**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

**ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

*На правах рукопису*

**ПЛОТНІКОВА ЛІДІЯ МИКОЛАЇВНА**

УДК 612.275:57.032:576.53

**ВПЛИВ ПАРЦІАЛЬНОГО ТИСКУ КИСНЮ ТА ДОНОРА СІРКОВОДНЮ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ЛІНІЇ 4*BL***

03.00.13 – фізіологія людини та тварин

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник

Березовський Вадим Якимович

доктор медичних наук, професор

**Київ – 2015**

**ЗМІСТ**

**Перелік умовних скорочень**……………………………………………………5

**Вступ**………………………………………………………………………………6

**Розділ 1. Огляд літератури**…………………………………………………….12

1.1. Характеристика стовбурових клітин ………...……………………………12

1.2. Молекулярні механізми, що індукуються у клітинах при зниженому парціальному тиску кисню …..…………………………………………………19

1.3. Вплив зниженого парціального тиску кисню на проліферацію і диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин………………………….25

1.4. Механізми реалізації впливу сірководню на клітини………….……...….32

1.4.1. Роль сірководню в регуляції апоптозу клітин…………………………..36

1.4.2. Роль сірководню у цитопротекції………………………………………..38

**Розділ 2. Матеріали і методи дослідження**…………………………………..42

2.1. Умови культивування соматичних клітин людини лінії 4*BL*…..………...42

2.2. Оцінка проліферації клітин у культурі …………………………..………..43

2.3. Визначення концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини…………………………………………………………………44

2.4. Визначення активності лужної фосфатази в культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини……………………………………………………..45

2.5. Визначення концентрації вільних амінокислот у культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини……………………………………………………..46

2.6. Методи статистичної обробки результатів………………………………..47

**Розділ 3. Результати досліджень**…………………………………….………..48

3.1. Морфологічні характеристики культивованих клітин людини лінії 4*BL* в умовах зниженого парціального тиску кисню та додавання донора сірководню……………………………………..………………………………...48

3.2. Вплив 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на клітини лінії 4*BL* людини…………………………………………………………………52

3.2.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали 24-годинного впливу зниженого парціального тиску кисню……………………………..….53

3.2.2. Зміни активності лужної фосфатази і концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали 24-годинного впливу зниженого парціального тиску кисню………………………………....55

3.2.3. Концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали 24-годинного впливу зниженого парціального тиску кисню………………………………………………………………………59

3.3. Вплив переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню на клітини лінії 4*BL* людини……………………………………………………….68

3.3.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали впливу переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню………….…...68

3.3.2. Зміни активності лужної фосфатази і концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали впливу переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню………………70

3.3.3. Концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали впливу переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню…...............................................................................73

3.4. Вплив донора сірководню на клітини лінії 4*BL* людини…………………77

3.4.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини культивованих в умовах додавання донора сірководню………………………….……………………….77

3.4.2. Зміни активності лужної фосфатази і концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню…………………………………………………..80

3.4.3. Концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню………….84

3.5. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на культуру клітин лінії 4*BL* людини……………93

3.5.1. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на проліферацію клітин лінії 4*BL* людини………………………………………………………………………........93

3.5.2. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на активність лужної фосфатази і концентрацію загального білку у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини…………..94

3.5.3. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини………………………………..97

**Розділ 4. Обговорення результатів дослідження**……………………...…..104

**Висновки**…………………………………………………………...…………..117

**Список використаних джерел**……………………………………………….119

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АК – амінокислота

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

АФК – активні форми кисню

ГМК – гладенькі м'язові клітини

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДСК – дорослі стовбурові клітини

ЕСК – ембріональні стовбурові клітини

ЛФ – лужна фосфатаза

ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

МСК – мезенхімальні стромальні клітини

CA– стандартна атмосфера

СК – стовбурові клітини

ТНТ – тунельні нанотрубочки

CO– монооксид вуглецю

EPO – еритропоетин

EGF – епідермальний фактор росту

FGF – фактор росту фібробластів

H2S – сірководень

HIF-1 – фактор індукований гіпоксією

HGF – фактор росту гепатоцитів

NaHS – гідросульфід натрію

NF-kB – nuclear factor kB

NO– оксид азоту

Ро2 – парціальний тиск кисню

SAM – S-аденозилметіонін

TGFβ – трансформуючий фактор росту β

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту

VHL – білок фон Хіппель-Ліндау

**ВСТУП**

**Актуальність теми.** Культури клітин різного походження використовують у фундаментальних дослідженнях, в експериментальній медицині, для розробок і тестування лікарських препаратів, а також для цілей клітинної терапії та регенеративної медицини [105]. На сьогодні одним із найбільш перспективних методів клітинної терапії є застосування аутологічних та алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих із різних тканин організму [108, 138, 255]. Однак, з віком кількість стовбурових клітин (СК) в організмі знижується. Так, у новонародженого одна СК зустрічається на 10 тисяч, у віці до 20-25 років – 1 на 100 тисяч, до 50 – 1 на 500 тисяч диференційованих клітин [69]. Тому для практичних цілей доводиться СК, виділені з тканин, культивувати *in vitro*. Останнім часом приділяється багато уваги оптимізації методів культивування стовбурових клітин і масштабування клітинної біомаси для подальшого використання. З цієї точки зору клітинна лінія 4*ВL*, яка виділена із периферичної крові здорового донора та має властивості МСК, викликає особливий інтерес [31-32, 39]. Пошук оптимальних умов культивування МСК є актуальним напрямком досліджень.

На ростові особливості досліджуваних клітинних популяцій, у першу чергу, впливає мікрооточення: природа субстрату, на якому відбувається ріст культури, міжклітинні взаємодії, фізико-хімічний та фізіологічний склад середовища, склад газової фази, температура інкубації тощо [49, 231]. Для оптимізації умов культивування клітин мезенхімального ряду найчастіше зміни стосуються компонентів ростового середовища (вмісту поживних речовин, факторів росту, солей і амінокислот). Газовий склад традиційно залишається найбільш консервативним параметром культивування, при цьому рівень СО2 наближається до тканинного (Рсо2 = 38 мм рт. ст.), тоді як парціальний тиск кисню (Ро2) в звичайних СО2-інкубаторах відповідає атмосферному тиску 159 мм рт. ст. Проте в організмі концентрація кисню значно менша: в артеріальній крові напруження О2 становить біля 100 мм рт. ст., у венозній крові складає приблизно 35-40 мм рт. ст., а в кісткових тканинах − від 20 до 35 мм рт. ст. [14, 176]. Культивування клітин *in vitro* при зниженому Ро2 дозволяє приблизити умови до фізіологічних, тобто до *in vivo.*

Раніше сірководень (H2S) був відомий лише як токсичний газ. Зараз його відносять до групи газових трансмітерів разом із NO і CO. Встановлено, що H2S ендогенно продукується із L-цистеїну в різних тканинах за допомогою трьох ферментів: цистатіонін-β-синтази, цистатіонін-γ-ліази та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази [182, 216, 246]. Серед досліджених газотрансмітерів H2S найменш вивчений, але він є важливою сигнальною молекулою, яка бере участь у реалізації функціональних можливостей клітин. Тому актуально було дослідити вплив донора сірководню на процеси життєдіяльності клітин лінії 4*BL* людини. Показано, що знижений Ро2 та газовий трансмітер сірководень впливають на проліферацію, життєздатність, диференціювання, а також на морфологічні та імунофенотипічні показники клітин [5, 11, 164, 179, 197, 244]. Проте їх роль з’ясована недостатньо, а результати досліджень неоднозначні. Це може бути пов’язано з вибором культури клітин, а також умовами проведення експерименту, а саме: нормо- або гіпобарією, рівнем парціального тиску кисню, часовим режимом впливу, загальною тривалістю дії штучних газових сумішей, співвідношенням періодів деоксигенації та реоксигенації, кількістю циклів впливу, концентрацією донора сірководню. Все це диктує необхідність додаткових фундаментальних морфофункціональних і біохімічних досліджень для з’ясування впливу зниженого парціального тиску кисню та сірководню на проліферацію клітин лінії 4*BL* людини.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу клінічної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Дослідження реактивності сполучної тканини в умовах моделювання донозологічних форм патології та пошуки шляхів її корекції», № держреєстрації 0108U003915, яка входить до зведеного плану НДР НАН України.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було дослідження різних режимів впливу зниженого парціального тиску кисню та донора сірководню, як окремо так і сумісно, на проліферацію соматичних клітин людини лінії 4*BL*.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Порівняти вплив переривчастого і безперервного режимів подачі газової суміші зі зниженим парціальним тиском кисню на проліферацію, активність лужної фосфатази, концентрацію загального білку та амінокислотний склад культуральної рідини клітин лінії 4*BL* людини.
2. З’ясувати вплив донора сірководню NаHS (10-8, 10-9, 10-10, 10-12, 10-13, 10-15 моль/л) на проліферацію, активність лужної фосфатази, концентрацію загального білку та амінокислотний склад культуральної рідини клітин лінії 4*BL* людини.
3. Виявити особливості сумісного впливу зниженого парціального тиску кисню (23, 38 мм рт. ст.) і сірководню (10-12 моль/л NаHS) на проліферацію, активність лужної фосфатази, концентрацію загального білку та амінокислотний склад культуральної рідини клітин лінії 4*BL* людини.

*Об'єкт дослідження* –культурасоматичних клітин людини лінії 4*BL*.

*Предмет дослідження* –проліферація і метаболізм клітин лінії 4*BL* в умовах зниженого парціального тиску кисню та додавання донора сірководню.

*Методи дослідження:*фізіологічні, біохімічні, фізико-хімічні (спектрофотометрія, тонкошарова хроматографія), світлова мікроскопія, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** У дисертаційній роботі проведено комплексне дослідження впливу різних режимів зниження парціального тиску кисню та донора сірководню NaHS, як окремо так і сумісно, на проліферацію клітин лінії 4*BL* людини. Вперше досліджено зміни амінокислотного складу культуральної рідини соматичних клітин людини лінії 4*BL*. Вперше виявлено морфологічні зміни фібробластоподібних клітин лінії 4*BL* людини при додаванні у живильне середовище донора сірководню NaHS. Вперше встановлені особливості кореляційних взаємовідносин між проліферацією та параметрами впливу – парціальним тиском кисню, концентрацією сірководню та їх сумісної дії.

**Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.** Отримані в роботі експериментальні результати мають як теоретичне, так і практичне значення, оскільки дають змогу доповнити сучасні уявлення про вплив зниженого Ро2 на проліферацію клітин та їхній обмін речовин. В умовах Ро2 76 мм рт. ст. (24 год) концентрація загального білку у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* статистично вірогідно зростала, що може свідчити про інтенсифікацію синтезу компонентів міжклітинної речовини. Встановлено, що інкубування МСК людини лінії 4*BL* в середовищі з Ро2 38 і 76 мм рт. ст. (по 8 год/добу, 3 доби) активує їхню проліферацію. Такі умови здатні забезпечити отримання більшої кількості клітин за коротший час. Це може бути використано в галузі комбустіології та відновлювальної терапії.

Результати дослідження є внеском у розвиток фундаментальних знань про роль зниженого Ро2 та сірководню на процеси життєдіяльності МСК периферичної крові людини. Важливе практичне значення мають отримані в роботі експериментальні дані про гальмівний вплив H2S на проліферацію клітин (патент на корисну модель №96716). Отримані результати створюють підгрунтя для нових перспективних шляхів, направлених на пригнічення гіперпроліферативних розладів.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно здійснено пошук і аналіз вітчизняної та зарубіжної наукової літератури за напрямом дисертаційного дослідження. Розробка методичної концепції роботи, головна ідея та задачі досліджень проведені у співпраці з науковим керівником заслуженим діячем науки і техніки України, д.м.н., проф. Березовським В.Я. Проведення експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення отриманих результатів, статистична обробка даних, формулювання висновків роботи і підготовка матеріалів до публікацій проводились автором самостійно. Окремі дослідження виконано за участю співавторів публікацій.

Автор висловлює щиру подяку зав. відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, д.б.н., проф. Лукаш Л.Л. за надання культури клітин лінії 4*BL* людини. Також автор дякує старшому науковому співробітнику відділу загальної фізіології НДІ фізіології ім. акад. Петра Богача ННЦ «Інституту біології», Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, д.б.н. Весельському С.П. за надання можливості провести визначення амінокислотного складу культуральної рідини методом тонкошарової хроматографії.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на: засіданні сектору вісцеральних систем Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, 27 листопада, 2014), IV з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, 17-20 вересня, 2014); VIIІ Міжнародному симпозіумі "Актуальні проблеми біофізичної медицини" (Київ, 14-17 травня, 2014); III Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, 24-27 февраля, 2014); VI Науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 31 жовтня – 01 листопада, 2013); ІІІ Науковій конференції молодих вчених "Фізіологія: від молекул до організму" (Київ, 24-25 жовтня, 2013); VII Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 20-23 листопада, 2012); II Конференції молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму» (Київ, 8-9 жовтня, 2012); ІІ International symposium «Molecular mechanisms of synaptic transmission regulation» in memory of Professor Vladimir Skok (Kiev, 6-9 october 2012); VII Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофизической медицины» (Киев, 17-20 мая, 2012).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 8 статей у фахових наукових журналах, 10 тез доповідей на конгресах, з`їздах, конференціях та отримано 2 патенти на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів дослідження, обговорення результатів, висновків і списку використаних джерел, який включає 256 посилань. Робота викладена на 149 сторінках машинописного тексту, містить 11 таблиць, проілюстрована 38 рисунками.

**РОЗДІЛ 1**

**ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**

1.1. Характеристика стовбурових клітин

Стовбурові клітини (СК) мають дві важливі риси, які відрізняють їх від інших типів клітин. По-перше, вони є неспеціалізованими клітинами і здатні до самовідновлення. По-друге, при певних фізіологічних чи експериментальних умовах, вони можуть перетворюватися в спеціалізовані клітини, такі як нейрони, скоротливі клітини серцевого м’язу, еритроцити, чи клітини підшлункової залози, які продукують інсулін [169, 192, 254]. Дослідники переважно працюють з двома типами СК тварини чи людини: ембріональними стовбуровими клітинами (ЕСК), що походять безпосередньо від бластоцисти, та дорослими стовбуровими клітинами (ДСК), що знаходяться у зрілих тканинах. У ембріонах, що розвиваються, СК можуть дифференціюватися в усі спеціалізовані ембріональні тканини. Стовбурові клітини дорослого організму діють як репараційна система для тіла, підтримуючи потрібну кількість спеціалізованих клітин.

Потенціал СК – це можливість їхнього перетворення на диференційовані типи клітин. Тотипотентні СК отримують унаслідок злиття сперматозоїду з яйцеклітиною. Клітини, що утворюються внаслідок декількох перших поділів заплідненої яйцеклітини теж тотипотентні. Вони можуть перетворитися на ембріональні та екстраембріональні (поза-ембріональні) типи клітин. Плюрипотентні СК походять від тотипотентних клітин і можуть утворити клітини трьох зародкових шарів. Мультипотентні СК можуть утворювати лише близькі типи клітин (наприклад, гематопоетичні СК утворюють червоні кров'яні тільця, білі кров'яні тільця, тромбоцити, тощо). Уніпотентні СК можуть перетворитися лише на один тип клітин, але мають здатність до самовідтворення, що відрізняє їх від спеціалізованих клітин [30]. Проаналізувавши велику кількість даних, ми склали таку схему (рис. 1.1.1).

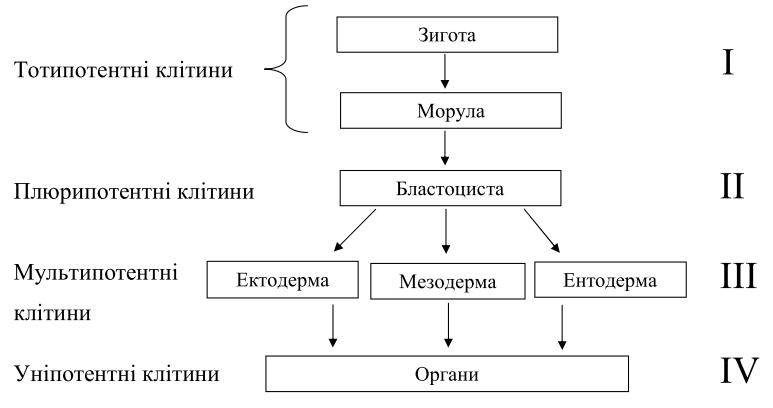


Рис. 1.1.1. Чотири рівня можливості диференціації стовбурових клітин: І – тотипотентність, ІІ – плюрипотентність, ІІІ – мультипотентність, ІV – уніпотентність

Як вже вказувалося вище, що ДСК знаходяться в багатьох тканинах і можуть диференціюватися у спеціалізовані клітини тієї тканини, в якій вони знаходяться. ДСК мають також можливість формувати спеціалізовані клітини інших тканин – цей процес називається трансдиференціація або пластичність. Стромальні клітини кісткового мозку можуть диференціюватися в три основні типи клітин головного мозку (нейрони, олігодендроцити та астроцити) [122]. CК виділені із пульпи зуба теж здатні до нейрогенної диференціації [169]. Червоний кістковий мозок може бути одним із джерел СК [87, 144, 251]. Ми склали схему, проаналізувавши велику кількість даних (рис. 1.1.2).

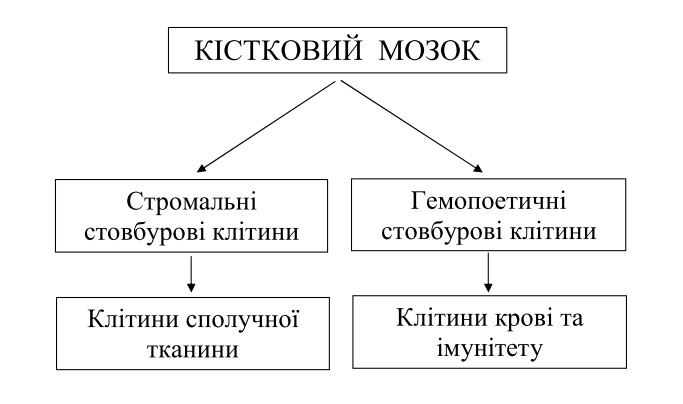


Рис.1.1.2. Послідовність розвитку дефінітивних клітин кісткового мозку

Мезенхімальні (мезенхімні, або стромальні) стовбурові клітини (МСК) – мультипотентні СК, що знаходяться переважно в кістковому мозку, а також в інших мезенхімальних тканинах. У кістковому мозку ці клітини представлені нечисленною популяцією фібробластоподібних клітин строми кісткового мозку і сприяють збереженню недиференційованого стану гемопоетичних стовбурових клітин. МСК здатні до диференціювання в різні клітини сполучної тканини. Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) – мультипотентні СК, що дають початок усім клітинам крові (еритроцитам, В-лімфоцитам, Т-лімфоцитам, нейтрофілам, базофілам, еозинофілам, моноцитам, макрофагам і тромбоцитам).

СК в організмі мало, з віком їх стає все менше і менше: у ембріона 1 клітина на 10 тисяч, у дорослої людини 1 клітина на декілька мільйонів (рис. 1.1.3).

