

УДК 577.3

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КЛЕТКИ И АКТИВНОСТЬ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ

¹Смолянинов В.В., ²Потапова Т.В., ³Мякишева С.Н., ¹Асланиди К.Б.

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, e-mail: kbaslanidi@gmail.com;*

²*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва;*

³*Институт биофизики клетки РАН, Пушкино*

Жизненный цикл клетки многоклеточного организма состоит из эмбриональной фазы, включающей многочисленные этапы пролиферации и дифференцировки оплодотворённой яйцеклетки, фазы функционирования взрослой дифференцированной клетки и фазы запрограммированной клеточной гибели. В работе показано, что активность неорганических ионов в культуральной среде существенно влияет на все фазы жизненного цикла клетки. Эксперименты показали, что как время дифференцировки, так и время жизни минимальны при низких концентрациях ионов Na⁺ в среде. В среде с pH 7,5 время дифференцировки составило 24 ч, а время жизни – 120 ч, а в среде при pH 8,2 время дифференцировки практически не изменилось, а время жизни увеличилось почти в полтора раза. Это означает, что низкое содержание ионов Na⁺ и защелачивание цитоплазмы способствуют значительному увеличению продолжительности жизни клеток нейроblastомы. На уровне организма полученные результаты могут способствовать подбору препаратов, влияющих на рост или гибель конкретных клеток, в частности опухолевых. Полученные результаты позволяют надеяться, что подбор культуральных сред поможет увеличивать выход продукции при выращивании различных клеток самых разных организмов.

Ключевые слова: неорганические ионы, клеточный цикл, пролиферация, дифференцировка, клеточная гибель, скорость дифференцировки, продолжительность жизни

LIFE CYCLE OF THE CELL AND THE ACTIVITY OF INORGANIC IONS

¹Smolyaninov V.V., ²Potapova T.V., ³Myakisheva S.N., ¹Aslanidi K.B.

¹*Institute for Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, e-mail: kbaslanidi@gmail.com;*

²*Belozersky Scientific Research Institute of Physical and Chemical Biology Lomonosov MSU, Moscow;*

³*Institute for Cell Biophysics RAS, Pushchino*

The life cycle of a cell in a multicellular organism consists of an embryonic phase, which includes numerous stages of proliferation and differentiation of a fertilized egg, a phase of functioning of an adult differentiated cell, and a phase of programmed cell death. The work shows that the activity of inorganic ions in the culture medium significantly affects all phases of the cell life cycle. Experiments have shown that both the differentiation time and the lifetime are minimal at low concentrations of Na⁺ ions in the medium. In a medium with pH 7.5, the differentiation time was 24 h, and the life time was 120 h, and in a medium at pH 8.2, the differentiation time practically did not change, and the life time increased by almost one and a half times. This means that the low content of Na⁺ ions and alkalization of the cytoplasm contribute to a significant increase in the lifespan of neuroblastoma cells. At the level of the organism, the results obtained can contribute to the selection of drugs that affect the growth or death of specific cells, in particular, tumor cells. The results obtained allow us to hope that the selection of culture media will help to increase the production yield when growing various cells of various organisms.

Keywords: inorganic ions, cell cycle, proliferation, differentiation, cell death, rate of differentiation, life span

Жизненный цикл клетки многоклеточного организма состоит из эмбриональной фазы, включающей многочисленные этапы пролиферации и дифференцировки оплодотворённой яйцеклетки, фазы функционирования взрослой дифференцированной клетки и фазы запрограммированной клеточной гибели. Покоящиеся терминально дифференцированные клетки имеют тенденцию быть сильно поляризованными, в то время как более пластичные типы клеток (стволовые клетки, эмбриональные клетки и раковые клетки) имеют тенденцию быть относительно деполаризованными [1]. Мембранный потенциал растёт в процессе дифференцировки и достигает максимума у взрослой дифференцирован-

ной клетки, а затем падает в процессе гибели по типу апоптоза [1, 2]. Если влияние ионного состава цитоплазмы на экспрессию различных генов интенсивно исследовалось уже много лет [1, 3], то влияние ионного состава внешней среды на различные фазы жизненного цикла клетки детально не исследовалось. Целью работы было исследование влияния активности неорганических ионов на разных этапах жизненного цикла клетки.

