

DOI: 10.1134/S0041377118120027

## ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. I. ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ КАЛИЯ И НАТРИЯ И ПОТОКОВ КАЛИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ПЛОТНОСТЬЮ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

© А. Н. Шатрова, Т. А. Виноградова, А. П. Домнина, В. И. Земелько,  
Н. А. Пуговкина, Н. Н. Никольский, И. И. Марахова\*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;*

*\* электронный адрес: iim@incras.ru*

В работе охарактеризованы связанные с ростом культуры изменения содержания калия и натрия и потоков калия через плазматическую мембрану в мезенхимных стволовых клетках (МСК) человека. Показано, что в оптимальных условиях культивирования в процессе роста культуры одного посева удельное внутриклеточное содержание калия, рассчитанное на общий клеточный белок, снижается, в то время как содержание натрия не изменяется. При возрастании плотности культуры снижается ингибируемый убаином входной поток калия, что свидетельствует о снижении активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насоса. Установлено, что снижение внутриклеточного содержания калия в растущей культуре МСК человека не является результатом длительного культивирования клеток, оно обусловлено возрастанием плотности клеток в культуре, коррелирует с накоплением клеток в фазе  $G_1$  клеточного цикла и свидетельствует о замедлении размножения клеток. Высказывается предположение о том, что связанные с ростом культур изменения внутриклеточного содержания калия отражают участие ионов калия в регуляции объема клетки в процессе прохождения клеточного цикла. Сделан вывод о том, что высокое удельное внутриклеточное содержание калия является маркером функционального состояния и пролиферативного статуса стволовых клеток.

**Ключевые слова:** внутриклеточное содержание калия, входные потоки калия,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насос, пролиферация, мезенхимные стволовые клетки человека

**Принятые сокращения:** МСК — мезенхимные стволовые клетки, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека привлекают внимание исследователей в связи с возможностями их применения в регенеративной медицине. МСК, полученные из мезенхимных тканей организма человека, сохраняют пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке в условиях длительного культивирования и широко используются для исследования внутриклеточных сигнальных событий, участвующих в регуляции пролиферации и дифференцировки, а также гибели стволовых клеток (Baksh et al., 2004; Nombela-Arrieta et al., 2011; Grompe, 2012; Wang et al., 2012; Fridlyanskaya et al., 2015). Физиологические свойства стволовых клеток, включая ионный гомеостаз, и роль мембранных систем ионного транспорта в поддержании размножения клеток в культуре, исследованы мало. Вместе с тем, изучая *in vitro* процессы, контролирующие рост и дифференцировку стволовых клеток, важно иметь в эксперименте функционально стабильные клетки и знать оптимальные условия для поддержания клеток функционально жизнеспособными при их клинических испытаниях.

Ионтранспортирующие системы плазматической мембраны участвуют в регуляции роста и размножения клеток животных, но механизмы, посредством которых моновалентные ионы вовлечены в процессы пролиферации и дифференцировки клеток, недостаточно поняты (Kaplan, Owens, 1980; Веренинов, Марахова, 1986; Grinstein, Dixon, 1989; Marakhova et al., 1998; Lang et al., 2005; Orlov, Hamet, 2006; Klausen et al., 2010). Принято считать, что, как и ионы кальция, выполняющие сигнальную роль в разных клеточных процессах, одновалентные ионы могут быть вовлечены в сложную сеть событий, регистрируемых при передаче сигнала с рецепторов плазматической мембраны внутрь клетки. Показано, в частности, что изменения концентрации натрия в клетке влияют на внутриклеточный pH и трансмембранный потенциал, а изменение концентрации хлора вызывает гиперполяризацию клеточной мембраны и влияет на сигнальную функцию ионов кальция во время стадии  $G_1$  клеточного цикла (Klausen et al., 2010). Обнаружена зависимость активности некоторых белков-регуляторов клеточного цикла от внутриклеточного pH и мемб-

ранного потенциала (Putney, Barber, 2003; Pedersen et al., 2007).

В настоящей работе внимание сосредоточено на выяснении роли ионов калия в размножении стволовых клеток в культуре. При исследовании клеток постоянных линий были обнаружены изменения ионного гомеостаза клеток, связанные с ростом клеточных культур (Марахова и др., 1985а, 1985б; Трошин и др., 1985). На основании данных об изменениях содержания калия в культурах с разными скоростями размножения был сделан вывод о том, что высокое удельное внутриклеточное содержание калия характеризует клеточные культуры с высокой скоростью пролиферации (Веренинов, Марахова, 1986). Природа связи между уровнем пролиферации и содержанием калия в растущих клеточных культурах до конца не понята. Калий является доминирующим катионом в клетке и в отличие от других внутриклеточных ионов, таких как натрий, хлор или кальций, вряд ли может выполнять сигнальную функцию. Наше исследование МСК человека выявляет связанные с культивированием стволовых клеток изменения содержания калия и потоков калия через плазматическую мембрану. Эти изменения обусловлены возрастом плотности клеточной культуры, они коррелируют с накоплением клеток в фазе  $G_1$  клеточного цикла и проявляются при замедлении размножения клеток. Выдвигается предположение о том, что связанные с ростом культур МСК изменения содержания калия отражают участие ионов калия в регуляции объема клетки во время клеточного цикла, а удельное внутриклеточное содержание калия является маркером функционального состояния и пролиферативного статуса стволовых клеток.

