

УДК 576.32.36

## ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕАКЦИЕЙ НА ГИПОКСИЮ, В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА

© 2019 А.Ю. Ратушный, Ю.В. Рудимова, Л.Б. Буравкова\*

Институт медико-биологических проблем РАН, 123007 Москва,  
Россия; электронная почта: buravkova@imbp.ru

Поступила в редакцию 09.11.2018

После доработки 04.12.2018

Принята к публикации 04.12.2018

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются одной из популяций стволовых клеток взрослого организма, способной модулировать функциональный статус окружающих тканей. Однако при достижении состояния клеточного старения биологическая активность МСК изменяется, что может стать причиной изменения тканевого гомеостаза. Известно, что снижение уровня кислорода в условиях *in vitro* до физиологических значений, характерных для ниши данной популяции клеток, способствует смягчению некоторых морфофункциональных изменений, ассоциированных со старением. Целью данной работы являлось изучение экспрессии генов МСК, ассоциированных с реакцией на гипоксию, на модели репликативного старения с использованием физиологического (5%) и атмосферного (20%) уровней кислорода при культивировании. Согласно полученным данным, значимое снижение пролиферативных свойств МСК происходит после 20 пассажей, что составляет ~50 клеточных делений. Вне зависимости от уровня кислорода в сенесцентных клетках повышалась экспрессия генов *PKM2*, *SERPINE1*, *VEGFA* и снижалась экспрессия генов *ANKRD37*, *DDIT4*, *HIF1A*, *TXNIP*. Помимо этого в гипоксических условиях обнаружено уменьшение количества мРНК генов *ADORA2B*, *VN1PL*, *CCNG2*, *EGLN1*, *MAP3K1*, *MX11* и *P4HA1*. Влияние уровня кислорода как на клеточном, так и на транскрипционном уровнях оказалось более выраженным на ранних пассажах. Независимо от пассажа при гипоксии снижалась экспрессия генов *ANGPTL4*, *GYS1*, *PKM2*, *SERPINE1* и *TP53*. При этом на ранних этапах культивирования дополнительно обнаружено уменьшение количества мРНК *ADM*, *F10*, *HMOX1*, *P4HB*, *PFKL* и *SLC16A3*, а на поздних – мРНК *HK2*. Повышение уровня экспрессии показано лишь для гена *ANKRD37*, причем и на ранних, и на поздних пассажах.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** мезенхимальные стромальные клетки, репликативное старение, уровень кислорода.

**DOI:** 10.1134/S0320972519030084

Увеличение средней продолжительности жизни в экономически развитых странах ставит перед регенеративной медициной вопросы, касающиеся клеточной терапии при заболеваниях, ассоциированных с возрастом. Одним из основных проявлений старения организма является нарушение тканевого гомеостаза, поддерживаемого прогениторными клетками, в т.ч. мезенхимальными стромальными клетками (МСК),

Принятые сокращения: МСК – мезенхимальные стромальные клетки; сенМСК – сенесцентные МСК; HIF – фактор, индуцируемый гипоксией; PD – количество удвоенных клеточных популяций; SA-β-gal – β-галактозидаза, ассоциированная со старением (senescence-associated β-galactosidase); SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением (senescence-associated secretory phenotype).

\* Адресат для корреспонденции.

располагающимися в периваскулярном пространстве. Снижение регенеративной способности тканей коррелирует со снижением функциональной активности этих клеток, с одновременным уменьшением плотности и пластичности микроваскулярного русла. Изменение морфофункциональных характеристик клеточной популяции при последовательных делениях клеток диктует необходимость изучения свойств МСК, понимания механизмов клеточного старения и поиска возможных путей их предотвращения (уменьшения).

Анализ возрастных изменений позволяет выделить девять ключевых признаков старения организма: нестабильность генома, укорочение теломера, эпигенетические альтерации, нарушение протеостаза, нарушение распознавания питательных веществ, митохондриальная дис-

функция, клеточное старение, истощение пула стволовых клеток и изменение межклеточного взаимодействия [1, 2]. Одним из центральных звеньев в процессе старения является клеточное старение (сенесценция) [3]. Данный феномен характеризуется необратимым арестом клеточного цикла и сопровождается выраженными фенотипическими изменениями, включая ремоделирование хроматина, модуляцию метаболизма, усиление аутофагических процессов и продукцию провоспалительных цитокинов [4–6]. Среди наиболее известных маркеров сенесцентного состояния клетки стоит выделить морфологические изменения – уплощение и увеличение размера клетки, повышение активности ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы (SA- $\beta$ -gal) и увеличение частоты возникновения гетерохроматиновых фокусов –  $\gamma$ H2AX [7]. Остановка клеточного деления при сенесценции достигается путем активации сигнальных каскадов супрессоров опухолей p16INK4a/Rb и p53/p21CIP1, которые опосредуют реакцию клетки на повреждения ДНК.

Кроме того, одним из наиболее характерных признаков сенесцентных клеток (и, возможно, наиболее важным с точки зрения старения всего организма) является секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP – senescence-associated secretory phenotype). SASP характеризуется значительным сдвигом паракринной активности и включает сотни секретлируемых факторов, в т.ч. провоспалительные цитокины, хемокины, факторы роста и протеазы [8, 9]. Оценка экспрессии генов сенесцентных МСК показала увеличение количества транскриптов и других секретлируемых факторов, многие из которых обладают провоспалительным действием, включая GRO1, MCP-2, RANTES, GM-CSF, металлопротеазу MMP3 и ICAM-1 [10, 11]. В целом эти данные свидетельствуют о том, что SASP модифицирует паракринную коммуникацию между МСК и их физиологическим/патологическим микроокружением.

На сегодняшний день существует несколько потенциальных подходов поддержания или повышения терапевтической эффективности МСК путем регулирования конкретных факторов, способных повлиять на характеристики МСК, в т.ч. на старение. Для активации эндогенной теломеразы предлагается использовать аспирин, витамин С и цитокин FGF-2 [12]. Перспективным может быть применение антиоксидантов или ингибиторов некоторых сигнальных путей, таких как N-ацетил-L-цистеин (NAC), предшественник глутатиона [13], производные пластохинона (SkQ1), ориентированные на митохондрии

[14, 15]. Модификация условий культивирования, в частности снижение уровня кислорода, может приводить к сходным эффектам [11, 16–20]. Ранее нами было показано, что при длительном культивировании МСК наиболее выраженное увеличение экспрессии маркерных генов клеточного старения (*CCND1*, *SERPINE1*) наблюдается в стандартных условиях (20% O<sub>2</sub>). При этом уменьшается уровень мРНК ингибиторов данного процесса и позитивных регуляторов пролиферации (*ID1*, *IGF1*). Снижение содержания кислорода уменьшает интенсивность проявлений ассоциированных со старением признаков, в т.ч. на уровне экспрессии генов [19, 20]. Хорошо известно, что в реакции клеток на гипоксию ведущую роль играет транскрипционный фактор HIF-1, изменяющий транскрипцию широкого спектра генов [21].

