

DOI: 10.1134/S0041377118120039

## ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА. II. ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАЛИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ВОЗРАСТОМ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

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

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: iim@incras.ru

Проведено исследование ионного гомеостаза мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека, размножающихся в культуре в течение длительного времени. Обнаружено, что на ранних пассажах (2—4-й) после разморозки одного и того же клона МСК удельное внутриклеточное содержание калия, рассчитанное на общий клеточный белок, почти на 40 % выше, чем в клетках того же клона, который прошел в культуре не менее 12—15 пассажей. В этих же условиях по мере увеличения возраста МСК удельное внутриклеточное содержание натрия остается практически без изменений. Цитофлуориметрический анализ пролиферации культур МСК разного возраста показал, что снижение внутриклеточного содержания калия коррелирует с накоплением клеток в фазе  $G_1$  клеточного цикла и сопутствует замедлению размножения клеток. Опираясь на совокупность данных, полученных при изучении транспорта моновалентных катионов у клеток постоянных линий человека (стволовых и нормальных лимфоцитов), обсуждаются механизмы участия ионов калия в пролиферации клеток. Сделан вывод о том, что изменения удельного внутриклеточного содержания калия в расчете на общий клеточный белок, связанные с запуском или торможением пролиферации клеток, отражают участие ионов калия в регуляции объема клетки. Удельное внутриклеточное содержание калия в расчете на общий клеточный белок является адекватным маркером функционального состояния и пролиферативного статуса стволовых клеток *in vitro*.

Ключевые слова: внутриклеточное содержание калия, внутриклеточное содержание натрия,  $Na^+$ ,  $K^+$ -насос, пролиферация, клеточный цикл, мезенхимные стволовые клетки человека

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

Результаты исследования свойств ионных каналов и ионных транспортеров у размножающихся клеток в культуре свидетельствуют о том, что моновалентные ионы участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток (Веренинов, Марахова, 1986; Grinstein, Dixon, 1989; Marakhova et al., 1998; Lang et al., 2005; Orlov, Hamet, 2006; Klausen et al., 2010). Общеизвестно, что такие ионы, как  $Na^+$  и  $Cl^-$ , влияют на внутриклеточный pH, мембранный потенциал, концентрацию ионов кальция в цитоплазме и оказываются вовлеченными в сеть сигнальных событий, которые контролируют, в частности, активность белков-регуляторов клеточного цикла (Pedersen et al., 2007; Duran et al., 2010). Снижение концентрации внутриклеточного калия вследствие блокирования  $Na, K$ -насоса также замедляет размножение клеток, останавливая клетки в фазе  $G_1$  клеточного цикла (Frantz et al., 1980; Lopez-Rivas et al., 1982; Dornand et al., 1986). Механизмы участия ионов калия в клеточной пролиферации не вполне поняты. На основании данных, полученных при исследовании транспорта ионов в культиви-

руемых клетках постоянных линий, а также в нормальных лимфоцитах человека, стимулированных митогенными факторами к размножению, мы пришли к выводу о том, что высокое внутриклеточное содержание, рассчитываемое на общий клеточный белок, является показателем высокого пролиферативного статуса клеточной культуры (Веренинов, Марахова, 1986; Веренинов и др., 1991).

В последнее время наше внимание привлекли стволовые клетки как объект, который мог бы расширить возможности в исследовании тех изменений ионного гомеостаза клеток, которые сопровождают размножение и дифференцировку клеток в культуре. На мезенхимных стволовых клетках (МСК) человека мы исследовали изменения содержания калия и его потоков через плазматическую мембрану в процессе роста культур и нашли, что снижение удельного внутриклеточного содержания калия коррелирует с увеличением плотности клеточной культуры, накоплением клеток в фазе  $G_1$  клеточного цикла и замедлением размножения клеток (Шатрова и др., 2018).