### Материал и методика

Клетки. В работе использовали МСК, полученные из эндометрия здорового донора (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone), в атмосфере 5 %  $CO_2$  при 37 °С во флаконах 25 мм<sup>2</sup>. Клетки рассевали на чашки диаметром 35 мм по 10—15 тыс. клеток на 1 см<sup>2</sup>. В работе использовали клетки 2—15-го пассажей.

Измерение внутриклеточного содержания катионов и входных потоков калия. Содержание калия и натрия в клетках измеряли с помощью пламенно-эмиссионной фотометрии (Веренинов и др., 1982). Входной поток калия оценивали по накоплению его физиологического аналога рубидия, добавляя в ростовую среду RbCl на 30 мин в конечной концентрации 2.5 мМ. Поток рубидия, относящийся к переносу с участием  $Na^+, K^+$ -насоса, детектировали по разнице между общим накоплением рубидия и его входом в клетку в присутствии 0.05 мМ убаина в течение 20 мин. Для оценки содержания катионов клетки осаждали центрифугированием в течение 3—5 мин при 600 g. Осадок пятикратно промывали охлажденным раствором  $MgCl_2$  (85 мМ), не ресуспендируя, и заливали 1 мл 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Содержание катионов в надосадочной жидкости определяли на атомно-абсорбционном фотометре Perkin-Elmer AA-306. Далее осадок растворяли в 1 мл 0.1 N NaOH для последующего определения содержания общего белка по методу Лоури. Внутриклеточную концентрацию катионов выражали в мкмольях на 1 г общего клеточного белка.

Пролиферативную активность оценивали методом проточной ДНК-цитометрии. Перед измерением клетки инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 0.02 % сапонина. После отмывки от сапонина клетки окрашивали в растворе PBS, содержащем 50 мкг/мл иодида пропидия и 250 мкг/мл рибонуклеазы (30—40 мин, 37 °С). Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter).

В работе использовали убаин, сапонин, РНКазу, иодистый пропидий (Sigma, США), а также реактивы отечественного производства квалификации «хч» или «осч».

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Excell (Microsoft Corporation, США). Данные представлены в виде средних значений и средних квадратичных отклонений, полученных в каждой отдельной серии экспериментов ( $n = 3—13$ ).

### Результаты и обсуждение

Внутриклеточное содержание калия и натрия в процессе роста. На рис. 1 представлены данные одного репрезентативного эксперимента, в котором оценивали ростовые характеристики культур и измеряли содержание главных внутриклеточных катионов — калия и натрия — в МСК человека, культивируемых в оптимальных условиях в течение 7 сут. В эксперименте использовали клетки на 5-м пассаже после выделения линии МСК из эндометрия человека, а замену среды культивирования на свежую питательную среду с сывороткой проводили через каждые 2 сут. Вслед за задержкой роста в первые сутки после пересева культура МСК входит в стадию экспоненциального роста, но после 5-х сут рост культуры замедляется (рис. 1, а). На протяжении первых 4 сут содержание общего клеточного белка в культуре увеличивается пропорционально приросту числа клеток, но далее, когда скорость роста культуры замедляется, внутриклеточное содержание белка продолжает расти, так что содержание белка, рассчитанное на 1 клетку, в конфлюэнтной культуре больше, чем в экспоненциально растущей культуре (рис. 1, а). Ростовые кривые, представленные на рис. 1, а, являются типичными для пролиферирующей культуры МСК человека ранних пассажей.

Ионный гомеостаз в растущей культуре МСК оценивали по удельному содержанию основных внутриклеточных катионов — калия и натрия, рассчитанному на содержание общего клеточного белка для одних и тех же культур. Такое нормирование внутриклеточного содержания катионов (вместо расчета их молярной концентрации на содержание внутриклеточной воды) принято для культивируемых клеток ввиду сложности измерения объема клеток в асинхронно размножающейся клеточной популяции с большой вариабельностью размеров клеток (Веренинов, Марахова, 1986; Kay, 2017). Следует заметить, что при пропорциональном нарастании числа клеток и количества общего белка по ходу основной части ростовой кривой культуры МСК количество клеточного белка служит также показателем плотности культуры. В нашей работе подобный способ оценки изменений плотности культуры имел то преимущество, что позволял сравнивать изменения внутриклеточного содержания катионов для индивидуальных культур.

