

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

Вплив нейроендокринного диференціювання клітин раку простати людини лінії LNCaP на характеристики об'ємчутливого хлорного струму

На андрогензависимых клетках карциномы простаты человека линии LNCaP был исследован эффект нейроэндокринной дифференциации этих клеток на свойства объёмчувствительного хлорного тока. Показано, что в клетках, которые подвергаются нейроэндокринной дифференциации вследствие повышения внутриклеточного содержания циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), ускоряется развитие тока в ответ на приложение извне гипотонического раствора и набухание клетки. Характеристики потенциалзависимой инактивации объёмчувствительного хлорного тока при этом практически не меняются. На основании анализа полученных результатов, выдвинуто предположение, что потенциация тока при нейроэндокринной дифференциации, по крайней мере частично, происходит вследствие снижения ингибирующего воздействия на объёмчувствительный хлорный ток ионов кальция, поступающих в клетку через кальциевые каналы, активирующиеся опустошением внутриклеточных кальциевых депо; а более быстрое развитие тока вызвано перестройкой клеточного цитоскелета при нейронообразном росте.

ВСТУП

В розвитку раку передміхурової залози розрізняють андрогензалежну та андрогеннезалежну стадії. Перехід до андрогеннезалежного росту карциноми простати свідчить про підвищення агресивності пухлини та невтішні прогнози на лікування [10,25]. Серед гетерогенної популяції клітин залози особливу увагу привертають нейроендокринні клітини. Їхнє функціональне значення повністю не з'ясовано, але відомо, що вони є як у дозрілій простаті, так і в тій, що розвивається [10, 11, 12]. При злоякісному переродженні залози в ній збільшується популяція диференційованих нейроендокринних клітин, котрі хоч самі й не проліферують, але мають підвищену стійкість до апоптичної загибелі та справляють стимулювальний паракринний вплив на сусідні карциномні

клітини [7]. Щодо протиапоптичної стійкості нейроендокринних клітин простати, то вона здійснюється через Vcl-2-незалежні шляхи [41], вірогідно, за участю таких білків виживання, як сирвівін [40] і кластерин [21]. Нейроендокринні клітини простати походять зі стовбурових епітеліальних клітин самої залози [17] і експресують простатоспецифічні антигени [2,6], але їм бракує андрогенових рецепторів у ядрі [5,18]. Тому, вони представляють серед простатичних клітин андрогеннечутливу популяцію.

Нещодавно в клітинах карциноми простати людини лінії LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) нами вперше було описано об'ємчутливий хлорний струм [35]. Цей струм активується у відповідь на набрякання клітини при зниженні осмотичності зовнішньоклітинного середовища і реалізує в клітині функцію регуля-

торного відновлення об'єму [30]. Відомо також про активацію об'ємчутливого хлорного струму при нормотонічному зменшенні клітинного об'єму в процесі апоптозу [31,32] і участь цього струму в проліферативних процесах [14]. У кальційзалежній модуляції об'ємчутливого хлорного струму також задіяні механізми, котрі, за останніми даними, зазнають істотних змін під час проапоптичної перебудови кальцієвого гомеостазу [4,18]. Недавні дослідження показали інгібіторний вплив на об'ємрегульовані аніонні канали, котрі переносять об'ємчутливий хлорний струм, іонів Ca^{2+} , що надходять в клітину через кальцієві канали, функціональний стан яких регулюється рівнем наповненості внутрішньоклітинних кальцієвих депо – SOC (store-operated channels) [22]. Вважається, що взаємодія об'ємрегульованих аніонних каналів з Ca^{2+} відбувається в мікродоменах на внутрішній поверхні плазматичної мембрани, недосяжних для змін концентрації кальцію в цитозолі. Припускається також колокалізація SOC і об'ємрегульованих аніонних каналів у клітинній мембрані [22]. Щодо апоптозу, то для андрогензалежних клітин карциноми простати було показано, що власне спустошення кальцієвих депо ендоплазматичного ретикулула призводить до запуску апоптичних процесів [36], але SOC також викликає зацікавленість як потенційний регулятор апоптозу [37].

Зважаючи на те, що нейроендокринне диференціювання клітин карциноми простати може через зміни проліферативного та апоптичного станів клітини впливати на властивості об'ємзалежних аніонних каналів, ми поставили за мету дослідити характеристики об'ємчутливого хлорного струму в популяції нейроендокрино-диференційованих клітин раку простати людини лінії LNCaP. Отримані нами результати свідчать про потенціацію об'ємчутливого хлорного струму в нейроен-

докринних клітинах і прискорення кінетики його розвитку. Експерименти з застосуванням блокатора SERCA2b Ca^{2+} -АТФази саркоендоплазматичного ретикулула тапсигаргіну дозволяють, принаймні частково, пояснити підвищення амплітуди об'ємчутливого хлорного струму, зниженням інгібіторного впливу на нього з боку струму, що переноситься через SOC. Прискорення кінетики розвитку струму, найімовірніше, зумовлене перебудовою цитоскелету клітини в процесі нейрито-подібного росту.

