

## ИОННЫЙ ГОМЕОСТАЗ И СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЕ СТАРЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. Н. Шатрова<sup>1</sup>, А. П. Домнина<sup>1</sup>, Н. А. Пуговкина<sup>1</sup>, И. И. Марахова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: iim@incras.ru

Поступила в редакцию 15.03.2022 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принята к публикации 15.04.2022 г.

В работе охарактеризованы связанные с преждевременным старением изменения ионного гомеостаза в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках (эмСК) человека. Методом пламенной фотометрии исследованы изменения внутриклеточного содержания калия и натрия и потоков калия через плазматическую мембрану и установлено, что в процессе индуцированной окислительным стрессом остановки клеточного цикла и развития преждевременного старения эмСК сохраняют высокий ионный гетерогенитет, характерный для функционально активных клеток животных. Преждевременное старение клеток сопровождается возрастанием внутриклеточного содержания натрия и трансмембранных потоков калия, сопряженных с функционированием Na/K-насоса, но не сказывается на пассивном транспорте калия через плазматическую мембрану. Отличительной особенностью стресс-индуцированных остановленных эмСК является сниженное удельное внутриклеточное содержание калия (500–600 мкмоль на 1 г белка) по сравнению с пролиферирующими эмСК (800–900 мкмоль на 1 г белка). Высказывается предположение, что связанное с развитием преждевременного старения снижение внутриклеточного содержания калия отражает участие ионов калия в регуляции объема клеток и может свидетельствовать о снижении гидратации стареющих эмСК.

**Ключевые слова:** внутриклеточное содержание калия, входные потоки калия, Na/K насос, окислительный стресс, преждевременное старение, эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека

**DOI:** 10.31857/S0041377122040101

Общепризнано, что моновалентные ионы участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки, а также гибели клеток, однако механизмы их участия в этих важных клеточных процессах изучены недостаточно. Ионные каналы и ионные транспортеры плазматической мембраны вовлечены в систему внутриклеточной сигнализации, и такие ионы как калий, натрий, хлор важны для поддержания мембранного потенциала и внутриклеточных концентраций кальция и водорода (pH). Показано, например, что изменение концентрации натрия в клетке контролирует скорость клеточного цикла посредством изменений внутриклеточного pH, что, в свою очередь, влияет на экспрессию циклина B1 и активность cdk2 (Putney, Barber, 2003; Darborg et al., 2007; Pedersen et al., 2007). Предполагается, что внутриклеточный хлор участвует в гиперполяризации плазматической мембраны, которая сопровождает пререпликативную фазу и переход G<sub>1</sub>/S в клеточном

цикле (Klausen et al., 2010). Наряду с сигнальной функцией, моновалентные ионы играют важную роль в регуляции объема клетки (Tosteson, Hoffman, 1960; Hoffman et al., 2009; Hoffmann, Pedersen, 2011). Движение ионов через плазматическую мембрану и связанные с ним потоки воды и изменения клеточного объема рассматриваются в качестве важного фактора в регуляции клеточного цикла (Lang et al., 1998, 2005, 2006).

При исследовании трансформированных клеток различного происхождения, а также мезенхимных стволовых клеток человека нами были выявлены изменения внутриклеточного содержания калия, связанные с замедлением пролиферации клеток и приуроченные к фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла (Марахова и др., 1985а, 1985б; Marakhova et al., 2019а). Последующий анализ связанных с пролиферацией изменений содержания калия в активированных лимфоцитах человека позволил нам предположить, что калий, являясь основным ионом, который участвует в регуляции содержания воды в клетках, вовлечен в процессы, контролируемые клеточный рост при переходе из состояния покоя (quiescence) к пролиферации (Веренинов и др., 1991; Marakhova et al., 2019б).

**Принятые сокращения:** эмСК – эндометриальные мезенхимные стволовые клетки; K<sub>v</sub>/Na<sub>v</sub> – отношение содержания калия к содержанию натрия в клетке; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор.

В последние годы ионные транспортеры, в частности Na/K насос, предлагаются в качестве терапевтических мишеней преждевременного клеточного старения. Преждевременное старение (senescence) клеток определяется как необратимая остановка клеточного цикла в ответ на различные внешние и внутренние воздействия (Fridlyanskaya et al., 2015; Hernandez-Segura et al., 2018; Davan-Wetton et al., 2021). Преждевременное старение играет физиологическую роль при нормальном развитии клеток, оно лежит в основе старения стволовых клеток, а также предлагается в качестве механизма подавления злокачественного роста (Ermolaeva et al., 2018; Rhinn et al., 2019; Wang et al., 2020). Такие маркеры старения как повреждение ДНК, повышенная экспрессия ингибиторов клеточного цикла (p53, p16, p21), а также фенотипические изменения, включая метаболическое репрограммирование и изменения хроматина, используются для идентификации стареющих клеток, хотя и не являются универсальными. Несмотря на глубокие изменения в клеточном метаболизме, нарушении синтеза белка, изменения физиологии митохондрий и лизосом, стареющие клетки длительное время остаются жизнеспособными.

