

Т. В. ПОТАНОВА

УСТАНОВЛЕНИЕ ПРОНИЦАЕМЫХ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ КОНТАКТОВ В КУЛЬТУРЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ИОНА La^{3+}

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 23 XII 1974)

Предполагается, что прямая диффузионная связь между цитоплазматическим содержимым близлежащих клеток может играть существенную роль в росте, дифференцировке и функционировании органов и тканей (^{1, 2}), однако механизм установления такой связи не известен. В литературе описан ряд экспериментальных воздействий, ухудшающих связь между клетками через высокопроницаемые межклеточные контакты: это уменьшение концентрации в среде ионов Ca^{2+} или Cl^- , увеличение рН или тоничности среды, охлаждение, воздействие трипсином или гиалуронидазой, механическое повреждение одной из клеток в связанной паре и т. д. (³⁻⁵). Описаны также морфологические структуры (типа «gap-junction» и «septate-junction»), характерные для диффузионно связанных клеток: в местах таких контактов мембраны соседних клеток разделены щелью 20—40 Å и содержат многочисленные гранулы (по-видимому, белковой природы), часто упакованные в гексагональную решетку (см. ⁶).

В настоящей работе получены данные в пользу того, что в условиях, когда культивируемые клетки самопроизвольно не образуют проницаемых межклеточных контактов (п.м.к.), установление таких контактов удается индуцировать добавлением в среду иона La^{3+} в низких концентрациях.

Использовались культуры трех типов клеток: 1) МПТР — линия эпителиальных клеток почки мыши, трансформированных вирусом SV-40, полученная ~8 лет назад в Лаборатории противоопухолевого иммунитета Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР; 2) L — клетки подкожной соединительной ткани эмбриона мыши СЗН, обработанные метилхолантроном, переживающие в культуре ~25 лет; 3) RSK₄ — фибробластоподобные клетки крысы, полученные при дополнительной трансформации вирусом саркомы Рауса спонтанно трансформированных клеток линии LW13K₂ (⁷). В некоторых опытах использовались нормальные фибробластоподобные клетки мышинных эмбрионов (НМФ) 1—3-го пассажей. Клетки выращивали в матрицах в смеси среды 199, гидролизата лактальбумина и 10% сыворотки крупного рогатого скота. Для опытов клетки пересевали в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами (1×2 см²) по 0,5—1·10⁵ клеток/мл. В ряде опытов на однослойную культуру МПТР наносили «рану», т. е. удаляли часть монослоя со стекла, позволяя оставшимся клеткам заполнять освободившееся пространство (⁸). В некоторых опытах клетки L или RSK₄ в концентрации 0,5—1·10⁵ клеток/мл высевали на поверхность сформировавшегося монослоя НМФ.

Для оценки установления п.м.к. в культуре покровные стекла с клетками переносили из инкубационной среды в плексигласовую камеру объемом ~1 мл с солевым раствором, содержащим 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl₂ и 20 мМ трис-HCl буфер рН 7,2. В контрольных опытах смена инкубационной среды на сбалансированный солевой раствор не влияла на установление п.м.к. В ряде опытов солевой раствор модифицировали: по-

вышали концентрацию Ca^{2+} до 30 мМ или добавляли 0,5—5 мМ LaCl_3 . При комнатной температуре под контролем люминесцентного микроскопа МЛ-3 (ВИ; 400×) из микроэлектрода, заполненного 0,1 М флуоресцином $\text{Na}+0,1 \text{ M KCl}$, электрофоретически инъецировали (см. (9)) в одну из клеток флуоресцирующий краситель (м.в. 330); в темном поле микроскопа наблюдали появление свечения в соседних клетках и подсчитывали случаи перетекания флуоресцентной метки по крайней мере в одну из соседних клеток в процентах от числа инъекций.

Таблица 1

Степень связанности клеток, %

Тип клеток	Сроки после пересева, сутки						
	1	2	3	4	5	8	11
МПТР							
в центре пласта	10 (10; I)	22 (36; IV)		77 (18; III)	100 (24; III)	—	—
на краю «раны»	—	—	—	25 (20; II)	12 (20; III)	—	—
L							
в однородной культуре	0 (10; I)	—	0 (10; I)	10 (10; I)	0 (10; I)	0 (10; I)	30 (10; I)
в смешан. культуре с НМФ	60 (48; IV)	—	—	—	—	—	—
RSK ₄							
в однородной культуре	0 (4; I)	—	0 (17; III)	0 (10; I)			
в смешанной культуре с НМФ	7 (14; I)						

Примечание. Степень связанности определяется отношением числа случаев перетекания метки флуоресцина в соседние клетки к числу инъекций; в скобках арабские цифры — число инъекций, римские — число опытов (отдельных стекол с культурами).