МЕТОДИКА

Клітини лінії LNCaP (American Type Culture Collection) культивували в середовищі RPMI 1640 (фірми "Biowhittaker", Франція) з додаванням 5 ммоль/л L-глутаміну (фірми "Sigma", США), 10%-ї ембріональної бичачої сироватки (фірми "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 з 5 % CO_2 . Для електрофізіологічних досліджень клітини висаджували в чашки Петрі, покриті поліорнітином (фірми "Sigma", США), і використовували протягом 4 – 6 діб. Для нейроендокринного диференціювання клітини інкубували з 1 ммоль/л ДБ-цАМФ ($N^6,2'$ -О-дибутириладенозин $3':5'$ – циклічний монофосфат натрію, фірми "Sigma", США) протягом 3 діб, починаючи з 2-ї доби після пасажу.

Мембранні струми в клітинах LNCaP реєстрували з використанням методики "patch-clamp" у конфігурації "ціла клітина". Склад ізо- та гіпотонічних зовнішніх розчинів наведено в таблиці. Зовнішньоклітинні розчини готували на базі тетраетиламонію як основного катіона для того, щоб надійно заблокувати потенціалзалежний тетраетиламонійчутливий калієвий струм, наявний у клітинах LNCaP [35].

Склад зовнішньоклітинних 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
Тетраетиламоній-Cl	-	145	80

Осмогичність ізо- та гіпотонічних розчинів становила 310 та 190 мОсм/л відповідно і вимірювали її за допомогою кріоскопічного осмометра Osmomat 030 (“Gonotec”, Велика Британія). Піпетку для реєстрації заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): КОН – 100, KCl – 40, MgCl₂ – 1, HEPES – 10, EGTA – 8, Mg-АТФ – 5, CaCl₂ – 2,6; рН 7,2 (доводили L-глутаміновою кислотою). За такого складу розчину концентрація вільного кальцію в клітині підтримувалася на рівні $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Опір піпетки для реєстрації був у межах 4–6 МОм. Заміну зовнішнього розчину проводили за допомогою багатоствольної мікропіпетки зі спільним витоком, який розташовували дуже близько до клітини. Повна заміна розчину відбувалася за час не більший, ніж 1 с. Усі реактиви, які використовували для приготування розчинів були від фірми “Sigma” (США). Експерименти проводили з використанням підсилювача фірми “Dagan” (США) у комплексі з персональним комп’ютером.

Для реєстрації струмів використовувалось програмне забезпечення pCLAMP-6 фірми “Axon Instruments” (США). А для обробки та аналізу результатів – також pCLAMP-8 і програма Origin-6 фірми “Microcal” (США).

Фотографії клітинних популяцій у контролі та за різних термінів інкубації з індуктором нейроендокринного диференціювання були зроблені з використанням

мікроскопа “Leitz Diavert” у фазовому контрасті на плівці Micrat Isoran.

РЕЗУЛЬТАТИ

Морфологічні ознаки нейроендокринного диференціювання LNCaP клітин

Серед процедур нейроендокринного диференціювання клітин простати *in vitro* найуживаніші – це вилучення гормонів з культурального середовища [25] або вплив на клітини фізіологічних, чи фармакологічних агентів, що призводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ (епінефрин, ізопротеренол, форсколін, дибутирил-цАМФ (ДБ-цАМФ), інтерлейкіни 1 і 6, ізобутилметилксантин тощо) [25,9].

При інкубації клітин LNCaP з мембранопроникним аналогом цАМФ – ДБ-цАМФ у концентрації 1 ммоль/л спостерігалася зміна фенотипу клітин і пригнічення проліферативної активності, починаючи вже з першої доби інкубації. Нейроноподібний ріст клітин прогресував відповідно до терміну дії на них ДБ-цАМФ. Фотографії нейроендокринно-диференційованих і контрольних клітин (рис. 1) показують, що вже на другу добу відростки клітин збільшуються і клітини набувають морфологічних ознак нейроендокринних. На п’яту добу – ці ознаки стають ще більш вираженими. “Нейрити” ще значніше збільшуються і стають подібними до переплетеної мережі.

У разі переведення клітин в нормальне культуральне середовище без ДБ-цАМФ уже через 1 добу відзначається повернення клітин до проліферації та поступово – до нормальної форми.

Як у контрольних клітинах карциноми простати лінії LNCaP, так і в експериментальних – тих, що зазнали нейроендокринного диференціювання внаслідок інкубації з ДБ-цАМФ, оцінювалися кінетичні показники розвитку, амплітуда та параметри потенціалзалежної інактивації об'ємчутливого хлорного струму.

Вплив нейроендокринного диференціювання на амплітуду об'ємчутливого хлорного струму

Для відокремлення досліджуваного струму від властивого LNCaP клітинам тетраетиламонійчутливого калієвого струму, використовувалися зовнішньоклітинні

розчини, де основним катіоном був тетраетиламоній.

У разі переведення як контрольних клітин LNCaP, так і клітин, що піддавалися ДБ-цАМФ-індукованій нейроендокринній диференціації протягом 3 діб з ізотонічного зовнішньоклітинного розчину (310 мОсм) в аналогічний розчин з тонічністю, зниженою до 190 мОсм (на 40 %), розвивався струм з ознаками зовнішнього випрямлення та потенціалом реверсії – 19 мВ (контроль) і – 22 мВ (нейроендокринно диференційовані клітини), що досить близько до розрахункового рівноважного потенціалу для іонів хлору. Аналіз вольт-амперних характеристик (рис. 2, а) вказує на відсутність істотних змін потенціалзалежності струму при нейроендокринному диференціюванні і, відтак, відсутність активації додаткових крім об'ємчутливого хлорного струму провідностей

