycznym żele wyjmowano z aparatu, usuwano część zagęszczającą i przystępowano do transferu białek na membranę (ze względu na niską trwałość żelu).

W tym celu przygotowano bufor do transferu (10x blot buffer, 100 ml; metanol, 200 ml; woda, 700 ml). Membrane PVDF (z polifluorku winylidenu, ang. polyvinylidene fluoride) namaczano przez 1 min w metanolu, następnie w buforze do transferu. Bibuły celulozowe zwilżano buforem do transferu i układano następujące warstwy transferu, od dołu: bibuła, żel, membrana, bibuła. Dociskano, aby pozbyć się pęcherzyków powietrza i wkładano do aparatu do transferu, tak aby białka z żelu zostały przeniesione z kierunkiem transferu na membranę przy natężeniu 400 mA przez 2 h. Po zakończeniu procesu, wyjmowano membranę i wybarwiano ją niebieskim barwnikiem do znakowania białek (Gel Code™ Blue Safe Protein Stain) celem uwidocznienia białek na membranie PVDF. Membranę kolejno odbarwiano (50 % metanol, 10 % kwas octowy, woda), podpisywano i odrysowywano marker. Odbarwiano dodatkowo w 96 % etanolu, aż do zniknięcia prążków (prążki dla markera zostawały na membranie). Przepłukiwano woda i TBST (sól fizjologiczna buforowana TRIS z Tween 20 - monolaurynian polioksyetyleno (20) sorbitanu; ang. trisbuffered saline with Tween 20 - polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate). Następnie membrane poddawano całonocnej inkubacji w 10 % roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w TBST (4 °C).

Identyfikacji wybranych białek dokonywano poprzez inkubację membrany (2h w temperaturze pokojowej) z przeciwciałem I-rzędowym (rozcieńczonym w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka w proszku, w TBST) wiążącym się z danym białkiem na membranie (wykaz przeciwciał umieszczono w Tabeli 7). W kolejnym kroku usuwano nadmiar przeciwciała, przepłukując membranę roztworem TBST i inkubowano z przeciwciałem IIrzędowym (anty-mysie do anty-mysiego I-rzędowego, itd.) sprzężonym z peroksydazą chrzanową, umożliwiającą naświetlenie kliszy fotograficznej. Membranę kolejno przepłukiwano TBST i zalewano ją roztworem wywołującym (ECL™ Prime, Amersham<sup>™</sup>). Następnie przenoszono do kasety do wywoływania klisz, wkładając ją między folię. W ciemni przykładano klisze fotograficzne do membrany w kasecie, celem przeniesienia sygnału z wyznakowanych przeciwciałami białek. Na wywołanych kliszach odrysowywano dokładnie ułożenie markera z membrany i porównywano jakościowo różnice w poziomach stężeń danego białka między próbami. Klisze fotograficzne skanowano i określano ilościowo obserwowane zmiany. Pomiary densytometryczne (pomiary gestości prążków) wykonywano w programie Image Studio Lite wersja 5.2 (LI-COR Biotechnology).

Rodzaj	Numer katalogowy	Pochodzenie	Masa	Rozcień-
przeciwciała	(firma)	(M – mysie,	cząsteczkowa	czenie
		R – królicze)	białka [kDa]	
Anti-slo1	L6/60 (NeuroMab)	М	110-130	1:400
(KCNMA1)				
Anti-sloβ1	APC-036 (Alomone	R	25-30	1:200
(KCNMB1)	labs)			
Anti-sloβ2	APC-034 (Alomone	R	45	1:200
(KCNMB2)	labs)			
Anti-sloβ3	N40/18 (NeuroMab)	М	35	1:500
(KCNMB3)				
Anti-sloβ4	60122-1-Ig	М	25	1:1000
(KCNMB4)	(Proteintech)			
COXIV	4844C (Cell	R	17	1:1000
	Signaling)			

**Tabela 7** Wykaz przeciwciał wykorzystanych w doświadczeniach. Przedstawiono numery katalogowe, pochodzenie i przewidywane masy prążków, a także użyte rozcieńczenia.

## 3.10 Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  odchylenie standardowe (SD, *ang. standard deviation*). Analizowano dane, które uzyskano z co najmniej trzech niezależnych doświadczeń, w których każde z oznaczeń przeprowadzono w trzech powtórzeniach (badania biochemiczne, biologii molekularnej oraz funkcjonalne). Wyniki pomiarów elektrofizjologicznych przedstawiono jako średnią wartość  $\pm$  SD, te z kolei uzyskano z co najmniej trzech do sześciu niezależnych doświadczeń. Do określenia istotności statystycznej zastosowano test t-Studenta dla porównania między sobą dwóch prób. Do porównania średnich z trzech lub więcej warunków doświadczalnych stosowano jednoczynnikową lub dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA z testem Tukey'a. Analizę danych, przygotowanie wykresów i oznaczeń istotności statystycznej wykonano w programie GraphPad Prism 9 (GraphPad Software). W przypadku wszystkich testów wartość p uznawano za istotną, gdy p <0,05 (\*), p <0,01 (\*\*), p <0,001 (\*\*\*) lub p <0,0001 (\*\*\*\*) lub nieistotną statystycznie dla p > 0,05 (ns).

### 4. Wyniki

W celu wyjaśnienia hipotez badawczych wykonano doświadczenia z wykorzystaniem szerokiego spektrum technik biofizycznych, biochemicznych i metod biologii molekularnej. Z perspektywy poszukiwań nowych i specyficznych aktywatorów kanałów potasowych, z grupy flawonoidów kardioprotekcyjnych, szczególnie ważne jest zastosowanie techniki patch-clamp. Pozwala ona na szczegółowe analizy właściwości biofizycznych i farmakologicznych pojedynczych białek kanałowych w mitochondriach. Dodatkowo podjęto próbę określenia roli flawonoidów kardioprotekcyjnych jako aktywatorów mitochondrialnych kanałów potasowych w zjawisku cytoprotekcji.

### 4.1 Charakterystyka biofizyczna i farmakologiczna kanału mitoBKCa

W komórkach śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926, zidentyfikowano mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami wapnia (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>) [71]. Opublikowane wówczas dane pochodziły z modelu komórek EA.hy926 hodowanych w wysokim stężeniu glukozy (4,5 g/l). Takie warunki sprzyjają indukowaniu cukrzycy. Dlatego badania zawarte w tej rozprawie oparte są na modelu komórek EA.hy926 hodowanych w niskim stężeniu glukozy (1 g/l).

W celu określenia właściwości biofizycznych kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, wykonano pomiary z wykorzystaniem techniki patch-clamp. Obserwowano symetryczny wzrost amplitud płynącego prądu jonowego po stronie napięć dodatnich, jak i ujemnych – nie obserwowano prostowania prądowo-napięciowego (Rycina 11a i 11b). Na podstawie zależności prądowo-napięciowej wyznaczono przewodnictwo kanału. Analiza nachylenia prostej do osi napięcia wskazuje, że średnie przewodnictwo kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w układzie symetrycznego roztworu 150/150 mM KCl wynosi  $\sigma = 285 \pm 3,51$  pS (S – Simens, jednostka przewodnictwa kanału) (n = 6). Należy zwrócić uwagę, że przewodnictwo jest to stała charakterystyczna dla danego kanału tylko w danych warunkach doświadczalnych. Wykazano, że przewodnictwo jest funkcją potencjału i stężenia, a także zależy od składu lipidowego błony czy otoczenia białkowego kanału. Dlatego, porównywanie wartości przewodnictwa z innymi ma sens tylko

wtedy, gdy eksperymenty zostały przeprowadzone w tych samych warunkach doświadczalnych.



**Rycina** 11 Właściwości biofizyczne kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach śródbłonka naczyniowego EA.hy926. (a) Zależność natężenia prądu jonowego [pA] przepływającego przez por kanału, od napięcia [mV]. Dane otrzymano w warunkach symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, pH = 7,2, w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. Na wykresie zaznaczono odchylenie standardowe (SD) zmierzonych wartości prądu jonowego przepływającego przez kanał (n = 6). (b) Rejestracje zmian aktywności kanału w zależności od napięcia (+40, 0 i -40 mV) wykonane w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM KCl, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. Dodatkowo zaznaczono średnie wartości prawdopodobieństw otwarć kanału (P<sub>o</sub>) przy napięciu +40 i -40 mV. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału.

W kolejnym etapie badań wykonano doświadczenia z wykorzystaniem substancji powszechnie znanych jako modulatory kanału typu BK<sub>Ca</sub> (wapń, NS11021, paksylina).

W celu określenia regulacji kanału przez jony wapnia wykonano doświadczenia z wykorzystaniem roztworu izotonicznego o różnych stężeniach Ca<sup>2+</sup> (1, 10, 30 oraz 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>). Roztwory te podawane były za pomocą układu perfuzyjnego (patrz rozdział *3.3.3 Technika patch-clamp*). Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 12. Wraz ze spadkiem stężenia jonów Ca<sup>2+</sup>, obserwowano spadek prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, z 41,1 % ± 3,1 % przy 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, przez 24,1 % ± 1,9 % przy 30  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, 7,1 % ± 0,9 % przy 10  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, aż po 0,5 % ± 0,5 % przy 1  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. Wyniki te świadczą o regulacji kanału przez jony wapnia. Takie zmiany prawdopodobieństw otwarć są typowe dla kanałów typu BK<sub>Ca</sub>.



**Rycina** 12 Regulacja kanalu mito $BK_{Ca}$  przez jony wapnia. (a) Rejestracje zmian aktywności kanalu w zależności od stężenia jonów wapnia. Rejestracje przeprowadzono w symetrycznym układzie roztworu 150/150 mM KCl, pH = 7,2 w obecności 100, 30, 10 i 1  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. "-" oznacza stan zamknięty kanalu; "o" oznacza stan otwarty kanalu. (b) Analiza prawdopodobieństw otwarć kanalu mito $BK_{Ca}$  ( $P_o$ ) w warunkach 100, 30, 10 i 1  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> dla napięcia +40 mV (n = 3). Poziomy istotności statystycznej wyznaczono analizą jednoczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a (p < 0.01 (\*\*); p < 0.0001 (\*\*\*\*)).

W dalszym etapie pracy wykorzystano paksylinę - znany inhibitor kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [55,77,81,143,144]. Podczas rejestracji aktywności kanału techniką patch-clamp, po podaniu 1  $\mu$ M paksyliny od strony macierzy mitochondrialnej, obserwowano całkowite blokowanie kanału (Rycina 13a). Zanotowano spadek prawdopodobieństwa otwarć kanału z 39,6 %  $\pm$  3,4 % do 0,5 %  $\pm$  0,3 % (Rycina 13b). Dane literaturowe wskazują, że paksylina hamuje kanał, gdy ten jest w stanie zamkniętym (wtedy może się z nim związać). Miejsce wiązania paksyliny znajduje się wewnątrz poru kanału [145].



**Rycina** 13 Blokowanie kanału mito $BK_{Ca}$  przez paksylinę. (a) Przykładowe rejestracje aktywności kanału w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 1  $\mu$ M paksyliny. Rejestracje przeprowadzono w symetrycznym układzie roztworów 150/150 mM KCl, pH = 7,2 przy napięciu +40 mV w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mito $BK_{Ca}$  ( $P_o$ ) dla n = 3. Na wykresie zaznaczono poziom istotności statystycznej obserwowanych różnic p < 0,0001 (\*\*\*\*) (test t-Studenta).

Jednym z dobrze opisanych, syntetycznych aktywatorów kanału mitoBK<sub>Ca</sub> jest NS11021. Na Rycinie 14 przedstawiono przykładowy wynik doświadczenia przedstawiającego aktywację mitoBK<sub>ca</sub> w obecności 1  $\mu$ M NS11021. Obserwowano wzrost prawdopodobieństwa otwarć mitochondrialnego kanału BK<sub>ca</sub> z 39,8 % ± 2,3 % do 60,4 % ± 2,4 % po dodaniu 1  $\mu$ M NS11021.



**Rycina 14** Aktywacja kanału mito $BK_{Ca}$  przez NS11021. (a) Przykładowe fragmenty nagrań przepływu prądu jonowego zarejestrowane przy napięciu +40 mV w symetrycznym układzie 150/150 mM KCl, pH = 7,2 w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> oraz po podaniu 1  $\mu$ M NS11021. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć mito $BK_{Ca}$  (P<sub>o</sub>) dla warunków kontrolnych i po podaniu 1  $\mu$ M NS11021n = 3. Na wykresie zaznaczono także poziom istotności statystycznej określony testem t-Studenta (p < 0,001 (\*\*\*)).

Podsumowując, podstawowe właściwości farmakologiczne mitochondrialnego kanału o dużym przewodnictwie, regulowanego przez wapń to:

- regulacja aktywności kanału przez wapń
- aktywacja kanału przez NS11021
- blokowanie aktywności kanału przez paksylinę

Obserwowane zależności potwierdzają, że w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek EA.hy926 obecny jest kanał mitoBK<sub>ca</sub>. Otrzymane dane stanowią punkt wyjścia do dalszych doświadczeń.

### 4.2 Regulacja kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez flawonoidy kardioprotekcyjne

Określenie podstawowych właściwości biofizycznych i farmakologicznych kanału mito $BK_{Ca}$  było kluczowym punktem odniesienia do badań regulacji tego kanału przez wyselekcjonowane flawonoidy. W pierwszych etapach pracy przystąpiono do określenia wpływu: naringeniny i jej pochodnych oraz kwercetyny, cyjanidyny i luteoliny na aktywność kanału mito $BK_{Ca}$ . Ponadto wykonano szereg dodatkowych doświadczeń określających ich toksyczność oraz rolę fizjologiczną.

## 4.2.1 Naringenina

Jednym z badanych flawonoidów była naringenina. Jest ona przedstawicielem flawanonów i występuje między innymi w owocach cytrusowych. Kojarzona jest najczęściej z gorzkim smakiem, który nadaje grejpfrutom.

#### 4.2.1.1 Wpływ naringeniny na aktywność mitoBKca

W pierwszym kroku, wykorzystując technikę patch-clamp określono wpływ naringeniny na aktywność kanału mito $BK_{Ca}$ . W tym celu, podczas pomiarów elektrofizjologicznych, po uzyskaniu odpowiedniego, stabilnego zapisu aktywności kanału, rozpoczęto podawanie naringeniny. Zmiany aktywności kanału w obecności 1, 3 i 10  $\mu$ M naringeniny rejestrowano

w warunkach 10, 30 i 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. Na Rycinie 15(a) przedstawiono przykładowe zapisy zmian aktywności kanału, zaś w części 15(b) analizę prawdopodobieństwa otwarć (P<sub>o</sub>) kanału (n = 4).



**Rycina 15** Wpływ naringeniny na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. (a) Zapisy pomiarów elektrofizjologicznych w obecności 1, 3 i 10 µM naringeniny w 10, 30 oraz 100 µM stężeniu Ca<sup>2+</sup> w układzie symetrycznym 150/150 mM KCl, pH = 7,2. Obok zapisów zaznaczono wartości przyłożonego napięcia. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P<sub>o</sub>) dla 1, 3 i 10 µM naringeniny w warunkach 10, 30, 100 µM Ca<sup>2+</sup> (n = 4). Istotność statystyczną (względem kontroli) określono metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a (p < 0,05 (\*); p < 0,01 (\*\*); p > 0,05 (ns)).

Analizując powyższe dane można zauważyć, że w obecności 10  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, naringenina (NAR) w stężeniu 1  $\mu$ M aktywuje kanał przy napięciu +40 mV. Z analizy prawdopodobieństwa otwarć kanału wynika, że naringenina zwiększa P<sub>o</sub> z 40,7 % ± 9,3 % do 59,8 % ± 3,4 % (Rycina 14b, lewy panel). W przypadku obecności 3  $\mu$ M naringeniny, obserwujemy aktywację kanału zarówno przy napięciu ujemnym jak i dodatnim.

Obserwowano wzrost  $P_o$  odpowiednio o kolejne 11 % i 3 %. Podobnie, w obecności 10  $\mu$ M naringeniny, obserwowano wzrost prawdopodobieństwa otwarć kanału o 5 % przy napięciu -40 mV) i o 5,2 % przy +40 mV, w stosunku do 3  $\mu$ M naringeniny. Dodatkowo, zaobserwowano, że po odpłukaniu naringeniny, czyli podaniu roztworu kontrolnego (10  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>), prawdopodobieństwo otwarć kanału było na takim poziomie, jak w warunkach kontrolnych. Zatem aktywacja kanału była odwracalna.

W drugim przypadku, zarejestrowano aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w symetrycznym układzie roztworu izotonicznego w 30  $\mu$ M stężeniu jonów wapnia. W tym przypadku, 1  $\mu$ M naringenina nie aktywowała kanału w przy obu analizowanych napięciach. Natomiast, obecność 3  $\mu$ M naringeniny wpływała na zwiększenie prawdopodobieństwa otwarć przy napięciu +40 mV z 25,7 % ± 6,2 % na 43,2 % ± 3,1 % i przy napięciu -40 mV z 61 % ± 14,2 % na 73 % ± 5,1 % względem kontroli. Po podaniu naringeniny w stężeniu 10  $\mu$ M, aktywność kanału była nieco wyższa. Obserwowano wzrost P<sub>o</sub> odpowiednio o 4,2 % i 2,4 %. Odwracalność efektu aktywacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez naringeninę obserwowano w przypadku pomiarów wykonanych przy potencjale -40 mV.

Trzeci cykl doświadczeń dotyczący regulacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez naringeninę zaplanowano w roztworach zawierających 100  $\mu$ M wapń. Naringenina w stężeniach 3  $\mu$ M i 10  $\mu$ M, zwiększała prawdopodobieństwo otwarć z poziomu 32,6 % ± 10,1 % do odpowiednio 60,7 % ± 2,3 % i 58,4 % ± 6,3 %, zaś w obecności 1  $\mu$ M naringeniny obserwowany był wzrost P<sub>o</sub> o 6,9 % przy napięciu -40 mV, jednakże wynik ten był nieistotny statystycznie. Dla napięć dodatnich nie zaobserwowano istotnych zmian P<sub>o</sub> po podaniu naringeniny. Odwracalność efektu aktywacji kanału przez naringeninę obserwowano przy obu napięciach.

Powyższe wyniki wskazują, że aktywacja kanału przez naringeninę jest zależna od stężenia jonów wapnia.

#### 4.2.1.2 Potencjał błonowy mitochondriów w obecności naringeniny

Kolejnym etapem było zbadanie wpływu naringeniny na potencjał błony mitochondrialnej. W tym celu przeprowadzono doświadczenia z użyciem barwnika JC-10 i cytometrii przepływowej (opis w rozdziale *3.4 Pomiar potencjału błonowego mitochondriów*) Otrzymane wyniki zaprezentowano na Rycinie 16. Wraz ze wzrostem stężenia naringeniny (10 i 30  $\mu$ M) obserwowano niewielką depolaryzację mitochondriów. W obecności 30  $\mu$ M naringeniny zmiany były na poziomie 3-4 %. Naringenina w obu badanych stężeniach nie spowodowała istotnych statystycznie różnic w zmianach potencjału błony mitochondrialnej.



**Rycina** 16 Efekt naringeniny na potencjał wewnętrznej blony mitochondrialnej. (a) Wpływ 10 i 30  $\mu$ M naringeniny na zmianę potencjału mitochondriów komórek śródbłonka naczyniowego w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1,5 i 3  $\mu$ M FCCP. Poziomy istotności statystycznej określono z użyciem testu t-Studenta względem kontroli (p < 0,0001 (\*\*\*\*), p > 0,05 (ns)). (b) Przykładowe wykresy punktowe dla kontroli, 30  $\mu$ M naringeniny i 3  $\mu$ M FCCP (różowe punkty oznaczają komórki zawierające mitochondria o wysokim potencjale błony wewnętrznej; fioletowe – o niskim).

#### 4.2.1.3 Przeżywalność komórek

Badania elektrofizjologiczne określają bezpośredni wpływ badanej substancji na pojedyncze białko kanałowe. Mając na uwadze możliwe właściwości toksyczne substancji, zaplanowano doświadczenia określające wpływ naringeniny na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach EA.hy926. Badania wykonano z wykorzystaniem testu wykrywającego apoptozę i nekrozę opisanego w rozdziale *3.6 Ocena przeżywalności komórek*.

W określonych punktach czasowych (0,1,3,5,7,9,11 oraz 13 h) zbadano czy traktowanie naringeniną przyczynia się do indukcji apoptozy i nekrozy. Dodatkowo, w przypadku nekrozy wykonano pomiar po 24h. Nie zaobserwowano indukcji apoptozy w komórkach EA.hy926 pod wpływem 10  $\mu$ M i 30  $\mu$ M naringeniny (Rycina 17). Wyniki porównano z próbą traktowaną czynnikiem wywołującym apoptozę (TNF/CHX). Jest on kombinacją 1 ng/ml TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$ , *ang. tumor necrosis factor*  $\alpha$ ) oraz 0,05  $\mu$ g/ml cykloheksymidu (CHX). TNF- $\alpha$ , jest klasycznym induktorem szlaków apoptotycznych w wyniku aktywacji szlaku kwasu arachidonowego [146], zaś cykloheksymid hamuje wydzielanie wczesnych białek antyapoptotycznych, co wzmacnia efekt i zapobiega jego znoszeniu [147]. Pomiaru apoptozy dokonano mierząc luminescencję zaś wyniki przedstawiono jako % RLU (względne jednostki luminescencji, *ang. relative luminescence units*).



**Rycina** 17 Wykres prezentujący zmianę luminescencji w czasie w komórkach śródbłonka naczyniowego. Przedstawiono próby traktowane naringeniną w stężeniach 10 i 30  $\mu$ M, w odniesieniu do nietraktowanych komórek (kontrola) oraz uszkadzanych TNF/CHX. Istotność statystyczną względem kontroli określono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Wyniki otrzymane dla naringeniny porównano z danymi wykonanymi w obecności NS11021 – syntetycznego, powszechnie znanego aktywatora kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. W tym przypadku również nie zaobserwowano indukcji apoptozy. Sygnały luminescencji dla 3  $\mu$ M NS11021 i kontroli, w czasie 0-13 h są podobne. Rezultaty przedstawiono na Rycinie 18.



**Rycina** 18 Zmiany luminescencji w czasie w obecności NS11021. Punkty zaznaczone na wykresie przedstawiają wartości luminescencji w warunkach kontrolnych oraz z 3  $\mu$ M NS11021 i z induktorem apoptozy (TNF/CHX) oznaczane w czasie do 13 h. Istotność statystyczną względem kontroli określono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Oprócz oceny indukcji śmierci apoptotycznej, przeprowadzono pomiary fluorescencji, które umożliwiają oznaczenie poziomu martwicy (nekrozy). Proces ten przebiega wraz z stanem zapalnym i jest dużo bardziej niekorzystny niż apoptoza [148]. W wykonanych doświadczeniach nie obserwowano indukcji nekrozy przez 10 µM i 30 µM naringeninę, jak również nie zaobserwowano indukcji nekrozy przez TNF/CHX. Wszystkie wyniki wykazały poziom nekrozy podobny do obserwowanego w komórkach nietraktowanych. Stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic między próbami.

Podobnie, jak w przypadku apoptozy, określono poziom indukcji nekrozy pod wpływem 3 μM NS11021. Po przeanalizowaniu danych wywnioskowano, że NS11021 nie indukuje nekrozy w komórkach śródbłonka naczyniowego EA.hy926. Nie odnotowano istotnych statystycznie zmian sugerujących pronekrotyczne działanie tej substancji.

#### 4.2.1.4 Rola naringeniny w cytoprotekcji

Oprócz oceny toksyczności w testach apoptozy i nekrozy, określono właściwości protekcyjne naringeniny. Właściwe pomiary poprzedzała godzinna inkubacja komórek EA.hy926 z 10 μM naringeniną. Następnie dodawano 1 ng/ml TNF-α z 0,05 μg/ml cykloheksymidem (TNF/CHX) jako czynnik uszkadzający. Kolejno dokonywano pomiarów analogicznie jak w przypadku oceny przeżywalności.

Wykazano, że naringenina (NAR) zarówno w stężeniu 10 µM, jak i 30 µM ochraniają komórki śródbłonka przed indukcją apoptozy. Ochrona jest tym większa, im wyższe stężenie flawonoidu. Obserwowano obniżenie sygnału luminescencji o odpowiednio 20 % i 35 %. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono na Rycinie 19.



**Rycina** 19 Zmiany uszkodzeń wywoływanych przez TNF- $\alpha$  i cykloheksymid pod wpływem naringeniny. Na wykresie przedstawiono zmiany luminescencji w warunkach kontrolnych, w obecności TNF/CHX oraz 10 i 30  $\mu$ M naringeniny. Poziom istotności statystycznej określono względem danych otrzymanych w warunkach uszkodzenia wywołanego przez TNF/CHX. Wykorzystano analizę dwuczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a; n = 3 (p < 0.05 (\*); p < 0.01 (\*\*); p < 0.001 (\*\*\*\*)).

Równolegle, dokonano oceny pomiaru zmian poziomu nekrozy. Analizowano wyniki otrzymane po 24 godzinach. Analiza danych wskazuje, że naringenina w stężeniu 30  $\mu$ M o ok. 6 % obniża poziom nekrozy w próbie uszkadzanej przez 1 ng/ml TNF- $\alpha$  z 0,05  $\mu$ g/ml

cykloheksymidem (TNF/CHX). Ponadto, po upływie doby, sama naringenina również nie indukuje nekrozy w odniesieniu do kontroli. Rezultaty przedstawiono na Rycinie 20.



**Rycina** 20 Ochronne działanie naringeniny w stosunku do komórek śródbłonka poddanych uszkodzeniu. Na wykresie została przedstawiona procentowa zmiana fluorescencji oznaczającej poziom nekrozy, w obecności 30 µM naringeniny, TNF/CHX i 30 µM naringeniny wraz z TNF/CHX. Oceny poziomu istotności statystycznej względem kontroli dokonano z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a (p < 0,05 (\*); p < 0,01 (\*\*); p > 0,50 (ns)), n = 3.

Oprócz wykonania standardowych pomiarów, które przedstawiono na Rycinach: 19 i 20, po 24 godzinach wykonano zdjęcia obrazujące zaobserwowany efekt ochronny. Fotografie wchodzące w skład Ryciny 21 przedstawiają komórki śródbłonka w warunkach kontrolnych, traktowane 30 µM naringeniną, uszkadzane TNF/CHX oraz preinkubowane z 30 µM naringeniną godzinę przed dodaniem TNF/CHX.



kontrola

30 µM Naringenina

TNF/CHX



**Rycina 21** Fotografie mikroskopowe obrazujące efekt ochronny 30  $\mu$ M naringeniny w stosunku do komórek EA.hy926 poddanych uszkodzeniu przez TNF/CHX (po 24 h). Od lewej przedstawiono komórki kontrolne, traktowane 30  $\mu$ M naringeniną, uszkadzane TNF/CHX oraz inkubowane z 30  $\mu$ M naringeniną na godzinę przed podaniem czynnika uszkadzającego - TNF/CHX. Biała pozioma linia w prawym dolnym rogu ma długość 200  $\mu$ m.

Efekty ochronne naringeniny zarówno w przypadku apoptozy, jak i nekrozy komórek śródbłonka porównano do tych otrzymanych w obecności NS11021 - aktywatora kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. W przypadku apoptozy, wykazano, że NS11021 w stężeniu 3 μM, o ok. 5 % (po 9h) bardziej niż 30 μM naringenina ochrania komórki przed uszkodzeniem. Obserwowano obniżenie sygnału luminescencji z 96 % do 43 % w 9 godzinie doświadczenia (Rycina 22).



**Rycina 22** Efekty ochronne 3  $\mu$ M NS11021 przed indukcją apoptozy w komórkach śródbłonka przez TNF/CHX, w odniesieniu do kontroli i czynnika uszkadzającego (zmiana % RLU – luminescencji w czasie 13 h). Analiza dwuczynnikowa wariancji ANOVA z testem Tukey'a posłużyła do oceny poziomu istotności statystycznej względem uszkodzenia, dla n = 3 (p < 0,01 (\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*)).

Ponadto dokonano oceny właściwości ochronnych NS11021 przed indukcją nekrozy po upływie 24 godzin. Na Rycinie 23 zaprezentowano uśredniony wynik, świadczący o obniżeniu sygnału fluorescencji – nekrozy, o ok.10 %, jako efekt właściwości protekcyjnych NS11021 - aktywatora kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Co więcej, dowiedziono, że po upływie 24 h, 3 μM NS11021 nie indukuje nekrozy. Jednakże otrzymany wynik jest wyższy o 3 %, niż obserwowany w przypadku obecności naringeniny.



**Rycina 23** Pomiar zmian fluorescencji po 24h w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem 3  $\mu$ M NS11021, 1 ng/ml TNF- $\alpha$  z 0,05  $\mu$ g/ml cykloheksymidem (TNF/CHX) i 3  $\mu$ M NS11021 wraz z TNF/CHX. Poziom istotności statystycznej względem kontroli określono analizą jednoczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a (p < 0,05 (\*); p < 0,01 (\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,5 (ns)), n = 3.