Материалы и методы исследования

В наших экспериментах определялось влияние различных культуральных сред на процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза [4]. В экспериментах

использовалась культура клеток нейробластомы мыши N1E-115 (клон С-1300), способной к обратимой дифференцировке и спонтанной регрессии.

Основные компоненты используемых сред представлены в таблице.

Через сутки после культивирования на среде № 2 (таблица) клетки переводили на одну из сред, представленных в таблице. Плотность посева в стандартных пластиковых флаконах составляла 1×10^4 клеток на см^2 . Степень морфологической дифференцировки определяли как долю клеток, образующих отростки, длина которых бо-

лее чем в два раза превышала диаметр клетки. Время дифференцировки определяли как время воздействия среды, за которое доля дифференцированных клеток достигала $70 \pm 10\%$. Время жизни определяли как время, за которое гибель клеток достигала $85 \pm 10\%$.

Результаты исследования и их обсуждение

Значительные различия, представленные на рис. 1, были зарегистрированы при изменении кислотности среды от pH 7,5 до pH 8,2.

Основные компоненты используемых сред

Номера сред	Молярность, $\Sigma[\text{с.}], \text{мОсм}$	pH	$[\text{Na}^+], \text{мМ}$	$[\text{K}^+], \text{мМ}$	$[\text{Ca}^{2+}], \text{мМ}$	Аминокислоты, мМ	Углеводы, мМ
1*	408	8,2	185	5,40	4,30	11,2	6,6
2**	350	7,5	160	5,40	1,80	11,2	6,6
3	408	7,5	185	5,40	4,30	11,2	6,6
4	350	6,8	160	5,40	1,80	11,2	6,6
5	350	7,5	160	5,40	1,80	11,2	6,6
6	350	8,2	160	5,40	1,80	11,2	6,6
7	354	7,6	150	5,80	1,30	33,6	10,00
8	323	6,8	137	5,35	1,26	0,00	5,56
9	323	7,4	137	5,35	1,26	0,00	5,56
10	323	8,2	137	5,35	1,26	0,00	5,56
11	214	7,5	90	5,00	2,00	0,97	11,1

*К среде DMEM добавлено 10% сыворотки, 25 мМ NaCl и 2,5мМ CaCl₂.

**К среде DMEM добавлено 10% сыворотки.

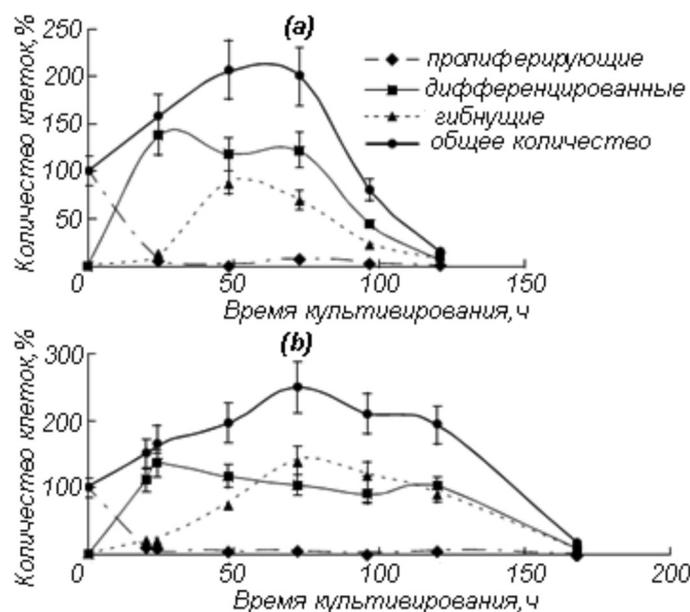


Рис. 1. Изменение количества клеток нейробластомы мыши N1E-115, выращенных в среде № 2, при замене среды (в точке $t = 0$ на оси времени): а – на среде № 5 (DMEM, pH 7.5; время дифференцировки – 24 ч, время жизни – 120 ч), б – на среде № 6 (DMEM, pH 8.2; время дифференцировки – 20 ч, время жизни – 168 ч)