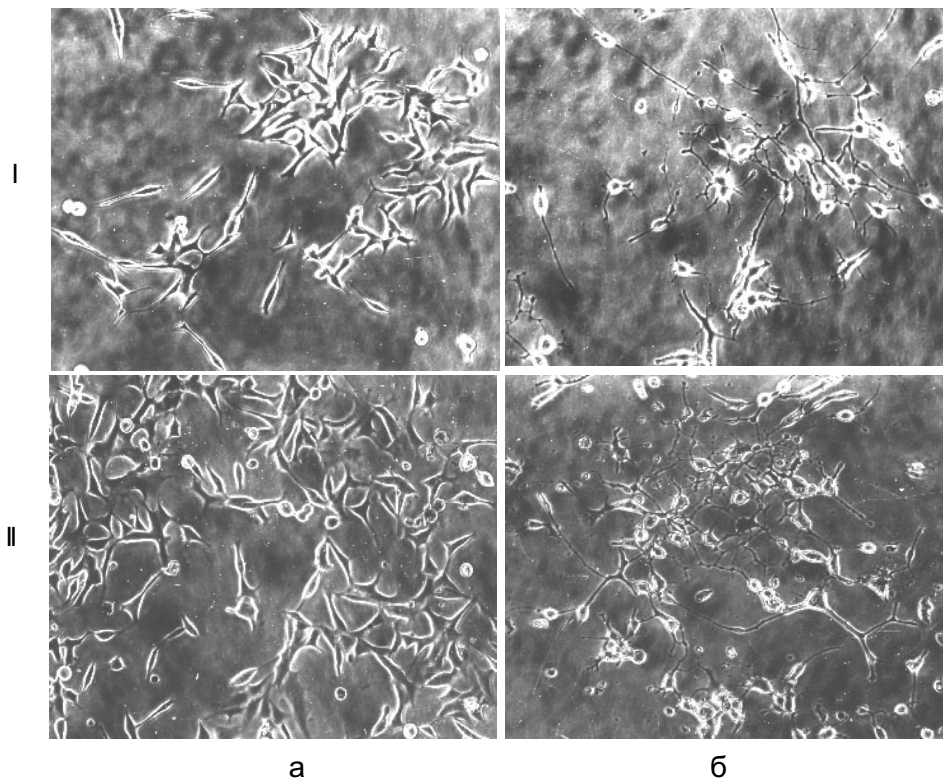


Рис.1. Морфологічні зміни клітин при нейроендокринному диференціюванні:
а – контроль, б – нейроендокринно-диференційовані клітини; I – 2 доби після пасажу, II – 5 діб

в нейроендокринно-диференційованих клітинах у відповідь на гіпоосмотичне набрякання.

Об'ємчутливий хлорний струм реєструвався у відповідь на стимуляцію клітин імпульсами потенціалу, що склалися з фази деполяризації до +100 мВ, фази гіперполяризації до -100 мВ та лінійнозмінного відрізка (зі швидкістю зміни потенціалу 1,6 мВ/мс) між ними (див. рис. 2, б). Це давало можливість одночасно визначати вольт-амперні характеристики струму, оцінюючи таким чином його амплітуду, потенціалзалежність та характеристики випрямлення. Нейроендокринне диференціювання клітин карциноми простати людини мало значний потенціюючий ефект на амплітуду об'ємчутливого хлорного струму, викликаного у відповідь на зниження тонічності зовнішнього розчину. Так, коли в контрольних клітинах розвивався струм густиною $56,2 \text{ пА/пФ} \pm 2,1 \text{ пА/пФ}$ ($n=10$) при потенціалі +100 мВ,

то в експериментальних клітинах це значення підвищувалося до $95,4 \text{ пА/пФ} \pm 6,5 \text{ пА/пФ}$ ($n=11$). Усереднені значення густини струмів представлено на рис. 2, в. Слід зазначити, що в нейроендокринно-диференційованих клітинах розмір базового струму, що існував за ізотонічних умов при наявності тетраетиламонію до початку розвитку ефекту гіпотонічності, практично не відрізнявся від базового струму в контролі (див. рис. 2, в).

Вплив нейроендокринного диференціювання на часові показники розвитку об'ємчутливого хлорного струму

Разом із підвищенням амплітуди об'ємчутливого хлорного струму, нейроендокринне диференціювання клітин лінії LNCaP значною мірою змінювало також показники розвитку струму. Часова затримка розвитку струму, розрахована від моменту прикладання гіпотонічного роз-