## 4.2.1.5 Udział naringeniny w migracji komórkowej

Udział kanałów jonowych w migracji komórkowej został dobrze opisany w literaturze [149]. Istnieją również prace wskazujące udział mitochondrialnych kanałów potasowych w tym procesie, np. kanału mitoKv1.3 [150]. Dlatego postanowiono zbadać czy naringenina, jako aktywator mitoBK<sub>Ca</sub>, ma wpływ na migrację komórek śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926. Postanowiono ponadto ocenić potencjał migracyjny tych komórek pod wpływem NS11021 i wykorzystywanego rozpuszczalnika - DMSO. W związku z tym dokonano obserwacji zarastania rysy, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale *3.7 Ocena migracji komórek*. Miało to na celu określenie fizjologicznej roli naringeniny w komórkach śródbłonka.

Otrzymane dane świadczą o tym, że naringenina w stężeniu 10 µM przyspiesza migrację komórek śródbłonka. Wynik ten porównano z kontrolą, w której nie było obecnej naringeniny. Po 24h odległość pomiędzy dwoma brzegami rysy w próbie traktowanej naringeniną była niemal o połowę mniejsza niż w kontroli. Zaś po 48 godzinach, rysa była całkowicie zarośnięta. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 24. Obok danych liczbowych przedstawiono również fotografie mikroskopowe komórek śródbłonka w warunkach kontrolnych oraz w obecności 10 µM naringeniny. Fotografie przedstawiają zarastanie rysy w 24 godzinnych odstępach czasowych.


**Rycina 24** Wpływ naringeniny na migrację komórek śródbłonka EA.hy926. Na wykresie przedstawiona została miana procentowej szerokości rysy w czasie 48 h w warunkach kontrolnych oraz w obecności 10  $\mu$ M naringeniny. Dla każdej z prób przygotowano zestaw zdjęć obrazujący obserwowany efekt w danych punktach pomiarowych. Istotność statystyczną określono analizą dwuczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a; n = 3; p < 0,5 (\*) (komórki traktowane względem kontroli). Biała skala w prawym dolnym rogu odpowiada długości 500  $\mu$ m. Wszystkie zdjęcia wykonano w jednakowej skali.

Aby wykluczyć efekt rozpuszczalnika, wykonano pomiary zarastania rysy w obecności DMSO. W tym celu wykonano test dla 0,1% DMSO i porównano go z kontrolą. Wynik przedstawiono na Rycinie 25. DMSO nie wpłynęło na migrację komórek, tempo zarastania rysy było podobne jak obserwowane w kontroli. Ponadto na tym samym wykresie pokazano wpływ 3  $\mu$ M NS11021 na potencjał migracyjny komórek EA.hy926. Dowiedziono, iż jako aktywator mitoBK<sub>Ca</sub> przyspiesza nieznacznie migrację, co jest szczególnie widoczne w ostatnim punkcie pomiarowym (48 h).



**Rycina** 25 Zmiany migracji komórek pod wpływem rozpuszczalnika (DMSO) oraz aktywatora kanału mito $BK_{Ca}$  (NS11021). Przedstawione wyniki zostały otrzymane w czasie 0, 6, 12, 24 i 48 h w warunkach kontrolnych oraz w obecności 0,1 % DMSO i 3µM NS11021. Istotność statystyczną względem kontroli potwierdzono analizą dwuczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a (p < 0,05 (\*); p > 0,05 (ns)), n = 6.

#### 4.2.2 Pochodne naringeniny

W świetle wyników badań przeprowadzonych z wykorzystaniem naringeniny zaplanowano poszukiwania aktywatorów kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, będących pochodnymi tego flawonoidu. Być może, modyfikacje naringeniny przyczynią się do odkrycia specyficznych aktywatorów mitochondrialnych kanałów potasowych. Poniżej przedstawiono wyniki dla naringeniny-TPP<sup>+</sup>, chalkonu naringeniny oraz 6-C-glukozydu naringeniny.

#### 4.2.2.1 Naringenina-TPP+

Pierwszą z pochodnych naringeniny poddanych badaniom była naringenina-TPP<sup>+</sup>. Z uwagi na dodatni ładunek jonu TPP<sup>+</sup>, jest on akumulowany w mitochondriach. Dlatego zaplanowano syntezę polegającą na dodaniu jonu TPP<sup>+</sup> do naringeniny w pozycji 7. Prawdopodobnie spowoduje to akumulację naringeniny-TPP<sup>+</sup> w macierzy mitochondrialnej. Oczekuje się, że modyfikacje w strukturze naringeniny, wzmocnią jej aktywacyjny charakter względem kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Związek ten nie jest dostępny komercyjnie.

#### 4.2.2.1.1 Zmiany aktywności kanału mitoBKca pod wpływem naringeniny-TPP<sup>+</sup>

sprawdzenia Podobnie, jak przypadku naringeniny, badania rozpoczęto od W pochodnej na aktywność bezpośredniego wpływu tej mitoBK<sub>Ca</sub>. W wyniku przeprowadzonych pomiarów elektrofizjologicznych techniką patch-clamp, okazało się, że naringenina-TPP<sup>+</sup> nie aktywuje kanału, a wręcz przeciwnie, hamuje przepływ potasu przez ten kanał. Zaobserwowano obniżenie prawdopodobieństwa otwarć kanału z 68,7 %  $\pm$  1,5 % w kontroli do 31,3 %  $\pm$  3,2 % po podaniu 3  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup>, a w przypadku 10  $\mu$ M stężenia tej pochodnej obserwowano obniżenie  $P_0$  do 1,3 % ± 0,6 %. Po odpłukaniu  $P_0$ wzrosło do  $60,7 \% \pm 2,5 \%$ . Reprezentacyjne fragmenty nagrań wraz z analizą prawdopodobieństwa otwarć kanału dla napięcia +40 mV przedstawiono na Rycinie 26.



**Rycina 26** Wpływ naringeniny-TPP<sup>+</sup> na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. (a) Przykładowe zapisy aktywności kanału w warunkach kontrolnych, po podaniu 3  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup>, 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup> oraz odpłukaniu do warunków kontrolnych. Przedstawione dane zarejestrowane zostały przy napięciu +40 mV w symetrycznym układzie stężeń 150/150 mM KCl w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> (P<sub>o</sub>) dla poszczególnych etapów eksperymentu. Poziomy istotności statystycznej wyznaczono testem t-Studenta dla n = 3 (p < 0,001 (\*\*\*)).

## 4.2.2.1.2 Regulacja potencjału błonowego mitochondriów przez naringeninę-TPP+

Pomimo efektu hamującego kanał mitoBK<sub>Ca</sub>, postanowiono określić wpływ naringeniny-TPP<sup>+</sup> na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej. Doświadczenia przeprowadzono wykorzystując barwnik JC-10, zaś pomiary wykonano wykorzystując cytometr przepływowy. Dokonano identyfikacji dwóch populacji komórek: z wysokim i niskim potencjałem wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wykazano, że 10 μM naringenina-TPP<sup>+</sup>, w odniesieniu do kontroli, zwiększa potencjał błony mitochondriów – obserwowano hiperpolaryzację. Wynik ten przedstawiono na Rycinie 27 w porównaniu z pomiarami wykonanymi w obecności FCCP – rozprzęgacza mitochondriów. W przypadku 1,5 i 3 μM FCCP obserwowano depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej.



**Rycina** 27 Wpływ naringeniny-TPP<sup>+</sup> na potencjał wewnętrznej blony mitochondrialnej. (a) Wykres przedstawia zmianę potencjału blony mitochondrialnej w warunkach kontrolnych oraz w obecności 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup> i FCCP (1,5 oraz 3  $\mu$ M). Poziomy istotności statystycznej wyznaczono stosując test t-Studenta dla n = 3 (p < 0,01 (\*\*), p < 0,0001 (\*\*\*\*)). (b) Przykładowe wykresy punktowe, uzyskane z cytometru przepływowego w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup> i 3  $\mu$ M FCCP (różowe punkty oznaczają komórki zawierające mitochondria o wysokim potencjale blony wewnętrznej; fioletowe – o niskim).

#### 4.2.2.1.3 Ocena cytotoksyczności naringeniny-TPP+

Toksyczność naringeniny-TPP<sup>+</sup> badano wykorzystując test apoptozy i nekrozy. W wyniku pomiaru luminescencji okazało się, że pomimo hamującego efektu na mitoBK<sub>Ca</sub>, naringenina-TPP<sup>+</sup> nie indukuje apoptozy. Sygnał luminescencji był ponadto niższy niż w przypadku kontroli, co ilustruje Rycina 28. Co więcej, w wyniku godzinnej inkubacji komórek z tą pochodną przed dodaniem czynnika uszkadzającego, okazało się, że 10  $\mu$ M naringenina-TPP<sup>+</sup> ochrania komórki śródbłonka przed apoptozą wywołaną przez TNF/CHX (1 ng/ml TNF- $\alpha$  z 0,05  $\mu$ g/ml cykloheksymidem).



**Rycina** 28 Wykres przedstawia zmianę luminescencji w czasie w EA.hy926 pod wpływem 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup>, w odniesieniu do kontroli i czynnika uszkadzającego (TNF/CHX). Zobrazowano również właściwości protekcyjne substancji - inkubacja 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup> z komórkami przez 1 h przed dodaniem TNF/CHX. Istotność statystyczną względem kontroli i pomiędzy próbami określono analizą dwuczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n=3 (p < 0,05 (\*); p < 0,001 (\*\*\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Tą samą metodą, dokonując pomiarów fluorescencji, określono udział naringeniny-TPP<sup>+</sup> w indukcji nekrozy. Dowiedziono, że 10 μM naringenina-TPP<sup>+</sup>, nie wykazuje właściwości indukujących śmierć nekrotyczną do 13 godzin od momentu rozpoczęcia pomiarów, w porównaniu do nietraktowanej kontroli. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie. Ponadto na Rycinie 29, przedstawiono dodatkowy pomiar fluorescencji (nekrozy), wykonany po 24 godzinach. Również w tym przypadku obserwowano właściwości ochronne naringeniny-TPP<sup>+</sup>. Godzinna inkubacja 10 μM naringeniny-TPP<sup>+</sup> z komórkami EA.hy926 przed podaniem czynnika uszkadzającego (TNF/CHX) powodowała obniżenie sygnału świadczącego o nekrozie, względem uszkodzenia. Co więcej, wynik dla samej naringeniny-TPP<sup>+</sup> okazał się być zbliżony do próby kontrolnej.



**Rycina** 29 Wpływ 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup> na indukcję nekrozy w komórkach śródbłonka naczyniowego po 24 godzinach. Na wykresie przedstawiono ponadto dane dla kontroli i po podaniu czynnika uszkadzającego. Pierwszy słupek od prawej wskazuje na obniżenie sygnału w obecności 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup> i czynnika uszkadzającego TNF/CHX. Poziom istotności statystycznej (względem kontroli) określono w przedziałach: p < 0,05 (\*); p < 0,001 (\*\*\*\*); p > 0,5 (ns) (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem Tukey'a), n = 3.

### 4.2.2.1.4 Wpływ naringeniny-TPP<sup>+</sup> na migrację komórek

W kolejnym etapie zbadano wpływ naringeniny-TPP<sup>+</sup> na migrację komórek EA.hy926 w teście zarastania rysy. Wykazano, że zarówno 3  $\mu$ M i 10  $\mu$ M naringenina-TPP<sup>+</sup> (inhibitor kanału mitoBK<sub>Ca</sub>) powoduje wolniejszą migrację komórek w odniesieniu do nietraktowanej kontroli. Jednak pochodna naringeniny w stężeniu 3  $\mu$ M hamowała migrację nieco bardziej niż w stężeniu 10  $\mu$ M. Zależność stężeniowa jest zatem odwrócona. Z otrzymanymi rezultatami można się zapoznać na Rycinie 30. W wyniku określenia poziomów istotności statystycznej, bezpośrednio porównując daną próbę do kontroli, w teście t-Studenta, potwierdzono rezultaty jako istotne statystycznie, odpowiednio p < 0,01 dla 3  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup> i p < 0,05 dla stężenia 10  $\mu$ M.



**Rycina** 30 Wpływ naringeniny-TPP<sup>+</sup> na migrację (zarastanie rysy) komórek śródbłonka naczyniowego EA.hy926 w odniesieniu do komórek nietraktowanych. Na wykresie przedstawiono % szerokości zarastania rysy w czasie 48 h w warunkach kontrolnych oraz w obecności 3  $\mu$ M i 10  $\mu$ M naringeniny-TPP<sup>+</sup>. Poziomy istotności statystycznej względem kontroli wyznaczono analizą jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a, n = 3 dla każdej z prób (p < 0,05 (\*); p < 0,01 (\*\*)).

W celu zobrazowania powyższych wyników przygotowano zestaw zdjęć zaprezentowany na Rycinie 31. Naringenina-TPP<sup>+</sup> w stężeniu 3  $\mu$ M spowalniała migrację komórek w odniesieniu do komórek kontrolnych.



3 µM Naringenina-TPP<sup>+</sup>

**Rycina 31** Zdjęcia mikroskopowe przedstawiające migrację komórek EA.hy926 w kontroli oraz pod wpływem 3 μM naringeniny-TPP<sup>+</sup>. Zdjęcia wykonano w puntach czasowych: 0, 6, 12, 24 i 48 h. Wszystkie zdjęcia wykonano w jednakowej skali odpowiadającej długości 500 μm, oznaczonej w prawym dolnym rogu.

#### 4.2.2.2 Chalkon naringeniny

Kolejną pochodną naringeniny wytypowaną do badań był chalkon naringeniny ((E)-3-(4-hydroksyfenylo)-1-(2,4,6-trihydroksyfenylo)prop-2-en-1-on). Dotychczas nie opublikowano prac określających wpływ tej substancji na aktywność kanałów potasowych.

#### 4.2.2.2.1 Ocena aktywności kanału mitoBKCa w obecności chalkonu

Ocenę bezpośredniego wpływu chalkonu naringeniny na kanał mitoBK<sub>Ca</sub> wykonano techniką patch-clamp. Po wyizolowaniu mitochondriów i przygotowaniu mitoplastów przystąpiono do prób uzyskania aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w pipecie pomiarowej. Podobnie jak wcześniej, obecność tego kanału potwierdzano na podstawie właściwości biofizycznych: przewodnictwa i prawdopodobieństwa otwarć kanału. Kolejno, bezpośrednio na białko kanałowe podawano chalkon naringeniny w strumieniu roztworu, wypływającego z szklanej kapilary. Równocześnie rejestrowano zmiany aktywności kanału. Otrzymane dane, z trzech niezależnych doświadczeń, poddano analizie i przygotowano Rycinę 32. W części (a) Ryciny 32 przedstawiono przykładowe fragmenty rejestracji nagrane przy napięciu -40 mV, a w części (b) analizę prawdopodobieństwa otwarć dla danych etapów doświadczenia przy napięciach +40 mV i -40 mV.

Po podaniu 10  $\mu$ M chalkonu naringeniny, prawdopodobieństwo otwarć kanału obniżyło się z 26,1 % ± 4,3 % do 14,0 % ± 9,7 % przy napięciu -40 mV oraz z 63,2 % ± 3,9 % do 46,7 % ± 18,2 % przy +40 mV. Po odpłukaniu chalkonu naringeniny, aktywność kanału przy napięciu +40 mV powróciła do takiej jak w kontroli (66,7 % ± 6,6 %), zaś przy -40 mV pozostała na poziomie 12,5 % ± 1,5 %. Dopiero podanie 30  $\mu$ M stężenia tej pochodnej zwiększyło prawdopodobieństwo otwarć przy -40 mV do 32,4 % ± 2,5 %, natomiast przy +40 mV pozostało na poziomie 65,4 % ± 8,3 %. Podsumowując, obserwowane zmiany aktywności kanału w powyższych warunkach nie świadczą, że chalkon naringeniny jest aktywatorem kanału mitoBK<sub>Ca</sub>.



**Rycina** 32 Wpływ chalkonu naringeniny na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. (a) Przykładowe rejestracje w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 10  $\mu$ M chalkonu naringeniny jego odpłukaniu, a następnie podaniu 30  $\mu$ M chalkonu naringeniny i 1  $\mu$ M paksyliny. Rejestracji dokonano przy napięciu -40 mV w symetrycznym układzie roztworu 150/150 mM KCl, w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> (P<sub>o</sub>) przy napięciach -40 mV i +40 mV. Poziomy istotności statystycznej względem kontroli określono metodą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a, n = 3 (p < 0,05 (\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

#### 4.2.2.3 Pochodna cukrowa naringeniny

Szeroką grupę flawonoidów stanowią tzw. pochodne cukrowe. Jedną z badanych pochodnych naringeniny, należącą do tej grupy był 6-C-glukozyd naringeniny, której wpływ na kanał mitoBK<sub>Ca</sub>, podobnie jak chalkonu naringeniny czy naringeniny-TPP<sup>+</sup>, nie został dotychczas poznany.

#### 4.3.2.3.1 Wpływ 6-C-glukozydu naringeniny na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>

Wykorzystując technikę patch-clamp określono wpływ 6-C-glukozydu naringeniny na aktywność mitoBK<sub>Ca</sub>.

Na Rycinie 33 w części (a) przedstawiono przykładowe rejestracje aktywności kanału w warunkach kontrolnych, 100 nM 6-C glukozydu naringeniny, odpłukania (100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>) oraz 1  $\mu$ M paksyliny przy -40 mV. W części (b) natomiast, przedstawiono analizę prawdopodobieństwa otwarć kanału przy napięciach +40 mV i -40 mV zgodnie z powyższą sekwencją.



**Rycina 33** Aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> pod wpływem 6-C-glukozydu naringeniny. (a) Rejestracje aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 100 nM 6-C-glukozydu naringeniny, odpłukania i 1  $\mu$ M paksyliny. Pomiarów dokonano przy napięciu -40 mV w układzie symetrycznym stężeń 150/150 mM KCl, w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> (P<sub>o</sub>) dla poszczególnych etapów pomiarów prowadzonych przy napięciach +40 mV i -40 mV. Poziomy istotności statystycznej względem kontroli określono za pomocą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,01 (\*\*); p < 0,001 (\*\*\*))

Przy napięciu ujemnym zaobserwowano spadek prawdopodobieństwa otwarć kanału po podaniu 100 nM stężenia pochodnej cukrowej z 19,4 %  $\pm$  1,1 % do 5,3 %  $\pm$  2,7 %, odpłukanie obniżyło aktywność do 2,8 %  $\pm$  0,7 %, natomiast 1 µM paksylina całkowicie

zahamowała kanał. Przy +40 mV, podobnie, zaobserwowano zmniejszenie P<sub>o</sub> tym razem z 62,2 %  $\pm$  1,2 % do 23 %  $\pm$  10,5 %, odpłukanie nie zmieniło tego stanu, z kolei 1  $\mu$ M paksylina ponownie całkowicie dezaktywowała kanał. W tych doświadczeniach również zaobserwowano wyjściowe wyższe wartości prawdopodobieństwa otwarć dla prób kontrolnych, jednakże kanał wykazywał wszelkie właściwości mitoBK<sub>Ca</sub> wraz z wrażliwością na klasyczny inhibitor – paksylinę. Podobnie jak w przypadku chalkonu naringeniny, zrezygnowano z dalszych badań z udziałem 6-C-glukozydu naringeniny.

Poszukiwania aktywatorów kanału mito $BK_{Ca}$  z grupy pochodnych naringeniny nie przyniosły oczekiwanych wyników. Żadna z badanych substancji nie okazała się być aktywatorem mito $BK_{Ca}$ . Wbrew wcześniejszym założeniom sugerującym zwiększenie efektu aktywacyjnego naringeniny względem kanału, okazało się, że badane pochodne naringeniny wpływają na mito $BK_{Ca}$  raczej hamująco.

#### 4.2.3 Luteolina

Kolejno podjęto próbę określenia wpływu flawonoidów określanych jako kardioprotekcyjne. Jednym z nich, wybranych na podstawie dostępnej literatury, była luteolina. Flawon ten między innymi obniża stres oksydacyjny i ochrania tkanki serca przed niekorzystnym działaniem niedotleniania.

# 4.2.3.1 Regulacja aktywności mitoBK<sub>Ca</sub> przez luteolinę w warunkach kontrolnych i w obecności DTT

W pierwszym etapie badań, stosując technikę patch-clamp określono wpływ luteoliny na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego o dużej przewodności regulowanego jonami wapnia (mitoBK<sub>Ca</sub>). Doświadczenia wykonano w symetrycznym układzie stężeń 150/150 mM KCl, w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. Po podaniu 10  $\mu$ M luteoliny nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przy napięciu +40 mV oraz - 40 mV. Przykładowe fragmenty nagrań w warunkach kontrolnych i po podaniu 10  $\mu$ M luteoliny przedstawiono na Rycinie 34.



**Rycina** 34 Efekt luteoliny na aktywność kanału mito $BK_{Ca}$  obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek śródbłonka naczyniowego. Na rycinie przedstawiono aktywność kanału mito $BK_{Ca}$  w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 10 µM luteoliny. Przedstawione zapisy otrzymane zostały przy napięciu +40 mV oraz -40 mV w symetrycznym układzie stężeń 150/150 mM KCl, w obecności 100 µM Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału.

Z uwagi na brak wpływu luteoliny (LUT) na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach opisanych powyżej, postanowiono zmienić środowisko doświadczeń. Warunki panujące w mitochondriach ze względu na obecność m.in. RFT są nieraz bardziej zredukowane, czasem zaś nieco bardziej utlenione, mimo iż wiele mechanizmów jest zaangażowanych w to, aby w macierzy mitochondrialnej panowała stabilna równowaga procesów redoks. Dodatkowo, z uwagi na zastosowanie luteoliny w leczeniu chorób związanych z uszkodzeniami oksydacyjnymi postawiono pytanie czy zmiana warunków redoks środowiska pomiarowego może wpływać na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> oraz właściwości aktywacyjne luteoliny? W tym celu wykonano serię doświadczeń, wykorzystując DTT (ditiotreitol). DTT jest związkiem, który wykorzystywany jest do ochrony grupy tiolowych przed utlenieniem bądź redukcją mostków dwusiarczkowych [151], np. pomiędzy atomami siarki reszt cysteinowych, występujących w sekwencji aminokwasowej domen budujących por kanału [152]. Wynik doświadczeń wykonanych w obecności DTT przedstawiono na Rycinie 35.



**Rycina** 35 Regulacja aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez luteolinę w warunkach zredukowanych. (a) Przykładowe zapisy aktywności kanału w warunkach kontrolnych, następnie w warunkach zredukowanych 0,5 mM DTT, w warunkach zredukowanych 0,5 mM DTT w obecności 10  $\mu$ M luteoliny, po odpłukaniu do warunków kontrolnych, po podaniu 10  $\mu$ M luteoliny bez DTT, po ponownym odpłukaniu i pod wpływem 1  $\mu$ M paksyliny. Pomiary wykonano przy napięciach +40 mV i -40mV w symetrycznym układzie stężeń 150/150 mM KCl, w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P<sub>o</sub>) dla poszczególnych etapów doświadczeń z części (a) wraz z określeniem poziomów istotności statystycznej (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem Tukey'a), n = 4 (p < 0,05 (\*); p < 0,01 (\*\*); p < 0,001 (\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Analiza danych tego doświadczenia wskazuje, że przy napięciu -40 mV P<sub>o</sub> po dodaniu 0,5 mM DTT spadło z 11,6 % ± 3,8 % do 1,5 % ± 0,4 %. Następnie 10  $\mu$ M luteolina wraz z DTT spowodowała wzrost aktywności kanału do 8,2 % ± 1,4 %, a po odpłukaniu prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> spadło do 2,5 % ± 0,2 %. 10  $\mu$ M luteolina podana na tle roztworu kontrolnego bez DTT zwiększyła P<sub>o</sub> do 13,7 % ± 1,7 %, które kolejno po odpłukaniu spadło ponownie do 2,8 % ± 0,5 %. W końcowym etapie doświadczenia podanie 1  $\mu$ M paksyliny spowodowało całkowite zamknięcie kanału mitoBK<sub>Ca</sub>.

Nieco inaczej regulacja mitoBK<sub>Ca</sub> wyglądała przy dodatnim napięciu (+40 mV). W kontroli prawdopodobieństwo otwarć kanału wynosiło średnio 30,8 % ± 8,3 %, a po podaniu 0,5 mM DTT spadło do 4,9 % ± 5,3 %, zaś po podaniu DTT wraz z 10  $\mu$ M luteoliną wzrosło do 21 % ± 10,2 %. Następnie w wyniku odpłukania do warunków kontrolnych, P<sub>o</sub> wzrosło do 27 % ± 5,3 %, a podanie 10  $\mu$ M luteoliny bez DTT powodowało wzrost P<sub>o</sub> kanału mitoBK<sub>Ca</sub> do wartości 36,5 % ± 11,1 %. Kolejne odpłukanie prowadziło do obniżenia aktywności kanału do 11,2 % ± 0,2 %, a 1  $\mu$ M paksylina blokowała aktywność kanału.

Podsumowując, 10 µM luteolina nie zmienia aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych. Natomiast w warunkach zredukowanych DTT, aktywuje go zarówno przy dodatnich, jak i ujemnych napięciach, jednakże przy -40 mV wyniki nie wykazały istotności statystycznej.

#### 4.2.3.2 Wpływ luteoliny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej

Zbadano również wpływ luteoliny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej wykorzystując barwnik fluorescencyjny JC-10. Doświadczenie umożliwia ocenę ilości komórek zwierających mitochondria o wysokim i niskim potencjale, wykorzystując metodę

cytometrii przepływowej. Na godzinę przed przystąpieniem do oznaczenia, do naczyń hodowlanych dodano odpowiednie objętości luteoliny, odpowiadające jej końcowym stężeniom 3 µM i 10 µM. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 36.



**Rycina** 36 Wpływ luteoliny na potencjał wewnętrznej blony mitochondrialnej komórek śródbłonka naczyniowego. (a) Zmiana potencjału blony mitochondrialnej pod wpływem luteoliny w stężeniu 3 i 10  $\mu$ M w odniesieniu do kontroli nietraktowanej i danych otrzymanych w obecności 1,5 i 3  $\mu$ M FCCP. Poziomy istotności statystycznej, w odniesieniu do kontroli, wyznaczono stosując test t-Studenta dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*)). (b) Przykładowe wykresy punktowe z cytometru przepływowego dla kontroli, 10  $\mu$ M luteoliny i 3  $\mu$ M FCCP (różowe punkty oznaczają komórki zawierające mitochondria o wysokim potencjale blony wewnętrznej; fioletowe – o niskim).

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia, stwierdzono, że luteolina nie wpływa na potencjał mitochondriów. Jej efekt określono jako neutralny, gdyż nie zaobserwowano istotnych różnic względem nietraktowanej kontroli. Wyniki porównano do tych otrzymanych w obecności różnych stężeń FCCP, klasycznego rozprzęgacza mitochondriów. FCCP w stężeniu 3 µM niemal całkowicie depolaryzuje mitochondria.

#### 4.2.3.3 Cytotoksyczność luteoliny

Następnie określono poziom toksyczności luteoliny względem komórek EA.hy926 za pomocą testu do wykrywania apoptozy oraz nekrozy. Wyniki dla apoptozy przedstawiono na Rycinie 37.

Wykazano, że luteolina w stężeniach 3 i 10  $\mu$ M nie indukuje apoptozy w porównaniu do komórek uszkadzanych TNF/CHX (1 ng/ml/0,05  $\mu$ g/ml). Analiza danych wskazuje, że otrzymane różnice nie są istotne statystycznie. Wyniki były podobne do tych uzyskanych w nietraktowanej kontroli. Podobnie w przypadku nekrozy – luteolina w badanych stężeniach nie indukowała procesów nekrotycznych. Również nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie.



**Rycina 37** Wpływ luteoliny na apoptozę komórek EA.hy926. Przedstawiono wyniki doświadczeń w warunkach kontrolnych, po dodaniu 3 i 10  $\mu$ M luteoliny oraz w obecności tego flawonoidu na indukcję śmierci apoptotycznej (sygnał luminescencji) w odniesieniu do nietraktowanej kontroli oraz induktora apoptozy w komórkach śródbłonka – TNF/CHX. Poziomy istotności statystycznej względem kontroli, ustalono z użyciem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p >0,05 (ns)).

#### 4.2.3.4 Ocena właściwości protekcyjnych luteoliny

W trakcie przeprowadzania testów apoptozy i nekrozy, postanowiono jednocześnie sprawdzić czy luteolina może ochraniać komórki śródbłonka naczyniowego przed

uszkodzeniem będącym kombinacją TNF- $\alpha$  z cykloheksymidem (TNF/CHX). W tym celu, na godzinę przed dodaniem czynnika uszkadzającego do komórek, poddano je inkubacji z luteoliną w stężeniach 3 i 10  $\mu$ M. Rezultaty dotyczące ochrony przed indukcją apoptozy przedstawiono na Rycinie 38.



**Rycina** 38 Efekt ochronny luteoliny przed uszkodzeniem komórek śródbłonka przez TNF/CHX. Wykres przedstawia zmianę luminescencji w czasie (indukcja apoptozy) w warunkach kontrolnych oraz w komórkach inkubowanych z 3 i 10  $\mu$ M luteoliną na godzinę przed dodaniem TNF/CHX, a także w komórkach uszkadzanych TNF/CHX. Poziomy istotności statystycznej względem uszkodzenia ustalono z użyciem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,01 (\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*); p >0,05 (ns)).

