



УДК 577.352:616-006.44:542.978

АКТИВНІСТЬ АТФ-аз ПОСТМІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ КЛІТИН ЛІМФОМИ NK/Ly ЗА ДІЇ БАФІЛОМІЦИНУ ТА НААДФ

С. Бичкова, В. Гренюх

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: s.bychkova@gmail.com*

Системам активного транспорту йонів приділяють важливу увагу в пошуку засобів протипухлинної терапії. Зокрема, інтенсивно вивчався блокатор H^+ -помпи – бафіломіцин. H^+ -АТФ-аза створює трансмембранний протонний градієнт на структурах ендо-лізосомальної системи клітин, закислюючи їхній вміст. Такі кислотні депо є одночасно Ca^{2+} -вмісними органοїдами. Нікотинацидаденіндинуклеотидфосфат (НААДФ) – внутрішньоклітинний посередник, що вивільнює Ca^{2+} з кислотного депо клітин різних типів. Проте в пухлинних клітинах НААДФ-чутливе депо не досліджене, а також мало вивчена його взаємодія з окремими АТФ-азами плазматичної мембрани (ПМ) і ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР). Метою цієї роботи було вивчити вплив бафіломіцину та НААДФ на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, базальної Mg^{2+} -АТФ-ази й Ca^{2+} -АТФ-аз ПМ і ЕПР пухлинних клітин. Досліди проведені на без'ядерній і постмітохондріальній фракції клітин лімфоми NK/Ly мишей. З'ясовано, що бафіломіцин не впливав на активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми. Встановлено, що НААДФ викликав зростання активності Na^+ , K^+ -помпи на $(54,18 \pm 7,84)\%$ ($n = 6$, $P \leq 0,05$) щодо контролю, а також підвищував активність Ca^{2+} -помпи ПМ у 3 рази ($P \leq 0,05$). Активність Ca^{2+} -помпи ЕПР і базальної Mg^{2+} -АТФ-ази не змінилася за дії НААДФ. Після преінкубації постмітохондріальної фракції клітин лімфоми з бафіломіцином НААДФ-індуковане зростання активності Na^+ , K^+ -помпи було менш виражене, однак ще більше підвищувалась активність Ca^{2+} -помпи ПМ. Висловлюється припущення, що H^+ -помпа у клітинах лімфоми мишей розміщена поверхнево, а тому її функція не пов'язана з іншими АТФ-азами. Взаємозв'язок між H^+ -АТФ-азою та помпами ПМ (Ca^{2+} - і Na^+ , K^+ -АТФ-ази) виявлено тільки за активування НААДФ-чутливого депо. Отже, кислотне депо клітин лімфоми NK/Ly, яке містить H^+ -помпу і НААДФ-чутливі Ca^{2+} -канали, має тісні зв'язки з ПМ.

Ключові слова: пухлинні клітини, лімфома NK/Ly мишей, активність АТФ-аз, НААДФ, Na^+ , K^+ -помпа, Ca^{2+} -помпа ПМ і ЕПР.

ВСТУП

Останнім часом у терапії пухлин значну увагу приділяють таким клітинним “мішеням”, як системи активного транспорту йонів [4; 10; 15]. Зокрема, встановлено,