Как показывает рис. 1, б, по мере роста культуры одного посева удельное внутриклеточное содержание калия не остается постоянным: через 1 сут после посева клеток содержание калия ниже, чем на 2-е сут культивирования, когда оно является наибольшим ( $999 \pm 57$  мкмоль/г,  $n = 8$ ), а далее в течение 5 сут содержание калия в клетках постепенно снижается до  $690 \pm 24$  мкмоль/г ( $n = 8$ ). Удельное содержание натрия в этих же условиях снижается в 1.5 раза между 1-ми и 2-ми сут, а далее в течение следующих 5 сут практически не изменяется и составляет около 95 мкмоль/г. Из этих данных следует, что после первых суток на протяжении всего периода наблюдения в растущих культурах МСК отношение внутриклеточного содержания калия к содержанию натрия сохраняется высоким ( $K_i/Na_i = 6-10$ ). Как известно, высокий индекс внутриклеточного содержания калия к содержанию натрия ( $K_i/Na_i$ ) является фундаментальным показателем функциональной жизнеспособности клеток. Что касается низкого содержания калия и повышенного содержания натрия и соответственно более низкого отношения  $K_i/Na_i$  в МСК в первые сутки культивирования, то оно, вероятно, отражает состояние клеток после посева в новую культуру.

В отдельной серии экспериментов мы оценили влияние процедуры трипсинизации, которую в практике культивирования клеток используют для снятия монослойной культуры с поверхности чашек и нового посева. Известно, что при выполнении процедуры посева клеток среду культивирования меняют на PBS с трипсином (0.05%) через 2—3 мин в зависимости от скорости открепления клеток от поверхности чашки, после чего клетки ополаскивают средой с сывороткой и прикрепившиеся клетки помещают в полноценную питательную среду для получения новой монослойной культуры. Наши измерения содержания катионов в МСК, которые готовят для посева новой культуры, показали, что в течение 1—2 ч после удаления трипсина содержание калия в клетках низкое, а содержание натрия высокое, так что отношение  $K_i/Na_i$  оказывается близким к 1. Замечено, что возрастание внутриклеточного содержания калия и снижение содержания натрия начинается одновременно с прикреплением (но еще не с распластыванием) клеток. В оптимальных условиях культивирования ионные показатели далее постепенно нормализуются, и лишь через 14—18 ч после посева новой культуры МСК величина отношения  $K_i/Na_i$  становится не менее 4 и находится в диапазоне значений, присущих функционально жизнеспособным клеткам. Необходимо отметить, что в течение первых суток, в условиях сниженного содержания калия и повышенного содержания натрия, численность клеток в культуре не увеличивается, а прирост численности клеток в культуре отмечается, как правило, лишь на 2-е сут (рис. 1, а).

Как следует из рис. 1, б, в растущих МСК между 2-ми и 7-ми сут удельное внутриклеточное содержание калия постепенно снижается. Для того чтобы выяснить, не является ли наблюдаемое снижение содержания калия результатом длительного культивирования клеток и «ухудшения» их функционального состояния, провели серию экспериментов, в которой МСК одного пассажа высевали одновременно, но с разной плотностью (100 или 250 тыс. клеток на чашку диаметром 35 мм), на следующие сутки меняли ростовую среду на свежую и на 3-и сут оценивали внутриклеточное содержание катионов. К 3-м сут плотность клеток в культурах составила соответственно  $1.1 \cdot 10^3$  и  $2.8 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>, так что в одном эксперименте

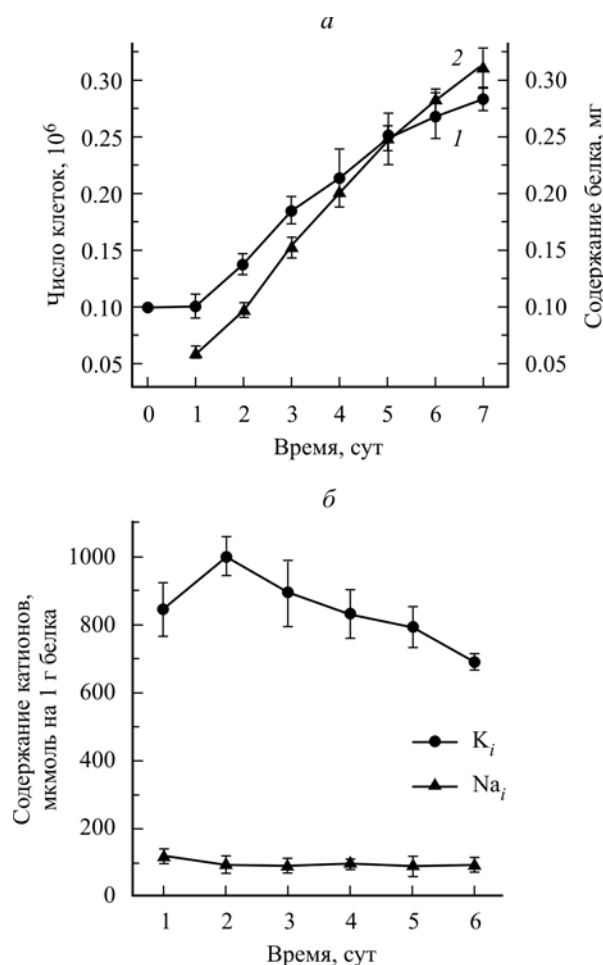


Рис. 1. Снижение внутриклеточного содержания калия по мере роста культуры МСК человека.