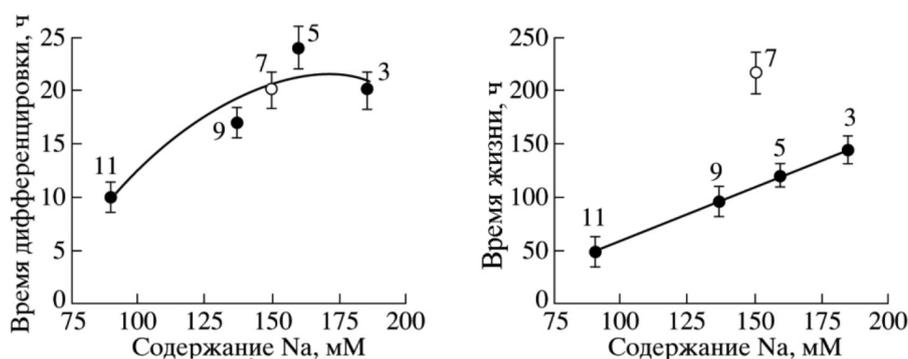


Рис. 2. Зависимость периода дифференцировки (слева) и продолжительности жизни (справа) от концентрации Na^+ в среде. Цифры рядом с точками данных соответствуют номерам сред, перечисленным в таблице

В среде № 5 при pH 7,5 время дифференцировки составило 24 ч, а время жизни – 120 ч, а в среде № 6 время дифференцировки практически не изменилось, а время жизни увеличилось почти в полтора раза. Зависимости времени дифференцировки и времени жизни от содержания ионов Na^+ в культуральной среде представлены на рис. 2.

Эксперименты показали, что как время дифференцировки, так и время жизни минимальны при низких концентрациях ионов Na^+ в среде. Время дифференцировки при увеличении концентрации ионов Na^+ в среде от 100 mM до 200 mM может изменяться практически в два раза, а время жизни – почти в три раза. При изменении кислотности внешней среды от pH 7,5 до pH 8,2 время дифференцировки уменьшилось от 24 ч до 20 ч, а время жизни увеличилось с 120 ч до 168 ч.

Наши эксперименты показали значительные изменения как времени дифференцировки, так и времени жизни при изменении pH внешней среды и при изменении содержания ионов натрия. В последних публикациях рассматриваются четыре типа переносчиков ионов, регулирующих содержание ионов Na^+ и pH у глиальных клеток. Это обменники Na^+/H^+ (NHE), обменники $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), котранспортеры $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC) и котранспортеры $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) [5, 6]. Обменники Na^+/H^+ (NHE) влияют на апоптоз, рост раковых клеток, инвазию и миграцию глиомы. Ингибирование Na^+/H^+ обменников способствует увеличению выживаемости в моделях глиомы на животных [6]. Клетки глиомы с нокдауном обменника демонстрировали значительно более медленный рост, чем контрольные клетки [7]. Сверхэкспрессия обменника усиливала пролиферацию и миграцию клеток глиобластомы [8]. Субъединица

альфа1 Na^+/K^+ -АТФазы экспрессируется в большинстве глиобластом активнее, чем в нормальных тканях мозга [9]. Показано, что деполяризация усиливает пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, а гиперполяризация усиливает дифференцировку этих клеток [10].

