



УДК 576.52

© 1994 г.

**АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА ОБРАТИМО БЛОКИРУЕТ  
ВЫСОКОПРОНИЦАЕМЫЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ КОНТАКТЫ**

Хюльзер Д. \*, Цемпель Г. \*, Ройс Б. \*, Зур Д. \*,  
Шаровская Ю. Ю., Муравьева О. В., Дунина-Барковская А. Я.,  
Марголис Л. Б.

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии  
им. А. Н. Белозерского Московского государственного  
университета им. М. В. Ломоносова;  
\* Лаборатория биофизики Института биологии  
Штутгартского Университета, Германия*

С помощью метода внутриклеточной инъекции флуоресцентного красителя и электрофизиологических методов (микрелектродного и double whole-cell регистрации) показано блокирующее действие арахидоновой кислоты на проницаемость межклеточных контактов у культивируемых клеток опухолевого происхождения VICR/MIR<sub>2</sub>. Эффект зависел от дозы (10—100 мкМ) и был обратим при действии растворов, содержащих сыворотку крови (10%) или сывороточный альбумин (1 мг/мл). Микрофлуориметрические измерения показали, что при обработке клеток арахидоновой кислотой в концентрации, достаточной для полной блокады межклеточной передачи красителя (100 мкМ), происходило небольшое снижение внутриклеточного рН (от 7,2 до 7,0). Однако такой же сдвиг внутриклеточного рН, вызванный инкубацией клеток в физиологическом растворе с рН 6,5, не влиял на межклеточную связь. С помощью метода поточной флуориметрии в суспензии клеток выявлено увеличение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> от 80 до 100—200 нМ при действии 100 мкМ арахидоновой кислоты. Согласно литературным данным, такого повышения содержания Ca<sup>2+</sup> недостаточно для разобщения клеток. Кроме того, в опытах с double whole-cell регистрацией арахидоновая кислота эффективно блокировала контактную проводимость, несмотря на присутствие в пипетках 10 мМ EGTA, забуферивающей внутриклеточную концентрацию Ca<sup>2+</sup> на уровне pCa, равном 9. Результаты позволяют предположить, что разобщающее действие арахидоновой кислоты не опосредовано внутриклеточными мессенджерами — H<sup>+</sup> или Ca<sup>2+</sup>; возможно, механизм эффекта состоит в прямом взаимодействии арахидоновой кислоты с контактными каналами.

Одним из универсальных свойств многоклеточных систем является прямой межцитоплазматический обмен низкомолекулярными веществами (ионами и метаболитами) между контактирующими клетками. Такой обмен осуществляется с помощью специально организованных мембранных структур — высокопроницаемых межклеточных контактов (ВПК), состоящих из агрегата межклеточных каналов [1—3]. Несмотря на широкое распространение ВПК и, возможно, их важную роль в организации функционирования ткани или органа, механизмы регуляции ВПК остаются во многом неясными.

В ряде исследований было показано, что многие экзогенные липофильные вещества (гептанол, октанол, галотан, дипикриламид и др.) и некоторые жирные кислоты способны существенно менять проницаемость ВПК. [4—6]. Вопрос о возможной физиологической роли липофильных веществ в регуляции ВПК, а также механизм их действия на ВПК остается неизученным. Между тем жирные кислоты могут оказаться эндогенными регуляторами проницаемости ВПК, поскольку многие процессы в клетках сопровождаются существенными изменениями жирнокислотного состава мембран [7—13]. На сегодня важнейшей жирной кислотой, высвобождаемой в клетке в результате ее активации или повреждения, считается арахидоновая кислота (АК) [7—18]. Ее содержание в мембранах увеличивается при ишемии мозга [7], печени [8, 9] и сердца [10—12]; при

активации тромбоцитов [13—15] и нейтрофилов [16—18]. В настоящей работе мы исследовали эффекты АК на ВПК в клетках *in vitro* и взаимосвязь этих эффектов с действием других известных модуляторов межклеточной проницаемости.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Клетки.** Использовали культуру фибробластоидных клеток опухолевого происхождения (рак молочной железы крысы) линии VICR/MIR<sub>1</sub> [19]. Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37° в модифицированной по Дульбекко среде Игла («Biochrom KB», Германия) в присутствии 3,7 г/л бикарбоната натрия, 100 мг/л стрептомицин-сульфата, 150 мг/л пенициллина G и 10% неонатальной телячьей сыворотки крови («Biochrom KB»). Для пассирования клетки обрабатывали 0,25% трипсином в физиологическом растворе с фосфатным буфером без кальция и магния (ФРФБ<sup>-</sup>) [20]. В опытах использовали клетки через 1 сут после посева при плотности 10<sup>6</sup> клеток/чашку (диаметр 50 мм). В некоторых опытах использовали многоядерные клетки, полученные с помощью индуцированного полиэтиленгликолем слияния [21]. АК («Sigma», США) растворяли в физиологическом растворе с фосфатным буфером с кальцием и магнием (ФРФБ<sup>+</sup>) путем озвучивания в ультразвуковой ванне Branson («Branson», Франция) в течение 2 мин. Маточный раствор АК (10 мМ в гексане) хранили при -18° С. Перед озвучиванием растворитель высушивали в потоке азота. Альбумин, свободный от жирных кислот («Sigma», США), растворяли в ФРФБ<sup>+</sup> в концентрации 1 мг/мл. Состав ФРФБ<sup>+</sup> в мМ: 137 NaCl, 2,7 KCl, 6,5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 0,8 MgSO<sub>4</sub>, 0,9 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2.

**Определение уровня межклеточной связи с помощью внутриклеточной инъекции люциферового желтого.** Микропипетки, изготовленные из стеклянных капилляров («WPI», США) с помощью горизонтальной микроулицы PN-3 («Narishige», Япония), заполняли 4% раствором люциферового желтого («Sigma», США) в дистиллированной воде или в 1 М LiCl. Внутриклеточные инъекции красителя осуществляли с помощью ионофореза, пропуская импульсы тока в 20 нА в течение 5—10 с, с помощью ионофоретической приставки к микроэлектродному усилителю L/M-1 («List Electronic», Германия) [20, 22]. Использовали люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-И2 («ЛОМО», Россия) с фазово-контрастной оптикой и с автоматической микрофотонасадкой. Степень межклеточной диффузионной связи оценивали путем подсчета числа клеток, в которые краситель распространился через 2 мин после инъекции [20, 22].