Как видно из табл. 1, клетки МПТР, L и RSK₄ в разной степени обладают способностью устанавливать п.м.к. Наиболее выражена эта способность у МПТР. Клетки МПТР на 2 сутки после пересева образуют на стекле сплошной пласт, плотность клеток в котором в дальнейшем увеличивается и обычно стабилизируется на 5—6 сутки. В 1-е сутки, когда культура состоит из разрозненных островков клеток, п.м.к. (внутри таких островков) отсутствуют, в более поздние сроки п.м.к. встречаются чаще, и на 5 сутки все клетки оказываются связанными.

При нанесении «раны» на 4—5-суточный монослой МПТР через 1 сутки после нанесения «раны», когда культура представляет собой пласт, плотность клеток в котором увеличивается по мере удаления от края «раны», количество п.м.к. на краю такого пласта оказывается существенно ниже, чем в центральных областях.

Клетки L в однородной культуре редко образуют п.м.к., однако образуют эффективные п.м.к. с нормальными мышинными фибробластами в условиях смешанной культуры. В табл. 1 представлены также результаты, из которых следует, что у клеток RSK₄ практически отсутствует способность самопроизвольно образовывать п.м.к. в однородных и смешанных культурах.

При добавлении в наружный солевой раствор небольших доз иона La^{3+} установление п.м.к. улучшалось, как видно из рис. 1, в молодых культурах МПТР и в прилежащих к краю «раны» участках взрослых культур МПТР, п.м.к. появлялись также в культурах L и RSK₄. Исключение составляет суточная культура клеток L. Во всех случаях действие La^{3+} обнаруживалось через несколько минут после смены среды. Характерно, что после удаления иона La^{3+} из среды клетки оставались связанными. В течение

30 мин. после удаления La клетки двухсуточной культуры МПТР оставались связанными на 90%; в свежей культуре, внесенной для контроля в эту же среду, степень связанности клеток п.м.к. составляла 20%. Клетки L после переноса в среду без La^{3+} в течение 15 мин. оставались связанными на 40%, повышение в среде концентрации ионов Ca^{2+} до 30 мМ не влияло на количество п.м.к.

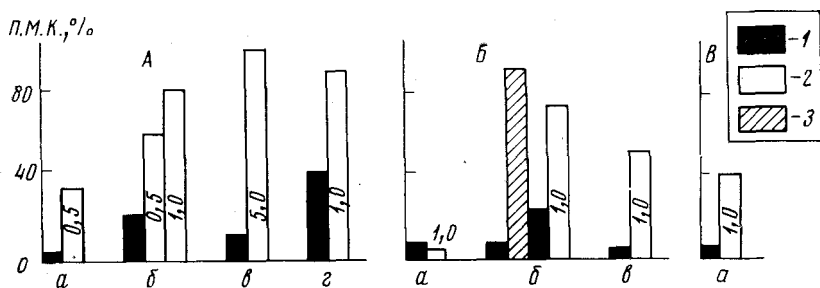


Рис. 1. Зависимость образования п.м.к. от добавления в среду иона La^{3+} . 1 — измерения в среде, не содержащей ион La^{3+} ; 2 — в среде с La^{3+} (цифры внутри столбиков — концентрация La^{3+} в мМ); 3 — измерения в среде нормального солевого состава рН 6,0. А — измерения в культуре МПТР (а — суточная культура, б — двухсуточная, в, г — край «раны» в четырехсуточной культуре); Б — измерения в культуре клеток L (а — суточная культура, б — пятисуточная и в — восьмисуточная); В — четырехсуточная культура RSK₄. Каждый столбик — среднее значение из 8—15 последовательных определений на одном стекле, все определения на одном стекле объединены в группы, обозначенные строчными буквами

В присутствии 30 мМ Ca^{2+} количество п.м.к. в четырехсуточной культуре МПТР составляло 20% на краю «раны» и 70% в глубине монослоя, что не отличается от контрольных данных, приведенных в табл. 1. В четырехсуточной культуре L-клеток степень связанности составляла 26% в присутствии 30 мМ Ca^{2+} (в контроле 10%). Таким образом, увеличение концентрации ионов Ca^{2+} не эквивалентно добавлению низких концентраций La (~1 мМ).

По предварительным данным, количество п.м.к. увеличивалось при понижении рН среды до 6,0 (см. рис. 1 Б, б). В опыте на четырехсуточной культуре RSK₄ снижение рН среды после действия La, вызвавшего появление 40% п.м.к., усиливало эффект до 100%; в свежей культуре, внесенной в эту же среду (нормального солевого состава), регистрировалось 60% п.м.к., причем при переносе в среду с нормальным рН клетки немедленно разоблачались.

Ранее при изучении п.м.к. у различных типов нормальных и опухолевых клеток *in vitro* мы наблюдали, что способность к установлению п.м.к. при трансформации клеток может утрачиваться лишь частично или, не проявляясь при контакте с гомотипными клетками, обнаруживаться при контакте с клетками другого типа (10). В настоящей работе способность к установлению п.м.к. меняется у клеток МПТР в зависимости от возраста культуры или от положения клеток в «рапеном» пласте, в обоих случаях меньшее количество п.м.к. коррелирует с пошением плотности клеток в пласте, т. е. способность устанавливать п.м.к. оказывается нестабильной характеристикой типа клеток.

