

А.П. Кондрацький, Г.В. Соткіс, О. І. Болдирєв, К.О. Кондрацька,  
О.П. Любанова, Ю.Б. Дискіна, Д.В. Гордієнко, Я.М. Шуба

## Функціональна ідентифікація холодового рецептора TRPM8 в епітеліальних клітинах простати щура

*Впервые на функциональном уровне при помощи электрофизиологии продемонстрирована экспрессия холод-ментолчувствительного катионного канала (TRPM8) в плазматической мембране секреторных эпителиальных клеток простаты крысы. Показано, что ступенчатое понижение температуры внеклеточного раствора от 33 до 21°C приводило к появлению тока с характеристиками внешнего выпрямления и равновесным потенциалом около 0 мВ, которые характерны для активации TRPM8. Внеклеточное приложение химического аналога ментола в концентрации 100 мкмоль/л при 33°C способствовало активации аналогичного тока. Холод- и ментолаktivированные токи наблюдались только в эпителиальных клетках продолговатой формы, которые на срезах простаты помечены антицитокератином 8, что свидетельствует об их принадлежности к апикальному секреторному фенотипу, тогда как в круглых, очевидно базальных клетках, понижение температуры и приложение ментола не вызывали никаких ответов. Сделан вывод, что в нормальной простате крысы TRPM8 экспрессируется на функциональном уровне в плазматической мембране полностью дифференцированных апикальных клеток секреторного эпителия.*

### ВСТУП

Кальцієва сигналізація відіграє регуляторну роль у перебігу таких важливих фізіологічних і патофізіологічних процесів, як секреція гормонів і нейромедіаторів, скорочення м'язів, експресія генів, проліферація, апоптоз тощо. Родина катіонних каналів TRP (від англ. transient receptor potential) є одним із можливих шляхів надходження  $\text{Ca}^{2+}$  всередину клітини. Ці канали широко експресовані в багатьох типах клітин, де вони задіяні у головних процесах. Родина TRP-каналів ссавців дуже неоднорідна. Хоч усі вони за своєю структурою та топологією нагадують потенціалзалежні калієві канали, тобто складаються з шести трансмембранних сегментів і ділянки пори, розташованої між п'ятим і шостим з них, – за схожістю амінокислотних послідовностей вони були розподілені на сім підродин: TRPC, TRPV,

TRPM, TRPA, TRPP, TRPML та TRPN [15]. TRP-канали відзначаються надзвичайною різноманітністю механізмів керування, які включають хімічні та механічні стимули, цитоплазматичні та ліпідні вторинні посередники, потенціал, стан наповнення внутрішньоклітинних кальцієвих депо, набухання клітин, кривизну плазматичної мембрани тощо. Серед них виділяють групу, представники якої реагують на зміни температури як у бік її підвищення, так і пониження відносно температури тіла. Такі канали називають термо-TRP. За своєю структурою вони відносяться до різних підродин, а об'єднує їх лише термочутливість. При цьому термо-TRP-канали, які активуються у відповідь на різні модальності гарячого (від теплого до пекучого) належать до ванілоїдної підродини – TRPV, на помірно охолодження – до меластатинової – TRPM – підродини, а на морозний

© А.П. Кондрацький, Г.В. Соткіс, О. І. Болдирєв, К.О. Кондрацька, О.П. Любанова, Ю.Б. Дискіна, Д.В. Гордієнко, Я.М. Шуба

холод – до анкиринової – TRPA-підродини [6]. Одним з найбільш цікавих представників цієї групи є холодовий рецептор TRPM8 з TRPM-підродини каналів [11], який відповідає на помірні пониження температури в діапазоні, що не викликає больових відчуттів (тобто до 8° C). TRPM8 також активується хімічними сполуками, що відіграють роль хімічних аналогів холоду, спричиняючи відчуття охолодження – ментолом, іциліном та їх похідними. Вважається, що основною фізіологічною функцією TRPM8 є сприйняття холодового стимулу сенсорними нейронами та його перетворення в електрохімічну форму, здатну до розповсюдження в інтегративні центри ЦНС [1,5,14]. Цікаво, що крім сенсорних нейронів TRPM8 найбільш широко експресується в простаті – органі, який суттєво не реагує на коливання температури [4,7,8,10]. Більше того, рівень експресії TRPM8 істотно підвищується при раку простати. Значна експресія також спостерігається у розповсюджених пухлинах людини, включаючи рак молочної залози, товстої кишки, легенів і шкіри, в той час як у відповідних нормальних тканинах вона практично відсутня [7,19]. Ці дані говорять про те, що крім детекції температури TRPM8, імовірно, може виконувати й інші важливі функції як у простаті, так і при канцерогенезі [22].

Більшість даних стосовно простатно-специфічного TRPM8 були отримані на епітеліальних клітинах лінії LNCaP раку простати людини та на первинних клітинах, одержаних зі зразків тканини раку та доброякісної гіперплазії простати [18,21,22]. На клітинах лінії LNCaP, зокрема, було показано, що TRPM8 може і не локалізуватися у плазматичній мембрані, як це відбувається у сенсорних нейронах, а знаходитися виключно у мембрані ендоплазматичного ретикулума (ER) [18]. Вважається, що переважна плазмолемальна або ендоплазматична локалізація TRPM8 зумовлена

існуванням двох сплайс-варіантів цього каналу – повномірного та вкороченого, з яких останній не тільки сам експресується в мембрані ER, а і сприяє затримці в ній повномірної форми [18].

