

Li/Na-ОБМЕН И АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ Li В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА U937, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ЛИТИЕВЫХ СРЕДАХ

© В. Е. Юринская, А. В. Мошков, Т. С. Горячая, А. А. Веренинов¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: verenino@gmail.com*

Транспорт Li^+ через клеточную мембрану давно привлекает внимание в связи с его изменениями при ряде патологий человека и в общем плане понимания механизма движения ионов через биологические мембраны. Механизмы переноса Li^+ через клеточную мембрану исследовали главным образом на эритроцитах, у которых обмен Li^+ идет медленно, и поэтому транспорт изучается обычно в нестационарных условиях. Проллиферирующие клеточные культуры, у которых ионный обмен идет быстро, почти не использовали для исследования транспорта Li^+ . В настоящей работе на клетках U937 исследовали кинетику поступления и выхода Li^+ , его стационарное распределение при длительном культивировании клеток в среде с относительно небольшими концентрациями Li^+ и при полной замене Na^+ в среде на Li^+ . Установлено, что стационарное распределение Li^+ у клеток U937 достигается почти так же быстро, как Na^+ и Cl^- , и что при варьировании концентрации Li^+ в среде от 1 до 10 мМ значение коэффициента дискриминации Li^+/Na^+ в условиях баланса входных и выходных потоков Li^+ и Na^+ сохраняется близким к 3, а при блокировании Na,K-АТФазного насоса убаинном распределение Li^+ и Na^+ становится одинаковым. Показано, что у клеток U937 в условиях, близких к физиологическим, при 5 мМ Li^+ в среде и его стационарном распределении между клеткой и средой около 80 % потока Li^+ приходится на эквивалентный Li^+/Li^+ -перенос. В нетто-потоке Li^+ в клетку по градиенту большая часть приходится на каналы и меньшая часть на входной поток через симпорты NC или NKCC. Этот поток компенсируется потоком Li^+ против градиента электрохимического потенциала, сопряженным с потоком Na^+ (Li^+/Na^+ -обмен), который по отношению к общему потоку Na^+ составляет 0.5 %. В клетках U937, инкубируемых в среде, содержащей Li^+ вместо Na^+ , через несколько часов весь внутриклеточный Na^+ и почти весь K^+ замещаются литием. Такие клетки могут служить модельным объектом для изучения роли K^+ и Na^+ в регуляции различных внутриклеточных процессов.

Ключевые слова: Li^+/Na^+ обмен, литий, ионный транспорт, клетки U937.

Принятые сокращения: ДМА — диметиламилорид, NMDG-Cl — хлорид N-метил-D-глюкамина, MgGluc — глюконат магния, АО — акридиновый оранжевый, БЭ — бромистый этидий, NC — Na-Cl симпорт, NKCC — Na-K-2Cl котранспортер, NHE — Na^+/H^+ -обменник.

Среди моновалентных ионов Li^+ — ближайший аналог Na^+ . Распределение между клетками и средой природного лития в естественных условиях и распределение Li^+ между эритроцитами и плазмой крови пациентов, систематически принимающих Li^+ , близко к распределению натрия и резко отличается от распределения калия, рубидия и цезия. На эритроцитах человека и многих других объектах показано, что в физиологических условиях Li^+ не откачивается из клетки Na,K-АТФазным насосом (Pandey et al., 1978; Ehrlich, Diamond, 1979). Активный транспорт Li^+ из клетки в среду против градиента электрохимического потенциала осуществляется, по современным представлениям, за счет сопряженного движения натрия по электрохимическому градиенту (Kemp et al., 2008). Это и ведет к выравниванию градиентов Li^+ и Na^+ на клеточной мембране. Сопряжение потоков лития и натрия (Li^+/Na^+ -обмен) может осуществляться в разных системах переноса натрия через клеточную мембрану (Lytle et al., 1998; Elmariah, Gunn, 2003). У клеток разной тканевой и видовой принадлежности ведущую роль в сопряжении

распределения лития и натрия, по-видимому, могут играть разные транспортеры. Исследования Li^+/Na^+ -противотранспорта начались более 30 лет назад, когда было обнаружено, что его изменения в эритроцитах характерны для целого ряда распространенных патологических состояний человека, таких как гипертония (Canessa et al., 1980; West et al., 1998; Semplicini et al., 2003), диабет, нефропатии и др. (Zerbini et al., 2004). Интерес к Li^+ обусловлен и тем, что Li^+ используется как терапевтическое средство в психиатрии (Lenox, Le Wang, 2003). В общей физиологии клетки Li^+ интересен как не откачиваемый Na,K-АТФазным насосом суррогат Na^+ .

Клеточные культуры до сих пор использовались при изучении Li^+/Na^+ -противотранспорта, главным образом при решении вопросов, относящихся к геномике транспортеров. Между тем ионный обмен у пролиферирующих культивируемых клеток идет на один-два порядка быстрее, чем у эритроцитов, на которых получена основная масса данных, касающихся Li^+/Na^+ -противотранспорта. Исследовать стационарное распределение лития и на-

трия в условиях, близких к физиологическим, в эксперименте на эритроцитах затруднительно, тогда как при работе с клеточными культурами баланс потоков моновалентных ионов между клетками и средой достигается в течение 1—3 ч.

Настоящая работа предпринята для того, чтобы проанализировать транспорт лития в клетку и из клетки наряду со стационарным его распределением. Клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937 — известный лабораторный объект, широко используемый при изучении апоптоза. Баланс потоков всех трех главных моновалентных ионов, Na^+ , K^+ и Cl^- , у этих клеток исследован более полно, чем у других пролиферирующих в культуре животных клеток (Mills, Tupper 1975; Tupper, 1975; Vereninov et al., 2007; Yurinskaya et al., 2011).

Материал и методика

Основные материалы и методы, используемые в настоящей работе, подробно описаны ранее (Веренинов и др., 2004; Yurinskaya et al., 2005, 2011; Vereninov et al., 2007; Юринская и др., 2010, 2011). Исследование проводили на клетках гистиоцитарной лимфомы человека U937 из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (номер по каталогу 160B2), культивируемых в стандартной среде RPMI 1640 (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки крови плодов коровы (HyClone, Standard, США), при 37 °C и 5 % CO_2 . Для ингибиторного анализа ионных потоков использовали уабаин (0.01—0.1 мМ), диметиламилорид (ДМА, 0.05 мМ), буметанид (0.05 мМ), флоретин (0.03 мМ) и метолазон (0.03 мМ). Все препараты фирмы Sigma-Aldrich (Германия). Содержание воды в клетках оценивали по плавучей плотности клеток в градиенте плотности Перколл. Внутриклеточное содержание ионов определяли пламенно-эмиссионным методом на спектрофотометре Перкин-Элмер АА 306, содержание белка — методом Лоури. Константы скорости обмена ионов между клеткой и средой оценивали по скорости их выхода или поступления. При измере-

нии входных потоков Li^+ в культуральную среду вносили 5 мМ LiCl , при определении потоков Na^+ и Cl^- использовали изотопы $^{22}\text{Na}^+$ и $^{36}\text{Cl}^-$ (Изотоп, Россия). Для исследования кинетики выхода ионов из клеток за 20 ч до эксперимента в культуральную среду RPMI добавляли LiCl (5 мМ) и RbCl (1 мМ), а за 1.5 ч вносили маркерные количества изотопов $^{22}\text{Na}^+$ и $^{36}\text{Cl}^-$. Затем клетки быстро отмывали от среды, содержащей ионы-маркеры, раствором MgCl_2 (96 мМ) и помещали в среду, не содержащую Li^+ , Rb^+ , $^{22}\text{Na}^+$ и $^{36}\text{Cl}^-$. Скорость выхода ионов измеряли как в стандартной среде RPMI, так и в средах, не содержащих ионы Na^+ (96 мМ MgCl_2 или 140 мМ NMDG-Cl + 5.5 мМ RbCl), или, кроме Na^+ , также и ионы Cl^- (96 мМ глюконата магния (MgGluc)), pH которых подводили до 7.4—7.6 с помощью Tris-OH и MOPS. Константы скорости обмена ионов рассчитывали, используя уравнения $y(t) = y_{t=\infty} (1 - \exp(-kt))$ для входа ионов и $y(t) = y_0 \exp(-kt)$ — для выхода, где $y(t)$ — содержание индикаторного иона в момент времени t (5, 10 и 20 мин), $y_{t=\infty}$ и y_0 — конечное и исходное содержание соответствующего иона.

