

Р.М. Лазаренко, Н.Х. Погорела, Я.М. Шуба

Аденозинтрифосфатзалежність об'ємчутливого хлорного струму в клітинах лінії LNCaP карциноми передміхурової залози людини

На андрогензависимых клетках линии LNCaP карциномы простаты человека при помощи метода patch-clamp был исследован эффект аденозинтрифосфата (АТФ) на свойства объемчувствительного хлорного тока ($I_{Cl,swell}$). Для устранения воздействия эндогенно синтезированного АТФ использовались метаболические ингибиторы. Показано, что в клетках в присутствии 5 ммоль/л АТФ в искусственном внутриклеточном растворе, ток в ответ на приложение извне гипотонического раствора и набухание клетки – усиливается. При полном отсутствии АТФ $I_{Cl,swell}$ все равно развивается. Кроме эффекта АТФ, в ходе работы наблюдался также противоположно направленный и независимый от него эффект ионов магния, находящихся во внутриклеточном растворе, на $I_{Cl,swell}$. Под воздействием АТФ потенциал-зависимая инактивация $I_{Cl,swell}$ ослабевала, а под воздействием Mg^{2+} , наоборот, – усиливалась. Стационарный неинактивирующийся ток под влиянием ионов магния в цитозоле существенно уменьшался, а под воздействием АТФ столь же значительно увеличивался. Достоверных различий во временных параметрах развития $I_{Cl,swell}$ в присутствии АТФ или Mg^{2+} не наблюдалось. Хотя эффект токов Mg проявлялся тенденцией к убыстрению реакции клеток на гипосмотический шок, а АТФ – к замедлению. Выдвинуто предположение, что активация тока является АТФ-независимой. Модулирующая потенция же $I_{Cl,swell}$ в присутствии АТФ происходит без гидролиза, а вероятнее всего, вследствие аллостерической регуляции через связывание этого вещества канальными структурами. Эффект Mg^{2+} может быть объяснен его действием как быстрого блокатора (через экранирование поверхностных зарядов на мембране) или как блокатора открытого состояния каналов.

ВСТУП

Останнім часом все більше уваги приділяють вивченню об'ємчутливого хлорного струму ($I_{Cl,swell}$), характерного для багатьох типів клітин [2,6,7,20]. Фізіологічна роль і структура каналів, які реалізують цей тип провідності плазматичної мембрани, досліджені недостатньо. Вихід іонів хлору з клітини при її набряканні внаслідок гіпоосмотичного стресу зумовлює так званий процес регуляторного відновлення клітинного об'єму. Але, очевидно, подібних екстремальних впливів *in vivo* зазнають лише певні типи клітин такі, як клітини епітелію ниркових каналців і травного

тракту [19]. Тоді наявність $I_{Cl,swell}$ у різних типах клітин дає змогу припустити існування якоїсь іншої загальної функції об'ємрегульованих хлорних каналів, важливої для життєдіяльності клітин.

Нещодавно було показано участь $I_{Cl,swell}$ у регуляції проліферативної активності та апоптичної загибелі клітин [5,19,24]. Вивчалася також роль об'ємрегульованого хлорного каналу як ендотеліального механосенсора [1,18]. Досліджувався зв'язок канальної активності з “годинником” клітинного циклу, бо інгібування цих каналів призупиняє проліферацію клітин ендотелію та пригнічує ангіогенез, що може бути

використане для боротьби з пухлинно-індукованою неоваскуляризацією [16,25]. Подібні відкриття спонукають до більш інтенсивного пошуку альтернативних механізмів активації $I_{Cl,swell}$ і шляхів модуляції його активності разом з дослідженням структури каналів.

Активация $I_{Cl,swell}$ є потенціалнезалежною. Тривають дискусії навколо питання про те, який фізичний чи хімічний чинник запускає роботу каналу. Ще належить з'ясувати чи мають клітини “сенсор об'єму”, чи “сенсор розтягнення”, або “розправлення” плазматичної мембрани, і, якщо мають, то яким чином ці структури взаємодіють з каналом.

Очевидно, функції об'ємрегульованих хлорних каналів дещо варіюють у різних типах клітин, а, можливо, такі відмінності вказують на існування різних типів каналів з однієї родини. У різних типів клітин канали можуть бути більш або менш АТФ-залежними. Дія АТФ (у разі АТФ-залежності роботи каналу) теж може реалізовуватися по-різному: в деяких клітинах цей процес є енергозатратним і йде з гідролізом АТФ, але найчастіше відбувається просто алостерична регуляція каналів при зв'язуванні ліганда – АТФ чи його негідролізованих аналогів. І хоча наявність АТФ не є достатньою умовою для активації об'ємрегульованих хлорних каналів, ця речовина у багатьох випадках значною мірою модулює їхню активність [3,10,19,23].

Донедавна загальноприйнятою була думка про АТФ-залежність $I_{Cl,swell}$ і тому для розвитку струму в клітинах лінії LNCaP ми додавали MgATФ у внутрішньоклітинний розчин. Та, використавши в експерименті розчин без АТФ для діалізу клітин, ми не помітили істотної різниці.

Мета цієї роботи – дослідити, чи дійсно $I_{Cl,swell}$ у клітинах карциноми простати не залежить від АТФ, чи все ж таки ця речовина справляє якісь модулюючі впливи на струм.

