

МОДУЛЯЦИЯ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ СТАРЕНИЯ СТВОЛОВЫХ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ mTOR и MAP-КИНАЗНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

© А. А. Грюкова,¹ А. Н. Шатрова,¹ П. И. Дерябин,¹ А. В. Бородкина,¹
Н. А. Князев,^{1,2} Н. Н. Никольский,^{1,3} Е. Б. Бурова^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

² С.-Петербургский национальный исследовательский академический университет РАН,
Санкт-Петербург, 194021, и

³ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251;

* электронный адрес: lenbur87@mail.ru

Для предотвращения преждевременного старения тканеспецифических стволовых клеток необходимо блокировать активность сигнальных путей, участвующих в реализации программы старения. В работе изучали эффекты перманентного ингибирования PI3K/Akt/mTOR- и ERK-зависимых путей в контексте восстановления пролиферативного потенциала и модуляции фенотипа H₂O₂-обработанных мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека (эмСК). Ингибиторный анализ проводили с использованием специфических фармакологических ингибиторов комплекса mTORC1, MEK/ERK и PI3K/Akt (рапамицина, U0126 и LY294002 соответственно). Показано, что все ингибиторы способны изменять свойственные старым клеткам фенотипические признаки, включая гипертрофию клеток и увеличенную активность β-галактозидазы, ассоциированной со старением (SA-β-Gal), а также подавлять генерацию внутриклеточных активных форм кислорода (АФК). Рапамицин и LY294002 эффективно препятствовали гипертрофии клеток и повышению активности SA-β-Gal. Ингибитор U0126 по-разному влиял на фенотипические признаки старения: препятствовал увеличению активности SA-β-Gal, но не предотвращал развития гипертрофии клеток. Эти результаты предполагают доминирующую роль PI3K/Akt/mTOR-пути в контроле над изменением фенотипа старения. Обнаружено, что ни один из ингибиторов не предотвращал H₂O₂-индуцированного ареста клеточного цикла, который имел пролонгированный и необратимый характер. В старых клетках существует сложная система взаимной регуляции mTOR и MAP-киназ: подавление активности киназ p38 или ERK1/2 не изменяло функциональной активности mTORC1-пути, тогда как ингибирование последнего вызывало сильную активацию компонентов Raf/MEK/ERK/p90RSK, но не влияло на p38/MK-2/Rb. Следовательно, mTORC1 является негативным регулятором ERK-, но не p38-зависимого MAP-киназного пути в старых эмСК.

Ключевые слова: mTOR, MAP-киназы, рапамицин, стволовые клетки эндометрия, преждевременное старение, окислительный стресс.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, эмСК — эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека, 4E-BP1 — связывающий белок 1 эукариотического фактора инициации трансляции 4E, MAPKAPK-2 (или MK-2) — протеинкиназа 2, активируемая MAP-киназой, PI3K — фосфатидилинозитол-3 киназа, PIP3 — фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, RSK — p90-киназа рибосомального белка S6, SA-β-Gal — β-галактозидаза, ассоциированная с клеточным старением (Senescence-Associated β-Galactosidase), S6K1 — p70-киназа 1 рибосомального белка S6, SASP — ассоциированный со старением секреторный фенотип (Senescence Associated Secretory Phenotype).

В последнее десятилетие использование стволовых клеток стало одним из приоритетных направлений развития современной регенеративной медицины. Несмотря на многообещающие результаты доклинических и клинических исследований, до сих пор остается много вопросов относительно механизмов функционирования стволовых клеток при терапии заболеваний, сопровождающихся повышением уровня активных форм кислорода (АФК). Позитивную роль в ликвидации «белых пятен» может сыграть использование мезенхимных тканеспецифических стволовых клеток человека для моделирования патологи-

ческих процессов, связанных с окислительным стрессом. Мезенхимные стволовые клетки (МСК), выделенные из разных источников, в условиях сублетального окислительного стресса подвергаются необратимому преждевременному старению (Brandl et al., 2011; Kim et al., 2011; Ko et al., 2012; Burova et al., 2013; Turinetto et al., 2016). Клеточное старение определяется как перманентный арест пролиферации через тумор-супрессорные пути и характеризуется измененной морфологией и метаболизмом, а также секреторным фенотипом, ассоциированным со старением (SASP), который ускоряет старение окружа-

ющих клеток благодаря провоспалительным свойствам (López-Otin et al., 2013; Malaquin et al., 2016). Для эффективного клинического использования МСК необходимо разрабатывать стратегию предотвращения их преждевременного старения, которое сопровождается утратой способности регенерировать ткани и может реально осложнить процесс трансплантации реципиентам с возрастными патологиями, характеризующимися повышенным уровнем АФК. Блокирование активности сигнальных путей, участвующих в реализации программы старения, можно рассматривать в качестве одного из подходов для решения этой проблемы.

Киназа mTOR (mammalian target of rapamycin), эволюционно консервативная серинтреониновая киназа, интегрирует различные вне- и внутриклеточные сигналы, включая ростовые факторы, энергию, питательные вещества, и координирует основные процессы в клетке — синтез белка, пролиферацию, дифференцировку, митохондриальную активность, метаболизм и аутофагию (Sarbasov et al., 2005a; Wullschleger et al., 2006; Ma, Blenis, 2009; Russel et al., 2011; Laplante, Sabatini, 2012).

Киназа mTOR функционирует как каталитическая субъединица в двух различных мультибелковых комплексах, которые контролируют в клетке разные программы (Loewith et al., 2002). Чувствительный к рапамицину (Rapa) комплекс mTORC1 характеризуется регуляторной субъединицей Raptor (regulatory associated protein of mTOR) и контролирует синтез белка (размер клеток) через фосфорилирование эффекторов — рибосомной киназы p70S6K и белка 4E-BP1, ингибитора фактора инициации элонгации. Это фосфорилирование стимулирует трансляцию мРНК, пролиферацию и клеточный рост (Sarbasov et al., 2005a). Rapa, аллостерический ингибитор mTORC1, способен по-разному ингибировать S6K и 4E-BP1 в зависимости от типа клеток (Choo et al., 2008; Choo, Blenis, 2009). Rapa-устойчивый комплекс mTORC2, содержащий в составе адапторный белок Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), регулирует активность киназы Akt/PKB фосфорилированием по Ser473, которое наряду с PDK1-зависимым фосфорилированием Thr308 необходимо для полной активации киназы Akt/PKB (Sarbasov et al., 2005b). Интересно отметить тот факт, что Rapa, высокоспецифичный ингибитор mTORC1, при пролонгированной обработке клеток может также препятствовать сборке комплекса mTORC2 и ингибировать фосфорилирование Akt/PKB (Sarbasov et al., 2006).

Киназа mTOR относится к семейству протеинкиназ, родственных фосфатидилинозитол-3-киназе (PI3K), и является интегральным компонентом сигнального пути Ras/PI3K/Akt/mTOR. PI3K/Akt-зависимая регуляция активности mTORC1 представляет собой сложный многоступенчатый процесс, подробно описанный в ряде обзоров (Hay, Sonenberg, 2004; Sarbasov et al., 2005a, 2005b; Huang, Manning, 2009; Steelman et al., 2011; Зубова и др., 2012). В общем, последовательность молекулярных событий следующая: связывание ростовых факторов с соответствующими мембранными тирозинкиназами индуцирует активацию PI3K с последующим фосфорилированием PIP2 с образованием PIP3, который активирует Akt. В свою очередь последний активирует mTORC1 за счет инактивации путем фосфорилирования комплекса белков TSC1/TSC2, главного репрессора mTORC1. Белок TSC2 (туберин) действует как сенсор активации PI3K/Akt- и MAP-киназных сигнальных путей, которые регулируют

функцию mTORC1 (Manning et al., 2002; Ma et al., 2005; Martelli et al., 2010). При изучении механизма активации mTORC1 следует учитывать существование петли негативной регуляции mTORC1/S6K1, которая оперирует по крайней мере в двух направлениях, супрессируя PI3K и mTORC2 (Foster,ingar, 2010; Julien et al., 2010).

