

РОЛЬ БЕЛКА ABCG2 В ПОДДЕРЖАНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

© 2016 г. А.Г. Полешко, И.Д. Волотовский

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220073, Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь

E-mail: renovacio888@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.15 г.

Показано, что гипоксия (5% O₂) и фактор роста фибробластов bFGF уменьшают время удвоения популяции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, что свидетельствует о повышении пролиферации культуры клеток. Установлено, что низкие концентрации O₂ и фактор bFGF в среде культивирования клеток повышают экспрессию гена *abcg2* и его белкового продукта – транспортера ABCG2 в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга. Совместное действие этих факторов характеризуется потенцированием выявленных в мезенхимальных стволовых клетках эффектов гипоксии. Выявлено, что блокирование функциональной активности белка ABCG2 приводит к повышенному образованию активных форм кислорода в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга. Изучено влияние гипоксии и/или bFGF на белковый профиль мезенхимальных стволовых клеток. Приведенные в работе результаты наряду с ранее полученными данными доказывают наличие связи между экспрессией и функционированием белка ABCG2 и поддержанием жизнеспособности и пролиферативной активности мезенхимальных стволовых клеток при культивировании их в гипоксии: ABCG2 выполняет защитную функцию.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, белок ABCG2, гипоксия, фактор роста bFGF, порфирины.

В зависимости от выраженности (% содержания O₂) и времени воздействия гипоксия может выступать в роли мощного стрессорного фактора и модулятора внутриклеточных метаболических процессов, оказывая различное влияние на способность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к пролиферации и дифференцировке [1–4]. Известно, что при отсутствии O₂ в среде наступает гибель клетки, однако в состоянии гипоксии клетка запускает экспрессию генов, ответственных за регуляцию процессов жизнедеятельности и поддержание жизнеспособности [5–8] с тем, чтобы изменение уровня потребления O₂ не сказалось радикально на ее функционировании.

Доказано, что ключевую роль в этом ответе клетки играет индуцируемый гипоксией фактор HIF-1 [8–10]. Оказалось, что посредством транскрипционного фактора HIF-1 5% гипоксия мо-

дулирует множество метаболических процессов в клетке, связанных с потреблением O₂, получением и преобразованием энергии, синтезом различных ростовых факторов, цитокинов, выведением ксенобиотиков, старением, а также апоптозом и др. [3,9]. Активация этих процессов – компенсаторная реакция клетки, в результате которой запускаются защитные механизмы, стабилизирующие основные процессы жизнедеятельности, что позволяет ей реализовать генетически заложенный потенциал.

Известно, что и в норме в организме поддерживаются физиологические условия гипоксии, например, в нише мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани содержание O₂ более низкое (1–7%), чем в атмосферном воздухе – 21% O₂ [7,11]. По всей видимости, фактор HIF-1 контролирует функционирование МСК в их нишах через активацию механизмов, которые обеспечивают деление и дифференцировку клеток [7,9,12]. При культивировании МСК *in vitro* при низких концентрациях O₂ (гипоксии) также повышается пролиферативная активность и жизнеспособность клеток при со-

Сокращения: МСК – мезенхимальные стволовые клетки, ПП-9 – протопорфирин 9, bFGF – фактор роста фибробластов, АФК – активные формы кислорода, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка, АЛК – 5-аминолевулиновая кислота.

хранении их дифференцировочного потенциала [13,14].

Процесс порфириногенеза/гемообразования относится к метаболическим реакциям клетки, которые одними из первых реагируют на снижение содержания O_2 во внеклеточной среде. Интермедиаты порфириногенеза, в основном протопорфирин-9 (ПП-9), гем и продукты их распада могут оказывать непосредственное негативное влияние на жизнеспособность и реализацию генетического потенциала МСК [3,9].

В некоторых работах, например, показано, что в поддержании жизнеспособности и нормальной жизнедеятельности эмбриональных и гемопоэтических стволовых клеток *in vivo* определенную роль играет белок-транспортер ABCG2, ответственный за выброс из клетки порфиринов и продуктов их метаболизма [12,15]. Действительно, повышенная экспрессия ABCG2 характерна для тех клеток (стволовые, раковые и др. клетки взрослого организма) [16–19], которые активно выводят продукты метаболизма, оказывающие повреждающее воздействие на клетку, например порфириновые пигменты и ксенобиотики различного происхождения [20,21].