Целью данной работы являлось изучение экспрессии генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, при длительном культивировании МСК в условиях физиологического (5%) и атмосферного (20%) уровней кислорода.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение и культивирование МСК.** МСК выделяли из жировой ткани человека по стандартной методике [22] с модификациями [23]. В исследовании использовали образцы жировой ткани от пяти различных доноров (женщины 35–45 лет), предоставленные в рамках договора Многопрофильной клиникой «Союз» (Москва).

Клетки культивировали в среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) в условиях 5%-ного уровня CO<sub>2</sub>, 37 °С, 100%-ной влажности при содержании кислорода 20% и 5%. Иммунофенотип МСК (CD90<sup>+</sup> CD73<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD29<sup>+</sup> HLA-ABC<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>) [24] подтверждали с помощью соответствующих антител с флуоресцентными метками («BD», США) методом проточной цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 («BD», США). Пассирование осуществляли при 80–90%-ной конфлюентности клеточного слоя. Длительное пассирование культуры продолжали до наступления состояния репликативного старения.

**Число удвоений популяций (PD)** за пассаж (7 дней) подсчитывали по формуле:  $PD = [\log(N/N_0)]/\log 2$ , где N<sub>0</sub> и N – начальное и конечное количество клеток [25]. Затем полученные значения усредняли для нескольких пассажей.

**Распределение популяций МСК** по фазам клеточного цикла оценивали методом проточной

цитофлуориметрии на приборе Accuri C6 («BD», США). Для анализа клетки фиксировали 70%-ным этанолом и в течение 15 мин обрабатывали раствором, содержащим 50 мкг/мл иодида пропидия (PI) и 25 мкг/мл РНКазы А.

**Клоногенную активность МСК** оценивали, высеивая клетки с низкой плотностью на чашки Петри диаметром 35 мм (~100 клеток на чашку). После двух недель культивирования при соответствующем уровне кислорода клетки фиксировали и окрашивали 0,5%-ным раствором кристалл-виолета в метаноле в течение 5 мин.

**Экспрессию SA- $\beta$ -gal** в клетках оценивали с помощью набора Senescence Cells Histochemical Staining Kit («Sigma», США) согласно инструкции производителя. Анализировали пять полей зрения, полученных с использованием светового фазово-контрастного микроскопа Eclipse TiU («Nikon», Япония). Подсчет клеток проводили с помощью программы Sigma ScanPro 5.0 Image Analysis Software («SPSS Inc.», США).

Для определения **уровня экспрессии генов** выделяли тотальную РНК с помощью лизирующего реагента QIAzol («Qiagen», США), после чего проводили реакцию обратной транскрипции с использованием QuantiTect Reverse Transcription Kit («Qiagen», США) согласно инструкциям производителя. Контроль концентрации и чистоты РНК и кДНК в образцах осуществляли при помощи спектрофотометра Nanodrop ND-2000c («Thermo Scientific», США). Полученную кДНК использовали для проведения количественной ПЦР с применением коммерческого реагента RT<sup>2</sup> Real Time SYBR Green/ROX PCR Master Mix («Qiagen», США) и планшетов RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Human Cellular Senescence и RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Human Hypoxia Signaling Pathway («Qiagen», США) с иммобилизованными лиофилизированными праймерами. Для нормализации результатов исследования использовали праймеры для референсных генов (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*), входящие в состав набора. Уровень экспрессии оценивали методом  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [26].

**Статистическую достоверность** различий между группами данных выявляли попарно с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

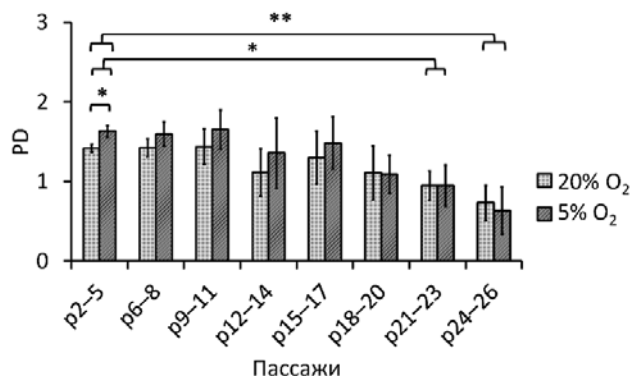
Данное исследование предполагало получение сенесцентных культур МСК *in vitro*, включая подтверждение состояния репликативного старения. Репликативного старения культур достигали путем длительного культивирования

до достижения лимита Хейфлика и появления характерных признаков.

Одним из главных признаков клеточного старения является неспособность клетки к делению, т.е. необратимая потеря ее пролиферативных свойств. Анализ среднего количества удвоенной популяции за пассаж (PD) пяти клеточных линий выявил, что МСК, выделенные из жировой ткани человека, активно делятся в среднем до 21–23 пассажей (~50 клеточных делений), после чего количество удвоений популяции достоверно ( $p < 0,05$ ) снижается (рис. 1). Данный факт не только указывает на приобретение соответствующего фенотипа стареющих клеток, но и является одним из главных свидетельств отсутствия спонтанной иммортализации. Также полученные данные показали значительные индивидуальные различия в зависимости от донора МСК, поэтому во всех дальнейших экспериментах использовали клетки поздних пассажей (p19–28), для которых предварительно подтверждали значительное снижение пролиферативной активности, указывающее на достижение сенесцентного состояния.

Постоянное культивирование клеток в условиях с физиологическим уровнем кислорода (5%) приводило к увеличению среднего PD на ранних этапах культивирования (рис. 1). При более длительном пассировании клеток эффект влияния уровня кислорода не был статистически подтвержден, но тенденция сохранялась.

Такой параметр, как количество удвоений популяции, может зависеть от двух основных факторов – пролиферативной активности клеток и клеточной гибели. Ранее мы показали, что в сенесцентных культурах МСК в несколько раз увеличивается доля поврежденных клеток по сравнению с «молодыми», при этом снижение уровня кислорода до физиологических значе-



**Рис. 1.** Среднее количество удвоений клеточных популяций МСК по пассажам (PD) при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Данные представлены как  $M \pm SEM$ ;  $n \geq 5$ ; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

ний позволяло уменьшить долю клеточной гибели как на ранних, так и на поздних пассажах [20].

Пролиферативный потенциал культуры МСК оценивали по ряду параметров, включая распределение МСК по фазам клеточного цикла, клонотипную активность и накопление клеток с активной SA-β-gal.