Неизвестно, участвуют ли моновалентные ионы, которые являются важными регуляторами клеточного гомеостаза, в развитии преждевременного старения и поддержании жизнеспособности стареющих клеток. Показано, что стареющие клетки имеют более высокую концентрацию кальция по сравнению с нормальными циклирующими клетками (Fine et al., 2013; Yu et al., 2013). Имеются данные, свидетельствующие об активации Na/H<sup>+</sup>-обменника во время индуцированной стрессом остановки пролиферации (Pedersen, 2006). С помощью флуоресцентных зондов обнаружено повышенное содержание калия, натрия, кальция в стареющих фибробластах легкого человека IMR90 по сравнению с нормальными фибробластами (Gueghe et al., 2019). Количественный анализ содержания калия и натрия в клетках во время старения не проводился.

В настоящей работе мы исследовали изменения ионного гомеостаза эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эМСК) человека во время развития преждевременного старения, вызванного сублетальным окислительным стрессом. Используя метод пламенной фотометрии для оценки как содержания калия и натрия в клетках, так и трансмембранных потоков калия, мы обнаружили специфические изменения внутриклеточного содержания калия во время индуцированного стрессом старения эМСК человека.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки, их культивирование и обработка.** В работе использовали мезенхимные стволовые клетки, полученные из эндометрия здорового донора (Земелько и др., 2011). Клетки культивировали в среде

DMEM/F12 (Gibco), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C, во флаконах 25 см<sup>2</sup>. Для экспериментов клетки рассеивали на чашки диаметром 35 мм по 10–15 тыс. клеток на 1 см<sup>2</sup>. В работе использовали клетки 2–15-ого пассажей.

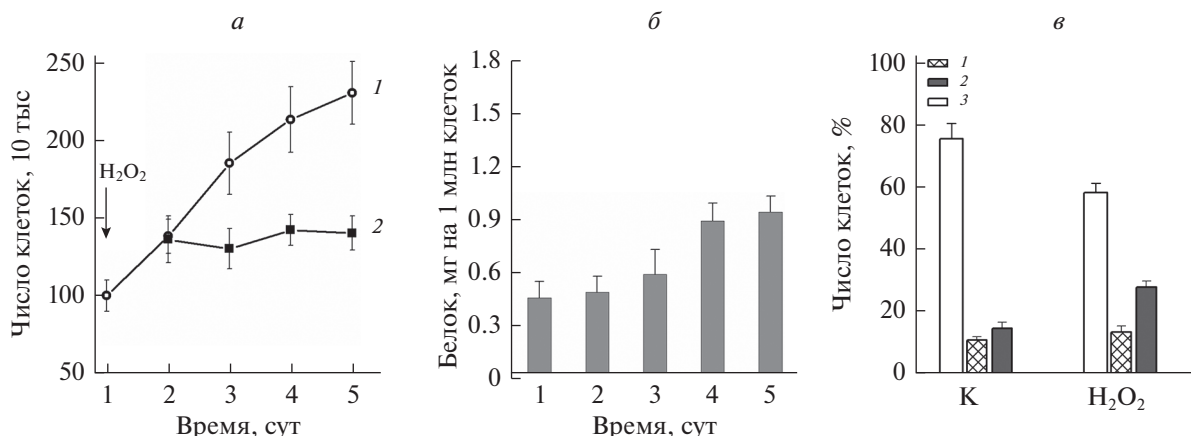
Преждевременное старение клеток индуцировали с помощью окислительного стресса по методике, предложенной ранее (Vugova et al., 2013). Окислительный стресс вызывали добавлением в среду культивирования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (конечная концентрация 200 мкМ) на 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После обработки клетки промывали 2 раза раствором PBS и далее культивировали в свежей ростовой среде, проводя ее смену на свежую через 2–3 сут.

**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 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<sub>2</sub> (85 мМ), не ресуспендируя, и заливали 5%-ой трихлоруксусной кислотой (1 мл). 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.

**Проточная цитофлуориметрия.** Для флуориметрического анализа клетки дважды промывали PBS и переводили в суспензию путем трипсинизации, после чего осаждали центрифугированием и суспендировали в PBS. Подготовленные далее по соответствующему протоколу образцы анализировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX или CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

Для определения жизнеспособности клеток использовали окрашивание йодидом пропидия (PI). Непосредственно перед анализом к каждому образцу добавляли PI (50 мкг/мл). Полученные двумерные цитограммы (или диаграммы) (соответствующие точечные графики) позволяли различать PI-отрицательные живые клетки и PI-положительных погибших клеток.

Для анализа клеточного цикла каждый образец клеток суспендировали в 300 мкл PBS среды, содержащей 200 мкг/мл сапонина (Fluka, США), 250 мкг/мл РНКа-зы А (Sigma-Aldrich, США) и 50 мкг/мл PI, инкуби-



**Рис. 1.** Окислительный стресс останавливает рост культур эмСК человека. Клетки стимулировали добавлением  $H_2O_2$  на 1 ч, затем отмывали и измеряли их ростовые характеристики. *a* – Рост численности клеток, *б* – изменение удельного содержания массы белка в клетке в процессе культивирования пролиферирующих (кривая 1) и подвергнутых окислительному стрессу (кривая 2) эмСК; *в* – доля клеток (%) в культуре, находящихся в фазах  $G_0/G_1$  (1), S (2) и  $G_2/M$  (3), на 5-е сут после стресса. К – контрольные клетки, необработанные  $H_2O_2$ . Приведены средние значения и их ошибки из 4–6 независимых серий экспериментов, проведенных по одной схеме; отличия от К достоверны при  $P < 0.05$ .

ровали от 30 до 60 мин при комнатной температуре в темноте.