Также показано, что для поддержания жизнеспособности и активации пролиферации МСК при культивировании в условиях с атмосферным содержанием O_2 (21%) оказываются эффективными различные ростовые факторы, в особенности фактор роста фибробластов (bFGF) [22–25]. Ранее мы продемонстрировали, что при культивировании МСК в условиях гипоксии bFGF дополнительно стимулирует пролиферацию клеток, сохраняя их высокую жизнеспособность, и снижает внутриклеточное образование активных форм кислорода (АФК) [14,26]. Кроме того, внесение bFGF в питательную среду для роста клеток при гипоксии, которая стимулирует порфириногенез и гемообразование [27], снижает и внутриклеточное содержание конечных продуктов этих метаболических реакций [14].

Целью настоящей работы стало изучение экспрессии белка-транспортера ABCG2 в МСК костного мозга при различных кислородных режимах культивирования: нормоксии (21% O_2) и гипоксии (5% O_2) без и в присутствии фактора роста bFGF, что позволило определить роль фактора в процессах адаптации МСК костного мозга к гипоксическим условиям культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура МСК костного мозга. МСК выделяли из костного мозга бедренных и большеберцовых костей белых беспородных крыс трех–пятимесячного возраста после их декапитации, вымывая его средой α -МЕМ (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Полученный материал дезагрегировали до клеточной суспензии, которую высевали в культуральные флаконы (Sarstedt, Германия). Через 24 ч среду с неадгезированными клетками удаляли, адгезированные клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,4) (Gibco, Великобритания) и заливали свежей питательной средой α -МЕМ. Замену среды проводили каждые трое суток. Смену пассажа осуществляли при достижении 70–80% конfluenceности монослоя, после чего клетки обрабатывали 0,25–0,02% раствором трипсин-ЭДТА (Invitrogen, США) и пересевали в новые флаконы. В экспериментах использовали клетки второго–третьего пассажа с фенотипом CD29⁺/CD44⁺/CD90⁺, типичным для МСК костного мозга, количество которых в общей популяции клеток составляло 95%. Содержание клеток с фенотипом CD34⁺/CD45⁺, характерным для гемопоэтических стволовых клеток, не превышало 2%.

Для изучения влияния ростового фактора bFGF в условиях гипоксии спустя сутки после посева клетки переводили из среды α -МЕМ с 10% ЭТС в ростовую среду того же состава, но содержащую 2% ЭТС. Затем к МСК добавляли bFGF (Sigma, США), в концентрации 7 нг/мл [28], часть флаконов с клеточным содержимым переносили в гипоксический CO_2 -инкубатор для культивирования в условиях 5% содержания кислорода (5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2), вторую часть продолжали культивировать в стандартных условиях (5% CO_2 , 95% атмосферного воздуха). Клеточную культуру выдерживали в присутствии bFGF, при гипоксии в течение 72 ч, после чего клетки снимали с пластика и подсчитывали их количество в камере Горяева. Пролиферативную активность культуры анализировали по времени клеточных удвоений популяции, которое вычисляли по формуле $y = t/3,32 \times \log(N/N_0)$, где y – время удвоения популяции МСК, t – период времени роста культуры, N – начальное количество клеток, N_0 – конечное количество клеток.

ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Выделение РНК из клеток проводили

с использованием набора RNAqueous®-4PCR Kit (Applied Biosystems Inc., США) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по оптической плотности ее раствора, при $\lambda = 260$ нм.

Для исследований экспрессии гена белка ABCG2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени использовали 380 нг очищенной РНК. Синтез кДНК из РНК осуществляли с использованием набора «High Capacity RNA-to-cDNA Kit» (Applied Biosystems Inc., США) согласно руководству для пользователя. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе CFX 96 (BioRad, США) с использованием набора реагентов «TaqMan® Gene Expression Master Mix» (Applied Biosystems Inc., США) и праймеров к гену *abcg2* (кат. № Rn00710585_m1, Applied Biosystems Inc., США), соблюдая условия, рекомендованные производителем.

