

Р.М. Лазаренко, А.П. Кондрацький, Н.Х. Погорела, Я.М. Шуба

Зміни АТФ-залежності об'ємчутливого хлорного струму при нейроендокринному диференціюванні клітин лінії LNCaP карциноми простати людини

С помощью метода patch-clamp была произведена сравнительная характеристика АТФ-зависимости объемчувствительного хлорного тока ($I_{Cl,swell}$) в нормальных и нейроэндокринно дифференцированных клетках линии LNCaP карциномы простаты человека. Нейроэндокринная дифференциация клеток достигалась путем их длительной инкубации с дибутирил-цАМФ. Для устранения эффекта эндогенно синтезированного АТФ использовались метаболические ингибиторы. Полное отсутствие АТФ в цитозоле не препятствовало активации $I_{Cl,swell}$ в исследуемых клетках в ответ на индуцированное гипотоничностью набухание, а 5 ммоль/л MgАТФ оказывал потенцирующее воздействие на амплитуду тока в клетках обеих групп. Существенные изменения наблюдались в АТФ-зависимости инактивации $I_{Cl,swell}$ при нейроэндокринном дифференцировании клеток. Инактивационные характеристики $I_{Cl,swell}$ тока в нейроэндокринно дифференцированных клетках линии LNCaP практически не зависели от наличия АТФ в цитозоле, в то время как в клетках рака простаты такая зависимость была значительной. На основании анализа полученных результатов, а также исходя из значимости $I_{Cl,swell}$ для функционирования клеток, предполагается, что снижение АТФ-зависимости тока при нейроэндокринной дифференциации открывает дополнительные возможности для более стабильной жизнедеятельности клеток в критических метаболических условиях. Этот факт также говорит о предполагаемой, к сожалению, меньшей эффективности противораковой терапии по отношению к нейроэндокринно дифференцированным клеткам простаты.

ВСТУП

АТФ є винятково важливим енергетичним субстратом для всіх живих клітин. Особливо високу потребу в ньому мають ракові клітини, котрі швидко проліферують. Недавні дослідження показали, що зниження концентрації АТФ в ракових клітинах призводить до збільшення ефективності протипухлинної терапії – регресії новоутворень, а іноді – до повного одужання від раку [8, 18].

За звичайних умов у цитозолі клітини знаходиться близько 5 ммоль/л MgАТФ [13], і коли цей вміст з якихось причин знижується – клітина спочатку втрачає здатність до проліферації, а подальше зниження АТФ (як правило менше ніж 15 %

від норми) стає несумісним з її стабільною життєдіяльністю. Існують також відомості про те, що мінімальний вміст АТФ потрібен клітині для нормального перебігу апоптозу. За повної ж відсутності замість апоптичної відбувається некротична загибель клітин [20].

Крім безлічі інших своїх ефектів, внутрішньоклітинний АТФ позитивно модулює об'ємрегульовані аніонні канали в різних типах клітин [21]. Ці канали активуються у відповідь на набрякання клітини, що може мати різне походження, і, пропускаючи хлорний струм ($I_{Cl,swell}$), сприяють регуляторному відновленню її об'єму [21]. Стандартним експериментальним прийомом активації цих каналів є гіпоосмотичне набрякання.

© Р.М. Лазаренко, А.П. Кондрацький, Н.Х. Погорела, Я.М. Шуба

Недавно було показано, що збільшення амплітуди $I_{Cl,swell}$ є однією з ознак підвищення апоптотичної резистивності клітин, пов'язаної, зокрема, з надекспресією протиапоптотичного білка Bcl-2 [16, 22], яка характеризує перехід до пізньої, андроген-незалежної стадії раку простати (РП), для якої досі немає дієвої терапії [16]. Важливу роль у переході до андрогеннезалежної стадії РП відіграють також злякисні нейроендокринні клітини [1, 3–5, 10–12, 25], що теж відзначаються надзвичайною стійкістю до апоптозу, яка в даному разі зумовлюється Bcl-2-незалежними механізмами. Популяція повністю диференційованих, нейроноподібних нейроендокринних клітин дисперсно наявна як у нормальній простаті, так і в злякисно переродженій, але в останній – вона значно численніша. Справляючи стимулювальний паракринний вплив на сусідні карциномні клітини, нейроендокринні зумовлюють особливу агресивність раку простати.

Слід зазначити, що $I_{Cl,swell}$ при нейроендокринному диференціюванні клітин РП, так само як і у разі надекспресії Bcl-2, підвищується [16]. Нами було показано, що таке підвищення, принаймні частково, відбувається як внаслідок зменшення інгібіторного впливу на об'ємурегульовані аніонні канали з боку депо-керованого входу кальцію через плазматичну мембрану, так і внаслідок збільшення експресії CIC-3-білка, котрий за нашими даними, очевидно, бере участь у формуванні чи регуляції ендogenous об'ємурегульованого аніонного каналу в клітинах лінії LNCaP карциноми простати [14]. Таким чином, літературні дані свідчать про те, що клітини РП незалежно від механізму, за яким вони набувають андрогеннечутливості та апоптотичної резистивності, характеризуються підвищенням $I_{Cl,swell}$ і більш ефективним регуляторним відновленням об'єму. Однак, чи є це причиною, чи наслідком апоптотичної резистивності і яким чином $I_{Cl,swell}$

та краща здатність до регуляторного відновлення об'єму можуть їй сприяти ще належить з'ясувати.