**Электрофизиологические измерения.** Оценку эффективности электрической связи в монослойных культурах проводили микроэлектродным методом [23, 24]. Эти опыты проводили на гомокарионах, полученных с помощью полиэтиленгликоля. Внутриклеточные микроэлектроды заполняли 3 М раствором KCl. В одну из клеток монослоя вводили два микроэлектрода: один — для инъекции тестирующих прямоугольных импульсов тока (3 нА), другой — регистрирующий, для измерения сдвига мембранного потенциала V<sub>1</sub>, вызванного импульсом тока. В соседнюю клетку вводили еще один микроэлектрод, регистрирующий сдвиг потенциала в этой клетке (V<sub>2</sub>) при пропускании тока через первую клетку. Для регистрации потенциалов использовали микроэлектродные усилители L/M-1 («List Electronic», Германия); сигналы с выходов усилителей подавались на самописец Graphias («Sefram», Франция). Эффективность электрической связи оценивалась по отношению V<sub>2</sub>/V<sub>1</sub> [23]. Введение микроэлектродов осуществляли с помощью микроманипуляторов с электрическим приводом DC3 + STM3 («Gebr. Märzhäuser», Германия).

Измерения проводимости одиночного межклеточного контакта в двуклеточных агрегатах проводили с помощью метода одновременной регистрации токов соседних клеток в режиме фиксации потенциала (double whole-cell) [25]. Пипетки заполняли раствором, содержащим 140 мМ CsCl, 10 мМ тетраэтиламмоний-хлорид

(TEA—Cl), 10 мМ EGTA, 10 мМ HEPES/КОН (рН 7,3). Использовали усилители patch-clamp EPC-7 («List Electronic», Германия). Для измерения проводимости контакта на каждую из клеток пары поочередно подавали прямоугольные импульсы потенциала в 10 мВ с частотой 0,2 Гц [26]. Регистрируемые токовые сигналы фильтровали с помощью частотных фильтров (Type 2, «Frequency Devices», США) при полосе пропускания 250 Гц, записывали с помощью модифицированного цифрового аудиопроцессора PCM 501ES («Sony Corporation», Япония) и видеоманитографа NV-810 («Panasonic», Япония) и в дальнейшем анализировали с помощью компьютера IBM/AT.

*Измерение внутриклеточного рН.* Внутриклеточный рН измеряли с помощью микрофлуориметрического метода [27, 28] с использованием фотомикроскопа («Zeiss», Германия), оборудованного фотометрической приставкой ФМЕЛ-2 («ЛОМО», Россия). Клетки в чашках Петри инкубировали в присутствии 1—2 мкМ ацетоксиметилового эфира 2',7'-бис-(2-карбокситетил)-5(6)-карбоксифлуоресцеина (BCECF-AM) («Molecular Probes», США) в растворе Хенкса, рН 7,4, в течение 40—60 мин и определяли интенсивность флуоресценции клеток при 520 нм при длинах волн возбуждения 430 и 490 нм [29]. По отношению интенсивностей флуоресценции при этих длинах волн вычисляли внутриклеточный рН, используя калибровочный график, полученный нигерицинкалиевым методом [30]. Высококальциевая наружная среда для калибровки содержала (в мМ): 140 КСl; 1,8 СаСl<sub>2</sub>; 0,8 МgСl<sub>2</sub>, а также либо 10 мМ HEPES («Sigma», США) при рН 7,0—7,7, либо 10 мМ MES («Sigma», США) при рН 6,0—6,8. BCECF-AM растворяли в диметилсульфоксиде («Sigma», США) в концентрации 1 мМ и хранили при —18°. Нигерицин («Sigma», США) растворяли в дважды перегнанном этаноле в концентрации 10 мМ и хранили при —18° не более 2 нед. Концентрация нигерицина при проведении калибровки составляла 10 мкМ.

*Определение внутриклеточной концентрации кальция.* Внутриклеточную концентрацию кальция  $[Ca^{2+}]_i$  определяли с помощью метода поточной флуориметрии [31, 32] с использованием  $Ca^{2+}$ -чувствительного индикатора INDO-1 («Molecular Probes», США) [29]. Интенсивность флуоресценции измеряли при двух длинах волн 405 и 485 нм, длина волны возбуждающего света 360 нм, и концентрацию свободного кальция определяли по отношению интенсивностей флуоресценции при двух длинах волн. Для проведения измерений клетки на чашках Петри снимали трипсином (0,25% раствор в ФРФБ<sup>+</sup>) и суспендировали в 2 мл ФРФБ<sup>+</sup>. Суспензию центрифугировали при 500g в течение 5 мин, клеточный осадок суспендировали в 250 мкл ФРФБ<sup>+</sup>, содержащем 40 мкг/мл INDO-1 АМ. После 5-мин инкубации при 37° в присутствии зонда объем суспензии доводили раствором ФРФБ<sup>+</sup> до 2 мл и использовали эту суспензию для измерений в поточном флуориметре FACS Analyser («Beckton-Dickinson», Германия), соединенном с компьютером Hewlett Packard. Измеряли  $[Ca^{2+}]_i$  у 10 000 клеток в контрольных условиях, у 20 000 клеток в присутствии АК и у 10 000 клеток при добавлении альбумина. Калибровку проводили методом [33] в модификации Й. Бреннера, с использованием семи калибровочных растворов с рСа от 5,3 до 9,0, забуференных EGTA. Присутствие в калибровочном растворе АК или альбумина не влияло на регистрируемое отношение интенсивностей флуоресценции. Маточный раствор INDO-1 АМ (1 мг/мл в диметилформамиде) хранили при —18° С.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Арахидоновая кислота блокирует проницаемость ВПК

*АК блокирует межклеточное перетекание красителя люциферового желтого, инъецированного в одну из клеток монослоя.* Метод внутриклеточных инъекций красителя позволяет дать количественную оценку эффективности межклеточной связи и ее модуляций. Как уже было показано ранее [34], в контрольных условиях клетки В1СR/М1R<sub>1</sub> хорошо связаны между собой: люциферовый желтый,

