

## Влияние пониженного содержания кислорода на дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека *in vitro*

А.П. Жамбалова, Ю.Г. Гершович, Л.Б. Буравкова, С.В. Гальчук, Ю.А. Романов

Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

### Effects of low oxygen levels on differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells of human bone marrow *in vitro*

A.P. Zambalova, Yu.G. Gershovich, L.B. Buravkova, S.V. Gal'chuk, Yu.A. Romanov

RF State Scientific Center – the Institute of Medico-Biological Problems RAS, Moscow

Исследовали дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток, МСК) костного мозга человека и экспрессию транскрипционного фактора, индуцируемого при гипоксии (Hypoxia Inducible Factor – HIF-1 $\alpha$ ), при культивировании в условиях пониженного содержания кислорода (1 и 5% O<sub>2</sub>). При индукции МСК в нормоксических (20% O<sub>2</sub>) условиях и при пониженном содержании кислорода установлена, проявляющаяся в различной степени, способность МСК к дифференцировке в остеогенном, адипогенном, эндотелиальном направлениях. Методом проточной цитометрии выявлено, что уровень HIF-1 $\alpha$  в цитоплазме монослойных культур МСК, инкубированных при 1 и 5% содержании кислорода в течение 24 ч и 7 сут., снижается по сравнению с нормоксическим контролем (20% O<sub>2</sub>).

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, дифференцировочный потенциал, пониженное содержание кислорода, транскрипционный фактор, индуцируемый при гипоксии (HIF-1 $\alpha$ ).

### Введение

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (мезенхимальные стволовые клетки, МСК) в культуре обладают способностью к активной пролиферации, поддержанию кроветворного микроокружения в течение длительного времени и дифференцировке в различные типы клеток мезодермального ряда в ответ на действие соответствующих стимулов [1, 2]. Накоплен большой опыт индукции МСК к дифференцировке *in vitro* в самых различных направлениях, однако механизмы включения тех или иных дифференцировочных путей изучены недостаточно. Кроме того, известно, что условия культивирования – состав среды, индукторы дифференцировки, характер субстрата и состав газовой смеси играют существенную роль в реализации функциональных возможностей клеток. В условиях пониженного содержания кислорода активируются многие важные физиологические процессы, например, эритропоэз, ангиогенез, которые тесно связаны с транскрипционной экспрессией индуцируемых гипоксией генов [3–7]. Ключевая роль в инициации такого системного ответа клетки принадлежит специфическому белковому фактору, индуцируемому при гипоксии – HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1). HIF-1 представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из двух субъединиц: индуцибельно экспрессируемой кислородчувствительной субъединицы HIF-1 $\alpha$  и конститутивно экспрессируемой в ядре (независимо от на-

We investigated differentiation potential and the expression of transcriptional factor stimulated by hypoxia (Hypoxia Inducible Factor – HIF-1 $\alpha$ ) of mesenchymal stem cells (MSC) derived from adult bone marrow under low oxygen tension (1% O<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub>). It was revealed modification in differentiation capacity (osteogenic and adipogenic) of MSC dependent to the level of oxygen tension. Flow cytometry analysis demonstrated reduced amount of HIF-1 $\alpha$  in cytoplasm of MSC monolayers incubating under 1% and 5% of oxygen for 24 hours and 7 days in comparison with normoxic controls (20% O<sub>2</sub>).

**Key words:** mesenchymal stem cells, differentiation potential, low oxygen tension, transcriptional factor stimulated by hypoxia (Hypoxia Inducible Factor – HIF-1 $\alpha$ ).

пряжения кислорода в клетке) субъединицы HIF-1 $\beta$ . Этот транскрипционный фактор активирует ряд генов, экспрессия которых необходима для поддержания клеточного гомеостаза [7–9].

Многие исследователи напрямую связывают дифференцировочные процессы с регуляцией, опосредованной HIF-1 $\alpha$  [10–12]. Так, в исследованиях S. Provot и соавт. отмечают замедление хондрогенеза при нокаутировании HIF-1 $\alpha$  у эмбрионов мышей [13]. HIF-1 активирует гены, кодирующие синтез таких ростовых факторов, как фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), ангиопозтин 1 и 2 (ANGPT1, ANGPT2), которые регулируют ангиогенез [14–16].