що пригнічення Na^+ , K^+ -помпи виявляє антиміграційну дію щодо пухлинних клітин молочної залози [9]. У той же час суттєве пригнічення Ca^{2+} -помпи ЕПР тапсигаргіном активує проапоптичні шляхи у ЕПР і мітохондріях. Крім того, було доведено, що бафіломіцин як селективний інгібітор H^+ -АТФ-ази V-типу суттєво збільшує загибель пухлинних клітин молочної залози. Блокування бафіломіцином H^+ -помпи здатне зменшувати міграцію та інвазійність пухлинних клітин *in vitro*, що дає підстави припустити пряму роль цієї помпи у розвитку метастазів [5; 13]. Отже, не викликає сумніву, що системи активного транспорту йонів відіграють важливу роль у пошуку протипухлинних засобів. Як відомо, бафіломіцин-чутлива H^+ -помпа функціонує в мембранах ендо-лізосомальної системи клітин, створюючи трансмембранний протонний градієнт. Він є рушійною силою для роботи транспортування йонів, зокрема кальцію. Тому ендо-лізосомальна система є одночасно кальцій-вмісними органοїдами клітин, які вивільнюють кальцій за дії НААДФ. Однак роль НААДФ-чутливого Ca^{2+} депо у пухлинних клітинах залишається нез'ясованою. Також невивченими є взаємозв'язки між цим депо та різними системами активного транспортування йонів, зокрема за умов блокування H^+ -помпи бафіломіцином. Лімфома Nemeth-Kellner (NK/Ly) використовується як модель для вивчення ефектів різних протипухлинних хімічних речовин [8]. Тому метою наших досліджень було вивчити активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин клітин NK/Ly за умов блокування H^+ -помпи бафіломіцином і активування вивільнення кальцію з кислотного депо за дії НААДФ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Отримання лімфоми NK/Ly. Досліди проведені на мишах-самцях лінії С57В1 масою 22–27 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на змішаному раціоні. Штам лімфоми NK/Ly отриманий із колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України (Київ). Асцитну форму лімфоми пасажували методом інокуляції мишам $10\text{--}15 \times 10^6$ пухлинних клітин внутрішньочеревно. Асцит отримували дренаванням черевної порожнини мишей стерильним шприцом під ефірним наркозом на 7–10-й день після інокуляції. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин (1998), що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (2014).

Отримання фракції клітин. Клітини лімфоми осаджували зі свіжо-отриманого асциту центрифугуванням упродовж 5 хв за 1000 об/хв у центрифугі ОПн-ЗУХЛ4.2. Клітини промивали розчином такого складу (ммоль/л): сахароза – 250, ЕГТА – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,2. Потім центрифугували в тому ж режимі. Осад клітин суспендували у вищеназваному середовищі, в об'ємі, який відповідав початковому об'ємові асциту, і гомогенізували у скляному гомогенізаторі (зазор між поршнем і циліндром гомогенізатора 0,075 мм) зі швидкістю 2000 об/хв упродовж 10 хв при охолодженні у льодяній бані. Гомогенат центрифугували 10 хв за 300 г (центрифуга РС-6) для осадження незруйнованих клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту в центрифугі Jouan MR 1812 протягом 10 хв за 8500 г і температури 0–2 °С. Одержаний постмітохондріальний супернатант позначали як постмітохондріальну фракцію клітин, з якою проводили експерименти.

Визначення АТФ-азної активності. На початку експерименту 200 мкл постмітохондріальної фракції клітин лімфоми поміщали у середовище інкубації без АТФ, яке містило (у ммоль/л): NaCl – 50,0; KCl – 100,0; *трис*/HCl – 20,0; MgCl₂ – 3,0; CaCl₂ – 0,01; NaN₃ – 1 (селективний інгібітор АТФ-ази мітохондрій); рН = 7,4 за 37 °С. АТФ-гідролазну реакцію ініціювали додаванням 3 ммоль/л АТФ (Sigma) й інкубували проби протягом 15 хв за 37 °С та помірного струшування у водяному ультратермостаті. Для активування НААДФ-чутливих Ca²⁺-каналів до суспензії додавали НААДФ (Sigma) у концентрації 7 мкмоль/л. Для блокування H⁺-помпи застосовували бафіломіцин (Sigma) у концентрації 1 мкмоль/л. Після завершення інкубації реакцію зупиняли додаванням 5 мл 10 % трихлороцтової кислоти, витримували проби 10 хв і центрифугували при 1600 g протягом 10 хв. Одержану безбілкову надосадову рідину використовували для визначення в ній вмісту неорганічного фосфору (P_n) за методом Фіске–Субарроу. Активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми розраховували за різницею вмісту Ф_n у середовищах різного складу та виражали в мкмоль Ф_n у перерахунку на 1 мг білка на 1 год. Сумарну АТФ-азну активність постмітохондріальної фракції клітин визначали у Ca²⁺- та Mg²⁺-вмісному середовищі інкубації. Для визначення питомої активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази зі сумарної активності АТФ-аз обчислювали АТФ-азну активність постмітохондріальної фракції клітин у середовищі, яке містило 1 ммоль/л оуабаїну (Sigma). Питому Mg²⁺-АТФ-азну активність визначали у середовищі інкубування, що містило 1 ммоль/л ЕГТА без CaCl₂ і наявності 1 ммоль/л оуабаїну. Тапсигаргін (Calbiochem) у концентрації 1 мкмоль/л застосовували для того, щоб відокремити внесок Ca²⁺-помпи ЕПР. У всіх дослідах контролем на неферментативний гідроліз АТФ було реакційне середовище, в яке не додавали фракції клітин.