Для оценки изменения размера клеток, которое сопровождает преждевременное клеточное старение, отслеживали сигнал прямого светорассеяния (FS). Для обнаружения накопления липофусцина образцы анализировали на аутофлуоресценцию (АФ, лазер 488 нм). Краситель тетраметилродамин (TMRM; Invitrogen, США) использовали в качестве индикатора потенциала митохондриальной мембраны (Scaduto, Grottyohann, 1999; Creed, McKenzie, 2019). Для приготовления окрашивающего раствора 1-кратный (100 нМ) исходный раствор TMRM (100 мкМ) разбавляли в 1000 раз питательной средой, которую добавляли к клеткам.

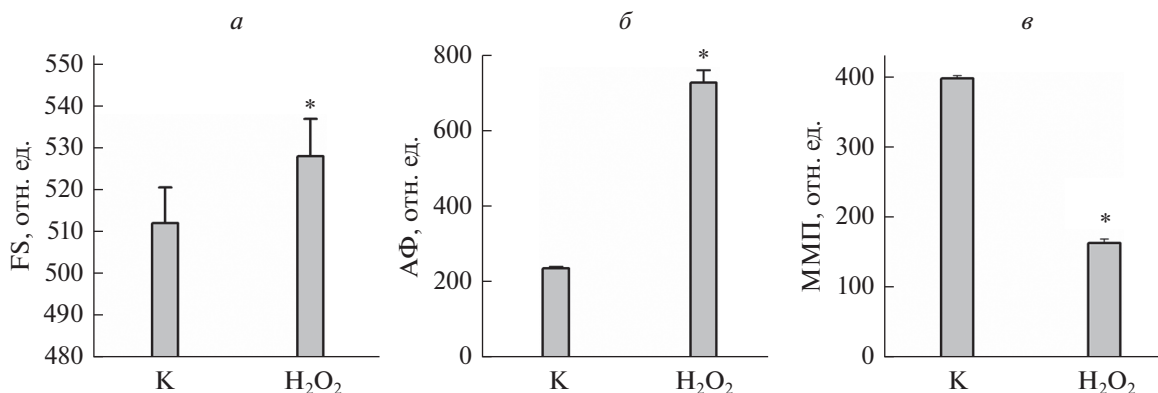
В работе использовали убаин, сапонин, РНКазу, PI (Sigma, США), а также реактивы отечественного производства квалификации “х. ч.” или “ос. ч.”.

**Статистическая обработка данных.** Использовали программу Microsoft Excell (Microsoft Corporation, США). Статистическую значимость оценивали с помощью либо критерия ANOVA-Тьюки в случае множественных сравнений, либо *t*-критерия Стьюдента в случае парных сравнений. Данные представлены в виде средних значений и их ошибок из 3–8 независимых серий экспериментов (*n*): суммировали средние значения из трех измерений в каждом эксперименте.

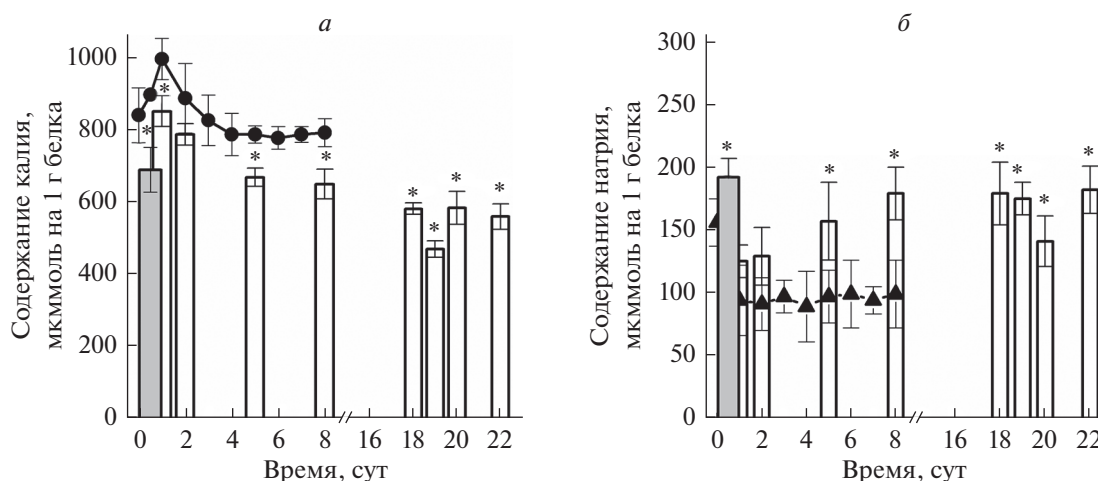
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Сублетальная доза  $H_2O_2$  индуцирует преждевременное старение в эмСК.** Ранее было показано, что сублетальный окислительный стресс вызывает необратимую остановку клеточного цикла эмСК, кото-