В многочисленных работах последних лет убедительно показана ключевая роль mTOR-пути в регуляции программы клеточного старения (Russell et al., 2011; Laplante, Sabatini, 2012; Campisi, 2013; Gharibi et al., 2014; Xu et al., 2014). В процессе клеточного старения, в том числе стрессиндуцированного, происходит модуляция активности киназы mTOR за счет взаимодействия с белками сигнальных каскадов, активируемых в стрессовых условиях. Так, для клеток многих типов описан молекулярный механизм взаимного влияния компонентов сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR и Ras/Raf/MEK/ERK для контроля активности киназы mTOR и ее эффекторов, критичных для стабильности мРНК и белковой трансляции (Carracedo et al., 2008; Demidenko et al., 2009a; Martelli et al., 2010; Mendoza et al., 2011; Steelman et al., 2011). Поэтому полагают, что ингибирование компонентов этих путей может способствовать предотвращению клеточного старения. Действительно, обработка клеток ингибиторами MEK, PI3K или mTOR приводила к супрессии или препятствовала индукции старения (Blagosklonny, 2009; Demidenko et al., 2009b; Chappell et al., 2011; Gharibi et al., 2014).

Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека (эмСК), традиционный объект нашего исследования, в условиях окислительного стресса подвергаются необратимому преждевременному старению (Burova et al., 2013). При инициации старения клетки активируют ATM/p53/p21- и MAP-киназные сигнальные пути, включая p38, JNK и ERK (Borodkina et al., 2014). Для реализации программы H₂O₂-индуцированного старения необходима взаимная негативная регуляция между MAP-киназными и p53-зависимыми путями (Дерябин и др., 2015). Используя ингибиторный анализ, мы показали ключевую роль ATM/p53/p21 и p38 MAPK в индукции преждевременного старения эмСК (Borodkina et al., 2014; Бородкина и др., 2016). Вклад ERK1/2 MAP-киназы, как и PI3K/Akt/mTOR-каскада, в процесс старения эмСК до сих пор в литературе не описан. Цель настоящей работы заключалась в изучении молекулярного механизма H₂O₂-индуцированного старения эмСК и оценке эффективности ингибирования PI3K/Akt/mTOR- и ERK-зависимых сигнальных путей для предотвращения их преждевременного старения.

Материал и методика

Культивирование клеток. Использовали стволовые клетки эндометрия (эмСК) человека линии 2304, полученные сотрудниками Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). эмСК выделяли из десквамированного эндометрия менструальной крови от здоровых доноров (Земелько и др., 2011) и культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % гентамицина и 1 % глутамакса, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C во флаконах 25 или 75 см². Для экспериментов клетки рассеивали в плотности 15 тыс. кл./см² на чашки диаметром 35 мм; использовали клетки 6—9 пассажей.

Обработка клеток. Окислительный стресс вызывали добавлением в бессывороточную среду H_2O_2 (конечная концентрация 200 мкМ), раствор которой готовили из 30%-ной H_2O_2 непосредственно перед использованием. Обработку клеток проводили в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 , после чего клетки дважды промывали раствором PBS и далее культивировали в свежей ростовой среде или в ростовой среде, содержащей ингибиторы. Использовали следующие фармакологические ингибиторы: Rapa (200 нМ) — специфический ингибитор mTORC1 (в комплексе с белком FKBP12 Rapa ингибирует киназную активность mTORC1); вещество LY294002 (LY) (20 мкМ) — селективный синтетический ингибитор PI-3K (инактивирует Akt/PKB, более стабилен в растворах по сравнению с вортманнином, другим известным ингибитором PI-3K); U0126 (10 мкМ) — высокоселективный ингибитор MEK1/2-киназы, регулирующих активность ERK1/2. Обработку клеток ингибиторами проводили по схеме: 1) клетки подвергали окислительному стрессу, как описано выше; 2) после промывки клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 в течение 3 или 5 сут в свежей ростовой среде при постоянном присутствии каждого из исследуемых ингибиторов в указанной концентрации. Среду меняли через каждые 2 сут для поддержания постоянной концентрации ингибиторов. В отдельных случаях клетки подвергали сначала действию 20 мкМ LY в течение 40 мин, а затем окислительному стрессу в стандартных условиях.

Электрофорез и иммуноблотинг. Клетки дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 10 % глицерина, 1 % Тритона X-100, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мМ NaF, 0,5 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (1 : 500 и Sigma, США), в течение 10 мин на льду. После лизиса клетки соскребали с чашек и центрифугировали в течение 15 мин при 15 000 g. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (40 мМ Трис, pH 6,8, 10 % SDS, 20 % 2-меркаптоэтанол и 40 % глицерина) и инкубировали в течение 5 мин при 100 °С. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, используя овалбумин для построения калибровочной кривой. Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma, США). Для специфического выявления белков использовали моноклональные кроличьи антитела против ингибитора циклинзависимых киназ p21Cip1/Waf1, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10), фосфо-МАРКАРК-2 (Thr334), а также поликлональные кроличьи антитела против фосфо-Rb (Ser807/811), фосфо-p53 (Ser15), фосфо-p38 (Thr180/Tyr182), фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), фосфо-c-Raf (Ser338), фосфо-MEK1/2 (Ser217/221), фосфо-p90RSK (Ser380), фосфо-Akt (Thr308), фосфо-Akt (Ser473), фосфо-p70S6K (Thr389), фосфо-S6 (Ser248/244) и фосфо-4E-BP1 (Thr37/46). В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP). Все антитела были приобретены в фирме Cell Signaling (США). Для детекции пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP использовали реакцию усиленной хемилуминесценции (ECL, Amersham, Швеция). Хемилуминесцентное излучение регистриро-

вали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

Жизнеспособность клеток после обработки ингибитором в различных концентрациях оценивали методом МТТ, основанным на энзиматическом превращении МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) в формазан в живых клетках. После удаления культуральной среды к клеткам добавляли раствор МТТ (0.715 мг/мл) в ростовой среде. Через 2 ч раствор заменяли на DMSO для растворения образовавшихся кристаллов формазана и инкубировали клетки в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего измеряли абсорбцию раствора при 570 нм на приборе Fluorofot Charity (США).

Проточная цитофлуориметрия. Прикрепленные клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и Версена (0.05 %), осаждали центрифугированием и промывали раствором PBS. Далее образец окрашивали йодистым пропидием (PI; 50 мкг/мл) и анализировали на цитофлуориметрах EPICS XL и CytoFlex (Beckman Coulter, США). Изменение размера клеток оценивали по изменению прямого светорассеяния живых клеток (FSC). Данные собирали и обрабатывали с помощью программ WinMDI (версия 2.8) и CytExpert (версия 1.2).

Для оценки внутриклеточного уровня АФК использовали 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат ($H_2DCF-DA$) (Molecular Probes, США). Прикрепленные к поверхности чашки клетки инкубировали в течение 20 мин при 37 °С в темноте в среде без сыворотки с добавлением 10 мкМ флуоресцентного красителя. После окончания времени инкубации с красителем клетки промывали PBS, переводили в суспензионное состояние при помощи смеси растворов трипсина и Версена (0.05 %) и анализировали на проточном цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Beckman Coulter). В каждом образце анализировали не менее 10 тыс. клеток.

Активность SA- β -Gal выявляли с помощью фирменного набора Senescence-galactosidase staining kit (Cell Signaling, США). Все процедуры осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Клетки на чашках промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего дважды промывали PBS и окрашивали в β -галактозидазном растворе при 37 °С в течение ночи. Об активности SA- β -Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). При установлении достоверности различий данных, подчиняющихся нормальному распределению, использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений ($N = 3$).

В работе использовали неорганические соли и H_2O_2 производства фирмы Sigma (США).