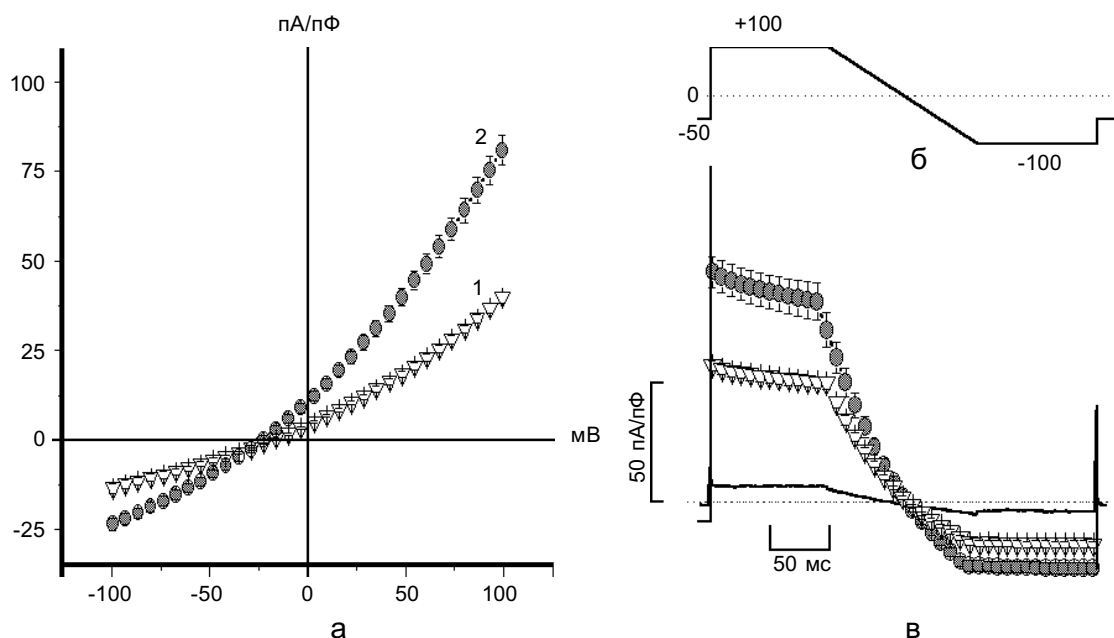


Рис. 2. Потенціалзалежність об'ємчутливого хлорного струму в клітинах карциноми простати людини лінії LNCaP: а – усереднені вольт-амперні характеристики струмів, що розвиваються за гіпотонічних умов у контрольних (1) та нейроендокринно-диференційованих клітинах (2); б – протокол стимуляції; в – середні значення струмів після розвитку ефекту гіпотонічності у відповідь на стимуляцію. Базова лінія – це струм, що реєструвався за ізотонічних умов

чину до підвищення розміру струму до 10 % від його максимального значення, становила $24,4 \pm 2,4$ с ($n=10$) у контролі, а в нейроендокринно-диференційованих клітин зменшувалася до $15 \pm 1,7$ с ($n=11$). Час безпосереднього розвитку струму від 10 до 90 % від його максимального значення для нейроендокринно-диференційованих клітин становив $90 \pm 5,6$ с ($n=11$) порівняно з $110 \pm 7,5$ с в контролі ($n=10$). Таким чином, в нейроендокринно-диференційованих клітинах струм починав розвиватися раніше і розвивався більш швидко порівняно з контролем. Часову залежність розвитку струму в контролі та в експерименті показано на рис. 3.

Вплив нейроендокринного диференціювання на потенціалзалежну інактивацію об'ємчутливого хлорного струму

Досліджуваному нами струму не притаманна потенціалзалежна активація, але однією з головних його рис є здатність до потенціалзалежної інактивації при значних деполяризаційних стимулах [14,28,30].

Набуття клітинами нейроендокринних

ознак, як виявилось, не справляє істотного впливу на інактиваційні характеристики об'ємчутливого хлорного струму. Як у контролі, так і в нейроендокринно-диференційованих клітинах струм, що реєструвався у відповідь на ступінчасту стимуляцію (рис. 4,а) до потенціалів вищих за +60 мВ, виявляв залежну від часу інактивацію, рівень якої збільшувався з підвищенням деполяризації (див.рис. 4, б, г). Стала часу інактивації струму в контролі при +120 мВ становила $234 \text{ мс} \pm 38,2 \text{ мс}$ ($n=10$), а в експериментальних клітин $196,8 \pm 30,6$ ($n=11$), що свідчить про відсутність достовірної різниці. Порівняння кінетики інактивації об'ємчутливого хлорного струму показано на рис. 4, в.

Вплив нейроендокринного диференціювання на кальційзалежну регуляцію об'ємчутливого хлорного струму

Як вже зазначалося, кальційзалежна регуляція об'ємчутливого хлорного струму в клітинах карциноми простати відбувається головним чином за рахунок іонів кальцію, що проникають в клітину через