Показано, что в процессе длительного культивирования в МСК человека развивается процесс преждевременного старения, характерным признаком которого является прекращение размножения метаболически активных клеток (Noh et al., 2010; Alekseenko et al., 2014; Fridlyanskaya et al., 2015). Феномен старения следует принимать во внимание, когда для использования стволовых клеток в клинической практике требуется накопить значительную массу клеток.

В настоящей работе мы поставили задачу выяснить, отражается ли старение стволовых клеток на характеристиках ионного гомеостаза. Знание параметров ионного гомеостаза клеточных культур может быть полезным для оценки функционального состояния стволовых клеток, используемых для целей регенеративной медицины. Мы исследовали ионный гомеостаз МСК человека при длительном поддержании их в культуре и обнаружили изменения внутриклеточного содержания калия, связанные с возрастом клеточной линии. В совокупности с данными, полученными при изучении транспорта одновалентных катионов у стволовых клеток человека, клеток постоянных линий и нормальных Т-лимфоцитов человека, в работе обсуждаются механизмы участия ионов калия в пролиферации клеток. Сделан вывод о том, что высокое удельное внутриклеточное содержание калия в расчете на общий клеточный белок является признаком клеточной культуры с высоким уровнем пролиферации и может служить маркером функционального статуса стволовых клеток.

## Материал и методика

**К л е т к и.** В работе использовали МСК, полученные из эндометрия здорового донора (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % глутамина и 1 % глутамакса, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С во флаконах 25 мм<sup>2</sup>. Для экспериментов клетки рассевали на чашки диаметром 35 мм по 10—15 тыс./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 метода пламенно-эмиссионной фотометрии (Веренинов и др., 1982). Входной поток калия оценивали по накоплению его физиологического аналога рубидия, добавляя RbCl в конечной концентрации 2.5 мМ на 30 мин. Поток рубидия, относящийся к переносу с участием Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-насоса, детектировали по разнице между общим накоплением рубидия и его входом в клетку в присутствии 0.05 мМ убаина в течение 30 мин. Для оценки содержания катионов клетки осаждали центрифугированием в течение 3—5 мин при 600 g. Осадок пятикратно промывали охлажденным раствором MgCl<sub>2</sub> (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 белка.

Для оценки пролиферативной активности использовали метод проточной ДНК-цитомет-

рии. 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 и иодистый пропидий (Sigma, США).

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—8).

## Результаты

Изменения содержания калия и натрия в МСК человека, связанные с возрастом клеточной линии. Для оценок функционального состояния стволовых клеток, которые ведутся разное время в культуре, мы исследовали содержание калия и натрия в растущих культурах, полученных из одной и той же линии МСК человека (№ 2034, Институт цитологии РАН), которая прошла в культуре разное число пассажей (Земелько и др., 2011). На рис. 1 представлены результаты экспериментов, в которых измеряли содержание калия и натрия в культурах МСК, полученных при пересеве клеточных культур от 2-го до 15-го пассажа. Как и ранее, оценивали удельное содержание калия в клетке, для чего рассчитывали отношение измеренного содержания калия к содержанию общего клеточного белка в одних и тех же культурах (Шатрова и др., 2018). Оказалось, что содержание калия, рассчитанное на 1 мг общего клеточного белка, в клетках культур одной и той же плотности, но разного возраста различается, а именно: в «молодых» клетках ранних пассажей содержание калия выше, чем в «старых» клетках, которые поддерживаются в культуре длительное время (рис. 1, а). В МСК исследованного клона обнаруживается закономерность, которая состоит в том, что до 9-го пассажа после разморозки клона внутриклеточное содержание калия составляет не менее 800 мкмоль на 1 г белка, но к 15-му пассажу оно снижается до 600 мкмоль на 1 г белка (рис. 1, б).