Уровень содержания мРНК анализируемых генов выравнивали по отношению к мРНК референтного гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы «TaqMan® Rodent GAPDH Control» (Applied Biosystems Inc., США).

Проточная цитофлуориметрия. Для исследования экспрессии белка ABCG2 клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере, фиксировали 15 мин в 4% параформальдегиде (Sigma, США) при комнатной температуре в темноте, затем снова отмывали в фосфатно-солевом буфере и обрабатывали 0,1% сапониновым буфером (Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте для перфорации плазматической мембраны МСК. Далее клетки переводили в 0,1% сапониновый буфер, доведя их концентрацию до $1,5 \cdot 10^5$ кл/мл, инкубировали опытный образец с немечеными антителами к ABCG2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., США) в разведении 1:20 и контрольный образец к нему с немечеными антителами того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера (Santa Cruz Biotechnology Inc., США) в разведении 1:5 в течение 40 мин при комнатной температуре. После этого МСК отмывали сапониновым буфером от несвязавшихся антител и инкубировали опытный и контрольный образцы клеток в сапониновом буфере со вторичными антителами, мечеными флуоресцеинизотиоцианатом (Santa Cruz Biotechnology Inc., США), при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После отмывки сапониновым буфером и ресуспендирования осадка в 200 мкл фосфатно-солевого буфера образцы анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACScanto II (Becton Dickinson, США) в канале флуоресцеинизотиоцианата, гистограммы их распределения по интенсивно-

сти флуоресценции оценивали с помощью программного обеспечения DIVA-6.0.

Обработка культуры клеток ингибитором белка-транспортера ABCG2 и измерение содержания АФК. Для изучения влияния белка ABCG2 на накопление АФК в клетках МСК третьего пассажа после 72 ч культивирования переводили из среды с 10% ЭТС в α -МЕМ без ЭТС, куда вносили в качестве индуктора порфириногена 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 8 мМ [28], смесь инкубировали в течение 1 ч в темноте при 37°C, после чего в среду добавляли функциональный блокатор ABCG2 – фумитреморгин С [27] (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ [21] и инкубировали вместе с АЛК 2 ч в темноте при 37°C параллельно с контрольными образцами. После инкубации среду сливали, а клетки переводили из монослоя в суспензию. Перед измерением на проточном цитофлуориметре клетки в концентрации $1,5 \cdot 10^5$ кл/мл инкубировали по отдельности с флуоресцентными зондами CM-H₂DCFDA (5-(и-6)-хлорметил-2,7-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат ацетиловый эфир, Invitrogen, США) (конечная концентрация 3 мкМ) в течение 30 мин в темноте при 37°C и дигидроэтидиумом (Sigma, США) (конечная концентрация 25 мкМ) в течение 20 мин в темноте при 37°C. Затем образцы два раза отмывали в фосфатно-солевом буфере от несвязавшихся зондов и инкубировали в темноте при 37°C 2 ч для CM-H₂DCFDA, 1 ч – дигидроэтидиума. Содержание АФК в клетках оценивали по стандартной методике на проточном цитофлуориметре FACScanto II. По интенсивности внутриклеточной флуоресценции окисленных форм зондов CM-H₂DCFDA и дигидроэтидиума судили о содержании в них H₂O₂ и O₂⁻ соответственно [29].