Результаты и обсуждение

Действие Rapa на H_2O_2 -стимулированные эмСК. Ранее мы установили, что в ответ на сублетальный окислительный стресс, индуцированный действием 200 мкМ H_2O_2 , эмСК подвергаются преждевременному старению, которое сопровождается модуляцией фенотипа клеток, включая изменение морфологии и уве-

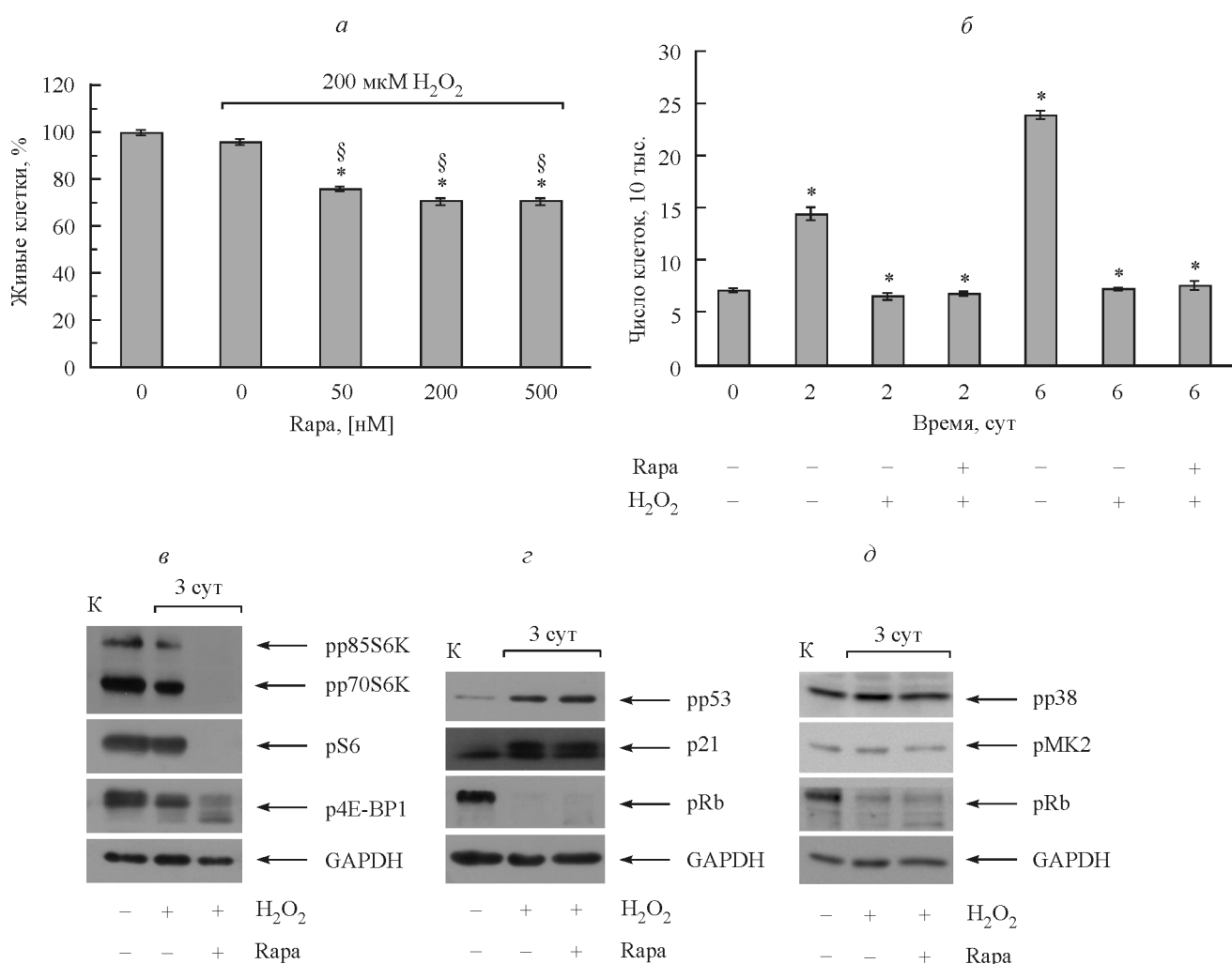


Рис. 1. Влияние рапамицина (Rapa), специфического ингибитора комплекса mTORC1, на выживаемость (а), пролиферацию (б) и сигнальные пути (в—д) в H₂O₂-обработанных стволовых клетках эндометрия (эмСК).

Клетки стимулировали с помощью 200 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч, затем культивировали в присутствии 200 нМ Rapa в течение указанного времени. Жизнеспособность (а) клеток определяли методом МТТ; гистограмма (б) отражает данные кривых роста; на иммуноблотах (в—д) с помощью специфических антител выявляли фосфорилированные белки (указаны стрелками) сигнальных каскадов mTORC1, p53/p21/Rb и p38/Rb соответственно; К — контроль, GAPDH — глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (здесь и на рис. 3, 5, 6). Данные представлены здесь и на всех рисунках в виде средних значений и их стандартных отклонений (N = 3). Различия достоверны при P < 0.5 по сравнению с контролем (*) и с H₂O₂-обработанными клетками (§).

личение активности SA-β-Gal, а также необратимым арестом клеточного цикла (Burova et al., 2013). Для проверки предположения об участии mTOR-пути в регуляции старения эмСК в настоящей работе мы использовали специфический ингибитор комплекса mTORC1 — Rapa.

Для выбора рабочей концентрации Rapa провели оценку жизнеспособности H₂O₂-обработанных клеток после их культивирования в течение 24 ч при постоянном присутствии ингибитора в концентрациях 50, 200 и 500 нМ. Как показали результаты МТТ-теста, Rapa во всех протестированных концентрациях оказывал примерно одинаковое негативное влияние на жизнеспособность H₂O₂-обработанных клеток (рис. 1, а).

Последующие эксперименты проводили на H₂O₂-обработанных клетках, которые культивировали в присутствии 200 нМ Rapa в среде в течение разного времени. Вариант длительной обработки клеток ингибитором был выбран для проверки предположения о возможности обращения процесса преждевременного старения эмСК, который активируется в клетках уже в течение первых

минут воздействия H₂O₂ (Burova et al., 2013). Отметим, что предыдущие попытки обратить H₂O₂-индуцированное старение эмСК ингибиторами p38 MAPK — SB203580 и BIRB796 — были успешными (Borodkina et al., 2014; Бородкина и др., 2016).

Действие 200 нМ Rapa в течение 3 сут после индукции старения приводило к полному ингибированию фосфорилирования основных мишеней mTORC1 — S6K и S6 — при значительном снижении уровня фосфорилирования белка 4E-BP1 по сравнению и с контрольными, и с H₂O₂-обработанными клетками, что свидетельствует о подавлении активности mTORC1-сигнального пути (рис. 1, в). Наличие фосфорилированной формы белка 4E-BP1 в Rapa-обработанных эмСК можно объяснить тем обстоятельством, что в условиях длительной обработки клеток ингибитором (в течение 3 сут) появляется Rapa-устойчивая форма 4E-BP1 (Choo et al., 2008).

Для выявления роли mTORC1 в развитии старения H₂O₂-стимулированных эмСК оценивали влияние Rapa на маркеры старения. Как известно, основным признаком