рая сопровождается такими характерными признаками преждевременного старения, как гипертрофия клеток, усиленное окрашивание клеточной  $\beta$ -галактозидазы, повышенная экспрессия супрессоров клеточного цикла p53, p21, повреждение ДНК (Burova et al., 2013; Borodkina et al., 2016). В настоящем исследовании культуры эмСК человека, которые были обработаны перекисью водорода (200 мкМ  $H_2O_2$ , 1 ч), на 3-и сут прекращали рост, останавливаясь в фазах  $G_2$  и M клеточного цикла (рис. 1*a, в*). К этому времени увеличивался размер клеток, о чем свидетельствовало как повышение прямого светорассеяния клеток, так и возрастание содержания белка в каждой отдельной клетке (рис. 2*a* и рис. 1*б*). В остановленных культурах эмСК отмечали повышение аутофлуоресценции, обусловленное накоплением в клетках липофусцина, что является общепризнанным маркером клеточного старения (рис. 2*б*) (Bertolo et al., 2019; Shatrova et al., 2021). У клеток, обработанных  $H_2O_2$ , мембранный потенциал митохондрий был снижен, о чем свидетельствовало возрастание флуоресценции тетраметилродамина (рис. 2*в*) (Creed, McKenzie, 2019). Важно, что после обработки сублетальной дозой  $H_2O_2$  эмСК сохраняли высокую жизнеспособность. По данным проточной цитометрии на 5-е сут после окислительного стресса количество жизнеспособных (неокрашенным йодистым пропидием) клеток в остановленной культуре составляло  $91 \pm 7\%$  ( $n = 3$ ), тогда как в растущей пролиферирующей культуре эмСК оно составляло  $96 \pm 5\%$  ( $n = 3$ ). Совокупность полученных данных позволила далее использовать эмСК человека, обработанные сублетальной дозой  $H_2O_2$ , в качестве модели для изучения изменений ионного гомеостаза при развитии преждевременного клеточного старения.



**Рис. 2.** Показатели ЭМСК человека, индуцированных окислительным стрессом (действие  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 ч). *а* – Прямое светорассеяние (FS), *б* – автофлуоресценция (АФ), *в* – митохондриальный мембранный потенциал (ММП). Приведены средние значения и их ошибки из 3-х экспериментов, проведенных по одной схеме; различия по сравнению с контролем (К) считали достоверными при  $*P < 0.005$ .



**Рис. 3.** Изменение внутриклеточного содержания калия и натрия в ЭМСК по ходу их преждевременного старения, индуцированного окислительным стрессом. По горизонтали – время культивирования, сут. *а* – Внутриклеточное содержание калия в растущих (кружки) и остановленных (светлые столбики) ЭМСК; *б* – внутриклеточное содержание натрия в растущих (треугольники) и остановленных (светлые столбики) ЭМСК. Темные столбики – содержание калия (*а*) и натрия (*б*) после обработки клеток  $\text{H}_2\text{O}_2$  в течение 1 ч. Приведены средние значения и их ошибки ( $n = 3$ ) из 4–8 экспериментов, проведенных по одной схеме. Достоверность различий между стресс-индуцированными и пролиферирующими клетками рассчитывали с использованием теста Тьюки,  $*P < 0.05$ .

### Изменение внутриклеточного содержания калия и натрия в процессе преждевременного старения ЭМСК.

Короткий кратковременный окислительный стресс ( $200 \mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2$ , 1 ч) вызывает снижение содержания калия и увеличивает содержание натрия в пролиферирующих ЭМСК (рис. 3, темные столбики). В результате реципрокного изменения содержания калия и натрия в клетках, обработанных  $\text{H}_2\text{O}_2$ , отношение содержания этих катионов ( $K_{\text{в}}/Na_{\text{в}}$ ) снижается с 7–8 до 3–3.5, что свидетельствует о нарушении ионного гомеостаза, характерного для клеток животных. После замены среды на свежую, не содержащую  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ионные градиенты постепенно восстанавливаются.

В течение первых 2-х сут после окислительного стресса культуры ЭМСК, находящиеся в полноценной питательной среде, продолжают расти, хотя и медленнее, чем пролиферирующие культуры, не подвергавшиеся стрессу, но к 3-м сут они прекращают пролиферировать и останавливаются, накапливаясь в фазах  $G_2/M$  и  $S$  клеточного цикла (рис. 1*а, в*). В течение этого времени содержание калия снижается как в пролиферирующих, так и в стресс-индуцированных клетках (рис. 3*а*). Такое изменение содержания калия отражает общую закономерность, обусловленную тем, что независимо от типа клеток возрастание плотности культуры и снижение ее пролиферативной активности приводит к снижению внут-

рикеточного содержания калия (Марахова и др., 1985а, 1985б; Marakhova et al., 2019a). Далее, в стресс-индуцированных клетках содержание калия достигает постоянного уровня, который ниже ( $652 \pm 41$  мкмоль на 1 г белка), чем в пролиферирующих культурах эМСК ( $795 \pm 39$  мкмоль на 1 г белка) (рис. 3а).

Важно отметить, что в наших исследованиях для оценки внутриклеточного содержания катионов измеряемое количество катионов нормировали на массу клеточного белка, определяемого в той же пробе. В клеточной биологии такая оценка изменений содержания внутриклеточных ионов широко используется. Действительно, существуют значительные трудности в оценке внутриклеточных концентраций ионов (когда содержание ионов рассчитывается на содержание воды в клетке) из-за отсутствия надежных методов оценки объемов клеток в асинхронно растущих культурах. Наиболее адекватный метод оценки содержания воды в нативных клетках – измерение плавучей плотности клеток – успешно используется при исследовании клеток, культивируемых в суспензии, но неприменим для клеток, растущих в монослое. Следует заметить, что предпринимаются попытки оценки ионных и других физиологических параметров у клеток в монослойных культурах после их снятия с субстрата, на котором прикрепляются и функционируют клетки.