Прижизненное микрофотографирование клеток, окрашенных смесью красителей акридинового оранжевого (АО, 10 мкг/мл) и бромистого этидия (БЭ, 10 мкг/мл), проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL. Флуоресценцию возбуждали лазером 488 нм и регистрировали в диапазонах 500—550 и 600—700 нм. Микрофотографирование клеток в проходящем свете проводили с помощью микроскопа Axiovert 200M, оснащенного видеокамерой Leica DFC 420 (Германия).

Статистический анализ результатов проводили с помощью t -теста Стьюдента, достоверность различий оценивали при $P < 0.05$.

Результаты

Скорость обмена Li^+ у клеток U937 в стационарных условиях. Измерение скорости входа и выхода индикаторных количеств лития показывает, что стационарное распределение Li^+ устанавливается у кле-

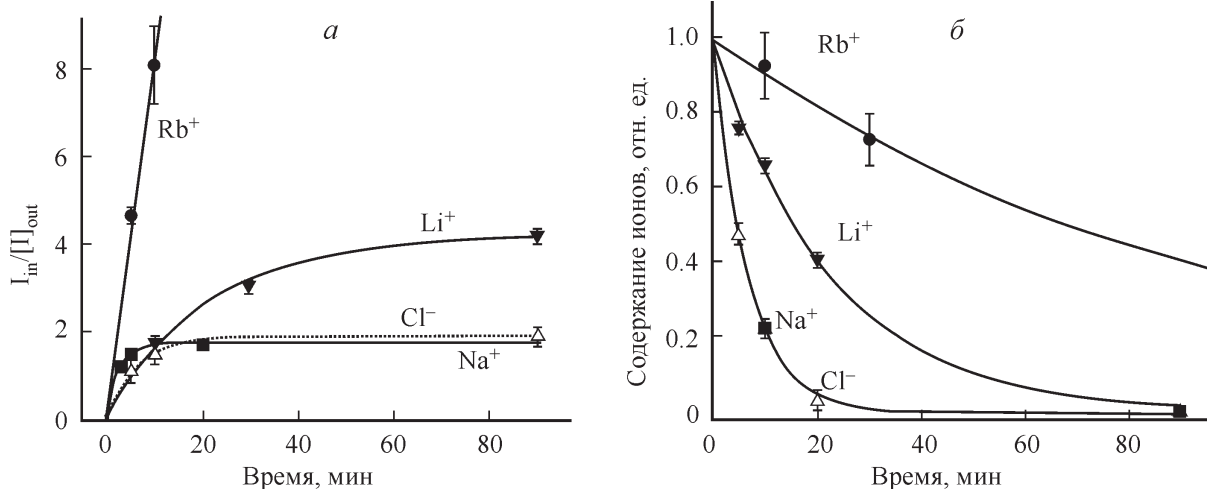


Рис. 1. Кинетика входа (а) и выхода (б) Li^+ , $^{22}\text{Na}^+$, Rb^+ и $^{36}\text{Cl}^-$ у клеток U937 в среде RPMI.

а: $I_{\text{in}}/[I]_{\text{out}}$ — отношение внутриклеточного содержания иона I (Rb^+ , Li^+ , Na^+ и $^{36}\text{Cl}^-$) в мкмоль на 1 г белка к его концентрации в культуральной среде в мМ. В точке $t = 0$ в культуральную среду добавляли одновременно LiCl (5 мМ) RbCl (2.5 мМ), и изотопы $^{36}\text{Cl}^-$ и $^{22}\text{Na}^+$. б: клетки предварительно культивировали в среде RPMI, содержащей 5 мМ LiCl , 1 мМ RbCl (20 ч) и изотопы $^{36}\text{Cl}^-$ и $^{22}\text{Na}^+$ (1.5 ч). Затем клетки отмывали от среды с метками раствором MgCl_2 и помещали в среду RPMI, не содержащую Li^+ , Rb^+ , $^{22}\text{Na}^+$ и $^{36}\text{Cl}^-$ (точка $t = 0$). Каждая точка на рисунке соответствует среднему значению и его стандартной ошибке из 3—5 экспериментов с 2—3 параллельными пробами в каждом.

Таблица 1

Коэффициент дискриминации Li^+/Na^+ , константы скорости выхода Li^+ и внутриклеточное содержание K^+ , Na^+ и Li^+ при длительном культивировании клеток U937 в стандартной среде RPMI и среде RPMI, содержащей уабаин (10 мкМ) и 1—10 мМ LiCl

Добавки в среду RPMI	Li^+ в среде, мМ	Время инкубации, ч	$\frac{\text{Li}_i^+ \cdot \text{Na}_0^{+a}}{\text{Na}_i^+ \cdot \text{Li}_0^+}$	$\frac{\text{Li}_i^+}{\text{Li}_0^+}$	$k_{\text{Li}} \pm \text{se}, \text{мин}^{-1} (n)^b$	K^+	Na^+	Li^+
						мкмоль/г ^в		
LiCl	3	24	$3.06 \pm 0.11 (8)$	$0.80 \pm 0.05 (8)$	$0.040 \pm 0.005 (9)$	$687 \pm 37 (8)$	$191 \pm 8 (8)$	$14.0 \pm 0.6 (8)$
	5	24	$2.98 \pm 0.08 (58)$	$0.92 \pm 0.03 (43)$	$0.035 \pm 0.002 (20)$	$892 \pm 27 (27)$	$228 \pm 6 (25)$	$26.6 \pm 1.0 (27)$
	5	1.5	$2.46 \pm 0.13 (34)$	$0.94 \pm 0.03 (37)$	$0.051 \pm 0.003 (28)$	$808 \pm 25 (20)$	$283 \pm 12 (22)$	$24.7 \pm 0.8 (34)$
LiCl	1	4	$2.96 \pm 0.06 (6)$	$0.71 \pm 0.04 (6)$	—	$970 \pm 74 (6)$	$151 \pm 9 (6)$	$3.6 \pm 0.2 (6)$
	2	4	$3.27 \pm 0.09 (5)$	$0.81 \pm 0.05 (5)$	—	$926 \pm 80 (5)$	$147 \pm 13 (5)$	$7.6 \pm 0.5 (5)$
	5	4	$3.29 \pm 0.16 (3)$	$0.71 \pm 0.02 (3)$	—	$778 \pm 16 (3)$	$124 \pm 3 (3)$	$16.3 \pm 0.4 (3)$
	10	4	$3.64 \pm 0.15 (5)$	$0.84 \pm 0.07 (6)$	—	$879 \pm 55 (5)$	$140 \pm 18 (5)$	$41.6 \pm 3.5 (5)$
LiCl	5	12	$3.32 \pm 0.15 (9)$	$0.95 \pm 0.04 (8)$	$0.042 \pm 0.002 (3)$	$690 \pm 13 (6)$	$168 \pm 11 (9)$	$25.6 \pm 0.8 (6)$
LiCl + уабаин, 4 ч	5	12	$1.18 \pm 0.02 (10)$	$1.54 \pm 0.04 (11)$	$0.019 \pm 0.001 (3)$	$84.9 \pm 1.9 (6)$	$728 \pm 22 (6)$	$42.0 \pm 0.6 (6)$
LiCl + уабаин, 12 ч	5	12	$1.08 \pm 0.04 (8)$	$1.54 \pm 0.02 (9)$	$0.015 \pm 0.001 (3)$	$71.3 \pm 2.5 (6)$	$779 \pm 51 (6)$	$42.3 \pm 1.6 (6)$

^a Коэффициент дискриминации вычисляли по содержанию Li^+ и Na^+ в одних и тех же клетках, инкубированных указанное время в среде RPMI, которая содержала Li^+ в указанной концентрации. Концентрацию Li^+ в среде (Li_0^+) измеряли, а для вычисления концентрации Li^+ в клетках (Li_i^+) использовали кроме содержания в клетках Li^+ содержание воды, полученное по измерению плавучей плотности клеток в градиенте Перколл. ^b Для определения констант скорости выхода Li^+ (k_{Li}) клетки инкубировали 12 или 20 ч в среде, содержащей 5 мМ LiCl, затем переносили на 10 или 30 мин в среду без LiCl. k_{Li} рассчитаны по формуле $k = -(1/t) \ln y_t/y_0$, где y_t — содержание Li^+ в момент времени $t = 10$ или 30 мин, y_0 — исходное содержание Li^+ в клетках. В среде с уабаином k_{Li} получены аппроксимацией кривых выхода Li^+ , построенных по средним значениям с использованием экспоненциального уравнения $y_t = y_0 \exp(-kt)$. ^в Внутриклеточное содержание ионов выражено в мкмоль на 1 г клеточного белка. Здесь и в табл. 2, 3 приведены средние значения и их стандартная ошибка, в скобках — число определений (n).