а — рост численности клеток (кривая 1) и нарастание массы общего клеточного белка (кривая 2) в процессе культивирования МСК в течение 7 сут; б — внутриклеточное содержание калия ( $K_i$ ) и натрия ( $Na_i$ ) в растущих культурах. Приведены средние значения и средние квадратичные отклонения из 8 экспериментов, выполненных по одной схеме.

для исследования имели одновременно редкие и плотные культуры МСК. Измерения показали, что удельное содержание калия в МСК из редких культур ( $1.1 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>) составляло  $791 \pm 52$  мкмоль/г, тогда как в условиях плотного клеточного слоя (более  $2.5 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>) оно было ниже и составляло  $626 \pm 31$  мкмоль/г (рис. 2). В обеих культурах удельное внутриклеточное содержание натрия было практически одинаковым ( $96 \pm 9$  и  $100 \pm 11$  мкмоль/г). Полученный результат дает основание заключить, что причиной снижения удельного внутриклеточного содержания калия по ходу роста культуры МСК человека является нарастание плотности клеток культуры.

Изменение входных потоков рубидия по мере роста МСК. Известно, что рубидий является физиологическим аналогом калия и используется (вместо радиоактивного изотопа калия) для характеристики транспорта калия через разные системы переноса этого катиона через плазматическую мембрану (Segel et al., 1979; Веренинов, Марахова, 1986). Мы измеряли накопление рубидия в клетках после инкубации в течение 15 мин в ростовой среде, содержащей 5 мМ RbCl, в присутствии 0.1 мМ уабаина выделяли поток рубидия через

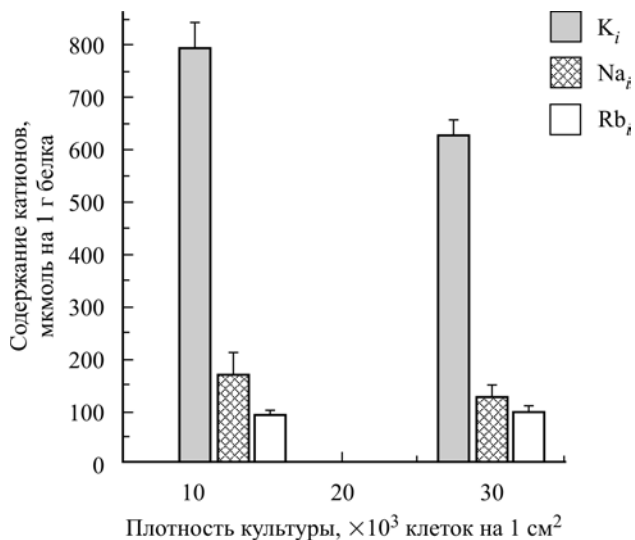


Рис. 2. Зависимость внутриклеточного содержания калия и натрия, а также входа рубидия от плотности культуры МСК человека.

По вертикали — внутриклеточное содержание калия ( $K_i$ ) и натрия ( $Na_i$ ) и входной поток рубидия ( $Rb_i$ ) в редких ( $1.1 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>) и плотных ( $2.8 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>) культурах, посеянных одновременно и проанализированных на 3-и сут после посева. Приведены средние значения и средние квадратичные отклонения из 3 экспериментов, выполненных по одной схеме.

Na,K-АТФазный насос и оценивали также не ингибируемый убаином транспорт рубидия через каналы «пассивной утечки» в плазматической мембране.

Как следует из данных, представленных на рис. 2, вход рубидия, по которому оценивали входной поток калия, в плотных культурах МСК был ниже, чем в редких культурах. Мы нашли, что у МСК человека в общем входном потоке рубидия ингибируемый убаином активный транспорт, связанный с работой  $Na^+,K^+$ -насоса, составляет значительную долю (до 70 %), а на «пассивную утечку» приходится не более 30 %. По мере увеличения плотности клеточного монослоя ингибируемый убаином транспорт рубидия сначала снижается, а в плотных культурах выходит на некоторый постоянный уровень (рис. 3, кривая 2). В этих же условиях культивирования пассивный, не ингибируемый убаином вход рубидия оказался на 25—30 % выше в редких культурах, чем в конфлюэнтных (рис. 3, кривая 3). Из этих данных следует, что по мере роста культуры и возрастания клеточной плотности поток рубидия в клетках снижается за счет уменьшения активного поступления рубидия в клетки, что указывает на ослабление функциональной активности  $Na^+,K^+$ -насоса.