Відомо, що неспецифічні блокатори об'ємурегульованих аніонних каналів спричинюють також призупинку проліферації клітин та неоваскуляризації пухлин [7]. Очевидно, що механізми регуляції клітинного об'єму, котрі реалізуються внаслідок роботи об'ємурегульованих аніонних каналів, тісно пов'язані з функціональним станом клітини і є важливими елементами клітинної сигналізації.

Отже, зважаючи на певний зв'язок об'ємурегульованих аніонних каналів з канцерогенезом простати і переходом пухлини до андрогеннечутливості, на можливості лікування раку за допомогою вилучення АТФ з ракових клітин, а також на свідчення про роль АТФ у функціонуванні об'ємурегульованих аніонних каналів загалом [21] і в клітинах LNCaP, зокрема, ми поставили собі за мету дослідити зміни АТФ-залежності $I_{Cl,swell}$ при нейроендокринному диференціюванні клітин карциноми простати.

МЕТОДИКА

Клітини лінії LNCaP культивували в середовищі RPMI 1640 ("Biowhittaker", Франція) з додаванням 5 ммоль/л L-глутаміну ("Sigma", США), 10%-ї ембріональної бичачої сироватки ("Poly-Labo", Франція), 50000 од/л пеніциліну та 50 мг/л стрептоміцину. Клітини вирощували у флаконах об'ємом 50 мл при 37 °C в інкубаторі зі зволоженою атмосферою: 95 % повітря та 5 % CO₂. Для електрофізіологічних досліджень клітини висаджували в чашки Петрі, покриті поліорнітином ("Sigma", США), і використовували протягом 4–6 діб.

Для з'ясування АТФ-чутливості каналів плазматичної мембрани ендogenous продукцію АТФ ми виключали метаболічними інгібіторами (мкмоль/л): олігоміцину (макролідного антибіотика, блокатора мітохонд-

ріальної АТФази та переносу фосфорильної групи [17]) – 40, йодоацетату (інгібітора ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, відповідального за один із найважливіших етапів гліколізу [13]) – 5, ротенону (інгібітора електронного транспорту в мітохондріях [24]) – 20. Перед експериментом клітини інкубували протягом 25–35 хв у розчині Рінгера з додаванням 100 нмоль/л ротенону та 5 ммоль/л 2-деоксиглюкози (мембранопроникного інгібітора гліколізу [6]), а під час самого експерименту діалізували штучним внутрішньоклітинним розчином з блокаторами енергетичного метаболізму. Для додавання метаболічних інгібіторів використовували розчини, розведені в DMSO, кінцева концентрація якого становила 0,15 %.

Мембранні струми в клітинах LNCaP реєстрували з використанням методики “patch-clamp” у конфігурації “ціла клітина”. Інтегральні струми вимірювали у відповідь на стимуляцію клітини імпульсами потенціалу, що склалися з плато потенціалу при +100 мВ, плато при -100 мВ та лінійно-змінного відрізка між ними. Струм перед індукцією набрякання вважали за базовий.

Зовнішньоклітинні розчини готували на базі тетраетиламонію (ТЕА), як основного катіона, для того, щоб надійно заблокувати потенціалзалежний ТЕА-чутливий калієвий струм, властивий клітинам лінії LNCaP [23]. Осмотичність ізо- та гіпотонічних розчинів вимірювали за допомогою кріоскопічного осмометра «Osmomat-030» («Gono-

tes», Великобританія). Вона становила 310 та 190 мОсм/л відповідно. Реєструвальну піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): КОН – 100, КСl – 40, MgCl₂ – 1, HEPES – 10, EGTA – 8, Mg-АТФ – 5, СаCl₂ – 2,6; рН 7,2 (доводили L-глутаміною кислотою). Щоб запобігти спонтанному набряканню клітини, внутрішній розчин був гіпотонічним відносно зовнішнього (290 мОсм/л). За такого складу розчину концентрація вільного кальцію в клітині підтримувалася на рівні $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Опір реєструвальної піпетки перебував у межах 3–5 МОм.

Зміни зовнішнього розчину проводили за допомогою багатоканальної мікропіпетки зі спільним витком, який розташовували дуже близько до клітини. Повну заміну зовнішнього розчину робили не більше ніж за 1 с. Під час експерименту клітини знаходилися в проточному зовнішньоклітинному розчині, щоб уникнути артефактів, пов'язаних з переходом від статичного розчину до проточного. Усі реактиви, які використовували для приготування розчинів були від фірми “Sigma” (США). Експерименти проводили з використанням підсилювача “Dagan” (США) та персонального комп'ютера.

Для реєстрації струмів використовували програмне забезпечення pCLAMP-8 („Axon Instruments”, США), а для обробки та аналізу результатів – Origin-7 („Microcal”, США). Результати оброблено за допомогою критерію t Стьюдента. Різницю з P<0,05 вважали достовірною.