Что касается внутриклеточного содержания натрия, то его изменения не являются столь закономерными, как содержания калия. В этих же культурах удельное внутриклеточное содержание натрия оказалось самым высоким на 2-м пассаже (167 ± 21 мкмоль на 1 мг белка), но далее до 15-го пассажа оно существенно не менялось и составляло 103 ± 14 мкмоль на 1 мг белка (рис. 1, б). Как результат описанных изменений внутриклеточного содержания катионов отношение содержания калия к содержанию натрия (K<sub>i</sub>/Na<sub>i</sub>) хотя и снижалось до 7 к 15-му пассажу, но оставалось высоким, что свидетельствует о сохранении высокого ионного гетерогенитета у МСК человека в исследованном интервале пассажей.

В МСК разного возраста проявляется описанное нами ранее снижение внутриклеточного содержания калия по мере нарастания плотности культуры одного посева (Шатрова и др., 2018). Однако зависимое от плотности снижение содержания калия в клетках культур поздних

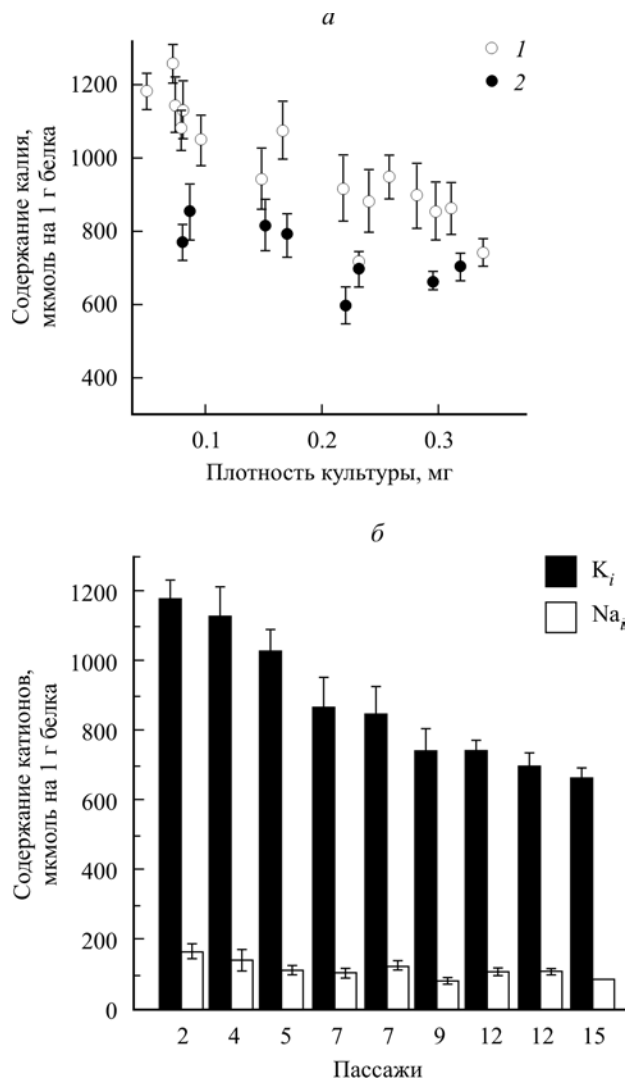


Рис. 1. Внутриклеточное содержание калия и натрия и возраст культивируемых МСК человека.

*а* — удельное внутриклеточное содержание калия в растущих культурах ранних (1) и поздних (2) пассажей; *б* — удельное внутриклеточное содержание калия (K<sub>i</sub>) и натрия (Na<sub>i</sub>) в МСК разных пассажей. Плотность указана в мг клеточного белка на 1 чашку 35 мм. Приведены средние значения и средние квадратичные отклонения из 8 экспериментов, выполненных по одной схеме.

