

Ю.М. Вітко, Н.Х. Погорела, Н. Преварська, Р. Скрима, Я.М. Шуба

## Вплив зовнішньоклітинного рН на об'ємактивований хлорний струм в епітеліальних клітинах карциноми простати

*На клеточной линии карциномы предстательной железы человека – LNCaP при помощи метода patch-clamp было исследовано влияние внеклеточного рН на характеристики объёмноактивированного хлорного тока –  $I_{Cl,swell}$ . Показано, что закисление внеклеточного гипотонического раствора, использовавшегося для развития тока, укорачивает временные параметры развития  $I_{Cl,swell}$  и снижает его максимальную плотность. Резкие сдвиги рН в кислую сторону вызывали быструю, транзиентную потенциацию тока, сменяющуюся его стационарным подавлением. Потенциалозависимая инактивация  $I_{Cl,swell}$  была наиболее выражена в узком диапазоне рН 6-7. На основании анализа полученных результатов выдвинуто предположение, что объёмрегулируемые анионные каналы, переносящие  $I_{Cl,swell}$ , имеют в своей структуре как минимум две рН-чувствительные молекулярные группы с близкими  $pK \approx 6$ , титрование которых модулирует амплитуду тока, и две дополнительные протончувствительные группы, определяющие инактивацию канала.*

### ВСТУП

Відомо, що зовнішньоклітинний рН ракової тканини є суттєво нижчим порівняно з нормальною тканиною [21], в той час, як її внутрішньоклітинний рН здебільшого змінюється в нейтрально-лужний бік [5]. Ця характеристика пухлин, навіть, використовується для розробки лікарських препаратів з вибірковою протираковою дією [15]. Знижений зовнішньоклітинний рН може також істотно впливати на трансмембранні транспортні процеси ракових клітин, адже відомо, що функціонування практично всіх іонних каналів і активних транспортерів є рН-залежним [17].

Активіація хлорного струму у відповідь на набухання клітини ( $I_{Cl,swell}$ ), викликана, зокрема, зниженням тоничності зовнішнього середовища, є одним з основних механізмів, за допомогою якого клітина намагається відновити свій об'єм [14]. При нормальних потенціалах спокою цей струм призводить до ви-

ходу іонів  $Cl^-$  та деяких інших аніонів, понижуючи тим самим внутрішньоклітинну осмолярність та протидіючи входу води, який, з іншого боку, призвів би до збільшення клітинного об'єму. Цей процес називається регуляторним зменшенням об'єму (regulatory volume decrease, RVD). Пертурбації зовнішньоклітинної осмолярності не єдина причина змін клітинного об'єму. Відомо, що такі процеси, як транспорт органічних осмолітів, дія гормонів, проліферація, диференціація та апоптоз [7, 9, 18] теж супроводжуються змінами об'єму, що означає активацію  $I_{Cl,swell}$ , відповідно, свідчить про роль  $I_{Cl,swell}$  у регуляції всіх цих процесів.

Молекулярна природа спеціалізованих об'ємрегульованих аніонних каналів (volume-regulated anion channel(s), VRAC(s)), які переносять  $I_{Cl,swell}$ , досі невідома, але є свідчення того, що вони якимось чином пов'язані з білками, які посилено експресуються при злоякісному переродженні клітин, зокрема з ак-

тивним, універсальним транспортером П-глікопротеїном (P-glycoprotein, скорочено P-gp) [8,22]. P-gp є продуктом MDR1 (multidrug resistance 1) гену, здатним виводити протипухлинні препарати з клітин, зумовлюючи тим самим їх резистивність до хемотерапії [4]. Є дані, що експресія P-gp у клітинах може посилюватися як за умов осмотичного стресу, так і за умов пониженого зовнішньоклітинного рН, що є характерним для пухлин [24].

Нещодавно ми вперше описали  $I_{Cl,swell}$  у лінії епітеліальних клітин карциноми простати людини, LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) [3, 19]. Зважаючи на те, що понижений рН, що є ознакою ракової тканини, може як прямо так і опосередковано впливати на активність об'ємзалежних аніонних каналів, в цій роботі ми дослідили вплив зовнішньоклітинного рН на характеристики  $I_{Cl,swell}$  у клітинах LNCaP. Наші дані свідчать про те, що VRACs в злоякісно перероджених клітинах простати людини мають у своїй структурі декілька молекулярних груп, титрування яких моделює роботу цих каналів.

## МЕТОДИКА

Клітини лінії LNCaP (American Tere Culture Collection) культивували в середовищі RPMI 1640 ("Sigma", США) з додаванням 5 ммоль/л L-глутаміну ("Sigma", США), 10 %-ї ембріональної бичачої сироватки ("Gibco BRL", США), 50000 од/л пеніциліну та 50 мг/мл стрептоміцину ("Sigma", США). Клітини вирощували в флаконах, об'ємом 50 мл при 37 °C в інкубаторі зі зволоженою атмосферою 95 % повітря та 5 % CO<sub>2</sub>. Для електрофізіологічних експериментів клітини висаджували в чашки Петрі, покриті поліорнітином ("Sigma", США) і використовували протягом 4-6 діб.