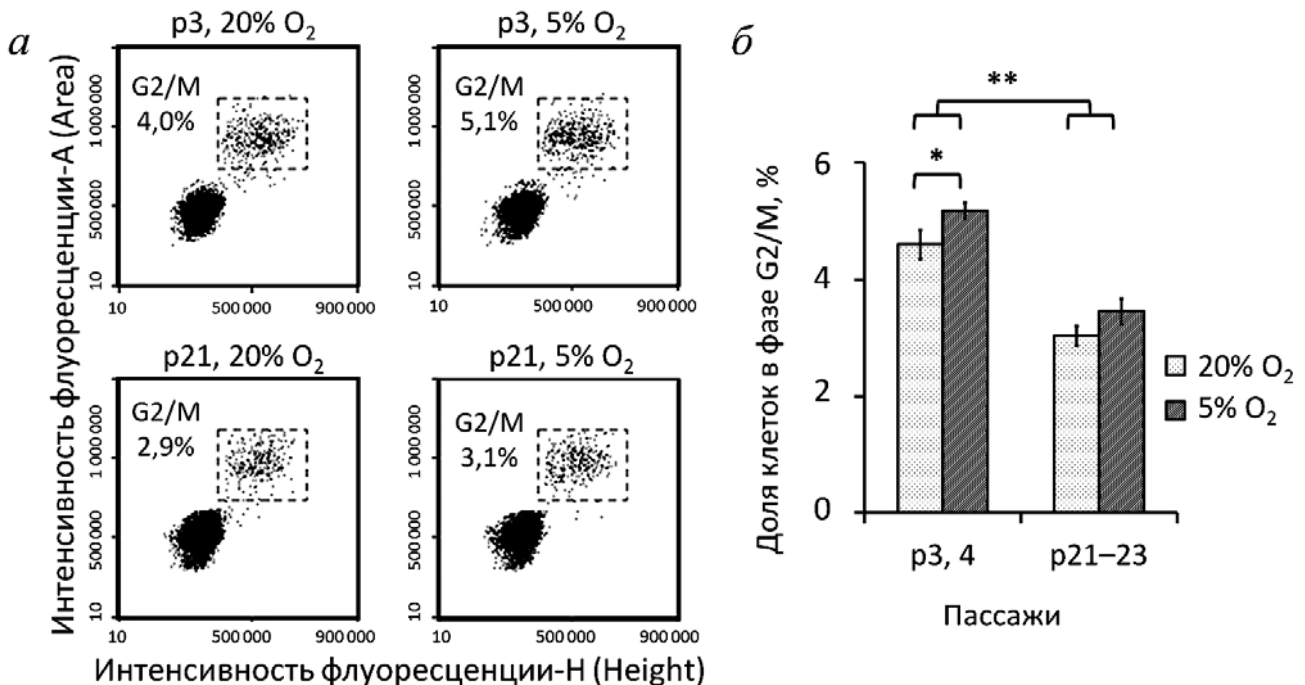
Популяция МСК, в т.ч. выделенная из жировой ткани, представляет собой гетерогенную культуру, включающую клетки разной степени коммитированности с различным пролиферативным потенциалом [27, 28]. Для оценки доли делящихся клеток при достижении конfluenceности монослоя 80–90% использовали метод, позволяющий определить разницу в количестве ДНК и разделить по этому показателю МСК по фазам клеточного цикла. Так, в фазе G1/G0 в клетках содержится в 2 раза меньше ДНК, чем в фазе G2 и во время митоза (M). Анализ распределения популяции МСК ранних и поздних пассажей по фазам клеточного цикла выявил существенное снижение доли активно делящихся клеток (G2/M) при длительном культивировании (рис. 2).

Культивирование МСК при физиологическом уровне кислорода приводило к увеличению доли делящихся клеток на ранних пассажах. Однако на поздних сроках значимых различий по

данному параметру не выявлено, хотя тенденция сохранялась (рис. 2).

Анализ клонотипной активности показал аналогичную закономерность. На ранних пассажах в условиях с атмосферным уровнем кислорода среднее количество колоний составляло 17,9 на чашку, что указывает на то, что лишь ~18% клеток в культуре МСК *in vitro* обладало значительными пролиферативными свойствами. На поздних пассажах выявлено значимое снижение КОЕ до 7,8, т.е. более чем двукратное уменьшение пула активно делящихся клеток на популяцию по сравнению с ранними пассажами (рис. 3). Анализируемые колонии отличались не только количественно, но и качественно. Так, колонии сенМСК были гораздо менее плотными и занимали меньшую площадь, что может быть одним из следствий снижения пролиферативной активности. Полученные результаты позволяют заключить, что при репликативном старении происходит не только уменьшение доли МСК, способных к активной пролиферации, но и снижение пролиферативного потенциала субпопуляции делящихся клеток.

Культивирование МСК при физиологическом уровне кислорода приводило к увеличению среднего количества колоний на ранних пассажах до 23 на чашку против 17,9 в условиях атмосферного O<sub>2</sub>. Однако в сенесцентных культу-



**Рис. 2.** Распределение МСК по фазам клеточного цикла на стадии 80–90%-ной конfluenceности на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. *а* – Репрезентативные диаграммы, проточная цитофлуориметрия; *б* – доля МСК в фазе клеточного цикла G2/M. Данные представлены как M ± SEM; n ≥ 3; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

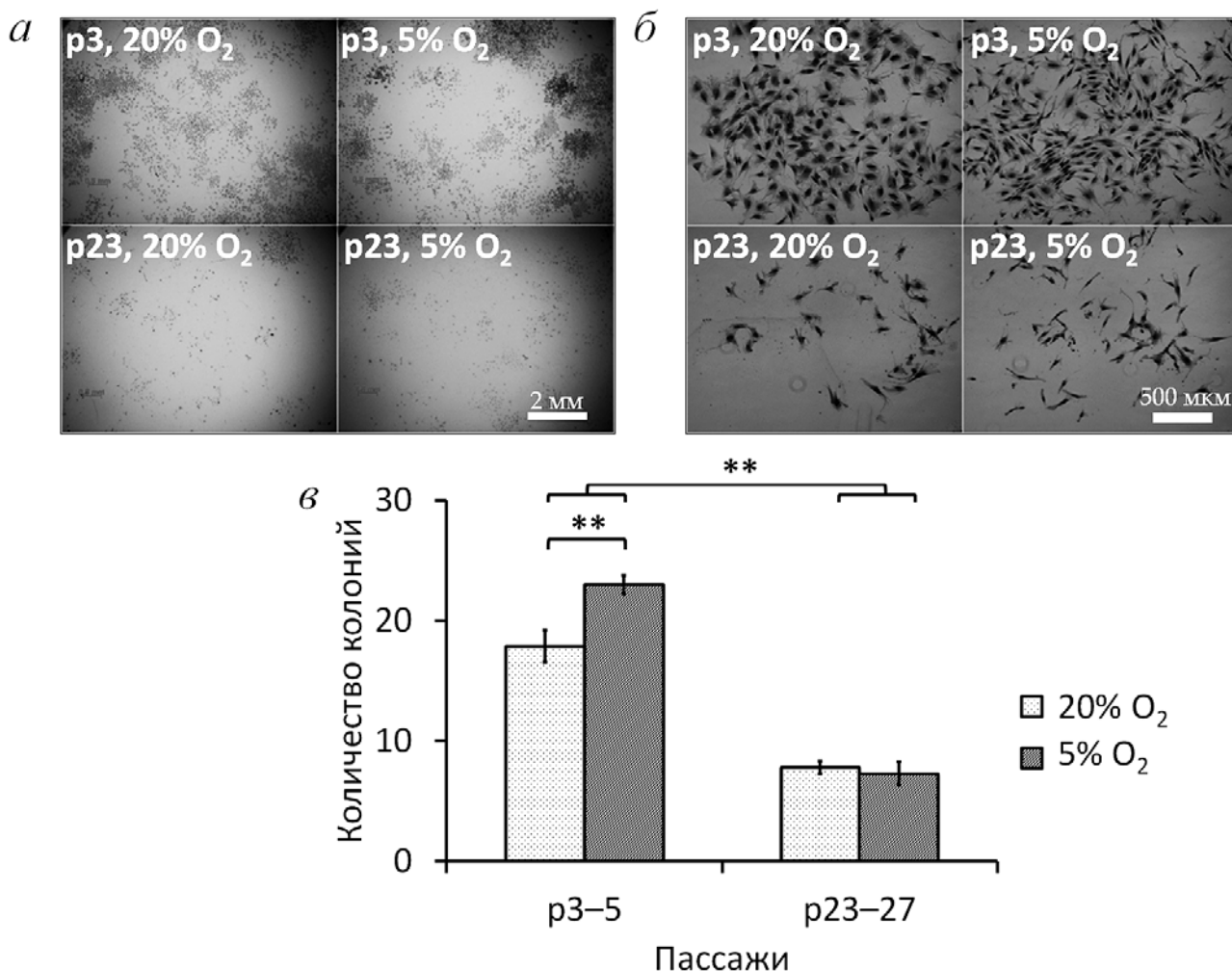
рах значимых различий по данному параметру не выявлено (рис. 3).