Склад ізо- та гіпотонічних зовнішніх розчинів (ммоль/л):

Складові розчину	Нормальний розчин	Ізотонічний розчин з тетраетиламонієм	Гіпотонічний розчин з тетраетиламонієм
NaCl	140	-	-
KCl	5	-	-
CaCl ₂	2	2	2
MgCl ₂	2	2	2
Глюкоза	5	10	10
HEPES	10	10	10
Хлорид тетраетиламонію	-	145	80

РЕЗУЛЬТАТИ

Порівняння АТФ-залежності амплітуди $I_{Cl,swell}$ у контрольних і нейроендокринно диференційованих клітинах лінії LNCaP. Для визначення амплітуди мембранного струму при різних потенціалах з можливістю одночасної реєстрації його вольт-амперної характеристики ми використовували протокол стимуляції клітин імпульсами потенціалу, що включав два постійних рівня ± 100 мВ, з'єднаних лінійно-змінною ділянкою (рис. 1,б). Потенціал реверсії струму, що розвивався за гіпотонічних умов як у контрольних, так і в нейроендокринних клітинах лінії LNCaP, незалежно від того, були вони піддані дії метаболічних інгібіторів, чи екзогенного внутрішньоклітинного АТФ, перебував поблизу розрахункового рівноважного потенціалу для іонів хлору (-16 мВ для наших експериментальних умов; див. рис. 1,а). Це свідчить про те, що у всіх випадках жодних інших струмів, крім $I_{Cl,swell}$, не розвивалося. До-

датковим доказом того, що $I_{Cl,swell}$ був єдиним струмом, який активувався у відповідь на гіпотонічно-індуковане набрякання клітин, був характерний вигляд кривих вольт-амперної залежності, що в обох типах клітин незалежно від внутрішньоклітинного вмісту АТФ виявляв властиве для $I_{Cl,swell}$ помірне зовнішнє випрямлення (див. рис. 1,а).

Усереднені значення густини $I_{Cl,swell}$ вказують на достовірне збільшення максимального струму (на початку фази деполаризації до $+100$ мВ, коли інактиваційний вплив ще не виявляється (див. рис. 1,б) в нейроендокринних клітинах лінії LNCaP порівняно з контролем. Причому повна відсутність внутрішньоклітинного АТФ, посилена дією метаболічних інгібіторів, не перешкоджала розвитку струму в обох типах клітин. Наявність же 5 ммоль/л MgАТФ у внутрішньоклітинному розчині як у контролі, так і в нейроендокринно диференційованих клітинах призводила до збіль-

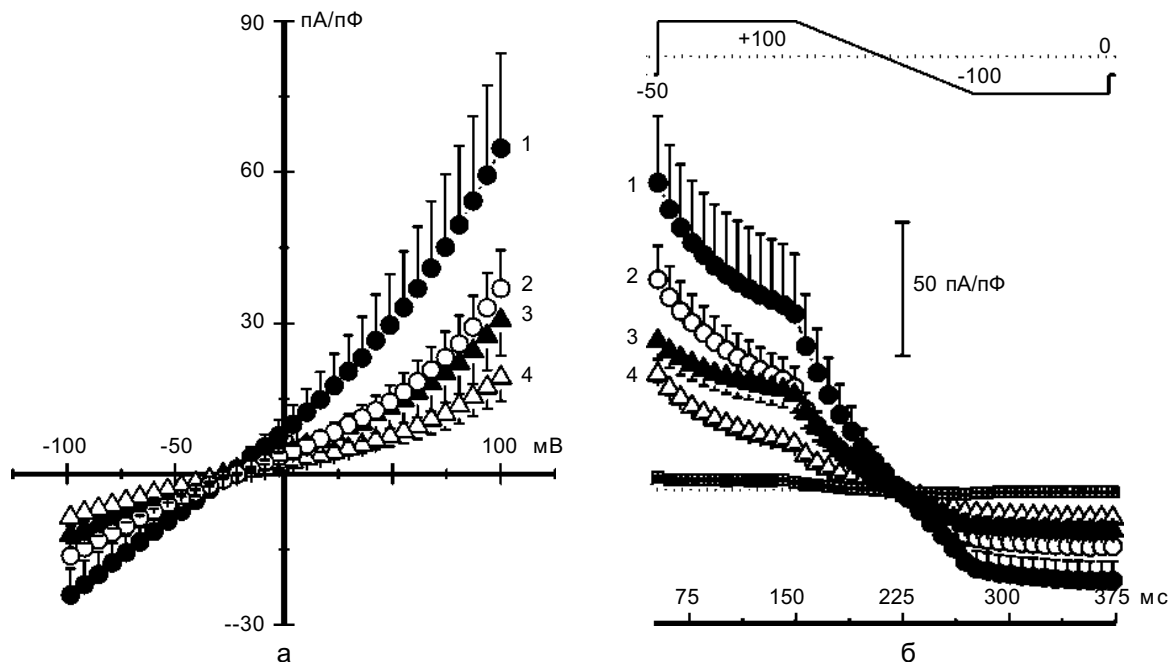


Рис. 1. Потенціалзалежність об'ємрегульованого хлорного струму в клітинах лінії LNCaP карциноми простати людини: а – усереднені вольт-амперні характеристики $I_{Cl,swell}$ демонструють помірне зовнішнє випрямлення струму: 1 – нейроендокринні клітини лінії LNCaP з 5 ммоль/л АТФ, 2 – нейроендокринні клітини без АТФ, 3 – контрольні клітини з 5 ммоль/л АТФ, 4 – контрольні клітини без АТФ; б – усереднені значення густини $I_{Cl,swell}$, що розвивається при індукованому гіпотонічності набряканні клітин у відповідь на протокол стимуляції, зображений вище