пассажей оказалось меньше, чем в клетках растущих культур ранних пассажей. На рис. 2 приведены данные экспериментов, в которых сравнивали удельное содержание калия в культурах одного пассажа с разными плотностями —  $2.5 \cdot 10^3$  и  $1.0 \cdot 10^3$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ . Оказалось, что в конфлюэнтных культурах, взятых в эксперимент на 4-м пассаже после разморозки клона, внутриклеточное содержание калия снижается на 12 % от его содержания в культурах на экспоненциальной стадии роста, тогда как при культивировании клеток 12-го пассажа это снижение составляет не более 4—5 %. Это наблюдение указывает на то, что в «старых» МСК человека ослабляется зависимость внутриклеточного содержания калия от плотности культуры.

Изменение уровня пролиферации и ионные показатели в МСК разных пассажей. Ранее мы показали, что изменения транспорта калия в МСК человека, наблюдаемые в процессе роста культуры од-

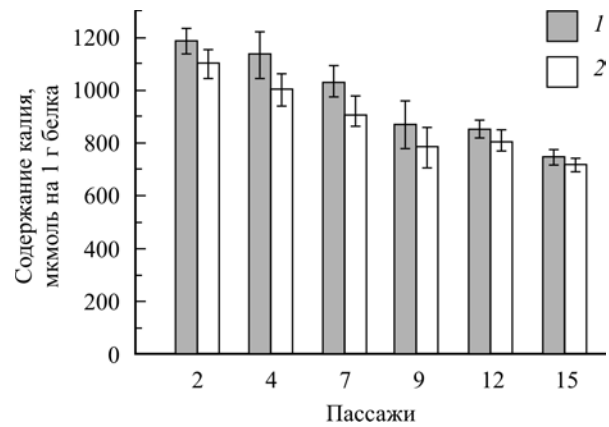


Рис. 2. Утрата зависимости внутриклеточного содержания калия от плотности культуры с увеличением возраста МСК человека.

Представлены значения удельного внутриклеточного содержания калия в редких (1 —  $1.1 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>), и плотных (2 —  $2.8 \cdot 10^3$  кл./см<sup>2</sup>) культурах разных пассажей. Приведены средние значения и средние квадратичные отклонения из 3 экспериментов, выполненных по одной схеме.

ного пассажа, коррелируют с изменением уровня пролиферации клеточной культуры (Шатрова и др., 2018). Мы предположили, что изменения удельного внутриклеточного содержания калия у МСК разного возраста также отражают изменения пролиферативной активности клеточной культуры, и провели цитометрический анализ МСК разных пассажей.

Как показывают данные, приведенные на рис. 3, в растущих культурах ранних пассажей (2—4-й) до 45 % клеток в популяции составляют клетки, пребывающие в фазах S, G<sub>2</sub> и M клеточного цикла, тогда как в культурах поздних пассажей (после 10—12-го) до 90 % клеток в популяции находились в фазе G<sub>1</sub>. Из этих данных можно сделать вывод о том, что связанное с длительностью поддержания МСК в культуре снижение внутриклеточного содержания калия отражает изменение профиля клеточного цикла и коррелирует со снижением пролиферативного статуса стволовых клеток.

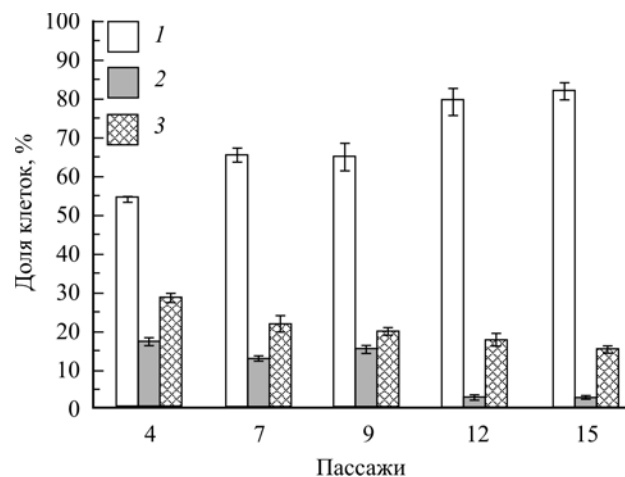


Рис. 3. Изменение распределения клеток по фазам клеточного цикла в растущих культурах МСК разных пассажей.