Длительное культивирование клеток приводило к увеличению активности SA- $\beta$ -gal, что наблюдается при аресте клеточного цикла. Данный фермент относится к лизосомальным гидролазам и в норме проявляет активность при pH 4. Было обнаружено, что в сенесцентных клетках SA- $\beta$ -gal активируется и при pH 6 [29], что послужило доказательством возможности ее использования для количественной оценки сенесцентного состояния клеточной культуры. В настоящий момент специфическая реакция на выявление активности SA- $\beta$ -gal является одним из наиболее широко используемых методов детекции клеточного старения.

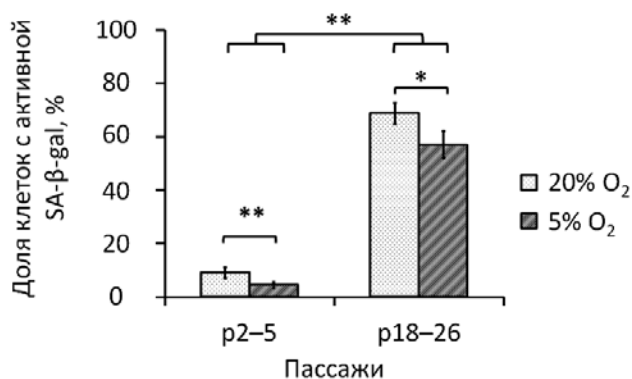
В нашей работе показано, что при длительном пассировании МСК в условиях стандартного культивирования (20% O<sub>2</sub>) доля клеток с ак-

тивной SA- $\beta$ -gal значительно увеличивается на поздних пассажах в среднем до 68,7 против 9% на ранних этапах культивирования (рис. 4). При снижении уровня кислорода до 5% доля позитивно окрашенных клеток уменьшается как на ранних, так и на поздних пассажах.

Анализ транскрипционной активности генов, ассоциированных со старением, проводили методом количественной ПЦР с помощью системы RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Cellular Senescence («Qiagen», США). Было обнаружено, что культивирование МСК до 3-го пассажа в условиях 20%-ного и 5%-ного содержания O<sub>2</sub> не приводит к различиям в экспрессии значительного числа генов, продукты которых участвуют в процессах старения. При 20%-ном уровне O<sub>2</sub> по сравнению с клетками при 5%-ном уровне O<sub>2</sub> наблюдалось двукратное повышение экспрессии лишь двух из анализируемых 84 генов –



**Рис. 3.** Клоногенная активность МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. *a* – Репрезентативные микрофотографии областей чашек Петри с колониями клеток; *b* – репрезентативные микрофотографии отдельных колоний; *в* – количество колоний. Данные представлены как  $M \pm SEM$ ;  $n \geq 3$ ; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$



**Рис. 4.** Выявление активной β-галактозидазы (SA-β-gal) в МСК на ранних и поздних пассажах при длительном культивировании в условиях с различным содержанием кислорода. Окрашивание проводили через семь дней после посева в стандартной плотности (3000 кл/см<sup>2</sup>). Данные представлены как M ± SEM; n ≥ 5; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01

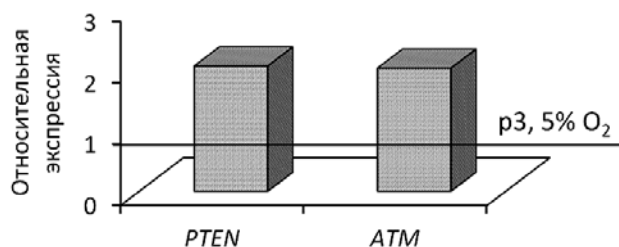
*ATM* и *PTEN* (рис. 5). Известно, что продукт гена *ATM* участвует в ответе на повреждения ДНК, а повышенная экспрессия *PTEN* способствует снижению пролиферативной активности клеток [30]. Активация ATM-киназы, одного из эффекторов DDR (DNA Damage Response), запускает сигнальные каскады, приводящие к аресту клеточного цикла [31, 32]. Киназа ATM фосфорилирует Chk2, которая может транслоцироваться в ядро и активировать свои мишени. Chk2 является компонентом сигнального пути, приводящего к остановке клеточного цикла преимущественно в фазе G1 в ответ на повреждение ДНК [33, 34]. Активированная Chk2 способна фосфорилировать p53, который может напрямую фосфорилироваться и киназой ATM [4, 35]. Полученные данные могут указывать на то, что стандартное культивирование при 20%-ном содержании O<sub>2</sub> оказывает некоторое повреждающее действие на ДНК клетки, способствуя снижению скорости клеточного деления.

Для выявления транскриптомных изменений генов, ассоциированных с реакцией на гипоксию, при длительном культивировании в условиях с пониженным содержанием кислорода были изучены МСК 23-го и 3-го пассажей. Анализ проводили методом количественной ПЦР с помощью системы RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array Human Hypoxia Signaling Pathway («Qiagen», США). Показано, что при длительном культивировании в условиях с 20%-ным содержанием O<sub>2</sub> изменялась экспрессия семи генов, в то время как в условиях гипоксии обнаружены изменения экспрессии 14 генов (табл. 1). Вне зависимости от уровня кислорода в сенесцентных клетках повышалась экспрессия генов *PKM2*, *SERPINE1*, *VEGFA* и снижалась экспрессия ге-

нов *ANKRD37*, *DDIT4*, *HIF1A*, *TXNIP*, т.е. изменения носили однонаправленный характер (табл. 1). Помимо этого в гипоксических условиях обнаружено уменьшение количества мРНК *ADORA2B*, *BNIP3L*, *CCNG2*, *EGLN1*, *LOX*, *MXI1* и *P4HA1*.