Двумерный гель-электрофорез. Клетки переводили из монослоя в суспензию при помощи 0,25–0,02% раствора трипсина-ЭДТА и отмывали фосфатно-солевым буфером. К осадку клеток в количестве 10^6 добавляли 0,5 мл лизирующего буфера (50 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ 1% ингибитора протеаз фенилметилсульфонилфторида и 65 мМ дитиотреитола), в котором клетки выдерживали 30 мин при 4°C, перемешивая через каждые 5 мин. После этого образцы центрифугировали в течение 15 мин при 13000 g, супернатант сливали, к осадку доливали три объема холодного ацетона и выдерживали 2 ч при –20°C. Затем образцы центрифугировали при 13000 g и сливали супернатант. Полученный осадок растворяли в 135 мкл буфера для электрофореза (8 М мочевины,

4% CHAPS (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат), 50 мМ дитиотреитола, 0,2% амфолита 3–10, 0,001% бромфенола синего). Для проведения двумерного гель-электрофореза на каждый стрип (7 см, градиент рН 3–10; BioRad, США) наносили по 200 мкг белкового лизата исследуемых образцов. После нанесения на стрип буфера, содержащего белок, разделение белков по рI – изоэлектрическое фокусирование – проводили в камере для изоэлектрофокусирования (BioRad, США), согласно инструкции производителя. После разделения белков по их зарядам каждый стрип обрабатывали уравнивающими буферными растворами, сначала содержащим 0,5% дитиотреитола, затем – 4,5% йодацетамида при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее проводили разделение белков по молекулярной массе в 12,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по второму направлению двумерного гель-электрофореза. Белки визуализировали, используя обработку гелей 0,001% раствором нитрата серебра. Количество белка в пятнах оценивали по интенсивности их окраски, используя программу PDQuest.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Данные представляли в виде средних величин \pm стандартное отклонение. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ABCG2 (ATP-binding cassette, G-subfamily, 2-member) – АТФ-связывающий транспортный белок – экспрессируется в большинстве клеток животных организмов [16–19]. Его высокая экспрессия является отличительной характеристикой фенотипа клеток (исключая раковые клетки), для которых критично важно контролировать гомеостаз внутренней среды, определяющий рост, развитие и состояние организма в целом [19–22]. Белку ABCG2 отводится особая роль в поддержании концентрационного баланса «порфирины-гем» на оптимальном для клетки уровне [15–18,30]. В животной клетке порфириновые пигменты, а именно ПП-9 и, возможно, гем, являются основными эндогенными субстратами этого транспортера. На ряде типов клеток – эмбриональных стволовых клетках, раковых клетках, астроцитах эпителия роговицы и др. – показано, что высокая экспрессия ABCG2 в них обеспечивает защитную функцию

при окислительном стрессе того или иного гена [20,21,31–33]. В основе этого эффекта лежит способность ABCG2 выводить из клетки избыток именно порфиринов/гема, индуцирующих образование АФК [15–17,20,21]. Структурные компоненты гема (железо и ПП-9) токсичны для клеток: Fe^{2+} вызывает образование гидроксил-радикала в результате протекания реакции Фентона, а ПП-9 катализирует светозависимое образование радикалов O_2 [33–35]. Так, в некоторых работах предполагается, что ABCG2 может выполнять защитную роль, повышая выживаемость эмбриональных стволовых клеток *in vivo* [15,16,20,21], через транспорт порфириновых пигментов из клетки во внеклеточную среду [20,21]. Сведения о значении белка ABCG2 для МСК на данный момент отсутствуют.

Учитывая тот факт, что транскрипционным фактором гена белка ABCG2 является индуцируемый гипоксией фактор HIF1, α -субъединица которого стабилизируется в гипоксических условиях и экспрессия гена которой повышается в МСК при их культивировании при 5% O_2 и в присутствии фактора роста bFGF [26], мы изучили влияние гипоксии (5% O_2) на его экспрессию в культуре МСК, выращенной в присутствии и без bFGF. Оказалось, что гипоксия повышает экспрессию ABCG2 как на этапе транскрипции, так и на этапе трансляции его гена (рис. 1а,б).

При этом внесение в среду культивирования фактора роста bFGF также способствует повышению синтеза транспортера в МСК. Следует отметить, что МСК, культивируемые в среде с низким содержанием кислорода и в присутствии bFGF, характеризуются максимальной экспрессией ABCG2 по сравнению с действием этих факторов по отдельности, причем эффект аддитивности не наблюдается.