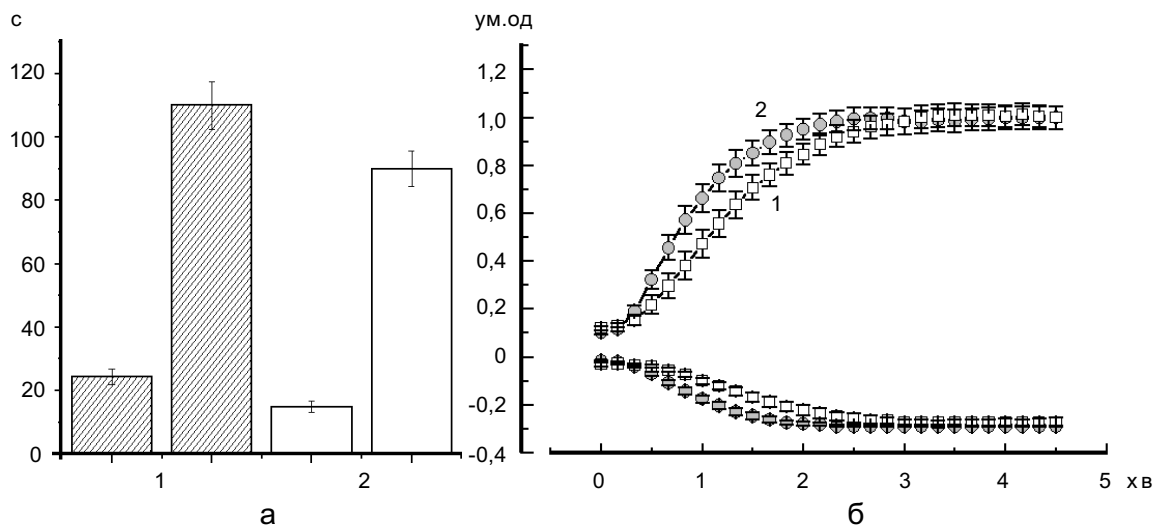


Рис. 3. Кінетичні характеристики об'ємчутливого хлорного струму: а – затримка та розвиток струму в контролі (1) та після нейроендокринної диференціації клітин LNCaP (2), б – часова залежність розвитку струму. Клітини, диференційовані в нейроендокринний фенотип демонструють струм, що за гіпотонічних умов починає розвиватися раніше і розвивається більш швидко (як у вихідному, так і вхідному напрямі) порівняно з контролем

SOC і взаємодіють з каналом у мікродоменах на внутрішній поверхні плазматичної мембрани значною мірою пригнічуючи струм [22].

Зважаючи на отримані результати про збільшення амплітуди об'ємчутливого хлорного струму в нейроендокринно-диференційованих клітинах карциноми простати, ми провели серію експериментів з використанням блокатора SERCA 2b типу кальцієвої АТФази саркоендоплазматичного ретикулула тапсигаргіну, який, як відомо [34], через спустошення кальцієвих депо ендоплазматичного ретикулула активує кальцієву провідність плазматичної мембрани, залежну від наповненості депо. Використання тапсигаргіну показало значне (майже дворазове) зменшення його інгібіторного впливу на об'ємчутливий хлорний струм в нейроендокринно-диференційованих клітинах, порівняно з контролем (рис. 5). Це дозволяє частково віднести спостережений нами ефект

підвищення амплітуди об'ємчутливого хлорного струму при нейроендокринному диференціюванні на рахунок зменшення інгібіторного впливу на струм з боку активованого тапсигаргіном I_{SOC} .

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами результати вказують на те, що нейроендокринна диференціація клітин раку простати призводить до: збільшення амплітуди об'ємчутливого хлорного струму, більш стрімкого розвитку струму у відповідь на зниження осмотичності зовнішньоклітинного розчину та зменшення інгібіторної дії тапсигаргіну на об'ємчутливий хлорний струм.

Відомо також, що нейроендокринні клітини простати складають у тканині пухлини андрогеннезалежну популяцію [5,20]. Таким чином, спостережені нами зміни об'ємчутливої хлорної провідності в клітинах лінії LNCaP при їхньому нейроендокрин-

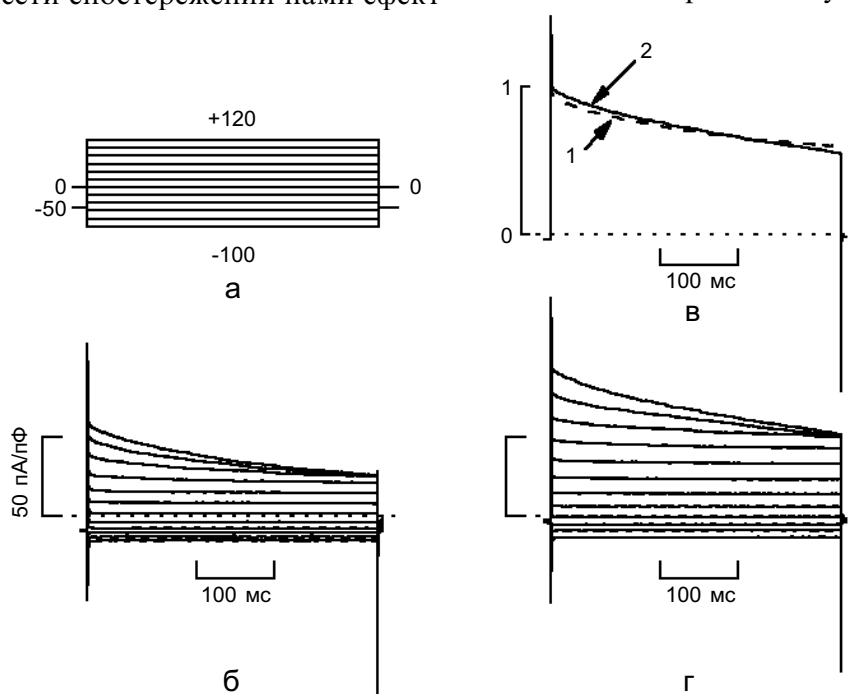


Рис. 4. Інактивацийні характеристики об'ємчутливого хлорного струму в клітинах LNCaP: а – протокол реєстрації, що використовувався для визначення параметрів інактивациї струму, б і г – записи струмів, що розвивалися при стимуляції клітин сходянками потенціалу від -100 до $+120$ мВ у контролі (1) та в диференційованих клітинах (2) відповідно; в – пронормовані струми при $+120$ мВ

ному диференціюванні, можливо, спричинені саме переходом пухлини до андроген-незалежної стадії росту.