ток U937 почти так же быстро, как в случае Na^+ и Cl^- (рис. 1). Константа скорости обмена Li^+ между клетками и средой при инкубации их в стандартной среде RPMI составляет 0.04 — 0.06 мин^{-1} (табл. 1; рис. 2). При такой скорости обмена можно считать, что 1.5 ч инкубации достаточно для достижения стационарного распределения Li^+ . Культивирование клеток в течение 1 сут в среде, к которой добавлен LiCl в концентрации 1—10 мМ, подтверждает, что это действительно так. Константы скорости обмена Li^+ и Na^+ , полученные нами на клетках U937, близки к найденным на клетках HeLa (Boardman et al., 1975). Отметим, что константы скорости обмена Li^+ у эритроцитов человека в физиологических условиях составляют величину порядка 0.0035 мин^{-1} (Ehrlich, Diamond, 1979).

Внутриклеточное содержание и кинетика обмена Li^+ при длительной инкубации клеток U937 в среде, содержащей индикаторные концентрации Li^+ . Добавление в культуральную среду Li^+ в концентрации 3—5 мМ на 12—24 ч заметным образом не отражается на росте культуры клеток U937 и их морфологии, выявляемой световой микроскопией (результаты не приводятся). В литературе можно найти со-

общения о замедлении роста культуры и изменении морфологии клеток при длительном культивировании в среде с концентрацией Li^+ 10 мМ и выше, но они относятся лишь к определенным видам клеток и культивированию более 1 сут (Matthopoulos et al., 1995; Laurenz, Smith 1998). Изучение стационарного распределения Li^+ в клетках U937 при относительно невысоких концентрациях его в среде показывает, что при внешней концентрации 1—10 мМ внутриклеточная концентрация Li^+ на 10—20 % ниже, чем в среде (табл. 1).

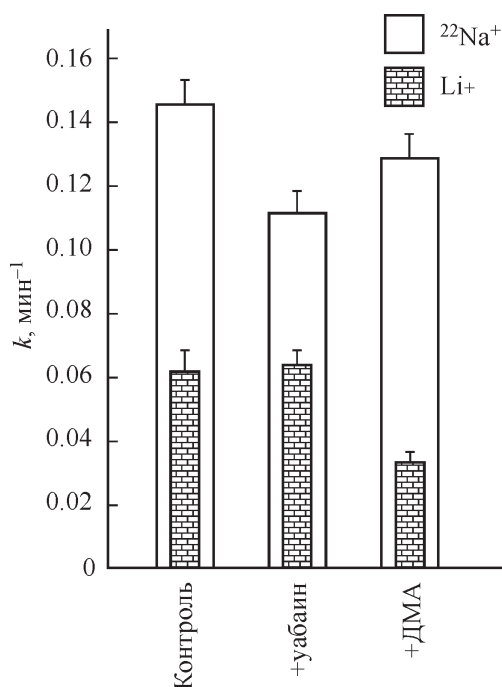


Рис. 2. Константы скорости обмена k_{Na} и k_{Li} у клеток U937, найденные по скорости выхода из них $^{22}\text{Na}^+$ и Li^+ в среду RPMI, в контроле и в присутствии ингибиторов Na,K-насоса (уабаина) и Na^+/H^+ -обменника (ДМА).

Клетки культивировали 1.5 ч в среде RPMI, содержащей $^{22}\text{Na}^+$ и 5 мМ LiCl, затем переносили на 10 мин в среду, не содержащую $^{22}\text{Na}^+$ и Li^+ , без ингибиторов (контроль) или в среду, содержащую 0.05 мМ ДМА или 0.1 мМ уабаин. Константы скорости выхода рассчитаны по формуле $k = -(1/t) \ln y_t/y_0$, где y_t — внутриклеточное содержание $^{22}\text{Na}^+$ или Li^+ в момент времени $t = 10$ мин, y_0 — исходное содержание соответствующего иона. Представлены средние значения и их стандартная ошибка из 9 экспериментов с 2 параллельными пробами в каждом.

Таблица 2

Константа скорости переноса Li^+ (k_{Li}), найденная по скорости его входа в клетки U937, и влияние на нее ингибиторов Na,K-насоса (уабаин, 0.1 мМ) и Na^+/H^+ -обменника (ДМА, 0.05 мМ)

Среда	k_{Li} , мин ⁻¹	Ингибируемый перенос	
		k_{Li} , мин ⁻¹	k_{Li} , %
RPMI	0.043 ± 0.003 (16)		
RPMI + уабаин	0.036 ± 0.003 (16)	0.007 ± 0.003 (16)	16
RPMI	0.041 ± 0.004 (14)		
RPMI + ДМА	0.026 ± 0.001 (14)	0.015 ± 0.004 (14)	37

Примечание. Значения k_{Li} рассчитаны по формуле $y(t) = y_{\infty}(1 - \exp(-kt))$, где $y(t)$ — содержание индикаторного иона в момент времени $t = 10$, y_{∞} — стационарное содержание Li^+ .

Подобно натрию Li^+ не накапливается в клетке, как должны накапливаться катионы, если их распределение зависит только от разности электрических потенциалов между цитоплазмой и средой. Вместе с тем коэффициенты распределения Li^+ и Na^+ между цитоплазмой и средой у клеток U937 все же различаются примерно в 3 раза, если Na,K-АТФазный насос не заблокирован уабаином. Постоянство коэффициента Li^+/Na^+ -дискриминации при изменении концентрации Li^+ в среде в интервале 1—10 мМ указывает на то, что распределение Li^+ привязано к распределению Na^+ , которое не изменяется при добавлении к среде LiCl в небольших концентрациях. Различие коэффициентов распределения Li^+ и Na^+ в 3 раза близко к отношению констант скорости выхода Li^+ и Na^+ (≈ 2.5), измерившихся на одних и тех же клетках (Vereninov et al., 2007). Отсюда можно заключить, что дискриминация Li^+/Na^+ у клеток U937 определяется Na,K-АТФазным насосом, а не системами, по которым Li^+ и Na^+ поступают в клетку. При выключении насоса коэффициенты распределения Li^+ и Na^+ становятся одинаковыми.

Соотношение между внутри- и внеклеточной концентрациями Li^+ , наблюдавшееся нами при стационарном распределении Li^+ в клетках U937, того же порядка, что и значение 0.52, которое получено Флейшманом с соавторами (1984) для распределения природного Li^+ между эритроцитами и плазмой крови человека при весьма низких концентрациях Li^+ в плазме, составляющих 0.1—1 мкМ. Близко оно и к значению 0.51, которое наблюдается у пациентов, регулярно принимающих Li^+ , когда концентрация Li^+ в плазме поддерживается на уровне 0.5—1 мМ (Girvin et al., 1996). Коэффициент Li^+/Na^+ -дискриминации около 3, наблюдавшийся у клеток U937, попадает в диапазон значений этого коэффициента, полученных ранее другими авторами (Буровина и др., 1963, 1964; Флейшман, 1982) для мышечной ткани широкого круга морских беспозвоночных (2—5) и рыб (3). Дискриминирующие Li^+ и Na^+ системы, очевидно, весьма консервативны.

Кинетика поступления и выхода Li^+ у клеток U937 в присутствии ингибиторов Na,K-АТФазного насоса и Na^+/H^+ -обменника (ДМА). Как показывают данные на рис. 2, блокирование Na,K-АТФазного насоса уабаином не изменяет константы скорости выхода Li^+ . Изменение константы скорости выхода Na^+ , регистрируемое одновременно на тех же клетках, и хорошо изученное резкое уменьшение входного потока Rb^+ у клеток U937 при действии уабаина указы-

вают на то, что клетки U937 обладают высокой чувствительностью к уабаину (Vereninov et al., 2007; Yurinskaya et al., 2011). Отсюда может быть сделан вывод о том, что из клетки в среду Na,K-АТФазным насосом Li^+ не транспортируется. Этот результат аналогичен тому, что наблюдали на многих других объектах. В экспериментах по другой схеме, когда кинетику переноса Li^+ исследовали по скорости его поступления в клетку, обнаружено небольшое снижение скорости входа Li^+ при действии уабаина (табл. 2). Это указывает на участие Na,K-АТФазного насоса в переносе Li^+ из среды в клетку. Известно, что в некоторых случаях Li^+ способен поступать в клетку через Na,K-АТФазный насос по калиевому пути (Dunham, Senyuk, 1977; Pandey et al., 1978; Sarkadi et al., 1978). Исчезновение Li^+/Na^+ -дискриминации при длительной инкубации клеток U937 с уабаином указывает на то, что в нормальных условиях она связана именно с тем, что Na^+ откачивается из клетки Na,K-АТФазным насосом, а Li^+ не откачивается. Очевидно, во всех остальных трактах, от которых зависит стационарное распределение Li^+ , дискриминация Li^+/Na^+ незначительна.