Самые последние исследования клеток глии *in vivo* подтвердили низкое содержание ионов Na^+ во внутриклеточной среде $[\text{Na}^+]_i \approx 10$ mM, но высокие концентрации ионов натрия Na^+ во внеклеточной среде и в крови $[\text{Na}^+]_o \approx 150$ mM [11]. В клетках глиомы крысы *in vivo* концентрация $[\text{Na}^+]_i$ и его содержание в крови $[\text{Na}^+]_b$ не отличались от нормальной ткани, а уровень натрия во внеклеточной среде $[\text{Na}^+]_o$ был занижен. Это означает, что эндотелиальные клетки, окружающие опухоль, изменяют проницаемость гематоэнцефалического барьера для ионов Na^+ . В этих условиях клетки глиомы деполяризованы относительно нормальных глиальных клеток, что свидетельствует о готовности к пролиферации [11]. Утверждается, что изменение содержания ионов натрия Na^+ в крови, в межклеточной среде или в цитоплазме *in vivo* могут рассматриваться как важный онкологический биомаркер [11].

Проведённые эксперименты показали, что при изменении кислотности внеклеточной среды от pH 8,2 до pH 7,5 время дифференцировки практически не изменилось, а время жизни уменьшилось почти в полтора раза. По-видимому, закисление цитоплазмы посредством активности Na^+/H^+ обменников способствует пролиферации раковых клеток и устойчивости лекарственным препаратам [12]. Закисление цитоплазмы астроцитов ствола мозга активирует ко-транспорт $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, который приносит Na^+

внутри клетки. Повышение $[Na^+]_i$ активирует обменник Na^+/Ca^{2+} , что приводит к поступлению ионов Ca^{2+} в цитоплазму [13].

Это означает, что изменения рН не влияют на экспрессию генов, ответственных за процессы дифференцировки, однако высокие рН могут блокировать экспрессию генов, ответственных за апоптоз.

Наши эксперименты показали, что как время дифференцировки, так и время жизни минимальны при низких концентрациях ионов Na^+ в среде. При увеличении концентрации ионов Na^+ в среде от 100 mM до 200 mM время дифференцировки увеличивалось практически в два раза, а время жизни – почти в три раза.

Учитывая условия водно-осмотического равновесия и известное уравнение Гольдмана для потенциала на плазматической мембране [14], можно заключить, что низкому содержанию ионов Na^+ в среде будет соответствовать низкое содержание ионов Na^+ в цитоплазме. Это означает, что при низком содержании ионов Na^+ в среде клетка гиперполяризуется. В такой клетке экспрессируются гены, ответственные за процессы дифференцировки, и гены, ответственные за апоптоз. При высоком содержании ионов Na^+ в среде клетка деполяризуется и экспрессируются гены, ответственные за процессы пролиферации [1]. Основные результаты наших исследований на клетках нейроblastомы недавно были подтверждены на культивируемых эпителиальных раковых клетках. Для оценки влияния неорганических ионов на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз использовали различные культуральные смеси, в которых проницаемые ионы (Na^+ , Cl^- и K^+) заменялись непроницаемыми ионами (N-метил-D-глуконат (NMDG), глюконат, холин, SO_4^{2-}). Значения мембранных потенциалов клеток оценивали как с помощью patch clamp, так и с помощью чувствительного к напряжению красителя [15].

Таким образом, на первых этапах жизненного цикла при пролиферации и начальной дифференцировке у клеток регистрируется низкое значение мембранного потенциала, высокое содержание ионов Na^+ и благодаря работе Na^+/H^+ обменников, цитоплазма слегка защелочена. У взрослой дифференцированной клетки регистрируется высокое значение мембранного потенциала, низкое содержание ионов Na^+ и слегка закисленная цитоплазма.

На последних этапах жизни клетки развивается апоптоз или некроз, регистрируются низкие значения мембранного потенциала, высокое содержание ионов Na^+ . Апоптоз приводит к ингибированию Na^+/H^+ обменников и закислению цитоплазмы. Полученные результаты позволяют надеяться,

что подбор культуральных сред поможет увеличивать выход продукции при выращивании различных клеток самых разных организмов. На уровне организма полученные результаты могут способствовать подбору препаратов, влияющих на рост или гибель конкретных клеток.