шення густини максимального струму. Причому відсоток його зростання за наявності внутрішньоклітинного АТФ у нейроендокринних клітинах лінії LNCaP був значно вищим. Так, амплітуда $I_{Cl,swell}$ під впливом АТФ у контрольних клітинах збільшувалася на 16 % (з $49,2 \pm 5,7$, $n=8$ до $57,0$ пА/пФ $\pm 6,7$ пА/пФ, $n=6$), а в нейроендокринних диференційованих – на 28 % (з $81,7 \pm 12,6$, $n=7$ до $104,8$ пА/пФ $\pm 20,7$ пА/пФ, $n=9$). Істотних змін базового струму, що спостерігався в ізотонічному розчині за різних дослідних умов ми не виявили.

Порівняння АТФ-залежності показників інактивації $I_{Cl,swell}$ у контрольних і нейроендокринно диференційованих клітинах лінії LNCaP. Однією з біофізичних ознак, за якими ідентифікують $I_{Cl,swell}$ є здатність до потенціалзалежної інактивації при тривалих високих деполяризаційних стимулах. У наших експериментах помітна інактивація струму виявлялася при стимуляції клітин імпульсами потенціалів, які були вищими від +40 мВ. $I_{Cl,swell}$, що розвивається у відповідь на ступінчасту деполяризацію мембрани (у цій роботі аналіз проведено при +120 мВ; рис. 2, а), можна в першому наближенні розділити на два компоненти: інактивований і неінактивований, тобто стаціонарний.

Інактивований компонент струму задовільно описувався експоненційною функцією зі сталою часу τ_{in} . За наших дослідних умов достовірно меншою порівняно з інши-

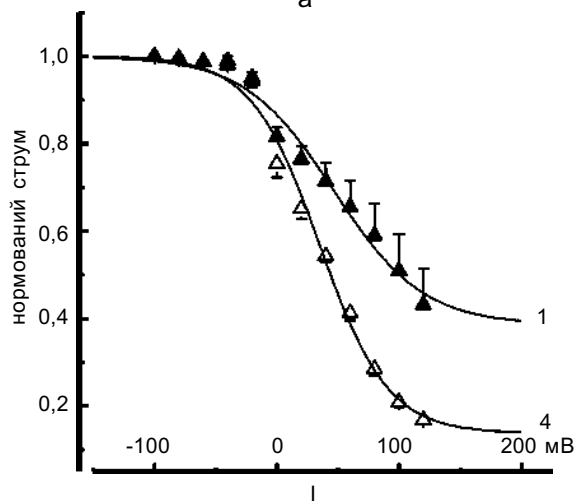
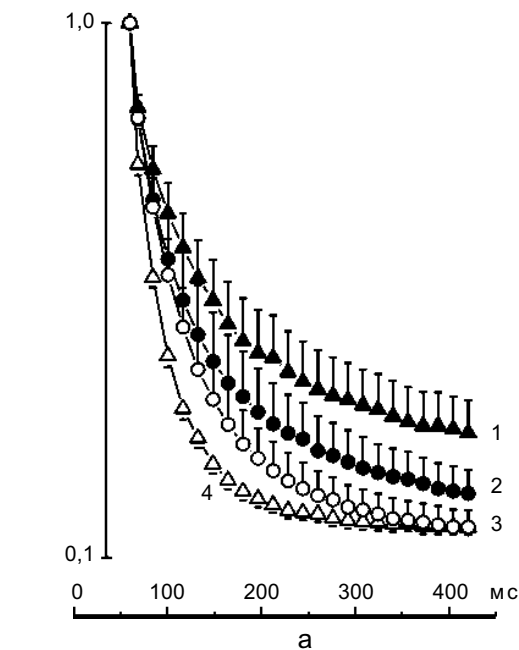
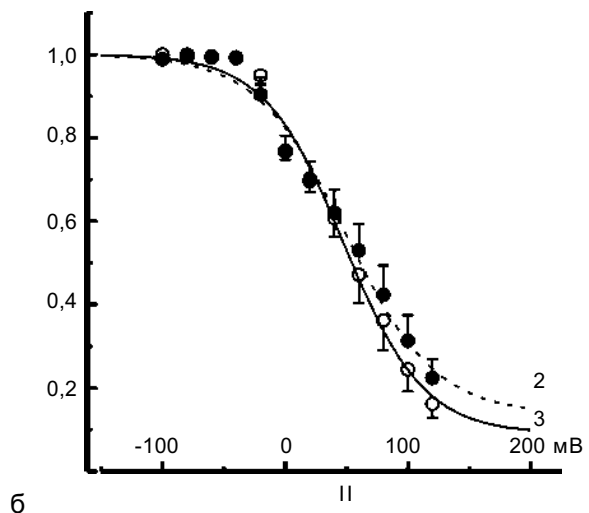