Для порівняння розподілу параметрів двох зв'язаних вибірок застосовували непараметричний метод Уїлкоксона, користуючись програмою SPSS Inc Statistics 17.0. Дані представляли у вигляді M±m. Достовірно вважали різницю за вірогідності P≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми НК/Лу за дії селективного блокатора H⁺-АТФ-ази V-типу – бафіломіцину. Пухлинні клітини ростуть в умовах гіпоксичного мікросередовища з кислим вмістом, тому вони мають системи динамічного регулювання рН. Було з'ясовано, що V-АТФ-ази, які розташовані у ПМ, залучені у заокисненні багатьох фенотипів пухлинних клітин молочної залози людини [12].

Ми визначали питому активність Na⁺,K⁺-АТФ-ази, Ca²⁺-АТФ-аз ПМ і ЕПР і базальної Mg²⁺-АТФ-ази у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми мишей за наявності бафіломіцину і порівнювали з активністю АТФ-аз контролю (без бафіломіцину).

Встановлено, що бафіломіцин не викликав жодних змін активності АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми. Це можна пояснити тим, що бафіломіцин-чутлива H⁺-помпа не має безпосередніх зв'язків з іншими АТФ-азами, які ми вивчали, за умов постмітохондріальної фракції клітин. Таке твердження узгоджується з даними про те, що вакуолярна H⁺-АТФ-аза (V-АТФ-аза), котра за нормальних умов локалізована у мембранах кислих депо, розташована поверхнево і, в такий спосіб, регулює цитозольне рН, підвищуючи міграційну здатність клітин

метастазів [12]. Цілком можливо, що у цілій клітині певні взаємозв'язки можуть бути, але під час диференційного центрифугування й отримання постмітохондріальної фракції клітин вони руйнуються.

Вплив НААДФ на активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми NK/Ly. Новим внутрішньоклітинним посередником, здатним вивільнювати кальцій, як це показано в останні роки, є НААДФ. Його Ca^{2+} -мобілізуюча роль доведена для різних клітин [2; 3; 6; 7; 11; 16]. Однак значення НААДФ як Ca^{2+} -мобілізуючого посередника у пухлинних клітинах залишається нез'ясованим.

Виявлено, що НААДФ у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми збільшував у 3 рази активність Ca^{2+} -помпи ПМ ($n = 5$; $P \leq 0,05$) щодо контролю, але активність Ca^{2+} -АТФ-ази ЕПР не зазнала змін (рис. 1). Варто зазначити, що обидві ці помпи активувались додаванням НААДФ до постмітохондріальної фракції клітин печінки щура [14]. Крім того, спостерігали певну тенденцію до збільшення базальної активності АТФ-аз за дії НААДФ у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми. Цей ефект також був протилежним до його впливу в печінці [14]. Встановлено, що НААДФ у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми NK/Ly мишей викликає збільшення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази на $(54,18 \pm 7,84)\%$ ($n = 6$, $P \leq 0,05$). Очевидно, що НААДФ впливає на цю помпу не безпосередньо, а через створення локальних сайтів з підвищеною концентрацією Ca^{2+} , які активують інші системи транспорту йонів та, опосередковано, Na^+ , K^+ -АТФ-азу. Виявлений нами ефект НААДФ на активність Na^+ , K^+ -помпи постмітохондріальної фракції клітин лімфоми був цілком протилежним до попередньо встановленого його впливу у печінці [14].