Наш опыт показал, что клетки, кратковременно обработанные трипсином (0.05%) для отделения их от адгезионной поверхности, сохраняют нормальное, высокое содержание калия ( $624 \pm 28$  мкмоль на 1 г белка), но имеют повышенное содержание натрия ( $663 \pm 23$  мкмоль на 1 г белка) и близкое к 1 отношение внутриклеточных катионов  $K_b/Na_b$ . Выяснилось также, что  $K_b/Na_b$  сохраняется низким, если клетки отмыть от трипсин-содержащей среды в свежей среде и далее подержать в суспензии 3 ч (более длительные наблюдения не проводили). Примечательно, что только после прикрепления к адгезивной поверхности в клетках постепенно восстанавливается низкое содержание натрия ( $108 \pm 9$  мкмоль на 1 г белка) и высокое отношение  $K_b/Na_b$ . На основании этих данных мы полагаем, что пламенно-эмиссионный метод измерения внутриклеточного содержания ионов является наиболее адекватным для изучения ионного гомеостаза клеток в монослойных культурах (Веренинов, Марахова, 1986). Метод позволяет определять как внутриклеточное содержание катионов в клетках, так и трансмембранные потоки ионов, используя ионы-аналоги (например, рубидий для оценки потоков калия), в монослойных культурах без снятия клеток с субстрата. Важно и то, что нормирование количества ионов на количество белка в каждом образце позволяет получить данные, способствующие пониманию механизма участия ионов (в нашем случае калия) в процессах роста и пролиферации клеток.

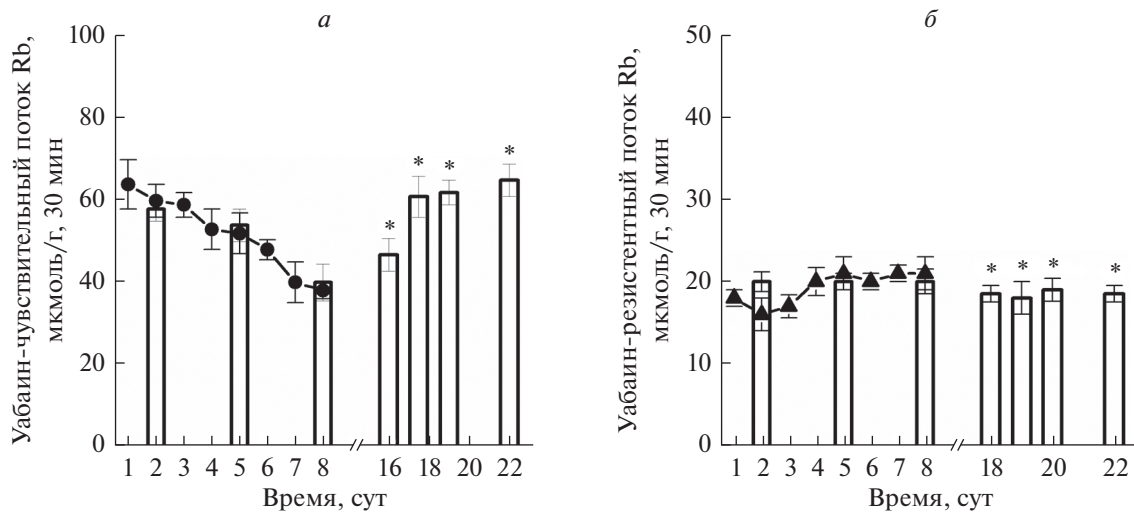
После окислительного стресса эМСК сохраняют жизнеспособность в культуре в течение длительного времени. Представлялось важным выяснить, как долго стареющие клетки способны поддерживать нормальные ионные градиенты. Как видно на рис. 3а, при длительном культивировании (до 22 сут) в стареющих эМСК содержание калия оставалось на постоянном уровне, который соответствовал содержанию калия в “ранних” стареющих клетках.

В течение первых 2-х сут после окислительного стресса внутриклеточное содержание натрия снижалось (рис. 3б, столбики). Однако по ходу культивирования стресс-индуцированных эМСК содержание натрия нарастало, оно увеличивалось от  $120 \pm 10$  до  $160 \pm 19$  мкмоль на 1 г белка, и в “поздних” стареющих эМСК содержание натрия оставалось повышенным. В совокупности, полученные данные свидетельствуют о том, что при длительном культивировании стресс-индуцированные эМСК сохраняют высокое внутриклеточное соотношение  $K_b/Na_b$ , характерное для функционально активных клеток в культуре, но имеют сниженное удельное содержание калия, рассчитанное на клеточный белок.

**Транспорт рубидия (калия) и стресс-индуцированное старение эМСК.** Изменения транспорта калия через плазматическую мембрану по ходу преждевременного старения оценивали, измеряя кратковременный вход рубидия в клетки (Marakhova et al., 1998). В пролиферирующих эМСК ингибируемый убаином поток рубидия, который характеризует перенос калия через  $Na/K$ -насос, составляет более половины общего потока рубидия в клетку. Как и в пролиферирующих культурах эМСК, в первые сутки после окислительного стресса в условиях замедленного роста культуры, ингибируемый убаином поток рубидия снижается (рис. 4а, столбики).

Как было показано ранее, снижение трансмембранных потоков рубидия (калия) в растущей клеточной культуре обусловлено плотным торможением размножения клеток (Marakhova et al., 2019a). В первые сутки после стресса снижение ингибируемого убаином потока рубидия является следствием постепенного замедления роста культуры эМСК. Далее, в процессе старения клеток, поток рубидия начинает нарастать, и на 22-е сут после стресса ингибируемый убаином вход рубидия составляет  $65 \pm 4$  ( $n = 4$ ) против  $40 \pm 4$  мкмоль на 1 г белка за 30 мин ( $n = 6$ ) у клеток в 1-е сут после стресса (рис. 4а, столбики). Наблюдаемое увеличение ингибируемого убаином входа рубидия свидетельствуют о возрастании активности  $Na/K$ -насоса по ходу преждевременного старения.