Рис. 2. Інактиваційні характеристики об'ємрегульованого хлорного струму в клітинах лінії LNCaP: а – усереднені записи $I_{Cl,swell}$, що розвивається у відповідь на інактиваційний протокол стимуляції при +120 мВ, б – криві стаціонарної інактивації $I_{Cl,swell}$. I – контрольні клітини, II – нейроендокринно диференційовані. 1 – контрольні клітини з 5 ммоль/л АТФ, 2 – нейроендокринні клітини з 5 ммоль/л АТФ, 3 – нейроендокринні клітини без АТФ, 4 – контрольні клітини без АТФ. Експериментальні точки апроксимовані за рівнянням Больцмана



ми була t_{in} у контрольних клітинах без АТФ – $46,7 \text{ мс} \pm 2,7 \text{ мс}$ ($n=8$). За наявності АТФ ця величина збільшувалася до $108 \text{ мс} \pm 18 \text{ мс}$ ($n=6$). У нейроендокринних клітинах лінії LNCaP за відсутності АТФ τ_{in} була значно більшою, ніж у контролі – $75,3 \text{ мс} \pm 13 \text{ мс}$ ($n=9$), але підвищувалася при включенні АТФ приблизно до того ж значення, що і в контролі – $95,4 \text{ мс} \pm 22 \text{ мс}$ ($n=7$). Отже, швидкість інактивації струму при $+120 \text{ мВ}$ набагато сильніше залежала від АТФ у контрольній групі клітин порівняно з нейроендокринно диференційованими.

Відмінності показників інактивації $I_{Cl,swell}$ у контрольних і нейроендокринно диференційованих клітинах полягали також у зміні величини стаціонарного струму і співвідношення двох компонентів максимального струму. Для оцінки внеску стаціонарного компонента в загальний (максимальний) струм ми поділили стаціонарні значення струму при кожному потенціалі на максимальні й отримали криві потенціалзалежності стаціонарної інактивації, усереднені значення яких представлено на рис. 2,б. Проапроксимувавши криві за допомогою

рівняння Больцмана, визначили такі показники стаціонарної інактивації струмів, як потенціал половинної інактивації ($V_{1/2}$), фактор крутизни (k) і мінімальний рівень інактивації (A_{min}). Виявилося, що незалежно від типу клітин і вмісту внутрішньоклітинного АТФ $V_{1/2}$ та k достовірно не змінювалися, варіюючи в діапазоні -35 – -49 мВ та -28 – -36 мВ відповідно. Найістотніших змін зазнавав показник A_{min} , що вказує на внесок сталого компонента в загальний $I_{Cl,swell}$ при переході від розчину без АТФ до АТФ-вмісного внутрішньоклітинного розчину в контрольних клітинах лінії LNCaP. При такому переході A_{min} статистично недостовірно збільшувався майже в 2,8 рази – від $0,14 \pm 0,04$ до $0,39 \pm 0,07$. В нейроендокринних клітинах лінії LNCaP включення АТФ призводило до дуже незначного збільшення A_{min} від $0,09 \pm 0,03$ до $0,14 \pm 0,06$, яке до того ж було статистично недостовірним.

Таким чином, виявляється, що АТФ здатен істотно збільшувати компонент $I_{Cl,swell}$, що неінактивується в контрольних клітинах лінії LNCaP, а при нейроендок-

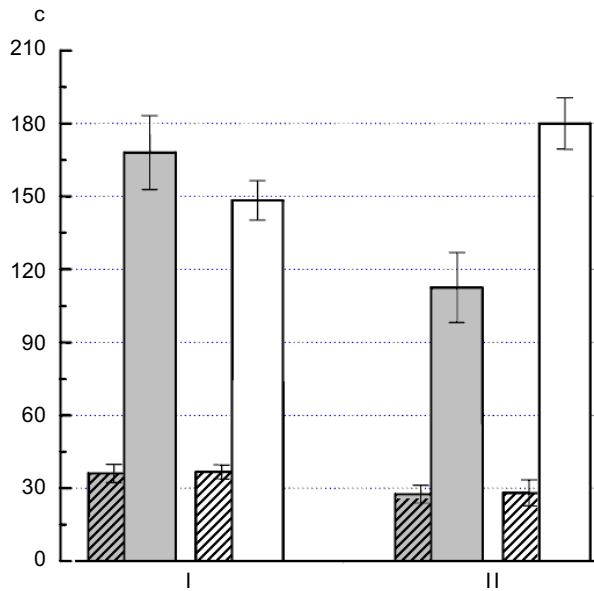


Рис.3. Порівняння кінетичних показників розвитку $I_{Cl,swell}$: I – контрольні клітини лінії LNCaP, II – нейроендокринні клітини лінії LNCaP, сірі стовпчики – з 5 ммоль/л АТФ, білі – без АТФ. Заштриховані стовпчики демонструють тривалість латентного періоду, незаштриховані – періоду розвитку струму

ринному диференціюванні цих клітин модуляторний вплив АТФ на сталий компонент втрачається.