По сравнению с культурами клеток 3-го пассажа, в сенесцентных клетках наблюдалось снижение уровня экспрессии не только гена *HIF1A*, кодирующего α-субъединицу HIF-1 (фактора 1, индуцируемого гипоксией), но и гена *EGLN1*. Белок, кодируемый этим геном, катализирует посттрансляционное формирование 4-гидроксипролина в α-субъединице HIF-1. HIF-1 функционирует как главный регулятор клеточного и системного гомеостатического ответа на гипоксию, активируя транскрипцию многих генов, вовлеченных в энергетический метаболизм, ангиогенез, апоптоз, а также генов, белковые продукты которых увеличивают доставку кислорода или облегчают метаболическую адаптацию к гипоксии. Механизм его действия изучен довольно подробно [21]. Синтез субъединицы HIF-1α происходит конститутивно, однако в присутствии кислорода она деградирует: пролилгидроксилазы, неактивные при низком уровне O<sub>2</sub> (1–4% O<sub>2</sub>), гидроксилируют консервативные пролиловые остатки на HIF-1α. После этого следует связывание с белком фон Хиппель–Линдау, который направляет субъединицу на убиквитин-зависимую протеасомную деградацию.

Другой механизм контроля – фактор FHN-1 (factor inhibiting HIF-1), который неактивен в гипоксических условиях, но в присутствии O<sub>2</sub> гидроксилирует аспарагиновый остаток на трансактивационном домене HIF-1α. При гипоксии HIF-1α стабилизируется и транслоцируется в ядро, соединяясь с HIF-1β. Далее димер присоединяется к домену HRE (hypoxia-response element), связанному с коактиватором, например, СВР/p300, и таким образом осуществляет регуляцию экспрессии ~70 генов. Также в сенМСК



**Рис. 5.** Относительная экспрессия генов МСК 3-го пассажа при культивировании в условиях атмосферного уровня кислорода (20%) и относительной гипоксии (5%). Представлены гены, экспрессия которых достоверно (p ≤ 0,05) изменилась более чем в 2 раза

Таблица 1. Относительная экспрессия HIF-зависимых генов в сенМСК

Ген	Продукт гена	Относительная экспрессия	
		20% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>
<i>ADORA2B</i>	рецептор аденозина A2b	0,66	0,18*
<i>ANKRD37</i>	анкириновый повтор домена 37	0,15*	0,19*
<i>BNIP3L</i>	аденовирус E1B19k-связывающий белок B5	0,74	0,45*
<i>CCNG2</i>	циклин G2	0,63	0,46*
<i>DDIT4</i>	транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК	0,24*	0,45*
<i>EGLN1</i>	HIF-пролилгидроксилаза 2	0,77	0,43*
<i>HIF1A</i>	фактор 1, индуцируемый гипоксией, $\alpha$ -субъединица	0,36*	0,31*
<i>LOX</i>	лизилоксидаза	0,66	0,50*
<i>MXI1</i>	МАХ-связывающий фактор транскрипции	0,51	0,27*
<i>P4HA1</i>	пролил-4-гидроксилаза, $\alpha$ -субъединица 1	0,77	0,32*
<i>PKM2</i>	пируваткиназа (мышца)	2,05*	2,18*
<i>SERPINE1</i>	ингибитор активатора плазминогена 1	2,54*	2,06*
<i>TXNIP</i>	тиоредоксин-связывающий белок	0,27*	0,50*
<i>VEGFA</i>	эндотелиальный фактор роста сосудов A	2,51*	2,31*

Примечание. За контроль приняты клетки 3-го пассажа, культивируемые при соответствующем уровне кислорода. Представлены гены, экспрессия которых изменилась более чем в 2 раза. \*  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ .

отмечалось снижение уровня экспрессии ряда HIF-зависимых генов. Было выявлено уменьшение количества мРНК *DDIT4*. Продукт этого гена действует как негативный регулятор mTOR, серин/треонинкиназы, опосредующей различные клеточные функции, такие как рост, пролиферация и аутофагия [36]. Обычно продукция этого транскрипта резко возрастает в ответ на гипоксию, поскольку *DDIT4* является мишенью как для HIF-1 $\alpha$ , так и для HIF-2 $\alpha$  [37–39]. Отмечено снижение уровня экспрессии гена *ANKRD37*, продукт которого также является белком-мишенью HIF-1 и имеет четыре сайта связывания с ним [40].

Сравнительный анализ МСК 3-го и 23-го пассажей показал снижение уровня экспрессии гена *ADORA2B*, кодирующего аденозиновый рецептор A2B, посредством которого осуществляется цитопротекторное действие аденозина при гипоксии и ишемии. Есть данные, что продукция IL-6 фибробластами десны человека опосредована аденозиновым рецептором A2B [41].

Культивирование МСК до 23-го пассажа приводило к снижению уровня экспрессии гена *MXI1*, продуктом которого является транскрипционный репрессор, отрицательно регулирующий функцию MYC (онкогенный фактор транскрипции). Следовательно, *MXI1* представляет собой потенциальный супрессор опухоли (RefSeq Gene ID 4601). Выявлено снижение уровня экспрессии гена *TXNIP*, кодирующего тиоредоксин-связывающий белок. Тиоредоксин представляет собой тиолоксидоредуктазу, которая является

основным регулятором редокс-сигналикации и защищает клетки от окислительного стресса. Тиоредоксинсвязывающий белок ингибирует антиоксидантную функцию тиоредоксина, что приводит к накоплению активных форм кислорода и клеточному стрессу (RefSeq Gene ID 10628). Кроме того, отмечено снижение уровня экспрессии гена *BNIP3L*, кодирующего проапоптотический белок, который, взаимодействуя с Bcl-2, приводит к выходу цитохрома *c* из митохондрий [42].

Наблюдаемое снижение пролиферативной активности сенМСК сопровождается снижением уровня экспрессии гена *CCNG2*, кодирующего циклин G2, который является негативным регулятором клеточного цикла и может влиять на пролиферацию, клеточную гибель и канцерогенез [43, 44].

Кроме того, в МСК 23-го пассажа выявлен более низкий уровень экспрессии двух генов: гена *P4HA1*, кодирующего фермент пролил-4-гидроксилазу (катализирует процесс трехмерного сворачивания вновь синтезированных цепочек проколлагена), и гена *LOX*, кодирующего фермент лизилоксидазу (катализирует образование нерастворимого коллагена из тропоколлагена). Некоторые данные указывают на то, что лизилоксидаза играет решающую роль на стадии коммитирования плюрипотентных стволовых клеток в адипоциты. Отсутствие этого фермента может приводить к дефектам трансформирующего фактора роста  $\beta$ , который контролирует рост и дифференцировку клеток [45].

Культивирование МСК до 23-го пассажа приводило к усилению экспрессии генов *SERPINE1*, *VEGFA* и *PKM2* как при 20%-ном уровне кислорода, так и при физиологической гипоксии (5% O<sub>2</sub>). Ген *SERPINE1* кодирует сериновую протеазу, которая вовлечена в ремоделирование внеклеточного матрикса и активно экспрессируется в клетках при старении [46]. Ген *VEGFA* кодирует эндотелиальный фактор роста сосудов А, который, в свою очередь, индуцирует пролиферацию и миграцию сосудистых эндотелиальных клеток, а также играет важную роль как в физиологическом, так и в патологическом ангиогенезе (RefSeq Gene ID 7422). Ген *PKM2* кодирует пируваткиназу, которая катализирует последнюю стадию гликолиза, превращение фосфоенолпирувата до енольной формы пирувата с образованием одной молекулы АТФ.