Po przeprowadzeniu doświadczeń ustalono, że 3 µM luteolina nie ochrania komórek śródbłonka przed uszkodzeniem wywołanym przez TNF/CHX, w przeciwieństwie do sytuacji kiedy komórki były traktowane 10 µM luteoliną. W tym przypadku zaobserwowano istotną statystycznie protekcję. Po 8 godzinach prowadzenia doświadczeń, sygnał apoptozy był niższy o ponad 20 %.

Dodatkowo określono potencjalne właściwości ochronne luteoliny przed śmiercią nekrotyczną komórek, mierząc sygnały fluorescencji po 24 godzinach od chwili rozpoczęcia oznaczeń. Krytyczną próbą do oceny właściwości cytoprotekcyjnych flawonoidu, była ta, do której po godzinie inkubacji z luteoliną, dodano TNF/CHX. Wyniki zaprezentowano na Rycinie 39.



**Rycina 39** Wpływ luteoliny na indukcję nekrozy w komórkach śródbłonka naczyniowego po 24 h. Na wykresie przedstawiono wyniki otrzymane w warunkach kontrolnych, 3 i 10  $\mu$ M luteoliny, czynnika uszkadzającego TNF/CHX (1 ng/ml/0,05  $\mu$ g/ml) oraz w obecności kombinacji 3 i 10  $\mu$ M luteoliny z TNF/CHX. Poziom istotności statystycznej względem kontroli określono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); P > 0,05 (ns)).

Dowiedziono, że luteolina w obu badanych stężeniach nie indukuje nekrozy nawet po 24 godzinach. Ponadto nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w protekcji przed procesami martwicy, analizując próby, w których godzinę przed dodaniem TNF/CHX podano luteolinę. Luteolina nie ochrania komórek EA.hy926 przed nekrozą wywołaną przez czynnik TNF/CHX.

#### 4.2.3.5 Udział luteoliny w migracji komórek

Po przeprowadzeniu pomiarów elektrofizjologicznych oraz testów toksyczności, poddano ocenie wpływ luteoliny na migrację komórek śródbłonka. Po wykonaniu rysy w studzienkach płytek hodowlanych, dodawano luteolinę w objętościach odpowiadających stężeniom 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M i 30  $\mu$ M. Analiza otrzymanych wyników wykazała, że 3  $\mu$ M luteolina przyspiesza migrację komórek EA.hy926 w odniesieniu do kontroli. Wynik ten był istotny statystycznie na poziomie p > 0,05). W przypadku komórek traktowanych 10  $\mu$ M luteoliną nie obserwowano zmian migracji komórek EA.hy926, jednak wynik jest nieistotny

statystycznie. Rezultaty przedstawiono na Rycinie 40, zaś Rycina 41 zawiera poglądowe zdjęcia świadczące o różnicach w migracji pomiędzy 3 μM luteoliną, a próbą kontrolną.



**Rycina 40** Wpływ luteoliny na migrację komórek EA.hy926. Na wykresie przedstawiono procentową szerokość rysy obserwowaną w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu luteoliny w stężeniach 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M i 30  $\mu$ M. Doświadczenia prowadzono w czasie 48 godzin. Poziomy istotności statystycznej określono z użyciem analizy dwuczynnikowej ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,05 (\*); p > 0,05 (ns)).



**Rycina** 41 Poglądowe fotografie przedstawiające zarastanie rysy w kontroli i próbie traktowanej 3  $\mu$ M luteoliną. Zdjęcia wykonano w punktach czasowych: 0, 6, 12, 24 i 48 h. Biała linia w prawym dolnym rogu odpowiada długości 500  $\mu$ m. Wszystkie zdjęcia wykonano w jednakowej skali.

### 4.2.4 Cyjanidyna

Flawonoidem o właściwościach kardioprotekcyjnych, z grupy antocyjanów, wybranym do badań, na podstawie dostępnej literatury, była cyjanidyna. Postanowiono określić jej wpływ, w postaci aglikonu, na mitochondrialny kanał BK<sub>Ca</sub> oraz ewentualne konsekwencje funkcjonalne modulacji aktywności kanału.

# 4.2.4.1 Zmiany aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych i zredukowanych

Pierwszym etapem badań było określenie wpływu cyjanidyny na aktywność kanału mito $BK_{Ca}$  wykorzystując technikę patch-clamp. Do doświadczeń elektrofizjologicznych wybrano dwa jej stężenia: 3  $\mu$ M i 10  $\mu$ M. Doświadczenia wykonano przy napięciu +40 mV.

Wykazano, że 3  $\mu$ M cyjanidyna obniża prawdopodobieństwo otwarć kanału z 27,1 % ± 9,3 % do 7,3 % ± 1,7 %. Po odpłukaniu do warunków kontrolnych, P<sub>o</sub> wzrosło do 17,7 % ± 7,8 %. W dalszej części doświadczenia, obecność 10  $\mu$ M cyjanidyny najpierw powodowała aktywację kanału, P<sub>o</sub> wzrosło do 32,3 % ± 8,6 %, a po chwili obserwowano zahamowanie aktywności do wartości P<sub>o</sub> na poziomie 4,6 % ± 2,6 %. Rolę cyjanidyny zatem określono jako niejednoznaczną z przewagą właściwości hamujących aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Przykładowe zapisy uzyskane podczas rejestracji przedstawiono w części (a) Ryciny 42. Z kolei w panelu (b) zaprezentowano analizę prawdopodobieństw otwarć kanału dla poszczególnych etapów doświadczenia.



**Rycina** 42 Aktywność kanału mito $BK_{Ca}$  w obecności cyjanidyny. (a) Reprezentacyjne fragmenty zapisów aktywności kanału dla kontroli oraz po podaniu 3 µM cyjanidyny, odpłukaniu i pod wpływem 10 µM cyjanidyny przy +40 mV w układzie symetrycznego roztworu 150/150 mM KCl, 100 µM Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P<sub>o</sub>) dla poszczególnych etapów doświadczenia. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z testem Tukey'a posłużyła do wyznaczenia poziomów istotności statystycznej względem kontroli dla n = 3 (p < 0,05 (\*); p > 0,05 (ns)).

Podobnie jak w przypadku luteoliny, również dla cyjanidyny, gdzie efekt w warunkach kontrolnych był niejednoznaczny, postanowiono zredukować środowisko dodając 0,5 mM DTT. Być może cyjanidyna w różnym stopniu wpływa na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, w zależności od zmiennych warunków redoks. Rezultaty tego doświadczenia przedstawiono na Rycinie 43.



**Rycina** 43 Regulacja aktywności mito $BK_{Ca}$  przez cyjanidynę w warunkach zredukowanych. (a) Przykładowe zapisy otwarć kanału w warunkach kontrolnych; 0,5 mM DTT; 0,5 mM DTT wraz z 10  $\mu$ M cyjanidyną; 10  $\mu$ M cyjanidyny oraz odpłukania. Dane zostały zarejestrowane przy napięciu -40 mV, w układzie symetrycznym roztworu 150/150 mM KCl, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć mito $BK_{Ca}$  (P<sub>o</sub>) dla powyższych etapów doświadczenia. Poziomy istotności statystycznej wyznaczono za pomocą analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey 'a dla n = 3 ((p < 0,05 (\*); p > 0,05 (ns)).

W wyniku dodania 0,5 mM DTT, odnotowano spadek prawdopodobieństwa otwarć kanału z 10,2 %  $\pm$  3,1 % w kontroli do 0,7 %  $\pm$  0,2 %. Kolejno, podanie roztworu z 0,5 mM DTT wraz z cyjanidyną (10 µM) spowodował wzrost P<sub>o</sub> do 36 %  $\pm$  13 %, a podana następnie 10 µM cyjanidyna w roztworze kontrolnym, zwiększyła aktywność kanału do 43,9 %  $\pm$  12,2 %. W wyniku odpłukania, aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> spadła do 16,1 %  $\pm$  11,5 %. Otrzymane wyniki wskazują, że cyjanidyna aktywuje kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach zredukowanych.

#### 4.2.4.2 Udział cyjanidyny w zmianach potencjału błony mitochondrialnej

Kolejno zbadano wpływ cyjanidyny na zmiany potencjału mitochondriów. Metodą cytometrii przepływowej z użyciem JC-10 wyznakowano komórki z wysokim i niskim potencjałem wewnętrznej błony mitochondrialnej w próbach poddanych działaniu

cyjanidyny i porównano do komórek nietraktowanych – kontroli. Rezultaty przedstawiono na Rycinie 44.



**Rycina** 44 Wpływ cyjanidyny na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej komórek śródbłonka naczyniowego. (a) Analiza zmiany potencjału pod wpływem 3 i 10  $\mu$ M cyjanidyny w odniesieniu do kontroli i FCCP (1,5 oraz 3  $\mu$ M). Poziomy istotności statystycznej względem kontroli wyznaczono stosując analizę jednoczynnikową ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)). (b) Przedstawiono przykładowe wykresy punktowe dla kontroli, 10  $\mu$ M cyjanidyny i 3  $\mu$ M FCCP (różowe punkty oznaczają komórki zawierające mitochondria o wysokim potencjale błony wewnętrznej; fioletowe – o niskim).

Wykazano, że cyjanidyna 3 i 10  $\mu$ M cyjanidyna o 2-3 % zwiększa potencjał błonowy mitochondriów w porównaniu z kontrolą, jednakże nieistotnie statystycznie. Niemalże całkowitą depolaryzację zaobserwowano w próbie traktowanej 3  $\mu$ M FCCP.

#### 4.2.4.3 Ocena toksyczności cyjanidyny

Następnie określono wpływ cyjanidyny na przeżywalność komórek śródbłonka stosując testy apoptozy i nekrozy, a wynik odniesiono do komórek nietraktowanych i celowo uszkadzanych przez 1 ng/ml/ 0,05 µg/ml TNF/CHX. Rezultaty dla oceny indukcji apoptozy przedstawiono na Rycinie 45.



**Rycina 45** Ocena indukcji apoptozy komórek śródbłonka linii EA.hy926 po podaniu cyjanidyny. Na wykresie przedstawiono zmianę luminescencji w czasie pod wpływem 3 i 10  $\mu$ M cyjanidyny w odniesieniu do nietraktowanej kontroli oraz induktora apoptozy w komórkach śródbłonka naczyniowego – TNF/CHX. Poziomy istotności statystycznej względem kontroli ustalono z użyciem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p >0,05 (ns)).

Linie zależności sygnału luminescencji od czasu dla 3 i 10 µM cyjanidyny świadczą o nieco większej apoptozie komórek EA.hy926 pod wpływem tego flawonoidu, jednakże obserwowane różnice okazały się być nieistotne statystycznie.

Pomiar fluorescencji możliwy do zarejestrowania w momencie przerwania błony komórkowej i związania się fluoroforu z błoną jądrową, świadczy o martwicy – śmierci nekrotycznej komórki. Cyjanidyna w obu badanych stężeniach (3 i 10 µM) nie przyczyniła się indukcji nekrozy. Zarejestrowano sygnały fluorescencji na podobnych poziomach, do tych, występujących w komórkach kontrolnych.

### 4.2.4.4 Rola cyjanidyny w cytoprotekcji

Podczas badania toksyczności cyjanidyny względem komórek EA.hy926, zdecydowano się również ocenić jej właściwości protekcyjne. W tym celu do komórek dodano cyjanidynę na godzinę przed podaniem czynnika uszkadzającego TNF/CHX.

Wykazano, że cyjanidyna (CYA) 3 i 10 μM nie ochrania przed indukcją apoptozy przez TNF/CHX. Wynik ten przedstawiono na Rycinie 46, gdzie linie dla cyjanidyny niemalże pokrywają się z tą uzyskaną z sygnału luminescencji w warunkach uszkodzenia.



**Rycina** 46 Ocena właściwości ochronnych cyjanidyny przed apoptozą komórek śródbłonka naczyniowego. Wykres przedstawia pomiary luminescencji w czasie dla kontroli, czynnika wywołującego apoptozę (TNF/CHX) oraz prób wstępnie inkubowanych z 3 i 10  $\mu$ M cyjanidyną na godzinę przed dodaniem TNF/CHX. Istotność statystyczną względem uszkodzenia ustalono dwuczynnikową analizą wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n=3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Ponadto po 24 godzinach od dodania czynnika uszkadzającego do komórek, zmierzono sygnał fluorescencji pozwalający ocenić nekrozę. Okazało się, że cyjanidyna w obu badanych stężeniach nie ochrania przed nekrozą, jak również jej nie indukuje. Otrzymane różnice są nieistotne statystycznie. Uzyskane dane przedstawiono na Rycinie 47.



**Rycina 47** Wpływ cyjanidyny na indukcję nekrozy (pomiar fluorescencji w czasie) w komórkach linii EA.hy926 po 24 godzinach prowadzenia doświadczeń. Przedstawiono wyniki uzyskane dla kontroli, 3 i 10  $\mu$ M cyjanidyny, TNF/CHX oraz 3 i 10  $\mu$ M cyjanidyny w obecności czynnika uszkadzającego (TNF/CHX). Poziom istotności statystycznej względem kontroli określono dwuczynnikową analizą wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

### 4.2.4.5 Wpływ cyjanidyny na migrację komórek

W testach gojenia rany/zarastania rysy (*ang. Wound Healing/Scratch Assay*) określono wpływ cyjanidyny na migrację komórek EA.hy926.

Wykazano, że cyjanidyna nie wpłynęła znacząco na migrację tych komórek. Zmiany szerokości rysy dla stężeń cyjanidyny równych 10  $\mu$ M i 30  $\mu$ M, zbiegały się z tą dla próby kontrolnej. Jedynie w przypadku 3  $\mu$ M stężenia tego antocyjanu, zaobserwowano przyspieszenie migracji od ok. 18 godziny prowadzenia eksperymentu. Jednakże dla żadnej z prób, wyniki nie były istotne statystycznie w odniesieniu do próby kontrolnej. Analizę danych przedstawiono na Rycinie 48.



**Rycina 48** Wpływ cyjanidyny na migrację komórek śródbłonka naczyniowego w teście zarastania rysy. Zmiana % szerokości rysy w czasie 48 godzin dla komórek kontrolnych oraz pod wpływem 3, 10 i 30  $\mu$ M cyjanidyny. Analiza dwuczynnikowa wariancji ANOVA z testem Tukey'a, dla każdego ze stężeń cyjanidyny, względem kontroli, nie wykazała różnic istotnych statystycznie, n = 3 (p > 0.05 (ns)).

#### 4.2.5 Kwercetyna

Innym flawonoidem o właściwościach kardioprotekcyjnych, wyselekcjonowanym do badań w niniejszej rozprawie była kwercetyna. Po przeanalizowaniu dostępnej literatury dotyczącej jej korzystnych właściwości w odniesieniu do układu sercowo-naczyniowego, dokonano oceny wpływu kwercetyny na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> obecnego w komórkach śródbłonka naczyniowego. Dodatkowo wykonano szereg doświadczeń pozwalających ocenić funkcjonalne konsekwencje regulacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez kwercetynę.

#### 4.2.5.1 Efekt kwercetyny na aktywność kanału mitoBKca

Podobnie jak wcześniej, technikę patch-clamp wykorzystano do analizy zmian aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> pod wpływem kwercetyny. Technika ta umożliwia badanie bezpośredniego wpływu substancji na zmiany aktywności pojedynczego białka kanałowego.

W pierwszej kolejności wykonano pomiary zmian aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w obecności różnych stężeń kwercetyny. W próbie kontrolnej, oszacowane prawdopodobieństwo otwarć kanału wynosiło 9,0 % ± 1,4 % przy napięciu -40 mV i 36,5 % ± 2,9 % przy +40 mV. Podanie 1  $\mu$ M kwercetyny spowodowało wzrost P<sub>o</sub> kanału odpowiednio do 22,6 % ± 1,5 % i 47,5 % ± 12,5 %. Następnie obecność 3 i 10  $\mu$ M kwercetyny spowodowało wzrost prawdopodobieństwa otwarć do 56,6 % ± 17,3 % i 71,8 % ± 5,3 %, oraz do 84,0 % ± 3,2 % i 89,3 % ± 2,0 % przy napięciu -40 mV i +40 mV odpowiednio. W przypadku dodania 30  $\mu$ M kwercetyny obserwowano wzrost prawdopodobieństwa otwarć przy napięciu ujemnym do 83,8 % ± 7,6 %, zaś przy +40 mV odnotowano minimalny spadek wartości P<sub>o</sub> do 83,5 % ± 5,4 %. Przykładowe rejestracje aktywności kanału pod wpływem kwercetyny wraz z analizą prawdopodobieństwa otwarć przedstawiono na Rycinie 49.



**Rycina** 49 Regulacja aktywności kanału mito $BK_{Ca}$  przez kwercetynę. (a) Przedstawiono zapisy aktywności kanału w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1, 3, 10 i 30 µM kwercetyny. Dane uzyskano przy napięciu -40 mV w symetrycznym układzie roztworu 150/150 mM KCl, 100 µM Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mito $BK_{Ca}$  ( $P_o$ ) dla kolejnych etapów doświadczeń przedstawionych w panelu (a) przy napięciach -40 mV i +40 mV. Poziomy istotności statystycznej względem kontroli ustalono analizą jednoczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,05 (\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Dodatkowo, wykonano doświadczenie, na podstawie którego można ocenić sposób wiązania substancji do białka kanałowego. Wykazano, że odpłukanie kwercetyny, nie przywraca aktywności kanału mito $BK_{Ca}$  do wartości  $P_0$  obserwowanej w warunkach kontrolnych. Taka obserwacja może świadczyć o tym, że kwercetyna wiąże się z białkiem kanału trwale (Rycina 50).



**Rycina** 50 Badanie odwracalności aktywacji kanału mito $BK_{Ca}$  po odpłukaniu 10 µM kwercetyny. Na rycinie przedstawiono zapisy aktywności kanału mito $BK_{Ca}$  w warunkach kontrolnych, po podaniu 10 µM kwercetyny oraz po jej odpłukaniu. Doświadczenie przeprowadzono w symetrycznym układzie roztworów 150/150 mM KCl, w obecności 100 µM Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału.

Podsumowując, kwercetyna w niskich stężeniach mikromolowych aktywuje kanał mito $BK_{Ca}$ . Najwyższą aktywację zaobserwowano przy 10  $\mu$ M stężeniu kwercetyny. Zaktywowany kanał mito $BK_{Ca}$  po odpłukaniu nie powrócił do aktywności kontrolnej.

## 4.2.5.2 Analiza aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w obecności kwercetyny, paksyliny i izoramnetyny

Obserwując znaczną aktywację kanału po traktowaniu kwercetyną, postanowiono przeprowadzić serię doświadczeń z wykorzystaniem paksyliny, bloker kanału typu BK<sub>Ca</sub>. Dotychczas nie dowiedziono, że aktywator, szczególnie pochodzenia naturalnego może odwrócić blokowanie kanału przez paksylinę. We wstępnych doświadczeniach wykazano, że 1  $\mu$ M paksylina obniżyła prawdopodobieństwo otwarć mitoBK<sub>Ca</sub> z 12,9 % ± 1,2 % (-40 mV) do 0,3 % ± 0,1 % i z 53,5 % ± 7,2 % do 0,2 % ± 0,2 % (+40 mV) (Rycina 51). Takie dane świadczą o pełnym blokowaniu kanału. W obecności paksyliny nie przepływają jony przez por kanału zarówno przy napięciu dodatnim jak i ujemnym. Następnie po podaniu 10  $\mu$ M kwercetyny obserwowano aktywację kanału. Analiza danych wskazuje, że

prawdopodobieństwo otwarć kanału wzrosło z wartości ułamków procenta do 53,5 %  $\pm$  7,4 % przy napięciu ujemnym i do 89,2 %  $\pm$  0,9 % przy dodatnim. Kwercetyna przywróciła aktywność kanału, jednak wzrost prawdopodobieństw otwarć był większy w porównaniu z P<sub>0</sub> kanału w warunkach kontrolnych (Rycina 51).



**Rycina** 51 Odwracalność blokowania kanału mito $BK_{Ca}$  przez 10 µM kwercetynę. W górnej części ryciny zaprezentowano zapisy pomiarów elektrofizjologicznych dla kontroli, 1 µM paksyliny i 10 µM kwercetyny. Poniżej przedstawiono analizę prawdopodobieństwa otwarć mito $BK_{Ca}$  ( $P_o$ ). Poziomy istotności statystycznej określono testem t-Studenta dla n = 3 (p < 0,01 (\*\*); p < 0,001 (\*\*\*)). Doświadczenia przeprowadzono w symetrycznym układzie roztworu 150/150 mM KCl, 100 µM Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. (a) przy napięciu +40 mV. (b) przy napięciu -40 mV. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału.

Mając na uwadze powyższe dane, zaplanowano doświadczenia, w których w pierwszej kolejności podawano kwercetynę a następnie, w obecności flawonoidu podawano paksylinę. Zaplanowane kolejne kroki w doświadczeniach miały na celu uzyskanie warunków kiedy kwercetyna zostanie odpłukana, a aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> będzie blokowana przez paksylinę. Etapy takiego zaprezentowano na Rycinie 52.

#### Etapy doświadczenia



**Rycina** 52 Schemat przebiegu doświadczenia. Pomiary aktywności kanału wykonano w warunkach kontrolnych, po dodaniu 10  $\mu$ M kwercetyny, w obecności 10  $\mu$ M kwercetyny i 1  $\mu$ M paksyliny, następnie w obecności tylko 1  $\mu$ M paksyliny, po przejściu do niskiego stężenia jonów wapnia (1  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>) bez kwercetyny i paksyliny, po odpłukaniu do warunków z kontroli, a na zakończenie po dodaniu 1  $\mu$ M paksyliny. Koncepcja uwzględnia poszczególne etapy doświadczenia prowadzone w równych odstępach czasowych w symetrycznym układzie roztworu 150/150 mM KCl, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. Tylko w przypadku kroku 1  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> zmieniany był poziom wapnia.

Podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach, obecność 10 µM kwercetyny (KWE) spowodowała aktywację kanału mitoBK<sub>Ca</sub> z 10,9 %  $\pm$  1,9 % do 79,1 %  $\pm$  2,8 % (-40 mV) i z 54,2 %  $\pm$  4,5 % do 88,9 %  $\pm$  1,9 % (+40 mV). Kolejno podanie 10  $\mu$ M kwercetyny wraz z 1 µM paksyliną nie zmieniało poziomu aktywności kanału. Co ciekawe, podanie w kolejnym etapie samej 1 µM paksyliny nie doprowadziło do zablokowania aktywności kanału, zaobserwowano jedynie spadek  $P_o$  odpowiednio do 69,4 % ± 9,3 % (-40 mV) i do 86,1 %  $\pm$  4 % (+40 mV). W dotychczasowych doświadczeniach paksylina zawsze całkowicie hamowała aktywność kanału. Prawdopodobnie, wiązanie kwercetyny uniemożliwia zablokowanie kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez paksylinę. Poprzednie etapy doświadczenia wykonane zostały w obecności 100 µM Ca2+. Zaplanowano więc kolejny etap doświadczenia, który miał na celu obniżenie poziomu jonów wapnia do stężenia 1 µM. Badania aktywacji kanałów w odpowiedzi na różne stężenia jonów wapnia wskazują, że interakcje między domenami strukturalnymi kanału są kluczowe w pośredniczeniu stymulacji do otwarć kanału [153]. Te odkrycia dostarczają informacji, które mogą również wpływać na regulację kanałów w odpowiedzi na inne substancje. W warunkach obniżonego stężenia jonów wapnia obserwowano spadek  $P_0$  do poziomu 1 % ± 0,1 % przy -40 mV i 2,4  $\% \pm 2,4 \%$  przy +40 mV. Podobną zależność wykazano w części (b) Ryciny 12. Po odpłukaniu i powrocie do roztworu kontrolnego zawierającego 100 µM Ca<sup>2+</sup>, prawdopodobieństwo otwarć kanału wzrosło do 63,7 % ± 9,7 % (-40 mV) i 82,4 % ± 3,4 % (+40 mV). Z kolei ponowne podanie 1 µM paksyliny, spowodowało całkowite zablokowanie aktywności kanału. Zapisy zmian aktywności kanału oraz analizę P<sub>o</sub> w kolejnych etapach przedstawiono na Rycinie 53.



**Rycina** 53 Regulacja kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez kwercetynę oraz paksylinę. (a) Przedstawiono zapisy zmian aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych, po podaniu 10 µM kwercetyny, 10 µM kwercetyny wraz z 1 µM paksyliną, w obecności 1 µM paksyliny, w warunkach 1 µM Ca<sup>2+</sup>, po odpłukaniu do warunków kontrolnych oraz po podaniu 1 µM paksyliny. Zapisy pomiarów elektrofizjologicznych wykonano przy napięciu -40 mV w symetrycznym układzie roztworu 150/150 mM KCl, 100 µM Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału (P<sub>o</sub>) w powyższych etapach doświadczenia dla napięć -40 mV i +40 mV wraz z zaznaczonym poziomem istotności statystycznej względem kontroli (nad słupkami) oraz pomiędzy próbami - analiza jednoczynnikowa wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,05 (\*); p < 0,001 (\*\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Po raz pierwszy, wykazano, że blokowanie kanału przez paksylinę jest nie możliwe w obecności kwercetyny, co skłoniło do dodatkowych przemyśleń i zaprojektowania kolejnych doświadczeń. Postanowiono sprawdzić czy substancje o bardzo podobnej budowie strukturalnej, różniące się jednym podstawnikiem, będą również uniemożliwiały blokowanie kanału przez paksylinę. Jedną z pochodnych kwercetyny jest izoramnetyna, będącą metylowaną pochodną kwercetyny i równocześnie flawonoidem pochodzenia naturalnego. Porównanie struktur chemicznych kwercetyny i izoramnetyny przedstawiono na Rycinie 54c.

Wyniki doświadczeń patch-clamp wskazują, że izoramnetyna nie wpływa na aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Nie zaobserwowano zmian w prawdopodobieństwie otwarć kanału po podaniu 1, 3, 10 i 30  $\mu$ M izoramnetyny. Analiza danych wskazuje, że P<sub>o</sub> dla wszystkich prób włączając kontrolę wyniki około 15 %. Dodatkowo podanie 1  $\mu$ M paksyliny w obecności 30  $\mu$ M izoramnetyny całkowicie blokowało aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> (Rycina 54ab).



**Rycina** 54 Wpływ izoramnetyny na aktywność mito $BK_{Ca}$ . (a) Zapisy aktywności kanału w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 1, 3, 10 i 30  $\mu$ M izoramnetyny, a także 30  $\mu$ M izoramnetyny wraz z 1  $\mu$ M paksyliną przy napięciu -40 mV w symetrycznym układzie roztworu 150/150 mM KCl, 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,2. "-" oznacza stan zamknięty kanału; "o" oznacza stan otwarty kanału. (b) Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mito $BK_{Ca}$  (P<sub>o</sub>) dla poszczególnych etapów doświadczenia z części (a). Istotność statystyczną względem

kontroli określono analizą jednoczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a, n = 5 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns). (c) Porównanie wzorów strukturalnych kwercetyny i izoramnetyny. Zaznaczono podstawnik różniący oba flawonoidy.

# 4.2.5.3 Udział kwercetyny i izoramnetyny w depolaryzacji mitochondriów i oddychaniu komórkowym

Do oceny funkcjonalnych konsekwencji regulacji kanału mitoBK<sub>ca</sub> przez kwercetynę wykorzystano metodę cytometrii przepływowej z użyciem barwnika JC-10. Wykazano, że 10  $\mu$ M kwercetyna obniża potencjał mitochondriów o 10,4 % ± 2,5 %. Obserwowano depolaryzację względem kontroli. Depolaryzację tę porównano z obniżaniem potencjału błony przez klasyczny aktywator mitoBK<sub>Ca</sub> – NS11021. W tym przypadku 34,0 % ± 7,3 % komórek wykazało mitochondria z obniżonym potencjałem, zaś 1  $\mu$ M paksylina osłabiła depolaryzację o ok. 12,7 %. Całość porównano do FCCP – klasycznego rozprzęgacza mitochondriów, gdzie przy stężeniu 1,5  $\mu$ M obserwowano depolaryzację na poziomie 82,8 % ± 1,6 %, a przy 3  $\mu$ M – niemal 100 %. Rezultaty przedstawiono na Rycinie 55.



**Rycina** 55 Udział kwercetyny w depolaryzacji mitochondriów. (a) Procentowy udział komórek z mitochondriami o wysokim i o niskim potencjale w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu 10  $\mu$ M kwercetyną, 3  $\mu$ M NS11021, 3  $\mu$ M NS11021 z 1  $\mu$ M paksyliną oraz 1,5  $\mu$ M i 3  $\mu$ M FCCP. Poziomy istotności

statystycznej określono testem t-Studenta dla n = 3 (p < 0,01 (\*\*); p < 0,001 (\*\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)). Oznaczenia bezpośrednio nad słupkami są porównaniem do kontroli, zaś wyżej, pomiędzy sąsiednimi słupkami. (b) Przykładowe wykresy punktowe z cytometru przepływowego dla kontroli, 10  $\mu$ M kwercetyny i 3  $\mu$ M FCCP (różowe punkty oznaczają komórki zawierające mitochondria o wysokim potencjale błony wewnętrznej; fioletowe – o niskim).