МЕТОДИКА

Клітини лінії LNCaP (American Type Culture Collection) 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-залежності каналів плазматичної мембрани ендогенну продукцію АТФ ми виключали метаболічними інгібіторами (мкмоль/л): олігоміцину – 40 (макролідного антибіотика, блокатора мітохондріальної АТФази і переносу фосфорильної групи [15]), йодоацетату – 5 (інгібітора ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, відповідального за один із найважливіших етапів гліколізу [12]), ротенону – 20 (інгібітора електронного транспорту в мітохондріях [27]). Перед експериментом клітини інкубували протягом 25–35 хв в розчині Рінгера з додаванням 100 нмоль/л ротенону та 5 ммоль/л 2-деоксиглюкози (мембранно-проникного інгібітора гліколізу [4]), 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 лінії 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 і лінійно-змінного відрізка між ними. Струм, перед індукцією набрякання, вважали за базовий.

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

Зовнішньоклітинні розчини готували на базі тетраетиламонію (ТЕА), як основного катіона, для того, щоб надійно заблокувати потенціалзалежний ТЕА-чутливий калієвий струм, властивий клітинам лінії LNCaP [26]. Осмотичність ізо- та гіпотонічних розчинів вимірювали за допомогою криоскопічного осмометра Osmomat-030 (“Gonotec”, Великобританія) і вона становила 310 та 190 мОсм/л відповідно. Рееструвальну піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): КОН – 100, КСІ – 40, MgCl₂ – 1, HEPES – 10, EGTA – 8, NaАТФ – 5, СаСІ₂ – 2,6; рН 7,2 (доводили L-глутаміновою кислотою). При дослідженні ефекту АТФ використовували внутрішньоклітинний розчин без Mg²⁺, а ефекту цих іонів – без АТФ. Щоб запобігти спонтанному набряканню клітини, внутрішній розчин був гіпотонічним відносно зовнішнього (290 мОсм/л). За такого складу розчину концентрацію вільного кальцію в клітині підтримували на рівні 1·10⁻⁷ моль/л. Опір рееструвальної піпетки був у межах 3–5 МОм.

Заміну зовнішнього розчину проводили

за допомогою багатоканальної мікропіпетки зі спільним витоком, який розташовували дуже близько до клітини. Повну заміну робили не більше ніж за 1 с. Під час експерименту клітини перебували 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 рCLAMP-8 („Axon Instruments”, США), а для обробки та аналізу результатів – Origin-7 („Microcal”, США). Результати представлено у вигляді середніх ± стандартна похибка та оброблено за допомогою критерію t Стьюдента. Різницю з P<0,05 вважали достовірною.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив АТФ і Mg²⁺ на амплітуду I_{Cl,swell}

У цій серії експериментів контрольними вважалися клітини, які не містили АТФ і Mg²⁺ у цитозолі, та піддавалися дії метаболічних блокаторів. Ефект АТФ визначався на клітинах, діалізованих з 5 ммоль/л Na АТФ, а Mg²⁺ – при діалізі розчином з 1 ммоль/л MgCl₂.

При зміні зовнішньоклітинного розчину з ізотонічного на гіпотонічний як у контрольних, так і у дослідних клітинах розвивався струм з ознаками зовнішнього випрямлення (рис. 1,а). Аналіз вольт-амперних характеристик (див. рис. 1,б) вказує на відсутність істотних змін потенціалзалежності струму та його потенціалу реверсії в дослідних і контрольних клітинах. Так, у контролі потенціал реверсії становив -26,4 мВ±2,8 мВ (n=10) і -22,4 мВ±2 мВ (n=26) та -20 мВ±3,2 мВ (n=7) під впливом АТФ і Mg²⁺ відповідно, що досить близько до розрахункового рівноважного потенціалу