Мембранні струми в LNCaP клітинах реєстрували з використанням методики patch-clamp у конфігурації "ціла клітина". Для того, щоб відокремити досліджуваний, об'єм-активованій хлорний струм від ендogenous

калієвого струму, властивого клітинам LNCaP [20], ми використовували TEA як основний катіон для зовнішньоклітинних розчинів. Осмотичність ізо- та гіпотонічних розчинів становила 310 і 190 мосмоль/л відповідно. Склад зовнішньоклітинних розчинів був таким:

Склад розчину	Norm	Гіпо Norm	Iso TEA	Гіпо TEA
NaCl	145	70	-	-
KCl	5	5	-	-
CaCl <sub>2</sub>	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2	2
Глюкоза	5	5	10	10
HEPES	10	10	10	10
TEA-Cl	-	-	145	80

Реєструвальну піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином наступного складу (ммоль/л): KOH – 100, KCl – 40, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 10, EGTA – 10, MgATФ – 5, рН 7,2 (доводили глютаміновою кислотою). Опір реєструвальних піпеток коливався в межах 3-5 МОм. Зміни зовнішніх розчинів проводили за допомогою багатоствольної мікропіпетки зі спільним витоком, який розташовували в безпосередній близькості до досліджуваної клітини. Повна зміна зовнішнього розчину відбувалася за час не більший за 1 с.

## РЕЗУЛЬТАТИ

*Вплив рН на часові параметри розвитку  $I_{Cl,swell}$ .* У відповідь на прикладання гіпотонічного розчину зі стандартним (контрольним) значенням рН 7,2  $I_{Cl,swell}$  у клітинах LNCaP починав розвиватися після затримки (латентний період) в 68 с ± 12 с і набував максимальної густини 63 пА/пФ ± 7 пА/пкФ при +120 мВ протягом наступних 298 с ± 55 с (рис. 1, а, б). Повернення клітини в ізотонічний розчин призводило до досить швидкого і фактично повного зникнення  $I_{Cl,swell}$  протягом 103 с ± 28 с. При переводі клітини з ізотонічного розчину, в якому  $I_{Cl,swell}$  повністю відсутній, в гіпотонічний зі зміненими значеннями рН активація струму відбувалася з ча-

совими показниками, суттєво відмінними від контрольних. Так, при зниженні рН до 5 латентний період вірогідно скорочувався приблизно вдвічі (до  $30 \text{ с} \pm 4 \text{ с}$ ), а час розвитку – приблизно в 5 разів (до  $62 \text{ с} \pm 8 \text{ с}$ ) порівняно з контролем (див.рис. 1,а, б). Одночасно максимальна густина  $I_{\text{Cl,swell}}$  зменшувалася майже на 40% (до  $38 \text{ пА/пФ} \pm 4,5 \text{ пА/пФ}$ ). Залуження гіпотонічного розчину до рН 9 призводило до протилежних змін – час розвитку струму та його максимальна густина збільшувалися приблизно на 50% (до  $490 \text{ с} \pm 40 \text{ с}$  та  $97 \text{ пА/пФ} \pm 19,3 \text{ пА/пФ}$  відповідно), тоді як латентний період залишався практично незмінним порівняно з контролем (див. рис. 1,а, б).

*Вплив рН на амплітуду  $I_{\text{Cl,swell}}$ .* Використання гіпотонічного розчину зі зміненим рН з самого початку для розвитку  $I_{\text{Cl,swell}}$  не дає можливість судити наскільки швидко відбуваються рН-індуковані зміни. Тому в наступній серії експериментів ми попередньо розвивали  $I_{\text{Cl,swell}}$  при контрольному значенні рН, а вже потім прикладали розчини з тестовими значеннями рН (рис. 2).

$I_{\text{Cl,swell}}$  реєстрували у відповідь на імпульси потенціалу, що склалися з фази

деполяризації до +100 мВ та фази гіперполяризації до -150 мВ, з'єднаних між собою лінійним відрізком. Як видно з часової залежності змін струму закислення та залуження зовнішнього гіпотонічного розчину призводило до двофазних змін  $I_{\text{Cl,swell}}$  (див. рис. 2,а). При закисленні струм спочатку короткочасно (транзйентно) потенціювався, а потім поступово зменшувався до нового стаціонарного значення, нижчого за те, яке він мав до переходу в більш кисле середовище. Перехід до лужних значень рН супроводжувався протилежними відхиленнями струму – короткочасне пригнічення змінювалося довготривалою потенціацією. Із зовнішнього вигляду струмів на піках транзйентних змін  $I_{\text{Cl,swell}}$  та при досягненні ним стаціонарного стану (див.рис.2,б, в) попередньо можна зробити висновок, що рН істотно впливає на кінетику інактивації  $I_{\text{Cl,swell}}$  при потенціалі +100 мВ. Водночас сталість потенціалу реверсії всіх ВАХ, виведених з ділянок струмів на лінійнозмінний потенціал (рис. 3а, б) свідчить про те, що, по ходу транзйентних і стаціонарних змін  $I_{\text{Cl,swell}}$  рН не призводить до активації додаткових струмів та/або до змін селективності самих об'ємзалежних аніонних