Порівняння АТФ-залежності кінетичних показників розвитку $I_{Cl,swell}$ Кінетику розвитку $I_{Cl,swell}$ ми визначали за двома показниками – тривалістю латентного періоду, коли клітина перебувала під гіпоосмотичним впливом, але струм ще не розвивався, та, власне, періоду розвитку струму до свого максимального значення.

Для контрольних клітин лінії LNCaP латентний період становив 37 ± 3 с без АТФ і 36 ± 4 с з АТФ, а при нейроендокринному диференціюванні скорочувався до 28 ± 5 та 28 ± 4 с відповідно. Зменшення тривалості латентного періоду вказує на прискорення реакції струму на гіпотонічність. Очевидно, що для обох типів клітин цей показник не залежав від наявності АТФ у цитозолі. Період розвитку струму в контролі становив 148 ± 8 с без АТФ, а під впливом 5 ммоль/л статистично недостовірно подовжувався до 168 ± 15 с. У нейроендокринно диференційованих клітинах тривалість цього періоду становила 180 ± 10 с без АТФ, а за наявності АТФ він статистично достовірно скорочувався до 112 ± 14 с. Отже, в нейроендокринно диференційованих клітинах швидкість розвитку $I_{Cl,swell}$ значною мірою залежала від наявності АТФ у цитозолі. З АТФ вона збільшувалася, а без АТФ – зменшувалася порівняно з контролем (рис. 3).

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати вказують на те, що АТФ-залежність $I_{Cl,swell}$ у разі нейроендокринного диференціювання клітин лінії LNCaP загалом знижується. Найбільш очевидним ефектом АТФ є збільшення амплітуди $I_{Cl,swell}$, яке спостерігається як у контрольних, так і нейроендокринно диференційованих клітинах. При вимірюванні пікового значення струму на початку

деполяризації це збільшення становило 16 і 28 % для контрольних і нейроендокринно диференційованих клітин відповідно, що на перший погляд свідчить про вищу АТФ-залежність саме в дослідних клітинах. Це враження, однак, спростовується, якщо врахувати істотний вплив АТФ та інактиваційні властивості $I_{Cl,swell}$. Дійсно, як показують наші результати, основний приріст струму в контрольних клітинах відбувається за рахунок компонента, що не інактивується. Під дією АТФ він збільшується майже в 2,8 раза (за результатами оцінки A_{min} з кривих стаціонарної інактивації), тоді як в нейроендокринних клітинах лінії LNCaP його збільшення становить всього десяті частини відсотка (A_{min} змінюється від $0,09 \pm 0,03$ до $0,14 \pm 0,06$). Слабка залежність сталої часу інактивації $I_{Cl,swell}$ від наявності цитозольного АТФ у нейроендокринних клітинах лінії LNCaP і в той же час її значне подовження в контрольних клітинах підтверджує, що збільшення струму в останніх відбувається саме за рахунок неінактивованого або слабоінактивованого компонента, тоді як в результаті нейроендокринної диференціації чутливість цього компонента до АТФ значною мірою втрачається.

Водночас видається, що швидкість розвитку $I_{Cl,swell}$ у відповідь на гіпотонічний стрес є більш АТФ-залежною в нейроендокринних клітинах порівняно з контролем. Таким чином, можна говорити, що об'ємрегульований аніонний канал, який переносить $I_{Cl,swell}$, але молекулярна природа якого поки залишається нез'ясованою, може регулюватися АТФ як мінімум двома шляхами: через сенсор клітинного об'єму та через функцію (іонопровідну або кінетичну) самого каналу. Причому у разі нейроендокринної диференціації епітеліальних клітин карциноми простати ці регуляторні шляхи зазнають різних змін.

За даними Bond і співавт., де досліджувалась АТФ-залежність $I_{Cl,swell}$ на клітинах

нейробластоми лінії N1E115, цей показник може змінюватися залежно від рівня набрякання клітин [2]. Це пояснюється тим, що або існують різні механізми активації каналів, котрі характеризуються різною АТФ-чутливістю або набрякання призводить до зниження афінності АТФ-зв'язувальних сайтів каналних чи регуляторних білків. При незначному набряканні клітин (15–55 % від початкового об'єму) об'ємрегульовані канали активуються через механізми, котрі значною мірою залежать від наявності АТФ у цитозолі. Рівень активації струму через ці шляхи є насичуваною гіперболічною функцією від концентрації АТФ. Тобто збільшення концентрації АТФ до певного насичуваного рівня прискорює активацію струму у відповідь на незначне набрякання клітин. Однак при набряканні більше ніж на 65 % від початкового об'єму така АТФ-залежність $I_{Cl,swell}$ втрачається.