Незважаючи на значний прогрес у дослідженні як нейронального TRPM8, так і експресованого у ракових клітинах простати, практично невідомо, чи цей канал функціонує у нормальній простаті. У цій роботі ми вперше показали, що канал TRPM8 функціонально експресується у плазматичній мембрані нормальних епітеліальних клітин простати щура. Причому ця експресія спостерігається тільки у диференційованих апікальних епітеліальних клітинах, які у відповідь на охолодження або ментол генерують “класичний” TRPM8-опосередкований струм, і відсутня у базальних клітинах. Наші результати ще раз підтверджують необхідність диференціації епітеліальних клітин простати для мембранної експресії TRPM8, як це було показано для клітин раку простати людини.

## МЕТОДИКА

*Виділення ізольованих епітеліальних клітин з простати щура.* В експериментах використовували статевозрілих щурів-самців масою 300–350 г. Тварин декапітували після анестезії ефіром. Вентральну, латеральну та дорсальну частки простати швидко вирізали та вміщували у холодний (4° C) розчин (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5, глюкоза – 10, HEPES – 10, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 1 (pH 7,4). Жирову оболонку вилучали, тканину, яка залишалася, подрібнювали ножицями на невеликі фрагменти (близько 1 мм<sup>3</sup>) і переносили у безкальцієвий розчин (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5, глюкоза – 5, HEPES – 10 (pH 7,4). Після цього тканину піддавали ферментативній обробці у 0,2%-му безкальцієвому розчині колагенази (тип IV, “Sigma”, США) протягом години при 37° C. Потім тканину декілька разів промивали у

безкальцієвому розчині для вилучення ферменту та диспергували піпеткою Пастера (діаметр 1–2 мм) для отримання ізольованих клітин. Суспензію клітин переносили в чашки Петрі для подальших електрофізіологічних експериментів.

*Електрофізіологічний експеримент.* Мембранні струми в епітеліальних клітинах простати реєстрували за допомогою методики “patch-clamp” у конфігурації “ціла клітина”. Склад позаклітинного розчину був таким (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 5, глюкоза – 10, HEPES – 10, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 1 (рН 7,4). Реєструючи піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): CsCl – 140, CaCl<sub>2</sub> – 1, EDTA – 10, HEPES – 10, MgATФ – 2 (рН 7,4). Опір цих піпеток був у межах 3–5 МОм. Ментол (“Sigma”, США) розчиняли в 96%-му етанолі для отримання маточного розчину концентрацією 1 моль/л. Перед кожним експериментом його додавали у позаклітинний розчин для отримання необхідної робочої концентрації. Зміну зовнішньоклітинного розчину проводили багатоканальною мікропіпеткою з загальним витоком, який був розташований дуже близько до клітини. Всі реактиви, які використовувалися для приготування розчинів, були від фірми “Sigma” (США). Температуру зовнішнього розчину підтримували за допомогою циркуляційного водяного термоса HAAKE C10 та сконструйованої в нашій лабораторії системи фіксації температури.

Експеримент проводили з використанням підсилювача фірми “Dagan PC-ONE” (США) в комплексі з персональним комп’ютером. Для реєстрації струмів використовували програмне забезпечення Clampex 8.0 (“Axon Instruments”, США). Обробку та аналіз результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Clampfit 8.0 (“Axon Instruments”, США) та Origin 7.0 (“Microcal”, США).

*Конфокальна мікроскопія епітеліальних клітин простати щура.* Для імуномарку-

вання клітин вентральну частку простати щура виділяли як було описано раніше та фіксували протягом 24 год у 4%-му розчині формальдегіду, потім нарізали на вібротомі (“Campden Instruments Ltd.”, Loughborough, Великобританія) на шари завтовшки 50 мкм при -10°C та прикріпляли до предметного скла, отримуючи слайди. Останні промивали тричі по 5 хв у розчині 0,1 М фосфатного буфера (ФБ). Після цього витримували в 0,1 М ФБ з додаванням 0,3 % Triton X-100 (Т) та 4%-ї козиної сироватки (КС) – розчин-1 (ФБ+Т+КС) – не менше ніж 2 год. Всі антитіла розчиняли в цій суміші. Між етапами прикладання антитіл слайди відмивали чотири рази по 5 хв у цьому самому розчині. Спочатку їх інкубували 24 год при +4°C з моноклональним мишачим первинним антитілом до маркерного білка клітин простати – цитокератином-8 (1:100, “Sigma”, США), потім їх годину інкубували із специфічним анти-IgG антитілом, до якого приєднаний флуоресцентний барвник FITC (1:100, “Sigma”, США). Імуномарковані слайди висушували при кімнатній температурі та покривали розчином проти вигорання. Конфокальні флуоресцентні сигнали отримували на скануючому конфокальному мікроскопі (“Olympus Corporation”, США), який обладнаний лазерами Multi line-Argon 457/488/515 та Helium/Neon 543/633. Слайди досліджували при 60-кратному збільшенні. Флуоресценцію FITC збуджували хвилею довжиною 488 нм, флуоресцентний сигнал реєстрували при довжині хвилі понад 510 нм з використанням програмного забезпечення OLYMPUS FV1000.