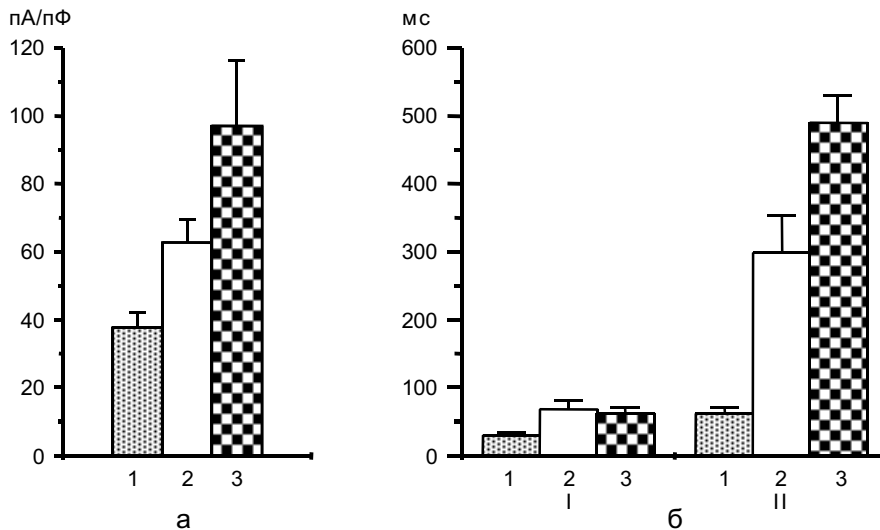


Рис.1. Вплив зовнішньоклітинного рН на об'ємзалежність і амплітуду  $I_{\text{Cl,swell}}$  у клітинах LNCaP: а- густина  $I_{\text{Cl,swell}}$  при +120 мВ (1- рН 6; 2- рН 7,2; 3- рН 8); в- латентний період (I), час розвитку (II) струму в контролі (2) та при зміні зовнішньоклітинного рН (1- рН 6, 2- рН 7,2, 3-рН 8).

каналів. рН-викликані стаціонарні зміни  $I_{Cl,swell}$  не є потенціалзалежними, тоді як рівень транзентної потенціації струму у відповідь на закислення середовища був помітно вищим при позитивних потенціалах (див.рис. 3,а,б вставка).

Для кількісної оцінки як транзентних, так і стаціонарних ефектів рН на  $I_{Cl,swell}$  ми пронормували амплітуди відповідних струмів, що виникали внаслідок переходу від контрольного (рН 7,2) до тестового значення рН відносно амплітуди струму при контрольному рН, яке він мав безпосередньо перед переходом, та представили відносні зміни  $I_{Cl,swell}$  залежно від рН. На рис. 3,в наведено одержані таким чином усереднені рН-залежності транзентних і стаціонарних змін амплітуди

$I_{Cl,swell}$  при +100 мВ. Експериментальні точки були апроксимовані кривими титрування:

$$A = (A_{min} - A_{max}) / (1 + (pH/pK)^n) + A_{max}$$

де  $A$  – відношення амплітуди  $I_{Cl,swell}$  при тестовому значенні рН до його амплітуди при рН 7,2,  $A_{max}$  та  $A_{min}$  – максимальні та мінімальні відносні зміни,  $pK$  – уявна константа титрування, а  $n$  – коефіцієнт Хілла. Внаслідок апроксимації ми одержали такі показники для транзентних змін  $I_{Cl,swell}$ :  $A_{max}=1,46$ ,  $A_{min}=0,91$ ,  $pK=6$ ,  $n=8$ , а для стаціонарних –  $A_{max}=1,52$ ,  $A_{min}=0$ ,  $pK=5,9$ ,  $n=3,7$ .

*Вплив рН на інактивіацію  $I_{Cl,swell}$*  Як уже зазначалося, прикладання гіпотонічного розчину з тестовими значеннями рН поряд зі впливом на амплітуду  $I_{Cl,swell}$  супроводжувалося також змінами кінетики його інактивіації