Результаты сравнительного анализа дифференциальной экспрессии генов МСК, культивируемых при 5%-ном уровне O<sub>2</sub> по сравнению с клетками, культивируемыми при 20%-ном уровне O<sub>2</sub>, также выявили однонаправленную тенденцию к изменению в МСК 3-го и 23-го пассажей (табл. 2). Однако более низкий уровень экспрессии гена *ADM* был достоверно подтвержден только в клетках 3-го пассажа. Адреномедуллин, кодируемый этим геном, может регулировать ангиогенез и повышать толерантность клеток к окислительному стрессу и гипоксическому повреждению [47]. Также при 5%-ном уровне O<sub>2</sub> отмечено снижение экспрессии гена *HMOX1*, продукт которого, гемоксигеназа 1, являясь родственным белком семейства белков

теплового шока 32, участвует в механизмах защиты клеток от повреждений, вызванных окислительным стрессом [48].

Более низкий уровень мРНК в клетках при 5%-ном уровне O<sub>2</sub> был отмечен для гена *GYS1*, кодирующего гликогенсинтазу 1 – фермент, который играет важную роль в клеточном ответе на долгосрочную адаптацию к гипоксии. Кроме того, показано, что активация этого гена может приводить к чрезмерному накоплению гликогена [49].

Культивирование при 5%-ном уровне O<sub>2</sub> приводило к уменьшению экспрессии нескольких генов, продукты которых принимают участие в метаболизме глюкозы в процессе гликолиза. Сравнительный анализ экспрессии этих генов показал уменьшение уровня экспрессии трех ферментов: 1) одной из изоформ гексокиназы (HK2) – фермента, катализирующего первую стадию гликолиза и превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат (RefSeq Gene ID 3099); 2) одной из изоформ фосфофруктокиназы (PFKL), осуществляющей фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата; 3) пируваткиназы (PKM2).

Транспортировка лактата и пирувата через плазматическую мембрану катализируется членами семейства протон-связанных монокарбоксилатных транспортеров, к семейству которых относится продукт гена *SLC16A3* (RefSeq Gene ID 9123). Экспрессия этого гена также снижается в МСК, культивируемых при 5%-ном уровне O<sub>2</sub>.

Анализ элементов транскриптома МСК при 5%-ном содержании O<sub>2</sub>, по сравнению с клетка-

Таблица 2. Относительная экспрессия HIF-зависимых генов при 5%-ном содержании

Ген	Продукт гена	Относительная экспрессия	
		p3	p23
<i>ADM</i>	адреномедуллин	0,22*	0,40
<i>ANGPTL4</i>	ангиопоэтинподобный белок 4	0,25*	0,11*
<i>ANKRD37</i>	анкириновый повтор домена 37	2,33*	3,17*
<i>F10</i>	фактор свертывания 10	0,26*	0,82
<i>GYS1</i>	гликогенсинтаза 1 (мышца)	0,21*	0,28*
<i>HK2</i>	гексокиназа 2	0,57	0,32*
<i>HMOX1</i>	гемоксигеназа 1	0,31*	0,21*
<i>P4HB</i>	пролил-4-гидроксилаза, β-субъединица	0,18*	0,69
<i>PFKL</i>	фосфофруктокиназа (печень)	0,19*	0,53
<i>PKM2</i>	пируваткиназа (мышца)	0,35*	0,36*
<i>SERPINE1</i>	ингибитор активатора плазминогена 1	0,34*	0,32*
<i>SLC16A3</i>	монокарбоксилатный транспортер 3	0,13*	0,97
<i>TP53</i>	опухольный супрессор p53	0,28*	0,38*

Примечание. За контроль приняты клетки соответствующего пассажа, культивируемые при 20%-ном содержании O<sub>2</sub>. Представлены гены, экспрессия которых изменилась более чем в 2 раза \*  $p \leq 0,05$ ;  $n = 3$ .



ми при 20%-ном содержании  $O_2$ , также показал низкий уровень экспрессии гена *ANGPTL4*, продукт которого функционирует как гормон, регулирующий гомеостаз глюкозы, липидный обмен и чувствительность к инсулину. Известно, что этот белок также может действовать как фактор выживания при апоптозе в эндотелиальных клетках сосудов [50]. Кроме того, было выявлено снижение уровня экспрессии гена *TP53*, кодирующего белок-супрессор опухолей. Данный белок реагирует на различные стрессы и изменяет экспрессию генов-мишеней, тем самым вызывая остановку клеточного цикла, апоптоз, старение, восстановление ДНК или изменения метаболизма (RefSeq Gene ID 7157).

Полученные результаты указывают на то, что направленность транскрипционных изменений ассоциированных с гипоксией генов в МСК при достижении завершающей фазы репликативного старения однотипна и слабо зависит от содержания кислорода. В то же время, как нами было показано ранее, при длительном культивировании МСК основные маркерные гены старения изменяют свою экспрессию более выражено при использовании условий стандартного культивирования (20%  $O_2$ ) [19, 20].

Несмотря на преимущественно посттрансляционную регуляцию активности HIF-1, в нашей работе показано снижение уровня экспрессии гена *HIF1A* в сенМСК, что указывает на связь этого транскрипционного фактора и ряда регулируемых им генов с процессом клеточного старения. При этом не обнаружено значительных различий между МСК, постоянно культивируемых в условиях 5%-ного и 20%-ного содержания кислорода. Ранее в нашей лаборатории были получены данные, касающиеся динамики экспрессии *HIF1A* в МСК при кратковременных экспозициях (до 24 ч) в условиях физиологической гипоксии [51]. Показано, что экспрессия этого гена значимо увеличивается лишь в первые 8 ч после смены условий (при перемещении клеток в условия даже относительно мягкой гипоксии – 5%  $O_2$ ). Новые результаты также демонстрируют, что изменение транскрипционной активности *HIF1A* носит транзиторный характер и не выявляется при постоянном культивировании в условиях 5%-ного содержания  $O_2$ .

Согласно полученным данным, постоянное пассирование МСК при разном уровне кислорода приводит к более выраженным различиям на ранних этапах культивирования, в то время как на поздних пассажах данный фактор оказывает меньшее влияние. Подобный эффект, вероятно, связан с адаптационными процессами.

Независимо от пассажа снижалась экспрессия генов *ANGPTL4*, *GYS1*, *PKM2*, *SERPINE1* и *TP53*. При этом на ранних этапах культивирования дополнительно обнаружено уменьшение количества мРНК *ADM*, *F10*, *HMOX1*, *P4HB*, *PFKL* и *SLC16A3*, а на поздних – мРНК *HK*. При этом выявлено повышение уровня экспрессии только одного гена – *ANKRD37* (ankyrin repeat domain 37). Известно, что этот ген является мишенью HIF-1 и активно экспрессируется в условиях гипоксии.