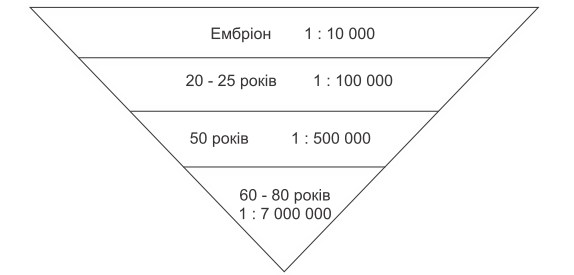


Рис. 1.1.3. Співвідношення стовбурових клітин і клітин тіла на різних етапах онтогенезу [69]

Оскільки СК можна культивувати та програмувати на спеціалізацію (наприклад, отримати м'язову чи нервову тканину) завдяки методу клітинних культур, їх стали використовувати для лікування захворювань (це так звана клітинна терапія). Лікувальні технології з використанням СК посідають вагоме місце в терапії широкого ряду онкологічних, гематологічних, неврологічних та кардіологічних захворювань, переходячи з лабораторії у клінічну практику [225, 228]. В останнє десятиліття особливу увагу приділяють МСК. Міжнародне товариство з клітинної терапії домовилося називати ці клітини мультипотентними мезенхімальними стромальних клітинами (ММСК) [74].

У клітинній терапії усе ширше використовуються ММСК, особливо при лікуванні масивних і глибоких опіків [52]. Фібробластоподібні клітини синтезують і секретують білки та глікозаміноглікани, які формують компоненти міжклітинної речовини сполучної тканини, що сприяє загоєнню ран. Ці клітини у культурі зберігають проліферативний потенціал і мультипотентність. Закінчуючи цикл розвитку, фібробласти перетворюються на фіброцити. Цитоплазма фіброцитів збіднюється на органели, клітини набувають плоскої форми, проліферативний потенціал істотно знижується. Проте фіброцити зберігають здатність брати участь у регуляції обмінних процесів у тканині [10, 22-23].

ММСК вперше виявив у стромі кісткового мозку мурчаків, успішно культивував і описав Фріденштейн О.Я. у 70-х рр ХХ ст [71-72, 128-129]. ММСК– це клітини мезодермального походження, які формують сполучну тканину у всьому організмі і дають початок дефінітивним формам – фібробластам, остеобластам, хондроцитам, адипоцитам і ендотеліоцитам [52, 113, 200-201]. Встановлено, що ММСК можуть бути отримані з багатьох тканин дорослого організму: строми кісткового мозку, жирової тканини, пульпи зуба, пуповинної крові та ін. [241]. ММСК, виділені зі строми кісткового мозку ссавців і людини, в певних умовах *in vitro* і *in vivo* здатні диференціюватися в різні типи клітин: кардіоміоцити, астроцити, нейрони та ін. [166, 185, 240, 242, 248]. Поверхневими маркерами ММСК кісткового мозку людини є антигени СD44, СD29, СD63, СD105, СD73, СD166, СD10, СD13, СD73, STRO-1, SSEA-1 [51]. Показано, що ММСК синтезують і секретують ростові і трофічні фактори, такі як епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту гепатоцитів (HGF), FGF, трансформуючий фактор росту β (TGFβ) [88], BDNF, GDNF, NGF [93, 98, 101] і білки екстрацелюлярного матриксу (колаген, фібронектин, ламінін) (Chen et al., 2007). Крім того, вони є імуномодуляторами [79], виробляють антизапальні цитокіни та антиапоптотичні молекули [230]. Сприятливий вплив ММСК на відновлення периферичних нервів було показано в експериментах на різних видах тварин: гризунах [102, 114, 159-160, 180-181], кроликах [106, 232, 237], собаках [116-117] та приматах [150, 233].

У 90-х роках ХХ століття була сформована концепція о «фіброцитах периферичної крові» − малодиференційованих клітин, отриманих із крові і здатних до розвитку у фібробластичному напрямку. Незважаючи на широке розповсюдження даного терміну, з позиції класичної гістології він є некоректним. Оскільки під фіброцитами розуміють термінальні малоактивні ланки фібробластичної лінії, не здатних до проліферації і диференціювання. У цьому випадку більш раціональним терміном є «фібробластоподібні клітини периферичної крові». Чисельність їх фракції складає біля 0,5-1,0% від загальної кількості ядровмісних клітин крові [104, 77].

Слід зазначити, що міжклітинні взаємодії відіграють важливу роль у фізіологічних функціях культури клітин. Було показано, що при сумісному культивуванні між мультипотентними МСК людини і диференційованими соматичними клітинами (ембріональними кардіоміоцитами, епітеліоцитами нирки) щура утворюються міжклітинні контакти, зокрема щілинні контакти та тунельні нанотрубочки (ТНТ). По цим контактам здійснюється міжклітинне перенесення цитоплазматичних і мембранних компонентів та органел, зокрема мітохондрій. У МСК в умовах сокультивування з соматичними клітинами запускається диференціювання по кардіо- або нефроспецифічному шляху. Цей процес значною мірою залежить від наявності специфічних контактів між клітинами. Мультипотентні МСК в умовах монокультури також утворювали ТНТ. Причому, якщо порівнювати кількість ТНТ-утворюючих клітин у монокультурах МСК і кардіоміоцитів, вона буде приблизно однаковою; тоді як у монокультурі нирки таких клітин мало. Отримані дані підтвердили утворення міжклітинних контактів по типу ТНТ (0,1 мкм в діаметрі) поряд з іншими типами цитоплазматичних тяжів (~ 3 мкм), що з'єднують клітини при сумісному культивуванні [202].

Морфогенетичні взаємодії клітин в організмі значною мірою відтворюються на культурах клітин різних типів, зокрема, епітеліоцитах і фібробластах. Культивовані клітини взаємодіють між собою за допомогою рецепторів і лігандів, які активують внутрішньоклітинні сигнальні системи. Роль лігандів грають три групи компонентів мікросередовища − рідке середовище, позаклітинний матрикс і міжклітинні контакти. До лігандів рідкого середовища відносяться гормони, фактори росту, фактори апоптозу та інші молекули. Прикріплюючись до матриксу, клітина розпластується, її форма зі сферичної перетворюється на пласку. Зустріч двох фібробластів або двох епітеліоцитів призводить до місцевого інгібування псевдоподіальної активності − так званому «контактному паралічу». Клітини того самого типу в тканині взаємодіють одина з одною і погоджують швидкість розмноження, щоб підтримувати належну щільність популяції. «Суспільний» контроль такого роду чітко проявляється при реакціях на пошкодження. Наприклад, коли ушкоджено епітелій, клітини по краях рани стимулюються до поділу й переміщуються на оголену поверхню доти, поки вона знову не буде закрита. На цьому етапі відбувається контактне гальмування проліферації й рух клітин припиняється. Подібне явище можна спостерігати на дисоційованих клітинах у культурі. Епітеліальні клітини або фібробласти, засіяні у чашку Петрі, будуть адгезуватися до поверхні, розпластуватися й ділитися доти, поки не утвориться суцільний моношар, у якому сусідні клітини налагоджують тісні взаємозв’язки [59]. Cлід зауважити, що вирощені *in vitro* клітини у моношарі поводяться і спілкуються одина з одною не зовсім так, як *in vivo*, тобто в умовах багатоклітинного організму. Однак, вивчати поведінку клітин у монокультурі набагато легше і зручніше, ніж у фізіологічних умовах живого організму. Проте, екстраполяція отриманих результатів до умов цілісного організму − це питання окреме, і в багатьох випадках потребує додаткових досліджень.

1.2. Молекулярні механізми, що індукуються у клітинах при зниженому парціальному тиску кисню

Безперервне забезпечення організму киснем є абсолютною умовою існування людини і вищих тварин. Молекулярний кисень необхідний для виробництва енергії, нормального росту і функціонування клітин. У той же час, надлишок кисню у формі вільних радикалів є згубним. Тому організм підтримує концентрацію кисню у вузьких фізіологічних межах. У сучасних дослідженнях культивування клітин зазвичай здійснюють в умовах стандартної атмосфери (СА) при вмісті кисню 21% О2 з додаванням 5% СО2. Проте в організмі концентрація кисню значно менша: в артеріальній крові концентрація О2 становить біля 12,5%, у венозній крові складає приблизно 5%, а в щільних тканинах − ще менше [49].

Гіпоксія − це патологічний стан, при якому в тканини потрапляє недостатня кількість кисню, або клітини тканин не здатні його утилізувати. Гіпоксія виникає при багатьох захворюваннях серцево-судинної і дихальної систем, хворобах системи крові, зниженні вмісту кисню у вдихуваному повітрі і т.д. У свою чергу, патологічна гіпоксія вкрай негативно відбивається на стані клітин і тканин організму: порушується утворення енергії і біологічно активних речовин у клітинах, порушується діяльність центральної нервової, вегетативної та ендокринної систем, шлунково-кишкового тракту і т.д. [44].

Провідним транскрипційним регулятором генів ссавців, відповідальних за реакцію на нестачу кисню вважається фактор індукований гіпоксією (HIF). Цей транскрипційний фактор уперше був ідентифікований Грегом Семензой із співробітниками з університету Джона Хопкінса в Балтіморі у 1992 році як регулятор експресії еритропоетину (EPO) при злоякісному рості [213].

Комплекс HIF є гетеродимером, що складається з однієї α-субодиниці (HIF-α) і однієї β-субодиниці (HIF-β). HIF-α існує у вигляді багатьох ізоформ (HIF-1α, HIF-2α і HIF-3α) з різними біологічними властивостями. Субодиниця HIF-1β експресується конститутивно, а експресія HIF-1α при нормоксіі є дуже низькою [1, 199].

При нормальній концентрації кисню відбувається гідроксилювання амінокислотних залишків проліну вільно існуючої молекули HIF-1α в результаті активності особливого регуляторного ферменту пролілгідроксилази, який є молекулярним сенсором кисню [7]. Проаналізувавши велику кількість даних, ми склали таку схему (рис. 1.2.1).

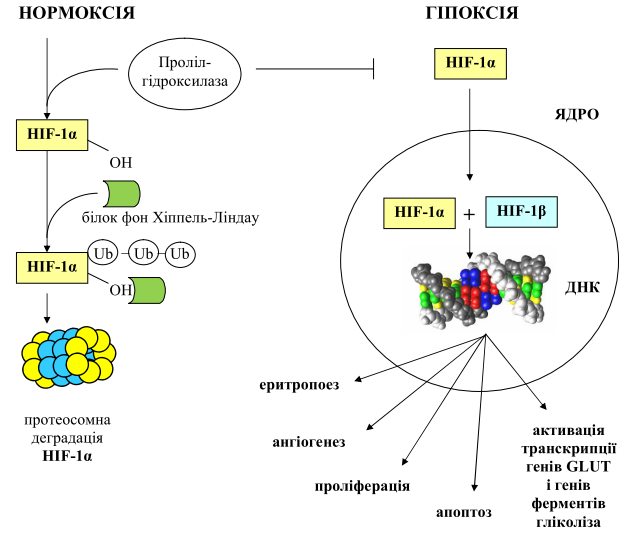


Рис. 1.2.1. Основні напрямки регуляторного впливу HIF-1 за умов зниженого парціального тиску кисню

Змінена таким чином субодиниця HIF-1α набуває здатність зв'язуватися з білком фон Хіппель-Ліндау (білок VHL − пухлинний супресор; з мутаціями гена, що кодує цей білок, пов'язаний спадковий синдром von Hippel Lindau, для якого характерні множинні гемангіоми, а також ниркова карцинома, рак підшлункової залози, ангіома сітківки ока). Білок VHL, у свою чергу, утворює комплекс із низкою інших білків, що відносяться до класу E3-убіквітин-лігази. Активовані убіквітин-лігази утворюють ковалентний зв'язок із деякими іншими білками, будучи для останніх своєрідною «чорною міткою», яка означає, що отримав таку мітку «убіквітинізований» білок незабаром має бути направлений в протеосому і там зруйнований. Таким чином, зв'язування білка VHL з гідроксильованим проліном HIF-1α призводить до убіквітинізаціі цього білка і подальшої його протеосомной деградації [58, 81, 94, 211-212]. HIF-2α так само, як і HIF-1α, піддається VHL-залежної деструкції протеазами. Обидва ці білка необхідні для нормальної біологічної відповіді ссавців на гіпоксію, оскільки показано, що гомозиготна інактивація хоча б одного з них у мишачого ембріона веде до летальності. В даний час вважається, що HIF-2α більш специфічний для ендотелію, але його експресія також визначена і в інших видах клітин. HIF-3α експресується при гіпоксії в більш специфічних тканинах, таких, наприклад, як рогівка ока [147, 213-214].

При гіпоксії активність пролілгідроксилази зменшується, тому що кисень є лімітуючим чинником її активності. Білкова молекула HIF-1α не гідроксилюється і залишається стабільною, уникнувши убіквітин-залежного протеолізу [187]. Субодиниці HIF-1α і HIF-1β об'єднуються, і утворений у результаті цього гетеродимерний білок HIF-1 направляється з цитоплазми в ядро, де зв'язується з особливими послідовностями ДНК в промоторних областях генів, експресія яких індукується гіпоксією [1, 221].

У даний час ідентифіковано більше 100 HIF-активуючих генів [107], продукти яких беруть участь у еритропоезі і обміні заліза [110, 186] − еритропоетин, трансферин, трансфериновий рецептор, церулоплазмін; в ангіогенезі [141-142, 249] − трансформуючий фактор росту β3 (TGF-β3), судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), EG-VEGF, ММР-2, катепсини D; в регуляції судинного тонусу − нітрооксидсинтаза-2 (iNOS), ендотелін-1, адреномедуллін, α1в-адренорецептор; в регуляції метаболізму глюкози [43, 149, 183, 234] − транспортери 1 і 3 глюкози (GLUT1, GLUT3), гексокінази I і II, фосфоглюкоізомерази, глицеральдегідфосфатдегідрогенази, фосфогліцераткінази, енолази, піруваткінази, лактатдегідрогенази, активуючи анаеробне дихання; в регуляції клітинної проліферації та виживання [199, 211-214] − IGF2, TGF-α, адреномедуллін; в регуляції апоптозу [44, 149] − протеїни BNip3, Nix. Виявлено, що в умовах гіпоксії транскрипційні фактор HIF-1 бере участь не тільки в активації експресії генів, відповідальних за гліколіз, але і в гальмуванні мітохондріального біогенезу [43, 40].

Несподіване відкриття зробили вчені з Університету ім. Джона Хопкінса (Балтімор, США). У статті, опублікованій в журналі Cell Metabolism, вчені представили нові дані про функції транскрипційного фактора HIF-1 [153]. Раніше вважалося, що цей фактор бере участь тільки в запуску гліколізу в тому випадку, якщо клітина знаходиться в умовах гіпоксії. Як стало зрозуміло із серії експериментів на мишах, HIF-1 одночасно з активацією гліколізу, пригнічує цикл трикарбонових кислот у мітохондріях, за допомогою транс-активації гена PDK1 (ген кінази-1 піруватдегідрогенази), тим самим зменшуючи утворення ацетил-СоА з пірувату. Накопичення метаболітів циклу Кребса (пірувату, оксалоацетата, сукцинату і фумарату) призводить до гальмування активності пролілгідроксилази і тим самим сприяє подальшій активації HIF-1 [153]. Крім того, HIF-1 стимулює експресію гена, що кодує синтез лактатдегідрогенази. Це призводить до зниження утилізації пірувату мітохондріями і до зниження дихання [214]. HIF-1 може змінювати активність цитохром с-оксидази, збільшуючи при гіпоксії експресію тої її субодиниці, яка оптимізує активність ферменту при нестачі кисню, і сприяє деградації іншої субодиниці, яка функціонує в аеробних умовах [127].

Пригнічення мітохондріального біогенезу має важливе значення в умовах гіпоксії − за рахунок цього клітина уникає накопичення шкідливих радикалів і, відповідно, апоптозу. Гліколіз, у свою чергу, здатний підтримати рівень АТФ, необхідний для життєдіяльності [20, 41].

Дані, отримані останнім часом, свідчать про те, що HIF-1α може індукуватися не тільки при безпосередньому впливі гіпоксії, а й іншими факторами (гормонами, білками теплового шоку, факторами росту, онкогенами). Передбачається, що активаторами HIF-1 можуть бути СоСl2 і речовини, що утворюють хелатні сполуки з іонами заліза [1, 94].

Індукторами активації різних факторів транскрипції виступають активні форми кисню (АФК), в той час, як антиоксиданти блокують активацію NF-kB, AP-1, HIF-1 та інших факторів транскрипції. Тому при активації АФК-опосередкованого окиснення відбувається індукція факторів транскрипції, що в свою чергу призводить до синтезу протекторних білків, серед яких найбільш важливими є репаративні білки, що сприяють відновленню структури та функції білків і нуклеїнових кислот, серед яких ферменти антиоксидантного захисту займають істотне місце. У той же час у міру підвищення в результаті цих процесів вмісту антиоксидантів, відбувається інгібування факторів транскрипції і, отже, синтез захисних білків припиняється [75, 58, 212].

HIF-1 індукує експресію багатьох ангіогенних факторів і насамперед основного регулятора ангіогенезу − фактора росту ендотелію судин (VEGF) і його рецепторів. VEGF вибірково стимулює проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, їх попередників і моноцитів, що експресують рецептори до нього. Збільшує проникність судин, сприяючи проходженню білків плазми в близькосудинний простір, який необхідний для міграції ендотеліальних клітин. VEGF індукує експресію ендотеліальної NO-синтази та утворенню NO. Оксид азоту сприяє вазодилатації і стимулює експресію протеаз, які руйнують зв'язки між ендотеліальними клітинами і позаклітинним матриксом, що необхідно для спрямованої міграції клітин [110, 137, 141].

Найбільш відомим геном, експресія якого регулюється гіпоксією, є ген еритропоетину. Фішер із співавторами показали підвищення рівня еритропоетину з 5,7 до 5786,6 мОД/мл у сироватці мавп, які перебували 18 годин у барокамері при 0,42 атм [121]. У ряді дослідів було показано, що гем білка служить кисневим сенсором при регулюванні продукції еритропоетину у відповідь на дію гіпоксії [161]. Оскільки продукція еритропоетину не стимулюється ціанідами або іншими інгібіторами дихального ланцюга, цей гемовий білок повинен бути чутливим тільки до гіпоксії [130]. Клітини, що опиняються в умовах нестачі кисню, з одного боку, через активацію шляхів ангіогенезу і гліколізу можуть адаптуватися і вижити, а з іншого − гинуть через механізм апоптозу [7].

У період еволюції аеробні організми виробили клітинну систему для відповіді на зміни концентрації кисню у позаклітинному середовищі, оскільки О2 є кінцевим акцептором електронів у мітохондріальному дихальному ланцюзі для продукції енергії в процесі окисного фосфорилювання. Дослідження функціонально-метаболічних внутрішньоклітинних реакцій адаптації до гіпоксії є фундаментальним аспектом фізіології.

1.3. Вплив зниженого парціального тиску кисню на проліферацію і диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини в культурі здатні до активної проліферації і диференціювання у різні типи клітин мезодермального ряду у відповідь на дію відповідних стимулів. Склад газового середовища виконує важливу роль у реалізації функціональних можливостей клітин. Жамбалова із співробітниками [21] досліджували диференціювальний потенціал ММСК кісткового мозку людини і експресію транскрипційного фактора, індукованого при гіпоксії (Hypoxia Inducible Factor − HIF-1α), при культивуванні в умовах зниженого вмісту кисню (1 і 5% О2). При індукції клітин у нормоксичних (21% О2) умовах і при зниженому вмісті кисню виявлена різна ступінь здатності МСК до диференціювання в остеогенному, адипогенному і ендотеліальному напрямках. У середовищі з 5% О2 спостерігали незначне зниження здатності МСК до мінералізації позаклітинного матриксу і накопиченню ліпідних крапель у порівнянні з контролем (21% О2). В умовах 1% О2 МСК практично повністю втратили здатність до мінералізації матриксу і не могли диференціюватися в адипоцитарному напрямку. Не виключено, що ці процеси можуть регулюватися за рахунок активації індукованого гіпоксією транскрипційного фактору HIF-1α, який модулює роботу багатьох генів, активуючих синтез ростових факторів, гліколітичних ферментів, проапоптотичних білків. Методом проточної цитометрії виявлено, що рівень HIF-1α в цитоплазмі моношарових культур МСК, інкубованих при 1 і 5% вмісті кисню протягом 24 год і 7 діб, знижується в порівнянні з нормоксичним контролем (21% О2) [21].