Данные цитофлуориметрического анализа. Приведены средние значения и их ошибки из 3 экспериментов, выполненных по одной схеме.

## Обсуждение

Нами выявлены изменения внутриклеточного содержания и входных потоков калия при культивировании МСК человека в оптимальных условиях. Показано, что в процессе роста культур МСК одного и того же посева содержание калия в расчете на клеточный белок и ингибируемый убабином входной поток калия снижаются, тогда как содержание натрия практически не изменяется (Шатрова и др., 2018). Впервые описаны изменения ионного гомеостаза в МСК, связанные с особенностями пересева монослойных клеточных культур и медленным ростом этих культур в первые сутки их развития вследствие сниженного содержания калия в клетках (Шатрова и др., 2018). Наконец, выявлены изменения транспорта калия, сопряженные с возрастом МСК человека: в культурах ранних пассажей внутриклеточное содержание калия выше, чем в культурах поздних пассажей. Установлено, что снижение внутриклеточного содержания калия в культурах МСК разной плотности и разного возраста коррелирует с накоплением клеток в фазе  $G_1$  клеточного цикла.

Механизмы, посредством которых моновалентные катионы влияют на скорость пролиферации и на дифференцировку клеток, давно изучаются. Принято считать, что, как и ионы кальция, выполняющие сигнальную роль в разных клеточных процессах, моновалентные ионы могут быть вовлечены в сеть внутриклеточных событий, регистрируемых при передаче сигнала с рецепторов плазматической мембраны на геном (Lang et al., 2005; Orlov, Hamet, 2006; Pedersen, 2006; Klausen et al., 2010).

Наши результаты показывают связь между внутриклеточным содержанием калия и пролиферацией стволовых клеток. Калий — доминирующий катион в цитоплазме большинства животных клеток и, скорее всего, в клеточной реакции на внешние стимулы не выполняет сигнальную функцию. Калий является необходимым элементом системы жизнеобеспечения клетки (housekeeping), принимая участие в создании разности электрических потенциалов на клеточной мембране, а также в транспорте воды и трансмембранном переносе ионов через ионные каналы и системы сопряженного ионного транспорта. Показано, что снижение содержания внутриклеточного калия, вызванное блокированием  $Na,K$ -насоса или понижением концентрации калия во внеклеточной среде, замедляет размножение клеток, останавливая клетки в фазе  $G_1$  клеточного цикла (Frantz et al., 1980; Lopez-Rivas et al., 1982; Dornand et al., 1986). Выключение специфическими ингибиторами калиевых каналов или  $Na^+,K^+$ -насоса препятствует бласттрансформации и запуску пролиферативного ответа, индуцированного митогенами или антителами в нормальных Т-лимфоцитах человека (Brodie et al., 1995; Wonderlin, Strobl, 1996; Charshiani et al., 2000; Karitskaya et al., 2010). Вопрос о роли внутриклеточного калия вновь поднимается в связи с возможностью его участия в регуляции процессов, связанных с пролиферацией и дифференцировкой эмбриональных стволовых клеток (Lin et al., 2017).

Ранее на культурах клеток постоянных линий было показано, что при снижении внутриклеточного содержания калия до некоторого «порогового» значения (около 500 мкмоль на 1 г белка) тормозится внутриклеточный синтез белка и останавливается пролиферация клеток в культуре (Tupper et al., 1977; Frantz et al., 1980; Lopez-Rivas et al., 1982). Наблюдаемый эффект ионов калия связы-

вают с тем, что только ионы калия (но не рубидия или других одновалентных ионов) необходимы для синтеза белка в животной клетке и поддержания их жизнеспособности (Ledbetter, Lubin, 1977).