На многих объектах показано, что в переносе Li^+ через клеточную мембрану значительную роль играет Na^+/H^+ -обменник (NHE), большинство изоформ которого блокируется амилоридом и его производными. Вместе с тем показано, что перенос Li^+ блокируется этими агентами не полностью (Grinstein et al., 1984a, 1984b). У исследованных нами клеток U937 диметиламилорид (ДМА) снижал скорость выхода из клеток и Na^+ , и Li^+ (рис. 2). Относительное изменение потока Li^+ было существенно больше, чем потока Na^+ , очевидно из-за того, что в выходном потоке Na^+ имеется компонент, относящийся к Na,K-АТФазному насосу, который ДМА не блокирует. Аналогичное снижение скорости переноса Li^+ в присутствии ДМА наблюдалось и тогда, когда изучали скорость его поступления в клетки (табл. 2).

Для проверки того, не связан ли амилорид-нечувствительный поток Li^+ у клеток U937 с тиазид-чувствительным Na-Cl-котранспортером, как это показано на клетках эпителия роговицы (Lauf et al., 2008), исследовали влияние на перенос Li^+ метолазона, специфического ингибитора этой группы переносчиков, относящихся к семейству SLC12A10 (Gamba, 2009). Как показывают данные, представленные в табл. 3, ни поток Li^+ , ни поток Cl^- у клеток U937 в присутствии метолазона не изменяется. В отличие от эритроцитов и фибробластов человека, у которых перенос Li^+ ингибируется флоретином (Pandey et

Таблица 3

Метолазон и флоретин не влияют на константу скорости выхода Li⁺ и Cl⁻ из клеток U937, а переход к среде без Na⁺ и Cl⁻ (MgGluc) изменяет скорости выхода Li⁺ и Cl⁻ в противоположном направлении

Среда	k_{Li} , мин ⁻¹		k_{Cl} , мин ⁻¹	
	RPMI	MgGluc	RPMI	MgGluc
RPMI (контроль)	0.059 ± 0.005	0.019 ± 0.002	0.072 ± 0.009	0.209 ± 0.011
RPMI + метолазон	0.058 ± 0.007	0.023 ± 0.003	0.072 ± 0.005	0.205 ± 0.017
RPMI (контроль)	0.063 ± 0.014	—	—	—
RPMI + флоретин	0.054 ± 0.007	—	—	—

Примечание. Клетки предварительно выдерживали в среде RPMI, содержащей 5 мМ LiCl, в течение 20 ч и в среде с добавлением ³⁶Cl⁻ 1.5 ч, а затем на 10 мин переносили в среду RPMI или 96 мМ MgGluc без ³⁶Cl⁻ и Li⁺. Метолазон и флоретин в концентрации 30 мкМ вводили в среду на 10 мин. Значения k_{Li} и k_{Cl} рассчитаны по формуле $k = -(1/t) \ln y_t/y_0$, где y_t — содержание ³⁶Cl⁻ или Li⁺ в момент времени $t = 10$, y_0 — исходное содержание ³⁶Cl⁻ или Li⁺ в клетках. Приведены средние значения и стандартная ошибка из 2 экспериментов с тремя параллельными измерениями в каждом.

al., 1978; Sarkadi et al., 1978; Duhm, Becker, 1979; Zerbini et al., 1997), у клеток U937 выход Li⁺ в присутствии флоретина заметным образом не изменяется (табл. 3). Вход Li⁺ также не изменялся в присутствии флоретина (данные не приводятся).

Влияние концентрации Na⁺ в среде на скорость выхода Li⁺ и Na⁺ (²²Na⁺). Связь между транспортом Li⁺ и Na⁺ показана главным образом в экспериментах по изучению перекрестной зависимости транспорта этих катионов от концентрации их в клетке и среде. Такой подход был нами испытан и при исследовании транспорта Li⁺ у клеток U937. Как показывают данные на рис. 3, а, снижение концентрации Na⁺ в среде до 1 мМ с заменой его на Mg²⁺ или NMDG⁺ сопровождается уменьшением константы скорости выхода Na⁺ (²²Na⁺) в среднем на 40 % за счет компонента потока, не ингибируемого убаином. Измеряемая на тех же клетках константа ско-

рости выхода Li⁺ также оказалась ниже в низконатриевой среде (~на 30 %) по сравнению с константой, полученной в среде RPMI. Таким образом, налицо компонент, зависящий от концентрации Na⁺ в среде.

Данные на рис. 3 показывают, что при увеличении концентрации Li⁺ в Mg-среде от 0—5 до 30 мМ константа выхода Na⁺ возрастает на 35 % (рис. 3, б), и это связано именно с изменением убаин-резистентного компонента, который доминирует, когда клетки находятся в обычной натриевой среде RPMI (рис. 3, в). Таким образом, в испытанных условиях наружный Li⁺ влиял на скорость выхода Na⁺, а наружный Na⁺ влиял на скорость выхода Li⁺ (рис. 3).

Проводившееся одновременно на одних и тех же клетках определение константы скорости выхода Li⁺ и ³⁶Cl⁻ показало, что снижение константы скорости выхода Li⁺ при переходе к низконатриевой среде может быть обусловлено не только специфическим сопряжением по-

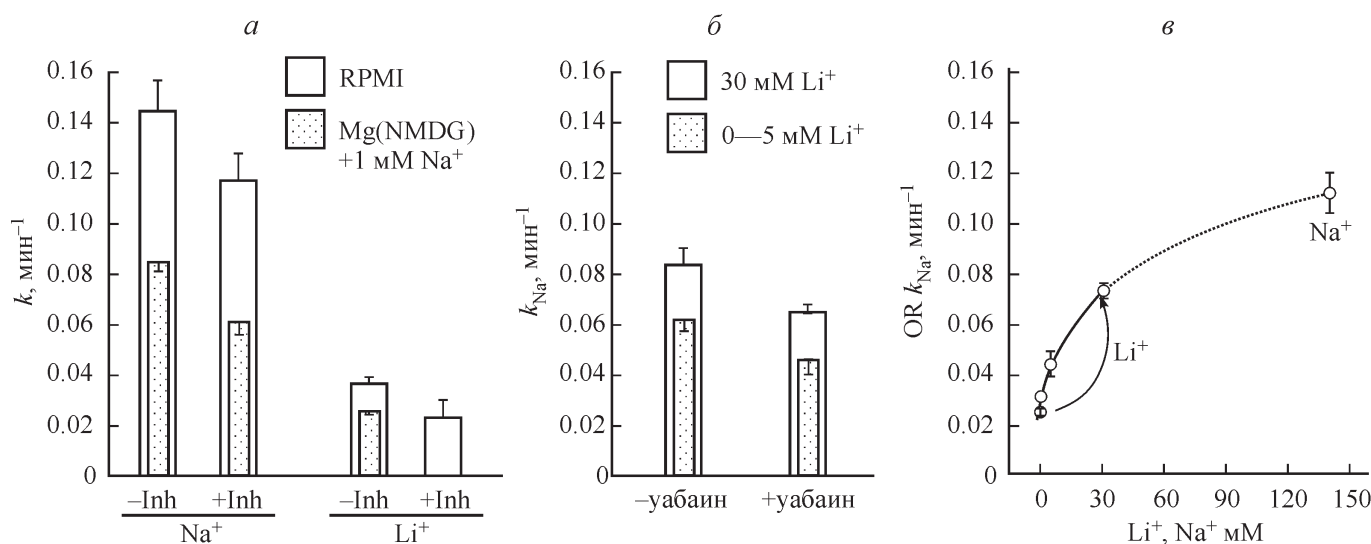


Рис. 3. Константы скорости выхода ²²Na⁺ (k_{Na}) и Li⁺ (k_{Li}) у клеток U937 в среду RPMI и в низконатриевые среды.

а: влияние набора ингибиторов на константы выхода ²²Na⁺ и Li⁺ в среде RPMI и в среде, содержащей 1 мМ Na⁺ (96 мМ MgCl₂ или 140 мМ NMDG-Cl + 5.5 мМ RbCl + 1 мМ NaCl). Ингибиторы (Inh) в мМ: 0.1 убаин + 0.05 буметанид + 0.05 ДМА. Константы рассчитаны по формуле $y(t) = y_0 \exp(-kt)$, где $y(t)$ — содержание ²²Na⁺ или Li⁺ в момент времени $t = 10$ мин, y_0 — исходное содержание соответствующего иона. б: влияние концентрации Li⁺ в среде на константу выхода Na⁺ из клеток U937 в Mg-среде в отсутствие и в присутствии убаина (0.1 мМ). в: убаин-резистентный (OR) компонент константы выхода Na⁺; первые 4 точки (в диапазоне 0—30 мМ) — выход Na⁺ в Mg-среде, содержащую 5.5 мМ RbCl + (0—30) мМ LiCl; последняя точка (140 мМ) относится к натриевой среде (RPMI, 140 мМ Na⁺ и 0 Li⁺), константа определена по выходу ²²Na⁺.