Ранее было показано, что перевод МСК в гипоксические условия культивирования приводит к росту содержания АЛК-индуцированных порфириновых пигментов и стимуляции процесса гемообразования по сравнению с нормоксией [27]. Этот факт свидетельствует о том, что клетка, оказываясь в условиях гипоксии, после культивирования в нормоксии подстраивает свои метаболические процессы к условиям *in vivo*, т.е. к низкому содержанию кислорода. Поэтому можно думать, что рост экспрессии транспортера порфиринов ABCG2 – это результат компенсаторной реакции поддержания порфиринового баланса в МСК при гипоксии, которая является физиологической нормой для них. При этом bFGF дополнительно увеличивает экспрессию ABCG2 в МСК, выращенных при гипоксии, что снижает содержание в них

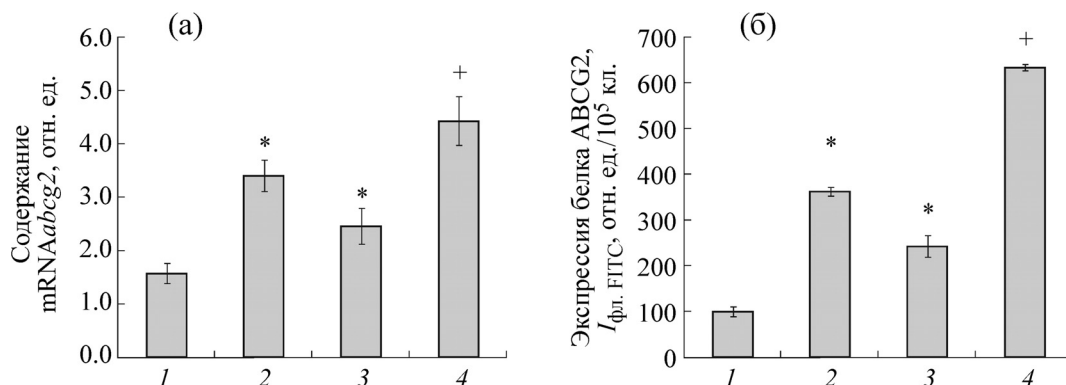


Рис. 1. Влияние гипоксии на экспрессию гена (а) и белка (б) ABCG2 в МСК костного мозга при их культивировании с фактором bFGF: 1 – нормоксия (21% O₂), 2 – гипоксия (5%, 72 ч), 3 – нормоксия (21% O₂) + bFGF (7 нг/мл, 72 ч), 4 – гипоксия (5% O₂, 72 ч) + bFGF (7 нг/мл, 72 ч); **p* < 0,05 по сравнению с 1; +*p* < 0,05 по сравнению с 1, 2, 3.

порфиринов/гема [14]. Не исключено поэтому, что ответы клетки на изменение условий культивирования, связанные с NIF-1 при добавлении bFGF, сопряжены друг с другом.

Учитывая время удвоения популяции МСК при исследуемых условиях (см. таблицу), следует отметить, что при максимальной экспрессии белка ABCG2 наблюдается максимальная пролиферативная активность клеток.

Порфирины/гем в избытке способны индуцировать в клетках образование высоких концентраций АФК и, как следствие, вызывать дифференцировку, старение и гибель клеток по механизму апоптоза [32,33]. Полученные нами ранее результаты свидетельствуют о том, что белок ABCG2 обеспечивает транспорт избыточного количества порфириновых пигментов и гема из МСК [14]. Кроме того, обнаружено, что в условиях АЛК-индуцированного порфириногенеза блокирование активности ABCG2 его функциональным ингибитором фумитреморгин С приводит к росту содержания H₂O₂ и O₂⁻ в МСК (рис. 2).

Это обстоятельство объясняет причину снижения уровня содержания АФК в МСК и увеличение их жизнеспособности при культивировании *in vitro* в условиях гипоксии и в присутствии фактора bFGF [14, 26].