В растущих культурах МСК человека мы регистрируем изменения внутриклеточного содержания калия в диапазоне от 1000 до 700—600 мкмоль на 1 г белка, который выше физиологического уровня внутриклеточного содержания калия для выживания клеток. Сходные изменения были обнаружены ранее в растущих культурах трансформированных клеток разного происхождения (Марахова и др., 1985а, 1985б; Трошин и др., 1985). Возрастание содержания калия в расчете на клеточный белок обнаружено у нормальных Т-лимфоцитов человека, активированных фитогемагглютинином и совершающих переход из состояния покоя к синтезу ДНК и делению (Веренинов и др., 1991; Marakhova et al., 1995, 1999). Анализируя изменения содержания калия, сопровождающие запуск или торможение клеточной пролиферации, мы предположили, что эти изменения могут отражать участие ионов калия в регуляции объема пролиферирующей клетки.

Известно, что в переходный период из состояния покоя к пролиферации и также в процессе продвижения в клеточном цикле объем клетки увеличивается, так что в нормальных физиологических условиях рост внутриклеточной массы предшествует синтезу ДНК (Pardee et al., 1978). В литературе имеются данные о том, что экспериментально вызванные изменения объема клеток (увеличение или уменьшение) тормозят пролиферацию клеточной культуры (Anbari, Schultz, 1993; Dubois, Rouzair-Dubois, 2004; Stutzin, Hoffmann, 2006). Показано также, что клеточный цикл замедляется в условиях осмотического «сжатия» клеток (Lang et al., 2000, 2007).

Клетки животных содержат крупные, не проникающие через плазматическую мембрану анионы (белки, нуклеиновые кислоты и т. д.), вследствие чего возникают нестабильное состояние и угроза клеточного лизиса из-за осмотически обусловленного поступления воды из внеклеточной среды. Клетки животных решают эту проблему с помощью двойной Доннановской системы: 1) «нежелательный» вход в клетку воды предотвращается с помощью ионного насоса, который за счет энергии АТФ «выкачивает» из клетки натрий; 2) функционируют системы сопряженного транспорта моновалентных ионов (калия, натрия и хлора), проникающих через мембрану, которые также участвуют в регуляции поступления воды в клетку (Tosteson, Hoffman, 1960; Hoffman et al., 2009; Hoffmann, Pedersen, 2011).

Во время клеточного цикла количество отрицательно заряженного, осмотически активного вещества в клетке возрастает (почти удваивается), что должно вызывать вход в клетку не только воды, но и положительно заряженных ионов калия (Веренинов et al., 2007; Yurinskaya et al., 2011). В пользу такого предположения свидетельствуют данные, полученные при исследовании митогенной активации Т-лимфоцитов человека. Показано, что в течение длительного пререпликативного периода у активированных лимфоцитов человека содержание калия и входные потоки калия нарастают одновременно с ростом активированных Т-клеток и превращением их в крупные бласты (Веренинов и др., 1991; Marakhova et al., 1995; Karytskaya et al., 2010). Интересно заметить, что в ряду изученных клеток (покоящиеся и активированные Т-клетки, трансформированные клетки постоянных линий, стволовые клетки человека) наибольшее удельное содержание

калия в расчете на белок обнаруживается в пролиферирующих стволовых клетках. Данные из литературы о постоянстве внутриклеточной концентрации калия (или содержания калия в расчете на содержание воды в клетке) во время клеточного цикла (Klausen et al., 2010) позволяют предположить, что в циклирующей клетке содержание воды по отношению к массе белка должно быть больше, чем в покоящейся или дифференцированной клетке. В таком случае повышенное удельное содержание калия в расчете на клеточный белок, характерное для клеточных культур с высоким уровнем пролиферации, указывает на высокое содержание воды в пролиферирующих клетках (обводненность). Для подтверждения этого предположения проводятся исследования, направленные на одновременные количественные оценки содержания в клетках воды и калия, а также объема пролиферирующих клеток.