Представлены средние значения и их стандартная ошибка из 3 экспериментов с 2 параллельными пробами в каждом.

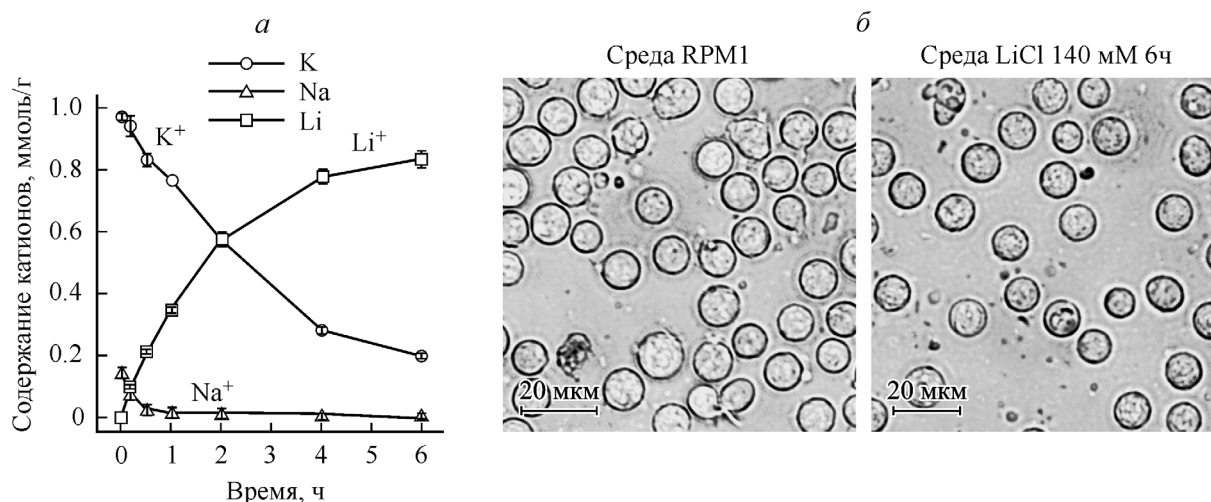


Рис. 4. Изменение содержания катионов (а) и морфология клеток U937 (б) при замене Na⁺ в среде на Li⁺.

а: в точке 0 клетки были перенесены из среды RPMI в Li⁺-среду следующего состава (мМ): 140 LiCl, 5.5 KCl, 0.42 CaCl₂, 0.41 MgCl₂, 10 Heps + LiOH. Приведены средние значения и их стандартная ошибка из 2 экспериментов с 2 параллельными пробами в каждом (во многих точках ошибка не превышает размера символа) и б — световая микроскопия клеток, инкубированных 6 ч в полной среде RPMI и в Li⁺-среде.

токов в катионном обменнике, но и изменением мембранного потенциала. Такое предположение возникает, если обратить внимание на одновременное противоположное 3-кратное изменение константы скорости выхода катиона Li⁺ и аниона Cl⁻ (табл. 3). Отсюда следует, что нужно очень внимательно анализировать данные, полученные при замещении Na⁺ в среде на Mg²⁺. Такого рода данные очень часто используются для оценки активности Li⁺/Na⁺-противотранспорта (см., например: Schork et al., 2002).

Замещение Na⁺ и K⁺ в клетке литием при длительной инкубации клеток U937 в среде с высокой концентрацией Li⁺. Каково распределение моновалентных ионов между клетками и средой, если заменить в среде Na⁺, который может откачиваться из клетки насосом, на Li⁺, который не может откачиваться из клетки ни Na,K-АТФазным насосом, ни системой сопряженного Na⁺/Li⁺-обмена ввиду отсутствия Na⁺ в среде? Как оказалось, у клеток U937 в этих условиях имеет место постепенное замещение на Li⁺ как внутриклеточного Na⁺, так и K⁺ (рис. 4, а). В течение 5—6 ч идет почти эквивалентное замещение этих катионов. Содержание внутриклеточной воды после инкубации клеток в литиевой среде в течение 5—6 ч практически не изменяется. В описываемых экспериментах оно составляет 5.16 ± 0.06 мл/г в среде RPMI и 5.15 ± 0.10 мл/г в Li-среде (n = 8).

Возникает вопрос: как переносят клетки почти полную замену внутриклеточного Na⁺ и K⁺ на Li⁺? Для выявления возможных результатов воздействия длительной инкубации клеток U937 в литиевой среде проводили прижизненное микроскопирование клеток. Оно показало, что форма и внешний вид клеток после инкубации в литиевой среде в течение 5—6 ч существенным образом не изменяются (рис. 4, б). Содержание поврежденных клеток, т. е. окрашенных БЭ и не окрашенных АО, увеличивается незначительно — от 5.1 ± 0.7 до 11.5 ± 2.1 % (средние значения доли мертвых клеток, полученные в 3 независимых экспериментах, и их стандартные ошибки при n = 3). Такие «литиевые» клетки представляют большой

интерес как модельный объект для изучения роли K⁺ и Na⁺ в регуляции различных внутриклеточных процессов и в регуляции объема клетки, в частности в гипо- и гиперосмотических средах.

Определение скорости замещения Na⁺ в клетках на Li⁺ после полной замены Na⁺ в среде на Li⁺ иногда практикуется как метод оценки активности Li⁺/Na⁺-противотранспорта. В свете наших данных выход из клетки Na⁺, сопровождающийся одновременным увеличением содержания Li⁺ — это всего лишь начальная фаза замещения внутриклеточных катионов на Li⁺. Как показывает математическая модель перестройки ионного баланса после выключения натриевого насоса, реципрокное нарастание внутриклеточной концентрации Li⁺ и снижение концентрации Na⁺ и K⁺ наблюдаются при полном отсутствии системы Li⁺/Na⁺-противотранспорта (Armstrong, 2003; собственные данные).

Обсуждение

Литература, посвященная транспорту Li⁺ в клетках, в особенности в клетках крови и эпителиальных клетках человека, весьма обширна. Это связано с обнаруженными изменениями Li⁺/Na⁺-противотранспорта при гипертонии (Canessa et al., 1980; West et al., 1998; Semplicini et al., 2003; Zheng et al., 2009), диабете, нефропатиях (Zerbini et al., 2003, 2004) и некоторых других патологиях, а также в связи с применением Li⁺ в психиатрии (Lenox, Le Wang, 2003; El Balkhi et al., 2009). В данной статье интересны два вопроса: каковы сходство и различие переноса Li⁺ и Na⁺ через клеточную мембрану по данным, полученным на клетках U937, и каков у этих клеток баланс входных и выходных потоков Li⁺ и Na⁺, о котором можно судить, располагая данными о стационарном распределении и скорости обмена этих ионов между цитоплазмой и средой.

В 1980-е годы считали, что у эритроцитов человека, изучению транспорта Li⁺ в которых посвящено особенно много работ, существуют 4 вида переноса Li⁺ через мемб-

рану. По данным Эрлих (Ehrlich, Diamond, 1979), это Li^+/Na^+ -противотранспорт ($\approx 75\%$ выходного потока), перенос через бикарбонат-зависимую систему ($\approx 30\%$ входного потока), «утечка» через каналы и, в особых условиях, перенос через Na,K-насос (см. также: Pandey et al., 1978; Sarkadi et al., 1978; Duhm, Becker, 1979). К аналогичной схеме пришли и при исследовании переноса Li^+ в культивируемых клетках нейробластомы (Reiser, Duhm, 1982). В более поздних работах эта схема была подтверждена, но в эритроцитах стали выделять еще не ингибируемый убаином и амилоридом Li^+/Na^+ сопряженный перенос (Canessa, 1989; West et al., 1998). В настоящее время вопрос о том, с каким транспортером следует связывать тот Li^+/Na^+ -противотранспорт, который коррелирует с гипертензией и некоторыми другими патологиями человека, вряд ли можно считать окончательно решенным (Timmer, Sands, 1999; Elmariah, Gunn, 2003; Xiang et al., 2007). Генетические исследования не привели к идентификации гена, ответственного за изменение Li^+/Na^+ -противотранспорта при гипертензии (Lifton et al., 1991; Lifton, 1996; Schork et al., 2002).