W kolejnym etapie określono wpływ kwercetyny na oddychanie komórkowe. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono na Rycinie 56. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia, kwercetyna stopniowo przyspiesza oddychanie komórek EA.hy926. Dla 3  $\mu$ M zaobserwowano wzrost średnio o 3,5 %, dla 10  $\mu$ M o 9%, zaś 30  $\mu$ M kwercetyna przyspiesza oddychanie o 23 % względem kontroli. Ostatni wynik jest istotny statystycznie na poziomie p < 0,05. Dodatek 500 nM FCCP spowodował rozprzęgnięcie mitochondriów.



**Rycina** 56 Wpływ kwercetyny na oddychanie komórek EA.hy926. Wykres przedstawia % zużycia tlenu w warunkach kontrolnych, a także po dodaniu 3, 10 i 30  $\mu$ M kwercetyny oraz 500 nM FCCP. Istotność statystyczną względem kontroli określono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 4 (p < 0.05 (\*), p < 0.0001 (\*\*\*\*); p > 0.05 (ns)).

Określono ponadto wpływ izoramnetyny na powyższe procesy. Metodą cytometrii przepływowej z użyciem sondy fluorescencyjnej JC-10 wykazano, że 10 μM izoramnetyna nie wpływa na potencjał mitochondriów, porównując wynik z kontrolą (komórki nietraktowane), co zaprezentowano na Rycinie 57a. Zbadano również szybkość oddychania

komórkowego w obecności izoramnetyny. Otrzymane wyniki przedstawiono na Rycinie 57b. Dowiedziono, że izoramnetyna w stężeniach: 3, 10 i 30 μM nie wpływa na szybkość zużycia tlenu komórek śródbłonka naczyniowego. Nie zaobserwowano różnic względem kontroli. Po podaniu 500 nM FCCP, doszło do rozprzęgnięcia łańcucha oddechowego w mitochondriach, co potwierdziło poprawność wykonanych oznaczeń.



**Rycina** 57 Wpływ izoramnetyny na potencjał mitochondriów oraz oddychanie komórkowe. (a) Wykres przedstawia potencjał mitochondriów komórek EA.hy926 w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem 10  $\mu$ M izoramnetyny i 3  $\mu$ M FCCP (rozprzęgacza mitochondriów). Poziom istotności statystycznej wyznaczono analizą jednoczynnikową ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3, (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns). (b) Wpływ 3, 10 i 30  $\mu$ M izoramnetyny na oddychanie szybkość oddychania komórek śródbłonka względem nietraktowanej kontroli oraz 500 nM FCCP. Istotność statystyczną określono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

#### 4.2.5.4 Ocena cytotoksyczności kwercetyny

Kwercetyna, jako substancja pochodzenia naturalnego, nie powinna negatywnie wpływać na przeżywalność komórek. Jednakże, zastosowane w doświadczeniach typu patch-clamp stężenia przetestowano w kontekście indukcji apoptozy i nekrozy.

Uzyskane wyniki oceny apoptozy w obecności kwercetyny zaprezentowano na Rycinie 58. W przypadku 1, 3, 10, i 30 μM kwercetyny nie obserwowano indukcji apoptozy w porównaniu do kontroli i 1 ng/ml/ 0,05 μg/ml TNF/CHX – czynnika uszkadzającego.


**Rycina** 58 Ocena apoptotycznej śmierci komórek pod wpływem różnych stężeń kwercetyny. Na wykresie przedstawiono brak indukcji apoptozy przez 1, 3, 10 i 30  $\mu$ M kwercetynę w odniesieniu do kontroli i czynnika uszkadzającego (TNF/CHX). Poziomy istotności statystycznej względem kontroli określono analizą dwuczynnikową wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,0001 (\*\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Jednocześnie, dokonując pomiarów fluorescencji, możliwe było określenie wpływu kwercetyny na proces nekrozy komórek śródbłonka naczyniowego. Zaprezentowane na Rycinie 59 wyniki świadczą o tym, że kwercetyna w stężeniach 1, 3 i 10 µM nie indukuje tego rodzaju śmierci komórkowej. Natomiast w przypadku 30 µM kwercetyny zauważalny jest wzrost nekrozy (średnio o ok. 9 %), co może oznaczać zbyt wysokie jej stężenie dla komórek EA.hy926.



**Rycina** 59 Kwercetyna a nekroza. Ocena 1, 3, 10 i 30  $\mu$ M kwercetyny w kontekście indukcji nekrotycznej śmierci komórek śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926 (pomiar fluorescencji w czasie 13 godzin), w odniesieniu do kontroli negatywnej (komórki nietraktowane i z TNF/CHX). Poziom istotności statystycznej względem kontroli, określono z użyciem analizy dwuczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a; n = 3 (p < 0,05 (\*); p > 0,05 (ns)).

### 4.2.5.5 Cytoprotekcyjne działanie kwercetyny

Aby potwierdzić ochronne względem komórek, działanie kwercetyny, aktywatora mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub> wykonano doświadczenia polegające na ocenie apoptozy i nekrozy pod wpływem 1 ng/ml/ 0,05  $\mu$ g/ml TNF/CHX – czynnika uszkadzającego, w obecności flawonoidu. Kwercetynę w odpowiednich stężeniach, dodawano do komórek na godzinę przed czynnikiem uszkadzającym.

Na Rycinie 60 przedstawiono wyniki potwierdzające właściwości ochronne kwercetyny przed apoptozą indukowaną przez TNF/CHX. Wraz ze wzrostem stężenia tego flawonoidu (1, 3, 10 i 30  $\mu$ M), linia świadcząca o zmianie sygnału apoptozy w czasie, była bliższa linii kontrolnej. Zatem im wyższe stężenie kwercetyny, tym silniejsza ochrona. Rezultaty odniesiono do komórek uszkadzanych.



**Rycina 60** Właściwości ochronne kwercetyny przed indukcją apoptozy. Przedstawiono zmianę luminescencji w czasie w warunkach kontrolnych oraz w próbach uszkadzanych TNF/CHX w obecności 1, 3, 10 i 30  $\mu$ M kwercetyny. Poziom istotności statystycznej względem uszkodzenia, w prezentowanym zakresie czasu, wyznaczono dzięki analizie dwuczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,05 (\*); p < 0,001 (\*\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*\*)).

W kontekście ochrony przed śmiercią nekrotyczną komórek EA.hy926, dokonano pomiaru fluorescencji po 24 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu. Dowiedziono, że 10  $\mu$ M kwercetyna nie indukuje po tym czasie nekrozy (wynik zbliżony do nietraktowanej kontroli), a inkubowana z komórkami przed dodaniem czynnika uszkadzającego, obniża sygnał dla nekrozy o 10 %. W przypadku 30  $\mu$ M kwercetyny zauważono, że obniża nekrozę wywołaną uszkodzeniem o kilka procent, jednakże sama delikatnie ją indukuje (20 %) w porównaniu do kontroli (14 %). Potwierdzono zatem protekcyjne właściwości 10  $\mu$ M kwercetyny. Opisane rezultaty zaprezentowano na Rycinie 61.



Rycina 61 Właściwości ochronne kwercetyny przed nekrotycznym uszkodzeniem śródbłonka. Zaprezentowano zmianę fluorescencji po 24 h od rozpoczęcia doświadczeń. Oznaczono warunki kontrolne, próby traktowane 10 μM i 30 μM kwercetyng oraz czynnikiem uszkadzającym – TNF/CHX, a także uszkadzane TNF/CHX w obecności 10 i 30 µM kwercetyny. Poziomy istotności statystycznej względem kontroli wyznaczono jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0.05 (\*); p < 0.01 (\*\*); p > 0.05(ns)).

Ponadto, z wykorzystaniem mikroskopu i specjalistycznej kamery, po upływie 24 godzin od przeprowadzenia eksperymentów wykonano zdjęcia komórek EA.hy926 przedstawiające efekt ochronny 10 µM kwercetyny przed uszkodzeniem TNF/CHX, w odniesieniu do kontroli, czynnika uszkadzającego i próby traktowanej wyłącznie kwercetyną. Efekt przedstawiono na Rycinie 62.



kontrola

10 µM Kwercetyna

TNF/CHX

TNF/CHX + 10 µM KWE

Rycina 62 Fotografie mikroskopowe obrazujące obserwowany efekt ochronny 10 µM kwercetyny przed uszkodzeniem TNF/CHX w komórkach śródbłonka naczyniowego, wykonane po 24 h. Od lewej komórki kontrolne, traktowane 10  $\mu$ M kwercetyną,, uszkodzone TNF/CHX oraz preinkubowane z 10  $\mu$ M kwercetyną przed podaniem czynnika uszkadzającego (TNF/CHX). Biała pozioma linia w prawym dolnym rogu ma długość 200 µт.

### 4.2.5.6 Analiza migracji komórek w obecności kwercetyny

Dodatkowym eksperymentem określającym rolę fizjologiczną kwercetyny i jej wpływ na procesy życiowe komórek śródbłonka był test migracji komórkowej (zarastania rysy).

Po wykonaniu rysy, przez 48 godzin obserwowano migrację komórek śródbłonka naczyniowego pod wpływem 3, 10 i 30  $\mu$ M kwercetyny, porównując szybkość zarastania rysy z próbą kontrolną. Z wyników zebranych na Rycinie 63 wynika, że 3  $\mu$ M i 10  $\mu$ M kwercetyna przyspiesza migrację komórek EA.hy926, jednakże w niższym stężeniu (3  $\mu$ M) nieco bardziej (różnica kilku procent). Flawonoid ten w najwyższym z badanych stężeń (30  $\mu$ M) wykazał natomiast spowolnienie zdolności komórek do migracji, co może oznaczać, że jak w przypadku badania toksyczności czy protekcji – jest to zbyt duża dawka. Może być to powiązane z początkiem indukcji nekrozy.

Właściwości 10 µM kwercetyny w kontekście przyspieszania migracji komórek śródbłonka naczyniowego potwierdzają dodatkowo, przedstawione na Rycinie 64, fotografie.



**Rycina 63** Kwercetyna a tempo zarastania rysy w teście migracji komórkowej. Przedstawiono wyniki dla kontroli oraz kwercetyny w stężeniach 3, 10 i 30  $\mu$ M, Poziomy istotności statystycznej względem kontroli, w prezentowanej skali czasu, ustalono za pomocą analizy dwuczynnikowej wariancji ANOVA z testem Tukey'a dla n = 3 (p < 0,05 (\*); p > 0,05 (ns)).



10 µM Kwercetyna

**Rycina** 64 Panel zdjęć mikroskopowych potwierdzających przyspieszenie migracji komórek linii EA.hy926 pod wpływem 10  $\mu$ M kwercetyny w odniesieniu do nietraktowanej kontroli. Biała linia w prawym dolnym rogu odpowiada długości 500  $\mu$ m. Wszystkie zdjęcia wykonano w jednakowej skali.

## 4.2.5.7 Wpływ kwercetyny na ekspresję genów i poziom białek kanału mitoBKca

Z uwagi na duży wzrost prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> obserwowany w doświadczeniach typu patch-clamp, pod wpływem kwercetyny, w porównaniu do innych aktywatorów, w szczególności tych pochodzenia naturalnego, postanowiono zbadać jej wpływ na ekspresję genów podjednostek kanału.

W tym celu zaplanowano doświadczenia z wykorzystaniem technik biologii molekularnej. Komórki EA.hy926 hodowano przez 12 godzin w obecności 10 µM kwercetyny i bez niej (kontrola). Następnie wyizolowano z nich RNA i po ustaleniu stężenia, w reakcji odwrotnej transkrypcji przepisano informację genetyczną na cDNA. Kolejno przystąpiono do przeprowadzenia reakcji RT-qPCR umożliwiającej porównanie ekspresji genów w obu próbach, a wyniki poddano analizie. Wszystkie kroki opisano w rozdziale *3.9 Ocena poziomu ekspresji genów*.

Otrzymane rezultaty przedstawiono na Rycinie 65. Wynika z nich, że traktowanie komórek 10  $\mu$ M kwercetyną powoduje obniżenie w tej próbie ekspresji genów podjednostek:  $\alpha$  (o 40 %),  $\beta$ 1 (o 55 %),  $\beta$ 2 (o 15 %) i  $\beta$ 4 (o 50 %), w odniesieniu do kontroli. W przypadku podjednostki regulatorowej  $\beta$ 3 zaobserwowano jej wzrost o 65 %. Zatem kwercetyna wpływa na poziom ekspresji genów kanału BK<sub>Ca</sub> w mitochondriach śródbłonka.



**Rycina** 65 Analiza ekspresji genów. Na wykresie przedstawiono poziom ekspresji genów podjednostki tworzącej por kanalu (BK  $\alpha$ ) i podjednostek regulatorowych  $\beta$ 1-4 mierzony metodą RT-qPCR w obecności 10  $\mu$ M kwercetyny w stosunku do nietraktowanej kontroli. Istotność statystyczną określono za pomocą testu t-Studenta dla n = 4 (p < 0,001 (\*\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*); p > 0,05 (ns)).

Dla potwierdzenia wyników otrzymanych techniką RT-qPCR, przeprowadzono eksperymenty Western blot, podczas których określono zmiany w poziomie białka określonych podjednostek kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Jak uprzednio, komórki hodowano przez 12 godzin z 10 µM kwercetyną oraz bez dodatku żadnych dodatkowych substancji. Z komórek traktowanych kwercetyną i części komórek kontrolnych wyizolowano mitochondria, pozostałe komórki nietraktowane zhomogenizowano. Kolejno z wszystkich prób przygotowano lizaty białkowe, zmierzono ich stężenie i dodano do nich bufor obciążający. Następnie nałożono je w równych ilościach na żel poliakrylamidowy i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny. Rozdzielone białka przeniesiono (transfer półsuchy) na membranę i znakowano wybrane odpowiednimi przeciwciałami. Finalnie dokonano detekcji białek na kliszach fotograficznych. Całą procedurę, krok po kroku, opisano w rozdziale *3.8 Analiza poziomu białek metodą Western blot*. Wyniki przedstawiono na Rycinie 66.



**Rycina 66** Analiza Western blot wpływu kwercetyny na białka podjednostki tworzącej por kanału mito $BK_{Ca}$ i podjednostek regulatorowych  $\beta$ . (a) Poziom białka podjednostek kanału mito $BK_{Ca}$ :  $BK \alpha$  i  $\beta$ 1-4 oraz COXIV (kontrola mitochondrialna) metodą Western blot. Wyniki uzyskane dla frakcji homogenatu komórkowego (H: 30 µg, 60 µg), kontrolnych mitochondriów (Mi<sub>K</sub>: 30 µg, 60 µg) i izolowanych mitochondriów z komórek wstępnie inkubowanych przez 12 godzin z 10 µM kwercetyną (Mi<sub>Q</sub>: 30 µg, 60 µg). (b) Pomiary densytometryczne poziomów białek BK $\alpha$ ,  $\beta$ 3 i COXIV w celu ilościowego określenia obserwowanych różnic. Istotność statystyczną wykazano dla testem t-Studenta dla n = 3 (p < 0,01 (\*\*); p > 0,05 (ns)).

Zaobserwowano analogiczne zmiany, jak w przypadku ekspresji genów. Mianowicie, spadek poziomu białka podjednostek kanału BK<sub>Ca</sub>:  $\alpha$ ,  $\beta$ 1 i  $\beta$ 2 we frakcjach mitochondrialnych. Wzrost poziomu odnotowano dla  $\beta$ 3, zaś różnic nie zauważono dla podjednostki  $\beta$ 4. Ponadto, w pomiarach densytometrycznych uzyskanych prążków, ilościowo określono obserwowane różnice dla podjednostki  $\alpha$  (niewielki spadek poziomu białka, nieistotny statystycznie) i  $\beta$ 3 (niemal 50 % wzrost poziomu białka w próbie traktowanej kwercetyną). Przedstawione oznaczenie ilościowe dla COIV (kontroli mitochondrialnej) wskazało równą ilość białka w danych próbach.

#### 5. Dyskusja

W ostatnich latach opublikowano szereg prac świadczących o udziale mitochondrialnych kanałów potasowych w procesach życiowych komórek [154]. Jednym z takich przykładów jest ich udział w ochronie komórek przed skutkami niedokrwienia/reperfuzji występującego w mięśniu sercowym [155] i w mózgu [156,157]. Wykazano, że aktywacja mitochondrialnych kanałów K<sup>+</sup> wiaże się z indukcją cytoprotekcji [54,55,158]. Badania mechanizmów ochrony wynikających z aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych nie są jeszcze dokładnie poznane, jednakże postawiono kilka hipotez próbujących wyjaśnić to zjawisko [56,159]. Jedną z nich może być kluczowy udział kanałów w tzw. mitochondrialnym cyklu potasowym [83] oraz regulacja syntezy reaktywnych form tlenu [160]. Bliższe poznanie tych mechanizmów stwarza szansę na opracowanie nowych strategii cytoprotekcji, której celem będą mitochondrialne kanały potasowe. Jednak właściwości biofizyczne i farmakologiczne kanałów potasowych obecnych w mitochondriach są nadal opisane jedynie częściowo [65]. Poza tym, dotychczas używane, syntetyczne substancje farmakologiczne, uważane za modulatory aktywności kanałów potasowych, mogą wpływać na inne białka mitochondrialne, a ich zastosowanie w terapii wymaga kosztownych i czasochłonnych badań klinicznych [161,162]. Zatem wydaje się, że istotne są poszukiwania nowych, specyficznych aktywatorów kanałów potasowych, szczególnie naturalnych związków roślinnych np. z grupy flawonoidów. Tym bardziej, że wiele danych wskazuje na to, że jednym z miejsc oddziaływania flawonoidów w komórce są mitochondria [97,163,164]. Dodatkowo, niektóre flawonoidy wykazują właściwości kardioprotekcyjne [165,166] i podejrzewa się, że działanie to może mieć związek z mitochondrialnym transportem jonów potasu.

### 5.1 Udział kanału mitoBKca w cytoprotekcji

Wykazano, że aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami wapnia (mitoBK<sub>Ca</sub>) związana jest np. z ochroną komórek mózgu przed uszkodzeniem w czasie udaru [156,157] czy komórek mięśni poprzecznie prążkowanych serca, gdzie łagodzi skutki zawału mięśnia sercowego [155]. Zarówno mitochondrialny, jak i plazmatyczny kanał BK<sub>Ca</sub> postrzegane się jako białka o ważnym udziale w protekcji komórkowej, co zostało potwierdzone licznymi badaniami [158,167-170].

Po raz pierwszy, mitoBK<sub>Ca</sub> został zidentyfikowany w wewnętrznej błonie mitochondriów nowotworu komórek glejowych mózgu – glejaka linii LN229 [67]. Później zidentyfikowano go również w mitochondriach kardiomiocytów, fibroblastów skórnych, mięśni szkieletowych [72,171,172], a także w komórkach śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926 [71]. Przyjmuje się, że funkcja kanału, jego lokalizacja i regulacja, wynikają z alternatywnych wariantów składania genów, specyficznych dla danej komórki. Dodatkowo, właściwości biofizyczne czy farmakologiczne poszczególnych wariantów mogą być zmieniane przez obecność różnych podjednostek regulatorowych  $\beta$ 1-4 [173].

Dowiedziono, że mitochondrialny kanał BK<sub>Ca</sub>, podobnie jak BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej, jest wrażliwy na NS1619 oraz NS11021 – znane aktywatory kanałów potasowych. Dodatkowo wykazano, że paksylina całkowicie hamuje aktywność tego kanału [174]. Jednakże większość modulatorów kanału mitoBK<sub>Ca</sub> wykazuje szerokie spektrum działań ubocznych [161]. Można tu wymienić właściwości rozprzęgające mitochondria, hamowanie łańcucha oddechowego, a także wpływ na homeostazę jonów wapnia w komórce [49]. Istnieje zatem uzasadniona potrzeba poszukiwania nowych, specyficznych związków, modulujących aktywność mitoBK<sub>Ca</sub>, zwłaszcza pochodzenia naturalnego, ze względu na ich niską toksyczność i relatywnie wysoką biodostępność [97,175]. Znany jest udział kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w procesach cytoprotekcyjnych, jak również szereg dobroczynnych właściwości flawonoidów. Dlatego podjęto próbę określenia nowych dróg cytoprotekcji wybranych flawonoidów kardioprotekcyjnych z udziałem aktywacji mitochondrialnych kanałów potasowych.

#### 5.2 Regulacja aktywności kanału mitoBKca przez flawonoidy kardioprotekcyjne

Zbadanie regulacji aktywności mitochondrialnego kanału o dużym przewodnictwie regulowanego wapniem (mitoBK<sub>Ca</sub>) było głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej. W badaniach zastosowano komórki śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926. Ponadto podjęto próby przeprowadzenia doświadczeń również na ludzkich fibroblastach mięśnia sercowego (HCF, *ang. human cardiac fibroblasts*). W toku prowadzonych badań nie udało się zidentyfikować aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach HCF. Zatem doświadczenia związane z badaniem wpływu flawonoidów na aktywność mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub> oparto na modelu komórek śródbłonka. Na podstawie wcześniej uzyskanych danych

i przeglądu literatury, do badań wyselekcjonowano naringeninę i jej pochodne (naringeninę-TPP<sup>+</sup>, 6-C-glukozyd naringeniny i chalkon naringeniny) oraz flawonoidy kardioprotekcyjne (kwercetynę, luteolinę i cyjanidynę). Podjęto również próbę oceny funkcjonalnych konsekwencji regulacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez flawonoidy w modelu śródbłonka naczyniowego. W tym celu zbadano wpływ flawonoidów na polaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej, oddychanie i migrację komórek, a także ich właściwości ochronne w uszkodzeniach wywoływanych przez TNF- $\alpha$ /cykloheksymid.

### 5.2.1 Naringenina i jej pochodne

Flawonoidy są powszechnie obecne w roślinach, gdzie pełnią ważne funkcje. Ostatnio przyciągają uwagę naukowców ze względu na ich korzystne oddziaływanie na organizm ludzki, również jako substancje regulujące aktywność kanałów potasowych [176]. Jednym ze związków biologicznie czynnych występujących w owocach cytrusowych, np. w grejpfrucie (*Citrus paradisi*), jest naringenina, która obniża poziom reaktywnych formy tlenu i azotu, a także może zwiększać poziom glutationu, będącego fizjologicznym antyoksydantem [177].

Otrzymane dane wskazują na bezpośredni wpływ naringeniny na mitochondrialne kanały potasowe. Wykorzystując technikę patch-clamp potwierdzono, że już w niskich stężeniach mikromolowych, naringenina aktywuje kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w komórkach śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926. Podobne efekty aktywacji kanału były obserwowane w przypadku wyższych stężeń naringeniny tzn. powyżej 10  $\mu$ M. Dodatkowo zmiany regulacji mitoBK<sub>Ca</sub> były obserwowane na tle różnych stężeń jonów wapnia. Najwyższą aktywację kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez 10  $\mu$ M naringeninę zaobserwowano w warunkach niskiego stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> [170]. Wykazano zależną od poziomu jonów wapnia aktywację kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez naringeninę obserwowaną nie tylko w przypadku kanałów typu BK<sub>Ca</sub> [88].

Yang i współpracownicy udowodnili, że naringenina, jako flawonoid wchodzący w skład leków ziołowych tradycyjnej medycyny chińskiej, wykazuje działanie rozkurczające względem mięśni gładkich [98], w tym mięśni tchawicy szczura poprzez aktywację plazmatycznego kanału BK<sub>Ca</sub> [178]. Podobne efekty obserwowano w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych [179], w tym również w komórkach ludzkiej żyły pępowinowej [180]. Ponadto, w przypadku bólu związanego ze stanem zapalnym,

wywołanym przez aniony ponadtlenkowe, u myszy, opisano udział tego flawonoidu jako środka łagodzącego te dolegliwości poprzez aktywację kanału K<sub>ATP</sub> błony komórkowej [99,181]. Aktywacja kanałów potasowych przez naringeninę jest również istotna dla zachowania prawidłowych funkcji neuronów [182]. Oprócz tego, we wcześniejszych badaniach potwierdzono, że naringenina aktywuje mitochondrialny kanał BK<sub>Ca</sub> w ludzkich fibroblastach skórnych, co pozytywnie wpływa na kondycję skóry, między innymi w kontekście jej starzenia [77]. Udowodniono także, że naringenina nie aktywuje kanałów potasowych bramkowanych napięciem w komórkach raka prostaty, co wyklucza rozwój komórek tego nowotworu u chorych suplementujących ten flawonoid lub spożywających duże ilości owoców zawierających naringeninę [183]. Co więcej, stwierdzono również, że naringenina hamuje kanały hERG (*ang. the human Ether-à-go-go-Related Gene*, ludzkie kanały potasowe genu Ether-à-go-go) [184]. Ponadto badano skojarzone działanie hamujące naringeniny z lekami przeciwarytmicznymi na te kanały i stwierdzono, że może to zwiększać ryzyko arytmii poprzez zwiększenie opóźnienia repolaryzacji [185].

W niniejszej rozprawie zbadano ponadto wpływ trzech pochodnych naringeniny na aktywność mitoBK<sub>Ca</sub>: naringeniny-TPP<sup>+</sup>, chalkonu naringeniny i 6-C-glukozydu naringeniny. Żadna z tych substancji nie wykazała właściwości aktywujących mitochondrialny kanał BK<sub>Ca</sub>. Obserwowano hamowanie aktywności mitoBK<sub>Ca</sub> przez każdą z badanych pochodnych. Jedynie obecność 30  $\mu$ M chalkonu naringeniny była neutralna względem kanału. Naringenina-TPP<sup>+</sup> została zaprojektowana tak, by z uwagi na obecność jonu TPP<sup>+</sup> akumulowała się w mitochondriach, co mogłoby wzmocnić dobroczynne skutki działania naringeniny. Badania nad substancjami zmodyfikowanymi przez dodanie tego jonu potwierdziły, że strategia wykorzystania grupy TPP<sup>+</sup> zastosowana dla aktywatorów mitoK<sub>ATP</sub> może sprzyjać ich gromadzeniu się w mitochondriach i wzmacniać kardioprotekcyjne działanie mitochondrialnych aktywatorów kanałów potasowych [186]. Jednak w przypadku naringeniny-TPP<sup>+</sup> i jej właściwości blokujących kanał mitoBK<sub>Ca</sub>, takich konkluzji nie można przedstawić. Prawdopodobnie taka modyfikacja naringeniny zmienia charakter wiązania tego flawonoidu do białka kanałowego.

# 5.2.2 Luteolina i cyjanidyna jako aktywatory mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach zredukowanych

Występująca w wielu owocach, warzywach czy ziołach leczniczych, luteolina, posiada właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i neuroprotekcyjne [187]. Luteolina wykazuje również wysoką biodostępność po podaniu doustnym, jest wchłaniana w dwunastnicy, jelicie czczym, a w większym stopniu w okrężnicy i jelicie krętym [188].

Udział luteoliny w regulacji aktywności kanałów potasowych jest opisany w wielu badaniach, jednakże nie ma dotychczas doniesień wskazujących jej wpływ na mitochondrialne kanały potasowe. Zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki, dotyczące śródbłonka naczyniowego, są zatem pierwszymi. W toku przeprowadzonych badań, nie dowiedziono jednoznacznego wpływu luteoliny na kanał mitoBK<sub>ca</sub> w warunkach kontrolnych tzn. w obecności 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. W tym przypadku wpływ luteoliny określono jako neutralny.

W literaturze opisano, że luteolina ma zdolność do rozluźniania naczyń krwionośnych, co udowodniono w modelu szczurzych pierścieni aortalnych pozbawionych warstwy komórek śródbłonka. Efekt ten przypisano aktywacji plazmatycznych kanałów BK<sub>Ca</sub>, jak również kanałów potasowych zależnych od ATP [189]. W innych pracach wykazano, że luteolina działając na kanały potasowe bramkowane napięciem rozluźnia szczurze tętnice wieńcowe i dzięki temu jako suplement diety może zapobiegać skurczowi tych naczyń [190]. Luteolina ponadto hamuje ruchliwość mięśni gładkich okrężnicy (ruchy perystaltyczne) co wiąże się z kolei z kanałami wapniowymi. Zaobserwowano, że w wyniku działania luteoliny, znacznie zmniejszył się przepływ prądów wapniowych, co udowodniono techniką patch-clamp na całych komórkach pochodzących od myszy. Co więcej, uznano, że flawonoid ten nie wpływa na przepływ jonów potasowych przez kanały zależne od ATP [191]. Udowodniono także, że luteolina wykazuje silne właściwości hamujące kanał potasowy hERG w ludzkich komórkach embrionalnych nerki [192]. Ponadto z najnowszych doniesień wynika, że luteolina jako inhibitor kanału potasowego Kv1.3 komórek efektorowych pamięci immunologicznej, pośrednio wpływa na różnicowanie centralnych komórek tejże pamięci, przez co w trwały sposób poprawia skuteczność szczepionki przeciw gruźlicy [193].