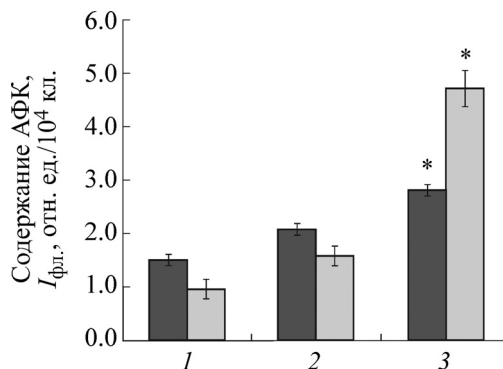


Рис. 2. Влияние фумитреморгина С на образование активных форм кислорода в МСК костного мозга при АЛК-индукции порфириногенеза в условиях нормоксии (21% O₂): темные столбики – O₂⁻; светлые столбики – H₂O₂; 1 – контроль, 2 – АЛК (0,8 мМ), 3 – АЛК (0,8 мМ) + фумитреморгин С (10 мМ); **p* < 0,05.

В ходе адаптации МСК в культуре к условиям 5% гипоксии и при введении в среду культивирования фактора роста bFGF запускаются механизмы экспрессии и других генов, белковые продукты которых, по-видимому, участвуют в поддержании внутриклеточного гомеостаза и сопряжения между различными метаболическими путями. Об этом свидетельствуют данные двумерного геле-электрофореза белков МСК (рис. 3).

Пролиферативная активность МСК костного мозга при различных условиях культивирования

Условия культивирования	Нормоксия (21% O ₂)	bFGF 7 нг/мл, 72 ч	Гипоксия 5% O ₂ , 72 ч	Гипоксия 5% O ₂ ; bFGF 7 нг/мл, 72 ч
Время удвоения популяции клеток, ч	64 ± 0,29	57,1 ± 0,14 ⁺	59 ± 0,18 ⁺	40 ± 1,2 ⁺ *

Примечание. + – *p* < 0,05 (относительно нормоксии); * – *p* < 0,05 (относительно влияния bFGF и гипоксии по отдельности).