Не совсем ясно, какую роль в установлении п.м.к. может играть ион La^{3+} . Вообще лантаниды — сильные восстановители, близкие по химическим свойствам к щелочноземельным металлам, но биологические свойства La и родственных ему элементов почти не изучены. На ряде объектов показано, что La не проникает внутрь клеток, а связывается (с насыщением в области концентраций 1—2 мМ) на поверхности клеток (11—14); с этим свойством, в частности, связано использование La в электронной микроскопии как маркера внеклеточных структур (6). Связанный с клет-

ками La не удаляется при переносе клеток в среду, лишенную La, а удаляется только под действием ферментов — проназы (¹⁴) или фосфолипазы C (¹³). Связываясь на поверхности клеток, La вытесняет связанный Ca и при этом блокирует вход Ca внутрь клетки (^{12, 14}).

Из ряда исследований ясно (³⁻⁵), что установление п.м.к. требует участия ионов Ca²⁺, причем, по-видимому, на разных стадиях этого процесса: как при сближении клеток до расстояния 20—40 Å и удерживании их на этом расстоянии, так и при перестройке структуры мембраны, создающей условия для перехода водорастворимых веществ из клетки в клетку, минуя внешнюю среду.

Аналогично иону Ca²⁺ ион La, частично экранируя отрицательный заряд поверхности и, таким образом, снижая электростатические силы отталкивания между клетками, может способствовать сближению подвижных участков поверхностей соседних клеток. При сближении на расстояние <2 μ, когда во взаимодействии клеток начинает играть роль взаимодействие зарядов противоположного знака на противлежащих поверхностях, ион La³⁺ может участвовать в образовании межклеточных «мостиков» и, таким образом, фиксировать участки поверхностей соседних клеток друг относительно друга, причем более эффективно, чем Ca²⁺.

На всех исследованных объектах: нервных и мышечных клетках (^{11, 12}), культивируемых куриных эмбриональных клетках (¹³), асцитных опухолевых клетках Эрлиха (¹⁴), La не оказывал повреждающего действия. В наших опытах при микроскопическом исследовании (875×) окрашенных гематоксилином препаратов также не обнаружено морфологических различий между контрольными и обработанными La клетками. Не исключено, что связывание на поверхности клетки La влияет на ультраструктуру мембраны. (Известно, что дестабилизация структуры мембраны лизолецитином способна приводить как к слиянию клеток, так и к установлению электрической связи между клетками (¹⁵).)

Возможно, дальнейшее исследование особенностей действия La на п.м.к. расширит наши представления о молекулярной природе установления между клетками прямой диффузионной связи, минуя внешнюю среду, без слияния клеток между собой.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. R. Loewenstein, *Developm. Biol.*, v. 19 (Suppl. 2), 151 (1968). ² В. П. Божкова, Л. Ю. Бойцова и др., Сб.: Межклеточные взаимодействия в дифференцировке и росте. «Наука», 1970, стр. 183. ³ W. R. Loewenstein, M. Nakas, S. J. Socolar, *J. Gen. Physiol.*, v. 50, 1865 (1967). ⁴ A. L. Politoff, S. J. Socolar, W. R. Loewenstein, *J. Gen. Physiol.*, v. 53, 498 (1969). ⁵ V. Asada, M. V. L. Bennett, *J. Cell. Biol.*, v. 49, 159 (1971). ⁶ J. P. Revel, M. J. Karnovsky, *J. Cell. Biol.*, v. 33, C7 (1967). ⁷ P. Vesely, R. A. Weiss, *Intern. J. Cancer*, v. 11, 64 (1973). ⁸ Ю. М. Васильев, И. М. Гельфанд, Л. В. Ерофеева, ДАН, т. 171, 721 (1966). ⁹ W. R. Loewenstein, Y. J. Kanno, *J. Cell Biol.*, v. 22, 565 (1964). ¹⁰ Л. Ю. Бойцова, Т. В. Поранова, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 8, 85 (1974). ¹¹ M. Takata, W. F. Pickard et al., *J. Gen. Physiol.*, v. 50, 461 (1966). ¹² G. B. Weiss, F. R. Goodman, *J. Pharm. Exp. Therapeutics*, v. 169, 46 (1969). ¹³ R. J. Lessups, *J. Cell Biol.*, v. 34, 173 (1967). ¹⁴ C. Levinson, T. M. Mikiten, T. C. Smith, *J. Cell. Physiol.*, v. 79, 299 (1971). ¹⁵ W. M. A. Haer, A. Venrooij et al., *J. Membr. Biol.*, v. 13, 61 (1973).