Изменение уровня пролиферации и ионные показатели в растущих МСК. Ранее на культурах постоянных клеточных линий нами были установлены изменения ионного гомеостаза, связанные с ростом, пролиферацией и дифференцировкой трансформированных клеток постоянных линий (Марахова и др., 1985а, 1985б; Веренинов, Марахова, 1986). Опираясь на эти исследования, мы предположили, что изменения транспорта калия в культурах МСК человека обусловлены изменением уровня пролиферации клеточной культуры. Проведенный цитометрический анализ показал, что в процессе роста МСК изменяется характер распределения клеток по фазам клеточного цикла. Как следует из данных на рис. 4,

к 7-м сут по сравнению с 4-ми сут в культуре возрастает доля клеток в  $G_1$ -фазе клеточного цикла (82 вместо 54 %) и снижается доля клеток в фазах S и  $G_2/M$  с 45.8 до 18 %. Изменения такого типа указывают на то, что в конфлюэнтной культуре высокой плотности уровень клеточной пролиферации снижается, что и проявляется в замедлении роста культуры (рис. 1, а). Сравнение пролиферативной активности и внутриклеточного содержания катионов в растущих МСК показало, что с замедлением проли-

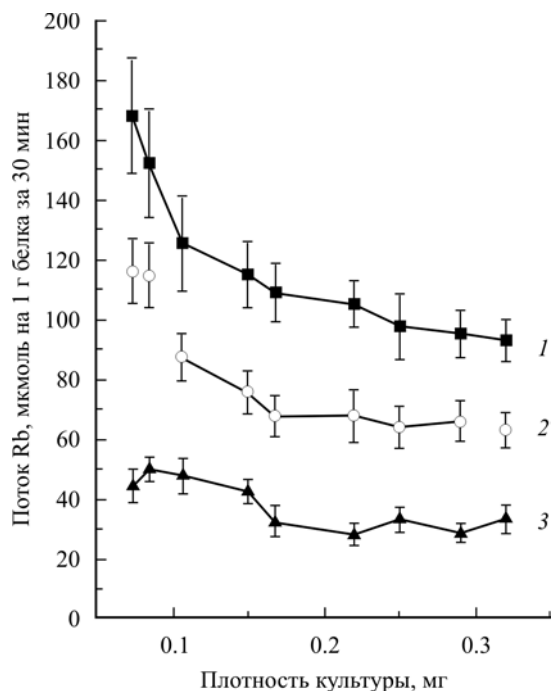


Рис. 3. Изменение входных потоков рубидия в растущих культурах МСК: общего (кривая 1), ингибируемого убаином (кривая 2) и резистентного к убаину (кривая 3).

По вертикали — входной поток рубидия; по горизонтали — плотность культуры, мг клеточного белка на 1 чашку диаметром 35 мм. Приведены средние значения и средние квадратичные отклонения из 7 экспериментов, выполненных по одной схеме.

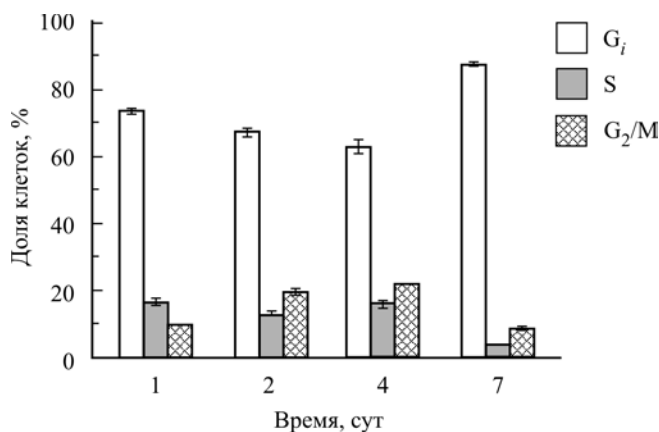


Рис. 4. Изменение распределения клеток по фазам клеточного цикла в процессе культивирования МСК.

Данные цитофлуориметрического анализа. По вертикали — доли клеток, находящихся в фазах  $G_1$ , S и  $G_2/M$ , %. Приведены средние значения и их ошибки из 3 экспериментов, выполненных по одной схеме.