*Оптична реєстрація кальцію.* Первинну культуру клітин простати статевозрілих щурів-самців вирощували при 37°C в інкубаторі з 5 % CO<sub>2</sub> в стандартному середовищі DMEM (“Gibco”, Великобританія) з 10 % фетальної сироватки теляти, 400 мкг/мл гентаміцину упродовж 1–2 діб у чашках Петрі на склі [18]. В експерименті з вико-

ристанням методу оптичної реєстрації кальцію середовище замінювали на стандартний позаклітинний розчин з додаванням 5 мкмоль/л Mag-Fluo-4AM (“Molecular Probes Inc”, США). Клітини інкубували протягом 25 хв при кімнатній температурі, після чого тричі відмивали позаклітинним розчином. Флуоресцентні конфокальні відображення були отримані на скануючій конфокальній установці LSM 5 PASCAL, яка базується на інвертованому мікроскопі Axiovert 200M з Argon 458/488/514 та Helium/Neon 543 лазерами, одним конфокальним фотоелектронним помножувачем (ФЕП) та одним ФЕП для прохідного світла. Флуоресценцію Mag-Fluo-4AM збуджували хвилиною довжиною 488 нм, флуоресцентний сигнал реєстрували хвилиною довжиною понад 510 нм, використовуючи програмне забезпечення LSM 5 PASCAL.

*Полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією.* У статевозрілих щурів лінії Вістар вирізали вентральну, латеральну та дорсальну частки простати і негайно гомогенізували у розчині Trizol (Trizol RNA-Prep, “Isogene”, Росія). Отриманий гомогенат використовували для виділення сумарної РНК. Зворотну транскрипцію здійснювали за допомогою RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва), беручи 0,3–0,6 мкг сумарної РНК та праймер оліго-dT. З отриманої одноланцюгової ДНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції фрагменти генів, що кодують канал TRPM8 та  $\beta$ -актин (внутрішній контроль). Реакційна суміш складалася з: 5-кратного буфера для полімеразної ланцюгової реакції (“Amplisens” Росія), 2,5 ммоль/л  $MgSO_4$ , 200 мкмоль/л суміші чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів, 30 пмоль кожного з праймерів, 0,5 ОД Taq ДНК-полімерази (“Fermentas”, Литва) та 5 мкл кДНК. Полімеразна реакція проходила у термоциклері “Т-СУ” (“CreaCon Technologies”, Нідерланди) при 94°C – 45 с, 58°C –

30 с, 72°C – 30 с протягом 35 циклів. Послідовності праймерів були: TRPM8f 5'-GAGTGGTACATGAACGGAGT-3', TRPM8r - 5'-TGAAGAGTGAAGCCGGAATAC -3' [21], Actf 5'-TCATCACTATCGGCAATGAGC-3', Actr 5'-GGCCAGGATAGAGCCACCA-3' [22]. Після горизонтального електрофорезу у 3%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію здійснювали візуалізацію ампліконів за допомогою транслюмінатора ViTran (“Біоком”, Росія).

## РЕЗУЛЬТАТИ

*Морфологічна характеристика епітеліальних клітин простати щура.* Гістологічні дослідження вказують на наявність у простаті трьох типів клітин епітеліального походження: колоноподібних люмінальних, круглих базальних і круглих нейроендокринних, серед яких два останні типи практично не відрізняються. З огляду на те, що в епітеліальних клітинах раку та доброякісній гіперплазії простати людини експресія TRPM8 була переважно виявлена в апікальному фенотипі клітин [2], ми застосували антитіла до маркерного білка цих клітин – цитокератину 8 для їх достовірної ідентифікації та визначення морфології у нормальній простаті щура. На рис. 1 представлено конфокальне зображення зрізу вентральної частки простати щура, забарвленого антицитокератином 8, та звичайна мікрофотографія клітин, виділених з цієї самої частки ферментативно-механічною обробкою. Видно, що на обох мікрофотографіях є клітини подовженої форми, причому той факт, що саме вони мітилися антицитокератином 8 (див. рис. 1,а) вказував на їх належність до секреторного апікального фенотипу. Як видно з рис. 1,б, характерна форма апікальних епітеліальних клітин зберігалася і після ферментативно-механічної ізоляції, що вказувало на їх достовірну ідентифікацію. При цьому більшість з клітин, які мали округлу форму,

були очевидно, базальними епітеліальними клітинами, оскільки популяція нейроендокринних клітин становить незначну кількість у простаті [3].