Таким образом, наши предыдущие результаты [19, 20] полностью подтверждают рекомендации ряда исследователей по использованию пониженного содержания кислорода при длительном культивировании МСК как с целью клинического применения клеточных препаратов, так и при изучении функциональных свойств МСК [16–18]. Анализ транскрипционного профиля культивируемых МСК показал его значительную вариабельность в зависимости от ткани, особенностей донора, пассажа, плотности посева культуры, используемых культуральных сред и т.д. Например, из-за торможения пролиферации в условиях атмосферного уровня  $O_2$  субкультивирование МСК из костного мозга человека становится невозможным уже после 7-го пассажа, тогда как в условиях гипоксии этот порог успешно преодолевается [52]. В настоящей работе определен ряд дифференциально экспрессируемых генов, ассоциированных с реакцией МСК на гипоксию, при длительном культивировании (до репликативного старения) в условиях с различным уровнем кислорода. Полученные данные позволяют выявить новые гены-мишени, потенциально ответственные за модуляцию функционального состояния МСК, культивируемых при тканевом уровне  $O_2$ .

#### Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-04-01244-А).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Munoz-Espin, D., and Serrano, M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 482–496, doi: 10.1038/nrm3823.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**, 1194–1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- McHugh, D., and Gil, J. (2018) Senescence and aging: causes, consequences, and therapeutic avenues, *J. Cell Biol.*, **217**, 65–77, doi: 10.1083/jcb.201708092.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 729–740, doi: 10.1038/nrm2233.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007) Cellular senescence in cancer and aging, *Cell*, **130**, 223–233, doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003.
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014) Cellular senescence and its effector programs, *Genes Dev.*, **28**, 99–114, doi: 10.1101/gad.235184.113.
- Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., and Hara, E. (2017) Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases, *Cancer Sci.*, **108**, 563–569, doi: 10.1111/cas.13184.
- Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009) Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 81–94, doi: 10.1038/nrc2560.
- Coppe, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression, *Annu. Rev. Pathol.*, **5**, 99–118, doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
- Minieri, V., Saviozzi, S., Gambarotta, G., Lo Iacono, M., Accomasso, L., Cibrario Rocchietti, E., Gallina, C., Turinetti, V., and Giachino, C. (2015) Persistent DNA damage-induced premature senescence alters the functional features of human bone marrow mesenchymal stem cells, *J. Cell Mol. Med.*, **19**, 734–743, doi: 10.1111/jcmm.12387.
- Turinetti, V., Vitale, E., and Giachino, C. (2016) Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1164, doi: 10.3390/ijms17071164.
- Wei, F., Qu, C., Song, T., Ding, G., Fan, Z., Liu, D., Liu, Y., Zhang, C., Shi, S., and Wang, S. (2012) Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity, *J. Cell Physiol.*, **227**, 3216–3224, doi: 10.1002/jcp.24012.
- Lin, T.M., Tsai, J.L., Lin, S.D., Lai, C.S., and Chang, C.C. (2005) Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants, *Stem Cells Dev.*, **14**, 92–102, doi: 10.1089/scd.2005.14.92.
- Skulachev, V.P. (2013) Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **441**, 275–279, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.063.
- Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2017) Programmed aging of mammals: proof of concept and prospects of biochemical approaches for anti-aging therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1403–1422, doi: 10.1134/S000629791712001X.
- Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitingner, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., and Lepperdinger, G. (2007) Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan, *Aging Cell*, **6**, 745–757, doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x.
- Choi, J.R., Pinguan-Murphy, B., Wan Abas, W.A., Yong, K.W., Poon, C.T., Noor Azmi, M.A., Omar, S.Z., Chua, K.H., Xu, F., and Wan Safwani, W.K. (2015) *In situ* normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumorigenesis, *PLoS One*, **10**, e0115034, doi: 10.1371/journal.pone.0115034.
- Buravkova, L.B., Andreeva, E.R., Gogvadze, V., and Zhi-votovskiy, B. (2014) Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? *Mitochondrion*, **19**, 105–112, doi: 10.1016/j.mito.2014.07.005.
- Lobanova, M.V., Ratushnyy, A.Y., and Buravkova, L.B. (2016) Expression of senescence-associated genes in multipotent mesenchymal stromal cells during long-term cultivation at various hypoxic levels, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **470**, 326–328, doi: 10.1134/S1607672916050057.
- Ratushnyy, A., Lobanova, M., and Buravkova, L.B. (2017) Expansion of adipose tissue-derived stromal cells at «physiologic» hypoxia attenuates replicative senescence, *Cell Biochem. Funct.*, **35**, 232–243, doi: 10.1002/cbf.3267.
- Semenza, G.L. (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway, *Sci. STKE*, **2007**, cm8, doi: 10.1126/stke.4072007cm8.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.*, **7**, 211–228, doi: 10.1089/107632701300062859.
- Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. (2009) Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода, *Цитология*, **51**, 5–11, doi: 10.1134/S1990519X09010039.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, **8**, 315–317, doi: 10.1080/14653240600855905.
- Greenwood, S.K., Hill, R.B., Sun, J.T., Armstrong, M.J., Johnson, T.E., Gara, J.P., and Galloway, S.M. (2004) Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environ. Mol. Mutagen.*, **43**, 36–44, doi: 10.1002/em.10207.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, *Methods*, **25**, 402–408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- McLeod, C.M., and Mauck, R.L. (2017) On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis, *Eur. Cell Mater.*, **34**, 217–231, doi: 10.22203/eCM.v034a14.
- Gonzalez-Cruz, R.D., Fonseca, V.C., and Darling, E.M. (2012) Cellular mechanical properties reflect the differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E1523–E1529, doi: 10.1073/pnas.1120349109.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., and Campisi, J. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9363–9367.
- Xu, L.N., Lin, N., Xu, B.N., Li, J.B., and Chen, S.Q. (2015) Effect of human umbilical cord mesenchymal stem