Для того чтобы выяснить, чем обусловлена высокая активность ионного насоса в стареющих клетках, мы оценили коэффициенты скорости активного переноса ионов, которые рассчитывали как отношение ингибируемого убаином входа рубидия в клетку к внутриклеточному содержанию натрия во время преж-



**Рис. 4.** Изменение убаин-чувствительного (*а*) и убаин-резистентного (*б*) входа рубидия в процессе преждевременного старения ЭМСК, индуцированного окислительным стрессом. *а* – Убаин-чувствительный поток рубидия в растущих (кружки) и остановленных (столбики) ЭМСК; *б* – убаин-резистентный поток рубидия в растущих (треугольники) и остановленных (столбики) культурах ЭМСК. Приведены средние значения и их ошибки из 4–8 экспериментов, проведенных по одной схеме. Достоверность различий между стресс-индуцированными и пролиферирующими клетками рассчитывали с использованием теста Тьюки, \* $P < 0.05$ .

двухфазного старения ЭМСК (Jakobsson et al., 1980; Lew et al., 1986; Vereninov et al., 2008). Оказалось, что коэффициенты скоростей переноса ионов составляют  $0.012\text{--}0.013\text{ мин}^{-1}$  и не различаются для клеток в ранних и поздних стресс-индуцированных культурах ЭМСК. Таким образом, повышение входных потоков рубидия в процессе преждевременного старения ЭМСК не связано с изменением кинетических свойств Na/K-насоса, а является следствием нарастания содержания натрия в стареющих клетках.

В процессе старения, индуцированного окислительным стрессом, не ингибируемый убаином пассивный транспорт рубидия (калия) через плазматическую мембрану не изменяется (рис. 4б).

Сравнительное исследование основных характеристик ионного гомеостаза в процессе индуцированной окислительным стрессом остановки клеточного цикла в ЭМСК человека показало, что стареющие ЭМСК сохраняют высокий ионный гетерогенитет, характерный для функционально активных клеток животных. Развитие преждевременного старения сопровождается возрастанием внутриклеточного содержания натрия и трансмембранных потоков калия, сопряженных с функционированием Na/K-насоса. Индуцированная стрессом остановка клеточного цикла не влияет на пассивный транспорта калия через плазматическую мембрану. Отличительной особенностью стареющих ЭМСК по сравнению с пролиферирующими является сниженное внутриклеточное содержание калия в расчете на массу клеточного белка.

Преждевременное старение клеток связано с остановкой клеточного цикла, и выявляемое в на-

стоящей работе низкое удельное содержание калия в расчете на массу белка в стареющих клетках хорошо согласуется с представлением о том, что снижение этого показателя отражает прекращение клеточной пролиферации (Трошин и др., 1985). Наше недавнее исследование активации лимфоцитов человека показало также, что переход покоящихся клеток к пролиферации сопровождается нарастанием содержания в клетках не только калия, но и воды в расчете на массу клеточного белка (Marakhova et al., 2019b). Такое согласованное изменение содержания в клетках и калия, и воды приводит к тому, что в условиях интенсивного роста лимфоцитов, когда клеточный объем существенно увеличивается, концентрация калия в клетках поддерживается на постоянном уровне. Эти данные позволяют считать, что калий вовлечен в регуляцию пролиферации клеток в качестве того внутриклеточного иона, который, принимая участие в водно-осмотическом балансе клетки, контролирует изменение клеточного объема и способствует сохранению постоянства ионного состава клеток в условиях интенсивного роста при запуске пролиферации клеток или их трансформации.

Принимая во внимание исследования, в которых оценки внутриклеточного содержания калия и воды, а также объема клеток проводились одновременно на суспензионных покоящихся и пролиферирующих клетках (Yurinskaya et al., 2005; Marakhova et al., 2019b) и опираясь на теоретический анализ ионного и водного баланса у животных клеток (Jentsch, 2016; Vereninov et al., 2016; Yurinskaya et al., 2020), мы полагаем, что низкое удельное содержание калия в стресс-индуцированных ЭМСК свидетельствует о сниженном содержании воды в стареющих клетках. Чтобы

проверить данное предположение, необходимо провести надежные измерения изменений объема стареющих клеток в условиях монослойной культуры.