В эритроцитах человека и многих других клетках антипортер NHE играет основную роль в Li^+/Na^+ -противотранспорте (Kemp et al., 2008). Вместе с тем NHE не единственный транспортер, в котором Li^+ может замещать Na^+ . Сопряженный Li^+/Na^+ -перенос возможен в симпортере NKCC (Lytle et al., 1998) и других транспортерах, в частности в симпортере $\text{Na}/\text{Li}-\text{PO}_4$ (Timmer, Gunn, 2000; Elmariah, Gunn, 2003; Andrini et al., 2012). Можно полагать, что у клеток разной видовой и тканевой принадлежности в переносе лития через плазматическую мембрану могут принимать участие разные транспортеры. Например, Li^+ может замещать Na^+ в бикарбонатзависимом переносе Na^+ в эритроцитах и не может у клеток U937, судя по литературным данным (Ladoux et al., 1987). Сообщалось и о более сложных случаях, например о том, что у эритроцитов собаки активация и транспорт Na^+ в обменнике NHE связаны с сайтами, через которые обменник блокируется литием (Dunham et al., 2005).

Полученные нами данные показывают, что у клеток U937 Na^+ откачивается Na,K-АТФазным насосом из цитоплазмы в среду, а Li^+ нет. Клетки U937 в этом отношении ведут себя так же, как все другие клетки, имеющие Na,K-АТФазный насос. Известно, что в определенных, «нефизиологических», условиях Na,K-АТФаза может активироваться литием, и возможен транспорт лития через Na,K-АТФазный насос из клетки или, чаще, в клетку (Dunham, Senyk, 1977; Sarkadi et al., 1978; Ehrlich, Diamond, 1979). У клеток U937 мы тоже наблюдали небольшой ингибируемый убаином входной поток Li^+ . Через Na^+/H^+ -обменник Li^+ и Na^+ у клеток U937, насколько можно судить по действию ДМА, транспортируются одинаково. Нельзя исключить, что Li^+ у клеток U937 транспортируется в среду частично и амилорид-нечувствительной изоформой Na^+/H^+ -обменника. Существование такой изоформы и такого переноса Li^+ и Na^+ показано для фибробластов человека и хомячка (Zerbini et al., 1997, 2001, 2003, 2004) и других клеток (Orlowski, Grinstein, 2004; Brett et al., 2005; Xiang et al., 2007; Kemp et al., 2008; Schushan et al., 2010). Как будет показано ниже, выходной поток Li^+ слишком велик, чтобы его можно было отнести к электродиффузионным каналам.

Флоретин, который считается ингибитором-маркером Li^+/Na^+ -противотранспорта у таких клеток, как эритроциты (Sarkadi et al., 1978; Duhm, Becker, 1979), и мето-

лазон, специфический блокатор тиазид-чувствительного котранспорта Na-Cl (Lauf et al., 2008; Gamba, 2009), заметным образом не изменяли потоки Li^+ и Na^+ у клеток U937. Для некоторых клеток показано, что Li^+ подобно Na^+ может транспортироваться переносчиком NKCC, одним из специфических ингибиторов которого считается буметанид. Особенно детально эти исследования проведены на эритроцитах утки (Lytle et al., 1998). У клеток U937 влияние буметанида на транспорт моновалентных ионов нами испытывалось неоднократно. Буметанид у этих клеток снижал в определенных условиях только входной поток Rb^+ , используемого как маркер потока K^+ (Vereninov et al., 2008). На потоки Li^+ у клеток U937 буметанид в исследованных условиях не влиял. Таким образом, выделить транспортер, в котором осуществляется сопряжение потока Li^+ против электрохимического градиента с потоком Na^+ по градиенту, у клеток U937 с помощью традиционного ингибиторного анализа удовлетворительным образом не удастся.

Чем может быть полезен анализ стационарного распределения Li^+ ? Обмен Li^+ между цитоплазмой и средой у пролиферирующих клеток идет на один-два порядка быстрее, чем у эритроцитов. В этом случае исследования ионных потоков могут проводиться в условиях стационарного распределения ионов, и это создает дополнительные возможности для анализа механизма переноса ионов через мембрану. Вместе с тем транспорт Li^+ у пролиферирующих в культуре клеток остается мало изученным. Среди таких работ следует отметить ранние исследования транспорта Li^+ на клетках HeLa (Boardman et al., 1975), клетках нейробластомы (Reiser, Duhm, 1982), миобластах L6 (Laurenz, Smith, 1998) и более поздние исследования переносчика $\text{Na}/\text{Li}-\text{PO}_4$ на клетках K562 (Timmer, Gunn, 2000), переноса Li^+ у фибробластов человека (Zerbini et al., 1997, 2001) и исследование сопряжения потоков Li^+ и Na^+ в системе котранспорта Na^+ и Cl^- у культивируемых клеток эпителия роговицы (Lauf, 2008). Баланс потоков всех трех главных моновалентных ионов — Na^+ , K^+ и Cl^- — наиболее полно исследован на клетках U937 (Yurinskaya et al., 2005, 2011; Vereninov et al., 2007).

Общий поток Na^+ в клетку и из клетки, определяемый по скорости радиоизотопного обмена и содержанию Na^+ в клетке по пламенно-эмиссионному анализу, у изучавшихся нами клеток U937 в нормальных условиях можно принять равным $42 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ (Vereninov et al., 2007). В работе Юринской и соавторов (Yurinskaya et al., 2011) был проведен расчет однонаправленных потоков Na^+ , K^+ и Cl^- по главным трактам, т. е. через насос, каналы и системы симпорта NC и NKCC в условиях, когда имеет место баланс потоков всех трех ионов. Этот расчет показал, что в выходном потоке Na^+ на поток через насос у изучавшихся нами клеток U937 приходится около 13% (табл. 4). Во входном потоке Na^+ в клетку по градиенту электрохимического потенциала большая часть приходится на каналы и меньшая часть на входной поток через симпорты NC или NKCC. Вместе взятые эти потоки и балансируются выходным потоком Na^+ через насос. Оставшиеся 87% общего потока есть ничто иное, как Na^+/Na^+ эквивалентный обмен, встречный перенос Na^+ , балансирующийся в самом переносчике.

Можно принять, что в каналах и симпортных трактах Li^+ ведет себя как достаточно близкий аналог Na^+ (Lytle et al., 1998; Hille, 2001). Тогда нетто-поток Li^+ по градиенту должен отличаться от аналогичного потока Na^+ так же,

Баланс однонаправленных потоков Na⁺ и Li⁺ у клеток U937, уравновешенных со средой, содержащей Li⁺ в концентрации 5 мМ и Na⁺ — 140 мМ

Ионы	Потоки, мкмоль · г ⁻¹ · мин ⁻¹ (%)				Вариант симпорта ^б
	тракт	выходной	входной	нетто	
Na ⁺	Все ^а	42 (100 %)	42	0	
	Насос	5.5 (13 %)	0	5.5	
	Каналы	0.16—0.4	2—5	1.84—4.6	NC = 4—1, NKCC = 0
	NC	0.4—0.1	4—1	3.6—0.9	
	Каналы	0.6	6 (14 %)	5.4	NC = 0, NKCC = 0.15
	NKCC	0.11	0.15	0.04	
	Na ⁺ /Na ⁺	≈ 36 (87 %)	≈ 36	0	
Li ⁺	Все	1.12 (100 %)	1.12	≈ 0	
	Каналы	0.007—0.018	0.072—0.18	0.07—0.16	NC = 4—1, NKCC = 0
	NC	0.014—0.004	0.14—0.036	0.13—0.032	
	Каналы	0.022	0.22	0.19	NC = 0, NKCC = 0.15
	NKCC	0.004	0.0054	0.0014	
	Li ⁺ /Li ⁺	0.90 (80 %)	0.90	0	
	Li ⁺ /Na ⁺	≈ 0.2	0	≈ 0.2	

^а Экспериментальные значения полных потоков Na⁺ и Li⁺ получены умножением скорости обмена на внутриклеточное содержание ионов. Расчет однонаправленных потоков Na⁺ проведен, как описано ранее (Yurinskaya et al., 2011). Выходной поток Na⁺ через насос оценивали по ингибируемому убаинном входному потоку Rb⁺. Входные потоки Li⁺ через каналы и тракты симпорта получены умножением входных потоков Na⁺ на соотношение концентраций Na⁺ и Li⁺ в среде (140 и 5 мМ соответственно). Оценка выходных потоков Li⁺ сделана в предположении, что отношение входных и выходных потоков Na⁺ и Li⁺ в трактах пассивного переноса одинаково. ^б Расчет проведен для модели с симпортом NC или NKCC. Двойные значения потоков в случае симпорта NC соответствуют разным значениям симпорта, указанным в последнем столбце справа.