Досліджено вплив зниженого вмісту кисню в середовищі культивування на проліферативну активність, життєздатність і імунофенотип мезенхімних стромальних клітин із ліпоаспірата людини (лМСК) [13]. Показано, що проліферативна активність клітин в умовах гіпоксії (5% О2) була в середньому в 2,9 рази вищою в порівнянні з культивуванням у стандартних умовах (20% О2). Зменшення вмісту кисню в середовищі культивування не змінювало життєздатність і імунофенотип лМСК. Таким чином, постійне культивування лМСК в середовищі зі зниженим вмістом кисню може виявитися корисним підходом для отримання більшої кількості клітин з незміненими властивостями за менший час, що може бути затребуване в області регенеративної і відновлювальної терапії [13].

У відділі генних технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України проводяться дослідження з розробки технології культивування МСК пуповинного канатика при знижених концентраціях кисню. Співробітниками відділу генних технологій було сконструйовано обладнання, що дозволяє створювати газові суміші з різним відсотком кисню для культивування МСК. Були проведені дослідження з культивування клітин в атмосфері з 2% кисню протягом 3 пасажів. Показано, що такі умови підвищують інтенсивність проліферації МСК. Клітини в умовах 2% О2 у порівнянні з такими, що культивувались за атмосферної концентрації кисню, мали відмінності у морфології: були дрібнішого розміру та частіше зберігали веретеноподібну форму. Характер формування моношару для культур з різним відсотковим вмістом кисню відрізнявся: при 2% О2 клітини розміщувались менш щільно, не прилягаючи одна до одної [75].

Досліджено вплив зниженого парціального тиску кисню (10% О2) на активність стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини. Матеріалом для дослідження був кістковий мозок 13 голівок стегнових кісток, видалених під час операції ендопротезування кульшового суглоба у пацієнтів віком від 37 до 55 років. Показано, що за умов 10% О2 колонієутворююча активність стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини збільшилася від 1,4 до 9,3 раза через 14 діб культивування. Аналіз досліджень дозволяє вважати, що знижений парціальний тиск кисню посилює проліферативну активність клітин і збільшує їх потенціал структуроутворення [5].

Панюхін Н.В. із колегами [49] вивчали вплив парціального тиску кисню в атмосфері, яке оточує культуральне середовище, на життєздатність, проліферацію і диференціювання МСК із кісткового мозку миші. Показано, що у присутності 3% кисню підвищується виживання клітин при рідкій посадці, зростає швидкість їх росту і тривалість проліферації. Вплив концентрації кисню на проліферацію проявлявся вже через декілька днів культивування. Дослідження колонієутворення МСК при різних рівнях кисню показало, що навіть преінкубація в умовах 21% кисню негативно впливає на подальший ріст клітин при 3% кисню. Культивування МСК мінімум за 9 днів до досліду при 3% кисню сприяє проліферації у присутності 21% кисню. При цьому не варто однозначно говорити про негативний вплив атмосферного кисню. Виявилось, що знижений парціальний тиск кисню гальмує остеогенне диференціювання МСК, але не спостерігалось вірогідного впливу вмісту кисню на адипогенне диференціювання. Таким чином, концентрація кисню у середовищі інкубування здатна впливати не тільки на їх проліферацію, але і на ефективність диференціювання клітин [49].

Дослідження, проведені на культурі клітин – остеоцитів, показали, що темпи клітинного росту в умовах помірно зниженого Ро2 істотно підвищуються. Проліферація остеоцитів склепіння черепа ембріонів щурів, інкубованих у середовищі, що містить 10% О2, була більш високою, ніж при 90% кисню [118]. Хрящоутворення, простежене на періостальному експлантаті проксимальної ділянки великої гомілкової кістки 2-місячних кролів у середовищах інкубації з різним вмістом кисню (від 1 до 90%), було максимальним при 12-15% О2 [196]. В експериментах по клонуванню стромальних клітин кісткового мозку людини у трьох умовах газового середовища (5, 10 і 21% кисню) показано, що максимальна регенерація клітин відбувається при 10% О2 [229]. Проліферація та диференціація клітин остеобластної лінії людини прискорювалась навіть в умовах гіпоксичного середовища з 5% кисню [5]. За результатами дослідів, проведених із 7- і 13-добовими культурами клітин остеокластів, помірна гіпоксія сприяла прогресивному збільшенню формувння остеокластів і зон резорбції. Максимальні ефекти спостерігали у разі 2% вмісту кисню у штучній газовій суміші. Формування остеокластів суттєво активувалося навіть у різко гіпоксичних (14-15 мм рт. ст.) умовах. У 3-добових культурах клітин гіпоксія такого рівня не змінювала резорбтивної діяльності остеокластів, але зменшувала час їх виживання. Автори дослідження припускають, що аналогічні процеси відбуваються й у цілістній кістці [82]. Використання штучних газових сумішей зі зниженим Ро2 може бути одним із можливих шляхів компенсації негативного впливу гіпокінезії на кісткову тканину [8-9].

Дані літератури дають підстави припустити, що основний механізм стимулюючої дії зниженого Ро2 реалізується через активацію киснечутливих сигнальних сполук. Відомо, що більшість клітин ссавців відповідають на зниження Ро2 активацією експресії генів і синтезом білків *de novo*. Встановлені редокс-сенситивні фактори, найвідомішим з яких є білок-активатор-1 (АР-1) та фактор індукований гіпоксією (HIF-1)[54-55, 203, 207].

Проведені дослідження по вивченню колонієутворення і диференціювання культур мезенхімальних стромальних клітин, отриманих із матеріалу окістя, з губчастої кістки і з периодонтальної зв'язки людини в залежності від парціального тиску кисню. Показано, що в усіх випадках колонієутворення в умовах зниженого Ро2 23 мм рт. ст. йде більш ефективно, ніж в умовах атмосферного кисню (159 мм рт. ст.). З трьох варіантів мезенхімальних стромальних клітин, колонії найбільшого розміру давали клітини окістя. Остеогенне диференціювання клітин, навпаки, йшло більш інтенсивно в умовах атмосферного кисню. Інтенсивність остеогенної диференціації спостерігали в монокультурі на пластику і в тривимірній культурі на колагенових краплях. Показано, що ефект зниження парціального тиску кисню на колонієутворення частково обумовлений зміною редокс-потенціалу середовища культивування. В умовах зниженої кількості кисню редокс-потенціал середовища знижується приблизно на 20 мВ і його штучна корекція дозволяє збільшити ефективність колонієутворення в умовах атмосферного кисню [14].

Риловою та співавт. [55] показано, що постійне (протягом 4-х пасажів) культивування ММСК жирової тканини людини в умовах 5% О2 знижувало гетерогенність популяції і збільшувало в ній частку веретеноподібних клітин. Було відзначено, що в ММСК при 5% О2 рівень експресії генів *TUBB3*, *SVIL* і *ANK2*, продукти яких (β-тубулін, супервіллін, анкерин) беруть участь у примембранній перебудові та стабілізації цитоскелету був вищим. Рівень експресії генів *TPM2*, *ACTN1*, *CNN3*, *CDC42EP3*, *CDC42EP1*, *TAGLN*, *SGCG*, продукти яких (тропоміозин, актинін, кальпонін, ефекторні білки Rho-ГТФази, трансгелін і саркоглікан-γ) беруть участь у формуванні адгезивних контактів, взаємодії з позаклітинним матриксом і формуванні псевдоподій, був нижче, ніж в стандартних умовах культивування (21% О2). Автори припускають, що наближення концентрації кисню в середовищі до тканинного рівня забезпечує зниження ступеня окислювального стресу та збільшення гомогенності культур ММСК в умовах 5% О2 [55].

Відомо, що лужна фосфатаза (ЛФ) є ферментом, який присутній майже у всіх тканинах організму, особливо високий вміст в кістках, печінці, плаценті, кишечнику та нирках. Як збільшення, так зменшення ЛФ має вагоме клінічне значення. Збільшення активністі ЛФ головним чином зустрічається при захворюваннях кісток (хворобі Педжета, остеомаляціі, рахіті), або захворюваннях печінки (холециститі, гепатиті, саркоїдозі, гепатотоксичних випадкаї, механічній жовтяниці), метастазуванні в кістках та печінці [194, 195].

Клітини потребують постійного надходження молекулярного кисню для метаболічних процесів, що включають оксидативне фосфорилювання, в якому О2 є кінцевим акцептором вільних електронів у процесі утворення АТФ. У дослідженнях *in vitro* на мезенхімальних стромальних клітинах із жирової тканини людини Рилова і співавт. [54] показали, що зменшення концентрації кисню (5% О2) знижує споживання клітинами глюкози, збільшує молярне співвідношення лaктату/глюкози та зменшує трансмембранний потенціал мітохондрій. Це супроводжується підвищенням експресії генів, що кодують усі ферменти гліколітичного шляху катаболізму глюкози. Водночас активується клоногенний потенціал та проліферація МСК [54].

У клітинах постійно підтримується певний стаціонарний рівень амінокислот – фонд (пул) вільних АК. Цей фонд оновлюється за рахунок надходження АК і використовується для синтезу біологічно важливих хімічних компонентів клітини. Тобто можна виділити шляхи надходження та використання клітинного пулу АК.

Шляхи надходження вільних АК, що утворюють амінокислотний фонд у клітині при культивуванні *in vitro*: 1) Транспорт АК із поживного середовища, у нашому випадку це DMEM. Враховуючи, що культивування МСК відбувалось без зміни живильного середовища протягом 4 діб запаси поживних речовин поступово виснажувались і накопичувались метаболіти. 2) Синтез замінних АК – у клітині з проміжних продуктів окислення глюкози і циклу лимонної кислоти можуть синтезуватися АК. До них відносять: гліцин, серин, аланін, аспарагінову кислоту, аспарагін, глутамінову кислоту, глутамін, пролін. Серин синтезується з проміжного продукту гліколізу 3-фосфогліцерата, а аміногрупу отримує від глутамінової кислоти. Гліцин – також замінна амінокислота, основним джерелом якої служить серин. 3) Внутрішньоклітинний гідроліз білків (каталізують лізосомальні протеази) [224].

Шляхи використання амінокислотного фонду: 1) Синтез білків і пептидів – це основний шлях споживання АК (75-80% АК клітини йде на їх синтез). 2) Синтез небілкових азотовмісних сполук (пуринових і піримідинових нуклеотидів, холіну, креатину, деяких вітамінів тощо). 3) Синтез глюкози з використанням вуглецевих скелетів глікогенних АК (глюконеогенез). 4) Синтез ліпідів з використанням ацетильних залишків вуглецевих скелетів кетогенних АК. 5) Окислення до кінцевих продуктів обміну (СО2, Н2О, NH3) – це один із шляхів забезпечення клітини енергією (до 10% загальних енергетичних потреб). Усі амінокислоти, які не використовуються в синтезі білків та інших фізіологічно важливих сполук, піддаються розщепленню [210, 224].

Для МСК лінії 4*BL*, виділених із периферичної крові людини, дослідження впливу зниженого парціального тиску кисню на інтенсивність проліферації і диференціації до цього часу не проводились.

1.4. Механізми реалізації впливу сірководню на клітини

Регуляція фізіологічних функцій організму передбачає два основні шляхи реалізації сигнальних впливів − гуморальний і нейрогенний. В останні роки як вітчизняні, так і зарубіжні дослідники приділяють велику увагу третьому шляху − газовим трансмітерам. До них відносять оксид азоту (NO), монооксид вуглецю (СО) і сульфід водню (H2S) [2, 48, 235-236]. Серед досліджених газотрансмітерів H2S найменш вивчений [95]. Варто нагадати, що усі гази, у тому числі і газові трансмітери є низькомолекулярними речовинами, які мають досить важливі для біологічних процесів фізичні характеристики − високу швидкість дифузії, різну розчинність у воді при різних температурах і парціальному тиску (табл. 1.4.1).

Таблиця 1.4.1

Розчинність біологічно активних газів у воді (у порядку зниження їх розчинності)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Речовина | Розчинність,  мл розчиненої речовини на 100 г Н2О | | |
| 0ºС | 20ºС | 40ºС |
| **H2S** | 467 | 258 | 166 |
| N2O | 130 | 105 | 88 |
| СО2 | 171 | 88 | 53 |
| **NO** | 7,4 | 4,7 | 3,5 |
| O2 | 4,9 | 3,1 | 2,3 |
| **CO** | 3,5 | 2,3 | 1,8 |
| N2 | 2,4 | 1,5 | 1,2 |

Примітка: стандартно атмосферний тиск дорівнює 760 мм рт. ст., жирним шрифтом виділено газотрансмітери.

У порівнянні з іншими газовими трансмітерами H2S має більш високу розчинність у воді і має високу ліпофільність, тому легко проникає через плазматичну мембрану клітини. Переміщається в цитоплазмі за рахунок дифузії і циклозіса, взаємодіє безпосередньо з внутрішньоклітинними ферментами [46]. Сірководень зв'язується з залізом в гемі цитохром *с*-оксидази, яка при цьому втрачає активність. В результаті − зупиняється окисне фосфорилювання в мітохондріях і порушується клітинне дихання.

Сірководень продукується ендогенно в різних тканинах тварин і людини за допомогою трьох ферментів: цистатіонін-β-синтази та цистатіонін-γ-ліази, що відповідають за метаболізм L-цистеїну, а також 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази [216]. У різних органах і тканинах фізіологічні концентрації сірководню варіюють і становлять від 1 до 100 нмоль/г тканини. У плазмі крові щурів фізіологічна концентрація сірководню становить 46 мкМ, а в тканинах мозку 50-100 мкМ [206]. Цистатіонін-β-синтаза в основному діє в центральній нервовій системі, а цистатіонін-γ-ліаза − у клітинах гладкої мускулатури судинної стінки і в кардіоміоцитах. У печінці і в нирках працюють обидва фермента [53]. Один з основних механізмів дії газотрансмітерів − модифікація білків. NO модифікує сульфгідрильні групи, СО − залишки гістидину, а H2S відновлює дисульфідні зв'язки [57, 62, 190].

Як й інші газоподібні сигнальні молекули (NO і CO), сірководень в межах фізіологічних концентрацій релаксує гладенькі м'язи кровоносних судин, шлунково-кишкового тракту, репродуктивної і дихальної систем [127, 252-253]. Судинорозширювальну властивість сірководню виявив канадський дослідник Ван Жуй [53]. Він працював з лабораторними щурами, яким вводив у вену розчин гідросульфіду натрію (NaHS) в межах фізіологічних концентрацій. Крім того, він проводив дослідження і на ізольованих артеріях щурів. У результаті введення NaHS судини розширювалися, а артеріальний тиск різко знижувався. Частота серцевих скорочень при цьому не змінювалася. Ван Жуй, блокуючи частину генома вивів лінію генетично-модифікованих мишей, позбавлених гена цистатіонін-γ-ліази. Усі мутантні миші, як гомозиготні, так і гетерозиготні, були цілком життєздатні, плідні і зовні не відрізнялись від тварин вихідного типу. Однак вміст сірководню в крові, серцевому м'язі і стінці аорти у гомозигот становив всього 20% від нормального рівня, а у гетерозигот − 50%. Рівень H2S у сироватці крові також був нижче норми. Разом із тим відсутність гена цистатіонін-γ-ліази не вплинула на рівень сірководню в тканинах мозку, де його синтез забезпечує цистатіонін-β-синтаза. З віком у мутантних мишей розвивалася гіпертонія. У дванадцятитижневих гомозиготних тварин тиск перевищував норму на 18 мм. рт. ст., тобто приблизно на 15%. Ін'єкція NaHS на деякий час знижувала кров'яний тиск, причому у мутантів сильніше, ніж у тварин вихідного типу. Мабуть у мутантних мишей знижується поріг чутливості до впливу сірководню [53, 246].

Відомо, що функції газотрансмітерів односпрямовані, але мішені і механізми їх дії відрізняються. NO і СО активно проникають у гладеньку мускулатуру кровоносних судин і активують фермент гуанілілциклазу. Це веде до утворення циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), який запускає ланцюг реакцій, що приводить до розширення судин [28]. Сірководень гіперполяризує мембрану, що забезпечується активністю КАТФ-каналів [56, 68, 85]. При введенні блокаторів АТФ-чутливих калієвих каналів вазодилятація пригнічувалась [103, 253]. Селективний інгібітор КАТФ-каналів − глібенкламід − зменшує холінергічну гіперполяризацію гладеньких м'язових клітин (ГМК) брижових артерій приблизно на 70%, але не впливає на вазодилятаторну дію донорів оксиду азоту [190]. У серцево-судинній системі сірководень пригнічує проліферацію ГМК, модулюючи МАР-кіназний сигнальний шлях [175]. Cірководень може викликати і скорочення сегментів аорти щура через зміну внутрішньоклітинної концентрації циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) або активацію Cl/НСО3 обмінника й ацидифікацію цитоплазми ГМК [167].

Вазоактивні ефекти H2S мають істотне значення для підтримки рівня артеріального тиску. Гідросульфід натрію можна розглядати, як дійсне джерело газотрансмітера, а низький рівень ендогенного H2S у крові, як патогенетичний фактор розвитку гіпертонічної хвороби, ішемічно-реперфузійних ураженнях життєво важливих органів [6, 235].

H2S впливає на судинний тонус усіх класів хребетних тварин (риб, амфібій, рептилій) і включає як вазоконстрикцію, так і вазодилятацію, що вказує на філогенетичну давнину H2S як газомедіатора і універсальність його дії [62, 162-164, 205].

Встановлено, що гліальні клітини головного мозку також мають здатність синтезувати сірководень. Він бере участь у регуляції кислотно-лужного гомеостазису нервової тканини. На відміну від нейронів, що передають сигнали шляхом генерації потенціалів дії, гліальні клітини «спілкуються» одна з іншою і нейронами шляхом регуляції кальцієвих потоків в мозку. Показано, що H2S суттєво впливає на концентрацію іонів кальцію, генеруючи так звані «кальцієві» хвилі в астроцитах і нейронах [16, 133].

Показано також, що сірководень сприяв проліферації і диференціації нейрональних стовбурових клітин гіпокампа миші C57BL/6 після гіпоксії. Тварини (вік − 1 день) зазнавали впливу гіпоксичної газової суміші (5% кисню в азоті) протягом 2-ох годин. Внутрішньоочеревинно вводили NaHS (56 мкмоль/кг/день) протягом 30 днів. Результати дослідження показали збільшення кількості проліферативних клітин у зубчастій звивині гіпокампу мишей після 2-годинного дихання газовою сумішшю з парціальним тиском кисню 38 мм рт. ст. [178].

До захисних ефектів, які спостерігаються при дії сірководню на мітохондрії, можуть бути частково залучені мітохондріальні АТФ-залежні К+-канали [65-66]. Встановлено концентраційну залежність впливу NаHS на набрякання мітохондрій, ізольованих із тканини серця щурів. Низькі концентрації (10-12-10-8 моль/л) збільшували набрякання органел, а фізіологічні (10-6-5•10-5 моль/л) – здійснювали протекторний ефект щодо кальційіндукованого набрякання мітохондрій серця щурів [65].