Экспериментальных данных об изменениях гидратации клеток, связанных с пролиферативным статусом клеток, немного. Основываясь на данных о высоком содержании воды в эмбриональных и раковых клетках, повышенная гидратация клеток предложена в качестве важного фактора в поддержании злокачественного роста клеток и канцерогенеза (McIntyre, 2006, 2007). Предполагается, что связь между гидратацией клеток и их пролиферацией может отражать влияние макромолекулярного краудинга на метаболизм клетки и внутриклеточную сигнализацию (Lang et al., 1998; Burg, 2000; Burg et al., 2007; Zhou et al., 2008; Hoffman, Pedersen, 2011; Matsuda et al., 2014; Mourao et al., 2014; Wang et al., 2014; Rana et al., 2020). Данные, которые получены при измерении содержания воды в стареющих эритроцитах, указывают на то, что снижение содержания воды в клетках и макромолекулярный краудинг могут быть общим механизмом клеточного старения (Minton, 2020).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Т.А. Виноградской за измерения ионного состава клеток методом пламенной фотометрии и обсуждение результатов исследования.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием Института цитологии РАН (FMFU-2021-0005).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Веренинов А.А., Виноградова Т.Т., Ивахнюк И.С., Марахова И.И., Торопова Ф.В.* 1982. Применение эмиссионного анализа для исследования транспорта катионов через клеточную мембрану. Цитология. Т. 24. № 1. С. 98. (*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. V. 24. P. 98.)
- 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 человека, активированных ФГА. Цитология. Т. 33. № 11. С. 78. (*Vereninov A.A., Gusev E.V., Kazakova O.M., Klimenko E.E., Marakhova I.I., Osipov V.V., Toropova F.V.* 1991. Transport and distribution of monovalent cations in human peripheral blood lymphocytes activated by phytohemagglutinin. Tsitologiya. V. 33. P. 78.)
- Веренинов А.А., Марахова И.И.* 1986. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л., Наука. (*Vereninov A.A., Marakhova I.I.* 1986. Ion transport in cultured cells. L., Nauka.)
- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак 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. Т. 53. № 12. С. 919. (*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.B.* 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. V. 53. P. 919.)
- 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. Т. 27. № 9. С. 1011. (*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. 1. Potassium and sodium contents and cation fluxes in different lines of Chinese hamster ovary cells. Tsitologiya. V. 29. P. 1011.)
- 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. Т. 27. № 10. С. 1156. (*Marakhova I.I., Salnikov K.V., Vinogradova T.A.* 1985b. Cation transport through plasma membrane related to the cell culture density. 2. Active and passive cation fluxes in growing L-cell cultures. Tsitologiya. V. 27. P. 1156.)
- 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. Т. 282. № 3. С. 1235. (*Troshin A.S., Marakhova I.I., Vereninov A.A., Vinogradova T.A., Efimova E.V., Ignatova T.N., Salnikov K.V.* 1985. Culture density and ion transport through the plasma membrane in transformed cells. Doklady Akademii nauk SSSR. V. 282. P. 1235.)
- Bertolo A., Baur M., Guerrero J., Pötzel T., Stoyanov J.* 2019. Autofluorescence is a reliable in vitro marker of cellular senescence in human mesenchymal stromal cells. Sci. Rep. V. 9. P. 2074.
- Borodkina A.V., Shatrova A.N., Deryabin P.I., Griukova A.A., Abushik P.A., Antonov S.M., Nikolsky N.N., Burova E.B.* 2016. Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. Aging. V. 12. P. 3400.
- Burg M.B.* 2000. Macromolecular crowding as a cell volume sensor. Cell. Physiol. Biochem. V. 10. P. 251.
- Burg M.B., Ferraris J.D., Dmitrieva N.I.* 2007. Cellular response to hyperosmotic stresses. Physiol. Rev. V. 87. P. 1441.

- Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 474931.
- Creed S., McKenzie M. 2019. Measurement of mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). *Methods Mol. Biol.* V. 1928. P. 69.
- Darborg B.V., Rentsch M.L., Rasmussen M. 2007. Regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H exchanger, NHE1. *Arch Biochem Biophys.* V. 462. P. 195.
- Davon-Wetton C.S.A., Pessolano E., Perretti M., Montero-Melendez T. 2021. Senescence under appraisal: hopes and challenges revisited. *Cell Mol. Life Sci.* V. 78. P. 3333.
- Ermolaeva M., Neri F., Ori A., Rudolph K.L. 2018. Cellular and epigenetic drivers of stem cell ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 19. P. 594.
- 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. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* V. 305. P. 481.
- Fridlyanskaya I., Alekseenko L., Nikolsky N. 2015. Senescence as a general cellular response to stress: A minireview. *Exp. Gerontol.* V. 72. P. 124.
- Guerrero A., Herranz N., Sun B., Wagner V., Gallage S., Guiho R., Wolter K., Pombo J., Elaine I.E., Innes A.J., Birch J., Glegola J., Manshaei S., Heide D., Dharmalingam G. et al. 2019. Cardiac glycosides are broad-spectrum senolytics. *Nat. Metab.* V. 1. P. 1074.
- Hernandez-Segura A., Nehme J., Demaria M. 2018. Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol.* V. 28. P. 436.
- Hoffmann E.K., Lamber I.H., Pedersen S.F. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* V. 89. P. 193.
- Hoffmann E.K., Pedersen S.F. 2011. Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signalling pathways. *Acta Physiol (Oxf).* V. 202. P. 465.
- Jakobsson E. 1980. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* V. 238. C196.
- Jentsch T.J. 2016. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 17. P. 293.
- Klausen T.K., Preisler S., Pedersen S.F., Hoffmann E.K. 2010. Monovalent ions control proliferation of Ehrlich Lettse ascites cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* V. 299. C714.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldege S., Gulbins E., Häussinger D. 1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. *Physiol. Rev.* V. 78. P. 247.
- Lang F., Föller M., Lang K. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* V. 205. P. 147.
- Lang F., Shumilina E., Ritte M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S.M. 2006. Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib. Nephrol.* V. 152. P. 142.
- Lew V.L., Bookchin R.M. 1986. Volume, pH, and ion-content regulation in human red cells: analysis of transient behavior with an integrated model. *J. Membr. Biol.* V. 92. P. 57.
- 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.* V. 1368. P. 61.
- Marakhova I., Domnia A., Shatrova A., Borodkina A., Burova E., Pugovkina N., Zemelko V., Nikolsky N. 2019a. Proliferation-related changes in K<sup>+</sup> content in human mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* V. 9. P. 346.
- Marakhova I., Yurinskaya V., Aksenov N., Zenin V., Shatrova A., Vereninov A. 2019b. Intracellular K<sup>+</sup> and water content in human blood lymphocytes during transition from quiescence to proliferation. *Sci. Rep.* V. 9. P. 16253.
- Matsuda H., Putzel G.G., Szleifer I., Szleifer I. 2014. Macromolecular crowding as a regulator of gene transcription. *Biophys. J.* V. 106. P. 1801.
- McIntyre G.I. 2006. Cell hydration as the primary factor in carcinogenesis: A unifying concept. *Med. Hypotheses.* V. 66. P. 518.
- McIntyre G.I. 2007. Increased cell hydration promotes both tumor growth and metastasis: A biochemical mechanism consistent with genetic signatures. *Med. Hypotheses.* V. 69. P. 1127.
- Minton A.P. 2020. Water loss in aging erythrocytes provides a clue to a general mechanism of cellular senescence. *Biophys. J.* V. 119. P. 2039.
- Mourao M.A., Hakim J.B., Schnell S. 2014. Connecting the dots: the effects of macromolecular crowding on cell physiology. *Biophys. J.* V. 107. P. 2761.
- Pedersen S.F. 2006. The Na/H exchanger NHE1 in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death. *Pflügers Arch.* V. 452. P. 249–259.
- 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.* V. 462. P. 195.
- 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.* V. 278. P. 44645.
- Rana P.S., Kurokawa M., Model M.A. 2020. Evidence for macromolecular crowding as a direct apoptotic stimulus. *J. Cell. Sci.* V. 133. P. 243931.
- Rhinn M., Ritschka B., Keye W.M. 2019. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development.* V. 146. dev151837. <https://doi.org/10.1242/dev.151837>
- 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.* V. 278. P. 44645.
- Scaduto R.C., Grottyohann L.W. 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.* V. 76. P. 469.
- Shatrova A.N., Burova E.B., Kharchenk M.V., Smirnov I.S., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Borodkina A.V. 2021. Outcomes of deferoxamine action on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced growth inhibition and senescence progression of human endometrial stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 6035.
- 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.* V. 44. P. 169.
- 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<sup>+</sup>(Rb<sup>+</sup>) fluxes