Клітини лінії LNCaP втрачають андрогенчутливість також при надекспресії в них протиапоптичного онкопротеїну Bcl-2 [32,37]. Показано, що надекспресія Bcl-2 в клітинах спричинює зменшення наповненості Ca^{2+} депо ендоплазматичного ретикулула [15,33], що вказує також на зв'язок апоптотичної резистивності та кальцієвого струму, активованого при спустошенні депо. Справді, перехід клітин LNCaP до гормоннезалежного росту при надекспресії Bcl-2 супроводжується зменшенням I_{SOC} внаслідок зниження кількості функціональних каналів [33], що є складовою частиною комплексної реорганізації всього внутрішньоклітинного гомеостазу іонів кальцію: зниження наповненості кальцієвих депо в ендоплазматичному ретикулумі, зниження експресії головних білків-переносників Ca^{2+} в ендолемі та значного пригнічення кальцієвого струму плазматичної мембрани, що залежить від рівня наповненості кальцієвих депо ендоплазматичного ретикулула.

Істотних змін зазнає кальцієвий гомеостаз і при нейроендокринній диференціації клітин карциноми простати [25].

З іншого боку, кальцієва модуляція об'ємчутливого хлорного струму в клітинах карциноми простати лінії LNCaP реалізується саме через кальцієві канали, чутливі до наповненості депо ендоплазматичного ретикулула [22]. Іони Ca^{2+} , що проникають в клітину через SOC, у мікродоменах на внутрішній поверхні плазматичної мембрани взаємодіють з об'ємрегульованим аніонним каналом і це призводить до значного пригнічення об'ємчутливого хлорного струму.

Показане нами зменшення інгібіторного впливу тапсигаргіну (опосередкованого через I_{SOC}) на об'ємчутливий хлорний струм у нейроендокринно-диференційованих LNCaP клітинах карциноми простати свідчить про те, що подібно до LNCaP-Bcl-2 клітин, нейроендокринні клітини, можливо, характеризуються зниженням кількості функціональних SOC. Коли таке припущення справедливе, а наші попередні дані свідчать на його користь, то можна говорити про нову, потенційно важливу

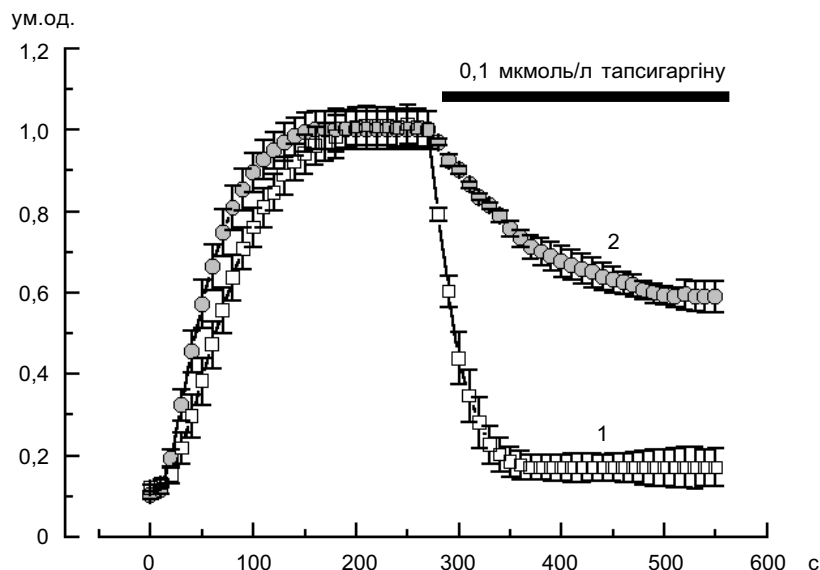


Рис. 5. Ефект 0,1 мкмоль/л тапсигаргіну на об'ємчутливий хлорний струм у контрольних (1) та нейроендокринно-диференційованих клітинах (2) карциноми простати людини

СОС-залежну ланку в змінах об'ємного гомеостазу при переході від андрогензалежного до андрогеннезалежного раку простати. Результати нашого дослідження вказують на те, що ці зміни можуть відбуватися внаслідок підвищення амплітуди об'ємчутливого хлорного струму через зменшення інгібіторного впливу на струм з боку I_{SOC} .

До цих пір мало що відомо про молекулярну структуру об'ємрегульованого аніонного каналу та механізми активації об'ємчутливого хлорного струму. Протягом останніх 10 років висувалися різні кандидати на роль каналу: П-глікопротеїн, pI_{cin} , члени СІС родини Cl^- каналів [14, 28, 30]. Стосовно СІС-3 все ще точаться дискусії. Експерименти з використанням методів транзйентної експресії разом з мутагенезом та імунологічною блокадою вказують на те, що СІС-3 є субодиницею об'ємрегульованого аніонного каналу [13]. Більше того, наші попередні дані свідчать про те, що в клітинах LNCaP саме СІС-3 найімовірніше задіяний у переносі об'ємчутливого хлорного струму. Тому не слід також відкидати припущення про те, що підвищення амплітуди струму при нейроендокринній диференціації разом з послабленням кальцієвого інгібування об'ємрегульованого аніонного каналу може бути також наслідком збільшення експресії канального білка СІС-3.