Важливо також зазначити, що мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку синтезують H2S з метою регулювання їх самооновлення і остеогенної диференціації. Дефіцит H2S призводив до дефектів кісткової тканини (остеопороз) миші [179]. Крім того було показано, що сірководень (0,1 нг/мл H2S, 9 днів) стимулював диференціацію МСК кісткового мозку людини і МСК пульпи зуба у гепатоцитарному напрямку. Накопичення глікогену і синтез сечовини автори вважали маркерними показниками перетворення МСК у гепатоцити [197]. Інші дослідження виявили зниження проліферації фібробластів серця людини на 33-58% через гальмування активності К+-каналів при концентрації NaHS 100-500 µM. Також, виявлено зменшення їх диференціювання у бік міофібробластів [215].

Сірководень спричиняє цілий ряд ефектів, включаючи вазодилятацію, кардіопротекцію, регуляцію проліферації та апоптозу, ангіогенез, тому роль H2S на процеси життєдіяльності клітин потрібно розглянути більш детально.

1.4.1. Роль сірководню в регуляції апоптозу клітин

Для підтримки тривалої працездатності будь-якого органу абсолютно необхідне його постійне ремоделювання – заміна клітин на нові. Апоптоз варто розглядати як елемент фізіологічної підтримки клітинного гомеостазису. Він усуває старі або функціонально неповноцінні клітини. Порушення реалізації запрограмованої загибелі клітин є одним із патогенетичних факторів розвитку захворювань. До них відносяться серцево-судинні та нейродегенеративні захворювання, гострі та хронічні запальні процеси, цукровий діабет, злоякісні новоутворення та ін Це обумовлює актуальність досліджень, присвячених встановленню молекулярних механізмів дизрегуляціі апоптозу. Встановлено, що H2S може спричиняти як індукуючий, так і інгібуючий вплив на механізми реалізації апоптозу клітин [64, 78, 83].

Дослідження впливу донора сульфіду водню (NaHS) на апоптотичну загибель клітин лінії Jurkat (T-лімфобластна лейкемія) і мононуклеарних лейкоцитів, отриманих від здорових донорів показали, що H2S посилював апоптотичну загибель клітин після 15 хв інкубації in vitro в концентраціях 10 і 100 ммоль (до 9,70% і 13,20% відповідно) у порівнянні з контролем (4,45%) [47, 63]. Виявилося, що H2S може запускати запрограмовану загибель клітин із залученням мітохондріального шляху індукції апоптозу, активацією каспази 3 і родини МАР-кіназ [78, 83, 208]. Показано, що вплив на клітини Т-лімфобластної лейкемії NaHS протягом 24 год не призводить до змін запрограмованої клітинної смерті. Проапоптотичний ефект сульфіду водню у високих мілімолярних концентраціях супроводжується генерацією активних форм кисню, зниженням вмісту глутатіону та залученням як рецепторного (Fas-опосередкованого), так і мітохондріального шляхів реалізації апоптозу [158]. Показано також, що дія більш низьких (мілі- і мікромолярних) концентрацій газу може призводити до цитопротекторного (антинекротичного і антиапоптотичного) або проапоптотичного ефекту в залежності від типу клітин та умов експерименту [172].

Ендогенний або екзогенний сірководень здатний регулювати проліферацію клітин. Giuliana Gobbi і співавтори показали, що екзогенний сірководень знижує клональний ріст, проліферацію і клітинну адгезію кератиноцитів людини in vitro. На молекулярному рівні H2S знижує Raf / MAPK (mitogen-activated protein kinase) / ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) сигнальних шляхів. Зниження адгезії в оброблених гідросульфідом натрію клітин (2 mM NaHS, 24-48 год) пов'язані з пригніченням експресії β4, α2 і α6 інтегринів, які необхідні для сприяння клітинної адгезії, а також антиапоптоза і проліферативної сигналізації нормальних кератиноцитів [136]. H2S може викликати пошкодження ДНК і тим самим змінювати клітинний цикл у різних клітинах ссавців. Дослідження показують, що H2S проявляє проапоптотичну дію. Наприклад, Yang G. і співавтори показали, що ендогенний H2S викликає апоптоз гладких м'язових клітин аорти людини через шлях MAP кінази [244-246]. Останнім часом повідомлялося, що NaHS (10 mM, 3 год) може індукувати апоптоз ацинарних клітин підшлункової залози миші через мітохондріальний шлях [92]. Було показано, що сірководень викликає ушкодження ДНК і змінює експресію генів апоптозу в легеневих фібробластах організму людини [83]. У цьому дослідженні, легеневі фібробласти людини культивували з донором сірководню NaHS (10-75 mM, 12-48 год). NaHS підвищував експресію генів ku 70 і ku 80, але не впливав на експресію генів інших репаративних білків, таких як ядерний антиген проліферуючих клітин (PCNA) або реплікаційний білок А (rNase protection assay). Вплив сірководню на адгезію клітин, життєздатність, проліферацію, активацію та секрецію цитокінів досліджено на різних типах клітин (лімфоцитах, макрофагах, фібробластах, кератиноцитах, гладком'язових клітинах, міобластах, ендотеліальних клітинах, ракових клітинах товстої кишки й епітеліальних клітинах кишечника і т.д .) [83, 245, 250].

Таким чином, газовий трансмітер − сульфід водню − здатний здійснювати модулюючий ефект на проліферацію і на запрограмовану загибель клітин. Кінцевий ефект впливу H2S на апоптоз визначається типом досліджуваних клітин, а також концентрацією і часом впливу газового трансмітера на клітини.

1.4.2. Роль сірководню у цитопротекції

Велика кількість досліджень свідчить про кардіопротекторну дію H2S при інфаркті міокарда і гіпоксії. При інфаркті порушується кровопостачання серця через ураження коронарних артерій, що супроводжується розвитком некрозу в міокарді. Після експериментально викликаного інфаркту міокарда у щурів H2S знижував розмір області некрозу і зменшував смертність тварин. Автори вважають, що судинорозширювальна дія H2S посилює коронарний кровоток при ішемічних станах і знижує клітинне пошкодження. Кардіопротекторний ефект H2S базується на активації АТФ-залежних калієвих каналів [62]. Крім того, є дані про стимуляцію сірководнем ангіогенезу − утворення нових кровоносних судин за рахунок посиленої міграції ендотеліальних клітин [123].

Показано, що позаклітинна сигнальна регуляторна кіназа і фосфатидилінозитол-3-кіназа беруть участь у H2S-SP-індукованої кардіопротекції при ішемії в кардіоміоцитах щурів. Введення NaHS значно знижувало частоту виникнення інфаркту міокарда, а також підвищувало скоротливу функцію ізольованого серця щура. Життєздатність клітин і відсоток паличковидних кардіоміоцитів залежать від концентрації NaHS і знаходяться в межах від 1 до 100 мкмоль/л [151].

У експериментах на перфузованих за методом Лангендорфа серцях щурів вивчали ефекти донора сірководню гідросульфіду натрію на зміни функціонального стану, резервні можливості серця та його реакцію на ішемію-реперфузію (20хв/40хв). Показано, що внутрішньоочеревинне введення щурам NaHS у дозі 7,4 мг/кг супроводжувалося збільшенням функціональних резервів серця. Кут підйому кривої кінцево-діастолічного тиску у них був меншим, а плато кривої Франка-Старлінга − тривалішим. NaHS збільшував мембранний потенціал мітохондрій серця, але не впливав на експресію гена UCP3. Ступінь відновлення показників кардіодинаміки після 20-хвилинної ішемії на тлі застосування NaHS був істотно вищим, ніж у контрольній серії внаслідок зменшення утворення мітохондріальних пор. Зроблено висновок, що донор сірководню у досліджуваній дозі має кардіопротекторний ефект [57, 73].

Відомості про роль різних типів К+АТФ-каналів у реалізації кардіопротекторного ефекту сірководню досить суперечливі. Bian і співавт. [86] виявили, що блокування К+АТФ-каналів сарколеми знімало ефект введення сірководню, а внутрішньовенне застосування специфічного блокатора мітохондріальних К+АТФ-каналів 5-гідроксидеканоату (5-HD) не впливало на розмір інфаркту ішемізованого серця. Sivarajah і співавт. [219] дійшли висновку, що Н2S не мав захисного впливу на міокард при внутрішньовенному застосуванні 5-HD. Згідно з даними Струтинської та співавт. [65], преінкубація ізольованих мітохондрій серця з 5-HD викликала ослаблення протекторного ефекту донора сірководню відносно кальційіндукованого відкривання мітохондріальних пор. Це може свідчити про участь мітохондріальних К+АТФ-каналів у Н2S-залежному інгібуванні пороутворення в серці, що спостерігається при його реперфузії [65].

Сірководень в мікромолярних концентраціях, отриманий *in vitro* з Na2S або NaHS [238, 243], виявляє цитопротекторні властивості, які можуть бути пов'язані з його здатністю нейтралізувати активні форми молекул (наприклад, пероксинітрити, гіпохлоритну кислоту і гомоцистеїн). H2S модулює функціонування внутрішньоклітинних каспаз або кіназ (p-38, c-JUN N-термінал протеїнкіназа 1/2, ERK1/2, PI3K), активацією ядерного фактору − кВ і кВ-залежних протеїнів (індуцибельна NO-синтаза, циклоокисигеназа-2, міжклітинна адгезивна молекула-1), а також зі зниженням антиапоптотичного фактору Bcl-2 [226]. Показано, що пригнічення ендогенного синтезу сірководню збільшує цитотоксичну дію на клітини організму екзогенного H2S [46]. Встановлено, що для захисту тканин нирки від ушкодження при ішемії−реперфузії необхідний ендогенний H2S. Введення NaHS зменшує ступінь виникнення дисфункцій і морфологічних змін нирок [226].

Найбільш загальним ефектом дії ендогенного H2S є вазодилятація. Показано, що в центральній нервовій системі ендогенний сірководень функціонує як нейромодулятор, але може виконувати і протекторну функцію при оксидативному стресі або порушеннях кровопостачання мозку. Відомо, що відновлений глутатіон виконує роль одного з основних антиоксидативних протекторів мозку. Підвищення фізіологічного рівня синтезу сірководню в мозку збільшує вміст глутатіону, що захищає нейрони від апоптозу в умовах оксидативного стресу, що запускається підвищеним рівнем L-глутамату [165]. Донор H2S (100 µM NaHS) здійснював цитопротекторний вплив на первинну культуру ембріональних щурячих нейронів при використанні моделі окиснювального стресу, індукованого глутаматом (1 mM, 2 год). Газотрансміттер підвищував внутрішньоклітинну концентрацію антиоксиданту глутатіону через активацію експресії γ-глутамілцистеїнсинтази [165].

Внутрішньоклітинні газові трансмітери необхідні для фізіологічного функціонування практично всіх органів і тканин. Сірководень продукується багатьма клітинами організму. Це свідчить про те, що в процесі еволюції H2S виявився важливим елементом спочатку гуморальної, а потім і нейрогенної регуляції життєвих властивостей − проліферації, фізіологічної регенерації й апоптозу. Фізіологічні концентрації ендогенного H2S забезпечують церебро- і кардіопротекцію, відносно постійний артеріальний тиск, зберігаючи здоров'я людини і тварин у складних динамічних умовах зовнішнього середовища. Проте роль Н2S в мінімальних концентраціях на життєздатність і метаболізм МСК лінії 4*BL* людини не досліджувалась.

**РОЗДІЛ 2**

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

2.1. Умови культивування соматичних клітин людини лінії 4*BL*

Для вирощування клітин лінії 4*BL* використовували середовище Ігла у модифікації Дюльбекко (DMEM − Dulbecco΄s modified Eagle΄s medium) (“Sigma”, США) із додаванням 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10% ембріональної сироватки теляти (“Sigma”, США). Клітини культивували при 37 °С у скляних чашках Петрі (d=35 мм). Контрольні клітини тримали в стандартних умовах СО2-інкубатора: 5% СО2 і 95% повітря (21% О2).

Клітинна лінія 4*BL* – це мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, одержані з периферичної крові здорового донора і переведені в умови стандартної моношарової культури. Лінію клітин 4*BL* отримано і досліджено у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [31-32, 39].

У наших дослідженнях для культивування клітин лінії 4*BL* людини газову суміш зі зниженим (відносно атмосферного повітря) парціальним тиском кисню (Ро2) подавали в двох режимах – безперервному і переривчастому (табл. 2.1.1). Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини лінії 4*BL* зазнавали впливу зниженого Ро2 в переривчастому режимі: 8 годин деоксигенація і 16 годин реоксигенація протягом 3-х діб. У безперервному режимі клітини інкубувались у газових сумішах 24 години, а потім переносились у СО2-інкубатор без змін поживного середовища. У кожному варіанті досліда по 12 чашок Петрі. Загальна тривалість експерименту становила 4 доби (96 годин).

Таблиця 2.1.1

Схема експерименту

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№**  **досліду** | **Група** | **Умови культивування**  **клітин лінії 4*BL* людини (n=12)** |
| І | Контроль | Стандартні умови СО2-інкубатора: 5% СО2 і 95% повітря (Ро2 159 мм рт.ст.) |
| ІІ | Вплив зниженого Ро2  24 год безперервно | 22-23 мм рт.ст. (3% О2, 5% СО2, 92% N2)  37-38 мм рт.ст. (5% О2, 5% СО2, 90% N2)  75-76 мм рт.ст. (10% О2, 5% СО2, 85% N2) |
| ІІІ | Вплив зниженого Ро2 переривчасто  8 год/добу×3 дні=24 год | 37-38 мм рт.ст. (5% О2, 5% СО2, 90% N2)  75-76 мм рт.ст. (10% О2, 5% СО2, 85% N2) |
| IV | Вплив донора сірководню NаHS | 10-8 М  10-9 М  10-10 М  10-12 М  10-13 М  10-15 М |
| V | Cумісний вплив  Ро2 (24 год безперервно)  + NаHS | 22-23 мм рт.ст. +10-12 М NаHS  37-38 мм рт.ст. +10-12 М NаHS |

Донором сірководню був гідросульфід натрію (NaHS, “Sigma”, США).

2.2. Оцінка проліферації клітин у культурі

Для визначення проліферації клітини досліджуваної лінії висівали по 50 тис. клітин на чашку Петрі і додавали по 2 мл живильного середовища. Клітини знімали за допомогою суміші 0,25% трипсину і 0,02% ЕДТА (рН 7,5; 1:1) на третю (72 год) й четверту (96 год) добу культивування. Підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [70] під світловим мікроскопом у 15-20 полях зору для оцінки середнього арифметичного.

Морфологічні зміни оцінювали візуально під світловим мікроскопом Jenaval (“Carl Zeiss”, Німеччина). Знімки отримували за допомогою фотоапарата Canon PowerShot 640А, приєднаного до мікроскопу. МСК фіксували і фарбували за методом Романовського-Гімзи.

2.3. Визначення концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини

Концентрацію загального білку в культуральній рідині визначали за допомогою біуретового методу [19].

Принцип методу: оснований на утворенні забарвленого у фіолетовий колір комплексу пептидних зв’язків білка з іонами двовалентної міді (сульфату міді) в лужному середовищі. Інтенсивність забарвлення розчину прямопропорційна концентрації білку і визначається фотометрично.

Реагенти:

Біуретовий реактив (СuSO4, KNaC4H4O6 i NaOH).

До 0,1 мл культуральної рідини добавили 5 мл робочого розчину біуретового реактиву, уникаючи утворення піни. Через 30 хвилин виміряли екстинцію на фотометрі в кюветі з товщиною шару 1 см при довжині хвилі 540 нм (зелений світофільтр) проти біуретового реактиву. Розрахунок проводили по калібровочному графіку. Калібровочний графік будували використовуючи серію стандартних розчинів курячого білку різної концентрації.

Формула розрахунку:

Ед / Ест × 5 = мг/мл, де

Ед – екстинція дослідної проби;

Ест – екстинція стандартної проби.

2.4. Визначення активності лужної фосфатази в культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини

Використовували стандартний набір реактивів ("Філісіт-Діагностика", Україна).

Принцип методу: лужна фосфатаза (ЛФ) розщеплює фенілфосфат при рН 10,4 з утворенням фенолу та фосфату, відповідно до наступної реакції:

фенілфосфат + H2O ЛФ фенол + фосфат.

Окисне сполучення фенолу з 4-амінофеназоном утворює червоний барвник, інтенсивність забарвлення якого визначається фотометрично. Активність ферменту є пропорційною прирощенню оптичної щільності розчину.

Реагенти:

1. Буферний концентрат:

* карбонат натрію – 32,0 г/л,
* бікарбонат натрію – 16,8 г/л,
* 4-амінофеназон – 10,2 г/л.

1. Субстрат: дінатрійфенілфосфат – 64 мг.
2. Окислювач: періодат натрію 50 г/л.
3. Калібрувальний розчин фенолу – 2,5 ммоль/л.

До контрольної і дослідної пробірки додавали по 2,1 мл субстратно-буферного розчину. Потім у дослідну пробірку вносили 0,07 мл культуральної рідини, перемішували та інкубували 10 хвилин при 37ºС. Після чого додавали в обидві пробірки по 2,1 мл окисного розчину. У контрольну пробу додавали ще 0,07 мл культуральної рідини. Витримували 5 хвилин при кімнатній температурі і вимірювали оптичну щільність дослідної проби (А) проти контрольної проби при λ=540 нм, І=10 мм.

Активність ферменту у пробі розраховували за формулою:

А (проби) = К × Е (проби),

де К – коефіцієнт, вирахуваний по калібрувальному графіку,

Е (проби) – оптична щільність дослідної проби, виміряна проти відповідної контрольної проби.

Перерахунок одиниць робили з урахуванням того, що 1 кат/л = 1 моль/с•л, або 1 мккат/л = 60 МО/л.

2.5. Визначення концентрації вільних амінокислот у культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини

До 1 мл культуральної рідини додавали 2 мл спирт-ацетона (1:3), перемішували і через 30 хв центрифугували (10 хв при 3 000 хв-1). Супернатант випарювали до 1 мл і наносили на хроматографічний папір "FN" (Німеччина) по 20 мкл. Амінокислоти розділяли на 13 фракцій:

1. цистеїн, цистин (Cys);
2. аргінін, гістидин, таурин (Arg+His+Taurine);
3. лізин, аспарагін (Lys+Asn);
4. гліцин, метіонін (Gly+Met);
5. серин, аспарагінова к-та (Ser+Asp);
6. аланін, глутамін (Ala+Gln);
7. валін, триптофан (Val+Trp);
8. тирозин, глутамінова к-та (Tyr+Glu);
9. треонін, ізовалін (Thr+Isovaline);
10. пролін, оксипролін (Pro+Hyp);
11. лейцин (Leu);
12. фенілаланін (Phe);
13. ізолейцин (Ile).

Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт, бутиловий спирт, оцтову кислоту, мурашину кислоту та воду (9:7:4:2:5 по об’єму) [24, 29].

Після видалення хроматограм із розчинника під витяжною шафою, їх фарбували за допомогою скляного лабораторного обприскувача розчином нінгідрину. Для кількісної оцінки амінокислотного складу використовували вітчизняний денситометр ДО-1М.

2.6. Методи статистичної обробки результатів

Отримані в експериментах цифрові показники обробляли статистично з використанням критерію t Стьюдента. Визначали середнє арифметичне (М), стандартну похибку (m), коефіцієнт вірогідних змін по Стьюденту (р). Нормальність розподілу даних аналізували тестом Колмогорова-Смирнова. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями досліду при р<0,05. Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення OriginPro 7,5 та програми Microsoft Excell 2003. Кореляційний аналіз проводили із встановленням лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона (r), що змінюється в межах від -1 до +1 [42].