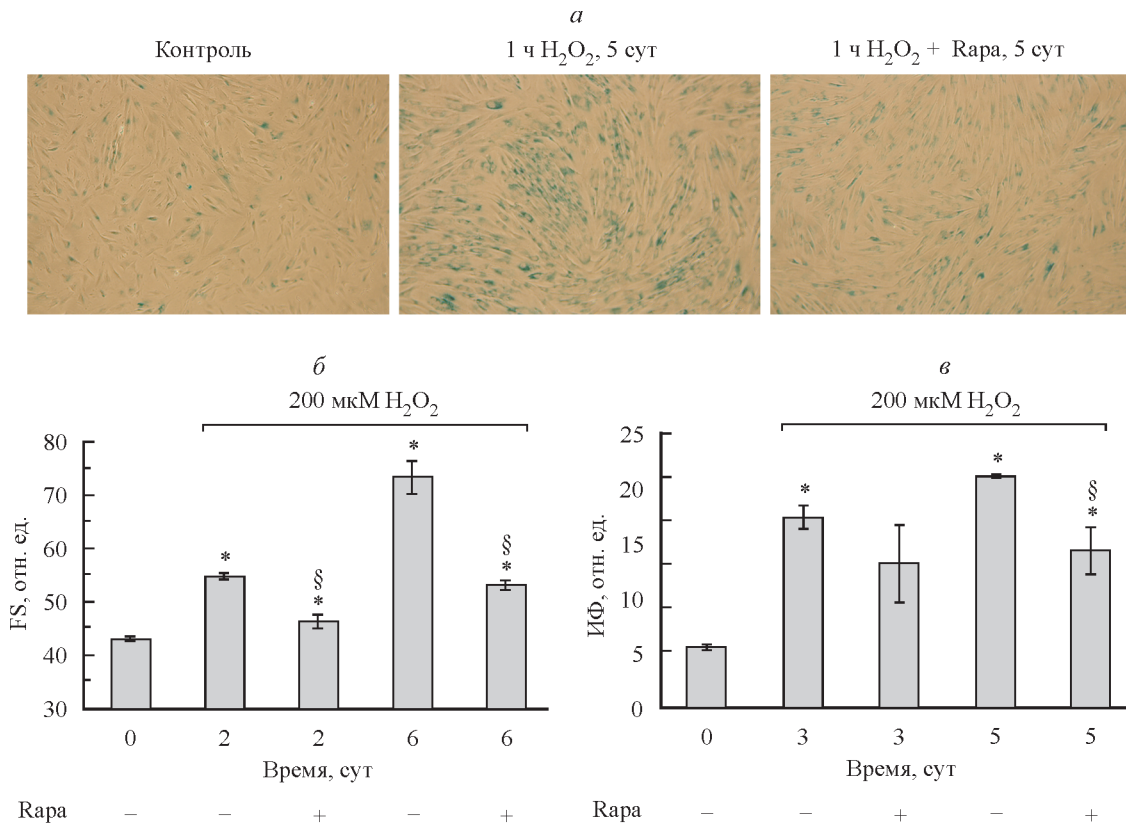


Рис. 2. Модуляция признаков преждевременного старения в H₂O₂-стимулированных эМСК при действии Rapa.

a — выявление активности SA-β-Gal в контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂ + Rapa)-обработанных клетках. *б* — средний размер клеток, определенный по прямому светорассеянию клеток (FS, проточная цитометрия). *в* — интенсивность флуоресценции (ИФ) АФК-зависимого зонда H₂-DCF-DA (проточная цитометрия). Клетки обрабатывали, как указано в подписи к рис. 1. Различия достоверны при $P < 0.5$ по сравнению с контролем (*) и с H₂O₂-обработанными клетками (§).

старых клеток является блок клеточного цикла и как следствие — остановка пролиферации, что было продемонстрировано в наших предыдущих исследованиях в отношении H₂O₂-обработанных эМСК (Burova et al., 2013). Эффект Rapa на модуляцию пролиферативного потенциала H₂O₂-обработанных клеток, находящихся в состоянии ареста клеточного цикла, определяли с помощью метода проточной цитометрии. Поскольку кривые роста H₂O₂- и (H₂O₂+Rapa)-обработанных клеток в течение всего периода наблюдения практически полностью совпали, для большей наглядности результаты представлены в виде гистограммы (рис. 1, б). Таким образом, перманентное ингибирование mTORC1 в течение 6 сут не приводит к восстановлению пролиферации H₂O₂-обработанных (старых) эМСК.

Этот факт согласуется с результатами иммуноблотинга, согласно которым уровень фосфорилирования компонентов сигнальных путей p53/p21/Rb и p38/MK-2/Rb, опосредующих арест клеточного цикла в эМСК, не изменялся через 3 сут после окислительного стресса в присутствии Rapa по сравнению с H₂O₂-стимулированными клетками (рис. 1, г, д). В связи с отсутствием влияния Rapa на активность компонентов путей p53/p21/Rb и p38/MK-2/Rb можно полагать, что mTORC1 не участвует в регуляции их функциональной активности.

Наряду с арестом клеточного цикла важным признаком старых клеток является изменение их фенотипических характеристик — увеличение размера, уплощение и

избыточная вакуолизация клеток, а также усиление биогенеза лизосом, что приводит к повышению активности SA-β-Gal (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). При культивировании эМСК после окислительного воздействия мы наблюдали типичные изменения морфологии, которые выражались в увеличении размера и вакуолизации клеток. С целью оценки влияния Rapa на фенотип старения H₂O₂-стимулированных эМСК мы исследовали изменение размера клеток и SA-β-Gal-окрашивания в условиях блокирования mTORC1-пути. Влияние Rapa на модуляцию размера клеток оценивали через 2 и 6 сут после окислительного стресса. Как показано на рис. 2, б, действие Rapa приводило к предотвращению увеличения размера H₂O₂-обработанных клеток.

Уровень активности SA-β-Gal анализировали через 5 сут в H₂O₂-обработанных эМСК (популяция старых клеток) и в (H₂O₂+Rapa)-обработанных клетках. На рис. 2, а видно, что ингибирование mTORC1 вызвало значительное уменьшение интенсивности окраски и количества SA-β-Gal-окрашенных клеток в популяции. Результаты экспериментов позволяют утверждать, что mTORC1 вовлекается в регуляцию развития фенотипа старения H₂O₂-стимулированных эМСК.

В предыдущих исследованиях мы установили, что процесс H₂O₂-индуцированного старения эМСК сопровождается повышенной генерацией АФК. Было интересно выяснить, какое влияние оказывает Rapa на уровень эндогенных АФК в H₂O₂-стимулированных клетках. На рис. 2, в показано, что в условиях ингибирования

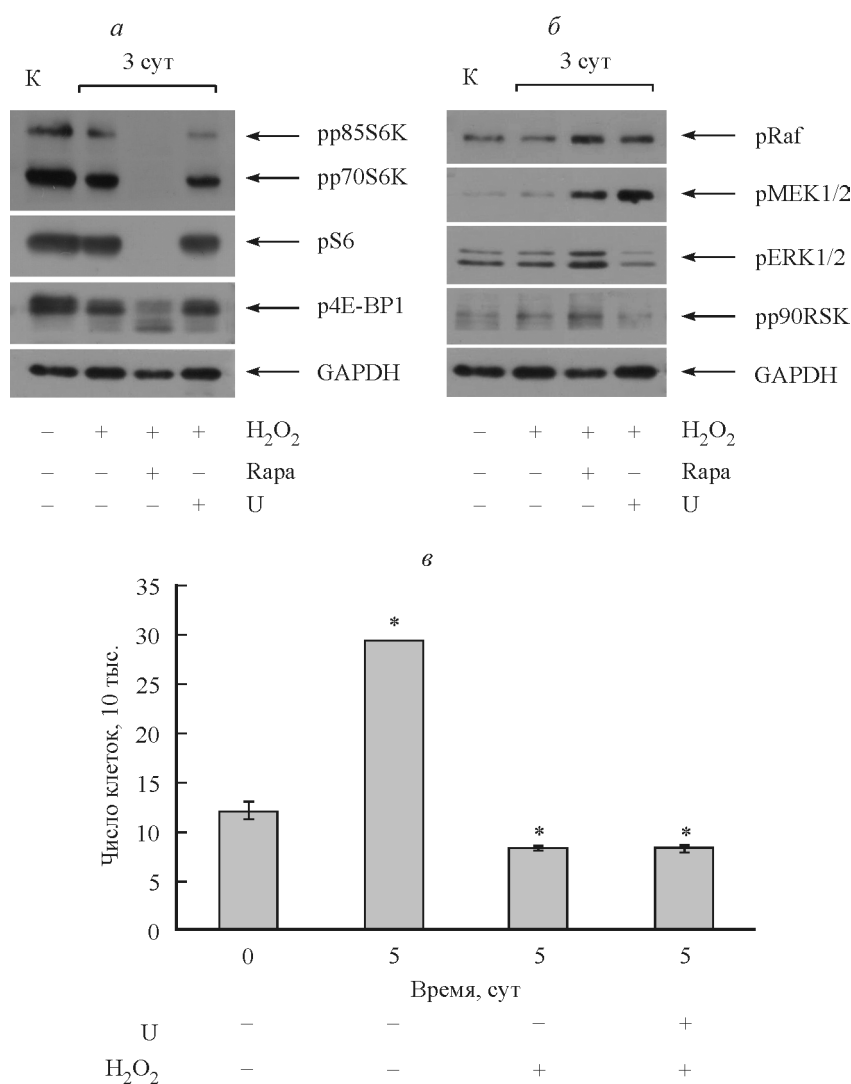


Рис. 3. Влияние Rapa (200 нМ) и U0126 (U, 10 мкМ), специфического ингибитора киназ MEK1/2, на mTORC1- и MEK/ERK-пути в старых ЭМСК.