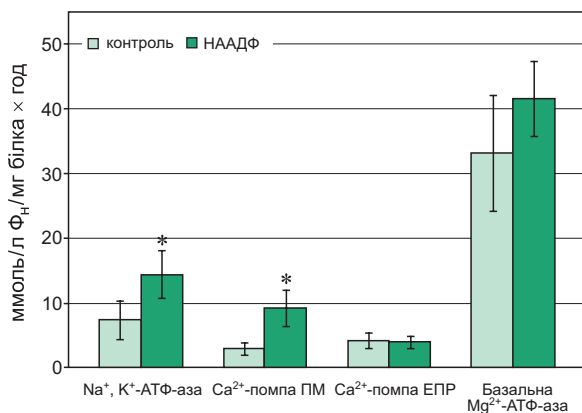


Рис.1. Вплив НААДФ на активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми NK/Ly мишей. * – $P \leq 0,05$

Fig.1. Influence of NAADP on activity of ATPases in postmitochondrial fraction of NK/Ly cells. * – $P \leq 0.05$

Таким чином, дія НААДФ у пухлинних клітинах суттєво відрізняється від його впливу на активність систем транспортування йонів у здорових клітинах. Це може свідчити про те, що НААДФ-чутливе депо у клітинах лімфоми має цілком відмінне значення від його ролі в клітинах печінки, а також зовсім інше розташування всередині клітини. На основі отриманих даних ми припускаємо, що є певна спорідненість між ПМ і НААДФ-чутливим депо у клітинах лімфоми. Такий висновок ми зробили на підставі того, що НААДФ чинив вплив тільки на помпи, які функціонують у ПМ (Ca^{2+} -і Na^+ , K^+ -АТФ-аза) та не діяв на ті системи активного транспорту, що локалізовані всередині клітини, зокрема у мембранах ЕПР. Хоча на печінковій фракції такий вплив було виявлено нами попередньо [14]. Це припущення узгоджується з висновками,

які ми зробили на основі вищеописаного впливу бафіломіцину. Також на підтвердження нашого припущення про спорідненість кислотного НААДФ-чутливого депо із ПМ пухлинних клітин свідчать дані про те, що застосування зовнішньоклітинного НААДФ здатне індукувати внутрішньоклітинне вивільнення Ca^{2+} [1].

Отже, сайтами впливу НААДФ, як ми припускаємо, є транспортні білки розміщені у ПМ клітин лімфоми. Це може бути зумовлено тим, що у пухлинних клітинах кислотні депо, такі як ранні чи пізні ендосоми, є асоційованими з ПМ унаслідок порушення внутрішньоклітинного транспорту цих органолів.

Вплив бафіломіцину на НААДФ-індуковані зміни активності АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми НК/Лу. Після попередньої преінкубації постмітохондріальної фракції клітин лімфоми з бафіломіцином вплив НААДФ на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази був послаблений (рис. 2). Активність Na^+ , K^+ -помпи знижувалася тільки на $(37,30 \pm 2,35) \%$ ($n = 6, P \leq 0,05$) за дії НААДФ на фоні бафіломіцину. Також бафіломіцин повністю запобігав тенденції до збільшення базальної АТФ-азної активності за дії НААДФ у пухлинних клітинах. Однак бафіломіцин підсилював НААДФ-індуковане збільшення активності Ca^{2+} -АТФ-ази ПМ у 9,4 разу ($n = 5, P \leq 0,05$). Підсилення бафіломіцином НААДФ-індукованого збільшення активності Ca^{2+} -помпи ПМ можна пояснити взаємозв'язком між цією системою активного транспорту йонів і H^+ -АТФ-азою. Ймовірно, що заблокувавши протонну помпу, ми зняли конкуренцію між H^+ -помпою та Ca^{2+} -АТФ-азою ПМ у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми. Однак такий зв'язок реалізується лише за умов активування вивільнення Ca^{2+} з НААДФ-чутливого депо, що може опосередковано впливати на H^+ -помпу. Таким чином, НААДФ-чутливе депо містить протонну помпу і є певним чином пов'язане з Ca^{2+} -помпою ПМ. Крім того, активування вивільнення кальцію НААДФ також впливає і на ще одну транспортувальну систему ПМ – Na^+ , K^+ -помпу.