Целью исследования явилось изучение экспрессии HIF-1 $\alpha$  и дифференцировочного потенциала МСК костного мозга человека при культивировании в условиях пониженного содержания кислорода.

### Материал и методы

#### Культивирование клеток в условиях гипоксии

Для культивирования в условиях пониженного содержания кислорода (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) и низкого содержания кислорода (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>) использовали мультигазовый инкубатор MCO-175M (Sanyo, Япония) или герметичные инкубационные камеры (Stem Cell Technologies, Канада), в которых воздух замещали газовой смесью (94% N<sub>2</sub> или 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) и помещали в термостат (+37°C). Содержание

e-mail: zhambalova@imbpb.ru

кислорода и давление в газовой среде камеры контролировали с помощью встроенных в камеру датчиков.

#### Оценка дифференцировочного потенциала МСК

Для подтверждения возможности дифференцировки, демонстрирующей остеогенный потенциал МСК костного мозга человека, клетки инкубировали в среде, содержащей остеогенные дифференцировочные стимулы:  $10^{-8}$  М дексаметазона, 10 мМ  $\beta$ -глицерол-2-фосфата натрия (Sigma, США) и 0,2 мМ 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (Fluka, Германия) и без добавления индукторов, при различном содержании кислорода (1,5 и 20%  $O_2$ ). Способность к дифференцировке МСК в остеогенном направлении оценивали гистохимически по степени минерализации внеклеточного матрикса после культивирования МСК в течение 21 сут. в остеогенной среде. Гистохимическое окрашивание  $Ca^{2+}$  внеклеточного матрикса проводили ализариновым красным S (40 мМ, pH 4,2) (Sigma, США).

Для анализа способности МСК к адипогенной дифференцировке клетки культивировали до достижения монослоя. Монослойные культуры клеток далее культивировали в индукционной среде (200  $\mu$ М индометацин, 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантин, 10  $\mu$ М инсулин,  $10^{-6}$  М дексаметазон) (Sigma, США) и среде без адипогенных стимулов при различном содержании кислорода (1,5 и 20%  $O_2$ ) в течение 21 сут. Адипогенную дифференцировку оценивали визуально по образованию внутриклеточно липидных капель. Клетки отмывали от среды буферным раствором, фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали с помощью 0,36% масляного красного O в изопропанол (Sigma, США).

Для выявления способности МСК образовывать капиллярноподобные структуры суспензию МСК, приготовленную для пассирования, инкубировали в матригеле (ECMatrigel™, CHEMICON®, США), содержащем ламинин, коллаген IV типа, протеогликаны, энтактин, факторы роста – TGF- $\beta$ , FGF, при различном содержании кислорода (1,5 и 20%  $O_2$ ) в течение 12 ч.

Визуальный анализ и фотографирование клеток проводили с помощью микроскопа, оборудованного цифровой фотокамерой (Leica DMIL, Германия).

#### Цитофлуориметрический анализ уровня HIF-1 $\alpha$ в цитоплазме

Экспрессию HIF-1 $\alpha$  анализировали с помощью точной цитофлуориметрии (Epics XL, Beckman Coulter,

США). При исследовании экспрессии HIF-1 $\alpha$  применяли в качестве первичных антител – мышиные моноклональные антитела против HIF-1 $\alpha$  (H1-alpha-67, Abcam, Великобритания) в разведении 1:500; в качестве вторичных антител – соответствующие антивидовые антитела IgG, меченые ФИТЦ (флюоресцеинизотиоцианат) (Jackson ImmunoResearch, США). Позитивным контролем служили моноклональные антитела против виментина (Dako Cytomation, Дания), в негативном контроле – первичные антитела не вносили. Проведено 6 серий экспериментов по анализу экспрессии HIF-1 $\alpha$  клетками в монослойных культурах МСК различных пассажей.