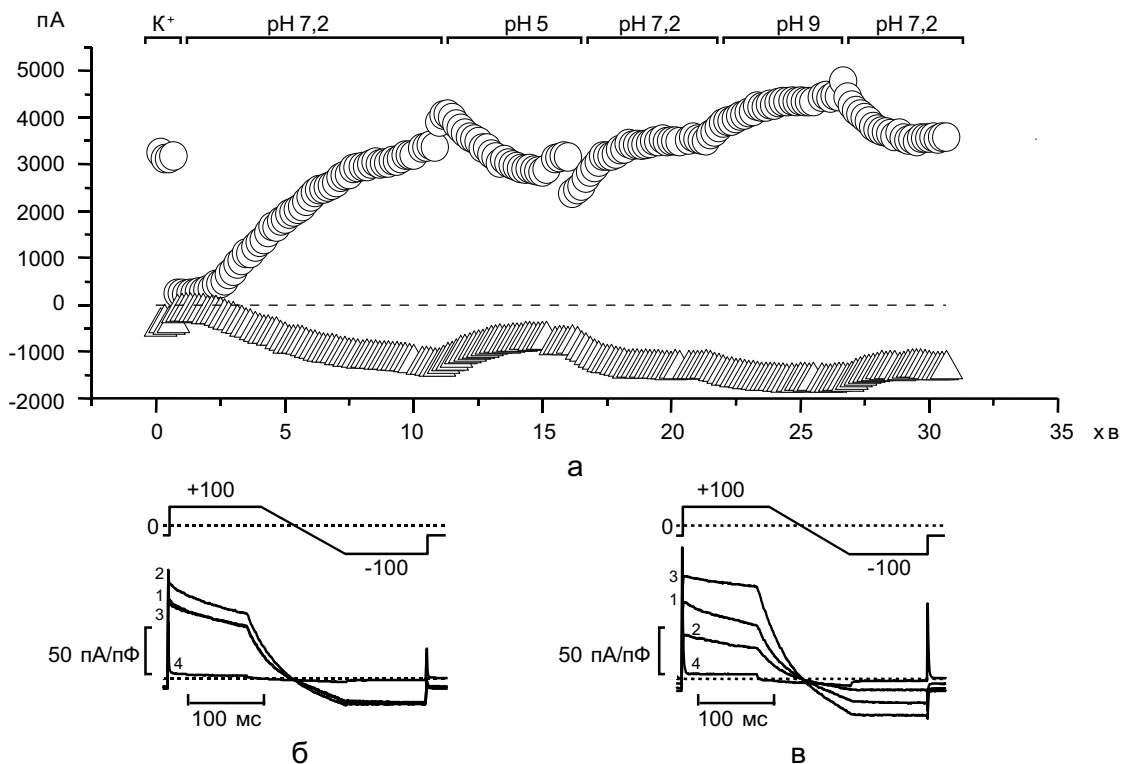


Рис.2. Комплексна дія зовнішньоклітинного рН на характеристики  $I_{Cl,swell}$ : а- зміни розміру  $I_{Cl,swell}$  при підтримуючому потенціалі -50мВ, викликані послідовним переведенням клітини із гіпотонічного розчину з нормальним рН 7,2 у гіпотонічний розчин з кислим і лужним рН після повного розвитку ефекту гіпотонічності; б- записи струмів, одержані при переключеннях між гіпотонічними розчинами зі змінними значеннями рН після розвитку ефекту гіпотонічності на максимумі транзентних змін (1- рН 7,2; 2- рН 6; 3- рН 8; 4 - струм в ізотонічному розчині) у відповідь на вказану зверху схему стимуляції клітини; в- записи струмів, одержані за тих самих умов на максимумі стаціонарних змін.

при позитивних значеннях мембранних потенціалів (рис.4,а). У нашій попередній роботі ми показали, що загальний  $I_{Cl,swell}$  у відповідь на ступінчасту деполаризацію може бути адекватно аналітично описаний як сума двох складових - експоненційно спадаючої, яка характеризується амплітудою  $A_{exp}$  та сталою часу  $\tau_{in}$ , а також сталої величини  $A_{sus}$  та запропонували спосіб одержання кривої стаціонарної інактивації цього струму [1]. Проаналізувавши рН-залежність характеристик інактивації  $I_{Cl,swell}$  з використанням аналогічних підходів, можна побачити, що зміни характеристик часозалежної інактивації з рН не є монотонними. Так, стала часу інактивації виявилася мінімальною при рН 6

( $\tau_{in}=58,47\text{мс}\pm 2,4\text{мс}$ ) і підвищувалася при зміні рН як у лужний (до  $\tau_{in}=102,3\pm 5$  при рН 7,2 та  $142,3\pm 1,7$  мс при рН 8), так і в кислий (до  $\tau_{in}=193,3\text{ мс}\pm 11,6\text{ мс}$  при рН 5) бік від цього значення. В той же час відношення амплітуди експоненційної складової до амплітуди сталої є найбільшим при контрольному значенні рН 7,2, яке зменшується по обидва боки від нього (див.рис. 4,б). Апроксимація кривих стаціонарної інактивації  $I_{Cl,swell}$  рівнянням Больцмана, яке описує розподіл заряджених воротних частинок між двома енергетичними рівнями в електричному полі, вказує на те, що потенціал половинної інактивації ( $V_{1/2}$ ) зі збільшенням рН зсувається в позитивну ділянку, складаючи +54,