В настоящее время очевидно, что внутриклеточные ионы принимают участие в регуляции клеточной пролиферации, но разные ионы используют для этого разные механизмы. Кроме общепризнанной сигнальной роли, которая хорошо известна для ионов кальция и показана для ионов натрия и хлора, одновалентные ионы могут участвовать в регуляции объема при переходе клеток из состояния покоя к пролиферации или во время клеточного цикла, а также при трансформации клеток. В нашей работе выявлены изменения внутриклеточного содержания калия, сопровождающие рост и пролиферацию МСК человека. Этот вывод перекликается с тем, который сделан в одной из последних работ, посвященных исследованию транспорта калия при изменении уровня плюрипотентности стволовых клеток человека (Lin et al., 2017). Применяя метод рентгеновской спектроскопии и панель плюрипотентных стволовых клеток человека, авторы нашли, что среди других элементов плюрипотентные и неплюрипотентные клетки различаются по содержанию калия, и сделали вывод о том, что внутриклеточный калий может быть полезным инструментом при работах, включающих в себя изменение статуса плюрипотентности. В совокупности полученные нами данные свидетельствуют о том, что калий как главный внутриклеточный проникающий катион может вовлекаться в процессы пролиферации, принимая участие в регуляции объема клетки и содержания в ней воды. Высокое удельное внутриклеточное содержание калия в расчете на клеточный белок является признаком высокого уровня пролиферации клеточной культуры и может служить маркером функционального статуса стволовых клеток, используемых для доклинических испытаний.

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 бласттрансформации лимфоцитов периферической крови челове-

ка, активированных ФГА. Цитология. 33 (11): 78—93. (Vereninov A. A., Gusev E. V., Kazakova O. M., Klimenko E. E., 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., Artzybasheva 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. 1985б. 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.)

Шатрова А. Н., Виноградова Т. А., Домнина А. П., Земелько В. И., Пуговкина Н. А., Никольский Н. Н., Марахова И. И. 2018. Ионный гомеостаз культивируемых мезенхимных стволовых клеток человека. I. Изменения внутриклеточного содержания калия и натрия и потоков калия, связанные с плотностью клеточной культуры. Цитология. 60 (12): 969—975. (Shatrova A. N., Vinogradova T. A., Domnina A. P., Zemelko V. I., Pugovkina N. A., Nikolsky N. N., Marakhova I. I. 2018. 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. Tsitologiya. 60 (12): 969—975.)

Алексеенко Л. Л., Земелько В. И., Домнина В. П., Lyublinkskaya O. G., Zenin V. V., Pugovkina N. A., Kozukharova I. V., Borodkina A. V., Grinchuk T. M., Frydlyanskaya I. I., Nikolsky N. N. 2014. Sublethal heat shock induces premature senescence. Cell Stress Chaperons. 19: 355—366.

Brodie C., Tordai A., Saloga J., Domenico J., Gelfand E. W. 1995. Ouabain induces inhibition of the progression phase in human T-cell proliferation. J. Cell. Physiol. 165: 246—253.

Charshiani S., Wulff H., Miller M. J., Rohm H., Neben A., Gutman G. A., Cahalan M. D., Chand K. G. 2000. Up-regulation of

the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J. Biol. Chem.* 275 : 37 137—37 149.

Dornand J., Favero J., Bonnafous J. C., Mani J. 1986. Mechanism whereby ouabain inhibits human T lymphocyte activation: effect on the interleukin-2 pathway. *Immunobiology.* 171 : 436—450.

Duran C., Thompson C. H., Xiao Q., Hartzell H. C. 2010. Chloride channels: often enigmatic, rarely edictable. *Annu. Rev. Physiol.* 72 : 95—121.

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. I., Alekseenko L. L., Nikolsky N. 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.

Hoffmann E. K., Lambe I. H., Pedersen S. F. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* 89 : 193—277.