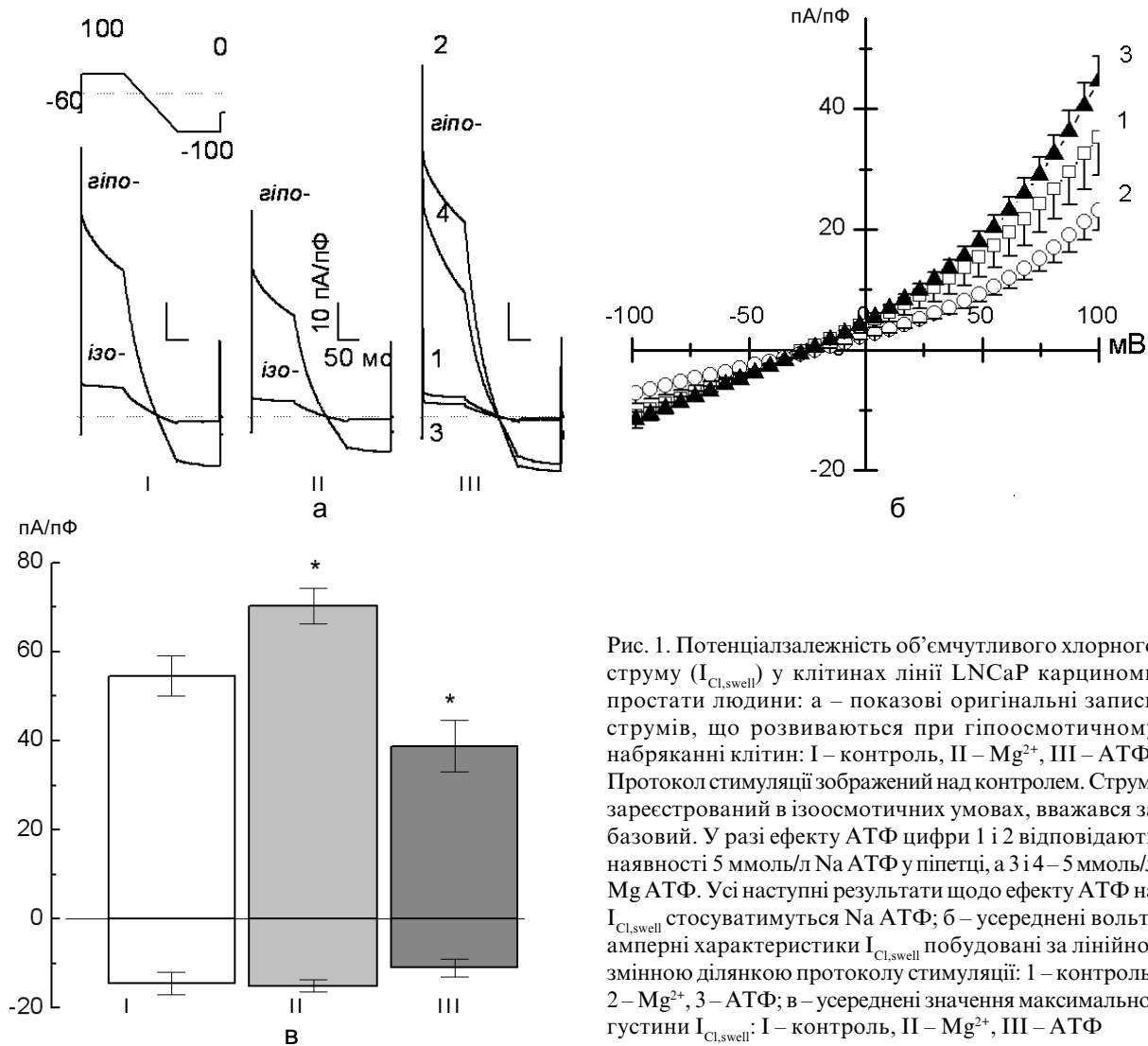


Рис. 1. Потенціалзалежність об'ємчутливого хлорного струму ($I_{Cl,swell}$) у клітинах лінії LNCaP карциноми простати людини: а – показові оригінальні записи струмів, що розвиваються при гіпоосмотичному набряканні клітин: I – контроль, II – Mg^{2+} , III – АТФ. Протокол стимуляції зображений над контролем. Струм, зареєстрований в ізоосмотичних умовах, вважався за базовий. У разі ефекту АТФ цифри 1 і 2 відповідають наявності 5 ммоль/л Na АТФ у піпетці, а 3 і 4 – 5 ммоль/л Mg АТФ. Усі наступні результати щодо ефекту АТФ на $I_{Cl,swell}$ стосуватимуться Na АТФ; б – усереднені вольтамперні характеристики $I_{Cl,swell}$ побудовані за лінійно-змінною ділянкою протоколу стимуляції: 1 – контроль, 2 – Mg^{2+} , 3 – АТФ; в – усереднені значення максимальної густини $I_{Cl,swell}$: I – контроль, II – Mg^{2+} , III – АТФ

для Cl⁻. Загалом, ці результати свідчать, що ні АТФ, ні Mg^{2+} не призводять до активації додаткових, крім $I_{Cl,swell}$, провідностей у клітинах лінії LNCaP у відповідь на гіпоосмотичне набрякання.

Так, АТФ мав значний потенціюючий ефект на амплітуду $I_{Cl,swell}$: коли контрольні клітини мали струм густиною $54,6 \text{ pA} \pm 4,6 \text{ pA/pF}$ ($n=10$) при потенціалі $+100 \text{ мВ}$, то за наявності АТФ цей показник збільшувався на $29,7 \%$ ($n=26$). Вплив іонів магнію, навпаки, зменшував на $30,6 \%$ амплітуду струму ($n=7$). Усереднені значення густини

струмів представлено на рис. 1, в. Амплітуда базового струму (до початку розвитку ефекту гіпотонічності) в контрольних і дослідних клітинах достовірно не відрізнялася.

Вплив АТФ і Mg^{2+} на інактиваційні характеристики об'ємчутливого хлорного струму.

Для $I_{Cl,swell}$ не властива потенціалзалежна активація, але він має здатність до потенціалзалежної інактивації при значних деполяризаційних стимулах [6,19,23]. Як у контрольних, так і в дослідних клітинах

струм, зареєстрований у відповідь на ступінчасту стимуляцію від підтримуваного потенціалу -60 мВ до потенціалів вищих за $+40$ мВ, виявляв залежну від часу інактивацію, рівень якої збільшувався з підвищенням деполяризації (рис. 2,а). При