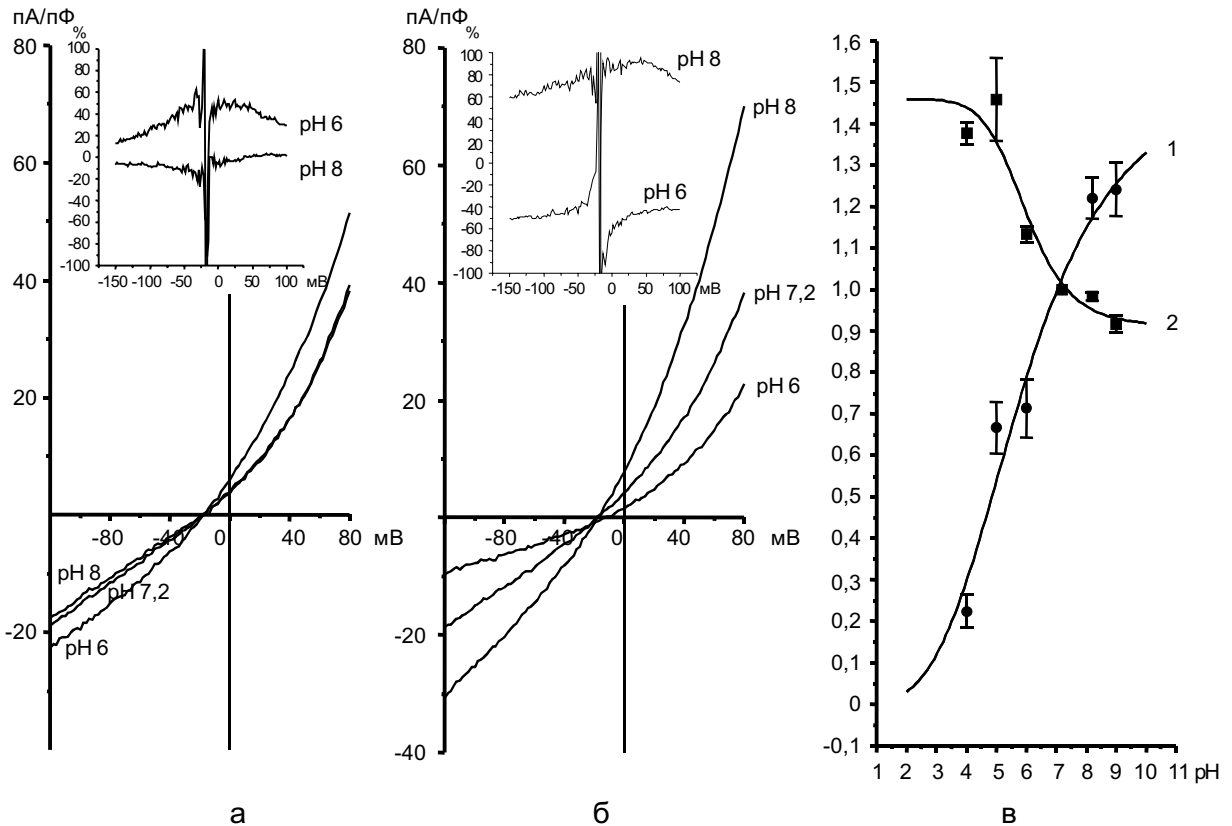


Рис.3. Потенціалзалежність транзйентних і стаціонарних змін  $I_{Cl,swell}$  у клітинах LNCaP: а - вольт-амперні характеристики транзйентних струмів, викликаних гіпотонічністю, за різних значень рН гіпотонічного розчину), одержані за записами 1,2 та 3 на рис.2,б; у вставці продемонстровано потенціалзалежність ефекту рН, отриману за допомогою побудови залежності відсотка інгібування (потенціювання) струму від мембранного потенціалу); б - вольт-амперні характеристики стаціонарних струмів, одержані за записами 1, 2 та 3 на рис.2,в; в- криві титрування довготривалих (1) і короткочасних (2) змін амплітуди хлорного струму.

+45,8, +83,2 та +117,7 мВ для значень рН рівних 5, 6, 7,2 та 8 (див.рис. 4,в). При цьому фактор крутизни ( $k$ ), який залежить від ефективного заряду воротних частинок, для тих же значень рН становив -26, -27, -31,2 та -44,6 мВ, а мінімальний рівень інактивациі ( $I_g$ ) – 0,63, 0,18, 0,24 та 0,33 відповідно.

## ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що зовнішньоклітинний рН суттєво впливає на функцію мембранних іонних каналів і відповідних їм струмів. Загалом цей вплив зводиться до двох основних ефектів – зсуву потенціалзалежних характеристик стру-