Нейроендокринного диференціювання клітин LNCaP простати ми досягали тривалим підвищенням концентрації внутрішньоклітинного цАМФ [9], котрий, як відомо, в багатьох типах клітин здатен активувати транскрипцію специфічних генів, що містять цАМФ-чутливий елемент [1]. Регуляторний вплив цАМФ на транскрипцію генів здійснюється опосередковано через протеїнкіназу А і ця регуляція відіграє важливу роль у контролі проліферації, диференціації та виживання [1]. Не виключено, що збільшення концентрації

цАМФ спричинює також підвищення експресії об'ємрегульованого аніонного каналу.

У цілої низки клітин, включаючи кардіоміоцити, гепатоцити щура, лімфомні клітини миші тощо [3,39], спостерігається підвищення вмісту цАМФ у цитозолі при механічному стресі чи осмотичному набряканні. Однак подібного збільшення концентрації цАМФ у клітинах людини не помічено [8]. В епітеліальних клітинах людини Intestine 407 підвищення цАМФ у цитозолі не призводить до активації об'ємчутливого хлорного струму та не впливає на індуковану набряканням активацію [29]. Відтак, вважається, що цАМФ не є активатором каналу, але може виступати в ролі модулятора за певних умов. На клітинах MDCK було показано, що збільшення внутрішньоклітинного вмісту цАМФ спричинює розрив ниток F-актину [26]. Отже, модулююча дія цАМФ на об'ємрегульовані аніонні канали, можливо, опосередковується впливом на цитоскелет і механізм об'ємчутливості.

Загальноприйнята думка про те, що цитоскелет контролює клітинний об'єм [27]. Цитоскелет – це динамічна структура, а філаменти, що його утворюють, здатні до швидкого вкорочення чи подовження [24]. F-актиновий каркас, що формується в підмембранному просторі з актинових філаментів, з'єднаних з білками спектрином, акріном, філаміном та ін. [19], у клітині підтримує структурну цілісність плазматичної мембрани. Показано зміни структури каркасу при осмотичному набряканні клітин. Однак руйнування цитоскелету дигідроцитохалазинами не призводить до активації об'ємрегульованого аніонного каналу, а лише до модуляції – більш крутого наростання струму і збільшення його амплітуди в клітин KB, тобто до збільшення реакції клітин на осмотичний стрес [30].

У разі нейроендокринного диференціювання клітин простати спостерігається зміна морфології клітин, однією з голов-

них ознак якої є нейритоподібне видовження відростків. Про ріст і диференціювання нейробластів відомо, що в процесі формування нейритів утворюються конуси росту, котрі залежно від зовнішньої сигналізації відповідають вибірковою стабілізацією, дестабілізацією чи реорганізацією актинового цитоскелету та мікротрубочок [24]. Отже, оскільки процес нейроендокринної диференціації супроводжується перебудовою F-актинового цитоскелету, можливо, саме це спричинює підвищення чутливості клітин до осмотичного стресу і прискорення розвитку об'ємчутливого хлорного струму.

Коли говорити про механізми підвищення протиапоптичної стійкості нейроендокринно-диференційованих клітин карциноми простати, для андрогеннечутливих клітин ліній TSU-Pr1, DU-145, PC3 відомо, що для запуску апоптозу критичним є тривале підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} внаслідок діяльності SOC [18,38]. Нейроендокринна популяція також характеризується андрогеннечутливістю, а зниження функціональної експресії SOC у клітинах (що можна припустити з отриманих нами результатів), можливо, спричинює зниження транспорту Ca^{2+} в цитоплазму і, відповідно, пригнічення апоптичних процесів.

Ця робота частково підтримана грантом INTAS – 99-01248.

**R.M. Lazarenko, Iu.M. Vitko, N.C. Pogorela,
R.N. Skryma, Ia.M. Shuba**

EFFECTS OF NEUROENDOCRINE DIFFERENTIATION OF LNCaP CANCER CELLS IN HUMAN PROSTATE ON CHARACTERISTICS OF VOLUME-SENSITIVE CHLORIDE CURRENT

By means of patch-clamp technique we examined changes in volume-regulated chloride current ($I_{Cl,swell}$) at neuroendocrine differentiation of androgen-dependent LNCaP prostate cancer cells. In those cells with neuroendocrine differentiation resulted from an increase in the intracellular cAMP, $I_{Cl,swell}$ became much faster in response to applying external hypo-

tonic solution and cell swelling. Changes in final rectification and voltage-dependent inactivation were not detected, as compared to the control cells. The differentiation also diminished $I_{Cl,swell}$ blockade by Ca^{2+} transported via store-operated channels (SOC). On the base of our data we suggest that potentiation of the current at neuroendocrine differentiation, at least in part, resulted from a decrease in an inhibitory effect of Ca^{2+} , transported into a cell through SOC, on volume-sensitive chloride current. Accelerated current in those cells might be induced by cytoskeleton rearrangement at the neuron-like growth.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Alberts B., Bray D., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell. – Garland Publishing. – 1994.
2. 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.
3. Baquet A., Meijer A.J., Hue L. Hepatocyte swelling increases inositol 1,4,5-triphosphate, calcium and cyclic AMP concentration but antagonizes phosphorylase activation by Ca^{2+} dependent hormones // FEBS lett. – 1991. – **278**. – P. 103 – 106.
4. Bian X., Huges F.M.Jr., Huang Y.C.J.A., Putney J.W.Jr. Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells // Amer. J. Physiol. – 1997. – **272**. – P. C1241 – C1249.
5. Bonkhoff H. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status // Ann. Oncol. – 2001. – **12**. – P. 141 – 144.
6. Bonkhoff H., Stein U., Remberger K. Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers // Hum. Pathol. – 1994. – **1**. – P. 42 – 46.
7. Bonkhoff H., Remberger K. Morphogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth // Pathol. Res. Pract. – 1995. – **191**. – P. 833 – 835.
8. Civan M.M., Coca-Prados M., Peterson-Yantorno K. Pathways signaling the regulatory volume decrease of cultured nonpigmented ciliary epithelial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1994. – **35**. – P. 2876 – 2886.
9. 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.
10. 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.
11. di Sant'Agnese P.A. Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and