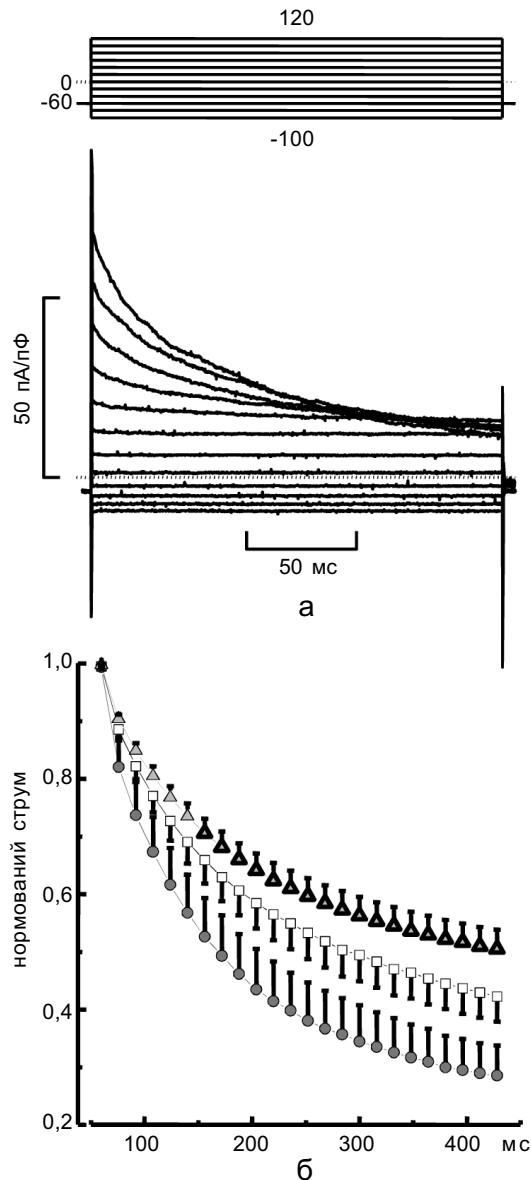


Рис. 2. Вплив АТФ і Mg^{2+} на потенціалзалежну інактивацію об'ємчутливого хлорного струму у клітинах лінії LNCaP карциноми простати людини: а – приклад реєстрації контрольного струму у відповідь на інактиваційний ступінчастий протокол стимуляції, зображений вище; б – усереднені нормовані значення струмів при $+120$ мВ: 1 – контроль, 2 – АТФ, 3 – Mg^{2+}

потенціалі $+120$ мВ зменшення струму внаслідок інактивації в першому наближенні можна було описати як суму спадаючої експоненти та її постійного компонента. Причому стала часу інактивації струму (τ_{in}) при $+120$ мВ мало залежала від експериментальних умов та становила в контролі $150,4 \text{ мс} \pm 17,1 \text{ мс}$ ($n=10$); при дії АТФ – $157,6 \text{ мс} \pm 10,9 \text{ мс}$ ($n=26$) та $155,5 \text{ мс} \pm 22,6 \text{ мс}$ під дією іонів магнію ($n=7$; див рис. 2,б). Потенціалзалежна інактивація $I_{Cl,swell}$ досить повільна, і вольт-амперна характеристика його максимуму не відображає інактиваційного впливу. Його можна оцінити за вольт-амперною характеристикою стаціонарного струму, тобто компонента, що залишається після інактивації (рис.3,а). Вольт-амперна характеристика такого струму залежить не лише від рушійної сили для іонів хлору, а й від стаціонарного рівня інактивації. Отже, поділивши стаціонарні значення струму при кожному рівні потенціалу на максимальні, ми отримали криві залежності стаціонарної інактивації, усереднені значення яких представлені на рис.3,б. Проапроксимували 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}). Для контрольних клітин ці показники були такими: $V_{1/2} = 75,14 \text{ мВ} \pm 8,05 \text{ мВ}$; $k = -45,09 \text{ мВ} \pm 3,03 \text{ мВ}$ та $A_{min} = 0,21 \pm 0,06$ відповідно. У дослідних клітинах спостерігався відчутний вплив ефektorів виключно на A_{min} . Так, наявність АТФ сприяла збільшенню цього показника на 62 %, а Mg^{2+} – істотному зменшенню на 71 %. Потенціалзалежність інактиваційних процесів і рівень половинної інактивації в дослідних клітинах достовірно не відрізнялися від контролю і становили: $k = -41,2 \text{ мВ} \pm 1,7 \text{ мВ}$ і $V_{1/2} = 73,7 \text{ мВ} \pm 4,1 \text{ мВ}$ за наявності АТФ і $k = -41,9 \text{ мВ} \pm 3,3 \text{ мВ}$ та $V_{1/2} = 74,3 \text{ мВ} \pm 8,4 \text{ мВ}$ – за наявності Mg^{2+} .