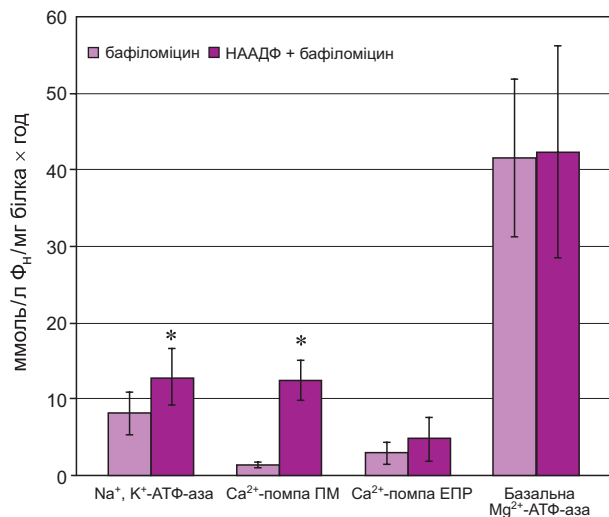


Рис. 2. Вплив НААДФ на активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми НК/Лу мишей за умов попередньої преінкубації з бафіломіцином. * – $P \leq 0,05$

Fig. 2. Influence of Baf 1A on NAADP-induced change of activity of ATPases in postmitochondrial fraction of NK/Ly cells. * – $P \leq 0.05$

Ми підтверджуємо наше припущення про те, що сайтами дії НААДФ, як і бафіломіцину, є ПМ клітин лімфоми. Отже, кислотне депо ракових клітин, яке містить H^+ -помпу і НААДФ-чутливі Ca^{2+} -канали, є асоційоване з ПМ. Можна припустити, що воно не є залучене у внутрішньоклітинному транспортуванні, яке полягає у перетворенні

первинних ендосом у вторинні ендосоми та лізосоми. Можливо, у клітинах лімфоми таке рециркулювання є порушеним, оскільки протонна помпа, яка відіграє головну роль у цьому процесі, в ракових клітинах є “переорієнтована” на ПМ і зовнішню інвазію патологічних клітин у вигляді розширення метастазів.

ВИСНОВКИ

Ми підтверджуємо, що протонна помпа клітин лімфоми має поверхневе розташування і за нормальних умов не виявляє тісних зв'язків з іншими АТФ-азними системами, оскільки блокування її бафіломіцином не впливало на жодну з досліджуваних АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми. Проте за активування ацидофільного депо додаванням НААДФ ми встановили взаємозв'язок між H^+ -помпою і АТФ-азами ПМ, тоді як помпи ЕПР не зазнавали змін. Ми висловлюємо припущення про можливу локалізацію ацидофільного депо пухлинних клітин у тісній спорідненості з ПМ.

Стаття виконана за підтримки гранту для молодих вчених від **West-Ukrainian BioMedical Research Center**.