как различаются их концентрации в среде (5 : 140 = 0.036). Различиями во внутриклеточных концентрациях Li⁺ и Na⁺ можно пренебречь, так как обратные потоки этих ионов из клетки примерно в 10 раз меньше прямых и внутриклеточные концентрации практически не влияют на нетто-потоки (Yurinskaya et al., 2011). По этим оценкам суммарный нетто-поток Li⁺ в клетку по градиенту электрохимического потенциала составляет не более 0.2 мкмоль · г⁻¹ · мин⁻¹. Поток именно такой величины должен быть скомпенсирован потоком Li⁺ из клетки против градиента, сопряженным с потоком Na⁺ в клетку через транспортер, в котором обменный поток Na⁺, по нашим оценкам, составляет 36 мкмоль · г⁻¹ · мин⁻¹.

Проведенный анализ может быть подытожен следующим образом: у клеток U937 в условиях, близких к физиологическим, при 5 мМ Li⁺ в среде и стационарном его распределении между клеткой и средой (когда поток Li⁺ в клетку и из клетки по всем трактам составляет 1.1, а поток Na⁺ — 42 мкмоль · г⁻¹ · мин⁻¹) около 80 % потока Li⁺ приходится на эквивалентный Li⁺/Li⁺-перенос. Нетто-поток Li⁺ в клетку по градиенту, большая часть которого приходится на каналы, а меньшая — на входной поток через симпорты NC или NKCC, составляет 20 %. Этот поток компенсируется потоком Li⁺ против градиента электрохимического потенциала из клетки, участвующим в Li⁺/Na⁺-обмене, который по отношению к общему потоку Na⁺ составляет 0.5 %.

Сопряженный встречный перенос Na⁺/Na⁺ или Li⁺/Li⁺ нельзя выявить ни электрофизиологическими методами, ни по изменению содержания Na⁺ или Li⁺ в клетке. Исследование переноса Na⁺ и Li⁺ показывает, что пока нет и блокаторов, которые полностью исключали бы такой

Na⁺/Na⁺/Li⁺-обмен. Очевидно, что Li⁺ является ценным ионом-маркером и удобным инструментом для изучения Na⁺/Na⁺-обмена. Другой итог нашей работы состоит в том, что у клеток, помещенных в среду, в которой Na⁺ заменен на Li⁺, в течение длительного времени сохраняется водный баланс и не обнаруживаются признаки повреждения или апоптоза, выявляемые с помощью АО и БЭ. Такие «литиевые» клетки могут служить модельным объектом, позволяющим изучать регуляцию баланса моновалентных ионов в условиях бездействия Na,K-АТФазного насоса и при крайне низкой внутриклеточной концентрации K⁺ и Na⁺.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 7 (рег. номер 01201267208) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01669-а).

Список литературы

- Буровина И. В., Глазунов В. В., Леонтьев В. Г., Нестеров В. П., Скульский И. А. 1964. Щелочные элементы в эволюции морских организмов. Журн. общей биологии. 25 (2) : 115—122.
- Буровина И. В., Глазунов В. В., Леонтьев В. Г., Нестеров В. П., Скульский И. А., Флейшман Д. Г., Шмитко М. Н. 1963. Содержание лития, натрия, калия, рубидия и цезия в мышцах морских организмов Баренцева и Черного морей. ДАН СССР. 149 (2) : 413—415.
- Веренинов А. А., Горячая Т. С., Матвеев В. В., Мошков А. В., Розанов Ю. М., Сакута Г. А., Широкова А. В., Юринская В. Е. 2004. Дегидратационное сокращение объема клеток при апоп-

тозе — факультативный признак. Апоптоз клеток U937, вызванный стауроспорином и этопозидом. Цитология. 46 (7) : 609—619.

Флейшман Д. Г. 1982. Щелочные элементы и их радиоактивные изотопы в водных экосистемах. Л.: Наука. 160 с.

Флейшман Д. Г., Арутюнян В. М., Багров Я. Ю., Гуревич З. П., Драмян Ф. С., Солюс А. А. 1984. Содержание лития в крови людей из различных регионов СССР. ДАН СССР. 279 (3) : 758—761.

Юринская В. Е., Горючая Т. С., Рубашкин А. А., Широкова А. В., Веренинов А. А. 2010. Перераспределение K^+ , Na^+ и Cl^- и потоки K^+ и Cl^- при апоптозе клеток U937, вызванном стауроспорином. К механизму апоптотической дегидратации клеток. Цитология. 52 (7) : 562—567.

Юринская В. Е., Рубашкин А. А., Широкова А. В., Веренинов А. А. 2011. Регуляторное увеличение объема (RVI) и апоптотическое уменьшение объема (AVD) клеток U937 в гипертонической среде. Цитология. 53 (6) : 474—481.

Andrini O., Meinild A. K., Ghezzi C., Murer H., Forster I. C. 2012. Lithium interactions with Na^+ -coupled inorganic phosphate cotransporters: insights into the mechanism of sequential cation binding. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 302 (3) : C539—C554.

Armstrong C. M. 2003. The Na,K pump, Cl ion, and osmotic stabilization of cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 6257—6262.

Boardman L. J., Hume S. P., Lamb J. F., Polson J. 1975. Effect of growth in lithium on ouabain binding, Na-K-ATPase and Na and K transport in HeLa cells. J. Physiol. 244 : 677—682.

Brett C. L., Donowitz M., Rao R. 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 288 : C223—C239.

Canessa M., Adragna N., Solomon H. S., Connolly T. M., Tosteson D. C. 1980. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. N. Engl. J. Med. 302 : 772—776.

Canessa M. 1989. Kinetic properties of Na^+/H^+ and Li^+/Na^+ , Na^+/Na^+ and Na^+/Li^+ exchanges of human red cells. Methods Enzymol. 173 : 176—191.

Duhm J., Becker B. F. 1979. Studies on lithium transport across the red cell membrane. V. On the nature of the Na^+ -dependent Li^+ countertransport system of mammalian erythrocytes. J. Membrane Biol. 51 : 263—286.

Dunham P. B., Kelley S. J., Logue P. J., Mutolo M. J., Milnick M. A. 2005. Na^+ -inhibitory sites of the Na^+/H^+ exchanger are Li^+ substrate sites. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 289 : C277—C282.

Dunham P. B., Senyk O. 1977. Lithium efflux through the Na/K pump in human erythrocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74 : 3099—3103.

Ehrlich B. E., Diamond J. M. 1979. Lithium fluxes in human erythrocytes. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 237 : C102—C110.

El Balkhi S., Megarbane B., Poupon J., Baud F. J., Galliot-Guilley M. 2009. Lithium poisoning: is determination of the red blood cell lithium concentration useful? Clin. Toxicol. 47 : 8—13.

Elmariah S., Gunn R. B. 2003. Kinetic evidence that the Na- PO_4 cotransporter is the molecular mechanism for Na/Li exchange in human red blood cells. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 285 : C446—C456.

Gamba G. 2009. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter: molecular biology, functional properties, and regulation by WNKs. Amer. J. Physiol. Renal. Physiol. 297 : F838—F848.

Girvin B., Byrne A., King D. J., Wilson-Davis K., Johnston G. D. 1996. An assessment of erythrocyte lithium concentrations as a measure of patient compliance. Hum. Psychopharmacol. 11 : 491—495.

Grinstein S., Goetz J. D., Rothstein A. 1984a. $^{22}Na^+$ fluxes in thymic lymphocytes. I. Na^+/Na^+ and Na^+/H^+ exchange through an amiloride-insensitive pathway. J. Gen. Physiol. 84 : 565—584.

Grinstein S., Goetz J. D., Rothstein A. 1984b. $^{22}Na^+$ fluxes in thymic lymphocytes. II. Amiloride-sensitive Na^+/H^+ exchange pathway; reversibility of transport and asymmetry of the modifier site. J. Gen. Physiol. 84 : 585—600.

Hille B. 2001. Ion channels of excitable membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 814 p.

Kemp G., Young H., Fliegel L. 2008. Structure and function of the human Na^+/H^+ exchanger isoform 1. Channels. 2 : 329—336.

Ladoux A., Krawiec I., Cragoe E. J., Jr., Abita J. P., Frelin C. 1987. Properties of the Na^+ -dependent Cl^-/HCO_3^- exchange system in U937 human leukemic cells. Eur. J. Biochem. 170 : 43—49.