#### Результаты

При культивировании МСК при 1,5 и 20%  $O_2$  в течение 3 нед. в среде, не содержащей остеогенные стимулы, клетки не кальцифицировали матрикс, тогда как в остеогенной среде отмечалось накопление солей кальция в ходе остеогенной дифференцировки МСК. Добавление остеогенных стимулов в среду роста МСК приводило к активной прогрессии остеогенеза, сопровождающейся активацией роста, формированием многослойных пластов клеток, приобретением клетками полигональной формы. При культивировании МСК при 5 и 20%  $O_2$  в течение 3 нед. клетки формировали узелки, а также интенсивно синтезировали межклеточное вещество, которое выявляли гистохимически с помощью ализаринового красного как соли кальция (рис. 1). Качественных различий (приобретение морфологических признаков остеобластов, присутствие кальция во внеклеточном матриксе) между МСК, культивируемыми при 5 и 20%  $O_2$ , выявлено не было, но соотношение количества минерализованного матрикса различалось. В нормоксических (20%  $O_2$ ) культурах МСК синтезированный матрикс с солями кальция полностью покрывал монослой клеток, в отличие от культур, инкубируемых при 5%  $O_2$ . В гипоксических условиях (1%  $O_2$ ) в среде с остеогенными стимулами МСК не вырабатывали минерализованного межклеточного вещества.

После индукции в адипогенном направлении клетки приобретали сферическую или близкую к ней форму, в цитоплазме клеток происходило накопление липидных включений, которые при окрашивании липофильным красителем приобретали оранжево-красный оттенок. Детальная микроскопия опытных образцов выявила сходную эффективность адипогенеза между культурами МСК, экспонированными при 1,5 и 20%  $O_2$

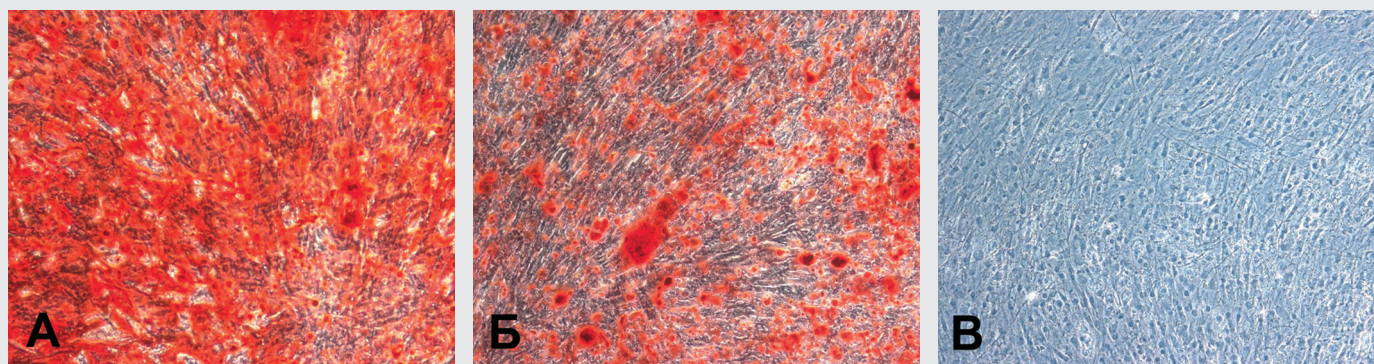


Рис. 1. Результаты индукции остеогенной дифференцировки МСК, культивированных при различном содержании кислорода: А – 20%  $O_2$ ; Б – 5%  $O_2$ ; В – 1%  $O_2$ . Окраска: ализариновый красный S. Ув.  $\times 100$

(рис. 2). В то же время в культурах, инкубируемых с адипогенными стимулами при 20%  $O_2$ , клетки объединялись с близлежащими клетками в единые колонии или кластеры с липидными включениями во внутриклеточном пространстве, которые на поздних этапах дифференцировки сливались в крупные конгломераты жировых капель и заполняли весь объем клетки. Размеры жировых капель в адипогенных культурах МСК, экспонированных при 5%  $O_2$ , были меньше. При культивировании МСК в среде, содержащей 1%  $O_2$ , количество клеток с липидными включениями было существенно ниже, чем при инкубации при 5%  $O_2$  и 20%  $O_2$ , уменьшался и размер липидных капель. В культурах МСК, инкубированных в среде без индукторов при 1,5 и 20%  $O_2$ , не было отмечено клеток с наличием липидных капель.