1. Billington R.A., Bellomo E.A., Floriddia E.M. et al. A transport mechanism for NAADP in a rat basophilic cell line. **The FASEB Journal**, 2006; 20(3): 521–3.
2. Bychkova S.V., Chorna T.I. NAADP-sensitive Ca^{2+} stores in permeabilized rat hepatocytes. **Ukr. Biochem. J**, 2014; 86(5): 65–73.
3. Cancela J.M., Charpentier G., Petersen O.H. Co-ordination of Ca^{2+} signalling in mammalian cells by the new Ca^{2+} -releasing messenger NAADP. **Pflugers Archiv**, 2003; 446: 322–327.
4. Chen D., Song M., Mohamad O., Yu S.P. Inhibition of Na^+/K^+ -ATPase induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. **BMC Cancer**, 2014; 14(1): 716.
5. Graham R.M., Thompson J.W., Webster K.A. Inhibition of the vacuolar ATPase induces Bnip3-dependent death of cancer cells and a reduction in tumor burden and metastasis. **Oncotarget**, 2014; 5 (5): 1162–1173.
6. Guse A.H., Lee H.C. NAADP: a universal Ca^{2+} trigger. **Sci Signal**, 2008; 1: re10.
7. Lee H.C. NAADP-mediated calcium signaling. **J. Biol. Chem**, 2005; 280(40): 33693–33696.
8. Lootsik M.D., Lutsyk M.M., Stoika R.S. Nemeth-Kellner Lymphoma Is a Valid Experimental Model in Testing Chemical Agents for Anti-Lymphoproliferative Activity. **Open Journal of Blood Diseases**, 2013 3 (3A): 1–6.
9. Magpusao A.N., Omolloh G., Johnson J. et al. Cardiac glycoside activities link Na^+/K^+ -ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR. **ACS Chem. Biol**, 2014; 10(2): 561–9.
10. Mijatovic T., Ingrassia L., Facchini V., Kiss R. Na^+/K^+ -ATPase alpha subunits as new targets in anticancer therapy. **Expert. Opin. Ther. Targets**, 2008; 12(11): 1403–1417.
11. Patel S. NAADP-induced Ca^{2+} release – a new signaling pathway. **Biol. Cell**, 2004; 96: 19–28.
12. Sennoune S.R., Bakunts K., Martínez G.M. et al. Vacuolar H^+ -ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, 2004; 286(6): 1443–52.
13. Stock C., Schwab A. Protons make tumor cells move like clockwork. **Pflugers Arch**. 2009; 458(5): 981–92.
14. Vergun M., Bychkova S. ATPase activity of rat hepatocytes membrane under the influence of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. **Visnyk of the Lviv University. Series Biology**. 2014. 65: 335–340. (In Ukrainian).

15. Xu Z.W., Wang F.M., Gao M.J. et al. Targeting the Na⁺/K⁺-ATPase alpha1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010; 33(5): 743–751.
16. Yamasaki M., Churchill G.C., Galione A. Calcium signalling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). *FEBS J.*, 2005; 272: 4598–4606.

ACTIVITY OF ATPases IN POSTMITOCHONDRIAL FRACTION OF LYMPHOMA NK/Ly CELLS UNDER BAFILOMICINE AND NAADP PRESENCE

S. Bychkova, V. Hreniuh

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: s.bychkova@gmail.com

The system of active transport of ions (ATPases) plays a critical role in cancer cells and is a potential target of anticancer therapy. A selective V-type H⁺-ATPase inhibitor – bafilomicine (Baf1A) was intensively studied as anticancer drug. It is known that H-ATPase creates the electrochemical gradients in the membranes of endo-lysosomal cells. These acidic stores are also Ca²⁺-containing organelles. The nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) is a mediator of intracellular calcium signaling pathways. The role of NAADP-induced Ca²⁺ transient in cancer cells is not understood. Its correlation with activity of different ATPases in tumor cells is also poorly studied. The main goal of our study was to investigate the effects of Baf1A and NAADP on the activity of Na⁺/K⁺-ATPase, basal Mg²⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase of plasma membrane (PMCA) and endoplasmatic reticulum (SERCA) of NK/Ly murine lymphoma cells. All experiments were conducted on the postmitochondrial fraction of NK/Ly cells. We found that Baf1A (1 μM) did not cause changes in activity of ATPase in postmitochondrial fraction of NK/Ly cells. It was revealed that NAADP (7 μM) caused an increase of Na⁺/K⁺-ATPase activity by (54.18±7.84)% (n = 6, P≤0.05) and PMCA by 3-fold (P≤0.05) in subcellular fractions of NK/Ly cells. The activity of SERCA in membrane of cancer cells, as well as basal ATPase activity, were not changed upon NAADP application. Addition of Baf1A to the subcellular fraction of NK/Ly cells enhanced NAADP-induced increase in PMCA activity by 9.4-fold (n = 5, P≤0.05), but NAADP-induced increase in Na⁺/K⁺-ATPase activity was slackened. We suggest that H⁺-ATPase functions independently on Na⁺/K⁺-ATPase as well as other ATPases identified in lymphoma membranes, due to its localization on cell surface. We found a correlation between the H⁺-ATPase activity and pumps of PM (PMCA and Na⁺/K⁺-ATPase) only in presence of NAADP in subcellular fraction of NK/Ly cells. We consider that membranes of acidic stores are associated with PM in tumor cells.