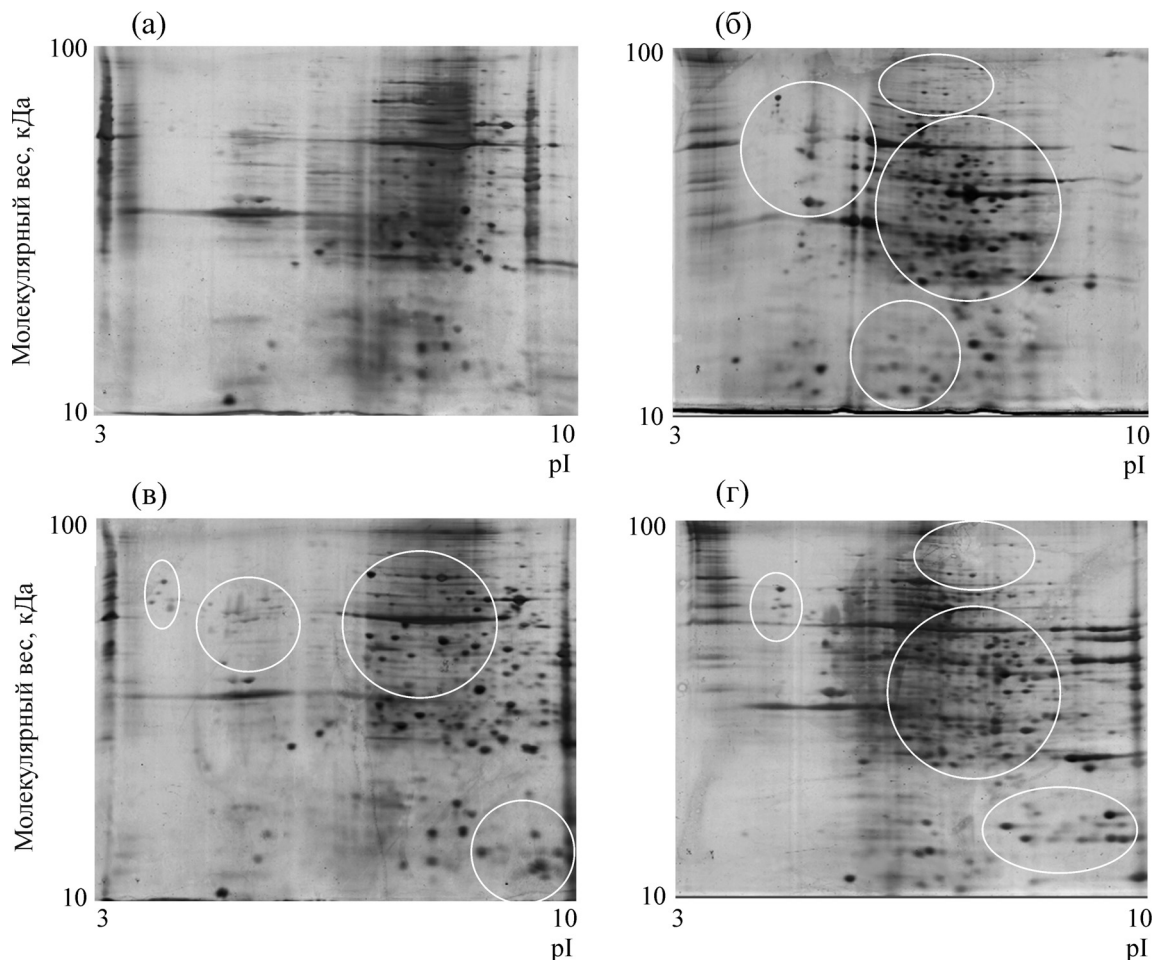


Рис. 3. Двумерные гель-электрофореграммы белков МСК костного мозга (третий пассаж), культивированных: (а) – при нормоксии (21% O₂), (б) – гипоксии (5% O₂; 72 ч), (в) – нормоксии (21% O₂) с bFGF (7 нг/мл; 72 ч), (г) – гипоксии (5% O₂; 72 ч) с bFGF (7 нг/мл; 72 ч).

При смене стандартных условий культивирования на гипоксические в присутствии и без bFGF в среде роста отмечается появление в низкомолекулярной и высокомолекулярной областях большого количества белковых пятен, отличающихся интенсивностью окраски, что свидетельствует об изменении концентрации белков в клетках.

ВЫВОДЫ

Таким образом, можно сделать вывод, что ABCG2 имеет определяющее значение для сохранения высокой жизнеспособности культуры МСК на фоне реализации максимальной пролиферативной активности клеток при их культивировании в условиях 5% гипоксии, через поддержание порфиринового гомеостаза, как одного из метаболических процессов, критических для нормальной жизнедеятельности клет-

ки. Фактор роста bFGF потенцирует эффект гипоксии.

Данная статья подготовлена по материалам V Съезда биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Lavrentieva, I. Majore, C. Kasper, et al., *Cell Commun. Signal.* **8**, 18 (2010).
2. A. Salim, R. P. Nacamuli, E. F. Morgan, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (38), 40007 (2004).
3. D. P. Lennon, J. M. Edmison, A. I. Caplan, *J. Cell Physiol.* **187** (3), 345 (2001).
4. P. Malladi, Y. Xu, M. Chiou, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290** (4), 1139 (2006).
5. C. Holzwarth, M. Vaegler, F. Gieseke, et al., *BMC Cell Biol.* **11**, 11 (2010).
6. Н. С. Тихонова, О. С. Москалева, Б. А. Маргулис и И. В. Гужова, *Цитология* **50** (5), 467 (2008).