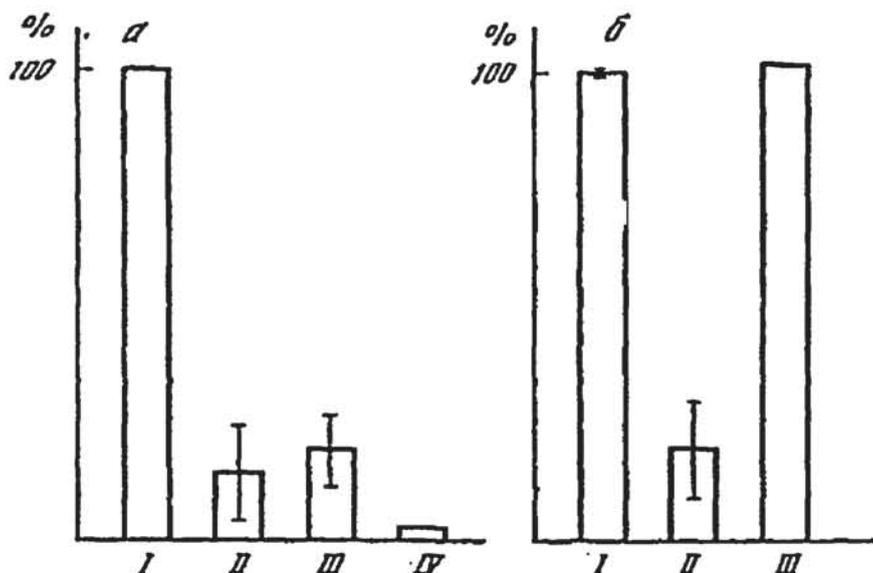


Рис. 1. Действие АК на перетекание красителя люциферового желтого, инъецированного в одну из клеток монослоя. Межклеточная связь (ось ординат) оценивалась по отношению (в %) количества окрашенных клеток, непосредственно контактирующих с инъецированной клеткой (соседи первого порядка), к общему числу соседей первого порядка. Приведены средние значения и стандартное отклонение. *a* — зависимость эффекта от дозы АК (клетки инкубировали в присутствии АК в разных концентрациях в течение 30 мин): I — контроль; II — 10 мкМ АК; III — 50 мкМ АК; IV — 100 мкМ АК. *б* — обратимость эффекта АК: I — контроль; II — межклеточная диффузионная связь через 10 мин от начала инкубации клеток в присутствии 50 мкМ АК; III — межклеточная диффузионная связь через 10 мин от начала отмывки АК средой, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки

инъецированный в одну из клеток монослоя, диффундирует из клетки-донора в соседние клетки, так что через 2—3 мин краситель обнаруживается в 10—20 клетках. Окрашены все соседние клетки первого порядка (т. е. клетки, непосредственно контактирующие с клеткой-донором), а также более удаленные клетки.

При инкубации в течение 30 мин в присутствии АК в ФРФБ<sup>+</sup> перетекание красителя подавлялось. Эффект зависел от концентрации АК. Если в контрольных условиях количество окрашенных соседей первого порядка составляло 100% ± 0,2 ( $n = 12$ ) от общего числа клеток-соседей первого порядка, то в присутствии 50 мкМ АК это количество снижалось до 18,9% ± 7,4 ( $n = 28$ ), а 100 мкМ АК подавляла перетекание люциферового желтого до 3,3% ± 0,2 ( $n = 14$ ).

Эффект АК был обратим: при инкубации клеток в среде, содержащей сыворотку, происходило практически полное восстановление межклеточной связи. Рисунок 1 иллюстрирует дозо-зависимость проницаемости межклеточных контактов при действии АК и обратимость эффекта.

*Действие АК на электрическую (ионную) связь между клетками.* Межклеточное перетекание красителя характеризует проницаемость контактов для молекул данного размера (400 Да в случае люциферового желтого) [22]. Другой важной характеристикой межклеточного контакта является его электрическая проводимость, которая определяется проницаемостью для ионов и измеряется с помощью электрофизиологических методов [23—25]. Эти методы позволяют на количественном уровне проследить динамику изменений электрической проводимости контактов при действии ее модуляторов. Мы оценивали эффективность электрической (ионной) межклеточной связи с помощью микроэлектродного метода в клеточных монослоях, а также с помощью метода одновременной регистрации токов соседних клеток в режиме фиксации потенциала (double whole-cell регистрация), проводимой на двухклеточных агрегатах.

Рисунок 2 иллюстрирует действие АК на электрическую связь в монослое клеток BICR/M1R<sub>1</sub>. Через 10 мин после начала внеклеточной перфузии клеток раствором, содержащим 100 мкМ АК, произошло разобщение клеток: снижение коэффициента электрической связи ( $V_2/V_1$ ) и увеличение входного сопротивления