Фосфорилированные формы белков (показаны стрелками) mTORC1- (а) и ERK-зависимых (б) сигнальных каскадов в присутствии ингибиторов выявляли с помощью специфических антител; в — гистограмма, отражающая данные кривых роста контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂ + U)-обработанных клеток. Старение индуцировали 1-часовым действием 200 мкМ H₂O₂. К — контроль. Различия достоверны при P < 0.5 по сравнению с контролем (*).

mTORC1 через 3 и 5 сут после индукции старения заметно уменьшается продукция АФК по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками. Полученные данные указывают на участие mTORC1 в регуляции генерации АФК в старых ЭМСК.

Суммируя результаты экспериментов с использованием Rapa, можно сделать вывод о том, что при условии длительной обработки H₂O₂-стимулированных клеток Rapa модулирует клеточный фенотип, ассоциированный со старением, но не восстанавливает пролиферативный потенциал старых ЭМСК. Описанные в литературе эффекты Rapa в контексте преждевременного старения клеток очень сильно варьируют, в первую очередь в зависимости от типа клеток, а также от метода индукции старения (Xu et al., 2014). Наблюдаемые эффекты Rapa: уменьшение активности SA-β-Gal и предотвращение остановки пролиферации при неизменной морфологии (эпителиальные клетки ARPE-19, H₂O₂) (Demidenko et al., 2009b); уменьшение только активности SA-β-Gal (фибросаркома HT1080-p21, IPTG) (Demidenko, Blagosklonny,

2008); частичное предотвращение появления фенотипа старения (фибробласты легкого WI-38, doxorubicin) (Demidenko, Blagosklonny, 2008); супрессия экспрессии p21 и IL-8, при неснижающейся активности SA-β-Gal (фибробласты кожи BJ, репликативное старение) (Kolesnichenko et al., 2012).

Влияние mTOR на ERK-зависимый MAP-киназный путь. Ранее мы показали, что процесс старения H₂O₂-стимулированных ЭМСК сопровождается взаимной негативной регуляцией между p53/p21- и MAP-киназными сигнальными путями, в том числе ERK (Дерябин и др., 2015). На следующем этапе работы исследовали возможную роль mTORC1 в регуляции каскада Raf/MEK/ERK/p90RSK в старых ЭМСК. Для этой цели использовали специфические ингибиторы — Rapa (200 нМ) и U0126 (10 мкМ) — для подавления активности киназ mTOR (в составе комплекса mTORC1) и ERK1/2 соответственно. В качестве положительного контроля проверили влияние U0126 на уровень активации каскада Raf/MEK/ERK/p90RSK: ингибитор блокировал

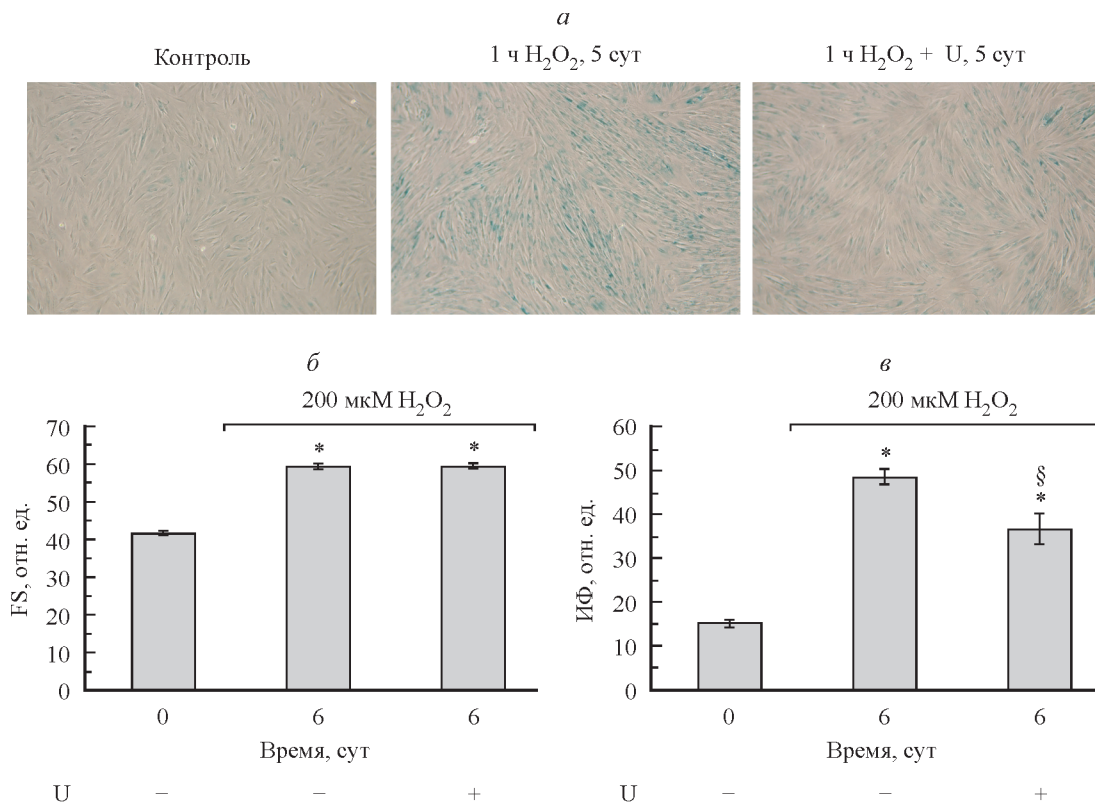


Рис. 4. Изменение активности SA-β-Gal (*a*), размера клеток (*б*) и уровня внутриклеточных АФК (*в*) в H₂O₂-обработанных ЭМСК при действии U0126 (U, 10 мкМ).

в — см. объяснение в подписи к рис. 2. Различия достоверны при $P < 0.5$ по сравнению с контролем (*) и с H₂O₂-обработанными клетками (§).

фосфорилирование киназ ERK1/2 и p90RSK; при этом уровень фосфорилирования киназ Raf и MEK1/2 повышался в соответствии с принципом обратной связи (рис. 3, б).

Согласно результатам иммуноблотинга, Rara-зависимое ингибирование активности mTORC1 в H₂O₂-обработанных клетках индуцировало усиление активации всех участников каскада Raf/MEK/ERK/p90RSK через 3 сут после индукции старения (рис. 3, б). Следовательно, mTORC1 является негативным регулятором ERK-зависимого MAP-киназного пути в старых ЭМСК. Эта находка представляется вполне логичной, поскольку ERK-зависимый путь позиционируется в нормальных клетках в большинстве случаев как опосредующий клеточную пролиферацию, а в старых клетках при аресте клеточного цикла этот путь должен быть блокирован. Подобный эффект Rara, усиливающий активность ERK через S6K/PI3K/Ras-зависимую петлю обратной связи, был обнаружен как в нормальных, так и в раковых клетках (Cargaceto et al., 2008). Однако по другим данным (Soares et al., 2013), Rara не оказывал стимулирующего эффекта на киназы ERK1/2 в раковых клетках. Не исключено, что такое противоречие связано со специфичностью использованных линий клеток.

Вклад ERK 1/2 в регуляцию mTOR-пути. Чтобы оценить влияние MAP-киназы ERK1/2 на функциональную активность белков mTORC1-каскада, H₂O₂-обработанные клетки культивировали в среде, содержащей 10 мкМ U0126. Как демонстрируют результаты иммуноблотинга, через 3 сут после индукции старения уровень фосфорилирования белков S6 и 4E-BP1 почти не изменя-

ется по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками, при этом наблюдается лишь небольшое снижение фосфорилирования обеих форм S6K — p85 и p70 (рис. 3, а). Таким образом, перманентное подавление активности ERK1/2 оказывает очень слабое влияние на активность компонентов сигнального каскада mTORC1 в старых ЭМСК. Этот факт пока не вписывается в современные представления о позитивном влиянии MEK/ERK/p90RSK на статус активации mTOR (Martelli et al., 2010).