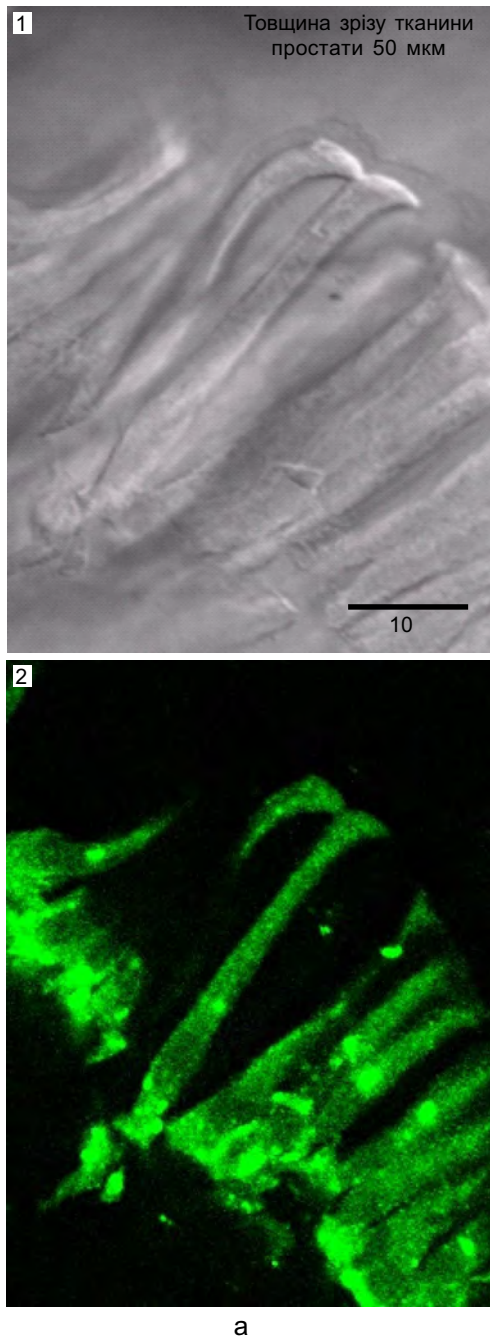
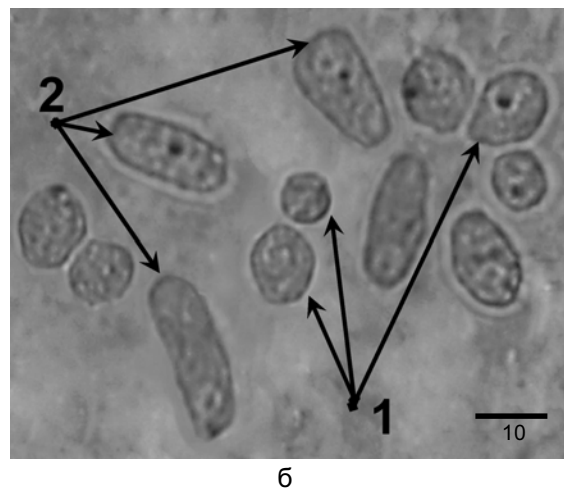


Рис. 1. Морфологічні ознаки епітеліальних клітин простати щура: а – конфокальне зображення зрізу вентральної частки простати щура: 1 – зріз у прохідному світлі; 2 – після прикладання антицитокератину 8; б – ізольовані епітеліальні клітини простати щура; 1 – базальні клітини; 2 – секреторні колоноподібні клітини

Охолодження або аплікація ментолу викликають активацію мембранного струму в епітеліальних клітин простати щура. Перед початком дослідження впливу охолодження та ментолу на мембранні струми ми хотіли впевнитися, що TRPM8 дійсно експресується у нормальній простаті щура, особливо з огляду на те, що у літературі щодо цього існує тільки одне свідчення [17]. Ми оцінювали експресію TRPM8 на рівні мРНК за допомогою методу зворотної транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції із застосуванням TRPM8-специфічних праймерів. На рис. 2 представлений дослід, який показує, що використання вказаних праймерів призводить до появи смуги із передбачуваною довжиною амплікона, свідчачи про експресію мРНК TRPM8 у простаті щура.

На рис. 3 наведені типові реєстрації інтегрального струму через плазматичну мембрану колоноподібних епітеліальних клітин простати щура при 33° С у відповідь на ступінчасті зміни потенціалу при використанні  $K^+$  або  $Cs^+$  як основного внутрішньоклітинного катіона. Видно, що при наявності  $Cs^+$  вихідний струм є суттєво меншим, що, очевидно, відбувається внаслідок



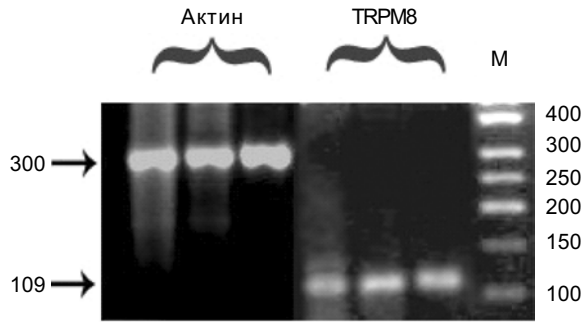


Рис. 2. Експресія TRPM8 у секреторних епітеліальних клітинах простати щура

зменшення калієвого компонента струму. Враховуючи, що струм, пов'язаний з активацією TRPM8 ( $I_{TRPM8}$ ), характеризується значним вихідним випрямленням [13], ми зупинилися на діалізі клітин  $Cs^+$  як такими, що забезпечують менший базовий рівень струму, на фоні якого очікується активація  $I_{TRPM8}$ .

Для відстежування активації  $I_{TRPM8}$  ми прикладали охолодження або ментол під час неперервної стимуляції клітини з частотою 0,33 Гц імпульсами потенціалу, що склалися з фази деполяризації до +100 мВ (+160 мВ у досліджах з ментолом) та фази гіперполяризації до -100 мВ, з'єднаних між собою лінійно-змінною ділянкою (ramp-ділянка) із швидкістю зміни потен-

ціалу 1,6 мВ/мс (2,08 мВ/мс в досліджах з ментолом) (рис. 4,а та 5,а). Такий протокол стимуляції дозволяв не тільки оцінити амплітуди струму при двох потенціалах, а і одночасно одержати його вольт-амперну характеристику (ВАХ).