7. L. Basciano, C. Nemos, B. Foliguet, et al., *BMC Cell Biol.* **12**, 12 (2011).
8. H. Abdollahi, L. J. Harris, P. Zhang, et al., *J. Surg. Res.* **165** (1), 112 (2011).
9. R. H. Wenger, D. P. Stiehl, G. Camenisch, *Sci. STKE* **12** (306), re12 (2005).
10. G. L. Semenza, *Physiology* **19**, 176 (2004).
11. R. H. Wenger, *FASEB J.* **16** (10), 1151 (2002).
12. T. Ma, W. L. Grayson, M. Fröhlich, and G. Vunjak-Novakovic, *Biotechnol. Prog.* **25** (1), 32 (2009).
13. *Assessment of HIF-1 α function and identification of a novel degradation mechanism*, Ed. by H. Andre (Karolinska Institutet, Stockholm, 2009).
14. А. Г. Полешко, Е. С. Лобанок, Л. М. Межевикина и др., *Биофизика* **59** (6), 1125 (2014).
15. R. Larsen, Z. Gouveia, M. P. Soares, et al., *Front Pharmacol.* **3**, 77 (2012).
16. P. Krishnamurthy, D. D. Ross, T. Nakanishi, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (23), 24218 (2004).
17. B. Sarkadi, C. Ozvegy-Laczka, K. Nemet, et al., *FEBS Lett.* **567**, 116 (2004).
18. L. Douglas and D. Ross, *Oncogene*. **22**, 7340 (2003).
19. B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakacs, and A. Varadi, *Physiol. Rev.* **86** (4), 1179 (2006).
20. A. A. Khan and J. G. Quigley, *Biochim. Biophys. Acta* **1813** (5), 668 (2011).
21. J. Susanto, Y. Lin, Y. Chen, et al., *PLoS One* **3** (12), e4023 (2008).
22. C. Hirschmann-Jax, A. E. Foster, G. G. Wulf, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (39), 14228 (2004).
23. Y. R. Yun, J. E. Won, E. Jeon, et al., *J. Tissue Eng. Art.* 218142 (2010).
24. N. Gotoh, *Curr Stem Cell Res Ther.* **4** (1), 9 (2009).
25. Y. W. Eom, J. E. Oh, J. I. Lee, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445** (1), 16 (2014).
26. А. Г. Полешко и И. Д. Волотовский, *Гены и клетки* **10** (2), 73 (2015).
27. А. Г. Полешко, Е. С. Лобанок и И. Д. Волотовский, *Клеточные технологии в биологии и медицине* **1**, 57 (2014).
28. А. Г. Полешко, Е. С. Лобанок и И. Д. Волотовский, *Вести НАН* **2**, 77 (2014).
29. A. Gomes, E. Fernandes, and J. L. Lima, *J. Biochem. Biophys. Methods* **65** (2–3), 45 (2005).
30. P. Aisen, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36** (11), 2137 (2004).
31. M. Garc3a-Escarp, V. Mart3nez-Munoz, I. Sales-Pardo, et al., *Cytometry A* **62** (2), 129 (2004).
32. M. Kubota, S. Shimmura, H. Miyashita, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51** (11), 5617 (2010).
33. M. Solazzo, O. Fantappie, M. D'Amico, et al., *Cancer Res.* **69** (18), 7235 (2009).
34. A. Görlach, E. Y. Dimova, A. Petry, et al., *Redox Biol.* **6**, 372 (2015).
35. Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина и М. Н. Бизенкова, *Современные проблемы науки и образования* **6**, 21 (2006).

The Role of ABCG2 Protein in Maintenance of Viability and Proliferative Activity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Under Hypoxic Conditions

A.G. Poleshko and I.D. Volotovski

*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Akademicheskaya 27, Minsk, 220073 Belarus*

It has been shown that hypoxia (5% O₂) and fibroblast growth factor bFGF reduce the doubling time of bone marrow mesenchymal stem cells under their cultivation *in vitro* that indicates an increase in cell culture proliferation. It has been found out that low concentrations of O₂ and factor bFGF added to the cell culture medium increase an expression of *abcg2* gene and its gene protein, ABCG2 transport gene, in mesenchymal stem cells. These events potentiate the effects of hypoxia observed in mesenchymal stem cells. We revealed that blocking of ABCG2 protein functional activity led to increased generation of reactive oxygen species in mesenchymal stem cells. The effect of hypoxia and/or bFGF on protein profile of mesenchymal stem cells was studied. The results represented in this work together with previous data proved a link between ABCG2 protein expression, its activity and maintenance of viability and proliferative activity of mesenchymal stem cells cultivated under hypoxia. ABCG2 acts as protector.

Key words: mesenchymal stem cells, ABCG2 protein, hypoxia, growth factor bFGF, porphyrins