Вплив АТФ і Mg^{2+} на часові показники розвитку $I_{Cl,swell}$

Кінетику розвитку досліджуваних струмів ми характеризували за латентним пе-

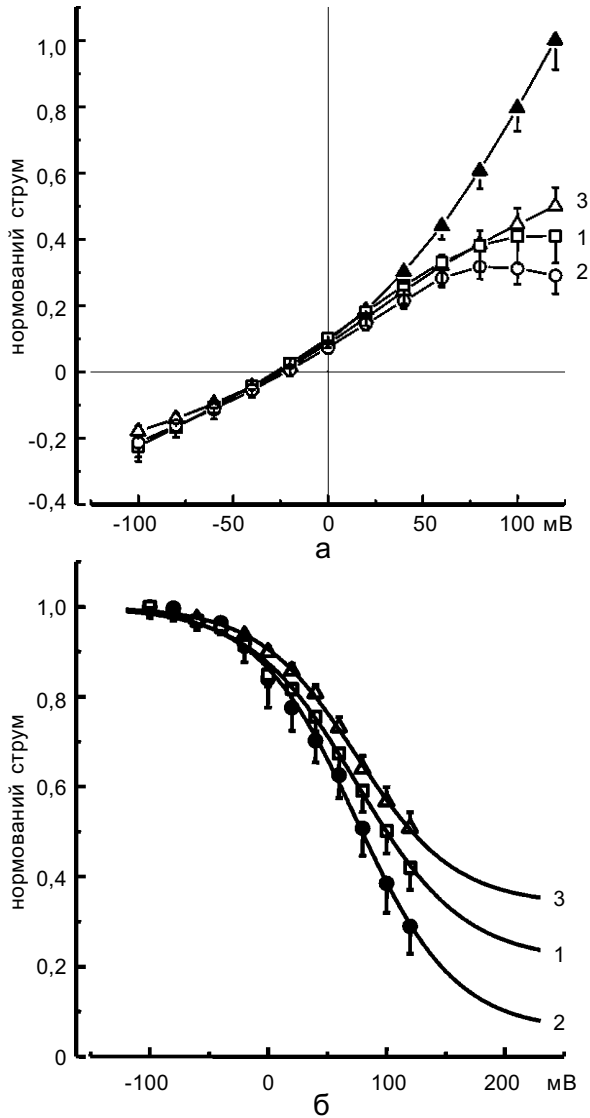


Рис. 3. Вплив АТФ і Mg^{2+} на стаціонарну інактивацію об'ємчутливого хлорного струму ($I_{Cl,swell}$) у клітинах лінії LNCaP карциноми простати людини: а – порівняння усереднених нормованих значень стаціонарних струмів при +120 мВ у контролі (1), під впливом Mg^{2+} (2) і АТФ (3), (забарвлення у разі максимального струму і прозорість у разі стаціонарного рівня струму); б – усереднені значення стаціонарної інактивації $I_{Cl,swell}$ у контролі (1), під впливом Mg^{2+} (2) та АТФ (3). Суцільні лінії найкращим чином апроксимують експериментальні точки за рівнянням Больцмана

ріодом і часом розвитку. За латентний період вважався час від моменту прикладання гіпотонічного розчину до збільшення струму на 10 % від його максимального значення, а час розвитку струму – від 10 до 90 % (рис.4,а). Слід зазначити, що латент-

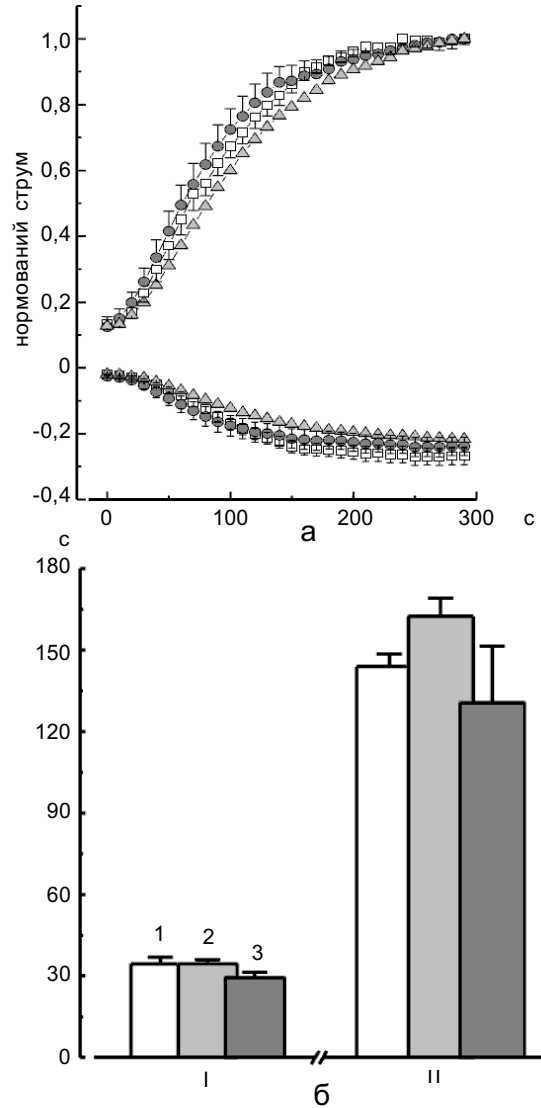


Рис. 4. Вплив АТФ і Mg^{2+} на характеристики розвитку об'ємчутливого хлорного струму ($I_{Cl,swell}$) у клітинах лінії LNCaP карциноми простати людини: а – часова залежність розвитку $I_{Cl,swell}$ у відповідь на зниження осмотичності зовнішньоклітинного середовища: квадратики – контроль, кружечки – вплив Mg^{2+} , трикутники – вплив АТФ; б – обчислені латентні періоди (I) та власне періоди розвитку струмів (II) у контролі (1), за наявності АТФ (2) та Mg^{2+} (3)

ний період для контрольних і дослідних клітин, котрі піддавалися впливові АТФ, практично не відрізнявся і становив у контролі 34 ± 2 с ($n=10$; див. рис. 4,6), а за наявності АТФ – $34,5 \pm 2$ с ($n=21$). Iони Mg спричиняли більш швидку реакцію струму на гіпоосмотичний шок – латентний період скорочувався до $29,5 \pm 2,0$ с ($n=7$, $P=0,15$). Час розвитку струму за наявності Mg^{2+} також виявляв тенденцію до зменшення і становив $130 \pm 20,8$ с ($n=7$, $P=0,47$) порівняно з 144 ± 5 с у контролі; а АТФ, навпаки подовжував цей період до 162 ± 7 с ($n=21$, $P=0,98$). Таким чином, усі спостережені нами зміни кінетики розвитку струмів мали лише тенденційний характер.

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами результати свідчать про наступне: активація $I_{Cl,swell}$ у клітинах лінії LNCaP карциноми простати людини у відповідь на гіпоосмотичне набрякання відбувається незалежно від АТФ у цитозолі; АТФ справляє модулюючий вплив на струм, що виявляється в збільшенні його амплітуди, стаціонарного неінактивованого струму і сповільненні реакції струму на гіпоосмотичний шок; дія Mg^{2+} характеризується прямо протилежними ефектами, тобто зниженням амплітуди $I_{Cl,swell}$ і зменшенням його стаціонарної інактивації; вплив АТФ на струм не залежить від Mg^{2+} , що може вказувати на регуляцію каналу через алостеричне зв'язування, а не через фосфорилування за участі протеїнкіназ.