**РОЗДІЛ 3**

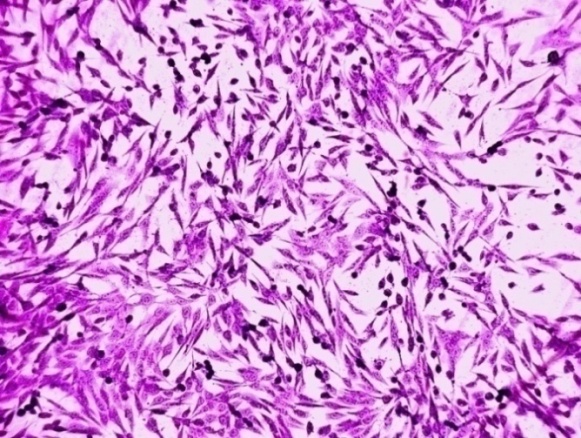
**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

3.1. Морфологічні характеристики культивованих клітин людини лінії 4*BL* в умовах зниженого парціального тиску кисню та додавання донора сірководню

Морфологічних відмінностей між клітинами лінії 4*BL* людини контрольної (при Po2 159 мм рт. ст., що еквівалентно 21% О2) та дослідних груп, що піддавалися впливу зниженого Po2 у двох режимах – безперервного 24-х год (при Po2 23, 38 і 76 мм рт. ст., що еквівалентно 3, 5і 10% О2) і переривчастого по 8 год/добу, 3 доби (при Po2 38 і 76 мм рт. ст., що еквівалентно 5і 10% О2) – не виявлено (приклад представлено на рис. 3.1.1).

Клітини даної лінії були більш-менш однорідні за розмірами (60-120 мкм) та мали округле ядро. Під світловим мікроскопом переважна більшість клітин лінії 4*BL* людини мала витягнену веретеноподібну форму з відростками, але зустрічались і трикутні клітини. При низькій щільності клітин у популяції на третю добу культивування переважали фібробластоподібні клітини. Зустрічались круглі клітини, які відкріплювались від поверхні чашки Петрі та переходили у суспензію для поділу. Така морфологічна неоднорідність характерна для ММСК. Відносно фібробластів у культурі це пояснюють динамікою морфології клітин протягом клітинного циклу [76]. Попередніми дослідженнями встановлено, що клітини лінії 4*BL* мають властивості ММСК: здатні диференціюватися в остеогенному, адипогенному та міогенному напрямках у відповідь на дію відповідних стимулів [31-32, 39, 119].

А Б

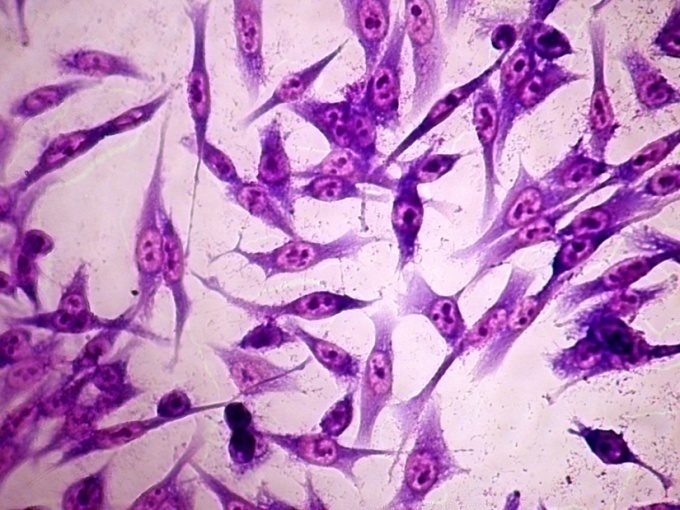
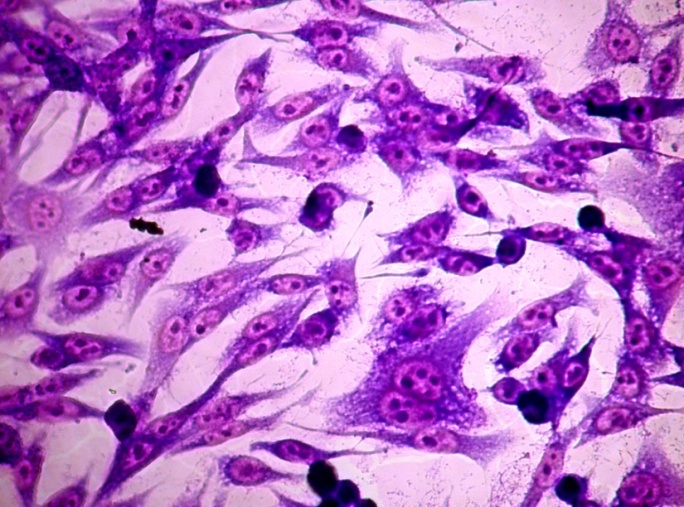
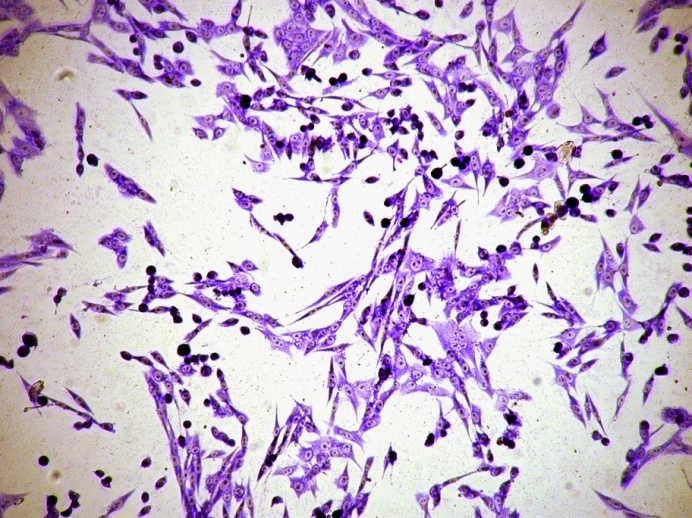
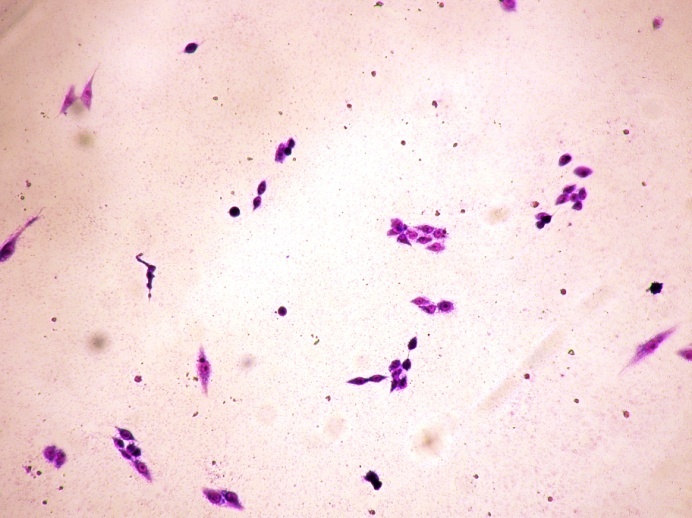
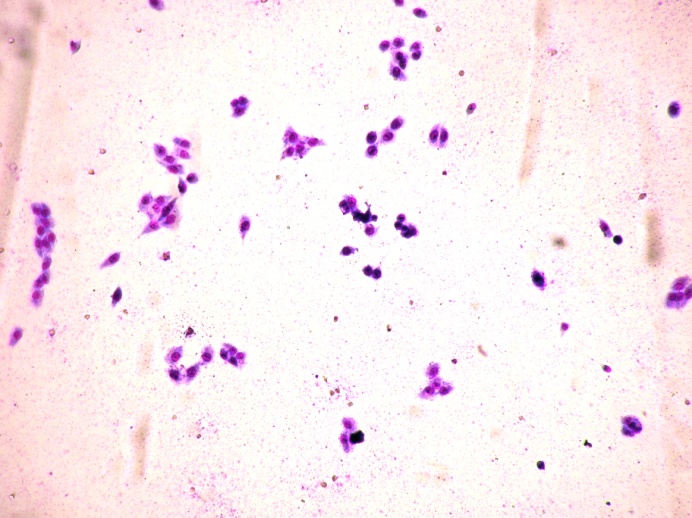
 

Рис. 3.1.1. Клітини лінії 4*BL* людини на 4-ту добу культивування у контролі (А) та при 24-годинному Po2 76 мм рт. ст. (Б). Фарбування за Романовським-Гімзою. Зб. ×100 та ×400

У результаті культивування МСК лінії 4*BL* людини у присутності донора сірководню NаHS ми вперше спостерігали значні морфологічні відмінності. Клітини контрольної групи характеризувалися фібробластоподібною формою (довжиною 50-120 мкм) з округлим ядром (рис. 3.1.2, а; рис. 3.1.3, а). Вони мали відростки, за допомогою яких контактували між собою з утворенням сітки. З невисокою частотою зустрічались подібні до трикутника більш розпластані МСК, або округлі клітини, які відкріплювались від поверхні та переходили у суспензію. У деяких зразках у культурі з’являлися клітини-гіганти (200 мкм). Клітини дослідженої культури при підвищенні конфлюентності схильні до подовження, стоншення та набуття щільного моношару.

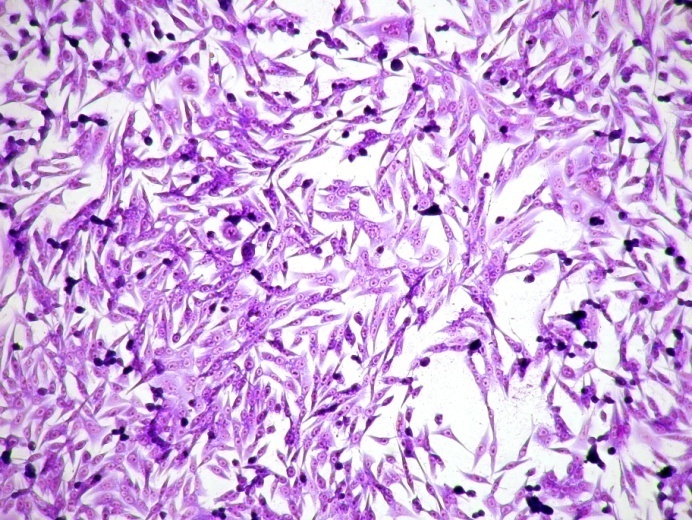
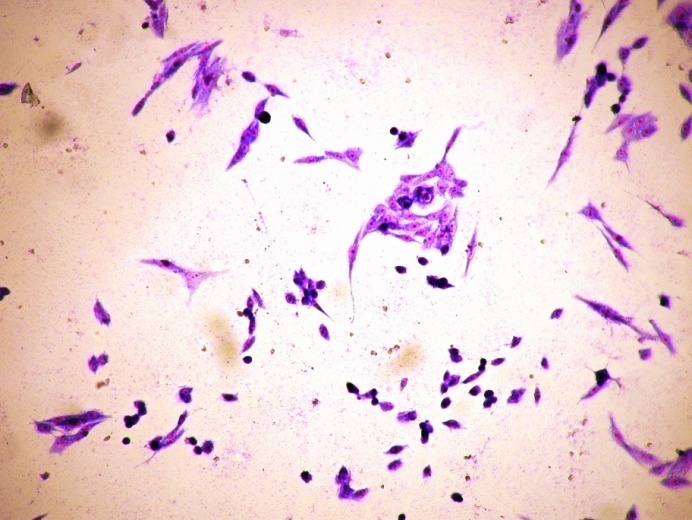
а б

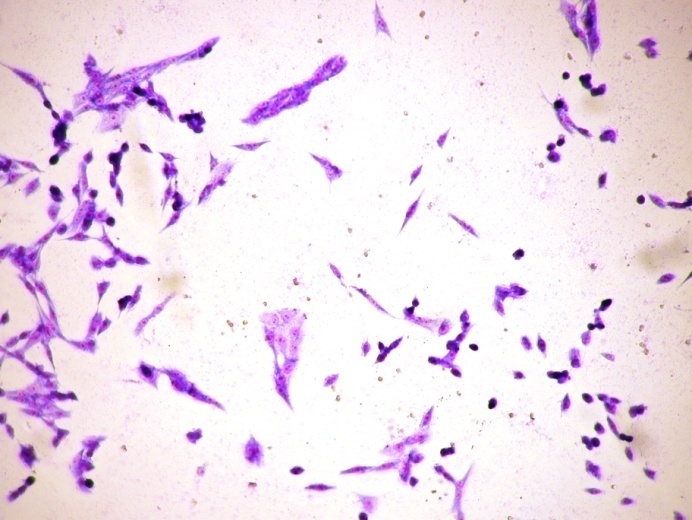
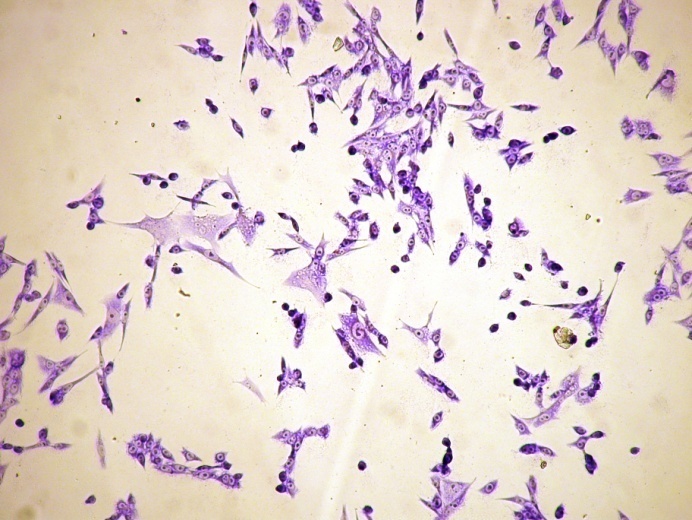
в г

Рис. 3.1.2. Морфологія клітин лінії 4*BL* контрольної групи (а) та після впливу різних концентрацій NaHS: 10-8 М (б), 10-9 М (в), 10-10 М (г) на 3-тю добу культивування. Фарбування за Романовським-Гімзою. Зб. ×100

На третю добу культивування МСК у присутності NаHS (10-8-10-10 М) клітини набували атипової форми (рис. 3.1.2, б, в, г). Вони втрачали відростки та округлювалися. Розташовувалися поодиноко або невеликими групами з 4-8 клітин. На четверту добу − вирізнялися плоскі веретеноподібні клітини з довгими відростками, які контактували з поверхнею сусідніх клітин (рис. 3.1.3, б, в, г). Вони утворювали ділянки моношару з 10-20 клітин. Половина клітин морфологічно залишалась округлої форми.

а б

в г

Рис. 3.1.3. Морфологія клітин лінії 4*BL* контрольної групи (а) та після впливу різних концентрацій NaHS: 10-8 М (б), 10-9 М (в), 10-10 М (г) на 4-ту добу культивування. Фарбування за Романовським-Гімзою. Зб. ×100

Зміну морфології клітин при додаванні у живильне середовище донора сірководню можна пояснити цитотоксичною дією Н2S [83, 182]. Наші дослідження показали, що у присутності мінімальної дози 10-15 моль/л NaHS приблизно 80-90% популяції клітин мали типову фібробластоподібну форму, іноді зустрічались ниткоподібні, атипові округлі та розпластані клітини-гіганти (>200 мкм). Можливо NaHS спричиняв би менш виражений цитотоксичний вплив при додаванні його до культури адгезованих клітин, аніж при внесенні безпосередньо під час пасажування, коли більшість клітин є неприкріпленими до субстрату та округлими.

3.2. Вплив 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на клітини лінії 4*BL* людини

Мезенхімальні стромальні (стовбурові) клітини людини знаходяться в кістковому мозку, жировій тканині, шкірі, тканинах серця, плаценті, пуповинній крові, а також в інших органах і тканинах [67, 115, 143, 184]. У культурі МСК мають здатність до активної проліферації. Наступна стадія розвитку – спонтанна диференціація *in vitro* в клітини кісткової (остеогенні клітини), жирової (адипоцити), хрящової (хондроцити), м'язової (міоцити) або сполучної тканини (фібробласти) [26]. Умови культивування (склад культурального середовища, фактори росту, індуктори диференціювання) відіграють важливу роль у реалізації функціональних можливостей клітин. Показано, що парціальний тиск кисню в позаклітинному середовищі, який зумовлює внутрішньоклітинну концентрацію кисню, також є одним з істотних факторів, що активно впливає на проліферацію, життєздатність, диференціювання, а також на морфологічні та імунофенотипічні показники клітин [5, 11-13, 15]. Проте їхні висновки неоднозначні. Це може бути пов’язано з вибором культури клітин, а також умовами проведення експерименту, а саме: використанням різного часового режиму та неоднакової інтенсивності впливу газової суміші.

Тому ми дослідили 24-годинний вплив зниженого Ро2 до 23, 38 і 76 мм рт. ст. на проліферацію, активність лужної фосфатази (один із маркерних показників початку остеогенної диференціації та показник інтенсивності метаболізму), концентрацію загального білку і зміни амінокислотного складу культуральної рідини МСК лінії 4*BL* людини.

3.2.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали 24-годинного впливу зниженого парціального тиску кисню

Результати проведених нами досліджень показали, що проліферація клітин лінії 4*BL* у газовій суміші з 3% О2 та в умовах стандартної атмосфери (СА) істотно відрізняються (рис. 3.2.1.1).

N•103, клітин/мл



1

групи

Рис. 3.2.1.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини у контрольних (К, К1) і дослідних (І – 3%, ІІ – 5%, ІІІ – 10% О2, 24 год) груп на третю добу культивування. \*р<0,05 – відносно контролю

На третю добу культивування після 24-х годинного безперервного впливу 3% О2 кількість клітин була у 2 рази нижчою порівняно з контролем. Чисельність клітин при 5 і 10% кисню вірогідно не змінювалась порівняно з контролем. Через 96 годин культивування при СА в середньому на чашках Петрі налічувалось 313 – 327 тис клітин/мл. При інкубуванні клітин у газових середовищах з 5% та 10% О2  спостерігали тенденцію до збільшення кількості клітин: 330 – 363 тис клітин/мл порівняно з контролем (рис. 3.2.1.2). У І-й групі налічувалось на 37% клітин менше (р<0,05) щодо контрольних значень.

N•103, клітин/мл



1

групи

Рис. 3.2.1.2. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини у контрольних (К, К1) і дослідних (І – 3%, ІІ – 5%, ІІІ – 10% О2, 24 год) груп на четверту добу культивування. \*р<0,05 – вірогідні відмінності показників порівняно з контролем

Відомо, що вирощування ММСК при знижених концентраціях кисню у середовищі інкубування (5-10% О2) може позитивно впливати на їхній проліферативний потенціал [5, 13, 21, 49]. Зміни проліферації клітин в умовах дозованої гіпоксії пов’язують із регуляторним впливом транскрипційного фактору HIF. Активація HIF-1α є універсальною відповіддю клітин на гіпоксію і виявлена у різних типах клітин [21, 214, 221].

Наші досліди показали, що 24-годинне культивування МСК лінії 4*BL* людини при 3% О2 призводило до зниження проліферативного потенціалу на 37% порівняно з контролем. На відмінність, при інкубації клітин в умовах 5 та 10% О2, не тільки не виявлено пригнічення проліферації, а навпаки – спостерігалась тенденція до стимулювання поділу клітин лінії 4*BL*, хоча статистично вірогідних змін кількості клітин у цьому експерименті не спостерігали.