Z uwagi na brak regulacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez luteolinę, zaplanowano doświadczenia w warunkach zredukowanego środowiska. W tym celu zastosowano ditiotreitol (DTT). DTT jest wykorzystywany jako związek redukujący białka, w tym białka kanałowe [194-196]. Dowiedziono, że DTT hamuje aktywność plazmatycznego kanału BK<sub>Ca</sub>, co oznacza, że w warunkach zredukowanych prąd potasowy nie przepływa przez kanał [197]. Warto też wspomnieć, że efekt DTT zastosowanego na całych komórkach prowadzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej i zwiększenia syntezy RFT [198]. Wiadomo, że RFT to powstające głównie w mitochondriach: anionorodnik ponadtlenkowy (O2<sup>•-</sup>), rodnik nadtlenkowy (RO2<sup>•</sup>), rodnik hydroksylowy (HO<sup>•</sup>), rodnik alkoksylowy (RO<sup>•</sup>), tlen singletowy (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) oraz nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [199]. Zbyt wysoki poziom RFT może prowadzić do dysfunkcji mitochondriów [200,201]. Zważywszy na powyższe, uzyskane wyniki świadczące o aktywacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> pod wpływem luteoliny, w warunkach zredukowanych, mogą sugerować jej ochronny wpływ na mitochondria, przed ich dysfunkcją spowodowaną osiągnięciem zbyt wysokiego stężenia RFT.

Jedną z właściwości, obecnej powszechnie w owocach i warzywach, cyjanidyny jest działanie przeciwcukrzycowe, w tym również pobudzające wydzielanie insuliny. Wykryto jej obecność w przestrzeni wewnątrzkomórkowej komórek  $\beta$  trzustki. Badania sugerują, że cyjanidyna dyfunduje przez błonę plazmatyczną prowadząc do aktywacji kanałów wapniowych typu L, a co z kolei poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca<sup>2+</sup>, stymuluje wydzielanie insuliny [202]. Obecnie brakuje doniesień sugerujących udział cyjanidyny w modulacji aktywności kanałów potasowych z błony plazmatycznej czy tych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

W wyniku przeprowadzonych badań dowiedziono, że w warunkach kontrolnych cyjanidyna wykazuje właściwie działanie hamujące na kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w modelu komórek EA.hy926. Początkowo obserwowano nieznaczną aktywację, po chwili zaś hamowanie. Podobnie jak w przypadku luteoliny, wykorzystano w badaniach zredukowane środowisko reakcji tzn. w obecności DTT. Co ciekawe, w tych warunkach cyjanidyna spowodowała znaczący wzrost prawdopodobieństwa otwarć. Efekt ten obserwowano zarówno w próbie z DTT, jak również po jego odpłukaniu – w warunkach kontrolnych. Uzyskany efekt był odwracalny. Świadczyć to może o korzystnych właściwościach cyjanidyny na mitochondria w warunkach zredukowanych.

W kontekście powyższych wniosków, ciekawym wydaje się fakt, że metabolit cyjanidyny – cyjanidyno-3-glukozyd, hamuje syntezę RFT indukowaną przez ATP poprzez inhibicję depolaryzacji mitochondriów spowodowaną napływem jonów Ca<sup>2+</sup> [203]. W innej pracy dowiedziono także, że metabolity tego flawonoidu, występujące np. w ekstraktach i napojach ziołowych z hibiskusa (*Hibiscus sabdariffa L*.) posiadają działanie rozluźniające naczynia krwionośne związane z modulacją aktywności kanału wapniowego, co jest korzystne w przypadku nadciśnienia [204].

#### 5.2.3 Regulacja kanału mitoBKca przez kwercetynę, izoramnetynę i paksylinę

Kwercetyna posiada korzystne dla wielu organizmów właściwości. Należą do nich m.in. silne działanie przeciwutleniające, ochronne przed promieniowaniem, przeciwzapalne czy przeciwcukrzycowe [205-207]. Potwierdzono je wielokrotnie w badaniach na liniach komórkowych, a także w modelach zwierzęcych i w badaniach klinicznych, podczas których zweryfikowano bezpieczeństwo jej stosowania, gdyż nie zaobserwowano efektów toksycznych ani skutków ubocznych [128]. Stwierdzono, że może mieć korzystny wpływ na organizm poprzez działanie przeciwnowotworowe [208-211] oraz pozytywnie wpływa na układ krążenia poprzez obniżenie ciśnienia krwi [212,213].

Przedstawione w rozprawie wyniki po raz pierwszy wskazują, że jednym ze szlaków cytoprotekcji indukowanej kwercetyną jest szlak mitochondrialny związany z udziałem aktywacji mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego przez jony wapnia (kanał mito $BK_{Ca}$ ). Wzrost prawdopodobieństwa otwarć tego kanału w śródbłonku pod wpływem kwercetyny osiąga bardzo wysoki poziom (P<sub>o</sub> około 90 %) [214]. Do tej pory nie zaobserwowano tak wysokiej aktywacji przez dotąd poznane aktywatory (syntetyczne). Na przykład naringenina w komórkach śródbłonka, w tych samych warunkach, nie aktywowała go tak silnie jak kwercetyna. P<sub>o</sub> kanału było na poziomie około 55 % przy -40 mV [170]. Podobnie, w przypadku modelu ludzkich fibroblastów skórnych, prawdopodobieństwo otwarć kanału wynosiło około 65 % [77]. Wykazano również, że kwercetyna może aktywować plazmatyczny kanał BK<sub>Ca</sub> poprzez zwiększoną syntezę cytozolowego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w szczurzych tętnicach wieńcowych [215] oraz w ludzkich komórkach raka pęcherza moczowego, gdzie aktywacja ta osłabiała wzrost komórek nowotworowych [216]. Obie grupy wskazują na aktywację BK<sub>Ca</sub> przez kwercetynę

tylko na prądach potasu wypływających z komórki, co w rzeczywistości wiąże się ze spadkiem stężenia jonów potasu w cytozolu i np. wzrostem stężenia reaktywnych form tlenu [215]. Ponadto aktywacja plazmatycznego kanału BK<sub>Ca</sub> obserwowana była przy znacznie wyższych stężeniach kwercetyny niż miało to miejsce dla kanału mitoBK<sub>Ca</sub> obecnego w mitochondriach śródbłonka. Otrzymane w rozprawie wyniki wskazuja na kilkudziesięcioprocentowy wzrost aktywacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w obecności kwercetyny w stężeniu od 3 µM. Obserwowane natomiast efekty aktywacji plazmatycznego kanału BK<sub>Ca</sub> przez grupę Kim i wsp., które były statystycznie istotne, odpowiadają stężeniom kwercetyny powyżej 30 µM [216], zaś te według badań przedstawionych w rozprawie, mogą indukować nekroze. Może to oznaczać, że 3  $\mu$ M kwercetyna aktywuje mitochondrialny kanał BK<sub>Ca</sub>, podczas gdy ten z błony plazmatycznej pozostaje nieaktywny. Różnice te mogą wynikać np. z otoczenia lipidowego, obecności partnerów białkowych czy też podjednostek regulatorowych kanału BK<sub>Ca</sub>. Dodatkowo, zidentyfikowano miejsce wewnątrz poru plazmatycznego kanału BK<sub>Ca</sub> – Thr-353 (Treonina-353) jako kluczowe dla wiązania kilku flawonoidów, w tym kwercetyny. Oprócz niego wyznaczono jeszcze kilka innych miejsc wiązania w regionach 353-360 poru kanału [176]. Chociaż nie zidentyfikowano tych miejsc w strukturze kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, aktualny stan wiedzy wskazuje, że struktura kanału mitochondrialnego jest podobna do struktury kanału z błony plazmatycznej [73].

Powyższe informacje dotyczące wiązania kwercetyny do kanału BK<sub>Ca</sub> mogą częściowo wyjaśniać zjawisko braku blokowania mitoBK<sub>Ca</sub> przez paksylinę po jego aktywacji w wyniku zastosowania kwercetyny. Paksylina jest kanonicznym inhibitorem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> [55,143,217-219] i wykorzystywana jest również do charakterystyki farmakologicznej kanałów typu BK<sub>Ca</sub> w doświadczeniach, np. patch-clamp. Dotychczas w literaturze nie opisano danych, świadczących o braku blokowania kanału BK<sub>Ca</sub> przez paksylinę. Natomiast znanych jest kilka dodatkowych faktów, które wydają się istotne dla zrozumienia obserwowanych rezultatów. W 2014 roku w badaniach przedstawiono tezę, zgodnie z którą im większa aktywacja kanału, tym mniejsze prawdopodobieństwo blokowania aktywności kanału przez paksylinę. Zhou i współpracownicy wykazali wtedy, że hamowanie jest odwrotnie proporcjonalne do prawdopodobieństwa otwarć kanału BK<sub>Ca</sub> i jest całkowicie znoszone przez warunki, które zwiększają Po, nawet przy stałej obecności paksyliny [144]. Ponadto, ta sama grupa opublikowała dane określające miejsce Gly-311 wiązania paksyliny w porze kanału BK<sub>Ca</sub>. Udowodniono, że paksylina jest w stanie związać się z kanałem tylko wtedy, gdy ten znajduje się w stanie zamkniętym (należy pamiętać, że

aktywność mito $BK_{Ca}$  to ciągłe otwieranie się i zamykanie; im więcej otwarć jest rejestrowanych, tym kanał jest bardziej aktywny i tym wyższe jest prawdopodobieństwo jego otwarć) [145].

Biorac pod uwagę powyższe, czyli miejsce wiązania kwercetyny i paksyliny oraz informację, że w przypadku wysokiej aktywacji kanału jego hamowanie przez paksylinę może być nieskuteczne, pojawia się prawdopodobny mechanizm obserwowanego zjawiska. Otóż, przypuszczalnie, aby zablokować przepływ jonów potasu przez kanał, paksylina musi związać się w miejscu poru kanału, które jest bardzo blisko miejsca, w którym wiąże się kwercetyna. Tak więc, gdy kwercetyna jest obecna przed podaniem paksyliny, ta ostatnia nie jest w stanie dotrzeć do swojego miejsca wiązania, związać się i zahamować kanał. Wynika to prawdopodobnie ze stosunkowo bliskiej odległości między tymi dwoma miejscami wiążącymi. Jest to prawdopodobnie spowodowane tym, że kwercetyna jest na tyle dużą cząsteczką i stanowi zawadę przestrzenną w wiązaniu paksyliny. Tłumaczyłoby to również informacje z 2014 roku o braku hamowania kanału przez paksylinę, gdy jest on zaktywowany na wysokim poziomie. Proponowana hipoteza opiera się na zjawisku wiązania paksyliny z mitoBK<sub>Ca</sub> tylko w stanie zamkniętym. Aktywacja kanału na poziomie 90 % po podaniu kwercetyny drastycznie zmniejsza prawdopodobieństwo wiązania paksyliny z kanałem; wysoka aktywacja zapobiega zahamowaniu kanału; bliskość miejsc wiązania obu cząsteczek, a wreszcie rozmiar kwercetyny może stanowić zawadę przestrzenną dla wiązania paksyliny w pozycji Gly-311.

W celu potwierdzenia powyższych rozważań, wykonano doświadczenia z innym flawonoidem, bardzo podobnym strukturalnie do kwercetyny. Wybrano izoramnetynę, która różni się od kwercetyny jedną zastąpioną grupą hydroksylową na grupę metoksylową w pozycji 3' pierścienia B (Rycina 67).



**Rycina 67** Wzory strukturalne kwercetyny i izoramnetyny. Na czerwono zaznaczono różnice w budowie z uwagi na grupy chemiczne.

Izoramnetyna jest związkiem występującym w owocach rokitnika zwyczajnego (Hippophae rhamnoides L.) oraz w liściach miłorzębu dwuklapowego (Ginkgo biloba L.). Jego właściwości określane są jako przeciwutleniające, przeciwadipogenne, przeciwzapalne czy osłabiające proliferację komórek nowotworowych [220]. Wykazano, że w układzie sercowonaczyniowym pełni rolę w hamowaniu przerostu mięśnia sercowego i niewydolności serca jako efekt hamowania szlaku sygnałowego kinazy 3-fosfatydyloinozytolu-AKT [221]. Jak wykazano w niniejszej rozprawie, izoramnetyna, w przeciwieństwie do kwercetyny, nie aktywuje kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w mitochondriach komórek śródbłonka naczyniowego. Jej działanie określono więc jako neutralne względem aktywności kanału. Dodatkowo, obecność izoramnetyny nie wpływa na blokowanie kanału przez paksylinę. Obserwowano całkowite blokowanie aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez paksylinę w obecności izoramnetyny. Ponadto nie wpływa na potencjał błony mitochondrialnej. Zatem modyfikacja jednej grupy chemicznej w strukturze flawonoidu wpływa na właściwości farmakologiczne danego związku względem kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Wydaje się, że grupa –OH w pozycji 3' pierścienia B kwercetyny jest odpowiedzialna za aktywację kanału mitoBK<sub>Ca</sub> oraz braku blokowania kanału przez paksylinę.

Innym efektem, który zaobserwowano, jest możliwość zahamowania kanału przez paksylinę (po aktywacji kwercetyną), po obniżeniu stężenia wapnia z 100  $\mu$ M do 1  $\mu$ M. Kanał mitoBK<sub>Ca</sub> jest regulowany przez wapń - przy braku jonów Ca<sup>2+</sup> kanał zamyka się i nie obserwuje się jego aktywności [71,82]. Wtedy zmiana konformacji białka kanału może spowodować wypchnięcie cząsteczki kwercetyny. Po przywróceniu warunków kontrolnych (100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>, bez kwercetyny) zaobserwowano wzrost aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Obserwacja ta jest typowa w przypadku zmian stężenia Ca<sup>2+</sup>. Podana wówczas paksylina blokuje aktywność kanału, podobnie jak w przypadku kiedy kanał nie był aktywowany przez kwercetynę (Rycina 13). Właściwości aktywacyjne kwercetyny względem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> obserwowano również w innym doświadczeniu, gdzie po zahamowaniu kanału przez paksylinę, podanie 10 µM kwercetyny spowodowało aktywację kanału. Obecnie nie ma danych wskazujących by blokowanie kanału przez paksylinę znosił aktywator [71,72,222]. Mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze znany, natomiast być może cząsteczka kwercetyny jest w stanie wyprzeć cząsteczkę paksyliny z poru kanału lub dodatkowo związać się w innym miejscu (np. poza porem kanału) z uwagi na korzystne energetycznie wiązania cząsteczki do białka kanału. Może to prowadzić do zmian w konformacji kanału w celu jego otwarcia i odłączenia cząsteczki paksyliny. Dowiedziono, że np. bakteryjny kanał BK<sub>Ca</sub> może ulegać zmianom konformacyjnym pod wpływem jonów wapnia [223], więc być może również jest to możliwe w wyniku działania innych substancji, np. kwercetyny.

# 5.3 Wpływ flawonoidów na potencjał błony mitochondrialnej i oddychanie komórkowe

Aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych wpływa na zmiany potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Napływ jonów potasu do ujemnie naładowanej macierzy mitochondrialnej powoduje depolaryzację mitochondriów [224-226]. Subtelna regulacja aktywności mitochondrialnych kanałów potasowych jest konieczna aby uniknać gwałtownych zmian potencjału błonowego mitochondriów [227]. Samo zjawisko dużej depolaryzacji mitochondriów nie jest zjawiskiem korzystnym, jednakże napływ kationów jest "równoważony" np. przez wypływ protonów w łańcuchu oddechowym [226,228]. Utrzymanie prawidłowej homeostazy jonowej zapobiega osmotycznym zmianom objętości mitochondriów. Dodatkowo napływ jonów K<sup>+</sup> wpływa na syntezę ATP i zwiększa oddychanie mitochondrialne [229]. Z drugiej strony, hamowanie napływu potasu (np. przez inhibitory mitochondrialnych kanałów potasowych) sprzyja zwiększonej hiperpolaryzacji mitochondriów, a to z kolei wpływa na syntezę RFT [230]. Zatem zwiększenie prawdopodobieństwa otwarć mitochondrialnych kanałów potasowych przez aktywatory indukuje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz przyspieszenie oddychania, z kolei ich blokowanie powoduje hiperpolaryzacje [231]. Z drugiej strony, zmiana aktywności kanałów napięciowo-zależnych w przypadku depolaryzacji wiąże się również z zmianami konformacyjnymi prowadzącymi do otwarcia tych kanałów [226]. Być

może ta wielowymiarowa regulacja może być jednym z elementów złożonego zjawiska jakim jest cytoprotekcja.

Powyższe obserwacje potwierdzono między innymi dla NS11021, aktywatora kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Aktywacja tego kanału przez NS11021 w mitochondriach ameby *Dictyostelium discoideum* spowodowała zarówno depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej, jak również wzrost oddychania [232]. Podobne wyniki otrzymano pod wpływem NS11021 i NS1619, w modelu śródbłonka naczyniowego linii EA.hy926. Efekty te były znoszone przez paksylinę, inhibitor mitoBK<sub>Ca</sub> [233].

wyniku przeprowadzonych badań dowiedziono, że kwercetyna depolaryzuje W mitochondria, co koreluje z powyższymi rozważaniami. Również dla naringeniny zaobserwowano nieznaczną depolaryzację. Oba te flawonoidy ponadto przyspieszają oddychanie komórek śródbłonka naczyniowego. Dla kwercetyny potwierdzono to w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem komórek, gdzie w stężeniu 30 µM odnotowano istotny statystycznie wzrost oddychania mitochondrialnego. Naringenina natomiast zwiększa zużycie tlenu w doświadczeniach na izolowanych mitochondriach [170]. Warto zauważyć, że analog kwercetyny, izoramnetyna, nie spowodowała depolaryzacji ani hiperpolaryzacji wewnętrznej błony mitochondrialnej. Nie obserwowano również przyspieszenia czy spowolnienia oddychania komórek EA.hy926 w obecności tego związku. Izoramnetyna ponadto nie wpływała na zmiany aktywności kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Jako dodatkowy element odniesienia, wykonane eksperymenty dotyczące potencjału mitochondriów pod wpływem NS11021, są zbieżne z wynikami już opublikowanymi [233]. Kontrolą pozytywną w eksperymentach z JC-10 był rozprzęgacz mitochondriów - FCCP [234,235], który wraz ze wzrostem stężenia bardziej depolaryzował wewnętrzną błonę mitochondrialną. W przypadku cyjanidyny i luteoliny nie zaobserwowano depolaryzacji mitochondriów, zaś naringenina-TPP+ wykazała zdolność do zwiększania ujemnego potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej - hiperpolaryzacji.

Dla naringeniny już wcześniej zaobserwowano depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej i zwiększenie oddychania także w innej linii komórkowej – ludzkich fibroblastach skórnych [77]. Podobne zmiany w potencjale mitochondriów pod wpływem naringeniny potwierdzono też w organellach izolowanych z serc jednorocznych szczurów [81]. Naringenina ponadto może akumulować się w mitochondriach, co opisano w modelach komórek glejaka oraz fibroblastów [236]. Co ciekawe, kwercetyna również posiada takie

zdolności. Udokumentowano jej akumulację w mitochondriach ludzkich limfoblastów T czy jądrach komórkowych śródbłonka i nerwiaka niedojrzałego. Potwierdzono także bezpośrednie oddziaływanie kwercetyny z błonami mitochondrialnymi, wpływając tam np. na produkcję ATP [237].

### 5.4 Rola flawonoidów w procesach apoptozy, nekrozy i migracji komórek

Wykazano, że mitochondrialne kanały potasowe są zaangażowane w regulację procesu apoptotycznej śmierci komórki. Zmiany w potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej w wyniku modulacji aktywności kanałów kontrolują syntezę RFT. Nieregulowany, wysoki poziom reaktywnych form tlenu, z kolei powoduje uwolnienie cytochromu c i w następstwie tego, apoptozę [226].

Eksperymentalnie dowiedziono, że aktywacja kanału mitoBK<sub>Ca</sub> chroni serce przed śmiercią komórek wskutek niedokrwienia, obniżając syntezę RFT. Ponadto w modelu zwierzęcym, z delecją kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, w tych samych warunkach, nie zaobserwowano ochrony przed uszkodzeniem komórek prowadzącym do ich śmierci [226]. Co więcej, mutacja w obrębie kanału BK<sub>Ca</sub> powodująca utratę jego funkcjonalności przyczynia się do rozwoju ataksji móżdżkowej, co obserwuje się w dysfunkcji mitochondriów i ograniczonej żywotności komórek [167].

Uzyskane rezultaty potwierdzają dobroczynny udział aktywacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w modelu komórek śródbłonka linii EA.hy926. Wykazano brak toksyczności naringeniny, naringeniny-TPP<sup>+</sup>, cyjanidyny, luteoliny i kwercetyny. Związki te nie indukowały apoptozy. Co więcej, każdy z nich, poza cyjanidyną, zależnie od stężenia, ochraniał komórki śródbłonka przed śmiercią wskutek apoptozy powodowanej przez TNF/CHX. Potwierdza to fakt, że aktywatory mitochondrialnych kanałów potasowych, którymi są te flawonoidy, zapobiegają apoptotycznej śmierci komórek. Wyniki odniesiono do jednego z klasycznych aktywatorów kanału mitoBK<sub>Ca</sub> – NS11021, który nie indukował apoptozy i podobnie jak naturalne, nowo odkryte aktywatory, ochraniał komórki śródbłonka naczyniowego przed uszkodzeniami wywoływanymi przez TNF/CHX. Wyjątkiem jest pochodna TPP<sup>+</sup> naringeniny, gdzie wykazano jej efekt hamujący kanał mitoBK<sub>Ca</sub>, z kolei zaobserwowano, że ochrania komórki przed apoptozą. W tym przypadku, mechanizm ochronny może wynikać z interakcji z innymi białkami. Podobne efekty obserwowano w obecności paksyliny. Dowiedziono, że paksylina, jako znany inhibitor kanału BK<sub>Ca</sub>, wykazuje właściwości ochronne względem komórek związane z wpływem na homeostazę wapniową [238].

Z kolei w kontekście nekrozy uważa się, że aktywacja mitochondrialnych kanałów potasowych regulowanych ATP, osłabia dysfunkcję śródbłonka i zmniejsza skalę procesu martwicy (nekrozy) mięśnia sercowego. Co więcej, blokowanie kanałów ATP – zależnych nasila nekrozę naczyń mikrokrążenia [239], zaś ich aktywacja związana jest z przywróceniem właściwego potencjału błony mitochondrialnej w przypadku jego obniżenia, co ochrania komórki przed indukcją nekrozy [240]. Zmiana aktywności kluczowych białek mitochondrialnych, do których niewątpliwie zalicza się mitochondrialne kanały potasowe, jest ściśle powiązana z regulacją apoptozy i nekrozy – ich aktywacja zmniejsza skalę indukcji tych procesów [241].

Badane w ramach niniejszej rozprawy flawonoidy nie indukowały nekrozy, poza kwercetyną w stężeniu 30  $\mu$ M, gdzie proces martwicy był zauważalny. Podobnie jak w przypadku apoptozy, dowiedziono, że naringenina i kwercetyna ochraniają komórki EA.hy926 przed śmiercią nekrotyczną. Ten sam rezultat uzyskano dla naringeniny-TPP<sup>+</sup>, która jako inhibitor kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, powinna raczej promować nekrozę, a nie ochraniać przed nią. Mechanizm tej ochrony nie jest znany, jednak może być kojarzony z aktywacją innych szlaków cytoprotekcji, niezależnych od kanałów potasowych. Z kolei NS11021, jako aktywator kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, nie indukował nekrozy i również wykazał zdolność ochrony komórek przed śmiercią nekrotyczną. Efektów ochronnych przed nekrozą nie zaobserwowano dla cyjanidyny i luteoliny, związków dla których nie potwierdzono właściwości aktywujących kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych, a jedynie w zredukowanych. By wyjaśnić rolę redukcji środowiska, w regulacji kanału przez flawonoidy, potrzebne są dalsze badania.

Nie można ponadto wykluczyć udziału mitochondrialnych kanałów potasowych w migracji komórek. Zaobserwowano to w teście zarastania rysy, który pozwala ocenić wpływ różnych substancji na tempo migracji komórek [242]. Naringenina, luteolina i kwercetyna w stężeniach mikromolowych przyspieszały migrację komórek śródbłonka naczyniowego. Wzrost migracji komórek w wyniku działania kwercetyny wykazano także w komórkach śródbłonka żyły pępowinowej, gdzie hamowanie migracji pod wpływem wysokich stężeń glukozy zostało odwrócone przez kwercetynę [243]. Do tej pory wpływ kwercetyny na procesy migracji komórek został potwierdzony również w przypadku komórek

nowotworowych, a związane z tym zahamowanie tego procesu zmniejszyło zdolność tych komórek do przerzutów [244,245]. Naringenina także jest w stanie spowalniać migrację komórek nowotworowych mózgu, sutka czy płuc [246-248], podobnie jak luteolina może ograniczać inwazję i migrację komórek raka prostaty, mózgu i innych [249-251], a cyjanidyna zapobiegać przerzutom raka nerki [252]. W badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej przyspieszenia migracji komórek przez naringeninę, luteolinę i kwercetynę, prawdopodobnie nie można jednoznacznie przypisać tylko aktywacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Dostępna literatura sugeruje istotną rolę kanałów potasowych w migracji komórek [253,254]. Być może, kanały BK<sub>Ca</sub> z błony plazmatycznej oraz mitochondrialne kanały BK<sub>Ca</sub> w migracji komórek nie została dotychczas zbadana. Jednak w badaniach potwierdzono ważną rolę syntezy RFT i homeostazy wapnia w ruchu komórek [255,256], co może świadczyć o roli mitochondriów w tym procesie. Ponadto potwierdzono, że w procesach migracji komórek biorą udział kanały mitoTASK-3 [257] i mitoKv1.3 [150].

Otrzymane rezultaty potwierdzają, że flawonoidy wykazujące właściwości aktywujące mitoBK<sub>Ca</sub>, przyspieszają migrację. Te, które aktywują kanał w warunkach zredukowanych, są neutralne lub delikatnie przyspieszają migrację (3  $\mu$ M luteolina). Z kolei inhibitor, jak naringenina-TPP<sup>+</sup>, ale też kwercetyna w zbyt wysokim stężeniu (30  $\mu$ M), które powiązano już z indukcją nekrozy, hamują migrację komórek śródbłonka.

Warto wspomnieć, że flawonoidy ulegają metabolizmowi w organizmie, gdzie podczas wielu reakcji powstają inne związki, o nierzadko odmiennych właściwościach. Metabolizm flawonoidów zachodzi głównie w wątrobie i jelitach, zaś na procesy metaboliczne może wpływać wiele czynników, nawet wiek czy płeć [258]. Jest to bardzo szeroki temat, jednakże z uwagi na jego wpływ na pochodzące z produktów spożywczych flawonoidy, nie można go pominąć. Obserwowane efekty flawonoidów na poziomie ich interakcji z kanałem (mierzonej techniką patch-clamp) są bezsprzeczne i przypisane tylko do tych substancji, to samo dotyczy eksperymentów oddychania na izolowanych mitochondriach. Aczkolwiek, efekty obserwowane na komórkach można łączyć ze współdziałaniem metabolitów flawonoidów powstałych w wyniku trawienia z pożywienia, ale i metabolizmu komórkowego. W przedstawionych w niniejszej rozprawie doświadczeniach nie badano metabolizmu flawonoidów, gdyż nie prowadzono badań *in vivo*. Nie można wykluczyć jednak, że obserwowane efekty są wynikiem kumulacji wpływu zarówno samego flawonoidu jak i jego metabolitów na komórkę, mitochondria czy nawet kanał mitoBK<sub>Ca</sub>.

Wiadomo natomiast, że kwercetyna może występować W stanie wolnym (niezmetabolizowanym) w organizmie człowieka, gdyż jej obecność potwierdzono w osoczu [259]. Ponadto powstaje w organizmie w wyniku metabolizmu izoramnetyny czy innych metylowanych i glukuronidowych pochodnych, zaś w toku metabolizmu kwercetyny może powstać m.in. naringenina [237]. Naringenina jest również aktywnym metabolitem naringiny [260], a podawana na skórę może się wchłaniać w jej głębokie warstwy [77]. Najczęściej występującymi metabolitami cyjanidyny są z kolei jej glikozydy [261], podobnie jak w przypadku luteoliny, choć najlepiej przyswajalną jej formą u szczurów jest jej forma niezmetabolizowana [262]. Nie można zatem wykluczyć udziału metabolitów tych flawonoidów w badanych procesach apoptozy, nekrozy czy migracji komórek.