Точні механізми активації $I_{Cl,swell}$ невідомі. І хоча є відомості про можливості активації цієї провідності за ізотонічних умов [2,6,19], все ж широко апробованим і виправданим способом активувати цей струм вважається зниження осмотичності зовнішньоклітинного розчину [20,23].

Яким чином набрякання активує $I_{Cl,swell}$, невідомо, однак показано, що два важливі фізіологічні показники, а саме: зміна іонної

сили в цитоплазмі [21] і вміст цитозольного АТФ [10] модулюють активацію. Внутрішньоклітинна іонна сила впливає як на рівень активації, так і на чутливість каналу до змін об'єму [23]. Вважається, що це відбувається через вплив на електростатичні взаємодії білків об'ємрегульованого хлорного каналу та допоміжних білків чи білків цитоскелета. Інгібуючу дію на $I_{Cl,swell}$ зростаючих концентрацій Mg^{2+} у цитозолі також можна пояснити з позицій електростатичних відносин білок-білок [23].

Нині домінуючою є думка про АТФ-залежність $I_{Cl,swell}$ [10,20,23]. Для багатьох типів клітин описано модуляцію індукованої набряканням активації аніонного струму зовнішнього випрямлення, $I_{Cl,swell}$ у разі прикладання АТФ. У клітинах Intestine 407 зменшення концентрації АТФ у внутрішньоклітинному розчині з 0,1 до 0,01 ммоль/л призводить до лише незначного зниження інтегрального струму, в той час як застосування метаболічних інгібіторів (1 мкмоль/л карбоніл-ціанід р-трифлорметоксифенілгідразону, 1 мкмоль/л йодоацетату і 40 мкмоль/л олігоміцину) майже повністю усуває $I_{Cl,swell}$ [22]. Також повідомляється, що метаболічне вилучення АТФ з цитоплазми унеможливує активацію $I_{Cl,swell}$ у клітинах гліоми шкура та гепатоцитах ската [9] або спричинює спад індукованого набряканням струму в ендотеліальних клітинах людини [20].

На відміну від більшості літературних даних, наші результати показують, що в клітинах лінії LNCaP вилучення АТФ з цитозолу разом з блокадою його синтезу лише незначною мірою знижує амплітуду $I_{Cl,swell}$. Очевидно, функції об'ємчутливих хлорних каналів дещо варіюють у різних типах клітин, а можливо такі відмінності вказують на існування різних типів каналів.

Дослідження впливу АТФ на $I_{Cl,swell}$ виявили, що його аналоги, котрі не гідролізуються (АТФ γ S, АМФ-PNP, β , γ -метиленаденозин 5'-трифосфат) здатні замінити АТФ у багатьох типах клітин. Так само за

відсутності Mg^{2+} , потрібного для протеїнкіназної активності, найчастіше ефект АТФ зберігається. Тобто, виявляється, що вплив АТФ на $I_{Cl,swell}$ реалізується в більшості клітин без гідролізу, а внаслідок зв'язування [23].

За нашими результатами, збільшення амплітуди $I_{Cl,swell}$ у клітинах лінії LNCaP під дією АТФ спостерігається також і за відсутності Mg^{2+} у цитозолі а, відтак, не потребує гідролізу. Зважаючи на літературні дані, можна припускати, що і в клітинах раку простати для модуляції $I_{Cl,swell}$ потрібне зв'язування АТФ білком каналу чи допоміжними білками.

На клітинах нейробластоми N1E115 також було показано, що для активації $I_{Cl,swell}$ має значення лише зв'язування АТФ, а не гідроліз. Крім того, ці клітини виявили два механізми активації струму: АТФ-чутливий, який спостерігається при осмотичному збільшенні об'єму клітини на 15–55 % від початкового рівня, та АТФ-нечутливий при збільшенні об'єму клітини понад 65 % [3]. Таким чином, у клітинах нейробластоми АТФ-залежність каналу не є сталим явищем, а модулюється залежно від умов, в які потрапляє клітина.

У наших експериментах на клітинах лінії LNCaP ми досліджували струм при зниженні на 40% осмотичності зовнішньоклітинного розчину за аналогією з нашими попередніми роботами і виявили, що за таких умов візуально спостерігається значне набрякання клітин, а $I_{Cl,swell}$ може модулюватися АТФ.

Внутрішньоклітинний пул АТФ крім багатьох інших призначень, використовується також для синтезу цАМФ, що відіграє роль вторинного посередника в численних процесах внутрішньоклітинної сигналізації. Як було показано в наших попередніх дослідженнях, тривале підвищення внутрішньоклітинної концентрації цАМФ у клітинах карциноми простати людини індукує нейроендокринну диференціацію цих клітин, що супроводжується збільшенням амплітуди $I_{Cl,swell}$. А відомо, що

вміст цитоплазматичного цАМФ у деяких клітинах збільшується під дією механічного стресу чи осмотичного набрякання [29]. Можливо, зростаючі концентрації цАМФ також роблять свій внесок в активацію $I_{Cl,swell}$ при осмотичному набряканні клітин карциноми простати людини, і це, певним чином, знову є опосередкованим ефектом АТФ.