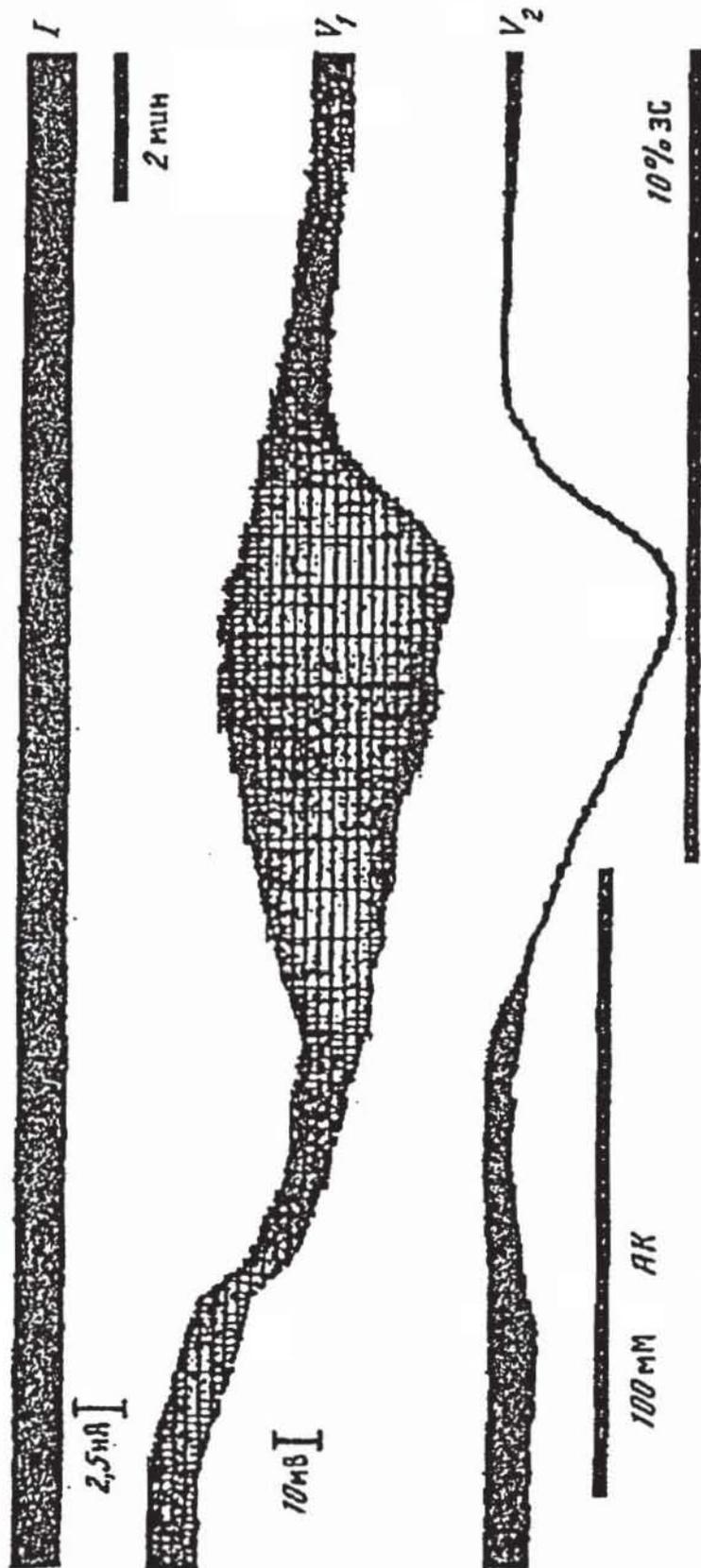


Рис. 2. Угнетающее действие АК на электрическую межклеточную связь у клеток ВИСР/МІР<sub>1</sub>. В одну из многоядерных клеток мононослой введен внутриклеточный микроэлектрод, через который пропускаются тестирующие импульсы тока  $I$ . Второй микроэлектрод, введенный в эту же клетку, регистрирует соответствующие сдвиги потенциала на мембране этой клетки ( $V_1$ ). Третий микроэлектрод введен в соседнюю клетку и регистрирует электрогенический сдвиг потенциала ( $V_2$ ), характеризующий степень электрической (ионной) межклеточной связи. Внеклеточная перфузия физиологическим раствором, содержащим 100 мгМ АК, приводит к разобщению клеток (снижение  $V_2$ , рост входного сопротивления первой клетки,  $V_1/I$ ). Отмывка средой Дульбекко с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭС) восстанавливает межклеточную связь

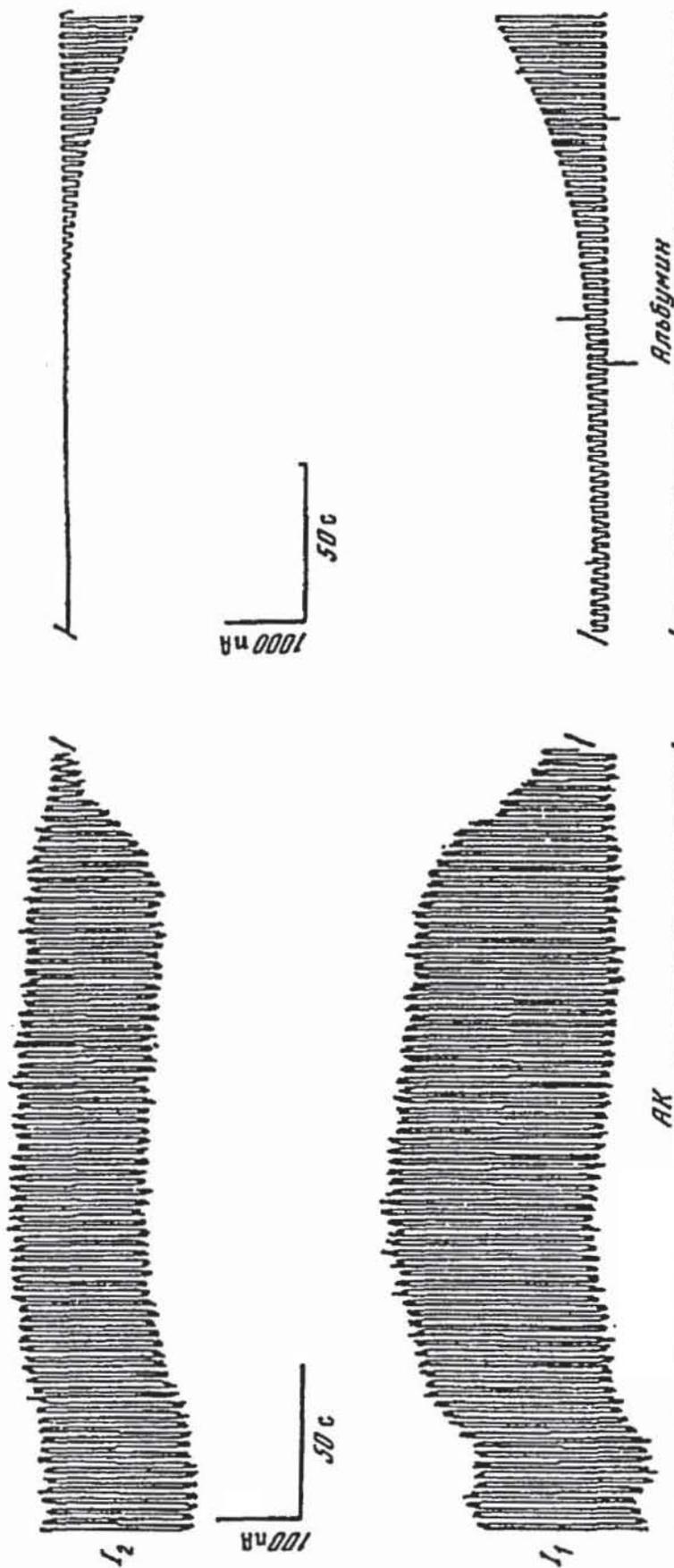


Рис. 3. Разобщающее действие АК: регистрация на паре клеток линии ВИСР/МІР<sub>4</sub> методом double whole-cell. На обеих клетках пары мембранный потенциал фиксирован на одинаковом уровне (-10 мВ). На одну из клеток пары подаются импульсы потенциала от -10 до 0 мВ. Ток, регистрируемый при этом на второй клетке ( $I_2$ ), соответствует трансконтактному току и прямо пропорционален проводимости контакта; ток, регистрируемый на первой (поляризуемой) клетке ( $I_1$ ), равен сумме токов, текущих через контактную и неконтактную мембраны этой клетки [25]. Приведены осциллограммы токов на фоне висеклеточной перфузии физиологическим раствором в присутствии 100 мкМ АК и последующей перфузией раствором, содержащим 1 мг/мл альбумина. Опушен 3-мин фрагмент регистрации от начала перфузии альбумином до начала восстановления межклеточной связи. Записи токов на фоне перфузии АК и альбумином сделаны при разной чувствительности по току (см. калибровки)