На рис. 4 наведені оригінальні записи струмів та їх ВАХ, а також типова залежність від часу змін мембранного струму, що спостерігалися у колоноподібних епітеліальних клітинах простати щура у відповідь на ступінчасте охолодження від 33 до 21° С. Видно, що при 33° С базовий струм має відносно невелику амплітуду, але після зниження температури до 21° С струм різко збільшувався, особливо у вихідному напрямку (див. рис. 4,б). Цей ефект був повністю зворотним, тобто після відновлення температури до 33° С струм зменшувався до початкового, базового рівня (див. рис. 4,в). Віднімання значення базового струму при 33° С від загального струму при 21° С на ВАХ дало змогу одержати ВАХ саме того компонента, який активується охолодженням (див. рис 4,г). Саме за такими ознаками, як виражене вихідне випрямлення (тобто набагато більше значення вихідного струму порівняно зі вхідним) і рівноважний потенціал поблизу 0 мВ,

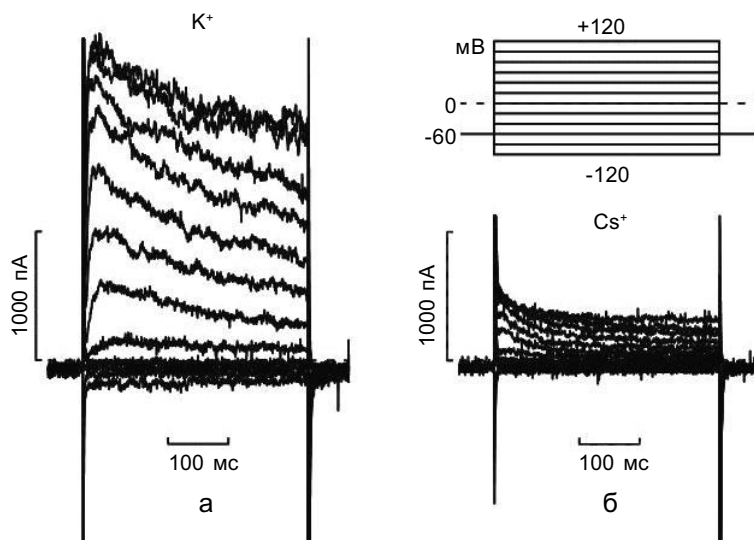


Рис. 3. Інтегральний струм через плазматичну мембрану секреторних епітеліальних клітин простати щура при 33 °С

отримана ВАХ нагадує таку для  $I_{TRPM8}$ , пов'язаного з активацією як гетерологічно експресованого, так і ендogenousного TRPM8 у сенсорних нейронах [9, 13, 14]. Це дало підстави стверджувати, що отримана нами відповідь на охолодження в секреторних епітеліальних клітинах простати щура опосередкована саме каналом TRPM8, що в них експресується.

Аналогічний експеримент на базальних епітеліальних клітинах (ідентифікованих за круглою формою) простати щура не показав жодних відповідей на зміни температури (дані не наводяться). Цей результат узгоджується з нещодавніми дослідженнями TRPM8 у простаті людини, які показали, що експресія цього каналу обмежується секреторним епітелієм, в той час як у базальних клітинах вона відсутня [2].

Струм, схожий за своїми властивостями на щойно описаний, міг бути активований у апікальних епітеліальних, але не базальних клітинах простати щура також прикла-

данням хімічного аналога охолодження – ментолу в концентрації 100 мкмоль/л при 33° С (див. рис. 5). Ефект теж виявився повністю зворотним, а ВАХ струму, який активується ментолом, за своєю формою та потенціалом реверсії також нагадувала ВАХ ендogenousного TRPM8 у сенсорних нейронах.

*Аплікація ментолу викликає підвищення рівня цитоплазматичного кальцію в епітеліальних клітинах простати щура.* Щоб з'ясувати, чи може ментол підвищувати концентрацію цитоплазматичного кальцію в клітинах простати, ми контролювали вміст внутрішньоклітинного кальцію використовуючи Mag-Fluo-4AM (рис. 6). Показано, що після прикладання 100 мкмоль/л ментолу підвищується концентрація внутрішньоклітинного кальцію в клітинах, в яких експресується TRPM8. Ментоліндуковане збільшення кальцієвого сигналу спостерігалось в збільшенні інтенсивності флуоресценції. Рівень внутрішньоклітинного