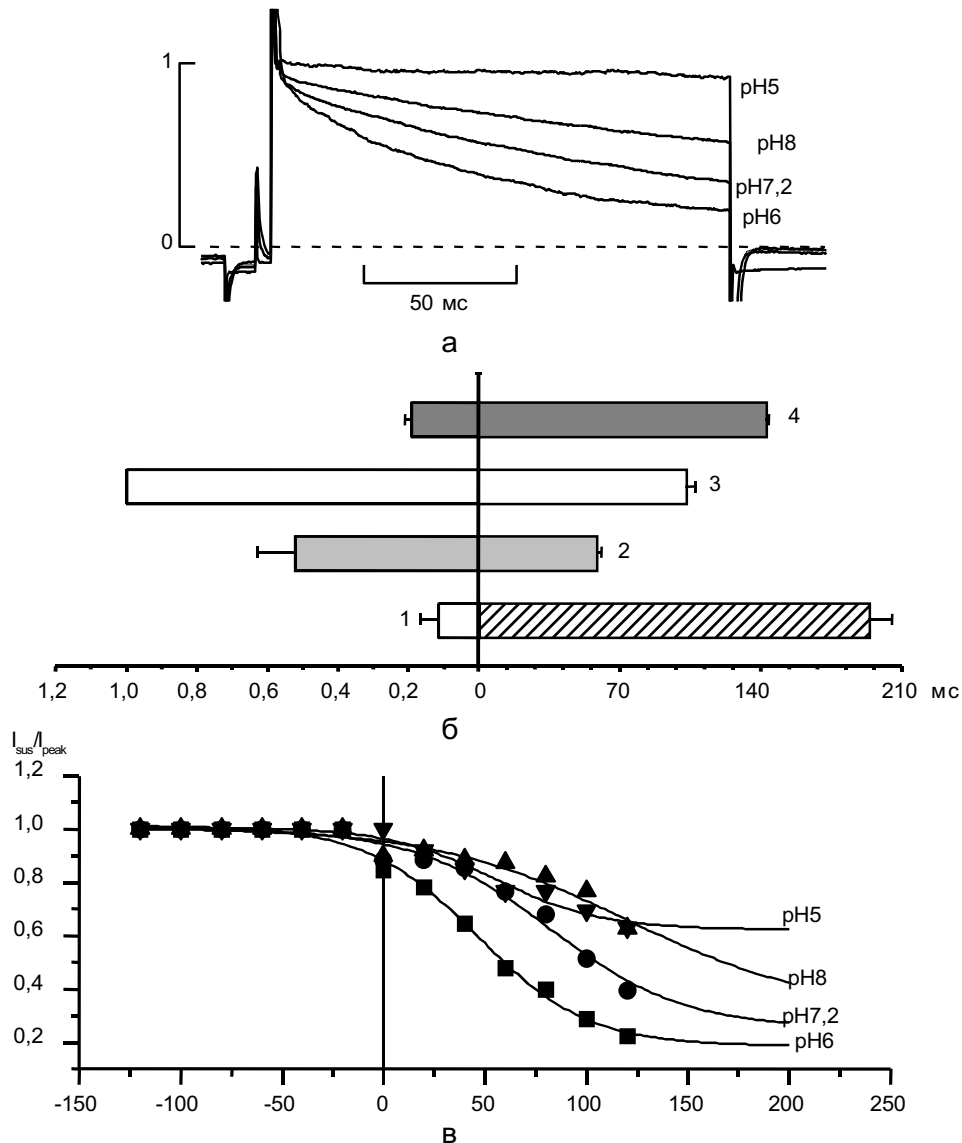


Рис.4. рН-залежність потенціалзалежної інактивациі хлорного струму, викликаного гіпотонічністю: а - нормовані струми при потенціалі +120мВ у контролі (3) та при зміні зовнішньоклітинного рН (1- рН 5; 2- рН 6; 4- рН 8); б - стала часу інактивациі та відношення між амплітудою експоненти та сталем компонентом контрольного (3) та модифікованого рН  $I_{Cl,swell}$  при потенціалі +120мВ (1- рН 5; 2- рН 6; 4- рН 8); в- значення стаціонарної інактивациі в контролі (1) і при рН5(2), рН6(3), рН8(4); суцільні лінії найкращим чином апроксимують експериментальні точки за рівнянням Больцмана.

му та зміни його амплітуди [6]. Найбільш повно в цьому плані вивчені катіонні канали, причому для них характерна направленість згаданих ефектів така, що при закисленні зовнішнього середовища відбувається деполаризаційний зсув потенціалзалежності та зниження амплітуди транспортованих струмів. Перший ефект пояснюється зменшенням від'ємного поверхневого потенціалу мембрани внаслідок зв'язування іонів  $H^+$  з фіксованими поверхневими зарядами, а другий протонуванням аніонних груп пори самого каналу, що призводить до блокування транспорту іонів [6]. рН може також змінювати кінетику іонних струмів, впливаючи на воротні процеси. Пояснення рН-викликаних змін найчастіше вимагає залучення до розгляду декількох типів поверхневих і внутрішньоканальних аніонних груп з різними уявними рК, які є специфічними для кожного типу каналу.

Що стосується об'ємзалежних аніонних каналів, то найбільш повна інформація про вплив на них зовнішньоклітинного рН, в основному, одержана на ендотеліальних клітинах [11,16]. Зокрема було показано, що зниження рН спричинювало зменшення амплітуди та прискорення інактивації  $I_{Cl,swell}$ , тоді як його підвищення, навпаки, потенціювало амплітуду та уповільнювало інактивацію [13]. рН-залежність амплітуди  $I_{Cl,swell}$  очевидно пов'язана з протонуванням зовнішньоклітинної аніонної групи, яка задіяна в регуляції провідності поодинокого каналу, з уявним рК 4,6 [16]. Локалізація цієї групи із зовнішнього боку каналу підтверджувалася відсутністю залежності від потенціалу впливу рН на амплітуду струму через поодинокий канал [16].