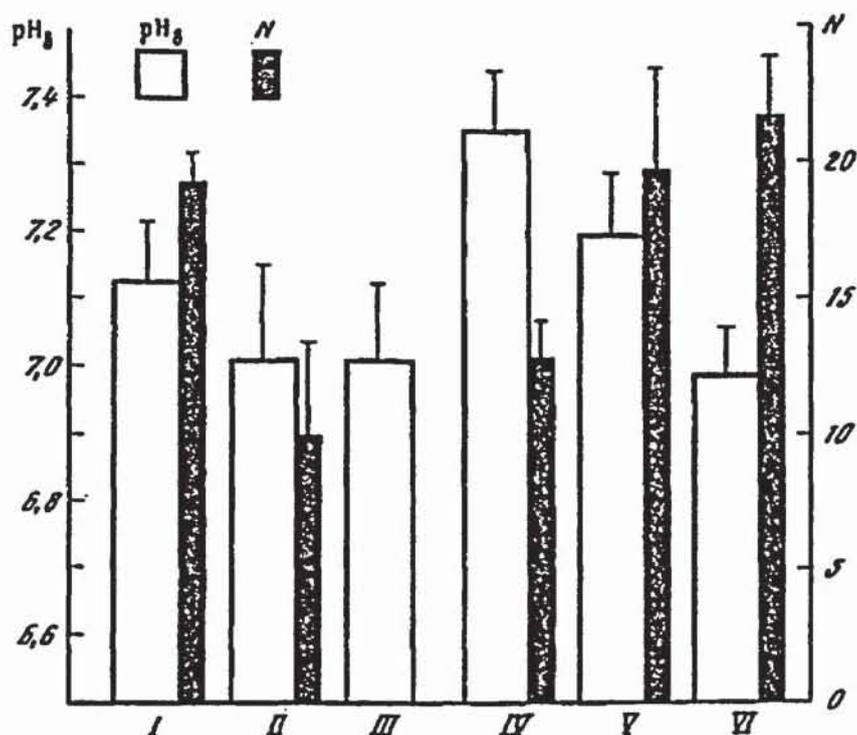


Рис. 4. Действие АК на внутриклеточный рН ( $pH_i$ ) и межклеточную диффузионную связь у клеток линии В1СR/М1R<sub>1</sub>. Оси ординат: слева —  $pH_i$ , справа —  $N$  — число окрашенных клеток после инъекции люциферового желтого в одну из клеток монослоя. I — контроль в растворе Хенкса с рН 7,4; II и III — АК (100 мкМ в растворе Хенкса) вызывает небольшое снижение  $pH_i$  и угнетает межклеточную диффузию красителя (II — через 15 мин и III — через 30 мин от начала инкубации); IV — отмывка средой Дульбекко с 10% эмбриональной телячьей сыворотки через 30 мин восстанавливает  $pH_i$  и межклеточную связь; V — контроль в растворе Рингера с рН 7,2; VI — раствор Рингера с рН = 6,5 через 30 мин от начала инкубации вызывает тот же сдвиг  $pH_i$ , что и АК (II, III), но не влияет на межклеточную передачу красителя

системы ( $V_1/D$ ). При промывании клеток раствором с сывороткой наблюдалось восстановление электрической связи. Снижение амплитуды  $V_2$  в два раза относительно контрольного уровня происходило за  $18,1 \pm 6,0$  мин ( $n = 7$ ) при обработке клеток 50 мкМ АК, и за  $8,4 \pm 1,1$  мин ( $n = 12$ ) — при концентрации АК 100 мкМ. Интересно, что в ряде случаев при действии АК наблюдался сдвиг мембранного потенциала (см. рис. 2), что может свидетельствовать о влиянии АК и на ионные каналы неконтактных мембран [35—38].

Эксперименты, проведенные на парах клеток с помощью метода double whole-cell регистрации, дали те же результаты, что и микроэлектродные отведения на клетках в монослое: внеклеточная перфузия раствором с 100 мкМ АК вызывала блокаду контактной проводимости примерно через 5—10 мин от начала обработки, а раствор ФРФБ<sup>+</sup> с альбумином примерно через то же время восстанавливал межклеточную связь (рис. 3). Существенным отличием в условиях этих экспериментов от опытов с микроэлектродами являлось наличие в низкоомных (2—3 МОм) patch-пипетках 10 мМ EGTA и 10 мМ HEPES, забуферивающих внутриклеточные концентрации  $Ca^{2+}$  и  $H^+$  соответственно до  $pCa = 9$  и  $pH = 7,2$ .

#### Действие арахидоновой кислоты на внутриклеточные концентрации ионов водорода и кальция

АК снижает внутриклеточный рН. С целью выяснения механизма блокирующего действия АК на межклеточные контакты были проведены параллельные измерения внутриклеточного рН ( $pH_i$ ) и межклеточного перетекания красителя при обработке клеток АК. Микрофлуориметрические измерения  $pH_i$  показали, что через 30 мин инкубации клеток в присутствии 100 мкМ АК происходит небольшое, но статистически достоверное снижение  $pH_i$  — от ~7,2 в контроле