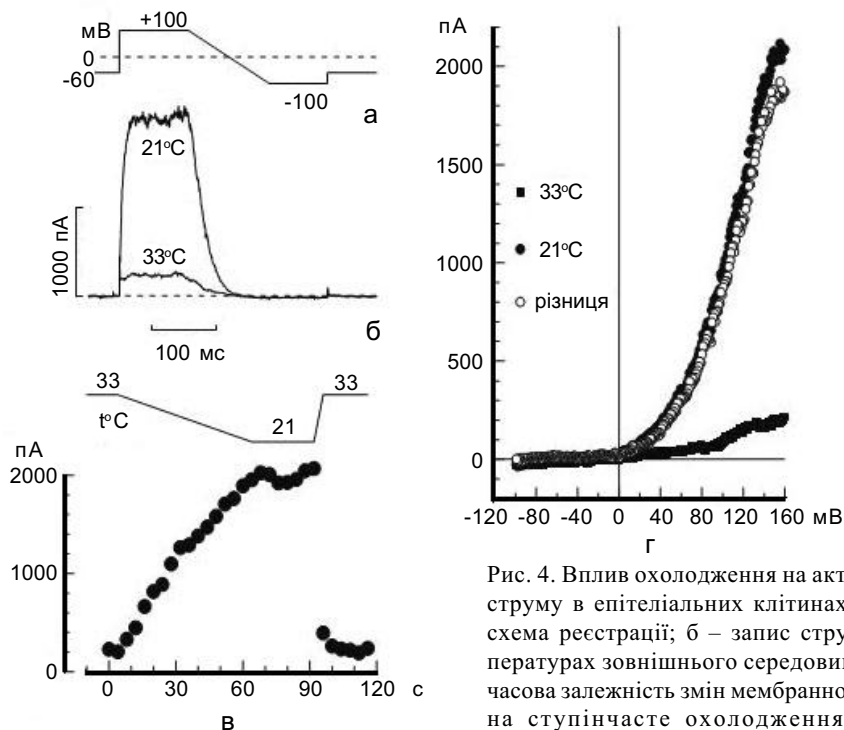


Рис. 4. Вплив охолодження на активацію мембранного струму в епітеліальних клітинах простати щура: а – схема реєстрації; б – запис струмів при різних температурах зовнішнього середовища: при 33, 21° С; в – часова залежність змін мембранного струму у відповідь на ступінчасте охолодження від 33 до 21° С; г – вольт-амперні характеристики струмів

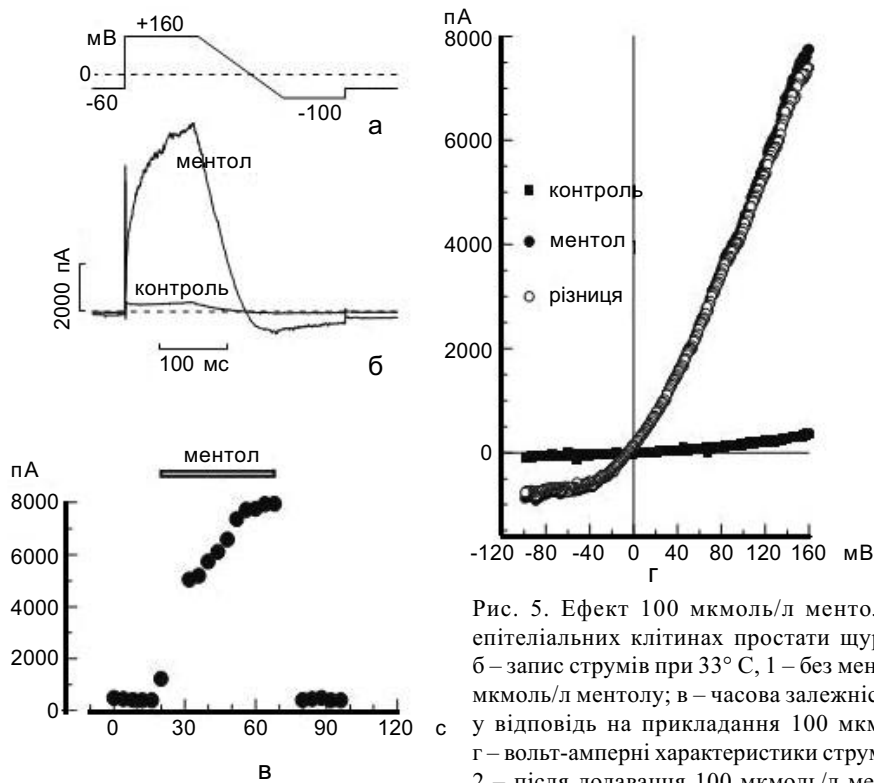


Рис. 5. Ефект 100 мкмоль/л ментолу на мембранні струми в епітеліальних клітинах простати щура: а – протокол реєстрації; б – запис струмів при 33° С, 1 – без ментолу, 2 – після додавання 100 мкмоль/л ментолу; в – часова залежність змін мембранного струму у відповідь на прикладання 100 мкмоль/л ментолу при 33° С; г – вольт-амперні характеристики струмів при 33° С: 1 – без ментолу, 2 – після додавання 100 мкмоль/л ментолу, 3 – ВАХ компоненту, який активується у відповідь на аплікацію ментолу

кальцію в клітинах простати, які не експресують TRPM8, не змінювався при прикладанні ментолу.

## ОБГОВОРЕННЯ

Наші результати вперше демонструють функціональну експресію холод-ментолчутливого каналу TRPM8 у плазматичній мембрані епітеліальних клітин нормальної простати щура. За такими своїми біофізичними характеристиками, як вихідне випрямлення та близький до 0 мВ рівноважний потенціал, струм, який ми спостерігали через цей канал у відповідь на охолодження або ментол, є практично ідентичним до струму активованого аналогічними стимулами у сенсорних нейронах. Цей результат є принципово важливим, бо не у всіх клітинах простатного походження, навіть при наявності в них TRPM8-специфічної мРНК, спостерігається локалізація функціо-

нального каналу у плазматичній мембрані. Так, у андрогензалежних клітинах лінії LNCaP раку простати людини функціональний TRPM8-канал був виявлений не у плазматичній мембрані, а у мембрані ЕР, в якій він відповідав за ментоліндуковане вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕР [18]. Активація ЕР-локалізованого TRPM8 призводила до спустошення кальцієвих депо ЕР з наступною активацією депозалежних кальцієвих каналів плазматичної мембрани та входу  $Ca^{2+}$  через них [18]. Причини можливої різної локалізації TRPM8 поки не зовсім зрозумілі. Одним з пояснень цього явища може бути існування декількох ізоформ TRPM8-каналу внаслідок альтернативного сплайсингу гена TRPM8.