3.2.2. Зміни активності лужної фосфатази і концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали 24-годинного впливу зниженого парціального тиску кисню

Одним із показників стану клітин в умовах *in vitro* може бути їхня метаболічна активність. Концентрація загального білку у безклітинному культуральному середовищі на третю добу культивування після безперервного 24-х годинного впливу у І-й і ІІ-й дослідних пробах була вищою на 14% (р<0,05), а при 10% О2 – на 35% порівняно з контролем (рис. 3.2.2.1, а).

групи

Рис. 3.2.2.1.Концентрація загального білку у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини у контрольних (К) та дослідних (І – 3% О2, ІІ – 5% О2, ІІІ – 10% О2) груп на третю (а) та четверту (б) добу культивування після безперервного 24-х годинного впливу. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

На четверту добу спостерігали статистично вірогідне зростання концентрації білку (на 36%) при 10% О2, а у інших досліджуваних пробах цей показник практично не відрізнявся від значень контролю (рис. 3.2.2.1, б). За нашими даними зниження вмісту кисню у газовому середовищі інкубації до 10% позитивно впливає на проліферативну та метаболічну активність мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин людини.

Відомо, що лужна фосфатаза (ЛФ) – фермент з групи гідролаз, що здійснює дефосфорилювання, тобто відщеплення фосфату (PO43-) від молекул різних органічних речовин (амінокислот, вуглеводів, нуклеотидів, білків). Біологічна роль її пов’язана з участю в обміні вуглеводів, фосфоліпідів, ДНК і РНК. Рівень її вмісту в організмі слугує надійним показником інтенсивності метаболізму [23]. ММСК лінії 4*BL* людини можуть диференціюватися в остеобласти, що в організмі формують нові елементи кісткової тканини. Для цього в культуральній рідині вимірювали активність ЛФ, яка є також одним із маркерних показників початку остеогенної диференціації мезенхімальних клітин [50]. Згідно з отриманими нами даними, на третю добу культивування клітин при 3% О2 активність ЛФ вірогідно знизилась на 40%, при 5% О2 – на 20% і при 10% О2 – на 23% порівняно з контрольним значенням (рис. 3.2.2.2, а). На четверту добу спостерігали спадання активності ЛФ у І-й і ІІ-й групах на 60% (р<0,05), а у ІІІ-й групі цей показник практично не відрізнявся від контролю (рис. 3.2.2.2, б). Отримані нами дані узгоджуються з опублікованими раніше результатами експериментального дослідження Грінаковської О.С. і співавт. [18]. Автори цього дослідження показали, що мезенхімальні стромальні клітини з ліпоаспірату людини (лМСК), які культивувались при 5% О2, утворювали в середньому на 50% менше мінералізованого матриксу у відповідь на остеогенну індукцію, ніж у стандартних умовах (21% О2). Після перенесення лМСК, постійно культивованих при 5% О2, у нормоксичні умови (21% О2) вони синтезували стільки ж матриксу, що і лМСК, постійно культивовані при 21% О2. Автори прийшли до висновку, що умови гіпоксії уповільнюють комітування лМСК під впливом остеогенних стимулів, що може мати вагоме значення при вирішенні задач відновлювальної та регенеративної медицини [18].

групи

Рис. 3.2.2.2.Активність лужної фосфатази у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини у контрольних (К) та дослідних (І – 3%, ІІ – 5%, ІІІ – 10% О2) груп на третю (а) та четверту (б) добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Встановлено, що у молодих щурів, які знаходились у стані гіпокінезії, але дихали штучною газовою сумішшю зі зниженим Ро2 91±8 мм рт. ст. протягом 28 діб, активність ЛФ у сироватці крові залишалася близькою до контрольних значень, а у кістковій тканині мала тенденцію до зниження порівняно з контролем. Це можна розглядати як підтвердження пригнічення процесів фізіологічного відновлення кісткової тканини при гіпокінезії. У тварин, що дихали газовою сумішшю 45 діб при обмеженні рухливості, активність ЛФ у сироватці крові вірогідно (р<0,05) знизилась у 1,5 раза порівняно з конролем. Водночас активність ЛФ у кістковій тканині молодих щурів вірогідно підвищилась, що свідчить на користь нормалізуючого впливу гіпоксії саногенного рівня за умов гіпокінезії [35-38].

При співставленні показників активності ЛФ, концентрації загального білку та проліферативного потенціалу клітин лінії 4*BL*, були встановлені їх кореляційні зв’язки (рис. 3.2.2.3).

А Б

Рис. 3.2.2.3.Графічна демонстрація ступеня кореляційних зв’язків між активністю лужної фосфатази та проліферацією клітин лінії 4*BL* людини (А) і між концентрацією загального білку у культуральній рідині та проліферацією (Б) при 24-годинній дії зниженого парціального тиску кисню 23, 38 і 76 мм рт. ст.

Зокрема, спостерігалась низька позитивна кореляція (r=0,24) між активністю ЛФ та проліферацією клітин. Негативний низький кореляційний зв’язок (r=-0,26) був встановлений між показниками концентрації загального білку і проліферацією. Виявили, що вказані чинники не корелюють між собою, тому не можуть використовуватись у якості додаткових факторів оцінки впливу зниженого парціального тиску кисню.

Отже, в наших дослідах після 24-годинного впливу зниженого Ро2 23 і 38 мм рт. ст., на четверту добу культивування спостерігали спадання активності ЛФ у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини на 60% у обох групах. Це може свідчити про гальмування інтенсивності метаболізму та диференціації в остеогенному напрямку. При цьому концентрація загального білку залишалась на рівні контролю. Після 24-годинного впливу зниженого Ро2 76 мм рт. ст. концентрація загального білку в культуральній рідині досліджуваної лінії статистично вірогідно зростала на 36%, проте активність ЛФ практично не відрізнялась від значень контролю. Отримані результати вказують, що Ро2 може регулювати як ферментативну, так і біосинтетичну активність клітин.

3.2.3. Концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали 24-годинного впливу зниженого парціального тиску кисню

На наступному етапі нашої роботи ми виявили, що безперервний 24-годинний гіпоксичний вплив призводив до змін амінокислотного складу культуральної рідини клітин лінії 4*BL* людини за показниками концентрації 13-ти фракцій вільних амінокислот (АК).

Результати проведених досліджень показали, що концентрація вільних АК гліцину (дефіцит призводить до порушення структури сполучної тканини) і метіоніну у культуральній рідині при дії 10% О2 на третю добу культивування була вищою на 85% (р<0,05) порівняно з контролем, а при 3 та 5% О2 – не відрізнялась від контрольних значень (рис. 3.2.3.1, А). На четверту добу культивування, цей показник зріс лише на 9% у 3-й групі (рис. 3.2.3.1, Б). Концентрація АК у 1-й і 2-й дослідних групах за той же період була вірогідно більшою на 60 і 47% відповідно порівнюючи з контрольним зразком (рис. 3.2.3.1, Б).

С, %

\*

\*

\*

групи

А Б

Рис. 3.2.3.1. Концентрація гліцину і метіоніну у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К – 21% О2) і дослідних (І – 3% О2, ІІ – 5% О2, ІІІ – 10% О2, 24 год безперервно) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

У процесі культивування МСК лінії 4*BL* людини в умовах 24-х годинного зниження Ро2 (38 і 76 мм рт. ст.) на третю добу концентрація проліну (основний елемент колагену) і оксипроліну майже не змінювалася відносно контролю. Вірогідно нижчою на 17% (р<0,05) концентрація цієї фракції була у 1-й групі (рис. 3.2.3.2, А). На четверту добу культивування їх вміст знизився в усіх дослідних групах: у 1-й на 31%, у 2-й – 42%, у 3-й – 21% (рис. 3.2.3.2, Б). Оскільки пролін і оксипролін являються головними АК у первинній структурі колагену, можна зробити припущення, що вони включалися у синтез даного білка.

**\***

**\***

**\***

**\***

групи

С, %

А Б

Рис. 3.2.3.2. Концентрація проліну і оксипроліну у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К – 21% О2) і дослідних (І – 3% О2, ІІ – 5% О2, ІІІ – 10% О2, 24 год безперервно) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

Отримані нами результати узгоджуються з літературними даними інших дослідників, які показали, що введення в зону перелому трубчастої кістки щурів мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку, культивованих при 5% кисню сприяло збільшенню коефіцієнта потовщення кісткової мозолі і хрящової тканини [11, 15].

Вміст вільних АК серину і аспарагінової кислоти у культуральній рідині був меншим на третю добу культивування при 3% кисню на 17%, а при 5% О2 – на 18% порівняно з контрольним значенням (рис. 3.2.3.3, А). При 10% О2 концентрація цих амінокислот вірогідно зростала на 19%. На четверту добу культивування у 1-й і 2-й пробах вміст серину і аспарагінової кислоти вірогідно (р<0,05) знизився на 45% і 62% відповідно порівнюючи з контролем (рис. 3.2.3.3, Б).

С, %

**\***

**\***

**\***

**\***

**\***

групи

А Б

Рис. 3.2.3.3. Концентрація серину і аспарагінової кислоти у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К – 21% О2) і дослідних (І – 3% О2, ІІ – 5% О2, ІІІ – 10% О2, 24 год безперервно) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

Концентрація вільного аланіну (бере участь у синтезі колагену) і глутаміну у культуральній рідині на 3-тю добу вирощування клітин у всіх зразках вірогідно не відрізнялась від значень контролю, хоча при 3 і 5% кисню мала тенденцію до зростання (рис. 3.2.3.4, А). Рівень цих АК через 96 год культивування збільшувався у 1-й і 2-й групі на 19 та 23% (р<0,05) відповідно, і зменшувався у 3-й групі – на 12% порівняно з контролем (рис. 3.2.3.4, Б).

С, %

**\***

**\***

**\***

групи

А Б

Рис. 3.2.3.4. Концентрація аланіну і глутаміну у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К – 21% О2) і дослідних (І – 3% О2, ІІ – 5% О2, ІІІ – 10% О2, 24 год безперервно) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

Фракції дев’яти інших АК змінювались з часом культивування по-різному. Газова суміш зі зниженим Ро2 (23 мм рт. ст.), яку подавали у безперервному режимі 24 год, сприяла вірогідному (р<0,05) зменшенню концентрації вільних амінокислот 4-х фракцій, а саме: цистеїну і цистину на 29%, валіну і триптофану – 33%, треоніну і ізоваліну – 22%, ізолейцину – 38% порівняно з контролем на 4-ту добу культивування (табл. 3.2.3.1).

Таблиця 3.2.3.1

Безперервний вплив зниженого парціального тиску кисню (23 мм рт. ст., що еквівалентно 3% О2, 24 год) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 3% О2  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 3% О2  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,41±0,04 | 0,42±0,05 | +2 | 0,38±0,03 | 0,27±0,02\* | -29 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,24±0,05 | 1,44±0,07\* | +16 | 1,40±0,12 | 1,96±0,09\* | +40 |
| лізин, аспарагін | 2,77±0,22 | 2,59±0,12 | -6 | 2,92±0,11 | 3,44±0,14\* | +18 |
| валін, триптофан | 0,59±0,03 | 0,52±0,02\* | -12 | 0,61±0,03 | 0,41±0,02\* | -33 |
| тирозин, глутамінова к-та | 4,34±0,26 | 3,85±0,24 | -11 | 4,80±0,23 | 5,74±0,24\* | +20 |
| треонін, ізовалін | 2,02±0,13 | 2,04±0,12 | +1 | 1,67±0,08 | 1,30±0,06\* | -22 |
| лейцин | 1,19±0,07 | 1,22±0,06 | +3 | 1,06±0,07 | 0,94±0,06 | -11 |
| фенілаланін | 0,61±0,04 | 0,72±0,08 | +18 | 0,49±0,02 | 0,63±0,15 | +29 |
| ізолейцин | 0,14±0,02 | 0,13±0,02 | -7 | 0,13±0,04 | 0,08±0,02 | -38 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю.

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Рівень Arg+His+Taurine був вищим на 40%, Lys+Asn – 18%, а Tyr+Glu – 20% щодо контрольних значень. Слід відмітити, що на 3-тю добу вміст Arg+His+Taurine складав 1,44±0,07 мг/мл, що на 16% (р<0,05) більше ніж у контролі – 1,24±0,05 мг/мл, а через добу був 1,96±0,09 мг/мл. Порівняно з контролем на 72-гу год культивування вірогідно нижчою була концентрація лише валіну і триптофану на 12%. При цьому концентрація незамінних амінокислот – лейцину, фенілаланіну, ізолейцину, валіну і триптофану – мала тенденцію до спадання як у контрольних так і у дослідних групах, порівнюючи 3-тю і 4-ту добу культивування. Це може свідчити про інтенсивне поглинання цих амінокислот клітинами і включення у процеси метаболізму.

Дослідження виявило, що 24-х годинна дія Ро2 38 мм рт. ст. впливає на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини (табл. 3.2.3.2).

Таблиця 3.2.3.2

Безперервний вплив зниженого парціального тиску кисню (38 мм рт. ст., що еквівалентно 5% О2, 24 год) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 5% О2  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 5% О2  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,41±0,04 | 0,35±0,02\* | -15 | 0,38±0,03 | 0,20±0,03\* | -47 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,24±0,05 | 1,37±0,06\* | +11 | 1,40±0,12 | 2,15±0,14\* | +54 |
| лізин, аспарагін | 2,77±0,22 | 2,59±0,06 | -6 | 2,92±0,11 | 3,43±0,17\* | +17 |
| валін, триптофан | 0,59±0,03 | 0,62±0,02 | +6 | 0,61±0,03 | 0,31±0,03\* | -49 |
| тирозин, глутамінова к-та | 4,34±0,26 | 4,15±0,28 | -4 | 4,80±0,23 | 6,08±0,32\* | +27 |
| треонін, ізовалін | 2,02±0,13 | 2,36±0,15 | +17 | 1,67±0,08 | 1,03±0,07\* | -38 |
| лейцин | 1,19±0,07 | 1,29±0,012 | +8 | 1,06±0,07 | 1,24±0,12 | +17 |
| фенілаланін | 0,61±0,04 | 0,73±0,08 | +20 | 0,49±0,02 | 0,47±0,03 | -4 |
| ізолейцин | 0,14±0,02 | 0,11±0,03 | -21 | 0,13±0,04 | 0,07±0,02 | -46 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю.

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

На 3-тю добу культивування вірогідно вищою на 11% була концентрація Arg+His+Taurine (1,37±0,06 мг/мл) порівняно з контролем (1,24±0,05 мг/мл). За тих само умов рівень цистеїну і цистину був нижчим на 15% за відповідне контрольне значення. Через 96 год культивування підвищився рівень 3-х груп АК: Arg+His+Taurine на 54%, Lys+Asn на 17% і Tyr+Glu на 27%. Концентрація цистеїну і цистину, яка складала 0,20±0,03 мг/мл, вірогідно знизилася на 47% (р<0,05) порівняно з контролем (0,38±0,03 мг/мл). Водночас зменшився вміст вільних валіну і триптофану на 49%, треоніну та ізоваліну – на 38%. У контролі концентрація незамінної АК ізолейцину була 0,13±0,04 мг/мл, а у дослідному варіанті – 0,07±0,02 мг/мл, тобто мала тенденцію до зниження.

Культивування МСК лінії 4*BL* людини у штучній газовій суміші з рівнем кисню 76 мм рт. ст., що відповідає вмісту 10%, різноспрямовано впливало на амінокислотний склад культуральної рідини (табл. 3.2.3.3).

Таблиця 3.2.3.3

Безперервний вплив зниженого парціального тиску кисню (76 мм рт. ст., 24 год) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 10% О2  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 10% О2  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,32±0,05 | 0,40±0,05 | +25 | 0,42±0,04 | 0,49±0,04 | +17 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,41±0,09 | 1,54±0,08 | +9 | 1,39±0,09 | 1,31±0,06 | -6 |
| лізин, аспарагін | 2,37±0,09 | 2,31±0,11 | -3 | 2,21±0,11 | 2,53±0,12\* | +14 |
| валін, триптофан | 0,25±0,04 | 0,21±0,02 | -16 | 0,18±0,02 | 0,18±0,04 | 0 |
| тирозин, глутамінова к-та | 2,99±0,14 | 3,23±0,16 | +8 | 2,89±0,13 | 2,58±0,10\* | -11 |
| треонін, ізовалін | 1,87±0,10 | 2,15±0,08\* | +15 | 2,34±0,12 | 3,09±0,14\* | +32 |
| лейцин | 0,84±0,05 | 0,85±0,07 | +1 | 0,76±0,06 | 0,72±0,05 | -5 |
| фенілаланін | 1,00±0,05 | 0,81±0,03\* | -19 | 0,70±0,03 | 0,59±0,03\* | -16 |
| ізолейцин | 0,17±0,03 | 0,23±0,04 | +35 | 0,08±0,01 | 0,10±0,02 | +25 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю.

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

На 3-тю добу виявлена тенденція до зростання концентрації Cys, Arg+His+Taurine, Tyr+Glu, Ile у культуральній рідині. Це може свідчити про менш інтенсивне поглинання цих АК клітинами дослідної групи порівняно з контролем. Зафіксовано зниження вмісту фенілаланіну на 19% (р<0,05). Показано, що на 4-ту добу культивування вірогідно зросла концентрація лізину і аспарагіну на 14%, треоніну та ізоваліну – на 32%, порівнюючи з контрольними даними. Показник тирозину і глутамінової кислоти був 2,58±0,10 мг/мл, що на 11% (р<0,05) нижче ніж у контролі – 2,89±0,13 мг/мл, а фенілаланіну (0,59±0,03 мг/мл) – на 16%, порівнюючи з контрольним значенням (0,70±0,03 мг/мл). Оскільки мінімальна концентрація речовини виникає в місці її інтенсивного поглинання, ми вважаємо, що цей факт варто розглядати як свідчення зростання інтенсивності життєдіяльності клітин за цих умов.

У проведених нами дослідах виявлено, що концентрація найбільш значущих для сполучної тканини вільних амінокислот, які безпосередньо беруть участь у синтезі колагену змінювалась по-різному. Аналіз динаміки змін вільних амінокислот культуральної рідини МСК лінії 4*BL* людини виявив їх чутливість до змін Ро2. Ми спостерігали вірогідне односпрямоване зниження проліну і оксипроліну на 4-ту добу культивування при 24-годинній подачі штучної газової суміші з Ро2 23, 38 і 76 мм рт. ст. Важливо також зазначити тенденцію до зниження усіх незамінних АК у культуральній рідині. Тому знижений рівень цих АК вказує на інтенсифікацію процесу синтезу колагену.

3.3. Вплив переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню на клітини лінії 4*BL* людини

На наступному етапі досліджень ми продемонстрували, що газова суміш зі зниженим Ро2 38 і 76 мм рт. ст., яку подавали у переривчастому режимі (8 год/добу, 3 доби), впливає на процеси життєдіяльності МСК лінії 4*BL* людини.

3.3.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали впливу переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню

Отримані нами результати показали, що при всіх варіантах інкубування проліферативна активність МСК на 3-тю добу вірогідно не відрізнялась від контрольних значень (рис. 3.3.1.1).

N•103, клітин/мл



групи

А Б

Рис. 3.3.1.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини, які культивували в умовах стандартної атмосфери (К – 159 мм рт. ст.) і зниженому парціальному тиску кисню (І – 38, ІІ – 76 мм рт. ст., 8 год/добу, 3 доби) на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу. \*p<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

На 4-ту добу культивування після впливу Ро2 38 мм рт. ст. кількість клітин (р<0,05) зростала і становила 462 тис клітин/мл у порівнянні з контролем (363 тис клітин/мл). Більш виражене підвищення кількості клітин відбувалося і при рівні Ро2 76 мм рт. ст. − 528 тис клітин/мл. Отримані нами результати свідчать, що культивування МСК людини лінії 4*BL* в середовищі зі зниженим вмістом кисню (5 і 10 %) може виявитися корисною модифікацією технології культивування, здатною забезпечити отримання більшої кількості клітин за менший час. Це може бути використано в галузі комбустіології та відновлювальної терапії.