Наші досліді проводилися за умов зниження осмотичності на 40 %, що призводить до набрякання контрольних клітин лінії LNCaP приблизно на 40–50 % від їхнього початково об'єму [15]. Активація струму в такому разі мала б бути АТФ-залежною, а концентрація АТФ 5 ммоль/л – достатньою для насичення сайтів зв'язування. Однак, очевидно, не можна проводити безпосередні порівняння з роботою Bond, оскільки ми не досліджували зміни активації струму залежно від ступеня набрякання клітин. У наших дослідях (на клітинах лінії LNCaP) 50%-не набрякання може бути вже достатнім для включення АТФ-незалежних механізмів активації $I_{Cl,swell}$ або для достатнього зниження афінності каналних структур до АТФ. Справді, 5 ммоль/л MgATF за наших умов призводить до незначного підвищення амплітуди струму. Крім того, активація спостерігається і за повної відсутності АТФ у цитозолі. Можливо, 50%-не набрякання в клітинах лінії LNCaP є близьким до перехідного від АТФ-залежності до АТФ-незалежності.

Нейроендокринне диференціювання клітин лінії LNCaP призводить до збільшення амплітуди $I_{Cl,swell}$ і підвищення ефективності регуляторного відновлення об'єму [14]. Тобто нейроендокринні клітини під дією гіпоосмотичності набрякають менше за контрольні (карциномні) і здатні краще переносити негативні впливи, що можуть позначатися на їх об'ємі. Оскільки ракові клітини, що швидко проліферують, працюють за умов браку енергетичного субстрату, то в разі АТФ-чутливості $I_{Cl,swell}$ струм і, відповідно, ефективність процесу регуляції клітинного об'єму будуть у таких клітинах знижені. І коли при нейроендокринному диференціюванні функціонування об'ємрегульованого аніонного каналу (чи, принаймні, одного з його компонентів – стаціонарного) звільняється від регуляції з боку АТФ, то це відкриває додаткові можливості для більш стабільної життєдіяльності таких клітин за критичного метаболічного стану.

Не виключена можливість, що в епітеліальних клітинах простати є різні типи об'ємрегульованих аніонних каналів: інактивовані та неінактивовані, які по-різному модулюються АТФ і зазнають диференційованої експресії при зміні фенотипу клітини, включаючи нейроендокринну диференціацію. Але щоб довести роздільне існування таких каналів, потрібні досліді, котрі б уважно контролювали впливи таких відомих чинників, що модулюють інактивацію $I_{Cl,swell}$, як внутрішньоклітинна концентрація іонів Mg і моновалентних катіонів, зовнішньоклітинна концентрація Ca^{2+} , H^+ , проникних аніонів тощо.

Зміни кінетичних характеристик $I_{Cl,swell}$ при нейроендокринному диференціюванні та АТФ-залежність цих змін, очевидно, головним чином пов'язані з перебудовами цитоскелета клітин. Відомо, що відсутність АТФ у цитозолі може спричинити деполімеризацію актину [9], з іншого боку, нейроендокринне диференціювання теж супро-

воджується перебудовами цитоскелета і збільшенням концентрації цАМФ, що також на нього впливає [19]. З таких позицій можна пояснити прискорення реакції струму при нейроендокринному диференціюванні та за відсутності АТФ. Однак спостережене нами сповільнення розвитку струму в нейроендокринно диференційованих клітинах без АТФ, очевидно, може бути наслідком активації іншого (АТФ-незалежного) підтипу об'ємрегульованих аніонних каналів, що характеризується іншою кінетикою, або змінами внутрішньоклітинної сигналізації клітин природа яких ще невідома. Для пояснення спостережених змін потрібні подальші дослідження.

**R.M. Lazarenko, A.P. Kondratsky
N.Ch. Pogorela, Y.M. Shuba**

ALTERATIONS IN ATP-DEPENDENCE OF SWELLING-ACTIVATED Cl⁻ CURRENT ASSOCIATED WITH NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION OF LNCaP PROSTATE CANCER EPITHELIAL CELLS

Increasing population of malignant, apoptosis resistant neuroendocrine (NE) cells due to differentiation of prostate epithelial/basal cells is a hallmark of advanced, androgen-independent prostate cancer, for which there is no successful therapy. Acquisition of apoptosis resistance involves alterations in the mechanisms of cell volume homeostasis, of which volume-regulate anion channels (VRAC) that carry swelling-activated Cl⁻ current (I_{Cl,swell}) represent one of the key determinants. Given that VRAC function is generally known to be ATP-dependent, here we investigated how such dependence may evolve during NE differentiation of LNCaP prostate cancer epithelial cells. In the whole-cell patch-clamp recording mode I_{Cl,swell} could be activated in response to hypotonicity-induced cell swelling in control and NE-differentiated (by incubation in membrane-permeable cAMP analogs) LNCaP cells even following total depletion of intracellular ATP using a cocktail of metabolic inhibitors. However, this basal I_{Cl,swell} had about 30% higher density and was less inactivating in NE-differentiated cells. Inclusion of 5 mM Mg-ATP in the patch pipette caused I_{Cl,swell} augmentation in both cell types. The augmentation in the control cells was more prominent and occurred mostly at the expense of a non-inactivating current component. We conclude that I_{Cl,swell} in LNCaP cells consists of a non-inactivating, ATP-dependent and inactivating, ATP-independent components. NE differentiation promotes the increase of non-inactivating component and partial loss of its ATP sensitivity making the whole I_{Cl,swell} less ATP-sensitive as well. By