Исследования по выявлению возможности МСК образовывать капилляроподобные структуры показали, что МСК, инкубируемые в матриксе с факторами роста как при 5%  $O_2$ , так и при 20%  $O_2$ , способны к дифференцировке в эндотелиальном направлении. В экспериментальных образцах уже через 8 ч. инкубации отмечена организация клеток в сетевидные трехмерные структуры (рис. 3). Сетевидная структура генерировалась из клеток, которые представляли собой уплотненные шаровидной формы образования, соединенные друг с другом длинными узкими отростками. В процесс дифференци-

ровки под действием специфических факторов, содержащихся в среде инкубирования, были вовлечены практически все клетки, экспонированные как при 5%  $O_2$ , так и при 20%  $O_2$ . При сопоставлении морфологических характеристик и временной динамики при инициализации дифференцировки МСК в капилляроподобные структуры не было отмечено существенных различий между культурами МСК, инкубируемыми при 5%  $O_2$  и 20%  $O_2$ .

Для сравнительного определения экспрессии цитоплазматического HIF-1 $\alpha$ , клетки инкубировали при различном содержании кислорода (1, 5 и 20%) в течение 24 ч. или 7 сут. В результате цитофлюориметрического анализа исследуемых культур МСК, инкубированных в нормоксии и гипоксии в течение 24 ч., были выявлены различия в уровне экспрессии HIF-1 $\alpha$ , зависящие от концентрации кислорода в среде. В нормоксических культурах число клеток с выявляемым в цитоплазме HIF-1 $\alpha$  сильно варьировало в зависимости от пассажа клеток и составляло от 13 до 75 % популяции. Экспозиция при 5%  $O_2$  в течение 24 ч. снижала число клеток, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$  при этом значения варьировали от 5 до 50% популяции (рис. 4). Снижение до 1%  $O_2$  в среде приводило к понижению доли клеток, экспрессирующих исследуемый транскрипционный фактор до критически низких значений.

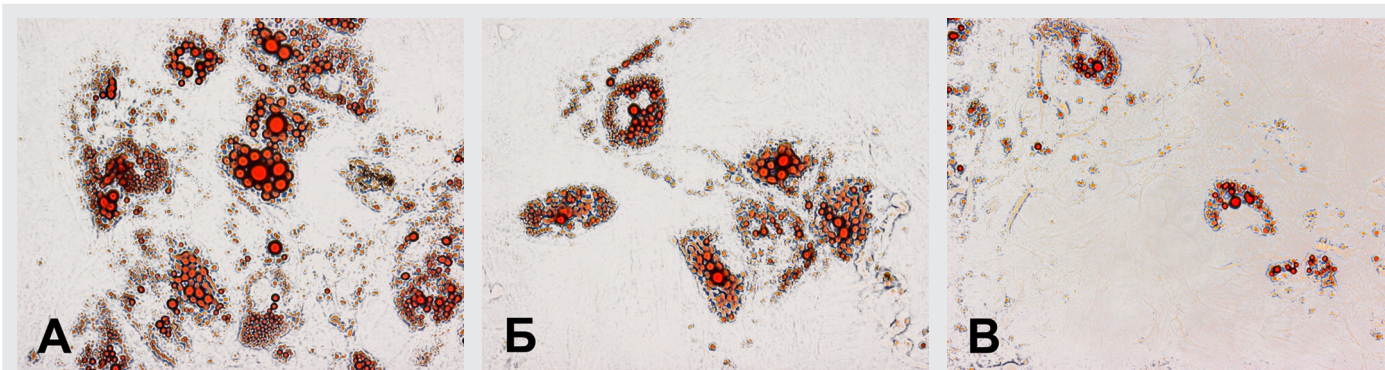


Рис. 2. Индуцированная адипогенная дифференцировка МСК, культивируемых при различном содержании кислорода: А – 20%  $O_2$ ; Б – 5%  $O_2$ ; В – 1%  $O_2$ . Окраска: масляный красный О. Ув.  $\times 400$

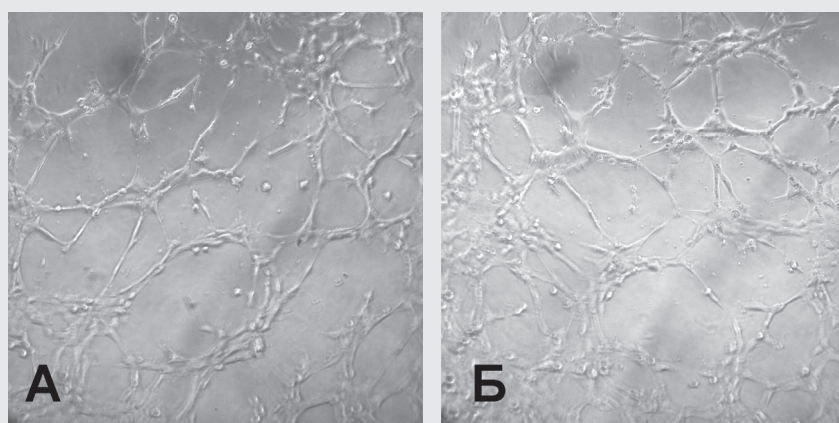


Рис. 3. Капилляроподобные структуры в культуре МСК, инкубированных при 20%  $O_2$  (А) и 5%  $O_2$  (Б). Фазовый контраст. Ув.  $\times 100$