Как было продемонстрировано выше, увеличение размера и активности SA-β-Gal старых ЭМСК контролируется посредством mTORC1 (рис. 2, а, б). При отсутствии влияния ERK1/2 на активность mTOR-пути (рис. 3, а) можно было ожидать, что блокирование активности ERK1/2 не отразится на размере H₂O₂-обработанных ЭМСК, а также на активности SA-β-Gal в этих клетках. Действительно, мы не наблюдали какого-либо влияния U0126 на изменение размера старых клеток (рис. 4, б). Однако довольно неожиданным оказался тот факт, что культивирование H₂O₂-обработанных ЭМСК в присутствии U0126 приводит к значительному уменьшению числа SA-β-Gal-окрашенных клеток через 5 сут после индукции старения (рис. 4, а). Более того, уровень АФК в старых клетках тоже снижался при подавлении активности ERK (рис. 4, в). В свете этих данных можно предположить, что отдельные фенотипические признаки старых ЭМСК, в частности повышенная активность SA-β-Gal, коррелируют с активностью MAP-киназ ERK1/2.

Далее мы проанализировали влияние U0126 на пролиферативную активность H₂O₂-обработанных ЭМСК. Как видно на рис. 3, в, кривые роста H₂O₂- и (H₂O₂ + U)-обра-

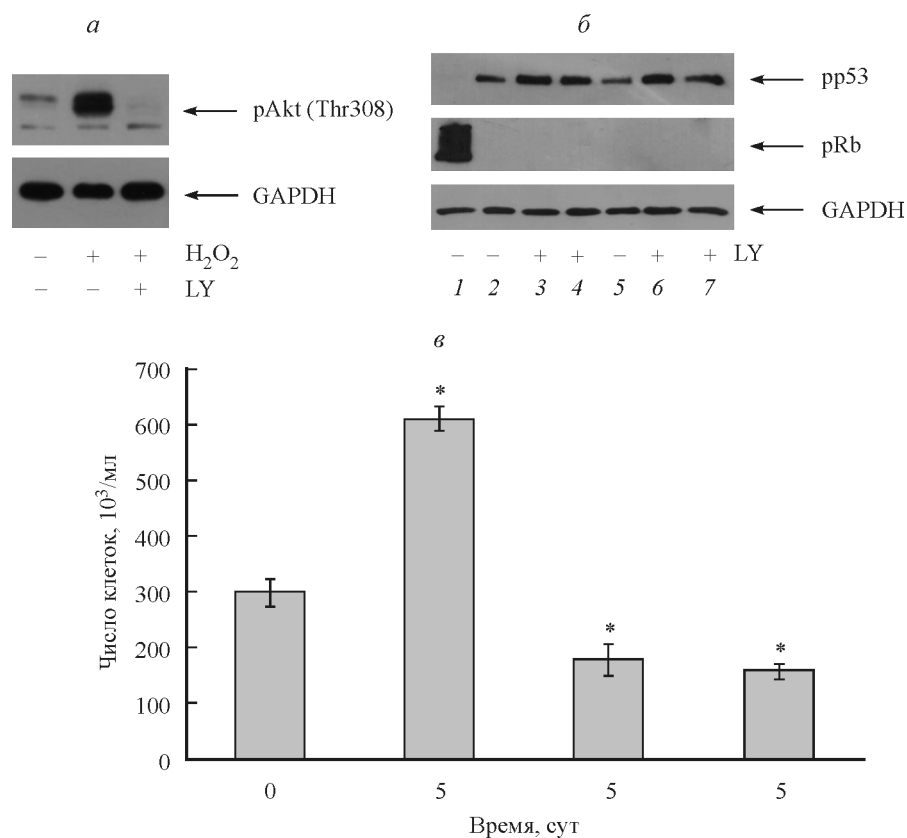


Рис. 5. Ингибирование PI3K/Akt стимулирует активацию p53-зависимого сигнального пути и не влияет на пролиферативный потенциал старых ЭМСК.

а — уровень фосфорилирования киназы Akt по Thr308 (иммуноблот, *стрелка*) в клетках, стимулированных в течение 30 мин 200 мкМ H₂O₂ без и с предварительной обработкой LY294002 (LY, 20 мкМ). *б* — фосфорилированные белки p53 и Rb (иммуноблот, *стрелки*); *дорожки*: 1 — контроль, 2, 5 — H₂O₂ в течение 1 ч, 3, 6 — 40 мин LY перед добавлением H₂O₂ с последующим его присутствием в течение 3 или 5 сут соответственно, 4, 7 — присутствие LY в среде после 1-часового действия H₂O₂ в течение 3 или 5 сут соответственно. *в* — кривая роста контрольных, H₂O₂- и (H₂O₂ + LY)-обработанных клеток (LY вводили в среду после 1-часового действия H₂O₂). Различия достоверны при *P* < 0.5 по сравнению с контролем (*).

ботанных клеток через 6 сут после индукции старения полностью совпадают, что свидетельствует об отсутствии модулирующего влияния ингибитора на пролиферацию H₂O₂-стимулированных клеток, которые находятся в состоянии ареста клеточного цикла. Таким образом, в H₂O₂-стимулированных клетках при деактивации ERK1/2 наблюдается значительное снижение активности SA-β-Gal и уровня продукции внутриклеточных АФК, но функциональная активность mTORC1-каскада, размер клеток и пролиферативный потенциал не претерпевают изменений по сравнению с H₂O₂-обработанными ЭМСК.

Вклад PI3K/Akt в регуляцию mTOR-пути. В нормальных и опухолевых клетках сигнальный путь mTOR регулируется по крайней мере двумя ключевыми киназами — Akt/PKB и ERK1/2, причем модуляция активности каждой из них может привести к изменениям в функционировании mTOR-пути в процессе как репликативного, так и стрессиндуцированного клеточного старения, а также в ходе канцерогенеза. Для проверки предположения об участии киназ mTOR-пути Akt/PKB и ERK1/2 в регуляции mTOR-пути в ЭМСК использовали фармакологические ингибиторы LY и U0126 в условиях пролонгированного действия на H₂O₂-обработанные клетки. Проанализировали также действие каждого из этих соединений на маркеры клеточного старения.

Киназа Akt/PKB, будучи компонентом PI3K/Akt/mTOR-сигнального каскада, при действии внешних стимулов фосфорилируется по Thr308 посредством PI3K с последующей активацией mTORC1 и (или) фосфорилируется по Ser473 mTORC2-зависимым образом, что требуется для полной активации Akt/PKB. Предобработка ЭМСК с помощью 20 мкМ LY вызывала полное ингибирование H₂O₂-индуцированного фосфорилирования Akt по Thr308 (рис. 5, *а*), что свидетельствует о специфичности действия ингибитора в использованной концентрации. Действие ингибитора в течение 3—5 сут после индукции старения приводило к практически полной деактивации мишеней mTORC1, S6K и S6, по сравнению как с контрольными, так и с H₂O₂-обработанными (старыми) клетками (рис. 6, *б*). В связи с этим мы предположили, что киназа Akt/PKB через mTOR-путь может осуществлять контроль над фенотипом старых ЭМСК. Анализ изменения фенотипических признаков показал, что длительное действие LY на H₂O₂-обработанные ЭМСК препятствует развитию гипертрофии клеток (рис. 6, *в*) и увеличению числа клеток, окрашенных на SA-β-Gal (рис. 6, *а*). Отметим, что эффективность RapA (рис. 2, *а, б*) и LY (рис. 6, *а, в*) в отношении замедления развития фенотипа старения H₂O₂-стимулированных ЭМСК была идентичной. Ингибирование активности Akt/PKB не спасало H₂O₂-стимулированные клетки от необратимого аре-