В цих же дослідженнях було показано, що експресія і, відповідно, ЕР-пов'язана функція TRPM8 у клітинах LNCaP є сильно андрогензалежною: стероїдна депривація культурального середовища призводила до



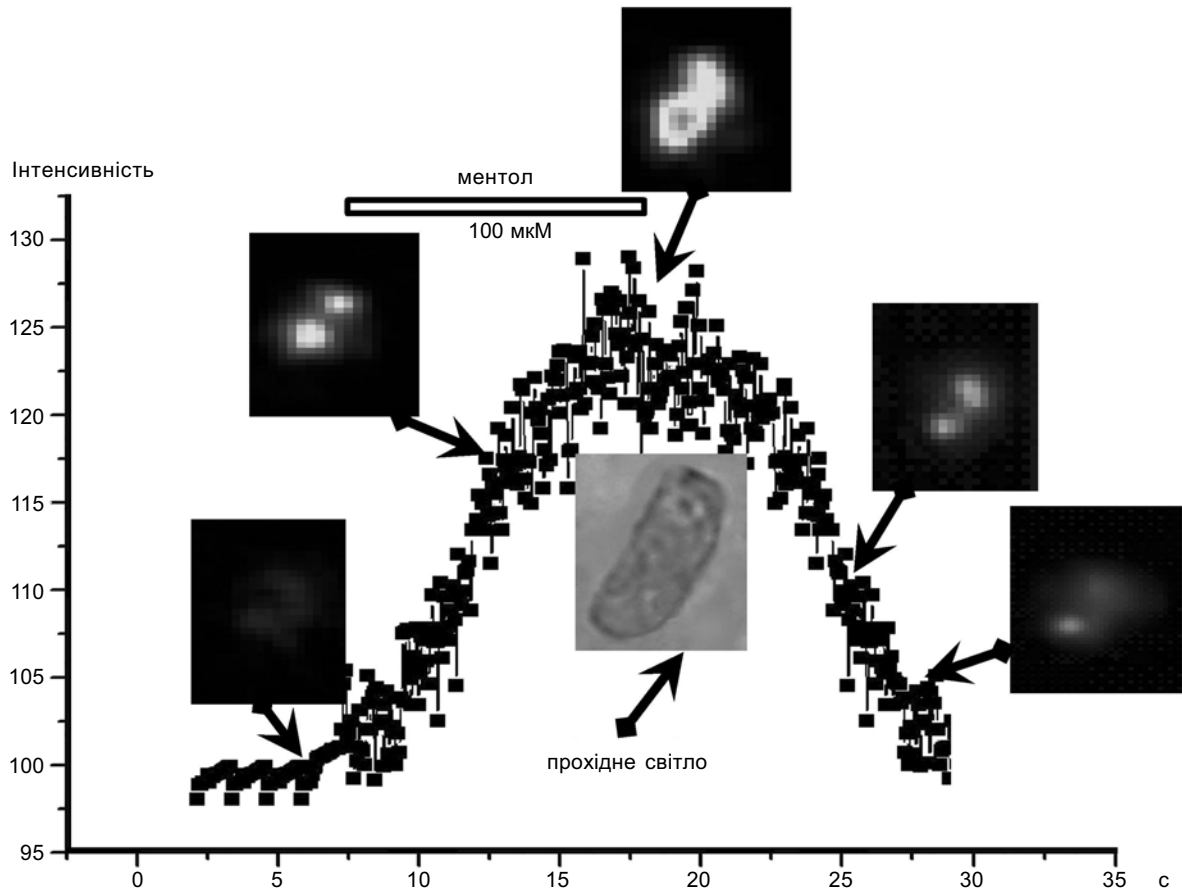


Рис. 6. Прикладання 100 мкмоль/л ментолу змінює рівень внутрішньоклітинного кальцію в епітеліальних клітинах простати щура

6 кратного зменшення експресії упродовж 72 год, а додавання дигідротестостерону – до її швидкого відновлення і, навіть підвищення до рівнів, вищих за контрольні [18]. Більше того, було встановлено, що у нативній простаті людини експресія гена TRPM8 вимагає наявності функціонального андрогенного рецептора і що цей ген, найімовірніше, являє собою первинний андрогенкерований ген [2].

Наші результати вказують на специфічність TRPM8 саме до диференційованих апікальних клітин секреторного епітелію простати щура, що також узгоджується з дослідженнями зразків тканини раку та доброякісної гіперплазії простати людини, в яких було показано, що тільки апікальні епітеліальні клітини, ізольовані з цих зраз-

ків, характеризувались експресією TRPM8, а тривале культивування клітин в умовах *in vitro*, яке призводило до їх дедиференціації, супроводжувалося втратою експресії як TRPM8, так і андрогенного рецептора [2].

Якщо для сенсорних нейронів фізіологічне значення TRPM8 у сприйнятті та передачі холодового стимулу добре встановлено, то роль цього каналу у простаті все ще залишається нез'ясованою. Найбільш імовірно, що у простаті TRPM8 залучений у процеси проліферації, диференціації, апоптозу та/або секреції. Це може відбуватися завдяки кальцієвій проникності TRPM8 та його можливій локалізації у двох мембранах – плазматичній та ендоплазматичній. Зокрема, нещодавно було показано потенційну роль TRPM8 у апоптозі клітин LNCaP

[21]. Оскільки простата не є органом, якому притаманні помітні зміни температури, то очевидно, що, крім холоду, повинні існувати додаткові механізми активації та регуляції TRPM8. У цьому плані перспективними є ліпідні посередники. Так, було показано, що важливим регулятором функціонального стану TRPM8 є фосфоінозитолбіфосфат (PIP<sub>2</sub>), який сам по собі може його активувати [12,16], а також лізофосфоліпіди [20]. Однак конкретні шляхи залучення цих посередників у регуляцію TRPM8 у простаті вимагають подальшого дослідження.