Список литературы

1. Binggeli R., Weinstein R. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J. Theor. Biol.* 1986. Vol. 123. P. 377–401.
2. Cervera J., Pai M.P., Levin M., Mafe S. From non-excitable single-cell to multicellular bioelectrical states supported by ion channels and gap junction proteins: Electrical potentials as distributed controllers. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019. Vol. 149. P. 39–53. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2019.06.004.
3. Levin M. Bioelectric signaling: Reprogrammable circuits underlying embryogenesis, regeneration, and cancer. *Cell.* 2021. Vol. 84 (8). P. 1971–1989. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.034.
4. Асланиди К.Б., Мякишева С.Н., Иваницкий Г.Р. Ионная регуляция пролиферации клеток нейроblastомы мыши NIE-115 in vitro. Доклады академии наук, 2008. Т. 423. № 2. С. 331–333. DOI: 10.1134/s1607672908060033.
5. Song S., Luo L., Sun B., Sun D. Roles of glial ion transporters in brain diseases. *Glia.* 2020. Vol. 68 (3). P. 472–494. DOI: 10.1002/glia.23699.
6. Tamtaji O.R., Mirzaei H., Shamshirian A., Shamshirian D., Behnam M., Asemi Z. New trends in glioma cancer therapy: Targeting Na^+/H^+ exchangers. *J. Cell Physiol.* 2020. Vol. 235 (2). P. 658–665. DOI: 10.1002/jcp.29014.
7. Kurata T., Rajendran V., Fan S., Ohta T., Numata M., Fushida S. NHE5 regulates growth factor signaling, integrin trafficking, and degradation in glioma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2019. Vol. 36 (6). P. 527–538. DOI: 10.1007/s10585-019-10001-6.
8. Pall A.E., Juratli L., Guntur D., Bandyopadhyay K., Kondapalli K.C. A gain of function paradox: Targeted therapy for glioblastoma associated with abnormal NHE9 expression. *J. Cell Mol Med.* 2019. Vol. 23 (11). P. 7859–7872. DOI: 10.1111/jcmm.14665.
9. Lefranc F., Kiss R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia.* 2008. Vol. 10 (3). P. 198–206. DOI: 10.1593/neo.07928.
10. Bhavsar M.B., Cato G., Hauschild A., Leppik L., Costa Oliveira K.M., Eischen-Loges M.J., Barker J.H. Membrane potential (V_{mem}) measurements during mesenchymal stem cell (MSC) proliferation and osteogenic differentiation. *Peer J.* 2019. Vol. 7. P. e6341. DOI: 10.7717/peerj.6341.
11. Khan M.H., Walsh J.J., Mihailović J.M., Mishra S.K., Coman D., Hyder F. Imaging the transmembrane and transendothelial sodium gradients in gliomas. *Sci Rep.* 2021. Vol. 11 (1). P. 6710. DOI: 10.1038/s41598-021-85925-9.
12. Aredia F., Scovassi A.I. Manipulation of Intracellular pH in Cancer Cells by NHE1 Inhibitors. *Protein Pept Lett.* 2016. Vol. 23 (12). P. 1123–1129. DOI: 10.2174/0929866523666161013125536.
13. Turovsky E., Theparambil S.M., Kasymov V., Deitmer J.W., Del Arroyo A.G., Gareth L., Ackland G.L., Corneveaux J.J., Allen A.N., Huentelman M.J., Kasparov S., Marina N., Gourine A.V. Mechanisms of CO_2/H^+ Sensitivity of Astrocytes. *J. Neurosci.* 2016. Vol. 36 (42). P. 10750–10758. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1281-16.2016.
14. Aslanidi K.B., Panfilov A.B. The Boyle-Convey Model Including the effect of an Electrogenic Pump for Nonelectable Cells. *Mathematical Biosciences.* 1986. Vol. 79. P. 45–54.
15. Bonzanni M., Payne S.L., Adelfio M., Kaplan D.L., Levin M., Oudin M.J. Defined extracellular ionic solutions to study and manipulate the cellular resting membrane potential. *Biol. Open.* 2020. Vol. 9 (1). P. bio048553. DOI: 10.1242/bio.048553.