Ми припускаємо, що основним регулятором пристосування клітин лінії 4*BL* до умов зниженого Ро2 є фактор індукований гіпоксією (HIF-1), який модулює роботу багатьох генів. Він складається з 2 субодиниць: киснечутливої HIF-1α та конститутивної HIF-1β [211-214]. Порівняльний аналіз даних, отриманих Риловою та співавт. [54-55] при дослідженні експресії генів МСК жирової тканини, показав, що в умовах зниженого до 5% вмісту кисню відбувалося збільшення рівня експресії генів, які відповідають за вступ клітин у клітинний цикл і позитивно регулюють їх проліферацію. Серед них гени родини Fos (*FOSB* і *FOSL1*), що кодують білки, які, димеризуючись із білками родини Jun, беруть участь у формуванні білка-активатора 1 (АР1); гени *PCNA* і *CCND2*, продукти яких являють собою цикліни (необхідні для переходу клітин з фази G1 в S-фазу синтезу ДНК), а також ген *CKS2*, який кодує регуляторну субодиницю циклінзалежної кінази. Крім того, у відповідь на знижений вміст кисню зменшувалась експресія *CDKN2C* − гена-інгібітора циклінзалежної кінази. Встановлено, що максимальну активність HIF-1 виявляє при концентрації кисню близько 0,5 % [54-55, 140, 148].

Отримані нами результати дають змогу зробити висновок, що зниження концентрації кисню в газовому середовищі інкубації до 5 і 10 % при культивуванні мультипотентних МСК людини лінії 4*BL* збільшує їх кінцеву проліферативну активність на 27 і 45 % відповідно порівняно з контролем. При цьому максимальний ефект отримано при 10% О2. Можливо це відбувається у зв’язку з тим, що у фізіологічних умовах цілого організму тканинне Ро2 в 2–4 рази нижче, ніж в атмосферному повітрі інкубатора.

3.3.2. Зміни активності лужної фосфатази і концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали впливу переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню

Результати проведених біохімічних досліджень показали вірогідне зниження активності ЛФ у культуральній рідині на 33 % порівняно з контролем при рівні Ро2  38 мм рт. ст. на 3-тю добу культивування (рис. 3.3.2.1, А). На 4-ту добу − активність ЛФ зменшилась як при 38 мм рт. ст., так і при 76 мм рт. ст. на 25 % (р<0,05; див. рис. 3.3.2.1, Б). Такі зміни дають змогу припустити, що початок остеогенної диференціації, одним із маркерних показників якої є активність ЛФ [50], МСК лінії 4*BL* людини залежить від рівня Ро2 у газовій фазі середовища. Зниження цього показника гальмує остеогенну диференціацію. Перетворення МСК у клітини кісткової тканини (остеобласти) відбувається швидше в умовах атмосферного рівня Ро2 (159 мм рт. ст.).

Отримані результати узгоджуються з літературними даними інших дослідників, які показали, що зниження концентрації кисню в газовому середовищі з 21 до 3% гальмує остеогенний потенціал культури МСК отриманої з тканин ротової порожнини людини [14] і кісткового мозку миші [49]. Жамбалова та співавт. [21] дослідили здатність мультипотентних МСК кісткового мозку людини до диференціації в умовах зниженого вмісту кисню (1 і 5% О2). При інкубації клітин у нормоксичних (21% О2) умовах і при зниженому вмісті кисню виявлена різна ступінь здатності МСК до диференціювання в остеогенному, адипогенному і ендотеліальному напрямках. У середовищі з 5% О2 спостерігали незначне зниження здатності МСК до мінералізації позаклітинного матриксу і накопиченню ліпідних крапель у порівнянні з контролем (21% О2). При концентрації 1% О2 МСК практично повністю втратили здатність до мінералізації матриксу і не диференціювалися в адипоцитарному напрямку. При культивуванні МСК протягом 3 тиж з 5 та 21% О2 вірогідних відмінностей у диференціюванні в ендотеліальному напрямку не виявлено. Характерним морфофункціональним показником ефективності такого диференціювання була здатність МСК утворювати капіляроподібні структури на екстраклітинному матриксі в культурі з додаванням ендотеліального фактора росту [21].

групи

А Б

Рис. 3.3.2.1. Активність лужної фосфатази у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К – 159 мм рт. ст.) і дослідних (І – 38, ІІ – 76 мм рт. ст., 8 год/добу, 3 доби) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

У межах чутливості біуретового методу при впливі зниженого Ро2 переривчастого режиму не було виявлено змін в концентрації загального білку в культуральній рідині між дослідними і контрольними групами клітин.

Аналіз ступеня взаємозв`язків між активністю ЛФ і проліферативним потенціалом клітин лінії 4*BL* людини показав наявність високого негативного (r=-0,80) кореляційного зв'язку (рис. 3.3.2.2).

А Б

Рис. 3.3.2.2. Кореляційні зв’язки між активністю лужної фосфатази та проліферацією клітин лінії 4*BL* людини (А) і між концентрацією загального білку у культуральній рідині та проліферацією (Б) при дії зниженого парціального тиску кисню 38 і 76 мм рт. ст. переривчастого режиму (8 год/добу, 3 доби)

Висока позитивна кореляція (r=0,82) була встановлена між показниками проліферації і рівнем загального білку в культуральному середовищі досліджуваної лінії.

Наведені результати дозволяють зробити висновок, що остеогенна диференціація клітин лінії 4*BL* людини, маркерним показником якої є активність ЛФ, при рівні Ро2 38 і 76 мм рт. ст. (8 год/добу, 3 доби) відбувалася на 25% повільніше, ніж в умовах атмосферного кисню (159 мм рт. ст.). Зниження вмісту кисню у середовищі інкубування не впливало на концентрацію загального білку у культуральній рідині.

3.3.3. Концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини, що зазнавали впливу переривчастого режиму зниження парціального тиску кисню

При культивуванні клітин в умовах Ро2 38 мм рт. ст. (8 год/добу, 3 дні) на 3-ю добу у культуральній рідині вірогідно нижчою була концентрація лізину і аспарагіну на 11%, проліну і оксипроліну – на 12% порівняно з контролем (табл. 3.3.3.1). Показники концентрації усіх інших фракцій АК мали тенденцію до зниження. Виняток становила лише група АК серин і аспарагінова кислота, що мала тенденцію до зростання відповідно контролю.

Таблиця 3.3.3.1

Вплив переривчасто зниженого парціального тиску кисню (38 мм рт. ст., 8 год/добу, 3 доби) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 38 мм рт. ст.  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 38 мм рт. ст.  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,54±0,04 | 0,47±0,03 | -13 | 0,61±0,05 | 0,55±0,04 | -10 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,11±0,04 | 0,99±0,03 | -11 | 1,22±0,11 | 1,09±0,08 | -11 |
| лізин, аспарагін | 2,12±0,12 | 1,89±0,08\* | -11 | 2,45±0,15 | 2,09±0,12\* | -15 |
| гліцин, метіонін | 3,17±0,16 | 2,90±0,13 | -9 | 3,26±0,19 | 3,11±0,11 | -5 |
| серин, аспарагінова к-та | 0,43±0,05 | 0,52±0,06 | +21 | 0,59±0,05 | 0,47±0,04\* | -20 |
| аланін, глутамін | 2,96±0,10 | 2,71±0,11 | -8 | 3,35±0,27 | 3,14±0,15 | -6 |
| валін, триптофан | 0,11±0,04 | 0,09±0,02 | -18 | 0,18±0,04 | 0,16±0,03 | -11 |
| тирозин, глутамінова к-та | 4,43±0,22 | 4,16±0,17 | -6 | 3,71±0,21 | 4,25±0,22\* | +15 |
| треонін, ізовалін | 1,73±0,14 | 1,59±0,08 | -8 | 2,12±0,13 | 1,73±0,11\* | -18 |
| пролін, оксипролін | 0,89±0,05 | 0,78±0,04\* | -12 | 0,83±0,05 | 0,68±0,04\* | -18 |
| лейцин | 1,17±0,12 | 1,06±0,08 | -9 | 1,28±0,11 | 1,01±0,10\* | -21 |
| фенілаланін | 0,45±0,03 | 0,41±0,03 | -9 | 0,47±0,04 | 0,43±0,03 | -9 |
| ізолейцин | 0,07±0,02 | 0,05±0,01 | -29 | 0,08±0,02 | 0,06±0,01 | -25 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю.

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Показано, що на 4-ту добу культивування 12 із 13 фракцій АК були нижчими за контрольне значення. Вірогідно (р<0,05) знизилась концентрація лізину і аспарагіну на 15%, серину і аспарагінової кислоти – на 20%, треоніну та ізоваліну – на 18%, проліну і оксипроліну – на 18%, лейцину – на 21% порівнюючи з контрольними даними. Показник тирозину і глутамінової кислоти був 4,25±0,22 мг/мл, що на 15% (р<0,05) вище ніж у контролі – 3,71±0,21 мг/мл.

Показано, що після дії Ро2 76 мм рт. ст. переривчастого режиму (8 год/добу, 3 дні) вірогідно знизилась у живильному середовищі концентрація Arg+His+Taurine на 17%, Tyr+Glu – на 12%, Thr+Isovaline – на 16%, Pro+Hyp – на 17% порівняно з контролем на 3-тю добу культивування клітин лінії 4*BL* людини (табл. 3.3.3.2).

Таблиця 3.3.3.2

Вплив переривчасто зниженого парціального тиску кисню (76 мм рт. ст., 8 год/добу, 3 дні) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 10% О2  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 10% О2  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,54±0,04 | 0,56±0,04 | +4 | 0,61±0,05 | 0,51±0,03\* | -16 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,11±0,04 | 0,92±0,03\* | -17 | 1,22±0,11 | 0,98±0,07\* | -20 |
| лізин, аспарагін | 2,12±0,12 | 1,91±0,10 | -10 | 2,45±0,15 | 1,76±0,08\* | -28 |
| гліцин, метіонін | 3,17±0,16 | 2,89±0,12 | -9 | 3,26±0,19 | 3,08±0,10 | -6 |
| серин, аспарагінова к-та | 0,43±0,05 | 0,61±0,13 | +42 | 0,59±0,05 | 0,45±0,05\* | -24 |
| аланін, глутамін | 2,96±0,10 | 3,17±0,17 | +7 | 3,35±0,27 | 3,08±0,013 | -8 |
| валін, триптофан | 0,11±0,04 | 0,14±0,04 | +27 | 0,18±0,04 | 0,15±0,03 | -17 |
| тирозин, глутамінова к-та | 4,43±0,22 | 3,89±0,14\* | -12 | 3,71±0,21 | 4,34±0,25\* | +17 |
| треонін, ізовалін | 1,73±0,14 | 1,46±0,09\* | -16 | 2,12±0,13 | 1,54±0,09\* | -27 |
| пролін, оксипролін | 0,89±0,05 | 0,74±0,05\* | -17 | 0,83±0,05 | 0,65±0,05\* | -22 |
| лейцин | 1,17±0,12 | 1,21±0,10 | +3 | 1,28±0,11 | 0,92±0,07\* | -22 |
| фенілаланін | 0,45±0,03 | 0,39±0,03 | -13 | 0,47±0,04 | 0,41±0,03 | -13 |
| ізолейцин | 0,07±0,02 | 0,04±0,01 | -43 | 0,08±0,02 | 0,05±0,01 | -37 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю.

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Встановлено, що 5 фракцій АК мали тенденцію до зростання, а саме: Cys, Ser+Asp, Ala+Gln, Val+Trp, Leu. У 4-х інших групах вільних АК (Lys+Asn, Gly+Met, Phe, Ile) спостерігали тенденцію до зниження їх концентрацій щодо контрольних значень.

На 4-ту добу культивування МСК показано зниження 12 із 13 фракцій вільних АК у живильному середовищі. Виняток становила лише концентрація тирозину і глутамінової кислоти, що вірогідно була вищою на 17% порівняно з контролем. Статистично значимо (р<0,05) щодо контролю зменшилась кількість Cys на 16%, Arg+His+Taurine – на 20%, Lys+Asn – на 28%, Ser+Asp – на 24%, Thr+Isovaline – на 27%, Pro+Hyp – на 22%, Leu – на 22%.

У дослідженнях, проведених на молодих щурах, які дихали 28 сеансів саногенною гіпоксією по 30 хв на добу, концентрація більшості АК у сироватці крові вірогідно зменшувалась. З 14 досліджених груп АК зниження відмічено в 11 випадках. Виняток становили 3 групи: гліцин і метіонін; аланін і глутамін; тирозин і глутамінова кислота [33].

Вміст 7 фракцій АК в сироватці крові дорослих 12-міс тварин вірогідно зростав після 28 сеансів 30-хвилинного дихання дозованою гіпоксичною газовою сумішшю. У кістковій тканині дорослих щурів, на відміну від молодих, значно підвищилась концентрація лізину і аспарагіну, гліцину і метіоніну, аланіну і глутаміну, тирозину і глутамінової кислоти, проліну і оксипроліну. Автори стверджують [33], що з двох досліджених ними режимів гіпоксичної активації метаболізму кісткової тканини, максимально сприятливим для молодих щурів є дозована киснева депривація протягом 2 годин в режимі 10 хв деоксигенації, 30 хв реоксигенації. Такий режим переривчастої саногенної дозованої гіпоксії має найбільшу кількість циклів деоксигенації/реоксигенації. Можливо, саме ця особливість подачі газової суміші надає процедурі максимальну ефективність за рахунок кількості «тригерних» впливів на адаптивні системи організму [33].

Для дорослих щурів сприятливі результати отримані при режимі, в якому гіпоксичну газову суміш подавали 30 хв безперервно. Періодичне дихання газовою сумішшю з помірно зниженим парціальним тиском кисню (Ро2 = 76 мм рт. ст.) при оптимальному співвідношенні періодів деоксигенації і реоксигенації і дозованої інтенсивності гіпоксичного впливу може бути одним із біофізичних факторів активації процесів фізіологічної регенерації кісткової тканини, темпи якої з віком зменшуються [33].

Отримані в наших дослідах результати дають підстави для заключення, що концентрація вільних АК у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини зменшувалась після переривчастого впливу зниженого Ро2 38, 76 мм рт. ст., а саме: лізину і аспарагіну; серину і аспарагінової кислоти; треоніну та ізоваліну; проліну і оксипроліну; лейцину. Можна припустити, що вони включалися у синтез колагену, оскільки являються головними амінокислотами у первинній структурі даного білка.

3.4. Вплив донора сірководню на клітини лінії 4*BL* людини

Відомо, що H2S є важливою сигнальною молекулою, яка бере участь у регуляції судинного тонусу, передачі нервових імпульсів, опосередковує цитопротекцію на моделях ішемічно-реперфузійного пошкодження міокарда [73, 53, 246]. Зазвичай дослідження проводять на щурах, кролях, мишах, або інших тваринах. Частина експериментів проводиться також на ізольованих органах (різних типах судин, міокарді) [61, 66, 182]. Проте вплив H2S на культури клітин вивчено недостатньо. Тому одним із напрямків нашого дослідження стало вивчення впливу донора сірководню NаHS на клітини *in vitro*.

У літературі наведено дані щодо наявності 20-80 мкМ H2S у плазмі крові людини та до 100 мкМ H2S у головному мозку [182, 198]. Потрібно зазначити, що такий рівень відображає не лише концентрацію вільного сірководню, але і концентрації гідросульфід (HS-) і сульфід-аніонів (S2-). За допомогою новітніх методів газової хроматографії та полярографічних методів аналізу було показано, що концентрація вільного газоподібного сірководню у плазмі крові становить 14-15 нМ [131, 173]. Тому у наших дослідженнях по впливу сірководню на проліферативну активність та інші процеси життєдіяльності МСК лінії 4*BL* людини *in vitro* ми використовували фізіологічні концентрації NаHS (10-8, 10-9, 10-10, 10-12, 10-13 і 10-15 моль/л).

3.4.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* людини культивованих в умовах додавання донора сірководню

Показано, що проліферація фібробластоподібних клітин людини лінії 4*BL* людини вірогідно знижувалася відносно контрольних значень при додаванні у живильне середовище донора сірководню NаHS (10-8, 10-9 і 10-10 моль/л). На третю добу культивування при NаHS кількість клітин була у І-й групі 10,45 тис клітин/мл; у ІІ-й – 12,1 тис клітин/мл; у ІІІ-й – 15,95 тис клітин/мл, а у контролі – 181,5 тис клітин/мл (рис. 3.4.1.1, А). Через 96 годин культивування в дослідних варіантах у середньому на чашках Петрі виросло 37-47 тис клітин/мл, у контролі кількість клітин збільшилась до 379,5 тис клітин/мл (рис. 3.4.1.1, Б).

Проліферативний потенціал досліджуваних МСК був вірогідно (р<0,05) меншим відносно контролю при 10-12 М NaHS на 42%, при 10-13 моль/л – на 29% і при 10-15 моль/л – на 18% на третю добу культивування. (рис. 3.4.1.2).



групи

N•103, клітин/мл

А Б

Рис. 3.4.1.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* контрольних (К) і дослідних (І – 10-8 моль/л, ІІ – 10-9 моль/л, ІІІ – 10-10 моль/л NaHS) груп на третю (А) та четверту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

групи

\*

\*

\*

N•103, клітин/мл

Рис. 3.4.1.2. Проліферація клітин лінії 4*BL* контрольних (К) і дослідних (І – 10-12 моль/л, ІІ – 10-13 моль/л, ІІІ – 10-15 моль/л NaHS) груп на третю добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Таким чином, спостерігали зростання проліферації клітин лінії 4*BL* людини при зниженні концентрації донора сірководню. Максимальна кількість клітин була у контрольній групі, яка росла без додавання NaHS. Можливо нам не вдалося підібрати фізіологічну концентрацію даного газотрансмітера, щоб отримати стимулюючий ефект на культуру клітин.

Наші дослідження показали, що донор сірководню в межах досліджуваних концентрацій (10-8, 10-9, 10-10, 10-12, 10-13 і 10-15 моль/л NaHS) знижував проліферацію клітин лінії 4*BL* людини. Це явище, ймовірно, пов’язано з цитотоксичною дією газотрансмітера. H2S є ліпофільною молекулою, що може вільно проникати через плазматичну мембрану клітини та інгібувати клітинне дихання, послаблюючи активність цитохром-с-оксидази електронно-транспортного ланцюга мітохондрій [61].

Відомо, що сірководень здатний пригнічувати ріст клітин, знижувати їхню адгезію до субстрату [136], викликати ушкодження ДНК і змінювати експресію генів апоптозу [83].

Таким чином, результати наших досліджень свідчать, що донор сірководню у досліджуваних концентраціях здатний впливати не тільки на проліферацію фібробластоподібних клітин, але і на їхню морфологію. Культивування соматичних клітин людини лінії 4*BL* з NaHS призводить до появи атипових клітин та істотно знижує швидкість їхньої проліферації, що може свідчити про цитотоксичну дію сірководню.

3.4.2. Зміни активності лужної фосфатази і концентрації загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню

Аналіз результатів проведених нами дослідів показав, що концентрація загального білку в культуральній рідині при додаванні 10-8, 10-9 і 10-10 моль/л NaHS вірогідно не відрізнялась від контрольних значень (рис. 3.4.2.1). Можливо це пов’язано із некрозом клітин, внутрішній вміст яких опинився назовні.