- in apoptosis of human lymphoid cell line U937. *Cell. Physiol. Biochem.* V. 22. P.187.
- Vereninov I.A., Yurinskaya V.E., Model M.A., Vereninov A.A.* 2016. Unidirectional flux balance of monovalent ions in cells with Na/Na and Li/Na exchange: experimental and computational studies on lymphoid U937 cells. *PLoS One.* V. 11. e0153284.
- Yu X., Li X., Jiang G., Wang X., Chang H.C., Hsu W.H., Li Q.* 2013. Isradipine prevents rotenone-induced intracellular calcium rise that accelerates senescence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience.* V. 246. P. 243.
- Yurinskaya V.E., Moshkov A.V., Rozanov Y.M., Shirokova A.V., Vassilieva I.O., Shumilina E.V., Lang F., Volgareva E.V., Vereninov A.A.* 2005. Thymocyte K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and water balance during dexamethasone- and etoposide-induced apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* V. 16. P. 15.
- Yurinskaya V.E., Vereninov I.A., Vereninov A.A.* 2020. Balance of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup> unidirectional fluxes in normal and apoptotic U937 cells computed with all main types of cotransporters. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. P. 591872.
- Wang R., Ferraris J.D., Izumi Y., Dmitrieva N., Ramkissoon K., Wang G., Gucek M., Burg M.B.* 2014. Global discovery of high-NaCl-induced changes of protein phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* V. 307. P. C442.
- Wang B., Kohli J., Demaria, M.* 2020. Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? *Trends Cancer.* V. 6. P. 838.
- Zhou H.-X., Riva G., Minton A.P.* 2008. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.* V. 3. P. 375.

## Ion Homeostasis and Stress-Induced Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells

A. N. Shatrova<sup>a</sup>, A. P. Domnina<sup>a</sup>, N. A. Pugovkina<sup>a</sup>, and I. I. Marakhova<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

*\*e-mail: iim@incrus.ru*

Human endometrial mesenchymal stem cells (hMESC) subjected to sublethal oxidative stress enter the premature senescence. Here, we studied the changes in ionic homeostasis associated with the premature senescence progression in human eMSCs. Using the method of flame photometry to assess the intracellular content of potassium and sodium as well as the potassium fluxes across the plasma membrane, it is shown that during the oxidative stress-induced cell cycle arrest and the premature senescence progression, eMSCs retain high ionic heterogeneity, which is characteristic of functionally active animal cells. The senescence progression is accompanied by an increase in intracellular sodium content and in potassium fluxes associated with the Na/K pump, but does not affect the passive transport of potassium across the plasma membrane. A peculiar feature of senescent eMSCs is a low intracellular potassium content (500–600 μmol./g) compared to proliferating eMSCs (800–900 μmol./g). It is suggested that the decrease in intracellular potassium content associated with the premature senescence progression reflects the involvement of potassium ions in the regulation of cell volume and may indicate a reduced hydration of senescent eMSCs.

*Keywords:* cell potassium content, potassium fluxes, Na/K pump, oxidative stress, premature senescence, human endometrial mesenchymal stem cells