Hoffmann E. K., Pedersen S. F. 2011. Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways. *Acta Physiol.* 202 : 465—485.

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.

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., Föller M., Lang K. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* 205 : 147—157.

Lang F., Föller M., Lang K., Lang P., Ritter M., Vereninov A., Szabo I., Hube S. M., Gulbins E. 2007. Cell volume regulatory ion channels in cell proliferation and cell death. *Meth. Enzymol.* 428 : 209—225.

Lang F., Ritter M., Gamper N., Huber S., Fillon S., Tanneur V., Lepple-Wienhues A., Szabo I., Gulbins E. 2000. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell. Physiol. Biochem.* 10 : 417—428.

Ledbetter M. L., Lubin M. 1977. Control of protein synthesis in human fibroblasts by intracellular potassium. *Exp. Cell Res.* 105 : 223—236.

Lin V. J. T., Zolekar A., Shi Y., Konerul B., Dimitrijevic S., Di Pasqua A. J., Wang Y.-C. 2017. Potassium as a pluripotency-associated element identified through organic element profiling in human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 7 : 5005.

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 blasttransformation 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<sup>+</sup> influxes during the initiation of phytohemagglutinin-induced proliferation. *Biochim. biophys. acta.* 1368 : 61—72.

Noh H. V., Ahn Y. J., Lee W. J., Kwack K., Do Kwon Y. 2010. The molecular signature of in vitro senescence in human mesenchymal stem cells. *Genes Genomic.* 32 : 87—93.

Orlov S. N., Hamet P. 2006. Intracellular monovalent ions as second messengers. *J. Membr. Biol.* 210 : 161—172.

Pardee A. B., Dubrow R., Hamlin J. L., Kletzien R. F. 1978. Animal cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 47 : 715—750.

Pedersen S. F. 2006. The Na/H exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death. *Pflugers Arch.* 452 : 249—259.

Stutzin A., Hoffmann E. K. 2006. Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis. *Acta Physiol. (Oxford).* 187 : 27—42.

Tosteson D. C., Hoffman J. F. 1960. Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.* 44 : 169—194.

Tupper J. T., Zorogniotti 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.

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.

Wonderlin W. F., Strobl J. S. 1996. Potassium channels, proliferation and G<sub>1</sub> progression. *J. Membr. Biol.* 154 : 91—107.

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

Поступила 12 VII 2018

## ION HOMEOSTASIS DURING THE GROWTH OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CULTURE. II. AGE-RELATED CHANGES IN CELL K<sup>+</sup> CONTENT

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

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;  
\* e-mail: iim@incrus.ru

Ion homeostasis as determined by intracellular K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> contents has been examined in long-term cultures of human mesenchymal stem cells (MSCs). The intracellular K<sup>+</sup> content was found to be dependent on the age of cultivated MSCs, namely, in the early-passaged MSCs (at 2<sup>nd</sup>—4<sup>th</sup> passages), K<sup>+</sup> content per 1 g cell protein was by almost 40 % higher than in late-passaged (12<sup>th</sup>—15<sup>th</sup> passages) cells. Under the same conditions, cell Na<sup>+</sup> content per 1 g cell protein was unchanged being independent on the MSCs culture age. In late-passaged MSCs cultures the decline in K<sup>+</sup> content per g cell protein was correlated with the accumulation of G<sub>1</sub> cells in the population. Based on the data on monovalent ion transport in permanent cell lines of different origin, hu-

man stem cells as well as in activated human lymphocytes, the mechanism of potassium ions participation in cell proliferation has been discussed. It is assumed that changes in cell  $K^+$  content per 1 g cell protein which accompany the onset or inhibition of cell proliferation are related to the  $K^+$  involvement in cell volume regulation. The high intracellular  $K^+$  content is important for successful hMSCs proliferation and cell  $K^+$  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,  $Na^+,K^+$  pump, proliferation, human mesenchymal stem cells

---