У багатьох клітинах вилучення АТФ супроводжується значними змінами цитоскелета внаслідок деполімеризації актину, асоційованого з кортикальними ділянками епітеліальних клітин [8]. F-актиновий каркас, що формується в підмембранному просторі, підтримує структурну цілісність плазматичної мембрани. Є багато відомостей про зміни структури каркасу при осмотичному набряканні клітин [23]. Однак руйнування цитоскелета дигідроцитохалазинами не призводить до активації $I_{Cl,swell}$, а лише до модуляції – більш крутого наростання струму і збільшення його амплітуди в клітинах KB, тобто до збільшення реакції клітин на осмотичний стрес [14,23].

Таким чином, можливо, спостережена нами тенденція до прискорення реакції $I_{Cl,swell}$ на гіпоосмотичний шок у клітинах лінії LNCaP за відсутності АТФ у цитозолі також відбувається внаслідок змін цитоскелета.

Роль Mg^{2+} у клітині надзвичайно важлива. Для АТФазної активності ці іони потрібні, можливо, тому, що вони є частиною істинного субстрату – $MgATP$. Відомо, що вміст цитоплазматичного Mg^{2+} регулює низку таких транспортних систем клітини, як АТФ-залежна іонна помпа, Na^+-Ca^{2+} -антипорт, Na^+-H^+ -антипорт, $Na^+-K^+-2Cl^-$ -симпорт, та K^+-Cl^- -симпорт. Наявність Mg^{2+} у цитозолі є передумовою об'ємчутливості K^+-Cl^- симпорта в еритроцитах вівці, для яких притаманний низький вміст калію [23].

Щодо впливу Mg^{2+} на $I_{Cl,swell}$, то на клітинах Intestine 407 було показано, що під

дією вільного Mg^{2+} прискорюється інактивація $I_{Cl,swell}$ [22]. З підвищенням концентрації Mg^{2+} у цитозолі при сталому вмісті АТФ, потенціалзалежна інактивація струмів прискорюється і стаціонарний струм, що залишається після повної інактивації – знижується. Mg^{2+} , наявний у цитозолі у вільному стані, зсуває криву потенціалзалежності стаціонарної інактивації ліворуч. Ці результати свідчать про те, що Mg^{2+} є блокатром відкритих об'єрегульованих аніонних каналів, так само, як і у разі з іншими катіонними каналами (калієвими каналами внутрішнього випрямлення, кальцієвими каналами, натрієвими та глутаматними NMDA-рецепторами) [22,23].

На користь гіпотези про блокування відкритих каналів внутрішньоклітинними катіонами (і в тому числі Mg^{2+}) говорить той факт, що інактивація $I_{Cl,swell}$ у клітинах Intestine 407 сповільнюється внаслідок вимивання або виштовхування цих катіонів зростаючим потоком аніонів, котрі спрямовуються в клітину при збільшенні зовнішньоклітинної концентрації хлору [22]. Підтверджує ідею щодо блокування іонами магнію аніонних каналів у відкритому стані також те, що інактивація вихідних аніонних струмів у набряклих M-1-клітинах сповільнюється при використанні більш проникних, порівняно з Cl^- аніонів таких, як SCN^- , I^- і Br^- [17].

Ми також спостерігали збільшення інактивації та зниження стаціонарного об'ємчутливого хлорного струму під дією Mg^{2+} . Таким чином, останній у клітинах LNCaP, імовірно, теж впливає на $I_{Cl,swell}$ як блокатр відкритих каналів. Крім очевидного впливу Mg^{2+} на інактивацію $I_{Cl,swell}$ у клітинах карциноми простати людини, ми спостерігали також зниження амплітуди інтегрального струму.

У попередніх наших роботах було показано, що об'єрегульований аніонний канал у своєму складі містить структурний внутрішньоклітинний інактиваційний домен [28], очевидно, іони Mg стабілізують цю структуру. Попри очевидність інгібіторного впливу

на об'ємчутливий хлорний струм у клітинах LNCaP, саме по собі зниження концентрації Mg^{2+} в цитозолі не веде до активації $I_{Cl,swell}$, а може лише сприяти їй [23].

АТФ-залежність дослідженого нами об'ємчутливого хлорного струму дозволяє припустити, що в клітинах карциноми простати він буде реагувати на зміни клітинного метаболізму. За патологічних умов, наприклад при ішемії, активація об'єрегульованих хлорних каналів значною мірою пригнічуватиметься не лише через зниження вмісту АТФ, але й внаслідок індукованого цим зниженням підвищення концентрації вільного Mg^{2+} у цитоплазмі.

При регуляції об'єму, крім виходу Cl^- , відбувається ще й вихід структурно різноманітних органічних осмолітів через об'єрегульовані аніонні канали. Крім того, канал високопроникний для таких важливих метаболічних посередників, як піруват, коротколанцюгові жирні кислоти, ацетат, бітурат, кетонні тіла і деякі амінокислоти [6,11]. Ці метаболіти (посередньо) входять до циклу трикарбонових кислот. Відтак, модуляція струму за допомогою АТФ може бути важливим фактором регуляторного зворотного зв'язку в енергетичному метаболізмі. Зменшення активності каналу у разі нестачі АТФ може попереджати втрати клітиною енергетичних ресурсів – клітина таким чином намагається захистити свій метаболізм. І хоча точні механізми впливу АТФ на роботу об'єрегульованого хлорного каналу ще належить з'ясувати, безумовно, ця властивість каналу має виняткове значення.