У наших експериментах вперше показано комплексність дії зовнішньоклітинного рН на  $I_{Cl,swell}$  в епітеліальних клітинах карциноми простати. Виявилось, що рН впливає не тільки на амплітудні та кінетичні характеристики струму, але і на його чутливість до змін клітинного об'єму, викликаних гіпотонічними умовами. Зокрема, наші результати свідчать, що сенсор об'єму каналу, очевид-

но, має в своєму складі молекулярну групу, повернуту в зовнішній простір, протонування якої прискорює реакцію каналу на набухання клітини.

Ефекти рН на амплітудні та кінетичні характеристики  $I_{Cl,swell}$  виявилися складними. З наших результатів можна зробити висновки, що амплітуда  $I_{Cl,swell}$  контролюється, принаймні, двома рН-залежними групами. Швидкі зміни амплітуди струму можна пов'язати з протонуванням групи, яка, судячи з того, що ці зміни залежать від мембранного потенціалу, найімовірніше знаходиться всередині пори каналу. Протонування цієї групи з рК 6 відповідає за швидке короткочасне і порівняно незначне (максимум на 60%) посилення струму при зниженні рН, яке повільно змінюється довготривалим пригніченням. Останнє відбувається внаслідок протонування іншої, вже поверхневої групи з близьким рК 5,9, яке призводить до майже повного, потенціалнезалежного блокування струму при рН, нижчих за 4. Як і з цих змін пов'язані з впливом рН на провідність каналу, а які з впливом на ймовірність його знаходження у відкритому стані поки що судити важко. За аналогією з ендотеліальними клітинами, в яких було показано, що провідність VRAC потенціалнезалежним чином контролюється зовнішньою аніонною групою з рК 4,6 [16], можна припустити, що в клітинах LNCaP саме повільний ефект рН на значення  $I_{Cl,swell}$  зумовлений впливом на провідність каналу, а швидкий – на ймовірність знаходження його у відкритому стані.

Пояснення рН-залежності виявлених нами змін інактиваційних характеристик  $I_{Cl,swell}$  теж вимагає залучення до розгляду як мінімум двох рН-чутливих груп. Ця рН-залежність є такою, що інактивація струму проявляється найбільше в діапазоні рН 6-7, в той час як по обидва боки від цих значень спостерігається як підвищення сталої часу інактивації, так і зменшення вкладу інактиваційного компонента в загальний струм. Така поведінка можлива, якщо припустити, що процес інактивації знаходиться під конт-

ролем двох молекулярних груп, які взаємодіють між собою (наприклад "ворота" і рецепторна ділянка). Причому, як повне протонування цих груп при низьких рН, так і повна депротонування при високих рН завдяки збільшенню одноіменного заряду не сприяють їх взаємодії, призводячи до сповільнення інактивації.

Про посилення інактивації  $I_{Cl,swell}$  у вузькому діапазоні рН 6-7 свідчать також криві стаціонарної інактивації. До речі, показаний нами зсув потенціалу половинної інактивації  $I_{Cl,swell}$  в ділянку більш негативних значень зі зменшенням рН є нетиповим для більшості каналів, для яких подібний зсув відбувається в позитивну ділянку внаслідок нейтралізації іонами  $H^+$  фіксованих негативних поверхневих зарядів мембрани. Цей факт може свідчити про те, що густина таких зарядів в околиці об'ємактивованих аніонних каналів є неістотною, а вказаний зсув відбувається через вплив іонів  $H^+$  на сам воротний механізм каналу.

Говорити про те, які із виявлених нами ефектів рН можуть бути пов'язані не з безпосередньою дією іонів  $H^+$  на об'ємрегульовані аніонні канали, а опосередковані через білки, котрі модулюють роботу цих каналів, зокрема P-гр, є передчасним. Зважаючи на те, що клітини LNCaP дуже слабо експресують P-гр [23], більш ймовірних можна вважати, що вказані ефекти є каналоспецифічними.

*Ця робота частково підтримана грантом INTAS-99-01248.*

**Y. M. Vitko, N. C. Pogorela, N. Prevars'ka, R. Skryma, Ja. M. Shuba**

### **THE INFLUENCE OF EXTRACELLULAR PH ON VOLUME-ACTIVATED CHLORIDE CURRENT IN THE PROSTATE CANCER EPITHELIAL CELLS**

The influence of extracellular pH on characteristics of volume-activated chloride current,  $I_{Cl,swell}$ , in the human prostate cancer epithelial cell line, LNCaP, was studied using the patch-clamp technique. Ac-

dification of the extracellular hypotonic solution used to develop the current shortened the temporal parameters of  $I_{Cl,swell}$  development and reduced its maximal density. Sudden shifts of the pH towards acidification caused fast, transient potentiation of the current followed by its sustained inhibition. Voltage-dependent inactivation of  $I_{Cl,swell}$  was the most pronounced in the narrow range of pH=6-7. Based on the analysis of our data we hypothesize that volume-regulated anion channels underlying  $I_{Cl,swell}$  possess in their structure at least two pH-sensitive molecular groups with similar  $pK=6$ , titration of which modulates the current amplitude and two additional proton-sensitive groups that determine channel's inactivation.