largely avoiding the ATP metabolic control I_{Cl,swell} may contribute to better control of cell volume under metabolic stress and thus enhance the survival rates of apoptosis-resistant NE cells.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aprikian A.G., Cordon-Cardo C., Fair W.R., Reuter V.E. Characterization of neuroendocrine differentiation in human benign prostate and prostatic adenocarcinoma // *Cancer*. – 1993. – **71**(12). – P. 3952–3965.
2. Bond T., Basavappa S., Christensen M., Strange K. ATP Dependence of the I_{Cl,swell} Channel Varies with the Rate of Cell Swelling // *J. Gen. Physiol.* – 1999. – **113**. – P. 441–456.
3. Bonkhoff H. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status // *Ann. Oncol.* – 2001. – **12**. – P. 141–144.
4. Cox M.E., Deeble P.D., Bissonette E.A., Parsons S.J. Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**(18). – P. 13812–13818.
5. Cox M.E., Deeble P.D., Lakhani S., Parsons S.J. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression // *Cancer Res.* – 1999. – **59**. – P. 3821–3830.
6. Culic O., Gruwel M.L., Schrader J. Energy turnover of vascular endothelial cells // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **273**. – P. 205–213.
7. Eggermont J., Trouet D., Carton I., Nilius B. Cellular function and control of volume-regulated anion channels // *Cell Biochem. and Biophys.* – 2001. – **35**. – P. 263–274.
8. Geschwind J.-F.H., Ko Y.H., Torbenson M.S. et al. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production // *Cancer Res.* – 2002. – **62**. – P. 3909–3913.
9. Golenhofen N., Doctro R.B., Baccalao R., Mandell L.J. Actin and villin compartmentation during ATP depletion and recovery in renal cultured cells // *Kidney Int.* – 1996. – **48**. – P. 1837–1845.
10. Ito T., Yamamoto S., Ohno Y. et al. Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence // *Oncol. Rep.* – 2001. – **8**. – P. 1221–1224.
11. Kim J.H., Shin S.Y., Yun S.S. et al. Voltage-dependent ion channel currents in putative neuroendocrine cells dissociated from the ventral prostate of rat // *Pflug. Arch.* – 2003. – **446** (1). – P. 88–89.
12. Krijnen J.L., Janssen P.J., Ruizeveld de Winter J.A. et al. Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? // *Histochemistry.* – 1993. – **100**. – P. 393–398.

13. Lehninger A.L. Principles of Biochemistry // Worth Publishers, Inc. – 1985. – 2. – P. 385–551.
14. Lemonnier L., Lazarenko R., Shuba Y. et al. Alterations in regulatory volume decrease and swelling-activated Cl⁻ current associated with neuroendocrine differentiation of prostate cancer epithelial cells // *Endocr. Relat. Cancer*. – 2005. – 12(2). – P. 335–249.
15. Lemonnier L., Prevarskaya N., Shuba Y. et al. Ca²⁺ modulation of volume-regulated anion channels: evidence for colocalization with store-operated channels // *FASEB J*. – 2002. – 16. – P. 222–224.
16. Lemonnier L., Shuba Y., Crepin A. et al. Bcl-2-dependent modulation of swelling-activated C- current and ClC-3 expression in human prostate cancer epithelial cells // *Cancer Res*. :4841–8. – 2004. – 64(14). – P. 4841–4848.
17. Li Y.C., Fung K.P., Kwok T.T. et al. Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells // *Chemotherapy*. – 2004. – 50. – P. 55–62.
18. Martin D.S., Bertino J.R., Koutcher J.A. ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach // *Cancer Res*. – 2000. – 60. – P. 6776–6783.
19. Mills J.W., Lubin M. Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on volume and cytoskeleton of MDCK cells // *Amer. J. Physiol.* – 1986. – 250 (2 Pt 1). – P. C319–324.
20. Nieminen A.L. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria // *Int. Rev. Cytol.* – 2003. – 224. – P. 29–55.
21. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – 273 (3 Pt 1). – P. 755–789.
22. Shen M.R., Yang T.P., Tang M.J. A novel function of BCL-2 overexpression in regulatory volume decrease. Enhancing swelling-activated Ca²⁺ entry and Cl⁻ channel activity // *J. Biol. Chem.* – 2002. – 277. – P. 15592–15599.
23. Shuba Y.M., Prevarskaya N., Lemonnier L. et al. Volume-regulated chloride conductance in the LNCaP human prostate cancer cell line // *Amer. J. Physiol.* – 2000. – 279. – P. C1144–C1154
24. Tai K.K., McCrossan Z.A., Abbott G.W. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels increases cell viability against rotenone-induced cell death // *J. Neurochem.* – 2003. – 84. – P. 1193–2000.
25. Vashchenko N., Abrahamson P.-A. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: Implication for new treatment modalities // *Europ. Urol.* – 2005. – 47. – P. 147–155.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 04.04.2005*