R.M. Lazarenko, N.Ch. Pogorela, Y.M. Shuba

THE ATP DEPENDENCE OF VOLUME SENSITIVE CHLORIDE CURRENT, $I_{Cl,swell}$ IN LNCaP HUMAN PROSTATE CANCER CELLS

Although sensitivity to intracellular ATP is considered to be one of the hallmarks of swelling activated Cl^- current ($I_{Cl,swell}$) involved in regulatory volume decrease (RVD) following hypotonic stress, the type and manner of such sensitivity seems

to vary in different cell types. Here by using whole-cell patch-clamp recording we investigated ATP sensitivity of $I_{Cl,swell}$ in LNCaP human prostate cancer cell line. Suppression of endogenous ATP production with metabolic inhibitors (oligomycin, iodoacetate and rotenone) during cell dialysis with ATP- and Mg^{2+} -free pipette solution did not prevent $I_{Cl,swell}$ in response to hypotonic exposure. However, supplementing this solution with 5 mM Na-ATP led to the development of $I_{Cl,swell}$ with nearly 305 higher density and less pronounced voltage-dependent inactivation (manifested mainly by the increase of non-inactivated current component) at positive potentials. On the contrary, inclusion of 1mM Mg^{2+} in the patch pipette resulted in even smaller $I_{Cl,swell}$ (30% lower density compared to Mg^{2+} -free conditions), which inactivated completely on prolonged depolarization. The presence of 5 mM Mg -ATP in the pipette did not affect $I_{Cl,swell}$ density. Neither intervention significantly altered the rate of $I_{Cl,swell}$ development in response to hypotonicity. We conclude that intracellular ATP, a positive modulator of $I_{Cl,swell}$ -carrying volume-regulated anion channel (VRAC) in LNCaP cells most likely acts via binding rather than hydrolysis and/or phosphorylation reactions, whereas intracellular Mg^{2+} is VRAC inhibitor.

O. O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Barakat A.I., Leavea E.V., Pappone P.A., Davies P.F. A flow-activated chloride-selective membrane current in vascular endothelial cells // *Circulat. Res.* – 1999. – **85**. – P. 820–828.
- Baumgarten C.M., Clemler H.F. Swelling-activated chloride channels in cardiac physiology and pathophysiology // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.* – 2003. – **82**. – P. 25–42.
- 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.
- Culic O., Gruwel M.L., Schrader J. Energy turnover of vascular endothelial cells // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **273**. – P. 205–213.
- Doroshenko P., Sabanov V., Doroshenko N. Cell cycle-related changes in regulatory volume decrease and volume-sensitive chloride conductance in mouse fibroblasts // *J. Cell. Physiol.* – 2001. – **187**. – P. 65–72.
- 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.
- Estevez A.Y., Bond T., Strange K. Regulation of $I_{Cl,swell}$ in neuroblastoma cells by G protein signaling pathways // *Amer. J. Physiol.* – 2001. – **281**. – P. C89–C98.
- Golenhofen N., Doctro R.B., Bacalao R., Mandell L.J. Actin and villin compartmentation during ATP depletion and recovery in renal cultured cells // *Kidney Int.* – 1996. – **48**. – P. 1837–1845.
- Jackson P.S., Churchwell K., Ballatori N. et al. Swelling-activated anion conductance in skate hepatocytes: regulation by cell Cl and ATP // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **270**. – P. C57–C66.
- Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels // *Physiol. Rev.* – 2001. – **82**. – P. 503–568.
- Kirk K., Strange K. Functional properties and physiological roles of organic solute channels // *Annu Rev Physiol.* – 1998. – **60**. – P. 719–739.
- Lehninger A.L. Principles of Biochemistry // Worth Publishers, Inc. – 1985. – **2**. – P. 385–551.
- Lemonnier L., Prevarskaya N., Shuba Y., Vandenberg A.E., Nilius B., Mazurier J., Skryma R. Ca^{2+} modulation of volume-regulated anion channels: evidence for colocalization with store-operated channels // *FASEB J.* – 2002. – **16**. – P. 222–224.
- 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.
- 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.
- Manolopoulos V.G., Liekens S., Koolwijk P. et al. Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels // *Gen. Pharmacol.* – 2000. – **34**. – P. 107–116.
- Meyer K., Kobmayer C. ATP-dependent voltage-gated chloride channels in M1-mouse cortical collecting duct cells // *J. Gen. Physiol.* – 1996. – **108**. – P. 177–193.
- Nakao M., Ono K., Fujisawa S., Lijima T. Mechanical stress-induced Ca^{2+} entry and Cl^- current in cultured human aortic endothelial cells // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **276**. – P. 238–249.
- Nilius B., Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview // *Acta Physiol Scand.* – 2003. – **177**(2). – P. 119–147.
- Nilius B., Eggermont J., Droogmans G. The Endothelial Volume-Regulated Anion Channel, VRAC // *Cell Physiol Biochem.* – 2000. – **10**. – P. 313–320.
- Nilius B., Prenen J., Voets T. et al. Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1998. – **506**. – P. 353–361.
- Oiki S., Kubo M., Okada Y. Mg^{2+} and ATP-dependence of volume-sensitive Cl channels in human epithelial cells // *Jpn. J. Physiol.* – 1994. – **44**, Suppl. 2. – P. S77–S79.
- 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.
- 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.

25. Shen M., Droogmans G., Eggermont J. et al. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells // *J. Physiol. (Lond.)*. – 2000. – **529**. – P. 385–394.
26. 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.
27. 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.
28. Vitko Y.M., Pogorelaya N.H., Prevarskaya N. et al. Proteolytic modification of swelling-activated Cl⁻ current in LNCaP prostate cancer epithelial cells // *J. Bioenerg Biomembr.* – 2002. – **34**(4). – P. 307–315.
29. Watson P.A. Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation // *FASEB J.* – 1991. – **5**. – P. 2013–2019.

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

*Матеріал надійшов до
редакції 06.08.2004*