*A.A.Bogomoletz Institute of Physiology of NASU,*

*International Center of Molecular Physiology of NASU, Kiev,*

*Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, France*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Вітко Ю.М., Лазаренко Р.М., Погорела Н.Х. Вплив внутрішньоклітинного трипсину на характеристики потенціалзалежної інактивації хлорного струму в клітинах раку простати // Фізіол. журн.- 2002.- **48**, № 3. – С. 41-50.
2. Шуба Я.М., Скрима Р.Н., Преварська Н.Б. Об'ємчутлива аніонна провідність у клітинах лінії кашпінноми простати людини // Фізіол. журн.- 1999.- **45**, №4.-С.27-34.
3. Arreola J., Melvin J.E., Begenisish T. Volume-activated chloride channels in rat parotid acinar cells // J. Physiol. (Lond).-1995.- P. 677-687.
4. Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. The P-glycoprotein multidrug transporter // Gen. Pharmacol.-1996.-**27**, № 8.-P. 1283-91.
5. Gerweck L.E, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer // Cancer Res.-1996.-**56**(6).-P. 1194-8.
6. Hille B. Ionic channels of Excitable Membranes // Sunderland: Sinauer Associates, Inc,1992.-P. 365-397.
7. Hoffmann E.K., Simonsen L.O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells // Physiol. Rev.-1989.-**69**.-P. 315-382.
8. Idriss H.T., Hannun Y.A., Boulpaep E. et al. Regulation of volume-activated chloride channels by P-glycoprotein: phosphorylation has the final say! // J. Physiol.- 2000.-**524**, № 3. - P. 629-36.
9. Kirk K., Ellory J.C., Young J.D. Transport of organic substrates via a volume-activated channel // J. Biol. Chem.-1992.-**267**.-P. 23475-23478.



10. Meyer K., Korbmayer C. Cell swelling activates ATF-dependent voltage-gated chloride channels in M-1 mouse cortical collecting duct cells // J. Gen. Physiol.-**108**.-P. 177-193.
11. Nilius B., Eggermont J., Voets T. at al. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells // Prog. Biophys. Mol. Biol.-1997.-**68**.-P. 69-119.
12. Nilius B., Eggermont J., Voets T. at al. Volume-activated Cl channels // Gen. Pharmacol.-1996.-**27**.-P. 1131-1140.
13. Nilius B., Preden J., Droogmans G. Modulation of volume-regulated anion channels by extra- and intracellular pH // Eur. J. Physiol.-1998.-**436**.-P. 742-748.
14. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor // Amer. J. Physiol.-1997.-**273**.-P. 755-789.
15. Raghunand N, Gillies R.J. pH and drug resistance in tumors // Drug Resist.-2000.-**3**, №1.-P. 39-47.
16. Sabirov R.Z., Prenen J., Droogmans G. at al. Extra- and intracellular proton-binding sites of volume-regulated anion channels // J. Membrane Biol.-2000.-**177**.-P. 13-22.
17. Sarcadi B., Parker J.C. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume // Biochim. Biophys. Acta.-1991.-**1071**.-P. 407-427.
18. Schlichter L.C., Sakellaropoulos G., Ballyk B. at al. Properties of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells // Glia.-1996.-**17**.-P. 225-236.
19. Shuba Y.M., Prevarskaya N., Lemonnier L. at al. Volume-regulated chloride conductance in the LNCaP human prostate cancer cell line // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.- 2000.-**279**, №4. - C1144-54.
20. Skryma R.N., Prevarskaya N.V., Dufy-Barble L. at al. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation // Prostate.-1997.-**32**.-P. 112-122.
21. Stubbs M., McSheehy P.M, Griffiths J.R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study // Adv. Enzyme Regul.-1999.-**39**.-P. 13-30
22. Valverde M.A., Diaz M., Sepulveda F.V. at al. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein // Nature.-1992.-**355**, №6363.-P. 830-3.
23. van Brussel J.P., van Steenbrugge G.J., Romijn J.C. at al. Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins // Eur. J. Cancer.-1999.-**35**, № 4.-P. 664-71.
24. Wei L.Y., Roepe P.D. Low external pH and osmotic shock increase the expression of human MDR protein // Biochemistry.-1994.-**33**, № 23.-P. 7229-38.
25. Woolf S.N. Screening for prostate cancer with prostate specific antigen. An examination of the evidence // New Engl. J. Med.-1995.-**333**.-P. 1401-1405.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;*

*Міжнар. Центр молекул. фізіології НАН України, Київ;*

*Лабораторія клітин. фізіології Ун-ту наук та технологій, Ліль, Франція*

*Матеріал надійшов до редакції 24.04.2002*