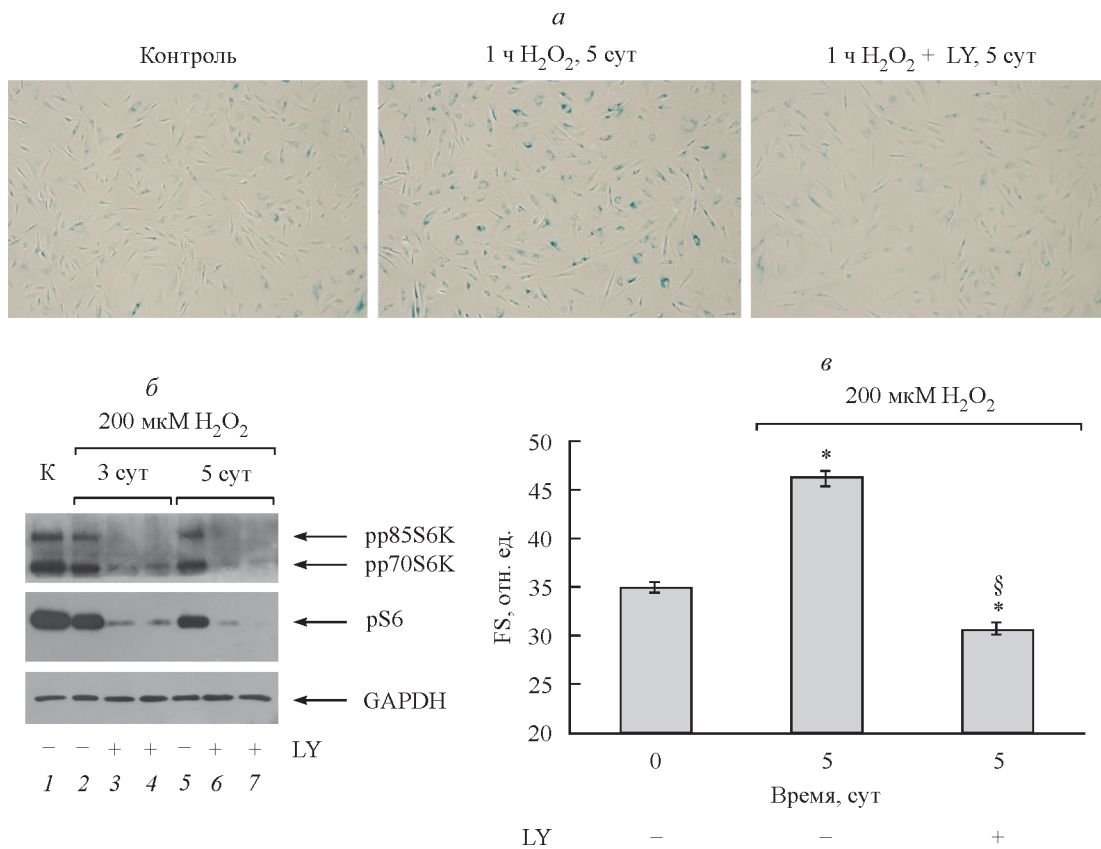


Рис. 6. Ингибитор LY уменьшает функциональную активность SA-β-Gal (*а*) и mTORC1-пути (*б*) в H₂O₂-обработанных ЭМСК, а также размер клеток (*в*).

Условия обработки клеток: *а*, *в* — LY вводили в среду после 1-часового действия H₂O₂; *б* — см. объяснение в подписи к рис. 5, *б*. Различия достоверны при $P < 0.5$ по сравнению с контролем (*) и с H₂O₂-обработанными клетками (§).

ста пролиферации, как показывает анализ кривых роста (рис. 5, *в*). В этом случае перманентный блок клеточного цикла был обусловлен повышенной функциональной активностью p53-зависимого пути по сравнению с контрольными клетками (рис. 5, *б*), как и в экспериментах с Rapa (рис. 1, *з*). В силу того, что ни Rapa, ни LY не уменьшали активность p53/p21/Rb в H₂O₂-обработанных клетках, они были не способны модулировать их пролиферативный статус.

Обобщая полученные результаты, мы заключаем, что ни одно из изученных соединений (Rapa, U0126 и LY), ингибирующих mTOR-, ERK- и PI3K-опосредованные сигнальные пути в ЭМСК, при постоянном присутствии в среде не предотвращает H₂O₂-индуцированного необратимого ареста клеточного цикла. В литературе описан феномен частичного восстановления клеточной пролиферации через 10 сут после удаления Rapa из инкубационной среды (Demidenko et al., 2009b), однако в наших экспериментальных условиях не удалось достичь такого эффекта в отношении пролиферативного статуса ЭМСК.

Длительное действие каждого из ингибиторов (для LY данные не показаны) приводило к подавлению генерации внутриклеточных АФК, что указывает на участие mTORC1, ERK и PI3K в регуляции уровня АФК при старении ЭМСК. Эти находки дополняют результаты наших исследований, в которых были доказаны необходимость повышенного уровня АФК для стабилизации H₂O₂-индуцированного старения ЭМСК и важная роль p38MAPK в

контроле АФК-зависимой активации ответа на повреждение ДНК (Borodkina et al., 2014). В настоящей работе мы продемонстрировали, что основные фенотипические характеристики, связанные с клеточным старением (размер клеток и активность SA-β-Gal), подвержены модуляции в зависимости от влияния ингибиторов на соответствующие сигнальные пути. Rapa и LY, эффективно ингибируя функциональную активность mTORC1, препятствовали развитию клеточной гипертрофии и увеличению активности SA-β-Gal в H₂O₂-обработанных клетках. Такие факты однозначно свидетельствуют о вовлеченности mTOR-пути (на уровне контроля фенотипа старения) в реализацию программы преждевременного старения ЭМСК при окислительном стрессе и согласуются с многочисленными литературными данными о ключевой роли mTOR в старении клеток различных типов.

При оценке влияния ERK-зависимого MAPK-пути на фенотипические характеристики старения ЭМСК был обнаружен необычный эффект U0126, отличный от эффектов Rapa и LY. Так, супрессия активности ERK1/2 в H₂O₂-обработанных клетках не влияла на активность мишеней mTORC1, не препятствовала появлению гипертрофии, но наряду с этим приводила к значительному уменьшению интенсивности окраски на SA-β-Gal и количества окрашенных клеток в популяции по сравнению с H₂O₂-стимулированными ЭМСК. Это позволяет предполагать существование корреляции между активностями лизосом и ERK1/2 MAP-киназ. Но в таком случае вряд ли можно обоснованно говорить об участии ERK-пути

в контроле фенотипа старения через mTORC1. Тем не менее, если принять во внимание существование mTOR-опосредованной негативной регуляции каскада Raf/MEK/ERK/p90RSK, тезис о взаимодействии сигнальных путей mTOR и ERK1/2 MAPK в старых ЭМСК остается на повестке дня.