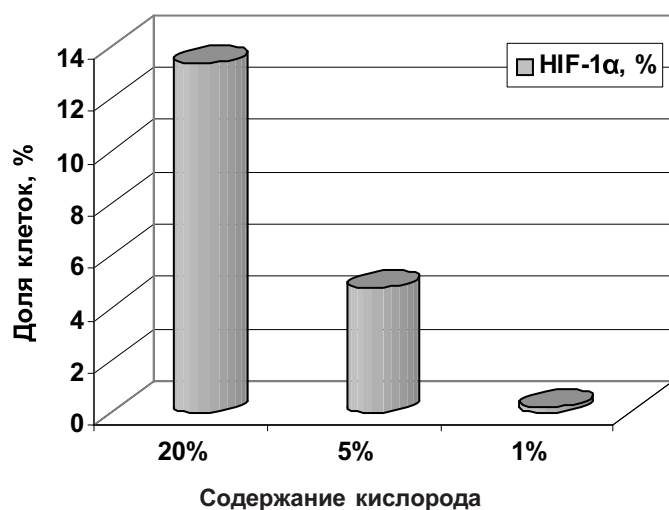


Рис. 4. Доля клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  в цитоплазме МСК, культивируемых при различном содержании кислорода. Экспозиция – 24 ч. Данные репрезентативного эксперимента для клеток 5 пассажа

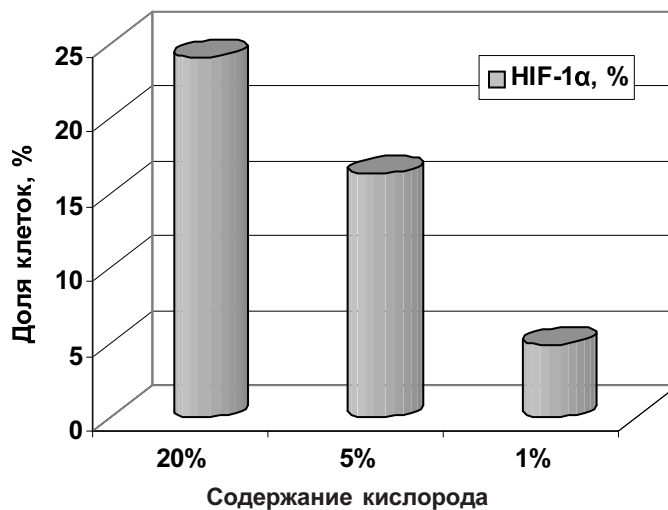


Рис. 5. Доля клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  в цитоплазме МСК, культивируемых при различном содержании кислорода. Экспозиция – 7 сут. Данные репрезентативного эксперимента для клеток 5 пассажа

Аналогичное уменьшение числа клеток, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$  было установлено в 7-суточных культурах МСК, экспонированных при 1 и 5% O<sub>2</sub> (рис. 5). В популяциях МСК, культивируемых в течение 7 сут. при 20% O<sub>2</sub> наблюдали высокий уровень числа клеток, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$ , сопоставимый с показателями 24-часовой экспозиции, который составлял от 24 до 85%, в зависимости от пассажа МСК. Понижение содержания кислорода в среде сопровождалось снижением числа клеток с экспрессией HIF-1 $\alpha$ . Доля клеток, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$  при культивировании в среде, содержащей 5% O<sub>2</sub>, варьировала от 16 до 77%. При инкубировании клеток в течение 7 сут. при 1% O<sub>2</sub> отмечали снижение доли клеток, экспрессирующих HIF-1 $\alpha$  до 4%.

### Обсуждение

Дифференцировочный потенциал является одной из определяющих функциональных характеристик МСК.