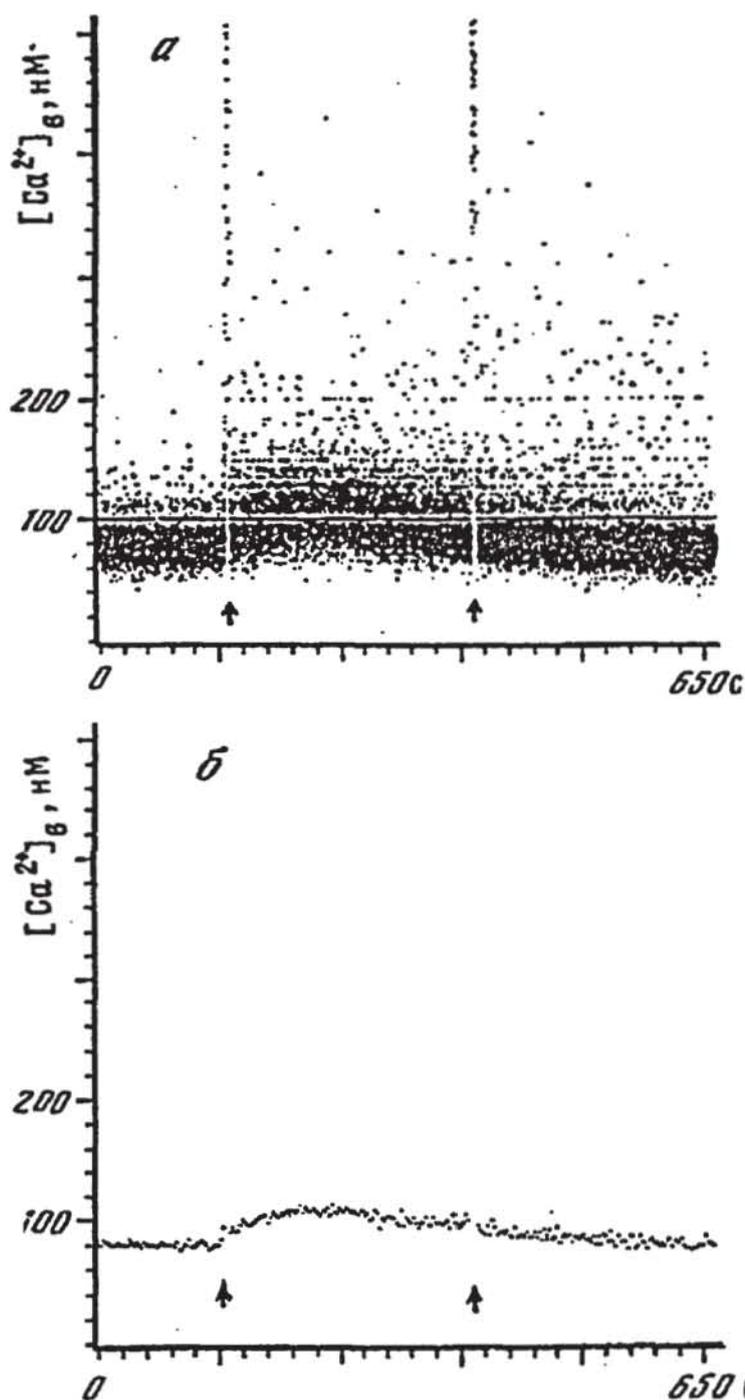


Рис. 5. Действие АК на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) у клеток В1СR/М1R<sub>1</sub>: измерения методом поточной флуориметрии в суспензии клеток. а — экспериментальные данные, полученные для всей массы клеток; б — усредненные значения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; стрелками отмечено добавление АК и альбумина

до  $\sim 7,0$  после обработки АК (рис. 4, I, II, III). За то же время 100 мкМ АК полностью блокировала межклеточное перетекание люциферового желтого. Последующая инкубация клеток в среде с сывороткой в течение 30 мин вызвала увеличение  $\text{pH}_i$  выше контрольного уровня, а также восстановление перетекания красителя (рис. 4, IV).

Для определения  $\text{pH}$ -чувствительности межклеточной диффузионной связи была проведена серия экспериментов, в которых снижение внутриклеточного  $\text{pH}$  достигалось путем обработки клеток в физиологическом растворе, закисленном до  $\text{pH}_i = 6,5$  с помощью MES. Инкубация клеток в таком растворе в течение 30 мин приводила к такому же снижению  $\text{pH}_i$ , что и обработка АК. Параллельные

измерения перетекания люциферового желтого показали, что проницаемость межклеточных контактов при этом не изменилась (рис. 4, V, VI).

*Действие АК на концентрацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$ .* Для измерения концентрации внутриклеточного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) с помощью метода поточной флуориметрии клетки сначала переводили в суспензию, и затем измеряли  $[Ca^{2+}]_i$  до обработки АК (контроль), в присутствии 100 мкМ АК и при добавлении 1 мг/мл альбумина. Рисунок 5 иллюстрирует полученные результаты. В контроле  $[Ca^{2+}]_i$  составляла 80 нМ. Через 2—3 мин после добавления АК происходило повышение  $[Ca^{2+}]_i$  до 100—200 нМ. В растворе с альбумином  $[Ca^{2+}]_i$  восстанавливалась до контрольного уровня.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

АК является важным компонентом клеточных мембран [7—17, 39—41]. Арахидонат входит в состав ряда фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилинозит, фосфатидилэтаноламин), участвующих в передаче сигнала с клеточной поверхности в цитоплазму. Связывание мнѳгих лигандов на клеточной поверхности приводит к активации фосфолипаз, которые либо непосредственно высвобождают АК, либо гидролизуют фосфолипид до диацилглицерина, и АК высвобождается уже в процессе метаболизма последнего [10, 14, 15, 39—41]. С другой стороны, недавно было показано, что АК вызывает угнетение проницаемости межклеточных контактов [4, 5, 42, 43]. Положение АК на пересечении важнейших путей клеточного метаболизма, ее участие в сигнальных каскадах внутриклеточных реакций и активность АК в отношении межклеточных контактов позволяет предположить, что АК может быть одним из эндогенных физиологических регуляторов контактной проницаемости. Кроме того, возникает вопрос о механизме разобщающего действия АК.

В настоящей работе мы показали тремя различными методами, что АК действительно блокирует межклеточные контакты. Мы попытались определить, опосредовано ли действие АК вторичными внутриклеточными мессенджерами, модулирующими проницаемость ВПК. На основании проведенных опытов мы предполагаем, что АК действует на контакты непосредственно, встраиваясь в плазматическую мембрану. Обсудим эти опыты более подробно.