- cells on endometriotic cell proliferation and apoptosis, *Genet. Mol. Res.*, **14**, 16553–16561, doi: 10.4238/2015. December.11.2.
31. Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2004) Phosphatases join kinases in DNA-damage response pathways, *Trends Cell Biol.*, **14**, 339–341, doi: 10.1016/j.tcb.2004.05.001.
  32. Zhan, H., Suzuki, T., Aizawa, K., Miyagawa, K., and Nagai, R. (2010) Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence, *J. Biol. Chem.*, **285**, 29662–29670, doi: 10.1074/jbc.M110.125138.
  33. Buscemi, G., Perego, P., Carenini, N., Nakanishi, M., Chessa, L., Chen, J., Khanna, K., and Delia, D. (2004) Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks, *Oncogene*, **23**, 7691–7700, doi: 10.1038/sj.onc.1207986.
  34. Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003) Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage, *Nat. Cell Biol.*, **5**, 255–260, doi: 10.1038/ncb945.
  35. Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., and Jackson, S.P. (2005) Human cell senescence as a DNA damage response, *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 111–117, doi: 10.1016/j.mad.2004.09.034.
  36. Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M., and Ellisen, L.W. (2005) Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 5834–5845, doi: 10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005.
  37. Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Zelin, E., Tenne, T., Gorodin, S., Moshel, Y., Elbaz, S., Budanov, A., Chajut, A., Kalinski, H., Kamer, I., Rozen, A., Mor, O., Keshet, E., Leshkowitz, D., Einat, P., Skaliter, R., and Feinstein, E. (2002) Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, *RTP801*, involved in apoptosis, *Mol. Cell Biol.*, **22**, 2283–2293, doi: 10.1128/MCB.22.7.2283-2293.2002.
  38. Wolff, N.C., Vega-Rubin-de-Celis, S., Xie, X.J., Castrillon, D.H., Kabbani, W., and Brugarolas, J. (2011) Cell-type-dependent regulation of mTORC1 by REDD1 and the tumor suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in response to hypoxia, *Mol. Cell Biol.*, **31**, 1870–1884, doi: 10.1128/MCB.01393-10.
  39. Kucejova, B., Sunny, N.E., Nguyen, A.D., Hallac, R., Fu, X., Pena-Llopis, S., Mason, R.P., Deberardinis, R.J., Xie, X.J., Debose-Boyd, R., Kodibagkar, V.D., Burgess, S.C., and Brugarolas, J. (2011) Uncoupling hypoxia signaling from oxygen sensing in the liver results in hypoketotic hypoglycemic death, *Oncogene*, **30**, 2147–2160, doi: 10.1038/ncb.2010.587.
  40. Benita, Y., Kikuchi, H., Smith, A.D., Zhang, M.Q., Chung, D.C., and Xavier, R.J. (2009) An integrative genomics approach identifies hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4587–4602, doi: 10.1093/nar/gkp425.
  41. Murakami, S., Terakura, M., Kamatani, T., Hashikawa, T., Saho, T., Shimabukuro, Y., and Okada, H. (2000) Adenosine regulates the production of interleukin-6 by human gingival fibroblasts via cyclic AMP/protein kinase A pathway, *J. Periodont. Res.*, **35**, 93–101.
  42. Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J.H., Reed, J.C., Gietz, R.D., and Greenberg, A.H. (2000) BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites, *J. Biol. Chem.*, **275**, 1439–1448.
  43. Ahmed, S., Al-Saigh, S., and Matthews, J. (2012) FOXA1 is essential for aryl hydrocarbon receptor-dependent regulation of cyclin G2, *Mol. Cancer Res.*, **10**, 636–648, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0502.
  44. Sun, G.G., Zhang, J., and Hu, W.N. (2014) CCNG2 expression is downregulated in colorectal carcinoma and its clinical significance, *Tumour Biol.*, **35**, 3339–3346, doi: 10.1007/s13277-013-1440-5.
  45. Huang, H.Y., Chen, S.Z., Zhang, W.T., Wang, S.S., Liu, Y., Li, X., Sun, X., Li, Y.M., Wen, B., Lei, Q.Y., and Tang, Q.Q. (2013) Induction of EMT-like response by BMP4 via up-regulation of lysyl oxidase is required for adipocyte lineage commitment, *Stem Cell Res.*, **10**, 278–287, doi: 10.1016/j.scr.2012.12.005.
  46. Kortlever, R.M., Higgins, P.J., and Bernards, R. (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence, *Nat. Cell Biol.*, **8**, 877–884, doi: 10.1038/ncb1448.
  47. Zhang, Y., Xu, Y., Ma, J., Pang, X., and Dong, M. (2017) Adrenomedullin promotes angiogenesis in epithelial ovarian cancer through upregulating hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor, *Sci. Rep.*, **7**, 40524, doi: 10.1038/srep40524.
  48. Chen, K., and Maines, M.D. (2000) Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38, *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, **46**, 609–617.
  49. Pescador, N., Villar, D., Cifuentes, D., Garcia-Rocha, M., Ortiz-Barahona, A., Vazquez, S., Ordóñez, A., Cuevas, Y., Saez-Morales, D., Garcia-Bermejo, M.L., Landazuri, M.O., Guinovart, J., and del Peso, L. (2010) Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1, *PLoS One*, **5**, e9644, doi: 10.1371/journal.pone.0009644.
  50. Kim, I., Kim, H.G., Kim, H., Kim, H.H., Park, S.K., Uhm, C.S., Lee, Z.H., and Koh, G.Y. (2000) Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis, *Biochem. J.*, **346**, 603–610.
  51. Погодина М.В., Буравкова Л.Б. (2015) Особенности экспрессии HIF1 $\alpha$  в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках при гипоксии, *Бюлл. экпер. биол. мед.*, **159**, 333–335.
  52. Tsai, C.C., Chen, Y.J., Yew, T.L., Chen, L.L., Wang, J.Y., Chiu, C.H., and Hung, S.C. (2011) Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST, *Blood*, **117**, 459–469, doi: 10.1182/blood-2010-05-287508.

**ALTERATION OF HYPOXIA-ASSOCIATED  
GENE EXPRESSION IN REPLICATIVE SENESCENT  
MESENCHYMAL STROMAL CELLS UNDER  
PHYSIOLOGICAL OXYGEN LEVEL**

**A. Yu. Ratushnyy, Yu. V. Rudimova, and L. B. Buravkova\***

*Institute of Biomedical Problems (IBMP), Russian Academy of Sciences,  
123007 Moscow, Russia; E-mail: buravkova@imbp.ru*

Received November 9, 2018

Revised December 4, 2018

Accepted December 4, 2018

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are one of the populations of progenitor cells of adults that can modulate functional status of surrounding tissues. However, biological activity of MSCs changes upon cell senescence that may result in shifting tissue homeostasis. The decrease in oxygen content *in vitro* to physiological level is known to suppress a number of senescence-associated markers. The aim of this work was to study the MSC hypoxia-associated gene expression in a replicative senescence model using physiological (5%) and atmospheric (20%) oxygen levels during cell cultivation. According to our data, MSC proliferative potential significantly decreased after 20 passages (~50 cell divisions). Regardless of oxygen level, the expression of *PKM2*, *SERPINE1*, and *VEGFA* genes was up-regulated and that of *ANKRD37*, *DDIT4*, *HIF1A*, and *TXNIP* genes was down-regulated in senescent MSCs. Additionally, in hypoxia, a decrease in *ADORA2B*, *BNIPL*, *CCNG2*, *EGLN1*, *MAP3K1*, *MXI1*, and *P4HA1* mRNAs was found. The effect of hypoxia both at cellular and transcriptional levels was more pronounced during early passages. Regardless of cultivation time, *ANGPTL4*, *GYS1*, *PKM2*, *SERPINE1*, and *TP53* genes were down-regulated under hypoxia. In addition, in early passages, the *ADM*, *F10*, *HMOX1*, *P4HB*, *PFKL*, and *SLC16A3* genes were down-regulated and in senescent cells the *HK2* gene expression was decreased. Only one gene, *ANKRD37*, was up-regulated in hypoxia at both early and late passages.

**Keywords:** mesenchymal stromal cells, replicative senescence, oxygen level