Индукцированная остеогенная дифференцировка приводила к появлению клеток, обладающих полигональной формой, продуцирующих минерализованный матрикс. Свойства изученных клеток, одновременно направленных по пути дифференцировки, в разной степени соответствовали приведенным признакам. Свидетельствующие о функциональной активности МСК костного мозга человека признаки остеогенной и адипогенной дифференцировки в значительной степени варьировали в зависимости от концентрации кислорода. Если в среде, содержащей 5% O<sub>2</sub> наблюдалось понижение способности МСК к минерализации внеклеточного матрикса и накоплению липидных капель, по сравнению с таковыми при 20% O<sub>2</sub>, то в условиях 1% O<sub>2</sub> МСК практически теряли способность к минерализации матрикса и не могли успешно дифференцироваться в адипоцитарном направлении, что, вероятно, свидетельствует о невозможности завершить фенотипическую трансформацию в условиях «жесткой» гипоксии.

На культурах МСК, остеобластов человека и иммортализованных остеобластоподобных клетках было показано, что в условиях пониженного содержания кислорода (0,2–2% O<sub>2</sub>) происходит снижение экспрессии ключе-

вого для остеогенной дифференцировки транскрипционного фактора – Runx2. Как следствие этого продемонстрировано снижение образования «нодул» и минерализованных участков в культуре исследуемых клеток [17]. Ранее нами показано, что культивирование МСК из костного мозга крыс в среде с остеогенными стимулами при пониженном содержании кислорода (5% O<sub>2</sub>) приводит к снижению активности раннего маркера остеогенной дифференцировки – щелочной фосфатазы [18].

T. Fink и соавт. при изучении адипогенного фенотипа МСК человека в условиях низкого содержания кислорода (1–2% O<sub>2</sub>) установили, что, несмотря на накопление липидов во внутриклеточном пространстве, эти процессы, свидетельствующие о приобретении клетками адипогенного фенотипа, не сопровождались увеличенной транскрипцией специфичных для адипоцитов факторов, таких как ADD1/SREBP1c, PPAR- $\gamma$ 2, aP2. Авторы отмечают также, что при определенных гипоксических условиях МСК способны приобрести морфологию адипоцитарных клеток в отсутствие истинного адипогенного преобразования [19].

Потенциал МСК костного мозга человека не ограничивается только дифференцировкой по ортодоксальным направлениям. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что действие определенных ростовых факторов и химических индукторов вызывает дифференцировку МСК в нейроноподобные клетки [20, 21], гепатоциты [22], эпителиоциты легких [23]. Согласно данным M. Majumdar, МСК не только сами подвергаются различным дифференцировкам, но и способны регулировать дифференцировку других стволовых клеток, в частности, кровяных [24]. В нашей работе при оценке способности МСК образовывать капиллярноподобные структуры была доказана возможность этих клеток дифференцироваться в эндотелиальном направлении, успешно реализуемая и при пониженном содержании кислорода в среде. Необходимо отметить, что наряду с изменениями дифференцировочных способностей МСК в остеогенном и адипогенном направлениях при культивировании в течение 3 нед. в условиях пониженного содер-

жания кислорода, показанными в нашем исследовании, при дифференцировке МСК в эндотелиальном направлении отчетливых различий не установлено. По-видимому, короткие сроки экспонирования МСК при различном содержании кислорода не позволили выявить отличительные особенности при формировании капиллярноподобных структур.

Продемонстрированные уже через 24 ч различия в экспрессии HIF-1 $\alpha$  в нормоксических и гипоксических условиях подтверждают, что транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  является одним из первых регуляторов клеточного системного ответа индуцирующих адаптивную реакцию. Это происходит путем транслокации HIF-1 $\alpha$  из цитоплазматического пространства в ядро и гетеродимеризации с конститутивно экспрессируемой субъединицей HIF-1 $\beta$ , образования транскрипционного активного комплекса и последующей транскрипционной активацией генов-мишеней [5, 8, 25]. В исследованиях с культурами клеток, так и условиях *in vivo* описывают переход цитоплазматического HIF-1 $\alpha$  в ядро в гипоксических условиях [26, 27]. Таким образом, можно предположить, что детектируемое на уровне белка снижение HIF-1 $\alpha$  относительно нормоксических условий, указывает на активацию данного транскрипционного фактора при пониженном содержании кислорода. Кроме того, известно, что в нормоксических условиях HIF-1 $\alpha$  подвергается убиквитин-протеасомальной деградации в реакциях пролил-гидроксирования [9]. Высокая активность пос-