# 5.5 Zmiany ekspresji genów i poziomu białka kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w obecności kwercetyny

Jednym z wniosków w prezentowanej pracy jest to, że kwercetyna znacznie aktywuje mitochondrialny kanał potasowy (Po ok. 90%). Dlatego postawiono pytanie czy jej obecność wpływa ona na ekspresję genów oraz poziom białka kanału mitoBK<sub>Ca</sub> oraz jego podjednostek regulatorowych. Oceny dokonano za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki wyraźnie wskazywały, że obecność kwercetyny znacząco wpływa na ekspresję genu podjednostki regulatorowej β3 kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Wynik ten zweryfikowano poprzez określenie poziomu białka tej podjednostki kanału metodą Western blot. Rezultaty potwierdziły, że kwercetyna wpływa również na wzrost poziomu białka podjednostki β3 kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. W stosunku do genów pozostałych podjednostek nie odnotowano wzrostów ekspresji, a ich spadki. Obecnie nie opublikowano badań dotyczących regulacji ekspresji genów mitoBK<sub>Ca</sub> przez kwercetynę. Opisano jednakże wpływ tego flawonoidu na regulację innych genów. Na przykład, w procesach starzenia komórkowego kwercetyna zwiększała ekspresję genów LPL (lipaza lipoproteinowa, ang. lipoprotein lipase ) i KCNE2 (podjednostka regulatorowa 2 kanałów potasowych bramkowanych napięciem typu E, ang. potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 2), co wiązało się ze wzrostem poziomu enzymów antyoksydacyjnych i obniżeniem poziomu białek sprzyjających starzeniu [263]. Ponadto, w komórkach nowotworowych, kwercetyna hamowała ekspresję białek szoku cieplnego (Hsp, ang. heat shock protein) – Hsp27, Hsp70 i Hsp90. Wysoka ekspresja tych białek w raku piersi jest związana z proliferacją komórek

nowotworowych, zatem kwercetyna jako inhibitor Hsp, wykazuje właściwości hamujące rozwój nowotworu [264].

Dla pozostałych badanych flawonoidów nie znaleziono prac opisujących ich wpływ na ekspresję genów kanałów potasowych. Niemniej jednak, naringenina, jako inhibitor migracji komórek nowotworowych poprzez obniżenie ekspresji genów bramkowanych napięciem kanałów sodowych, w komórkach raka prostaty, ograniczyła ich zdolności do przerzutowania (komórki raka prostaty charakteryzują się nadekspresją tego typu kanałów sodowych) [265]. Ponadto naringenina powoduje zwiększenie ekspresji genów związanych z termogenezą i utlenianiem tłuszczów oraz wrażliwością na insulinę, w brzusznej podskórnej tkance tłuszczowej. Może przez to wpływać na przemianę ludzkiej białej tkanki tłuszczowej w brązowo-beżową [266]. Z kolei inna grupa dowiodła, że naringenina może zaburzać ekspresję genów makrofagów, co nie zawsze doprowadzało do indukcji odpowiedzi przeciwzapalnej [267].

## 6. Wnioski

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń, wykazano, że wybrane związki pochodzenia naturalnego z grupy flawonoidów kardioprotekcyjnych regulują aktywność mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie (mito $BK_{Ca}$ ). Ponadto dowiedziono, że regulacja ta wpływa na zmianę potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, szybkość oddychania, migrację oraz ochronę komórek przed uszkodzeniem.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwalają na wysnucie wniosków w następujących obszarach:

- Zidentyfikowano nowy, pochodzenia naturalnego, aktywator kanału mitoBK<sub>Ca</sub>: kwercetynę, która oprócz bezpośredniego wpływu na kanał posiada właściwości ochronne komórek śródbłonka naczyniowego przed uszkodzeniem oraz przyspiesza ich migrację i oddychanie. Ponadto wykazano, że kwercetyna wpływa na polaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz ekspresję genów i białka podjednostek kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Dodatkowo odkryto, że kanał mitoBK<sub>Ca</sub> po aktywacji kwercetyną nie jest blokowany przez paksylinę.
- Wykazano, że luteolina i cyjanidyna aktywują mitochondrialny kanał BK<sub>Ca</sub> w warunkach zredukowanych tzn. w obecności DTT, przy braku takich efektów w warunkach kontrolnych. Prawdopodobnie stan redoks białka kanałowego decyduje o regulacji kanału potasowego przez luteolinę i cyjanidynę.
- Opisano aktywujący wpływ naringeniny na kanał mitoBK<sub>Ca</sub> obecny w komórkach EA.hy926. Zaobserwowano, że naringenina ochrania komórki przed apoptozą i nekrozą oraz przyspiesza migrację komórek. Z kolei pochodne naringeniny (naringenina-TPP+, chalkon naringeniny i 6-C-glukozyd naringeniny) wykazały właściwości hamujące aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub>.

Wnioski szczegółowe uzyskane na podstawie otrzymanych wyników:

 Zidentyfikowano nowe aktywatory mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego przez jony wapnia (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>): kwercetynę oraz naringeninę.

- Cyjanidyna i luteolina aktywowały kanał mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach zredukowanych, podczas gdy w warunkach kontrolnych ich rolę określono jako neutralną bądź hamującą.
- 3. Pochodne naringeniny (naringenina-TPP<sup>+</sup>, chalkon naringeniny oraz 6-C-glukozyd naringeniny) uznano inhibitorami mitochondrialnego kanału BK<sub>Ca</sub>.
- Po raz pierwszy, wykorzystując technikę patch-clamp odkryto interakcję pomiędzy kwercetyną, a paksyliną. Po aktywacji kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przez kwercetynę, paksylina nie hamowała aktywność kanału.
- 5. Wykazano, że:
  - a) kwercetyna powoduje depolaryzację wewnętrznej błony mitochondriów w komórkach EA.hy926;
  - b) naringenina-TPP<sup>+</sup> wywołuje hiperpolaryzację wewnętrznej błony mitochondriów w komórkach EA.hy926;
  - c) luteolina, cyjanidyna oraz izoramnetyna nie wpływają na zmiany potencjału mitochondriów.
- Kwercetyna przyspiesza oddychanie mitochondriów w komórkach śródbłonka EA.hy926 w sposób zależny od wzrostu jej stężenia.
- W badaniach cytotoksyczności dowiedziono, że flawonoidy w danych stężeniach nie indukowały śmierci apoptotycznej czy nekrotycznej. Wyjątek stanowi indukcja nekrozy przez 30 µM kwercetynę na niskim poziomie istotności statystycznej.
- Kwercetyna, naringenina oraz naringenina-TPP<sup>+</sup> wpływają na przeżywalność komórek śródbłonka EA.hy926 w warunkach uszkodzenia indukowanego przez TNF-α/ cykloheksymid.
- 9. W badaniach wykorzystujących test zarastania rysy zaobserwowano, że:
  - a) kwercetyna, luteolina i naringenina przyspieszają proces migracji komórek;
  - b) inhibitor kanału mitoBK<sub>Ca</sub>, naringenina-TPP<sup>+</sup> w porównaniu do migracji komórek nietraktowanych, spowolniała zarastanie rysy.
- Obecność kwercetyny powoduje zmiany ekspresji genów i poziom białka podjednostek kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Obserwowano wzrost ekspresji genu i poziomu białka podjednostki regulatorowej β3.

Najważniejsze otrzymane rezultaty przedstawiono w Tabeli 8.

**Tabela 8** Podsumowanie wyników otrzymanych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej. Tabela zawiera spis efektów wywołanych przez wybrane flawonoidy: naringeninę i jej pochodne (6-C-glukozyd naringeniny, chalkon naringeniny, naringenina-TPP+) oraz flawonoidy kardioprotekcyjne (luteolinę, cyjanidynę, kwercetynę) i izoramnetynę. Objaśnienia: tak (+) kolor zielony; nie (-) czerwony; brak efektu (o) niebieski; nie określono (puste okienko) biały; \* - za wyjątkiem 30 µM kwercetyny; \*\*- obserwowano hiperpolaryzację.

Flawonoid Efekt	naringenina	naringenina-TPP+	chalkon naringeniny	6-C-glukozyd naringeniny	luteolina	cyjanidyna	kwercetyna	izoramnetyna
aktywacja kanału mitoBK <sub>Ca</sub>	+	-	0	-	0	-	+	0
aktywacja kanału mitoBK <sub>Ca</sub> w warunkach zredukowanych					+	+		
blokowanie kanału mitoBK <sub>Ca</sub> przez paksylinę w obecności flawonoidu	+		+	+	+		-	+
depolaryzacja błony mitochondrialnej	0	-**			0	0	+	0
zwiększenie oddychania komórkowego							+	0
indukcja apoptozy	-	-			-	-	-	
indukcja nekrozy	-	-			-	-	-	
ochrona przed apoptozą	+	+			+	-	+	
ochrona przed nekrozą	+	+			-	-	+	
przyspieszenie migracji komórkowej	+	-			+	0	+	
wpływ na ekspresję genów i poziom białek kanału mitoBK <sub>Ca</sub>							+	

### 7. Streszczenie w języku polskim

Choroby układu krążenia jako efekt nieprawidłowego stylu życia i niezdrowej diety często prowadzą do zawału mięśnia sercowego, a nawet zgonu. Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się roli mitochondrialnych kanałów potasowych w ochronie komórek przed skutkami niedotlenienia lub stresu oksydacyjnego. Wykazano, że aktywacja kanałów potasowych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej może zapobiegać skutkom niedokrwienia lub znacznie je ograniczać, indukując szlaki cytoprotekcyjne w komórce. Jednak syntetyczne aktywatory kanałów potasowych wykazują szereg skutków ubocznych. Dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej było poszukiwanie nowych aktywatorów mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami wapnia (mitoBK<sub>Ca</sub>) pochodzenia naturalnego - kardioprotekcyjnych flawonoidów oraz określenie ich roli w cytoprotekcji indukowanej przez aktywację kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Na podstawie literatury, do badań wyselekcjonowano kilka flawonoidów: naringeninę i jej pochodne, luteolinę, kwercetynę i cyjanidynę.

Praca koncentruje się na opisie bezpośredniego oddziaływania flawonoidów z mitochondrialnymi kanałami potasowymi wykorzystując technikę patch-clamp. Fizjologiczną rolę regulacji kanałów potasowych obserwowano w testach migracji oraz apoptozy i nekrozy. Z kolei bezpośredni efekt mitochondriotropowy flawonoidów określano poprzez ocenę zmian potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, oddychania komórkowego czy ekspresji genów i białka podjednostek kanału mitoBK<sub>Ca</sub>.

W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano nowe aktywatory kanału mitoBK<sub>Ca</sub> pochodzenia naturalnego: kwercetynę i naringeninę oraz aktywatory kanału w środowisku zredukowanym: cyjanidynę i luteolinę. Wykazano, że pochodne naringeniny: naringenina-TPP<sup>+</sup>, chalkon naringeniny i 6-C-glukozyd naringeniny są inhibitorami kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Naringenina-TPP<sup>+</sup>, jako inhibitor mitoBK<sub>Ca</sub>, hiperpolaryzuje błonę mitochondrialną i spowalnia migrację komórkową, jednakże ochrania komórki przed apoptozą i nekrozą. Dla cyjanidyny i luteoliny nie wykazano znaczącej roli fizjologicznej. Kwercetyna i naringenina, jako aktywatory mitoBK<sub>Ca</sub> ochraniają komórki przed śmiercią, przyspieszają migrację oraz depolaryzują wewnętrzną błonę mitochondrialną. Kwercetyna dodatkowo zwiększa oddychanie i wpływa na ekspresję podjednostki  $\beta$ 3 kanału mitoBK<sub>Ca</sub>. Co ciekawe, w wyniku aktywacji mitoBK<sub>Ca</sub> przez kwercetynę, paksylina nie wykazuje właściwości blokujących aktywność kanału, czego nigdy wcześniej nie zaobserwowano.

### 8. Streszczenie w języku angielskim

Cardiovascular diseases as a result of an incorrect lifestyle and unhealthy diet often lead to myocardial infarction and even death. Recently, more and more attention has been paid to the role of mitochondrial potassium channels in protecting cells from the effects of hypoxia or oxidative stress. It has been shown that activation of potassium channels present in the inner mitochondrial membrane can prevent or significantly reduce the effects of ischemia by inducing cytoprotective pathways in the cell. However, synthetic potassium channel activators have a number of side effects. Therefore, the aim of this dissertation was to search for new large-conductance calcium-regulated mitochondrial potassium channel activators (mitoBK<sub>Ca</sub>) of natural origin - cardioprotective flavonoids and to determine their role in cytoprotection induced by mitoBK<sub>Ca</sub> channel activation. Based on the literature, several flavonoids were selected for research: naringenin and its derivatives, luteolin, quercetin and cyanidin.

The work focuses on the description of the direct interaction of flavonoids with mitochondrial potassium channels using the patch-clamp technique. The physiological role of potassium channel regulation was observed in migration, apoptosis and necrosis tests. In turn, the direct mitochondriotropic effect of flavonoids was determined by assessing changes in the potential of the inner mitochondrial membrane, cellular respiration or gene and protein expression of the mitoBK<sub>Ca</sub> channel subunits.

As a result of the conducted research, new mitoBK<sub>Ca</sub> channel activators of natural origin were identified: quercetin and naringenin and channel activators in a reduced environment: cyanidin and luteolin. The naringenin derivatives: naringenin-TPP<sup>+</sup>, naringenin chalcone and naringenin-6-C-glucoside have been shown to be inhibitors of the mitoBK<sub>Ca</sub> channel. Naringenin-TPP<sup>+</sup>, as an inhibitor of mitoBK<sub>Ca</sub>, hyperpolarises the mitochondrial membrane and slows down cell migration, but protects cells against apoptosis and necrosis. For cyanidin and luteolin, no significant physiological role was demonstrated. Quercetin and naringenin, as mitoBK<sub>Ca</sub> channel activators, protect cells against death, accelerate migration and depolarize the inner mitochondrial membrane. Quercetin additionally increases respiration and influences the expression of the  $\beta$ 3 subunit of the mitoBK<sub>Ca</sub> channel. Interestingly, as a result of mitoBK<sub>Ca</sub> activation by quercetin, paxilline does not exhibit any channel activity blocking properties, which has never been observed before.

### SPIS PUBLIKACJI

Z tematyki rozprawy doktorskiej:

- Kampa RP, Sęk A, Szewczyk A, Bednarczyk P. "Cytoprotective effects of the flavonoid quercetin by activating mitochondrial BK<sub>Ca</sub> channels in endothelial cells", Biomed Pharmacother. 2021, 142:112039 – praca eksperymentalna
- Kampa RP, Kicinska A, Jarmuszkiewicz W, Pasikowska-Piwko M, Dolegowska B, Debowska R, Szewczyk A, Bednarczyk P. "Naringenin as an opener of mitochondrial potassium channels in dermal fibroblasts", Exp. Dermatol. 2019; 28(5): 543-550. – praca eksperymentalna
- Kicińska A\*, Kampa RP\*, Daniluk J, Sęk A, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A, Bednarczyk P. ,,Regulation of the mitochondrial BK<sub>Ca</sub> channel by the citrus flavonoid naringenin as a potential means of preventing cell damage", Molecules. 2020 25(13), 3010; \* – równy wkład, – praca eksperymentalna
- Bednarczyk P, Kampa RP, Gałecka S, Sęk A, Walewska A, Koprowski P. "Patch-Clamp Recording of the Activity of Ion Channels in the Inner Mitochondrial Membrane" w: Weissig V., Edeas M. (eds) Mitochondrial Medicine. Methods in Molecular Biology, vol 2276. Springer, New York, NY 2021, ISBN: 978-1-0716-1266-8 – rozdział w książce

W przygotowaniu:

 Kampa RP, Gliździńska A, Szewczyk A, Bednarczyk P, Filipek S. "Flavonoid quercetin abolish inhibition of mitochondrial BK<sub>Ca</sub> channel by paxilline", w przygotowaniu – praca eksperymentalna

Pozostałe:

 Bednarczyk P, Kicinska A, Laskowski M, Kulawiak B, Kampa R, Walewska A, Krajewska M, Jarmuszkiewicz W, Szewczyk A. "Evidence for a mitochondrial ATPregulated potassium channel in human dermal fibroblasts.", Biochim Biophys Acta. 2018; 1859(5):309-318 – praca eksperymentalna

- Sęk A, Kampa RP, Kulawiak B, Szewczyk A, Bednarczyk P. "Identification of the large-conductance Ca<sup>2+</sup>-regulated potassium channel in mitochondria of human bronchial epithelial cells", Molecules. 2021; 26, 3233 – praca eksperymentalna
- 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", Postępy Biochemii 2018, vol. 64, nr 2-3 – artykuł przeglądowy
- Bednarczyk P, Sęk A, Kampa RP, Dębowska R, Szewczyk A. "Mitochondrial potassium channels: new target for skin protection?", Br. J. Dermatol.; w przygotowaniu – artykuł przeglądowy
- Kumar DG, Banasiewicz M, Wrzosek A, Kampa RP, Bousquet MHE, Jacquemin D, Szewczyk A, Gryko DT. "A highly sensitive potassium probe based on azacrowndiketopyrrolopyrrole", w przygotowaniu – praca eksperymentalna

# Wykaz najważniejszych konferencji międzynarodowych, gdzie prezentowano otrzymane wyniki:

- 11<sup>th</sup> MitoEAGLE Training School MiPschool 2018; Tromso-Bergen, Norwegia; 20-24.10.2018 r.; wystąpienie ustne oraz przewodniczenie sesji (laureat stypendium wyjazdowego European Cooperation in Science and Technology - COST).
- EMBO Workshop "Cell Polarity & Membrane Dynamics"; Sant Felieu de Guixols, Hiszpania; 26-31.05.2019 r.; prezentacja posteru (laureat stypendium wyjazdowego EMBO Travel Grant).
- 3. 44<sup>th</sup> FEBS Congress; Kraków, Polska; 06-11.07.2019 r.; prezentacja posteru (laureat stypendium konferencyjnego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).
- 4. 16<sup>th</sup> Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) & 19<sup>th</sup> Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit); Fukuoka, Japonia; 03-05.10.2019 r.; prezentacja posteru i krótkie wystąpienie ustne (laureat grantu wyjazdowego European Cooperation in Science and Technology COST ITC Grant).
- 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society; San Diego, USA; 15-19.02.2020 r.; prezentacja posteru.

### BIBLIOGRAFIA

- Chistiakov, D.A.; Shkurat, T.P.; Melnichenko, A.A.; Grechko, A.V.; Orekhov, A.N. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med* 2018, *50*, 121-127, doi:10.1080/07853890.2017.1417631.
- Pabich, M.; Materska, M. Biological Effect of Soy Isoflavones in the Prevention of Civilization Diseases. *Nutrients* 2019, *11*, 1660, doi:10.3390/nu11071660.
- Goloshumova, G.S.; Albakova, Z.A.; Marchev, K.V.; Kidinov, A.V.; Gustova, E.A.; Salakhova, V.B.; Krasheninnikova, N.A. The interrelation of environmental and social factors and man's mental health. *Ekoloji* 2019, 28, 6013-6016.
- 4. Kitajewska, W.; Szeląg, W.; Kopański, Z.; Maslyak, Z.; Sklyarov, I. Choroby cywilizacyjne i ich prewencja. *Journal of Clinical Healthcare* **2014**.
- 5. Czerwiecki, L. [Contemporary view of plant antioxidants role in prevention of civilization diseases]. *Rocz Panstw Zakl Hig* **2009**, *60*, 201-206.
- Sun, H.; Gusdon, A.M.; Qu, S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Curr Opin Lipidol* 2016, 27, 408-413, doi:10.1097/MOL.00000000000314.
- Chao, C.-T.; Yeh, H.-Y.; Yuan, T.-H.; Chiang, C.-K.; Chen, H.-W. MicroRNA-125b in vascular diseases: An updated systematic review of pathogenetic implications and clinical applications. *Journal of cellular and molecular medicine* 2019, *23*, 5884-5894, doi:10.1111/jcmm.14535.
- Jazwinski, S.M. The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1833, 400-409, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.010.
- 9. Chinnery, P.F.; Turnbull, D.M. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* **2001**, *106*, 94-101, doi:10.1002/ajmg.1426.
- Betts, J.G.; Desaix, P.; Johnson, E.; Johnson, J.E.; Korol, O.; Kruse, D.; Poe, B.;
  Wise, J.; Womble, M.D.; Young, K.A., et al. *Anatomy & physiology*; 2017.
- 11. Anderson, R.H.; Razavi, R.; Taylor, A.M. Cardiac anatomy revisited. *Journal of anatomy* **2004**, *205*, 159-177, doi:10.1111/j.0021-8782.2004.00330.x.
- 12. Golab BK, T.W. Anatomia i fizjolgia człowieka; TUR: Łódź, 1997.
- Konukoglu, D.; Uzun, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol* 2017, 956, 511-540, doi:10.1007/5584\_2016\_90.

- González, J.; Valls, N.; Brito, R.; Rodrigo, R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World journal of cardiology* 2014, 6, 353-366, doi:10.4330/wjc.v6.i6.353.
- Bonetti, P.O.; Lerman, L.O.; Lerman, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23, 168-175, doi:10.1161/01.atv.0000051384.43104.fc.
- Ferroni, P.; Basili, S.; Paoletti, V.; Davi, G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006, *16*, 222-233, doi:10.1016/j.numecd.2005.11.012.
- Jacobsen, J.C.; Hornbech, M.S.; Holstein-Rathlou, N.H. Significance of microvascular remodelling for the vascular flow reserve in hypertension. *Interface focus* 2011, *1*, 117-131, doi:10.1098/rsfs.2010.0003.
- Badimon, L.; Vilahur, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of internal medicine* 2014, 276, 618-632, doi:10.1111/joim.12296.
- Morales, P.E.; Arias-Durán, C.; Ávalos-Guajardo, Y.; Aedo, G.; Verdejo, H.E.; Parra, V.; Lavandero, S. Emerging role of mitophagy in cardiovascular physiology and pathology. *Mol Aspects Med* 2020, *71*, 100822, doi:10.1016/j.mam.2019.09.006.
- Vidali, S.; Aminzadeh, S.; Lambert, B.; Rutherford, T.; Sperl, W.; Kofler, B.; Feichtinger, R.G. Mitochondria: The ketogenic diet--A metabolism-based therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2015, *63*, 55-59, doi:10.1016/j.biocel.2015.01.022.
- Peng, W.; Cai, G.; Xia, Y.; Chen, J.; Wu, P.; Wang, Z.; Li, G.; Wei, D. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *DNA Cell Biol* 2019, *38*, 597-606, doi:10.1089/dna.2018.4552.
- Hoppel, C.L.; Lesnefsky, E.J.; Chen, Q.; Tandler, B. Mitochondrial Dysfunction in Cardiovascular Aging. *Adv Exp Med Biol* 2017, *982*, 451-464, doi:10.1007/978-3-319-55330-6\_24.
- Vásquez-Trincado, C.; García-Carvajal, I.; Pennanen, C.; Parra, V.; Hill, J.A.; Rothermel, B.A.; Lavandero, S. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J Physiol* 2016, *594*, 509-525, doi:10.1113/jp271301.
- Kumar, A.A.; Kelly, D.P.; Chirinos, J.A. Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 2019, *139*, 1435-1450, doi:10.1161/circulationaha.118.036259.

- Thygesen, K.; Alpert, J.S.; Jaffe, A.S.; White, H.D. Diagnostic application of the universal definition of myocardial infarction in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care* 2008, 14, 543-548, doi:10.1097/MCC.0b013e32830d34b9.
- Davidson, S.M.; Lopaschuk, G.D.; Spedding, M.; Beart, P.M. Mitochondrial pharmacology: energy, injury and beyond. *Br J Pharmacol* 2014, *171*, 1795-1797, doi:10.1111/bph.12679.
- Madamanchi, N.R.; Runge, M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007, *100*, 460-473, doi:10.1161/01.Res.0000258450.44413.96.
- Cho, Y.E.; Basu, A.; Dai, A.; Heldak, M.; Makino, A. Coronary endothelial dysfunction and mitochondrial reactive oxygen species in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013, 305, C1033-1040, doi:10.1152/ajpcell.00234.2013.
- Wang, Y.; Tabas, I. Emerging roles of mitochondria ROS in atherosclerotic lesions: causation or association? *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2014, *21*, 381-390, doi:10.5551/jat.23929.
- Dubois-Deruy, E.; Peugnet, V.; Turkieh, A.; Pinet, F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel)* 2020, 9, doi:10.3390/antiox9090864.
- Szewczyk, A.; Jarmuszkiewicz, W.; Koziel, A.; Sobieraj, I.; Nobik, W.; Lukasiak, A.; Skup, A.; Bednarczyk, P.; Drabarek, B.; Dymkowska, D., et al. Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep* 2015, 67, 704-710, doi:10.1016/j.pharep.2015.04.009.
- Solomon PE, B.L., Martin DW. Organizacja komórki In *Biologia Villee*, Multico: 2014; Vol. IX.
- Annesley, S.J.; Fisher, P.R. Mitochondria in Health and Disease. *Cells* 2019, *8*, 680, doi:10.3390/cells8070680.
- Giacomello, M.; Pyakurel, A.; Glytsou, C.; Scorrano, L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020, 21, 204-224, doi:10.1038/s41580-020-0210-7.
- Chipuk, J.E.; Bouchier-Hayes, L.; Green, D.R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death & Differentiation* 2006, *13*, 1396-1402, doi:10.1038/sj.cdd.4401963.
- 36. Alberts B, J.A., Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*; Norton & Company 2015.

- Mannella, C.A. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2006, 1763, 542-548, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.006.
- Lemasters, J.J.; Theruvath, T.P.; Zhong, Z.; Nieminen, A.-L. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -*Bioenergetics* 2009, 1787, 1395-1401, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2009.06.009.
- 39. Siemen, D.; Ziemer, M. What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and What is it Not? *IUBMB Life* **2013**, *65*, 255-262, doi:https://doi.org/10.1002/iub.1130.
- Dolgacheva, L.P.; Berezhnov, A.V.; Fedotova, E.I.; Zinchenko, V.P.; Abramov, A.Y. Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. J Bioenerg Biomembr 2019, 51, 175-188, doi:10.1007/s10863-019-09798-4.
- 41. Nedergaard, J.; Ricquier, D.; Kozak, L.P. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO reports* 2005, 6, 917-921, doi:10.1038/sj.embor.7400532.
- 42. Sharma, P.; Sampath, H. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. *Cells* **2019**, *8*, doi:10.3390/cells8020100.
- Chandhok, G.; Lazarou, M.; Neumann, B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 2018, 93, 933-949, doi:10.1111/brv.12378.
- 44. Nunnari, J.; Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 2012, *148*, 1145-1159, doi:10.1016/j.cell.2012.02.035.
- Ylikallio, E.; Suomalainen, A. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med* 2012, 44, 41-59, doi:10.3109/07853890.2011.598547.
- Suomalainen, A. Therapy for mitochondrial disorders: little proof, high research activity, some promise. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2011, *16*, 236-240, doi:10.1016/j.siny.2011.05.003.
- 47. Inoue, I.; Nagase, H.; Kishi, K.; Higuti, T. ATP-sensitive K+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **1991**, *352*, 244-247, doi:10.1038/352244a0.
- Leanza, L.; Checchetto, V.; Biasutto, L.; Rossa, A.; Costa, R.; Bachmann, M.; Zoratti, M.; Szabo, I. Pharmacological modulation of mitochondrial ion channels. *Br J Pharmacol* 2019, *176*, 4258-4283, doi:10.1111/bph.14544.
- 49. Szabo, I.; Zoratti, M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev* 2014, 94, 519-608, doi:10.1152/physrev.00021.2013.
- Szewczyk, A.; Bednarczyk, P.; Jedraszko, J.; Kampa, R.P.; Koprowski, P.; Krajewska, M.; Kucman, S.; Kulawiak, B.; Laskowski, M.; Rotko, D., et al. Mitochondrial potassium channels - an overview. *Postepy Biochem* 2018, 64, 196-212, doi:10.18388/pb.2018\_132.
- 51. Facundo, H.T.; Carreira, R.S.; de Paula, J.G.; Santos, C.C.; Ferranti, R.; Laurindo, F.R.; Kowaltowski, A.J. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K+ channel activity. *Free Radic Biol Med* 2006, 40, 469-479, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.041.
- Testai, L.; Rapposelli, S.; Martelli, A.; Breschi, M.C.; Calderone, V. Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs. *Med Res Rev* 2015, *35*, 520-553, doi:10.1002/med.21332.
- 53. Frankenreiter, S.; Bednarczyk, P.; Kniess, A.; Bork, N.I.; Straubinger, J.; Koprowski, P.; Wrzosek, A.; Mohr, E.; Logan, A.; Murphy, M.P., et al. cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels. *Circulation* 2017, *136*, 2337-2355, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028723.
- 54. Garlid, K.D. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* **2000**, *95*, 275-279, doi:10.1007/s003950070046.
- 55. Soltysinska, E.; Bentzen, B.H.; Barthmes, M.; Hattel, H.; Thrush, A.B.; Harper, M.E.; Qvortrup, K.; Larsen, F.J.; Schiffer, T.A.; Losa-Reyna, J., et al. KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* **2014**, *9*, e103402, doi:10.1371/journal.pone.0103402.
- Laskowski, M.; Augustynek, B.; Kulawiak, B.; Koprowski, P.; Bednarczyk, P.; Jarmuszkiewicz, W.; Szewczyk, A. What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim Biophys Acta* 2016, 1857, 1247-1257, doi:10.1016/j.bbabio.2016.03.007.
- 57. Augustynek, B.; Koprowski, P.; Rotko, D.; Kunz, W.S.; Szewczyk, A.; Kulawiak,
  B. Mitochondrial BK Channel Openers CGS7181 and CGS7184 Exhibit Cytotoxic
  Properties. *Int J Mol Sci* 2018, *19*, doi:10.3390/ijms19020353.
- Bednarczyk, P.; Kicinska, A.; Laskowski, M.; Kulawiak, B.; Kampa, R.; Walewska,
   A.; Krajewska, M.; Jarmuszkiewicz, W.; Szewczyk, A. Evidence for a mitochondrial

ATP-regulated potassium channel in human dermal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **2018**, *1859*, 309-318, doi:10.1016/j.bbabio.2018.02.005.