*Робота виконана за підтримки Грантів INTAS 05-1000008-8223 і WELLCOME TRUST 075112.*

**A.P. Kondratskyi, G.V. Sotkis, O. I. Boldyrev,  
K.O. Kondratska, O.P. Lyubanova,  
Iu.B. Dyskina, D.V. Gordienko, Ia.M. Shuba**

#### **FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF THE TRPM8 COLD RECEPTOR IN RAT PROSTATE EPITHELIAL CELLS**

For the first time by means of electrophysiology we demonstrate functional expression of cold/menthol sensitive TRPM8 channel in secretory epithelial cells plasma membrane from rat prostate. Under whole-cell patch-clamp technique rapid cooling from 33 to 21° C of freshly isolated rat prostate epithelial cells elicited the significant outward rectifying membrane current with close to 0 mV reversal potential characteristic of TRPM8 activation. Extracellular application of chemical analog of cooling, menthol (100 μM) at 33° C evoked similar current responses. Cold- and menthol-evoked currents could be detected only in elongated epithelial cells, which in prostate slices were labeled with anti-cytokeratin 8, suggesting that they belong to the apical secretory phenotype. No such current could be detected in round apparently basal epithelial cells. We conclude that in normal rat prostate functional expression of TRPM8 is restricted to plasma membrane of luminal apical epithelial cells.

*International Center of Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Babes A., Zorzon D., Reid G. A novel type of cold-sensitive neuron in rat dorsal root ganglia with rapid adaptation to cooling stimuli // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – **24**(3). – P. 691–708.

2. Bidaux G., Roudbaraki M., Merle C. et al. Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement // *Endocr. Relat. Cancerol.* – 2005. – **12**(2). – P. 367–382.

3. Bonkhoff H. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status // *Prostate Supplement* – 1998. – **8**. – P. 18–22.

4. Cunha G.R., Donjacour A.A., Cooke P.S. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate // *Endocrinol. Rev.* – 1987. – **8**(3). – P. 338–362.

5. de la Pena E., Malkia A., Cabedo H. et al. The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones // *J. Physiol.* – 2005. – **567**(2). – P. 415–426.

6. Dhaka A., Viswanath V., Patapoutian A. Trp-ion channels and temperature sensation // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2006. – **29**. – P. 135–161.

7. Fonfria E., Murdock P.R., Cusdin F.S. et al. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* – 2006. – **26**(3). – P. 159–178.

8. Hayward S.W., Cunha G.R. The prostate: development and physiology // *Radiol. Clin. North. Am.* – 2000. – **38**(1). – P. 1–14.

9. Hui K., Guo Y., Feng Z.P. Biophysical properties of menthol-activated cold receptor TRPM8 channels // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2005. – **333**(2). – P. 374–382.

10. Jesic C.J., Holland J.M., Lee C. An anatomic and histologic study of the rat prostate // *Prostate.* – 1982. – **3**(1). – P. 81–97.

11. Kraft R., Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview // *Pflug. Arch.* – 2005. – **451**(1). – P. 204–211.

12. Liu B., Qin F. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. // *J. Neurosci.* – 2005. – **25**(7). – P. 1674–1681.

13. McKemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // *Nature.* – 2002. – **416**(6876). – P. 52–58.

14. Nilius B., Talavera K., Owsianik G. et al. Gating of TRP channels: a voltage connection? // *J. Physiol.* – 2005. – **567**(1). – P. 35–44.

15. Pedersen S.F., Owsianik G., Nilius B. TRP channels: an overview // *Cell Calcium.* – 2005. – **38**(3-4). – P. 233–252.

16. Rohacs T., Lopes C.M., Michailidis I., Logothetis D.E. PI(4,5)P<sub>2</sub> regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain // *Nat. Neurosci.* – 2005. – **8**(5). – P. 626–634.

17. Stein R.J., Santos S., Nagatomi J. et al. Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract // *J. Urol.* – 2004. – **172**(3). – P. 1175–1178.

18. Thebault S., Lemonnier L., Bidaux G. et al. Novel role

- of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**(47). – P. 39423–39435.
19. Tsavaler L., Shapero M.H., Morkowski S., Laus R. Trp-r8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins // *Cancer. Res.* – 2001. – **61**(9). – P. 3760–3769.
20. Vanden Abeele F., Zholos A., Bidaux G. et al. Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**(52). – P.40174–40182.
21. Weiergraber M., Pereverzev A. et al. Immunodetection of alpha1E voltage-gated Ca(2+) channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney// *J. Histochem. Cytochem.* – 2000. – **48**. – P. 807–819.
22. Yang X.R., Lin M.J., McIntosh L.S., Sham J.S. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle// *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2006. – **290**(6). – P. 1267–1276.
23. Zhang L., Barritt G.J. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca<sup>2+</sup> channel required for the survival of prostate cancer cells // *Cancer. Res.* – 2004. – **4**(22). – P. 8365–8373.
24. Zhang L., Barritt G.J. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? // *Endocrinol. Relat. Cancer.* – 2006. – **13**(1). – P. 27–38.

*Міжнарод. центр молекуляр. фізіології НАН України, Київ;  
Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 22.06.2007*