ферации в плотных культурах снижается удельное внутриклеточное содержание калия. Особенность изменения содержания ионов в рассматриваемом случае состоит в том, что на фоне постепенного, но непрерывного снижения содержания калия внутриклеточное содержание натрия заметно снижается лишь на начальной стадии роста культуры, а в процессе экспоненциального роста и далее в конфлюэнтных культурах содержание натрия в МСК практически не изменяется. Следует также отметить, что с более низким удельным внутриклеточным содержанием калия в первые сутки после посева МСК коррелируют сниженное число клеток в фазах S и G<sub>2</sub>/M и отсутствие прироста численности клеток на начальном этапе ведения культуры (рис. 1, б).

Суммируя представленные выше данные, можно заключить, что при культивировании МСК человека в оптимальных условиях такие показатели ионного гомеостаза, как внутриклеточное содержание и трансмембранные потоки калия, не остаются постоянными. В процессе роста культуры одного посева удельное содержание калия в расчете на общий клеточный белок снижается, тогда как удельное содержание натрия практически не изменяется. Значение отношения внутриклеточного содержания калия к содержанию натрия хотя и снижается по мере роста МСК (с 10 до 6), но сохраняется высоким и при достижении конфлюэнтного состояния, что свидетельствует о функциональной жизнеспособности этих клеток. При высоких плотностях культуры снижается ингибируемый убаином поток калия, что свидетельствует о снижении активности Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-насоса. Установлено, что снижение внутриклеточного содержания калия в растущих МСК не является результатом длительного культивирования клеток, оно обусловлено возрастанием плотности культуры, коррелирует с накоплением клеток в фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла и замедлением размножения клеток.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что высокое удельное внутриклеточное содержание калия является маркером функционального состояния и может служить показателем пролиферативного статуса стволовых клеток.

В литературе имеются исследования, хотя и немногочисленные, свойств ионных каналов, обнаруженных в стволовых клетках. Внимание исследователей сосредоточено на поиске особенностей свойств или экспрессии ионных транспортеров в стволовых клетках в процессе дифференцировки. Выявлены ионные каналы разных типов в МСК человека (Ding et al., 2012; Chubinsky-Nadezhdin et al., 2017). Охарактеризованы изменения экспрессии субъединиц Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы во время нейрональной дифференцировки плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток мыши (Habiba et al., 2000). Данные, полученные на стволовых клетках человека, дают повод использовать тип экспрессии субъединиц Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы в качестве маркера при изучении функции и дифференцировки кардиомиоцитов (Chen et al., 2006; Fine et al., 2013).

Наша работа устанавливает связь между внутриклеточным содержанием калия и пролиферацией стволовых клеток. В растущих МСК человека мы регистрируем изменения внутриклеточного содержания калия в диапазоне от 1000 до 700—600 мкмоль на 1 г белка, который выше принятого исследователями физиологического уровня этого показателя для выживания клеток (Tupper et al., 1977; Frantz et al., 1980; Lopez-Rivas et al., 1982). Сходные изменения были обнаружены ранее в растущих трансформированных клетках разного происхождения

(Марахова и др., 1985а, 1985б; Трошин и др., 1985; Веренинов, Марахова, 1986). Изменение удельного содержания калия в расчете на клеточный белок выявлено также у нормальных Т-лимфоцитов человека, активированных фитогемагглютинином: в процессе митогенной активации и перехода к синтезу ДНК и делению внутриклеточное содержание калия в расчете на клеточный белок возрастает примерно в 1.3 раза, причем основные изменения сопровождаются стадией роста лимфоцитов и образования крупных бластов (Веренинов и др., 1991; Marakhova et al., 1995, 1999; Karitskaya et al., 2010). Во всех перечисленных случаях изменения внутриклеточного калия коррелируют с изменением уровня клеточной пролиферации, что свидетельствует о вовлеченности ионов калия в процессы размножения клеток.

Калий является основным внутриклеточным катионом и вряд ли может выполнять ту сигнальную функцию, которую, как показывают недавние исследования, выполняют в клетке другие одновалентные ионы — натрий, хлор и водород (Lang et al., 2005; Orlov, Hamet, 2006; Pedersen et al., 2007; Klausen et al., 2010). Анализируя изменения ионного гомеостаза, сопровождающие запуск или торможение клеточной пролиферации, мы предполагаем, что связанные с ростом культур изменения удельного внутриклеточного содержания калия могут отражать участие ионов калия в регуляции объема клеток по ходу препролиферативной G<sub>1</sub>-фазы клеточного цикла или в процессе перехода из состояния покоя к пролиферации. Выдвигаемое предположение обсуждается подробно в нашей следующей работе, которая посвящена изучению изменений ионного гомеостаза МСК человека в связи с возрастом культивируемых стволовых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