- Sato, T.; Marban, E. The role of mitochondrial K(ATP) channels in cardioprotection. Basic Res Cardiol 2000, 95, 285-289, doi:10.1007/s003950070047.
- Meng, L.M.; Ma, H.J.; Guo, H.; Kong, Q.Q.; Zhang, Y. The cardioprotective effect of naringenin against ischemia-reperfusion injury through activation of ATPsensitive potassium channel in rat. *Can J Physiol Pharmacol* 2016, *94*, 973-978, doi:10.1139/cjpp-2016-0008.
- Douglas, R.M.; Lai, J.C.; Bian, S.; Cummins, L.; Moczydlowski, E.; Haddad, G.G. The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience* 2006, *139*, 1249-1261, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.01.061.
- Tano, J.Y.; Gollasch, M. Hypoxia and ischemia-reperfusion: a BiK contribution? Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014, 307, H811-817, doi:10.1152/ajpheart.00319.2014.
- Augustynek, B.; Kunz, W.S.; Szewczyk, A. Guide to the Pharmacology of Mitochondrial Potassium Channels. *Handb Exp Pharmacol* 2017, 240, 103-127, doi:10.1007/164\_2016\_79.
- Szewczyk, A.; Kajma, A.; Malinska, D.; Wrzosek, A.; Bednarczyk, P.; Zablocka, B.; Dolowy, K. Pharmacology of mitochondrial potassium channels: dark side of the field. *FEBS Lett* 2010, 584, 2063-2069, doi:10.1016/j.febslet.2010.02.048.
- Szewczyk, A.; Kajma, A.; Malinska, D.; Wrzosek, A.; Bednarczyk, P.; Zabłocka, B.; Dołowy, K. Pharmacology of mitochondrial potassium channels: dark side of the field. *FEBS Lett* **2010**, *584*, 2063-2069, doi:10.1016/j.febslet.2010.02.048.
- 66. Laskowski, M.; Augustynek, B.; Kulawiak, B.; Koprowski, P.; Bednarczyk, P.; Jarmuszkiewicz, W.; Szewczyk, A. What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2016, 1857, 1247-1257, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.03.007.
- Siemen, D.; Loupatatzis, C.; Borecky, J.; Gulbins, E.; Lang, F. Ca2+-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 257, 549-554, doi:10.1006/bbrc.1999.0496.
- 68. Skalska, J.; Piwonska, M.; Wyroba, E.; Surmacz, L.; Wieczorek, R.; Koszela-Piotrowska, I.; Zielinska, J.; Bednarczyk, P.; Dolowy, K.; Wilczynski, G.M., et al. A

novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1777*, 651-659, doi:10.1016/j.bbabio.2008.05.007.

- 69. Kulawiak, B.; Bednarczyk, P. Reconstitution of brain mitochondria inner membrane into planar lipid bilayer. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **2005**, *65*, 271-276.
- Xu, W.; Liu, Y.; Wang, S.; McDonald, T.; Van Eyk, J.E.; Sidor, A.; O'Rourke, B. Cytoprotective role of Ca2+- activated K+ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 2002, 298, 1029-1033, doi:10.1126/science.1074360.
- Bednarczyk, P.; Koziel, A.; Jarmuszkiewicz, W.; Szewczyk, A. Large-conductance Ca(2)(+)-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013, 304, H1415-1427, doi:10.1152/ajpheart.00976.2012.
- Kicinska, A.; Augustynek, B.; Kulawiak, B.; Jarmuszkiewicz, W.; Szewczyk, A.; Bednarczyk, P. A large-conductance calcium-regulated K+ channel in human dermal fibroblast mitochondria. *Biochem J* 2016, 473, 4457-4471, doi:10.1042/BCJ20160732.
- 73. Balderas, E.; Zhang, J.; Stefani, E.; Toro, L. Mitochondrial BKCa channel. *Front Physiol* **2015**, *6*, 104, doi:10.3389/fphys.2015.00104.
- Lee, U.S.; Cui, J. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci* 2010, *33*, 415-423, doi:10.1016/j.tins.2010.06.004.
- Ghatta, S.; Nimmagadda, D.; Xu, X.; O'Rourke, S.T. Large-conductance, calciumactivated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 2006, *110*, 103-116, doi:10.1016/j.pharmthera.2005.10.007.
- Balderas, E.; Zhang, J.; Stefani, E.; Toro, L. Mitochondrial BKCa channel. *Frontiers in Physiology* 2015, *6*, doi:10.3389/fphys.2015.00104.
- Kampa, R.P.; Kicinska, A.; Jarmuszkiewicz, W.; Pasikowska-Piwko, M.; Dolegowska, B.; Debowska, R.; Szewczyk, A.; Bednarczyk, P. Naringenin as an opener of mitochondrial potassium channels in dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 2019, 28, 543-550, doi:10.1111/exd.13903.
- 78. Singh, H.; Lu, R.; Bopassa, J.C.; Meredith, A.L.; Stefani, E.; Toro, L. 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*, 10836-10841, doi:10.1073/pnas.1302028110.

- 79. Soltysinska, E.; Bentzen, B.H.; Barthmes, M.; Hattel, H.; Thrush, A.B.; Harper, M.E.; Qvortrup, K.; Larsen, F.J.; Schiffer, T.A.; Losa-Reyna, J., et al. KCNMA1 encoded cardiac BK channels afford protection against ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* **2014**, *9*, e103402, doi:10.1371/journal.pone.0103402.
- Baranowska, M.; Kozłowska, H.; Korbut, A.; Malinowska, B. [Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007, *61*, 596-605.
- Testai, L.; Da Pozzo, E.; Piano, I.; Pistelli, L.; Gargini, C.; Breschi, M.C.; Braca, A.; Martini, C.; Martelli, A.; Calderone, V. The Citrus Flavanone Naringenin Produces Cardioprotective Effects in Hearts from 1 Year Old Rat, through Activation of mitoBK Channels. *Front Pharmacol* 2017, *8*, 71, doi:10.3389/fphar.2017.00071.
- Skalska, J.; Bednarczyk, P.; Piwonska, M.; Kulawiak, B.; Wilczynski, G.; Dolowy, K.; Kudin, A.P.; Kunz, W.S.; Szewczyk, A. Calcium ions regulate K(+) uptake into brain mitochondria: the evidence for a novel potassium channel. *Int J Mol Sci* 2009, *10*, 1104-1120, doi:10.3390/ijms10031104.
- Garlid, K.D.; Paucek, P. The mitochondrial potassium cycle. *IUBMB Life* 2001, *52*, 153-158, doi:10.1080/15216540152845948.
- Mitchell, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1966, *41*, 445-502, doi:10.1111/j.1469-185x.1966.tb01501.x.
- Garlid, K.D.; Paucek, P. Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta* 2003, *1606*, 23-41, doi:10.1016/s0005-2728(03)00108-7.
- Bednarczyk, P. Potassium and Mitochondria. In *Metal Ion in Stroke*, Li, Y.V., Zhang,
   J.H., Eds. Springer New York: New York, NY, 2012; 10.1007/978-1-4419-9663 3\_18pp. 373-389.
- Kulawiak, B.; Kudin, A.P.; Szewczyk, A.; Kunz, W.S. BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp Neurol* 2008, *212*, 543-547, doi:10.1016/j.expneurol.2008.05.004.
- Kulawiak, B.; Bednarczyk, P.; Szewczyk, A. Multidimensional Regulation of Cardiac Mitochondrial Potassium Channels. *Cells* 2021, *10*, 1554.
- Kulawiak, B.; Bednarczyk, P.; Szewczyk, A. Multidimensional Regulation of Cardiac Mitochondrial Potassium Channels. *Cells* 2021, 10, doi:10.3390/cells10061554.

- Lv, D.; Cheng, X.; Tang, L.; Jiang, M. The cardioprotective effect of total flavonoids on myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Biomed Pharmacother* 2017, 88, 277-284, doi:10.1016/j.biopha.2017.01.060.
- 91. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* **2013**, *2013*, 162750, doi:10.1155/2013/162750.
- 92. Wen, L.; Jiang, Y.; Yang, J.; Zhao, Y.; Tian, M.; Yang, B. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Ann N Y Acad Sci* 2017, *1398*, 120-129, doi:10.1111/nyas.13350.
- Yáñez, J.A.; Andrews, P.K.; Davies, N.M. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 848, 159-181, doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.052.
- 94. Salehi, B.; Fokou, P.V.T.; Sharifi-Rad, M.; Zucca, P.; Pezzani, R.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **2019**, *12*, doi:10.3390/ph12010011.
- 95. Testai, L.; Martelli, A.; Marino, A.; D'Antongiovanni, V.; Ciregia, F.; Giusti, L.; Lucacchini, A.; Chericoni, S.; Breschi, M.C.; Calderone, V. The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol* 2013, 85, 1634-1643, doi:10.1016/j.bcp.2013.03.018.
- 96. Da Pozzo, E.; Costa, B.; Cavallini, C.; Testai, L.; Martelli, A.; Calderone, V.; Martini, C. The Citrus Flavanone Naringenin Protects Myocardial Cells against Age-Associated Damage. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 2017, 9536148, doi:10.1155/2017/9536148.
- 97. Testai, L. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sci* **2015**, *135*, 68-76, doi:10.1016/j.lfs.2015.04.017.
- Yang, Z.; Pan, A.; Zuo, W.; Guo, J.; Zhou, W. Relaxant effect of flavonoid naringenin on contractile activity of rat colonic smooth muscle. *J Ethnopharmacol* 2014, 155, 1177-1183, doi:10.1016/j.jep.2014.06.053.
- 99. Manchope, M.F.; Calixto-Campos, C.; Coelho-Silva, L.; Zarpelon, A.C.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Georgetti, S.R.; Baracat, M.M.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway. *PLoS One* **2016**, *11*, e0153015, doi:10.1371/journal.pone.0153015.

- 100. Hsu, H.T.; Tseng, Y.T.; Lo, Y.C.; Wu, S.N. Ability of naringenin, a bioflavonoid, to activate M-type potassium current in motor neuron-like cells and to increase BKCa-channel activity in HEK293T cells transfected with α-hSlo subunit. *BMC Neurosci* 2014, *15*, 135, doi:10.1186/s12868-014-0135-1.
- 101. Chanet, A.; Milenkovic, D.; Claude, S.; Maier, J.A.; Kamran Khan, M.; Rakotomanomana, N.; Shinkaruk, S.; Bérard, A.M.; Bennetau-Pelissero, C.; Mazur, A., et al. Flavanone metabolites decrease monocyte adhesion to TNF-α-activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes. *Br J Nutr* 2013, *110*, 587-598, doi:10.1017/s0007114512005454.
- 102. Kolot, C.; Rodriguez-Mateos, A.; Feliciano, R.; Bottermann, K.; Stahl, W. Bioavailability of naringenin chalcone in humans after ingestion of cherry tomatoes. International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernahrungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition 2020, 90, 411-416, doi:10.1024/0300-9831/a000574.
- 103. Wang, T.; Liang, X.; Abeysekera, I.R.; Iqbal, U.; Duan, Q.; Naha, G.; Lin, L.; Yao, X. Activation of the Nrf2-Keap 1 Pathway in Short-Term Iodide Excess in Thyroid in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 2017, 4383652, doi:10.1155/2017/4383652.
- 104. Escribano-Ferrer, E.; Queralt Regué, J.; Garcia-Sala, X.; Boix Montañés, A.; Lamuela-Raventos, R.M. In Vivo Anti-inflammatory and Antiallergic Activity of Pure Naringenin, Naringenin Chalcone, and Quercetin in Mice. *J Nat Prod* 2019, 82, 177-182, doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00366.
- 105. Iwamura, C.; Shinoda, K.; Yoshimura, M.; Watanabe, Y.; Obata, A.; Nakayama, T. Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2010, 59, 67-73, doi:10.2332/allergolint.09-OA-0118.
- Horiba, T.; Nishimura, I.; Nakai, Y.; Abe, K.; Sato, R. Naringenin chalcone improves adipocyte functions by enhancing adiponectin production. *Mol Cell Endocrinol* 2010, *323*, 208-214, doi:10.1016/j.mce.2010.03.020.
- Wang, X.; Zhang, Q. [Studies of the chemical constituents of Ardisia pusilla A. DC]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 1990, 15, 166-167, 191.
- Rawat, P.; Kumar, M.; Sharan, K.; Chattopadhyay, N.; Maurya, R. Ulmosides A and B: flavonoid 6-C-glycosides from Ulmus wallichiana, stimulating osteoblast differentiation assessed by alkaline phosphatase. *Bioorg Med Chem Lett* 2009, *19*, 4684-4687, doi:10.1016/j.bmcl.2009.06.074.

- 109. Swarnkar, G.; Sharan, K.; Siddiqui, J.A.; Mishra, J.S.; Khan, K.; Khan, M.P.; Gupta, V.; Rawat, P.; Maurya, R.; Dwivedi, A.K., et al. A naturally occurring naringenin derivative exerts potent bone anabolic effects by mimicking oestrogen action on osteoblasts. *Br J Pharmacol* 2012, *165*, 1526-1542, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01637.x.
- 110. Chen, Z.; Kong, S.; Song, F.; Li, L.; Jiang, H. Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats. *Fitoterapia* 2012, 83, 1616-1622, doi:https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.09.011.
- 111. Lim, S.H.; Jung, S.K.; Byun, S.; Lee, E.J.; Hwang, J.A.; Seo, S.G.; Kim, Y.A.; Yu, J.G.; Lee, K.W.; Lee, H.J. Luteolin suppresses UVB-induced photoageing by targeting JNK1 and p90RSK2. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2013, *17*, 672-680, doi:https://doi.org/10.1111/jcmm.12050.
- Imran, M.; Rauf, A.; Abu-Izneid, T.; Nadeem, M.; Shariati, M.A.; Khan, I.A.; Imran, A.; Orhan, I.E.; Rizwan, M.; Atif, M., et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother* 2019, *112*, 108612, doi:10.1016/j.biopha.2019.108612.
- 113. Chen, C.Y.; Peng, W.H.; Wu, L.C.; Wu, C.C.; Hsu, S.L. Luteolin ameliorates experimental lung fibrosis both in vivo and in vitro: implications for therapy of lung fibrosis. *J Agric Food Chem* **2010**, *58*, 11653-11661, doi:10.1021/jf1031668.
- 114. Domitrović, R.; Jakovac, H.; Tomac, J.; Šain, I. Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, *241*, 311-321, doi:https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.001.
- 115. Li, L.; Luo, W.; Qian, Y.; Zhu, W.; Qian, J.; Li, J.; Jin, Y.; Xu, X.; Liang, G. Luteolin protects against diabetic cardiomyopathy by inhibiting NF-κB-mediated inflammation and activating the Nrf2-mediated antioxidant responses. *Phytomedicine* **2019**, *59*, 152774, doi:10.1016/j.phymed.2018.11.034.
- Galvano, F.; La Fauci, L.; Lazzarino, G.; Fogliano, V.; Ritieni, A.; Ciappellano, S.;
   Battistini, N.C.; Tavazzi, B.; Galvano, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. *J Nutr Biochem* 2004, *15*, 2-11, doi:10.1016/j.jnutbio.2003.07.004.
- 117. Takashina, Y.; Manabe, A.; Tabuchi, Y.; Ikari, A. Cyanidin Increases the Expression of Mg(2+) Transport Carriers Mediated by the Activation of PPARα in Colonic Epithelial MCE301 Cells. *Nutrients* 2019, *11*, doi:10.3390/nu11030641.

- 118. Qian, P.; Yan, L.J.; Li, Y.Q.; Yang, H.T.; Duan, H.Y.; Wu, J.T.; Fan, X.W.; Wang, S.L. Cyanidin ameliorates cisplatin-induced cardiotoxicity via inhibition of ROSmediated apoptosis. *Exp Ther Med* **2018**, *15*, 1959-1965, doi:10.3892/etm.2017.5617.
- 119. Andres, S.; Pevny, S.; Ziegenhagen, R.; Bakhiya, N.; Schäfer, B.; Hirsch-Ernst, K.I.; Lampen, A. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Mol Nutr Food Res* 2018, 62, doi:10.1002/mnfr.201700447.
- Huang, C.; Chen, T.; Zhu, D.; Huang, Q. Enhanced Tumor Targeting and Radiotherapy by Quercetin Loaded Biomimetic Nanoparticles. *Frontiers in chemistry* 2020, 8, 225, doi:10.3389/fchem.2020.00225.
- 121. Das, S.S.; Hussain, A.; Verma, P.R.P.; Imam, S.S.; Altamimi, M.A.; Alshehri, S.; Singh, S.K. Recent advances in liposomal drug delivery system of Quercetin for cancer targeting: A mechanistic approach. *Current drug delivery* 2020, 10.2174/1567201817666200415112657,

doi:10.2174/1567201817666200415112657.

- 122. Colunga Biancatelli, R.M.L.; Berrill, M.; Catravas, J.D.; Marik, P.E. Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Frontiers in Immunology* 2020, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01451.
- Derosa, G.; Maffioli, P.; D'Angelo, A.; Di Pierro, F. A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Phytotherapy Research* 2020, *n/a*, doi:https://doi.org/10.1002/ptr.6887.
- Marunaka, Y.; Marunaka, R.; Sun, H.; Yamamoto, T.; Kanamura, N.; Inui, T.; Taruno, A. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules* 2017, 22, doi:10.3390/molecules22020209.
- Xu, D.; Hu, M.J.; Wang, Y.Q.; Cui, Y.L. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules* 2019, 24, doi:10.3390/molecules24061123.
- 126. Abarikwu, S.O.; Pant, A.B.; Farombi, E.O. Dietary antioxidant, quercetin, protects sertoli-germ cell coculture from atrazine-induced oxidative damage. *J Biochem Mol Toxicol* 2012, 26, 477-485, doi:10.1002/jbt.21449.
- 127. Magalingam, K.B.; Radhakrishnan, A.; Haleagrahara, N. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercetrin against 6-hydroxydopamine (6-

OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* **2016**, *29*, 30-39, doi:10.1177/0394632015613039.

- 128. Cialdella-Kam, L.; Nieman, D.C.; Sha, W.; Meaney, M.P.; Knab, A.M.; Shanely, R.A. Dose-response to 3 months of quercetin-containing supplements on metabolite and quercetin conjugate profile in adults. *Br J Nutr* **2013**, *109*, 1923-1933, doi:10.1017/S0007114512003972.
- 129. Middleton, E., Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* **2000**, *52*, 673-751.
- Terashima, M.; Kakuno, Y.; Kitano, N.; Matsuoka, C.; Murase, M.; Togo, N.; Watanabe, R.; Matsumura, S. Antioxidant activity of flavonoids evaluated with myoglobin method. *Plant Cell Rep* 2012, *31*, 291-298, doi:10.1007/s00299-011-1163-2.
- Al-Ishaq, R.K.; Abotaleb, M.; Kubatka, P.; Kajo, K.; Büsselberg, D. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules* 2019, 9, doi:10.3390/biom9090430.
- Castaldo, L.; Narváez, A.; Izzo, L.; Graziani, G.; Gaspari, A.; Di Minno, G.; Ritieni,
   A. Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules* 2019, 24, doi:10.3390/molecules24193626.
- Ishikawa, Y.; Kitamura, M. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 2000, *58*, 1078-1087, doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00265.x.
- 134. Bhargava, P.; Verma, V.K.; Malik, S.; Khan, S.I.; Bhatia, J.; Arya, D.S. Hesperidin regresses cardiac hypertrophy by virtue of PPAR-γ agonistic, anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant properties. *J Biochem Mol Toxicol* **2019**, *33*, e22283, doi:10.1002/jbt.22283.
- 135. Syska-Suminska, J. Inne leki w kardiologii. In *Jak stosować leki kardiologiczne w codziennej praktyce?*, Dluzniewski, M., Ed. Czelej: Lublin, 2010; Vol. 1.
- Edgell, C.J.; McDonald, C.C.; Graham, J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1983, 80, 3734-3737, doi:10.1073/pnas.80.12.3734.
- 137. Edgell, C.J.; Haizlip, J.E.; Bagnell, C.R.; Packenham, J.P.; Harrison, P.; Wilbourn,B.; Madden, V.J. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human

cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell Dev Biol* **1990**, *26*, 1167-1172, doi:10.1007/bf02623694.

- Lipovsek, M.; Bardy, C.; Cadwell, C.R.; Hadley, K.; Kobak, D.; Tripathy, S.J. Patchseq: Past, Present, and Future. *J Neurosci* 2021, 41, 937-946, doi:10.1523/jneurosci.1653-20.2020.
- Verkhratsky, A.; Parpura, V. History of electrophysiology and the patch clamp. *Methods Mol Biol* 2014, *1183*, 1-19, doi:10.1007/978-1-4939-1096-0\_1.
- Bednarczyk, P.; Wieckowski, M.R.; Broszkiewicz, M.; Skowronek, K.; Siemen, D.; Szewczyk, A. Putative Structural and Functional Coupling of the Mitochondrial BKCa Channel to the Respiratory Chain. *PLoS One* 2013, *8*, e68125, doi:10.1371/journal.pone.0068125.
- 141. Monteiro, J.P.; Martins, A.F.; Lúcio, M.; Reis, S.; Geraldes, C.F.; Oliveira, P.J.; Jurado, A.S. Interaction of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) with lipid membrane systems: a biophysical approach with relevance to mitochondrial uncoupling. *J Bioenerg Biomembr* 2011, 43, 287-298, doi:10.1007/s10863-011-9359-2.
- 142. Chu, Y.H.; Chen, S.Y.; Hsieh, Y.L.; Teng, Y.H.; Cheng, Y.J. Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF-alpha/cycloheximide-induced apoptosis. *Lasers Med Sci* 2018, *33*, 279-286, doi:10.1007/s10103-017-2364-x.
- 143. Bednarczyk, P.; Barker, G.D.; Halestrap, A.P. Determination of the rate of K(+) movement through potassium channels in isolated rat heart and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1777, 540-548, doi:10.1016/j.bbabio.2008.04.018.
- 144. Zhou, Y.; Lingle, C.J. Paxilline inhibits BK channels by an almost exclusively closed-channel block mechanism. J Gen Physiol 2014, 144, 415-440, doi:10.1085/jgp.201411259.
- 145. Zhou, Y.; Xia, X.M.; Lingle, C.J. The functionally relevant site for paxilline inhibition of BK channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020, *117*, 1021-1026, doi:10.1073/pnas.1912623117.
- 146. Chen, J.X.; Huang, X.Y.; Wang, P.; Lin, W.T.; Xu, W.X.; Zeng, M. Effects and mechanism of arachidonic acid against TNF-α induced apoptosis of endothelial cells. *Clinical hemorheology and microcirculation* **2020**, 10.3233/ch-200946, doi:10.3233/ch-200946.

- 147. Lee, S.B.; Lee, S.; Park, J.Y.; Lee, S.Y.; Kim, H.S. Induction of p53-Dependent Apoptosis by Prostaglandin A(2). *Biomolecules* 2020, 10, doi:10.3390/biom10030492.
- 148. Tonnus, W.; Meyer, C.; Paliege, A.; Belavgeni, A.; von Mässenhausen, A.; Bornstein, S.R.; Hugo, C.; Becker, J.U.; Linkermann, A. The pathological features of regulated necrosis. *J Pathol* 2019, 247, 697-707, doi:10.1002/path.5248.
- Schwab, A.; Fabian, A.; Hanley, P.J.; Stock, C. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev* 2012, 92, 1865-1913, doi:10.1152/physrev.00018.2011.
- Prosdocimi, E.; Checchetto, V.; Leanza, L. Targeting the Mitochondrial Potassium Channel Kv1.3 to Kill Cancer Cells: Drugs, Strategies, and New Perspectives. *SLAS Discov* 2019, 24, 882-892, doi:10.1177/2472555219864894.
- Hudson, B.C.; Cox, J.O.; Seashols-Williams, S.J.; Dawson Cruz, T. The effects of dithiothreitol (DTT) on fluorescent qPCR dyes. *J Forensic Sci* 2021, *66*, 700-708, doi:10.1111/1556-4029.14637.
- Ko, J.H.; Ibrahim, M.A.; Park, W.S.; Ko, E.A.; Kim, N.; Warda, M.; Lim, I.; Bang, H.; Han, J. Cloning of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel alpha-subunits in mouse cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, *389*, 74-79, doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.087.
- Cui, J.; Yang, H.; Lee, U.S. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009, 66, 852-875, doi:10.1007/s00018-008-8609-x.
- 154. O'Rourke, B.; Cortassa, S.; Aon, M.A. Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)* 2005, 20, 303-315, doi:10.1152/physiol.00020.2005.
- 155. Goswami, S.K.; Ponnalagu, D.; Hussain, A.T.; Shah, K.; Karekar, P.; Gururaja Rao, S.; Meredith, A.L.; Khan, M.; Singh, H. Expression and Activation of BKCa Channels in Mice Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury of Isolated Hearts by Modulating Mitochondrial Function. *Front Cardiovasc Med* 2018, *5*, 194, doi:10.3389/fcvm.2018.00194.
- Honrath, B.; Krabbendam, I.E.; Culmsee, C.; Dolga, A.M. Small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in the plasma membrane, mitochondria and the ER: Pharmacology and implications in neuronal diseases. *Neurochem Int* 2017, *109*, 13-23, doi:10.1016/j.neuint.2017.05.005.

- 157. Peng, K.; Hu, J.; Xiao, J.; Dan, G.; Yang, L.; Ye, F.; Zou, Z.; Cao, J.; Sai, Y. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel regulates mitochondrial dynamics to participate in neurodegeneration of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018, 1864, 1086-1103, doi:10.1016/j.bbadis.2018.01.013.
- Borchert, G.H.; Hlaváčková, M.; Kolář, F. Pharmacological activation of mitochondrial BK(Ca) channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 2013, 238, 233-241, doi:10.1177/1535370212474596.
- Checchetto, V.; Teardo, E.; Carraretto, L.; Leanza, L.; Szabo, I. Physiology of intracellular potassium channels: A unifying role as mediators of counterion fluxes? *Biochim Biophys Acta* 2016, 1857, 1258-1266, doi:10.1016/j.bbabio.2016.03.011.
- 160. Krabbendam, I.E.; Honrath, B.; Culmsee, C.; Dolga, A.M. Mitochondrial Ca(2+)-activated K(+) channels and their role in cell life and death pathways. *Cell Calcium* 2018, *69*, 101-111, doi:10.1016/j.ceca.2017.07.005.
- Wrzosek, A.; Augustynek, B.; Żochowska, M.; Szewczyk, A. Mitochondrial Potassium Channels as Druggable Targets. *Biomolecules* 2020, 10, doi:10.3390/biom10081200.
- 162. Wrzosek, A. The potassium channel opener NS1619 modulates calcium homeostasis in muscle cells by inhibiting SERCA. *Cell Calcium* 2014, 56, 14-24, doi:10.1016/j.ceca.2014.03.005.
- Kicinska, A.; Jarmuszkiewicz, W. Flavonoids and Mitochondria: Activation of Cytoprotective Pathways? *Molecules* 2020, 25, doi:10.3390/molecules25133060.
- 164. Duluc, L.; Soleti, R.; Clere, N.; Andriantsitohaina, R.; Simard, G. Mitochondria as potential targets of flavonoids: focus on adipocytes and endothelial cells. *Curr Med Chem* 2012, *19*, 4462-4474, doi:10.2174/092986712803251467.
- 165. Schroeter, H.; Heiss, C.; Spencer, J.P.; Keen, C.L.; Lupton, J.R.; Schmitz, H.H. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: current knowledge and future needs. *Mol Aspects Med* 2010, *31*, 546-557, doi:10.1016/j.mam.2010.09.008.
- 166. Testai, L.; Martelli, A.; Cristofaro, M.; Breschi, M.C.; Calderone, V. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J Pharm Pharmacol* 2013, 65, 750-756, doi:10.1111/jphp.12032.