Keywords: tumor cells, NK/Ly lymphoma, ATPase, NAADP, Na⁺/K⁺-ATPase, PMCA, SERCA.

АКТИВНОСТЬ АТФ-аз В ПОСТМИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ КЛЕТОК ЛИМФОМЫ NK / LY ПОД ДЕЙСТВИЕМ БАФИЛОМИЦИНА И НААДФ

С. Бычкова, В. Гренюх

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевського, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: s.bychkova@gmail.com*

Системы активного транспорта ионов играют очень важную роль в поиске веществ в антираковой терапии. В частности, как антираковое средство интенсивно изучали блокатор H^+ -насоса – бафиломицин. Известно, что H^+ -АТФ-аза создает протонный градиент на мембранах эндо-лизосомальной системы клеток, закисляя их изнутри. Такие кислотные депо одновременно являются Ca^{2+} -содержащими органоидами. Никотинацидадениндинуклеотидфосфат (НААДФ) – внутриклеточный посредник, который освобождает Ca^{2+} из кислотного депо клеток разных типов. Однако в раковых клетках НААДФ-чувствительное депо не изучалось, а также мало изучена его взаимосвязь с различными АТФ-азами этих клеток. Поэтому целью работы было изучение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, базальной Mg^{2+} -АТФ-азы, Ca^{2+} -АТФ-азы плазматической мембраны (ПМ) и эндоплазматического ретикулума (ЭПР) раковых клеток при действии бафиломицина и НААДФ. Эксперименты проведены на постмитохондриальной фракции клеток лимфомы NK/Ly мышей. Показано, что бафиломицин не вызывал никаких изменений активности АТФ-аз постмитохондриальной фракции клеток лимфомы. Установлено, что НААДФ вызывает увеличение активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы постмитохондриальной фракции клеток лимфомы NK/Ly на $(54,18 \pm 7,84)\%$ ($n = 6, P \leq 0,05$) по сравнению с контролем, а также увеличивает активность Ca^{2+} -насоса ПМ в 3 раза ($P \leq 0,05$). Активность Ca^{2+} -насоса ЭПР, а также базальной Mg^{2+} -АТФ-азы не изменилась под действием НААДФ. После предварительной преинкубации постмитохондриальной фракции клеток лимфомы с бафиломицином НААДФ-индуцированное увеличение активности Na^+ , K^+ -насоса было меньше выражено, однако еще больше усиливалось НААДФ-индуцированное увеличение активности Ca^{2+} -насоса ПМ. Мы предполагаем, что H^+ -насос в клетках лимфомы мышей локализуется поверхностно, а поэтому ее работа не связана с другими АТФ-азами. Только при активировании НААДФ-чувствительного депо установлена взаимосвязь между H^+ -АТФ-азой и насосами ПМ (Ca^{2+} - и Na^+ , K^+ -АТФ-азами). Таким образом, кислотное депо опухолевых клеток, которое содержит H^+ -насос и НААДФ-чувствительные Ca^{2+} -каналы, имеет тесную связь с ПМ в раковых клетках.

Ключевые слова: раковые клетки, лимфома NK/Ly мышей, АТФ-азы, НААДФ, Na^+ , K^+ -насос, Ca^{2+} -насос.

Одержано: 06.03.2015