ледних, направленная на снижение содержания HIF-1 $\alpha$ , зависит от O<sub>2</sub> и косубстратов этих реакций —  $\alpha$ -кетоглутарата и аспартата, которые проявляют при этом антиоксидантные свойства и ограничивают свободнорадикальную активность. Исходя из этого, целесообразно допустить, что широкая вариабельность содержания HIF-1 $\alpha$  в нормоксических условиях на фоне уменьшения при пониженном содержании кислорода тесно сопряжена с регуляторным взаимодействием пролил-гидроксилазных реакций и сигнальными субстратами.

Таким образом, признаки, свидетельствующие о реализации дифференцировочных потенциалов МСК, в существенной степени варьировали в зависимости от концентрации кислорода. Если в среде, содержащей 5% O<sub>2</sub>, наблюдалось небольшое понижение способности МСК к минерализации внеклеточного матрикса и накоплению липидных капель по сравнению с таковыми при 20% O<sub>2</sub>, то в условиях 1% O<sub>2</sub> МСК практически полностью теряли способность к минерализации матрикса и не могли дифференцироваться в адипоцитарном направлении. Не исключено, что эти процессы могут регулироваться за счет активации гипоксией индуцибельного транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ , который модулирует работу множества генов, активирующих синтез ростовых факторов, гликолитических ферментов, проапоптотических белков.

Работа выполнена при поддержке программы ОБН РАН и госконтракта Роснауки № 02.552.11.2006.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop Res.* 1991; 9 (5): 641–50.
2. Pittenger M. F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–7.
3. Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 1992; 12 (12): 5447–54.
4. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M. et al. Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998; 394: 485–490.
5. Semenza G.L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2000; 35: 71–103.
6. Greijer A.E., van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 2004; 57: 1009–14.
7. Manalo D.J., Rován A., Lavoie T. et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005; 105: 659–69.
8. Wang G.L., Jiang B.H., Semenza G.L. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 216: 669–75.
9. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W. et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271–5.
10. Yun Z., Maecker H.L., Johnson R.S., Giaccia A.J. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev. Cell.* 2002; 2: 331–41.
11. Pacary E., Legros H., Valable S. et al. Synergistic effects of CoCl<sub>2</sub> and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *J. Cell Sci.* 2006; 119: 2667–78.
12. Kieda C., Greferath R., Da Silva C.C. et al. Suppression of hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  and of angiogenesis in endothelial cells by myo-inositol trispyrophosphate-treated erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103(42): 15576–81.
13. Provot S., Zinyk D., Gunes Y. et al. HIF-16 regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J. Cell Biol.* 2007; 177: 451–64.
14. Ramnrez-Bergeron D.L., Simon M. C. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells* 2001; 19(4): 279–86.

15. Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 2003; 9: 677–84.

16. Kelly B.D., Hackett S.F., Hirota K. et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ. Res.* 2003; 93(11): 1074–81.

17. Salim A., Nacamuli R.P., Morgan E.F. et al. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 40007–16.

18. Буравкова Л.Б., Анохина Е.Б. Мезенхимальные стромальные клетки-предшественники: общая характеристика и особенности функционального состояния при пониженном содержании кислорода. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова* 2008; 94 (7): 737–57.

19. Fink T., Abildtrup L., Fogd K. et al. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells* 2004; 22: 1346–55.

20. Hermann A., Gastl R., Liebau S. et al. Efficient generation of neural stem cell-like from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 4411–22.

21. Wislet-Gendebien S., Hans G., Leprince P. et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem cells.* 2005; 23 (3): 392–402.

22. Wang P.P., Wang J.H., Yan Z.P. et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 320: 712–16.

23. Prockop D.J., Gregory C.A., Spees L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 11917–23.

24. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D. et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 1998; 176: 57–66.

25. Maxwell P.H., Dachs G.U., Gleadle J.M. et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 8104–09.

26. Hollander A.P., Corke K.P., Freemont A.J., Lewis C.E. Expression of hypoxia-inducible factor 16 by macrophages in the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 2001; 44 (7): 1540–44.

27. Hitchon C., Wong K., Ma G. et al. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2002; 46 (10): 2587–97.

Поступила 21.01.2009