### Список литературы

- Веренинов А. А., Виноградова Т. А., Ивахнюк И. С., Марахова И. И., Торопова Ф. В. 1982. Применение эмиссионного анализа для исследования транспорта катионов через клеточную мембрану. Цитология. 24 (1): 98—103. (Vereninov A. A., Vinogradova T. A., Ivakhnyuk I. S., Marakhova I. I., Toropova F. V. 1982. The measurement of alkaline cation fluxes across a cell membrane by flame emission. Tsitologiya. 24 (1): 98—103.)
- Веренинов А. А., Гусев Е. А., Казакова О. М., Клименко Е. В., Осипов В. В., Марахова И. И., Торопова Ф. В. 1991. Транспорт и распределение моновалентных катионов при бластотрансформации лимфоцитов периферической крови человека, активированных ФГА. Цитология. 33 (11): 78—93. (Vereninov A. A., Gusev E. A., Kazakova O. M., Klimenko E. V., Osipov V. V., Marakhova I. I., Toropova F. V. 1991. Transport and distribution of monovalent cations in human peripheral blood lymphocytes activated by phytohemagglutinin. Tsitologiya. 33 (11): 78—93.)
- Веренинов А. А., Марахова И. И. 1986. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука. 292 с. (Vereninov A. A., Marakhova I. I. 1986. Ion transport in cultured cells. Leningrad: Nauka. 292 p.)
- Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичева Н. К., Корсаков В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53 (12): 919—929. (Zemelko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artzibasheva I. V., Zenin V. V.,

- Kirsanov A. A., Bichevaia N. K., Korsak V. S., Nikolsky N. N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. *Tsitologiya*. 53 (8) : 919—929.)
- Марахова И. И., Поспелова Т. В., Виноградова Т. А., Веренинов А. А., Игнатова Т. Н. 1985а. Зависимость транспорта ионов через плазматическую мембрану от плотности клеточной культуры. I. Содержание калия и натрия и входной поток рубидия у трех линий клеток СНО. *Цитология*. 27 (9) : 1011—1020. (Marakhova I. I., Pospelova T. V., Vinogradova T. A., Vereninov A. A., Ignatova T. N. 1985a. Cation transport through plasma membrane related to the cell culture density. I. Potassium and sodium contents and cation fluxes in different lines of *Chinese hamster ovary* cells. *Tsitologiya*. 29 (9) : 1011—1020.)
- Марахова И. И., Поспелова Т. В., Сальников К. В. 1985b. Зависимость транспорта ионов через плазматическую мембрану от плотности клеточной культуры. II. Содержание калия и натрия и потоки рубидия и лития в ходе роста культур клеток L. *Цитология*. 27 (10) : 1156—1163. (Marakhova I. I., Pospelova T. V., Salnikov K. V., 1985b. Cation transport through plasma membrane related to the cell culture density. II. Active and passive cation fluxes in growing L-cell cultures. *Tsitologiya*. 27 (10) : 1156—1163.)
- Трошин А. С., Марахова И. И., Веренинов А. А., Виноградова Т. А., Ефимова Е. В., Игнатова Т. Н., Поспелова Т. В., Сальников К. В. 1985. Плотность культуры и транспорт ионов через плазматическую мембрану у трансформированных клеток. *ДАН СССР*. 282 (3) : 1235—1237. (Troshin A. S., Marakhova I. I., Vereninov A. A., Vinogradova T. A., Efimova E. V., Ignatova T. N., Pospelova T. V., Salnikov K. V. 1985. Culture density and ion transport through the plasma membrane in transformed cells. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 282 (3) : 709—711.)
- Baksh D., Song L., Tuan R. S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 8 : 301—316.
- Chen M., Fan Z. C., Liu X. J., Deng J. L., Zhang L., Rao L., Yang Q., Huang D. J. 2006. Effects of autologous stem cell transplantation on ventricular electrophysiology in doxorubicin-induced heart failure. *Cell. Biol. Int.* 30 : 576—582.
- Chubinsky-Nadezhdin V. I., Vasileva V. Y., Pugovkina N. A., Vassilieva I. O., Morachevskaya E. A., Nikolsky N. N., Negulyaev Y. A. 2017. Local calcium signaling is mediated by mechanosensitive ion changes in mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482 : 563—568.
- Ding F., Zhang G., Liu L., Jiang L., Wang R., Zheng Y., Wan G., Xie M., Duan Y. 2012. Involvement of cationic channels in proliferation and migration of human mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 44 : 358—364.
- Fine M., Lu F. M., Lin M. J., Moe O., Wang H. R., Hilgemann D. W. 2013. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for studies of cardiac ion transporters. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 305 : C481—C491.
- Frantz C. N., Stiles C. D., Pledger W. J., Scher C. D. 1980. Effect of ouabain on growth regulation by serum components in Balb/c-3T3 cells: inhibition of entry into S phase by decreased protein synthesis. *J. Cell. Physiol.* 105 : 439—448.
- Fridlyanskaya I., Alekseenko L., Nikolsky N. 2015. Senescence as a general cellular response to stress: a mini-review. *Exp. Gerontol.* 72 : 124—128.
- Grinstein S., Dixon S. J. 1989. Ion transport, membrane potential and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol. Rev.* 69 : 417—481.
- Grompe M. 2012. Tissue stem cells: new tools and functional diversity. *Cell Stem Cell*. 10 : 685—689.
- Habiba A., Blanco G., Mercer R. W. 2000. Expression, activity and distribution of Na,K-ATPase subunits during *in vitro* neuronal induction. *Brain Res.* 875 : 1—13.
- Kaplan J. G., Owens T. 1980. Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Annu. Rev. Physiol.* 40 : 19—41.
- Karitskaya I., Aksenov N., Vassilieva I., Zenin V., Marakhova I. 2010. Long-term regulation of Na,K-ATPase pump during T-cell proliferation. *Pflugers Arch.* 460 : 777—789.
- Kay A. R. 2017. How cells can control their size by pumping ions front. *Cell Develop. Biol.* 5 : 41—63.
- Klausen T. K., Preisler S., Pedersen S. F., Hoffmann E. K. 2010. Monovalent ions control proliferation of Ehrlich Lettre ascites cells. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 299 : C714—C725.
- Lang F., Föllmer M., Lang K. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* 205 : 147—157.
- Lopez-Rivas A., Adelberg E. A., Rozengurt E. 1982. Intracellular K<sup>+</sup> and the mitogenic response of 3T3 cells to peptide factors in serum-free medium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 79 : 6275—6279.
- Marakhova I. I., Ivanova A. E., Toropova F. V., Vereninov A. A., Vinogradova T. A. 1999. Functional expression of the Na/K pump is controlled via a cyclosporin A-sensitive signaling pathway in activated human lymphocytes. *FEBS Lett.* 456 : 285—289.
- Marakhova I. I., Vereninov A. A., Toropova F. V., Vinogradova T. A. 1995. Long-term enhancement of Na,K-ATPase pump during blast transformation of human lymphocytes is controlled first by translational, then by transcriptional mechanisms. *FEBS Lett.* 368 : 110—112.
- Marakhova I. I., Vereninov A. A., Toropova F. V., Vinogradova T. A. 1998. Na,K-ATPase pump in activated human lymphocytes: on the mechanisms of rapid and long-term increase in K influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation. *Biochim. biophys. acta.* 1368 : 61—72.
- Nombela-Arrieta C., Ritz J., Silberstein L. E. 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 : 126—131.
- Orlov S. N., Hamet P. 2006. Intracellular monovalent ions as second messengers. *J. Membr. Biol.* 210 : 161—172.
- Pedersen S. F., Darborg B. V., Rentsch M. L., Rasmussen M. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by the plasma membrane Na/H exchanger, NHE1. *Arch. Biochem. Biophys.* 462 : 195—201.
- Putney L. K., Barber D. L. 2003. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G<sub>2</sub>/M entry and transition. *J. Biol. Chem.* 278 : 44 645—44 649.
- Segel G. B., Simon V., Lichtman M. A. 1979. Regulation of sodium and potassium transport in phytohemagglutinin-stimulated human blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 64 : 834—841.
- Tupper J. T., Zorgniotti F., Mills B. 1977. Potassium transport and content during G<sub>1</sub> and S phase following serum stimulation of 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.* 91 : 429—440.
- Wang S., Qu X., Zhao R. C. 2012. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J. Hematol. Oncol.* 5 : 19—27.