Проницаемость межклеточных контактов оценивалась несколькими способами: а) микроинъекция флуоресцентного красителя в одну из клеток монослоя; число клеток, в которые краситель диффундирует из клетки-донора, характеризует количество и проницаемость высокопроницаемых контактов; б) измерение электротонической (ионной) связи и входного сопротивления в клеточных монослоях с помощью введенных в контактирующие клетки микроэлектродов; в) прямое измерение электрической проводимости одиночного межклеточного контакта в паре клеток методом double whole-cell регистрации. Как следует из представленных результатов, в присутствии АК происходит обратимое угнетение переноса из клетки в клетку как низкомолекулярного флуоресцентного красителя, так и ионов.

Выше было упомянуто, что метаболизм АК связан с работой фосфатидилинозитного сигнального каскада [10, 14, 15, 39—41]. Одним из последствий активации этого механизма является увеличение концентрации свободных ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме за счет выброса ионов из внутриклеточных депо и входа из наружной среды [44]. Поскольку повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  снижает проницаемость ВПК [45—48], можно предположить, что разобщающее действие АК опосредовано внутриклеточным кальцием. Однако наши результаты не подтверждают это предположение. Измерение  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках BICR/M1R<sub>1</sub> показало, что АК вызывает лишь слабое увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в цитоплазме (от 80 до 100—200 нМ), которое вряд ли могло привести к существенному снижению проницаемости ВПК. По данным литературы, даже при  $[Ca^{2+}]_i$  порядка нескольких сотен нМ происходит межклеточная

диффузия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через межклеточные контакты [49, 50]; для полной блокады ВПК требуется увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  до сотен мкМ [45—48]. Кроме того, блокирующее действие АК сохранялось и в опытах с double whole-cell регистрацией с использованием пипеток, заполненных раствором, содержащим 10 мМ EGTA, при  $p\text{Ca} > 9$ . В таких условиях увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на два порядка (от 1 до 100 нМ) вообще маловероятно.

Еще одним известным фактором, блокирующим проницаемость межклеточных контактов, является снижение  $p\text{H}_i$  [51, 52]. Проведенные в наших экспериментах измерения  $p\text{H}_i$  показали, что обработка клеток 100 мкМ АК сопровождается небольшим (на 0,1—0,2 единицы  $p\text{H}$ ) снижением  $p\text{H}_i$ . Мы добились такого же снижения  $p\text{H}_i$  без АК, инкубируя клетки в закисленном с помощью MES наружном физиологическом растворе. Это снижение  $p\text{H}_i$  не повлияло на проницаемость контактов для флуоресцентного красителя. С этими данными согласуются и результаты опытов с double whole-cell регистрацией. В этих опытах пипетки были заполнены раствором, содержащим 10 мМ HEPES, который должен был бы стабилизировать  $p\text{H}$  в клетках. Тем не менее в этих условиях АК блокировала проводимость межклеточных контактов.

Мы не можем исключить, что какие-то иные факторы опосредуют действие АК на проницаемость межклеточных контактов. Однако естественным кажется предположить, что АК действует непосредственно на контактную мембрану, приводя к ее реорганизации и в результате к блокированию контактов. В пользу этого предположения могут свидетельствовать такие факты, как увеличение содержания АК в клеточных мембранах при обработке клеток экзогенной АК (G. Zempel, неопубликованные данные); обратимость эффекта АК после экстракции альбумином (этот белок связывается именно со свободными жирными кислотами, извлекая из мембраны скорее именно поступившую туда из раствора АК, нежели предполагаемые ее метаболиты). Наконец, в пользу нашего предположения говорит и тот факт, что другие жирные кислоты оказывают угнетающее действие на проницаемость межклеточных контактов примерно в тех же концентрациях, что и АК [4, 5, 42, 53—55].

Поскольку свободная АК появляется в клеточных мембранах в процессе регуляции функций клетки, то независимо от правильности высказанных гипотез о механизмах действия АК можно предположить, что АК является одним из эндогенных физиологических регуляторов межклеточных контактов.

Работа частично финансировалась из средств Министерства науки, высшей школы и технической политики РФ, выделенных на международный проект «Биоэнергетика».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беркинблит М. Б., Божкова В. П., Бойцова Л. Ю., Миттельман Л. А., Потапова Т. В., Чайлахян Л. М., Шаровская Ю. Ю. Высокопроницаемые контактные мембраны. М.: Наука, 1981. 464 с.
2. Parallels in cell to cell junctions in plants and animals/Eds. Robards A. W., Lucas W. J., Pitts J. D., Jongsma H. J., Spray D. C. NATO ASI Series, V. H46. Berlin — Heidelberg — N. Y.: Springer, 1990.
3. Gap junctions. (Modern cell biology, V. 7)/Eds. Herzberg E. L., Johnson R. G. N. Y.: Alan R. Liss, Inc., 1988.
4. Burt J. M.//Biophysics of gap junction channels./Ed. Peracchia C. N. W. (Florida): CRC—Press, Inc., 1991. Ch. 6. P. 75—93.
5. Malewitz B., Kumar V. V., Johnson R. G., Baumann W. J.//Lipids. 1990. V. 25. P. 419—427.
6. Turin L., Béhé P., Plonsky I., Dunina-Barkowskaya A.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 9365—9369.
7. Wieloch T., Siesjö B. K.//Pathol. Biol. 1982. V. 30. P. 269—277.
8. Chien K. R., Adams J., Serroni A., Martin J. T., Farber J. L.//J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 4809—4817.
9. Chien K. R., Abrams J., Richard G., Farber J. L.//Amer. J. Pathol. 1977. V. 88. P. 539—557.