- therapeutic implications // *Cancer*. – 1992. – **70**. – P. 254 – 268.
12. di Sant'Agnesse P.A. Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects // *Urology*. – 1998. – **51**. – P. 121 – 124.
 13. Duan D., Zhong J., Hermoso M. et al. Functional inhibition of native volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in muscle cells and *Xenopus* oocytes by anti-ClC-3 antibody // *J. Physiol.* – 2001. – **531**. – P. 437 – 444.
 14. Eggermont J., Trouet D., Carton I., Nilius B. Cellular function and control of volume-regulated anion channels // *Cell. Biochem. Biophys.* – 2001. – **35**. – P. 263 – 274.
 15. Foyouzi-Youssefi R., Arnaudeau S., Krause K.H. et al. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – **97**(11). – P. 5723 – 5728.
 16. Furuya Y., Lundmo P., Short A.D. et al. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin // *Cancer Res.* – 1994. – **54**. – P. 6167 – 6175.
 17. Gkonos P.J., Lokeshwar B.L., Balkan W., Roos B.A. Neuroendocrine peptides stimulate adenylyl cyclase in normal and malignant prostate cells // *Regul. Pept.* – 1995. – **59**(1). – P. 43 – 51.
 18. He H., Lam M., McCormick T.S., Distelhorst C.W. Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2 // *J. Cell. Biol.* – 1997. – **138**(6). – P. 1219 – 1228.
 19. Henson J.H. Relationships between the actin cytoskeleton and cell volume regulation // *Microsc. Res. Tech.* – 1999. – **47**. – P. 155 – 162.
 20. 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.
 21. July L.V., Akbari M., Zellweger T. et al. Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy // *Prostate*. – 2002. – **50**. – P. 179 – 188.
 22. 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.
 23. Levitan I., Almonte C., Mollard P., Garber S.S. Modulation of a volume-regulated chloride current by F-actin // *J. Membr. Biol.* – 1995. – **147**(3). – P. 283 – 294.
 24. Lodish H., Berk A., Zipursky S. et al. In: *Molecular Cell. Biolgy*. 4th.ed. Ch. 18.1 The Actin Cytoskeleton. – 2000.
 25. Mariot P., Vanoverberghe K., Lalevee N. et al. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 10824 – 10833.
 26. Mills J.W., Lubin M. Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on volume and cytoskeleton of MDCK cells // *Amer. J. Physiol.* – 1986. – **250**. – P. C319 – C324.
 27. Mills J.W. The cell cytoskeleton: possible role in volume control // *Curr. Top. Membr. Transp.* – 1987. – **30**. – P. 75 – 101.
 28. Nilius B., Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview // *Acta. Physiol. Scand.* – 2003. – **177**. – P. 119-147.
 29. Okada Y., Kubo M., Oiki S. et al. Properties of volume-sensitive Cl⁻ channels in a human epithelial cell line // 1994. – *Jpn. J. Physiol.* – P. S31 – S35.
 30. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **273**. – P. C755 – C789.
 31. Okada Y., Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* – 2001. – **130**. – P. 377 – 383.
 32. Okada Y., Maeno E., Shimizu T. et al. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) // *J. Physiol.* – 2001. – **532**. – P. 3 – 16.
 33. Pinton P., Ferrari D., Magalhaes P. et al. Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells // *J. Cell. Biol.* – 2000. – **148**. – P. 857 – 862.
 34. Raffo A.J., Perlman H., Chen M.W. et al. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo // *Cancer Res.* – 1995. – **55**. – P. 4438 – 4445.
 35. 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.
 36. Skryma R., Mariot P., Bourhis X.L. et al. Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis // *J. Physiol.* – 2000. – **527**. – P. 71 – 83.
 37. Vanden Abeele F., Skryma R., Shuba Y. et al. Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells // *Cancer Cell*. – 2002. – **1**. – P. 169 – 179.
 38. Wang H.G., Pathan N., Ethell I.M. et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD // *Science*. – 1999. – **284**. – P. 339 – 343.
 39. Watson P.A. Direct stimulation of adenylate cyclase by mechanical forces in S49 mouse lymphoma cells during hyposmotic swelling // *J. Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P. 6569 – 6575.
 40. Xing N., Qian J., Bostwick D. et al. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin // *Prostate*. – 2001. – **48**. – P. 7 – 15.
 41. Xue Y., Verhofstad A., Lange W. et al. Prostatic neuroendocrine cells have a unique keratin expression pattern and do not express Bcl-2: cell kinetic features of neuroendocrine cells in the human prostate // *Amer. J. Pathol.* – 1997. – **151**. – P. 1759 – 1765.

*Ин-т фізіології ім. Богомольця НАН України, Київ;
Міжнарод. центр молекул. фізіології НАН України, Київ
Ун-т наук та технологій м. Ліль, Франція*

*Матеріал надійшов до
редакції 7.07.2003*