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

Список литературы

- Бородкина А. В., Шатрова А. Н., Никольский Н. Н., Бурова Е. Б. 2016. Роль MAP-киназы p38 в развитии стресс-индуцированного старения эндометриальных стволовых клеток человека. Цитология. 58 (6): 429—435. (Borodkina A. V., Shatrova A. N., Nikolsky N. N., Burova E. B. 2016. Role of p38 MAP-kinase in the stress-induced senescence progression of human endometrium-derived mesenchymal stem cells. Tsitologiya. 58 (6): 429—435.)
- Дерябин П. И., Бородкина А. В., Никольский Н. Н., Бурова Е. Б. 2015. Взаимное влияние p53/p21/Rb и MAP-киназных сигнальных путей в эндометриальных стволовых клетках человека в условиях окислительного стресса. Цитология. 57 (11): 788—795. (Deryabin P. I., Borodkina A. V., Nikolsky N. N., Burova E. B. 2015. Relationship between p53/p21/Rb and MAPK signaling pathways in human endometrium-derived stem cells under oxidative stress. Tsitologiya. 57 (11): 788—795.)
- 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. 53 (12): 919—929. (Zemelko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artzibasheva I. V., Zenin V. V., Kirsanov A. A., Bichevaia N. K., Korsak V. S., Nikolsky N. N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. 53 (12): 919—929.)
- Зубова С. Г., Шутикова Ж. В., Поспелова Т. В. 2012. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке. Цитология. 54 (8): 589—602. (Zubova S. G., Shitikova Zh. V., Pospelova T. V. 2012. TOR-centric concept of regulation mitogenic, metabolic and energetic signal processing in cell. Tsitologiya. 54 (8): 589—602.)
- Blagosklonny M. V. 2009. Aging-suppressants: cellular senescence (hyperactivation) and its pharmacologic deceleration. Cell Cycle. 8: 1883—1887.
- Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. Aging. 6: 481—495.
- Borodkina A. V., Shatrova A. N., Deryabin P. I., Grukova A. A., Nikolsky N. N., Burova E. B. 2016. Tetraploidization or autophagy: the ultimate fate of senescent human endometrial stem cells under ATM or p53 inhibition. Cell Cycle. 15 (1): 117—127.
- Brandl A., Meyer M., Bechmann V., Nerlich M., Angele P. 2011. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. Exp. Cell Res. 317 (11): 1541—1547.
- 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. 2013: 474931.
- Campisi J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. Annu. Rev. Physiol. 75: 685—705.
- Campisi J., d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8: 729—740.
- Carracedo A., Ma L., Teruya-Feldstein J., Rojo F., Salmena L., Alimonti A., Egia A., Sasaki A. T., Thomas G., Kozma S. C., Papa A., Nardella C., Cantley L. C., Baselga J., Pandolfi P. P. 2008. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. J. Clin. Invest. 118: 3065—3074.
- Chappell W. H., Steelman L. S., Long J. M., Kempf R. C., Abrams S. L., Franklin R. A., Bäsecke J., Stivala F., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Mazarino M. C., Nicoletti F., Libra M., Maksimovic-Ivanic D., Mijatovic S., Montalto G., Cervello M., Laidler P., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Evangelisti C., Cocco L., Martelli A. M., McCubrey J. 2011. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. Oncotarget. 2: 135—164.
- Choo A. Y., Blenis J. 2009. Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. Cell Cycle. 8 (4): 567—572.
- Choo A. Y., Yoon S. O., Kim S. G., Roux P. P., Blenis J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105: 17 414—17 419.
- Demidenko Z. N., Blagosklonny M. V. 2008. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. Cell Cycle. 7: 3355—3361.
- Demidenko Z. N., Shtutman M., Blagosklonny M. V. 2009a. Pharmacologic inhibition of MEK and PI-3K converges on the mTOR/S6 pathway to decelerate cellular senescence. Cell Cycle. 8: 1896—1900.
- Demidenko Z. N., Zubova S. G., Bukreeva E. I., Pospelov V. A., Pospelova T. V., Blagosklonny M. V. 2009b. Rapamycin decelerates cellular senescence. Cell Cycle. 8: 1888—1895.
- Foster K. G., Fingar D. C. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR) conducting the cellular signaling symphony. J. Biol. Chem. 285: 14 071—14 077.
- Gharibi B., Farzadi S., Ghuman M., Hughes F. J. 2014. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells. Stem Cells. 32 (8): 2256—2266.
- Hay N., Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. Genes Develop. 18: 1926—1945.
- Huang J., Manning B. D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and two mTOR complexes. Biochem. Soc. Transactions. 37: 217—222.
- Julien L.-A., Carriere A., Moreau J., Roux P. P. 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. Mol. Cell. Biol. 30: 908—921.
- Kim J.-S., Kim E.-J., Kim H.-J., Yang J.-Y., Hwang G.-S., Kim C.-W. 2011. Proteomic and metabolomic analysis of H₂O₂-induced premature senescent human mesenchymal stem cells. Exp. Gerontol. 46: 500—510.
- Ko E., Lee K. Y., Hwang D. S. 2012. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. Stem Cells Develop. 21: 1877—1886.
- Kolesnichenko M., Hong L., Liao R., Vogt P. K., Sun P. 2012. Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic RAS-induced senescence. Cell Cycle. 11: 2391—2401.
- Laplante M., Sabatini D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. Cell. 149: 274—293.
- Loewith R., Jacinto E., Wullschlegel S., Lorberg A., Crespo J., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M. N. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Mol. Cell. 10: 457—468.
- López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. Cell. 153: 1194—1217.
- Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Pandolfi P. P. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. Cell. 121: 179—193.

- Ma X. M., Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10 : 307—318.
- Malaquin N., Martinez A., Rodier F. 2016. Keeping the senescence secretome under control: molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp. Gerontol.* 82 : 39—49.
- Manning B. D., Tee A. R., Logsdon M. N., Blenis J., Cantley L. C. 2002. Identification of the tuberous sclerosis complex—2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell.* 10 : 151—162.
- Martelli A. M., Evangelisti C., Chiarini F., McCubrey J. A. 2010. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget.* 1 : 89—103.
- Mendoza M. C., Er E. E., Blenis J. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 36 (6) : 320—328.
- Russell R. C., Fang C., Guan K.-L. 2011. An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. *Development.* 138 : 3343—3356.
- Sarbassov D. D., Ali S. M., Sabatini D. M. 2005a. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 : 596—603.
- Sarbassov D. D., Ali S. M., Sengupta S., Sheen J. H., Hsu P. P., Bagley A. F., Markhard A. L., Sabatini D. M. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell.* 22 : 159—168.
- Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M., Sabatini D. M. 2005b. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307 : 1098—1101.
- Soares H. P., Ni Y., Kisfalvi K., Sinnott-Smith J., Rozengurt E. 2013. Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. *PLoS ONE.* 8 (2) : e57289.
- Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Kempf R. C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M. C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Basecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli A. M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J. A. 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY).* 3 : 192—222.
- Turinetto V., Vitale E., Giachino C. 2016. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 17 pii: E1164. Doi: 10.3390/ijms17071164.
- Wullschleger S., Loewith R., Hall M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124 : 471—484.
- Xu S., Cai Y., Wei Y. 2014. mTOR signaling from cellular senescence to organismal aging. *Aging Dis.* 5 (4) : 63—73.

Поступила 8 II 2017

MODULATION OF SENESCENCE PHENOTYPE OF HUMAN ENDOMETRIAL STEM CELLS UNDER INHIBITION OF mTOR AND MAP-KINASE SIGNALING PATHWAYS

A. A. Grukova,¹ A. N. Shatrova,¹ P. I. Deryabin,¹ A. V. Borodkina,¹ N. A. Knyazev,^{1,2}
N. N. Nikolsky,^{1,3} E. B. Burova^{1,*}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² St. Petersburg Academic University-Nanotechnology Research and Education Centre RAS, St. Petersburg, 194021, and

³ Department of Medical Physics, St. Petersburg State Polytechnical University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: lenbur87@mail.ru

Human endometrium-derived mesenchymal stem cells (hMESC) subjected to sublethal oxidative stress enter the premature senescence. To prevent the premature senescence of cells, it is necessary to block the activity of signaling pathways involved in the senescence program. Here, we studied the effects of permanent inhibition of PI3K/Akt/mTOR and ERK1/2 MAPK pathways for the restoration of proliferative potential and modulation of the senescence phenotype in H₂O₂-treated hMESC. The specific pharmacological inhibitors of mTORC1, MEK/ERK and PI3K/Akt (rapamycin, U0126 and LY294002, respectively) were used. It was found that all inhibitors are able to change the senescence phenotype of stressed cells, including cell hypertrophy, increased both ROS level and activity of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) but not to recommence the cell proliferation. In H₂O₂-treated cells, rapamycin and LY294002 effectively prevented cell hypertrophy and an increase in SA- β -Gal activity, whereas U0126 also could prevent magnification of SA- β -Gal activity but was not capable to rescue cells from hypertrophy. Under any inhibitor, the intracellular ROS levels elevated in the senescent cells were suppressed. Of note, the long-term post-treatment with any inhibitor did not result in the recovery proliferative potential in H₂O₂-stimulated cells. In senescent cells, there are the mutual links between mTOR and MAP-kinases: p38 or ERK1/2 inhibition did not alter the functional activity of mTORC1 signaling, whereas suppression of the latter caused a strong activation of components of Raf/MEK/ERK/p90RSK pathway but had no effect on p38/MK-2/Rb. Thus, mTORC1 is a negative regulator ERK-, but not p38-dependent MAP-kinase pathway in senescent hMESC.

Key words: mTOR, MAP-kinases, rapamycin, endometrial stem cells, premature senescence, oxidative stress.