10. Chien K. R., Han A., Sen A., Buja L. M., Willerson J. T.//Circ. Res. 1984. V. 54. P. 313—322.
11. Prinzen F. W., van der Vusse G. J., Arts T., Roemen T. H. M., Coumans W. A., Reneman R. S.//J. Physiol. 1984. V. 247. P. H264—H272.
12. Gunn M. D., Sen A., Chang A., Willerson J. T., Buja L. M., Chien K. R.//Amer. J. Physiol. 1985. V. 249. P. H1188—H1194.
13. Prescott S. M., Majerus P. N.//J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 764—769.
14. Rittenhouse-Simons S.//J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 2259—2262.
15. Neufeld E. J., Majerus P. N.//J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 2461—2467.
16. Chilton F. H., Connel T.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 5260—5265.
17. Chilton F. H.//Biochem. J. 1989. V. 258. P. 327—333.
18. Chilton F. H., Murphy R. C.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. V. 145. P. 1126—1133.
19. Rajevsky M. F., Grüneisen A.//Eur. J. Immunol. 1972. V. 2. P. 445—447.
20. Brümmer F., Zempel G., Buhle P., Stein J.—C., Hülser D. F.//Exp. Cell Res. 1991. V. 196. P. 158—163.
21. Krähling H., Schinkevitz U., Barker A., Hülser D. F.//Cytobiology (Eur. J. Cell Biol.). 1978. V. 17. P. 51—61.
22. Flagg-Newton J. L., Loewenstein W. R.//J. Membrane Biol. 1981. V. 63. P. 123—131.
23. Loewenstein W. R., Kanno Y.//J. Cell Biol. 1964. V. 22. P. 565—586.
24. Dertinger H., Hülser D. F.//Recent results in Cancer/Eds. Acker H., Carlsson I., Sutherland R. M. Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1984. V. 95. P. 67—83.
25. Neyton P., Trautmann A.//Nature. 1985. V. 317. P. 331—335.
26. Paschke D., Eckert R., Hülser D. F.//Pflügers Arch. 1992. V. 420. P. 87—93.
27. Thomas J. A., Buchsbaum R. N., Zimniak A., Racker E.//Biochemistry. 1979. V. 18. P. 2210—2218.
28. Tsein R. Y.//Methods in Cell Biology. N. Y.: Academ. Press, Inc., 1989. V. 30, Ch. 5. P. 127—157.
29. Molecular Probes, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals by R. P. Haugland (1992—94). N. Y.: Molecular Probes Inc., 1992.
30. Paradiso A. M., Tsein R. Y., Machen T. E.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 7436—7440.
31. Kachel V.//Clinical Cytometry. 1986. V. 468. P. 28—44.
32. Valet G., Raffael A., Rüssman L.//Naturwissenschaften. 1985. V. 72. P. 600—602.
33. Kachel V., Kempski O., Peters J., Schödel F.//Cytometry. 1990. V. 11. P. 913—915.
34. Hülser D. F., Brümmer F.//Biophys. Struct. Mech. 1982. V. 9. P. 83—88.
35. Shimada T., Somlyo A. P.//J. Gen. Physiol. 1992. V. 100. P. 27—44.
36. Kurachi Y., Ito H., Sugimoto T., Shimizu T., Miki I., Ui M.//Nature (Lond.) 1989. V. 337. P. 555—557.
37. Lambert I. H.//Cell Physiol. Biochem. 1991. V. 1. P. 177—194.
38. Hwang T.-C., Guggino S. E., Guggino W. B.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 5706—5709.
39. Gross R. W.//Trends Cardiovasc. Med. 1992. V. 2. P. 115—121.
40. Chilton F. H.//Methods in Enzymology. San Diego: Acad. Press, 1991. V. 197. P. 166—182.
41. Spector A. A., Yorek M. A.//J. Lipid Res. 1985. V. 26. P. 1015—1035.
42. Giaume C., Randriamampita C., Trautmann A.//Pflügers Arch. 1989. V. 413. P. 273—279.
43. Massey K. D., Minnich B. N., Burt J. M.//Amer. J. Physiol. 1992. V. 263. P. C494—C501.
44. Berridge M. J., Irvine R. F.//Nature. 1989. V. 341. P. 197—205.
45. Loewenstein W. R., Rose B.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975. V. 307. P. 285—307.
46. Rose B., Rick R.//J. Membr. Biol. 1978. V. 44. P. 377—415.
47. Spray D. C., Stern J. H., Harris A. L., Bennett M. V. L.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 441—445.
48. Bennett M. V. L., Verselis V., White R. L., Spray D. C.//Gap Junctions/Ed. Hertzberg E. L., Johnson R. G. N. Y.: Alan R. Liss, Inc., 1988. P. 167—175.
49. Charles A. C., Naus C. C. G., Zhu D., Kidder G. M., Dirksen E. R., Sanderson M. J.//J. Cell Biol. 1992. V. 118. P. 195—201.
50. Christ G. J., Moreno A. P., Melman A., Spray D. C.//Amer. J. Physiol. 1992. V. 263 (Cell Physiol. 32). P. C373—C383.
51. Turin L., Warner A. E.//J. Physiol. (Lond.). 1980. V. 300. P. 489—504.
52. Spray D. C., Harris A. L., Bennett M. V. L.//Science. 1981. V. 211. P. 712—715.
53. Hasler K. M., Bennink M. R., Trosko J. E.//Amer. J. Physiol. 1989. V. 261. P. C161—C168.
54. Aylsworth C. F., Trosko J. E., Welsch C. W.//Cancer Res. 1986. V. 46. P. 4527—4533.
55. Aylsworth C. F., Welsch C. W., Kabara J. J., Trosko J. E.//Lipids. 1987. V. 22. P. 445—454.

Поступила в редакцию  
4.III.1993

## ARACHIDONIC ACID REVERSIBLY REDUCES INTERCELLULAR JUNCTION PERMEABILITY

Hülser D. F., Zempel G., Reuss B., Suhr D., Sharovskaya Yu. Yu., Muravjova O. V.,  
Dunina-Barkovskaya A. Ya., Margolis L. B.

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,  
Moscow State University, Moscow;  
Abteilung Biophysik, Biologisches Institut,  
Universität Stuttgart, Germany*

The effect of arachidonic acid on intercellular coupling via gap junctions has been studied in BICR/MIR<sub>k</sub> cells — a mammary tumor cell line of the Marshall rat. Arachidonic acid is shown to reversibly block both ionic and dye coupling in a dose-dependent manner. The cells recoupled after the washout with either serum- or albumin (essentially fatty acid-free)-containing solution. The intracellular pH decreased from 7.2 to 7.0 after arachidonic acid treatment; the same pH shift in the absence of arachidonic acid, however, had no effect on the junctional permeability. Flow cytometric measurements revealed an arachidonic acid-induced increase in the cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration which was also reversible upon albumin treatment. Intracellular Ca<sup>2+</sup> or H<sup>+</sup> are unlikely to be involved in the mechanism of the arachidonic acid effect on intercellular coupling: high resolution measurements using double whole-cell technique also show reversible blockage of the junctional conductance in the presence of arachidonic acid while the pipette solution was buffered with 10 mM HEPES and 10 mM EGTA to clamp intracellular calcium and proton concentrations. We suggest that arachidonic acid directly affects the gap junction channels, probably interfering with the lipid-protein interactions.