Lauf P. K., Chimote A. A., Adragna N. C. 2008. Lithium fluxes indicate presence of Na-Cl cotransport (NCC) in human lens epithelial cells. Cell. Physiol. Biochem. 21 : 335—346.

Laurenz J. C., Smith S. B. 1998. Lithium chloride does not inhibit the proliferation of L6 myoblasts by decreasing intracellular free inositol. J. Anim. Sci. 76 : 66—73.

Lenox R. H., Le Wang. 2003. Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks. Mol. Psychiatry. 8 : 135—144.

Lifton R. P. 1996. Molecular genetics of human blood pressure variation. Science. 272 : 676—680.

Lifton R. P., Hunt S. C., Williams R. R., Pouyssegur J., Lapolou J. M. 1991. Exclusion of the Na^+-H^+ antiporter as a candidate gene in human essential hypertension. Hypertension. 17 : 8—14.

Lytle C., McManus T. J., Haas M. 1998. A model of Na-K-2Cl cotransport based on ordered ion binding and glide symmetry. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 274 : C299—C309.

Mathopoulos D. P., Tzaphlidou M., Leontiou I. 1995. Morphological alterations caused by lithium in various cell lines. Cell Biol. Int. 19 : 499—506.

Mills B., Tupper J. T. 1975. Cation permeability and ouabain-insensitive cation flux in the Ehrlich ascites tumor cell. J. Membrane Biol. 20 : 75—97.

Orlowski J., Grinstein S. 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. Pflugers Arch. 447 : 549—565.

Pandey G. N., Sarkadi B., Haas M., Gunn R. B., Davis J. M., Tosteson D. C. 1978. Lithium transport pathways in human red blood cells. J. Gen. Physiol. 72 : 233—247.

Reiser G., Duhm J. 1982. Transport pathways for lithium ions in neuroblastoma × glioma hybrid cells at «therapeutic» concentrations of Li^+ . Brain Res. 252 : 247—258.

Sarkadi B., Alifimoff J. K., Gunn R. B., Tosteson D. C. 1978. Kinetics and stoichiometry of Na-dependent Li transport in human red blood cells. J. Gen. Physiol. 72 : 249—265.

Schork N. J., Gardner J. P., Zhang L., Fallin D., Thiel B., Jakubowski H., Aviv A. 2002. Genomic/association linkage of sodium lithium countertransport in CEPH pedigrees. Hypertension. 40 : 619—628.

Schushan M., Xiang M., Bogomiakov P., Padan E., Rao R., Ben-Tal N. 2010. Model-guided mutagenesis drives functional studies of human NHA2, implicated in hypertension. J. Mol. Biol. 396 : 1181—1196.

Semplicini A., Sartori M., Ceolotto G., Calò L. A. 2003. The Li^+/Na^+ exchange in hypertension. Front Biosci. 8 : d912—d929.

Timmer R. T., Gunn R. B. 2000. The molecular basis for Na-dependent phosphate transport in human erythrocytes and K562 cells. J. Gen. Physiol. 116 : 363—378.

Timmer R. T., Sands J. M. 1999. Lithium Intoxication. J. Amer. Soc. Nephrol. 10 : 666—674.

Tupper J. T. 1975. Cation flux in the Ehrlich ascites tumor cell. Evidence for Na^+ -for- Na^+ and K^+ -for- K^+ exchange diffusion. Biochim. biophysica acta. 394 : 586—596.

Vereninov A. A., Goryachaya T. S., Moshkov A. V., Vassilieva I. O., Yurinskaya V. E., Lang F., Rubashkin A. A. 2007. Analysis of the monovalent ion fluxes in U937 cells under the balanced ion distribution: recognition of ion transporters responsible for changes in cell ion and water balance during apoptosis. Cell Biol. Int. 31 : 382—393.

Vereninov A. A., Rubashkin A. A., Goryachaya T. S., Moshkov A. V., Rozanov Y. M., Shirokova A. V., Strelkova E. G., Lang F., Yurinskaya V. E. 2008. Pump and channel $K(Rb^+)$ fluxes in apoptosis of human lymphoid cell line U937. Cell. Physiol. Biochem. 22 : 187—194.

West I. C., Rutherford P. A., Thomas T. H. 1998. Sodium-lithium countertransport: physiology and function. *J. Hypertens.* 16 : 3—13.

Xiang M., Feng M., Muend S., Rao R. 2007. A human Na⁺/H⁺ antiporter sharing evolutionary origins with bacterial NhaA may be a candidate gene for essential hypertension. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 18 677—18 681.

Yurinskaya V., Goryachaya T., Guzhova I., Moshkov A., Rozanov Y., Sakuta G., Shirokova A., Shumilina E., Vassilieva I., Lang F., Vereninov A. 2005. Potassium and sodium balance in U937 cells during apoptosis with and without cell shrinkage. *Cell. Physiol. Biochem.* 16 : 155—162.

Yurinskaya V. E., Rubashkin A. A., Vereninov A. A. 2011. Balance of unidirectional monovalent ion fluxes in cells undergoing apoptosis: why does Na⁺/K⁺ pump suppression not cause cell swelling? *J. Physiol.* 589 : 2197—2211.

Zerbini G., Gabellini D., Ruggieri D., Maestroni A. 2004. Increased sodium-lithium countertransport activity: a cellular dysfunction

common to essential hypertension and diabetic nephropathy. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 15 : S81—S84.

Zerbini G., Maestroni A., Breviario D., Mangili R., Casari G. 2003. Alternative splicing of NHE-1 mediates Na-Li countertransport and associates with activity rate. *Diabetes.* 52 : 1511—1518.

Zerbini G., Mangili R., Gabellini D., Pozza G. 1997. Modes of operation of an electroneutral Na⁺/Li⁺ countertransport in human skin fibroblasts. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 272 : C1373—1379.

Zerbin G., Podesta F., Meregalli G., Deferrari G., Pontremoli R. 2001. Fibroblast Na-Li countertransport rate is elevated in essential hypertension. *J. Hypertens.* 19 : 1—7.

Zheng X., Kammerer C. M., Cox L. A., Morrison A., Turner S. T., Ferrell R. E. 2009. Association of SLC34A2 variation and sodium-lithium countertransport activity in humans and baboons. *Amer J. Hypertens.* 22 : 288—293.

Поступила 17 VI 2013

Li/Na EXCHANGE AND Li ACTIVE TRANSPORT IN HUMAN LYMPHOID CELLS U937 CULTURED IN LITHIUM MEDIA

V. E. Yurinskaya, A. V. Moshkov, T. S. Goryachaya, A. A. Vereninov¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: verenino@gmail.com

Lithium transport across the cell membrane is interesting in the light of general cell physiology and because of its alteration during numerous human diseases. The mechanism of Li⁺ transfer has been studied mainly in erythrocytes with a slow kinetics of ion exchange and therefore under the unbalanced ion distribution. Proliferating cultured cells with a rapid ion exchange have not been used practically in study of Li⁺ transport. In present paper, the kinetics of Li⁺ uptake and exit as well as its balanced distribution across the plasma membrane of U937 cells were studied at minimal external Li⁺ concentrations and after the whole replacement of external Na⁺ for Li⁺. It has been found that a steady state Li⁺ distribution is attained at a high rate similar to that for Na⁺ and Cl⁻ and that Li⁺/Na⁺ discrimination under the balanced ion distribution at 1—10 mM external Li⁺ keeps on 3 and drops to 1 following blocking of the Na,K-ATPase pump by ouabain. About of 80 % of the total Li⁺ flux across the plasma membrane under the balanced Li⁺ distribution at 5 mM external Li⁺ accounts for the equivalent Li⁺/Li⁺ exchange. The most part of the Li⁺ flux into the cell down the electrochemical gradient is a flux through channels and its small part may account for the NC and NKCC cotransport influxes. The downhill Li⁺ influxes are balanced by the uphill Li⁺ efflux involved in Li⁺/Na⁺ exchange. The Na⁺ flux involved in the countertransport with the Li⁺ accounts for about 0.5 % of the total Na⁺ flux across the plasma membrane. The study of Li⁺ transport is an important approach to understand the mechanism of the equivalent Li⁺/Li⁺/Na⁺/Na⁺ exchange because no blockers of this mode of ion transfer are known and it cannot be revealed by electrophysiological methods. Cells treated with the medium where Na⁺ is replaced for Li⁺ are recommended as an object for studying cells without the Na,K-ATPase pump and with very low intracellular Na⁺ and K⁺ concentration.

Key words: Li⁺/Na⁺ exchange, lithium, ion transport, U937 cells.