ION HOMEOSTASIS DURING THE GROWTH OF HUMAN MESENCHYMAL  
STEM CULTURE. I. DENSITY-DEPENDENT CHANGES OF CELL K<sup>+</sup> AND Na<sup>+</sup> CONTENT  
AND RB<sup>+</sup> INFLUXES

*A. N. Shatrova, T. A. Vinogradova, A. P. Domnina, V. I. Zemelko, N. A. Pugovkina,  
N. N. Nikolsky, I. I. Marakhova\**

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: iim@incrus.ru

In this study, we reported the proliferation-related changes in cell K<sup>+</sup> content and in K<sup>+</sup> influxes in cultivated human mesenchymal stem cells (MSCs). The intracellular K<sup>+</sup> content calculated per cell protein content was found to decrease in growing culture of one passage whereas intracellular Na<sup>+</sup> content was not significantly changed. It was also revealed that at higher densities of hMSCs monolayer, the ouabain-sensitive K<sup>+</sup> influx was decreased thus indicating a decline in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump-mediated transport. We analyzed the cell cycle profiles of hMSCs cultures and found that under optimal culture conditions, in high-density cultures the decline in K<sup>+</sup> content per cell protein was related to the accumulation of G<sub>1</sub> cells in the population and accompanied cell proliferation slowing. It is concluded that cell K<sup>+</sup> content per cell protein is an informative test for assessing the functional status of stem cells *in vitro*.

**Key words:** cell potassium content, cell sodium content, potassium fluxes, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump, proliferation, human mesenchymal stem cells

---