- 167. Du, X.; Carvalho-de-Souza, J.L.; Wei, C.; Carrasquel-Ursulaez, W.; Lorenzo, Y.; Gonzalez, N.; Kubota, T.; Staisch, J.; Hain, T.; Petrossian, N., et al. Loss-of-function BK channel mutation causes impaired mitochondria and progressive cerebellar U. S. Α. ataxia. Proc. Natl. Acad. Sci. 2020. 117. 6023-6034, doi:10.1073/pnas.1920008117.
- Toczylowska-Maminska, R.; Olszewska, A.; Laskowski, M.; Bednarczyk, P.; Skowronek, K.; Szewczyk, A. Potassium channel in the mitochondria of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2014, *134*, 764-772, doi:10.1038/jid.2013.422.
- Gáspár, T.; Domoki, F.; Lenti, L.; Katakam, P.V.; Snipes, J.A.; Bari, F.; Busija, D.W. Immediate neuronal preconditioning by NS1619. *Brain Res* 2009, *1285*, 196-207, doi:10.1016/j.brainres.2009.06.008.
- Kicinska, A.; Kampa, R.P.; Daniluk, J.; Sek, A.; Jarmuszkiewicz, W.; Szewczyk, A.; Bednarczyk, P. Regulation of the Mitochondrial BKCa Channel by the Citrus Flavonoid Naringenin as a Potential Means of Preventing Cell Damage. *Molecules* 2020, 25, doi:10.3390/molecules25133010.
- 171. Skalska, J.; Piwonska, M.; Wyroba, E.; Surmacz, L.; Wieczorek, R.; Koszela-Piotrowska, I.; Zielinska, J.; Bednarczyk, P.; Dolowy, K.; Wilczynski, G.M., et al. A novel potassium channel in skeletal muscle mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 2008, 1777, 651-659, doi:10.1016/j.bbabio.2008.05.007.
- 172. Sato, T.; Saito, T.; Saegusa, N.; Nakaya, H. Mitochondrial Ca2+-activated K+ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 2005, *111*, 198-203, doi:10.1161/01.cir.0000151099.15706.b1.
- Gonzalez-Perez, V.; Lingle, C.J. Regulation of BK Channels by Beta and Gamma Subunits. *Annu Rev Physiol* 2019, *81*, 113-137, doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034038.
- 174. Stowe, D.F.; Yang, M.; Heisner, J.S.; Camara, A.K.S. Endogenous and Agonistinduced Opening of Mitochondrial Big Versus Small Ca2+-sensitive K+ Channels on Cardiac Cell and Mitochondrial Protection. *J Cardiovasc Pharmacol* 2017, 70, 314-328, doi:10.1097/fjc.000000000000524.
- 175. Bentzen, B.H.; Olesen, S.P.; Ronn, L.C.; Grunnet, M. BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Front Physiol* 2014, 5, 389, doi:10.3389/fphys.2014.00389.

- 176. Fusi, F.; Trezza, A.; Tramaglino, M.; Sgaragli, G.; Saponara, S.; Spiga, O. The beneficial health effects of flavonoids on the cardiovascular system: Focus on K(+) channels. *Pharmacol Res* 2020, *152*, 104625, doi:10.1016/j.phrs.2019.104625.
- 177. Naraki, K.; Rezaee, R.; Karimi, G. A review on the protective effects of naringenin against natural and chemical toxic agents. *Phytotherapy Research* 2021, *n/a*, doi:https://doi.org/10.1002/ptr.7071.
- 178. Shi, R.; Xu, J.W.; Xiao, Z.T.; Chen, R.F.; Zhang, Y.L.; Lin, J.B.; Cheng, K.L.; Wei, G.Y.; Li, P.B.; Zhou, W.L., et al. Naringin and Naringenin Relax Rat Tracheal Smooth by Regulating BK(Ca) Activation. *Journal of medicinal food* **2019**, *22*, 963-970, doi:10.1089/jmf.2018.4364.
- 179. Saponara, S.; Testai, L.; Iozzi, D.; Martinotti, E.; Martelli, A.; Chericoni, S.; Sgaragli, G.; Fusi, F.; Calderone, V. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca(2+)activated K+ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2006, *149*, 1013-1021, doi:10.1038/sj.bjp.0706951.
- 180. Protić, D.; Radunović, N.; Spremović-Rađenović, S.; Živanović, V.; Heinle, H.; Petrović, A.; Gojković-Bukarica, L. The Role of Potassium Channels in the Vasodilatation Induced by Resveratrol and Naringenin in Isolated Human Umbilical Vein. *Drug Dev Res* 2015, 76, 17-23, doi:10.1002/ddr.21236.
- 181. Pinho-Ribeiro, F.A.; Zarpelon, A.C.; Fattori, V.; Manchope, M.F.; Mizokami, S.S.; Casagrande, R.; Verri, W.A., Jr. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology* **2016**, *105*, 508-519, doi:10.1016/j.neuropharm.2016.02.019.
- 182. Hsu, H.T.; Tseng, Y.T.; Lo, Y.C.; Wu, S.N. Ability of naringenin, a bioflavonoid, to activate M-type potassium current in motor neuron-like cells and to increase BKCachannel activity in HEK293T cells transfected with alpha-hSlo subunit. *BMC Neurosci* 2014, 15, 135, doi:10.1186/s12868-014-0135-1.
- 183. George, K.; Thomas, N.S.; Malathi, R. Modulatory Effect of Selected Dietary Phytochemicals on Delayed Rectifier K(+) Current in Human Prostate Cancer Cells. *J Membr Biol* 2019, 252, 195-206, doi:10.1007/s00232-019-00070-9.
- 184. Scholz, E.P.; Zitron, E.; Kiesecker, C.; Luck, S.; Thomas, D.; Kathofer, S.; Kreye, V.A.; Katus, H.A.; Kiehn, J.; Schoels, W., et al. Inhibition of cardiac HERG channels by grapefruit flavonoid naringenin: implications for the influence of dietary compounds on cardiac repolarisation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005, 371, 516-525, doi:10.1007/s00210-005-1069-z.

- 185. Lin, C.; Ke, X.; Ranade, V.; Somberg, J. The additive effects of the active component of grapefruit juice (naringenin) and antiarrhythmic drugs on HERG inhibition. *Cardiology* 2008, *110*, 145-152, doi:10.1159/000111923.
- Testai, L.; Sestito, S.; Martelli, A.; Gorica, E.; Flori, L.; Calderone, V.; Rapposelli,
   S. Synthesis and pharmacological characterization of mitochondrial K(ATP) channel
   openers with enhanced mitochondriotropic effects. *Bioorganic chemistry* 2021, *107*, 104572, doi:10.1016/j.bioorg.2020.104572.
- 187. Nabavi, S.F.; Braidy, N.; Gortzi, O.; Sobarzo-Sanchez, E.; Daglia, M.; Skalicka-Woźniak, K.; Nabavi, S.M. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Res Bull* 2015, *119*, 1-11, doi:10.1016/j.brainresbull.2015.09.002.
- Cordaro, M.; Cuzzocrea, S.; Crupi, R. An Update of Palmitoylethanolamide and Luteolin Effects in Preclinical and Clinical Studies of Neuroinflammatory Events. *Antioxidants (Basel)* 2020, 9, doi:10.3390/antiox9030216.
- 189. Calderone, V.; Chericoni, S.; Martinelli, C.; Testai, L.; Nardi, A.; Morelli, I.; Breschi, M.C.; Martinotti, E. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004, 370, 290-298, doi:10.1007/s00210-004-0964-z.
- 190. Li, W.; Dong, M.; Guo, P.; Liu, Y.; Jing, Y.; Chen, R.; Zhang, M. Luteolin-induced coronary arterial relaxation involves activation of the myocyte voltage-gated K(+) channels and inward rectifier K(+) channels. *Life Sci* 2019, 221, 233-240, doi:10.1016/j.lfs.2019.02.028.
- 191. Yang, M.; Zhou, Y.; Wan, L.L.; Ye, J.Z.; Lu, H.L.; Huang, X.; Xu, W.X. Luteolin suppresses colonic smooth muscle motility via inhibiting L-type calcium channel currents in mice. *Gen Physiol Biophys* 2020, *39*, 49-58, doi:10.4149/gpb\_2019045.
- Sun, X.; Xu, B.; Xue, Y.; Li, H.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Kang, L.; Zhang, X.; Zhang, J.; Jia, Z., et al. Characterization and structure-activity relationship of natural flavonoids as hERG K(+) channel modulators. *Int Immunopharmacol* 2017, *45*, 187-193, doi:10.1016/j.intimp.2017.02.012.
- 193. Singh, D.K.; Dwivedi, V.P.; Singh, S.P.; Kumari, A.; Sharma, S.K.; Ranganathan, A.; Kaer, L.V.; Das, G. Luteolin-mediated Kv1.3 K+ channel inhibition augments BCG vaccine efficacy against tuberculosis by promoting central memory T cell responses in mice. *PLoS Pathog* 2020, *16*, e1008887, doi:10.1371/journal.ppat.1008887.

- 194. Seo, A.; Jackson, J.L.; Schuster, J.V.; Vardar-Ulu, D. Using UV-absorbance of intrinsic dithiothreitol (DTT) during RP-HPLC as a measure of experimental redox potential in vitro. *Anal Bioanal Chem* 2013, 405, 6379-6384, doi:10.1007/s00216-013-7063-2.
- Liu, T.H.; Yaghmour, M.A.; Lee, M.H.; Gradziel, T.M.; Leveau, J.H.J.; Bostock, R.M. An roGFP2-Based Bacterial Bioreporter for Redox Sensing of Plant Surfaces. *Phytopathology* 2020, *110*, 297-308, doi:10.1094/phyto-07-19-0237-r.
- 196. Rotko, D.; Kunz, W.S.; Szewczyk, A.; Kulawiak, B. Signaling pathways targeting mitochondrial potassium channels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2020, *125*, 105792, doi:https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105792.
- Olschewski, A.; Weir, E.K. Redox regulation of ion channels in the pulmonary circulation. *Antioxidants & redox signaling* 2015, 22, 465-485, doi:10.1089/ars.2014.5899.
- 198. Messias Sandes, J.; Nascimento Moura, D.M.; Divina da Silva Santiago, M.; Barbosa de Lima, G.; Cabral Filho, P.E.; da Cunha Gonçalves de Albuquerque, S.; de Paiva Cavalcanti, M.; Fontes, A.; Bressan Queiroz Figueiredo, R.C. The effects of endoplasmic reticulum stressors, tunicamycin and dithiothreitol on Trypanosoma cruzi. *Exp Cell Res* 2019, *383*, 111560, doi:10.1016/j.yexcr.2019.111560.
- Ługowski, M.; Saczko, J.; Kulbacka, J.; Banaś, T. [Reactive oxygen and nitrogen species]. *Pol Merkur Lekarski* 2011, *31*, 313-317.
- Larosa, V.; Remacle, C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. Bioscience reports 2018, 38, doi:10.1042/bsr20171492.
- Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014, 94, 909-950, doi:10.1152/physrev.00026.2013.
- 202. Suantawee, T.; Elazab, S.T.; Hsu, W.H.; Yao, S.; Cheng, H.; Adisakwattana, S. Cyanidin Stimulates Insulin Secretion and Pancreatic β-Cell Gene Expression through Activation of 1-type Voltage-Dependent Ca(2+) Channels. *Nutrients* 2017, 9, doi:10.3390/nu9080814.
- 203. Perveen, S.; Yang, J.S.; Ha, T.J.; Yoon, S.H. Cyanidin-3-glucoside Inhibits ATPinduced Intracellular Free Ca(2+) Concentration, ROS Formation and Mitochondrial Depolarization in PC12 Cells. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 2014, 18, 297-305, doi:10.4196/kjpp.2014.18.4.297.

- 204. Da-Costa-Rocha, I.; Bonnlaender, B.; Sievers, H.; Pischel, I.; Heinrich, M. Hibiscus sabdariffa L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem* 2014, *165*, 424-443, doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.002.
- 205. Perez-Cano, F.J.; Castell, M. Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients* **2016**, *8*, doi:10.3390/nu8100659.
- 206. Dower, J.I.; Geleijnse, J.M.; Gijsbers, L.; Schalkwijk, C.; Kromhout, D.; Hollman, P.C. Supplementation of the Pure Flavonoids Epicatechin and Quercetin Affects Some Biomarkers of Endothelial Dysfunction and Inflammation in (Pre)Hypertensive Adults: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *J Nutr* 2015, *145*, 1459-1463, doi:10.3945/jn.115.211888.
- 207. Heřmánková, E.; Zatloukalová, M.; Biler, M.; Sokolová, R.; Bancířová, M.; Tzakos, A.G.; Křen, V.; Kuzma, M.; Trouillas, P.; Vacek, J. Redox properties of individual quercetin moieties. *Free Radic Biol Med* 2019, 143, 240-251, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.001.
- 208. Kooshyar, M.M.; Mozafari, P.M.; Amirchaghmaghi, M.; Pakfetrat, A.; Karoos, P.; Mohasel, M.R.; Orafai, H.; Azarian, A.A. A Randomized Placebo- Controlled Double Blind Clinical Trial of Quercetin in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis. *J Clin Diagn Res* 2017, *11*, ZC46-ZC50, doi:10.7860/JCDR/2017/23975.9571.
- 209. McCann, S.E.; Ambrosone, C.B.; Moysich, K.B.; Brasure, J.; Marshall, J.R.; Freudenheim, J.L.; Wilkinson, G.S.; Graham, S. Intakes of selected nutrients, foods, and phytochemicals and prostate cancer risk in western New York. *Nutr Cancer* 2005, 53, 33-41, doi:10.1207/s15327914nc5301\_4.
- 210. Pratheeshkumar, P.; Budhraja, A.; Son, Y.O.; Wang, X.; Zhang, Z.; Ding, S.; Wang, L.; Hitron, A.; Lee, J.C.; Xu, M., et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PLoS One* 2012, *7*, e47516, doi:10.1371/journal.pone.0047516.
- Kedhari Sundaram, M.; Hussain, A.; Haque, S.; Raina, R.; Afroze, N. Quercetin modifies 5'CpG promoter methylation and reactivates various tumor suppressor genes by modulating epigenetic marks in human cervical cancer cells. *J Cell Biochem* 2019, *120*, 18357-18369, doi:10.1002/jcb.29147.
- 212. Ferenczyova, K.; Kalocayova, B.; Kindernay, L.; Jelemensky, M.; Balis, P.; Berenyiova, A.; Zemancikova, A.; Farkasova, V.; Sykora, M.; Tothova, L., et al.

Quercetin Exerts Age-Dependent Beneficial Effects on Blood Pressure and Vascular Function, But Is Inefficient in Preventing Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25010187.

- 213. Huang, H.; Liao, D.; Dong, Y.; Pu, R. Effect of quercetin supplementation on plasma lipid profiles, blood pressure, and glucose levels: a systematic review and metaanalysis. *Nutr Rev* 2020, 78, 615-626, doi:10.1093/nutrit/nuz071.
- Kampa, R.P.; 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.
- 215. Cogolludo, A.; Frazziano, G.; Briones, A.M.; Cobeño, L.; Moreno, L.; Lodi, F.; Salaices, M.; Tamargo, J.; Perez-Vizcaino, F. The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H2O2. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res* 2007, 73, 424-431, doi:10.1016/j.cardiores.2006.09.008.
- 216. Kim, Y.; Kim, W.-J.; Cha, E.-J. Quercetin-induced Growth Inhibition in Human Bladder Cancer Cells Is Associated with an Increase in Ca-activated K Channels. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 2011, 15, 279-283, doi:10.4196/kjpp.2011.15.5.279.
- 217. Balderas, E.; Torres, N.S.; Rosa-Garrido, M.; Chaudhuri, D.; Toro, L.; Stefani, E.; Olcese, R. MitoBKCa channel is functionally associated with its regulatory betal subunit in cardiac mitochondria. *J Physiol* 2019, *597*, 3817-3832, doi:10.1113/JP277769.
- 218. Li, T.; Zhang, Y.; Tian, J.; Yang, L.; Wang, J. Ginkgo biloba Pretreatment Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury via mitoBKCa. *The American journal of Chinese medicine* 2019, 47, 1057-1073, doi:10.1142/S0192415X1950054X.
- Gribkoff, V.K.; Lum-Ragan, J.T.; Boissard, C.G.; Post-Munson, D.J.; Meanwell, N.A.; Starrett, J.E., Jr.; Kozlowski, E.S.; Romine, J.L.; Trojnacki, J.T.; McKay, M.C., et al. Effects of channel modulators on cloned large-conductance calciumactivated potassium channels. *Mol Pharmacol* 1996, *50*, 206-217.
- 220. Gong, G.; Guan, Y.Y.; Zhang, Z.L.; Rahman, K.; Wang, S.J.; Zhou, S.; Luan, X.;
  Zhang, H. Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. *Biomed Pharmacother* 2020, *128*, 110301, doi:10.1016/j.biopha.2020.110301.

- Gao, L.; Yao, R.; Liu, Y.; Wang, Z.; Huang, Z.; Du, B.; Zhang, D.; Wu, L.; Xiao, L.;
  Zhang, Y. Isorhamnetin protects against cardiac hypertrophy through blocking PI3KAKT pathway. *Mol Cell Biochem* 2017, 429, 167-177, doi:10.1007/s11010-0172944-x.
- 222. Ksiazek, A.; Ladno, W.; Szulczyk, B.; Grzelka, K.; Szulczyk, P. Properties of BKtype Ca(+) (+)-dependent K(+) channel currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons in rats of different ages. *Front Cell Neurosci* **2013**, *7*, 185, doi:10.3389/fncel.2013.00185.
- 223. Yusifov, T.; Savalli, N.; Gandhi, C.S.; Ottolia, M.; Olcese, R. The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105, 376-381, doi:10.1073/pnas.0705261105.
- 224. Szewczyk, A.; Bednarczyk, P.; Jędraszko, J.; Kampa, R.P.; Koprowski, P.; Krajewska, M.; Kucman, S.; Kulawiak, B.; Laskowski, M.; Rotko, D., et al. Mitochondrial potassium channels - an overview. *Postepy Biochem* 2018, 64, 196-212, doi:10.18388/pb.2018\_132.
- 225. Walewska, A.; Kulawiak, B.; Szewczyk, A.; Koprowski, P. Mechanosensitivity of mitochondrial large-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2018, 1859, 797-805, doi:10.1016/j.bbabio.2018.05.006.
- 226. Checchetto, V.; Azzolini, M.; Peruzzo, R.; Capitanio, P.; Leanza, L. Mitochondrial potassium channels in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 500, 51-58, doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.095.
- 227. Szewczyk, A.; Jarmuszkiewicz, W.; Kunz, W.S. Mitochondrial potassium channels. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 134-143, doi:10.1002/iub.155.
- Beavis, A.D.; Lu, Y.; Garlid, K.D. On the regulation of K+ uniport in intact mitochondria by adenine nucleotides and nucleotide analogs. *Journal of Biological Chemistry* 1993, 268, 997-1004, doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54032-1.
- 229. Heinen, A.; Camara, A.K.S.; Aldakkak, M.; Rhodes, S.S.; Riess, M.L.; Stowe, D.F. Mitochondrial Ca2+-induced K+ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2007, 292, C148-C156, doi:10.1152/ajpcell.00215.2006.
- Korshunov, S.S.; Skulachev, V.P.; Starkov, A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* 1997, *416*, 15-18, doi:https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9.

- Leanza, L.; Venturini, E.; Kadow, S.; Carpinteiro, A.; Gulbins, E.; Becker, K.A. Targeting a mitochondrial potassium channel to fight cancer. *Cell Calcium* 2015, *58*, 131-138, doi:https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.006.
- 232. Laskowski, M.; Kicinska, A.; Szewczyk, A.; Jarmuszkiewicz, W. Mitochondrial large-conductance potassium channel from Dictyostelium discoideum. *Int J Biochem Cell Biol* 2015, 60, 167-175, doi:10.1016/j.biocel.2015.01.006.
- Bednarczyk, P.; Koziel, A.; Jarmuszkiewicz, W.; Szewczyk, A. Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel in mitochondria of endothelial EA.hy926 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013, 304, H1415-1427, doi:10.1152/ajpheart.00976.2012.
- 234. To, M.S.; Aromataris, E.C.; Castro, J.; Roberts, M.L.; Barritt, G.J.; Rychkov, G.Y. Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca(2+) current in liver cells. *Arch Biochem Biophys* 2010, 495, 152-158, doi:10.1016/j.abb.2010.01.004.
- 235. Sakamuru, S.; Attene-Ramos, M.S.; Xia, M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2016, 1473, 17-22, doi:10.1007/978-1-4939-6346-1\_2.
- Stompor, M.; Uram, Ł.; Podgórski, R. In Vitro Effect of 8-Prenylnaringenin and Naringenin on Fibroblasts and Glioblastoma Cells-Cellular Accumulation and Cytotoxicity. *Molecules* 2017, 22, doi:10.3390/molecules22071092.
- 237. de Oliveira, M.R.; Nabavi, S.M.; Braidy, N.; Setzer, W.N.; Ahmed, T.; Nabavi, S.F.
  Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotechnol Adv* 2016, *34*, 532-549, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.12.014.
- Kulawiak, B.; Szewczyk, A. Glutamate-induced cell death in HT22 mouse hippocampal cells is attenuated by paxilline, a BK channel inhibitor. *Mitochondrion* 2012, *12*, 169-172, doi:10.1016/j.mito.2011.12.001.
- 239. Miura, T.; Miki, T. ATP-sensitive K+ channel openers: old drugs with new clinical benefits for the heart. *Current vascular pharmacology* 2003, *1*, 251-258, doi:10.2174/1570161033476646.
- 240. Sunaga, D.; Tanno, M.; Kuno, A.; Ishikawa, S.; Ogasawara, M.; Yano, T.; Miki, T.; Miura, T. Accelerated recovery of mitochondrial membrane potential by GSK-3β inactivation affords cardiomyocytes protection from oxidant-induced necrosis. *PLoS One* **2014**, *9*, e112529, doi:10.1371/journal.pone.0112529.

- 241. Murphy, E.; Steenbergen, C. Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol* **2007**, *69*, 51-67, doi:10.1146/annurev.physiol.69.031905.163645.
- Rodriguez, L.G.; Wu, X.; Guan, J.L. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* 2005, 294, 23-29, doi:10.1385/1-59259-860-9:023.
- 243. Rezabakhsh, A.; Rahbarghazi, R.; Malekinejad, H.; Fathi, F.; Montaseri, A.; Garjani,
  A. Quercetin alleviates high glucose-induced damage on human umbilical vein endothelial cells by promoting autophagy. *Phytomedicine* 2019, *56*, 183-193, doi:10.1016/j.phymed.2018.11.008.
- 244. Lan, H.; Hong, W.; Fan, P.; Qian, D.; Zhu, J.; Bai, B. Quercetin Inhibits Cell Migration and Invasion in Human Osteosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 2017, 43, 553-567, doi:10.1159/000480528.
- 245. Liu, Y.; Tang, Z.G.; Lin, Y.; Qu, X.G.; Lv, W.; Wang, G.B.; Li, C.L. Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. *Biomed Pharmacother* 2017, 92, 33-38, doi:10.1016/j.biopha.2017.05.044.
- 246. Chen, Y.Y.; Chang, Y.M.; Wang, K.Y.; Chen, P.N.; Hseu, Y.C.; Chen, K.M.; Yeh, K.T.; Chen, C.J.; Hsu, L.S. Naringenin inhibited migration and invasion of glioblastoma cells through multiple mechanisms. *Environ Toxicol* 2019, *34*, 233-239, doi:10.1002/tox.22677.
- Zhao, Z.; Jin, G.; Ge, Y.; Guo, Z. Naringenin inhibits migration of breast cancer cells via inflammatory and apoptosis cell signaling pathways. *Inflammopharmacology* 2019, 27, 1021-1036, doi:10.1007/s10787-018-00556-3.
- 248. Tan, Z.; Sun, Y.; Liu, M.; Xia, L.; Cao, F.; Qi, Y.; Song, Y. Naringenin Inhibits Cell Migration, Invasion, and Tumor Growth by Regulating circFOXM1/miR-3619-5p/SPAG5 Axis in Lung Cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2020, 10.1089/cbr.2019.3520, doi:10.1089/cbr.2019.3520.
- 249. Seo, Y.; Ryu, K.; Park, J.; Jeon, D.K.; Jo, S.; Lee, H.K.; Namkung, W. Inhibition of ANO1 by luteolin and its cytotoxicity in human prostate cancer PC-3 cells. *PLoS One* 2017, *12*, e0174935, doi:10.1371/journal.pone.0174935.
- 250. Wang, Q.; Wang, H.; Jia, Y.; Ding, H.; Zhang, L.; Pan, H. Luteolin reduces migration of human glioblastoma cell lines via inhibition of the p-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncol Lett* **2017**, *14*, 3545-3551, doi:10.3892/ol.2017.6643.
- 251. Wang, H.; Luo, Y.; Qiao, T.; Wu, Z.; Huang, Z. Luteolin sensitizes the antitumor effect of cisplatin in drug-resistant ovarian cancer via induction of apoptosis and

inhibition of cell migration and invasion. *J Ovarian Res* 2018, *11*, 93, doi:10.1186/s13048-018-0468-y.

- Liu, X.; Zhang, D.; Hao, Y.; Liu, Q.; Wu, Y.; Liu, X.; Luo, J.; Zhou, T.; Sun, B.; Luo, X., et al. Cyanidin Curtails Renal Cell Carcinoma Tumorigenesis. *Cell Physiol Biochem* 2018, 46, 2517-2531, doi:10.1159/000489658.
- 253. Silva, H.B.; Rodrigues, D.C.; Andrade, R.; Teixeira, G.; Stelling, M.P.; Ponte, C.G.; Nascimento, J.H.M.; Campos de Carvalho, A.C.; Medei, E. Expression of potassium channels is relevant for cell survival and migration in a murine bone marrow stromal cell line. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 18086-18097, doi:10.1002/jcp.28441.
- 254. Rosa, P.; Sforna, L.; Carlomagno, S.; Mangino, G.; Miscusi, M.; Pessia, M.; Franciolini, F.; Calogero, A.; Catacuzzeno, L. Overexpression of Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Human Glioblastoma Stem-Like Cells and Their Role in Cell Migration. *J Cell Physiol* 2017, 232, 2478-2488, doi:10.1002/jcp.25592.
- 255. Bessou, M.; Lopez, J.; Gadet, R.; Deygas, M.; Popgeorgiev, N.; Poncet, D.; Nougarede, A.; Billard, P.; Mikaelian, I.; Gonzalo, P., et al. The apoptosis inhibitor Bcl-xL controls breast cancer cell migration through mitochondria-dependent reactive oxygen species production. *Oncogene* **2020**, *39*, 3056-3074, doi:10.1038/s41388-020-1212-9.
- 256. Suresh, K.; Servinsky, L.; Jiang, H.; Bigham, Z.; Zaldumbide, J.; Huetsch, J.C.; Kliment, C.; Acoba, M.G.; Kirsch, B.J.; Claypool, S.M., et al. Regulation of mitochondrial fragmentation in microvascular endothelial cells isolated from the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019, *317*, L639-L652, doi:10.1152/ajplung.00396.2018.
- 257. Bachmann, M.; Rossa, A.; Antoniazzi, G.; Biasutto, L.; Carrer, A.; Campagnaro, M.; Leanza, L.; Gonczi, M.; Csernoch, L.; Paradisi, C., et al. Synthesis and cellular effects of a mitochondria-targeted inhibitor of the two-pore potassium channel TASK-3. *Pharmacol Res* **2020**, 10.1016/j.phrs.2020.105326, 105326, doi:10.1016/j.phrs.2020.105326.
- 258. Cassidy, A.; Minihane, A.M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr* **2017**, *105*, 10-22, doi:10.3945/ajcn.116.136051.
- D'Andrea, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 2015, *106*, 256-271, doi:10.1016/j.fitote.2015.09.018.

- Bai, Y.; Peng, W.; Yang, C.; Zou, W.; Liu, M.; Wu, H.; Fan, L.; Li, P.; Zeng, X.; Su, W. Pharmacokinetics and Metabolism of Naringin and Active Metabolite Naringenin in Rats, Dogs, Humans, and the Differences Between Species. *Front Pharmacol* 2020, *11*, 364, doi:10.3389/fphar.2020.00364.
- 261. Fang, J. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition* **2015**, *31*, 1301-1306, doi:10.1016/j.nut.2015.04.015.
- 262. Hayasaka, N.; Shimizu, N.; Komoda, T.; Mohri, S.; Tsushida, T.; Eitsuka, T.; Miyazawa, T.; Nakagawa, K. Absorption and Metabolism of Luteolin in Rats and Humans in Relation to in Vitro Anti-inflammatory Effects. *J Agric Food Chem* 2018, 66, 11320-11329, doi:10.1021/acs.jafc.8b03273.
- Sohn, E.J.; Kim, J.M.; Kang, S.H.; Kwon, J.; An, H.J.; Sung, J.S.; Cho, K.A.; Jang, I.S.; Choi, J.S. Restoring Effects of Natural Anti-Oxidant Quercetin on Cellular Senescent Human Dermal Fibroblasts. *The American journal of Chinese medicine* 2018, *46*, 853-873, doi:10.1142/S0192415X18500453.
- 264. Kıyga, E.; Şengelen, A.; Adıgüzel, Z.; Önay Uçar, E. Investigation of the role of quercetin as a heat shock protein inhibitor on apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Biol Rep* 2020, 47, 4957-4967, doi:10.1007/s11033-020-05641-x.
- Gumushan Aktas, H.; Akgun, T. Naringenin inhibits prostate cancer metastasis by blocking voltage-gated sodium channels. *Biomed Pharmacother* 2018, *106*, 770-775, doi:10.1016/j.biopha.2018.07.008.
- 266. Rebello, C.J.; Greenway, F.L.; Lau, F.H.; Lin, Y.; Stephens, J.M.; Johnson, W.D.; Coulter, A.A. Naringenin Promotes Thermogenic Gene Expression in Human White Adipose Tissue. *Obesity (Silver Spring)* **2019**, *27*, 103-111, doi:10.1002/oby.22352.
- 267. Dall'Asta, M.; Derlindati, E.; Curella, V.; Mena, P.; Calani, L.; Ray, S.; Zavaroni, I.; Brighenti, F.; Del Rio, D. Effects of naringenin and its phase II metabolites on in vitro human macrophage gene expression. *International journal of food sciences and nutrition* 2013, 64, 843-849, doi:10.3109/09637486.2013.804039.