Концентрація загального білку в культуральній рідині при додаванні 10-12 моль/л NaHS була 4,45±0,38 г/л; при 10-13 моль/л – 4,52±0,43 г/л; при 10-15 моль/л – 4,39±0,33 г/л порівняно з контролем – 3,71±0,33 г/л на третю добу культивування. Спостерігали деяку тенденцію до збільшення порівняно з контрольним значенням.



групи

А Б

Рис. 3.4.2.1. Концентрація загального білку в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К) і дослідних (І – 10-8 моль/л, ІІ – 10-9 моль/л, ІІІ – 10-10 моль/л NaHS) груп на третю (А) та четверту (Б) добу культивування

Встановлено, що активність ЛФ на третю добу культивування вірогідно (р<0,05) знизилась у І-й групі на 24%, у ІІ-й групі – на 26%, а у ІІІ-й групі – на 16% порівняно з контрольними значеннями (рис. 3.4.2.2, А). На 4-ту добу цей показник був менший у І групі на 23%, у ІІ групі – на 22%, а у ІІІ групі – на 11% щодо контролю (рис. 3.4.2.2, Б).



групи

А Б

Рис. 3.4.2.2. Активність лужної фосфатази в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К) і дослідних (І – 10-8 М, ІІ – 10-9 М, ІІІ – 10-10 М NaHS) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Результати наших досліджень показали, що при додаванні у живильне середовище 10-12, 10-13, 10-15 М NaHS активність ЛФ була вірогідно нижчою на 15, 13 і 17% відповідно щодо контрольних значень на третю добу культивування (рис. 3.4.2.3).

Зниження активності ЛФ у наших дослідженнях можна розглядати як підтвердження гальмівної дії Н2S на інтенсивність метаболізму і на початок остеогенної диференціації МСК лінії 4*BL* людини. Активність ЛФ є одним із маркерних показників початку диференціації МСК в остеобласти (клітини кісткової тканини) [50]. Концентрація загального білку в культуральній рідині при введені NaHS вірогідно не змінювалась.

Відомо, що МСК кісткового мозку миші ендогенно синтезують H2S з метою регулювання їх самооновлення і остеогенної диференціації через сульфгідратацію залишків цистеїну Са2+-каналів. Дефіцит газотрансміттера призводив до остеопорозу у мишей [179]. H2S бере участь у ремоделюванні пародонта, особливо в процесі переміщення зубів [174].



групи

Рис. 3.4.2.3. Активність лужної фосфатази в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини контрольних (К) і дослідних (І – 10-12 моль/л, ІІ – 10-13 моль/л, ІІІ – 10-15 моль/л NaHS) груп на третю добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

За допомогою методів статистичного аналізу був виявлений високий позитивний кореляційний зв’язок (r=0,75) між показниками активності ЛФ і проліферації клітин лінії 4*BL* людини. Низька позитивна кореляція (r=0,08) була встановлена між рівнем загального білку в культуральній рідині МСК і активністю проліферації досліджуваної лінії при додаванні різної концентрації NaHS у живильне середовище (рис. 3.4.2.4).

А Б

Рис. 3.4.2.4. Кореляційні зв’язки між активністю лужної фосфатази та проліферацією клітин лінії 4*BL* людини (А) і між концентрацією загального білку у культуральній рідині та проліферацією (Б) при дії донора сірководню у 10-8, 10-9, 10-10, 10-12, 10-13, 10-15 моль/л NaHS.

Таким чином, збільшення кількості клітин у культурі корелює із зростанням активності ЛФ. Ці результати підтверджуються даними досліджень на культурі СК кісткового мозку людини, що піддавалися впливу фармакологічних речовин хондроїтину сульфату, глюкозаміну гідрохлориду та їх комбінації [27].

3.4.3. Концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню

У цьому експерименті, ми дослідили зміни амінокислотного складу живильного середовища при дії донора сірководню NaHS у 10-8, 10-9, 10-10, 10-13, 10-15 моль/л на МСК лінії 4*BL* людини. Показано, що на 3-тю добу культивування при 10-8 моль/л NaHS концентрація 12 із 13 фракцій АК мала тенденцію до збільшення порівняно з контролем (рис. 3.4.3.1).

С, мг/мл

Рис. 3.4.3.1. Концентрація фракцій вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню 10-8 моль/л NaHS на третю добу культивування

Аналогічну тенденцію до збільшення 7 груп АК спостерігали при додаванні 10-9 моль/л NaHS. Вірогідно вищим був вміст лізину і аспаргіну на 32% (р<0,05), гліцину і метіоніну – на 19%, аланіну і глутаміну – на 15%, треоніну та ізоваліну – на 22% відповідно контрольним значенням (рис. 3.4.3.2).

С, мг/мл

Рис. 3.4.3.2. Концентрація фракцій вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню 10-9 моль/л NaHS на третю добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

За умов додавання у живильне середовище 10-10 моль/л NaHS на третю добу культивування виявлено тенденцію до зростання показників 10 фракцій АК (рис. 3.4.3.3). Це можна розглядати як ознаку більш інтенсивного поглинання вільних АК клітинами контрольної групи, які не піддавалися впливу сірководню. Збільшення концентрації АК у культуральній рідині можливо пов’язано із загибеллю самих клітин, внутрішній вміст яких опиняється назовні, та із деградацією білків, що знаходяться у живильному середовищі.

С, мг/мл

Рис. 3.4.3.3. Концентрація фракцій вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню 10-10 моль/л NaHS на третю добу культивування

Аналіз результатів проведених нами дослідів показав, що на 4-ту добу культивування МСК при 10-8 М NaHS вірогідно нижчою була концентрація аланіну і глутаміну на 24%, лейцину – на 17%. Показники усіх інших фракцій АК залишались на рівні контролю. Концентрація 11 із 13 досліджуваних груп АК в культуральній рідині при введені 10-9 моль/л NaHS вірогідно не змінювалась. Лише вміст аланіну і глутаміну був нижчим на 17% (р<0,05), а проліну і оксипроліну – на 36% порівняно з контролем (рис. 3.4.3.4).

С, мг/мл

Рис. 3.4.3.4. Концентрація фракцій вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню 10-9 моль/л NaHS на четверту добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Через 96 год культивування клітин лінії 4*BL* у присутності 10-10 моль/л NaHS вірогідно більшою буда концентрація 3-х фракцій АК у живильному середовищі, а саме: аргініну, гістидину і таурину – на 20%, лізину і аспарагіну – на 12%, а гліцину і метіоніну – на 30% порівняно з контролем. У тих же умовах статистично значимо знизився рівень тирозину і глутамінової кислоти на 16%, а треоніну і ізоваліну – на 13% (рис. 3.4.3.5).

С, мг/мл

Рис. 3.4.3.5. Концентрація фракцій вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини інкубованих в умовах додавання донора сірководню 10-10 моль/л NaHS на 4-ту добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем.

Показано, що додавання 10-13, 10-15 моль/л NaHS викликало зміну концентрацій АК у культуральній рідині на третю добу культивування. Вміст лізину і аспарагіну був вірогідно нижчим на 18, 31% (р<0,05); гліцину і метіоніну – на 16, 22%; валіну і триптофану – на 12, 18% відповідно порівняно з контролем (табл. 3.4.3.1).

Таблиця 3.4.3.1

Вплив гідросульфіду натрію 10-13 і 10-15 моль/л на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 10-13 моль/л NaHS  (3-тя доба) | Δ, % | 10-15 моль/л NaHS  (3-тя доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,81±0,05 | 0,74±0,04 | -9 | 0,72±0,05 | -11 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,42±0,10 | 1,31±0,06 | -8 | 1,28±0,05 | -10 |
| лізин, аспарагін | 3,11±0,15 | 2,54±0,14\* | -18 | 2,16±0,12\* | -31 |
| гліцин, метіонін | 5,14±0,19 | 4,34±0,18\* | -16 | 3,99±0,17\* | -22 |
| серин, аспарагінова к-та | 0,65±0,08 | 0,61±0,06 | -5 | 0,59±0,05 | -9 |
| аланін, глутамін | 5,06±0,22 | 4,89±0,25 | -3 | 4,45±0,24\* | -12 |
| валін, триптофан | 0,35±0,02 | 0,30±0,02\* | -12 | 0,28±0,02\* | -18 |
| тирозин, глутамінова к-та | 2,81±0,12 | 2,90±0,06 | +3 | 3,09±0,19 | +10 |
| треонін, ізовалін | 2,72±0,07 | 2,63±0,07 | -3 | 2,61±0,09 | -4 |
| пролін, оксипролін | 1,19±0,06 | 1,14±0,05 | -4 | 1,11±0,03 | -7 |
| лейцин | 1,73±0,08 | 1,64±0,05 | -5 | 1,55±0,11 | -10 |
| фенілаланін | 0,68±0,04 | 0,65±0,02 | -4 | 0,61±0,03 | -10 |
| ізолейцин | 0,19±0,04 | 0,17±0,03 | -11 | 0,15±0,02 | -21 |

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем;

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю

У літературі описано мало результатів досліджень, що стосуються метаболізму амінокислот у стовбурових клітинах поза їх загальної ролі в синтезі білків.

Shyh-Chang N. зі співавт. [218] вивчав метаболізм треоніну у плюрипотентних мишачих ембріональних стовбурових клітинах (ЕСК). Ізотопне маркування ЕСК показало, що незамінна АК треонін використовується для синтезу білків. Виявлено, що треонін і цикл S-аденозилметіоніна (SAM) з'єднані в метаболізмі плюрипотентних стовбурових клітинах, що призводить до регуляції метилювання гістонів. Треонін під впливом треонінальдолази розпадається на гліцин і оцтовий альдегід (останній далі перетворюється в ацетил-КоА і ацетоацетил-КоА). Ацетил-коА є необхідним для синтезу SAM. Виснаження треоніну у живильному середовищі, або треонін дегідрогенази у ЕСК, призводить до зменшення рівня SAM і зниження триметилювання гістона H3 лізину 4 (H3K4me3), що призводить до сповільнення росту і диференціації клітин. Таким чином, при наявності вільного треоніну, з'являється велика кількість SAM, що впливає на метилювання гістонів H3K4me3 у ядрі, забезпечуючи можливий механізм, за допомогою якого модуляція метаболічного шляху може впливати на долю стовбурових клітин [218].

Дослідження Chen G. та співавт. [99-100] демонструють, що треонін бере участь у епігенетичних модифікаціях хроматину, необхідних для самооновлення і підтримки плюрипотентності ЕСК миші.

В експериментах *in vitrо*, проведених на культурі людських МСК кісткового мозку, показано, що аргінін (0; 0,1; 1 і 10 мкМ) впливав на проліферацію і диференціацію клітин. Посилював проліферацію на 36% при концентрації 10 мкМ аргініну протягом перших 48 год. Починаючи з 3-ї до 10-ї доби культивування, аргінін в дозах від 0,1-10 мкМ не стимулював проліферацію МСК. Це може свідчити про те, що аргінін не впливає на проліферацію МСК на даному етапі. Показано, що аргінін індукує остеогенну диференціацію МСК кісткового мозку людини та інгібує адипогенну диференціацію шляхом залучення Wnt5a і NFATc сигнального шляху [152]. Проте результатів досліджень впливу сірководню на амінокислотний склад культуральної рідини стовбурових клітин ми не знайшли.

Результати наших досліджень показали, що концентрація 10-12 фракцій вільних АК у культуральній рідині МСК лінії 4*BL* мала тенценцію до зростання, або вірогідно збільшувалась при додаванні донора сірководню NaHS у 10-8, 10-9, 10-10 моль/л на 3-тю добу культивування порівняно з контролем. Це можна пояснити малою кількістю клітин у досліджуваних групах (див. рис. 3.4.1.1). Клітини контрольної групи мали високу проліферативну активність, тому інтенсивно поглинали вільні АК із живильного середовища. У присутності 10-13 і 10-15 моль/л NaHS рівень 9-10 фракцій АК залишався близьким до контрольних значень. На 4-ту добу культивування вірогідно знизилась концентрація Ala+Gln і Leu при 10-8 моль/л, Ala+Gln і Pro+Hyp при 10-9 моль/л, Thr+Isovaline і Tyr+Glu при 10-10 моль/л NaHS. Відомо, що МСК синтезують компоненти міжклітинного матриксу, зокрема колаген, мономерними одиницями якого є АК [80]. Зменшення вмісту вільних АК корелює із підвищенням кількості клітин.

Підсумовуючи вищенаведене, слід зазначити, що при 10-8, 10-9, 10-10 моль/л NaHS концентрація майже всіх фракцій вільних АК у середовищі мала тенденцію до зростання, або була вірогідно більшою порівняно з контролем на третю добу культивування. Збільшення концентрації АК у культуральній рідині можливо пов’язано із загибеллю самих клітин, внутрішній вміст яких опиняється назовні, та із деградацією білків, що знаходяться у живильному середовищі. Також, це може бути пов’язано із зростанням трофічних потреб контрольної популяції клітин, що активно проліферують і тим самим збільшують свою кількість. При додаванні у живильне середовище донора H2S у більш низьких концентраціях 10-13, 10-15 моль/л вірогідно знижувало концентрацію лізину і аспарагіну (на 18 і 31%), гліцину і метіоніну (на 16 і 22%), валіну і триптофану (на 12 і 18%) порівняно з контролем. Фракції інших АК залишались на рівні контролю. Це можна пояснити інтенсивним поглинанням даних АК клітиною, що включалися у біосинтез білка, або використовувались у енергетичному метаболізмі.

3.5. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на культуру клітин лінії 4*BL* людини

З літературних джерел відомо, що і низьке Ро2 і різні концентрації H2S впливають на процеси життєдіяльності клітин [5, 11, 56, 96, 109, 132]. Проте їх сумісний вплив на проліферацію і диференціацію МСК у доступній для нас літературі не описано. Тому ми дослідили сумісний вплив донора сірководню 10-12 моль/л NаHS та 24-годинного зниженого Ро2 23 і 38 мм рт. ст. (що еквівалентно 3 і 5% О2) на культуру клітин лінії 4*BL* людини.

3.5.1. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на проліферацію клітин лінії 4*BL* людини

Наші дослідження показали, що культивування в умовах зниженої концентрації кисню (3%, 5% О2, 24 год) та у присутності донора сірководню (10-12 моль/л NаHS) гальмувало проліферацію соматичних клітин людини лінії 4*BL*. На третю добу культивування у контролі кількість клітин була 165 тис клітин/мл, у І групі – 95,7 тис клітин/мл, у ІІ – 59,4 тис клітин/мл, а у ІІІ – 39,6 тис клітин/мл (рис. 3.5.1.1, А).

На четверту добу кількість клітин знизилась у І групі на 29% (р<0,05), у ІІ – на 33%, а у ІІІ – на 54% порівняно з контролем (рис. 3.5.1.1, Б). Слід відмітити, що зниження концентрації кисню, при наявності у культуральній рідині NаHS, супроводжувалося додатковим зменшенням кількості клітин. Отже, ми зареєстрували посилення несприятливого впливу одного фактору (NаHS) дією іншого фактору (3%, 5% О2).

Зниження загальної кількості клітин можливо пов’язано із цитотоксичним впливом сірководню. Відомо, що Н2S може зупиняти клітинне дихання [162-164]. Механізм токсичної дії Н2S пов’язаний здебільшого із інгібуванням металовмісних ферментів. Таким чином, сірководень блокує передачу електронів із цитохромоксидази, ензима мітохондріального дихального ланцюга, на кисень. Внаслідок такої дії гальмується вивільнення енергії в клітинах.

N•103, клітин/мл

групи

\*

\*

\*

\*

\*

\*

А Б

Рис. 3.5.1.1. Проліферація клітин лінії 4*BL* контрольних (К) і дослідних (І – 21% О2 + 10-12 моль/л NaHS; ІІ – 5% О2 + 10-12 моль/л NaHS; ІІІ – 3% О2 + 10-12 моль/л NaHS) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

В наших дослідженнях показано, що за умов культивування при 10-12 моль/л NаHS як окремо та і разом із 3%, 5% О2 пригнічувалась проліферація соматичних клітин людини лінії 4*BL* у культурі.

3.5.2. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на активність лужної фосфатази і концентрацію загального білку у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини

При додаванні 10-12 моль/л NaHS та сумісного впливу зі зниженим Ро2 23, 38 мм рт. ст. концентрація загального білку в культуральній рідині не відрізнялася від контролю.

Одним із маркерних показників початку остеогенної диференціації МСК є активність лужної фосфатази [50]. Показано, що активність ЛФ на 3-тю добу культивування вірогідно (р<0,05) знизилась у І групі на 29%, у ІІ групі – на 47%, а у ІІІ групі – на 55% порівняно з контрольними значеннями (рис. 3.5.2.1, А).



групи

А Б

Рис. 3.5.2.1. Активність лужної фосфатази в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* контрольних (К) і дослідних (І – 21% О2+10-12 моль/л NaHS; ІІ – 5% О2+10-12 моль/л NaHS; ІІІ – 3% О2+10-12 моль/л NaHS) груп на 3-тю (А) та 4-ту (Б) добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

На 4-ту добу активність ЛФ в культуральній рідині клітин лінії 4*BL* була нижче у І групі на 21%, у ІІ групі – на 35%, а у ІІІ групі – на 46% щодо контролю (рис. 3.5.2.1, Б). Інгібування активності ЛФ, а отже і гальмування остеогенної диференціації при Н2S показано й іншими дослідниками. Встановлено, що сірководень є потужним інгібітором диференціації остеобластів і фосфатно-індукованої кальцифікації гладком'язових клітин судини [250]. Гідросульфід натрію – донор Н2S – пригнічував диференціацію остеокластів і остеобластів у клітинах періодонтальної зв'язки людини [171].

Аналіз ступеня взаємозв`язків між дослідженими показниками за умов сумісного впливу зниженого Ро2 23, 38 мм рт. ст. і 10-12 моль/л NaHS показав наявність високого позитивного кореляційного зв'язку (r=0,76) між активністю ЛФ і проліферацією клітин (рис. 3.5.2.2). Між кількістю клітин досліджуваної лінії і концентрацією загального білку – середній позитивний кореляційний зв’язок (r=0,5).

А Б

Рис. 3.5.2.2. Кореляційні зв’язки між активністю лужної фосфатази та проліферацією клітин лінії 4*BL* людини (А) і між концентрацією загального білку у культуральній рідині та проліферацією (Б) при дії донора сірководню у 10-12 моль/л NaHS та сумісного впливу зі зниженим парціальним тиском кисню 23, 38 мм рт. ст.

Отримані результати ми схильні розглядати як свідоцтво гальмівної дії Н2S на остеогенну диференціацію МСК лінії 4*BL* людини. Важливо також зазначити, що несприятливий вплив 10-12 М NaHS на диференціацію в остеогенному напрямку підсилювався при зниженні Ро2.

3.5.3. Сумісний вплив гідросульфіду натрію та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини

Обмін речовин, або метаболізм − складає основу життєдіяльності клітини. Із зовнішнього середовища у клітину поступають вода, іони солей, неорганічні і органічні молекули. Через плазматичну мембрану із клітини виводяться продукти обміну, а також речовини, синтезовані у клітині (білки, вуглеводи, гормони). Амінокислоти є мономерними одиницями білків, тому ми дослідили зміни їх концентрацій у культуральній рідині МСК.

Показано, що на третю добу культивування МСК лінії 4*BL* при 10-12 моль/л NaHS був вірогідно (р<0,05) знижений вміст наступних вільних амінокислот у культуральній рідині: серину і аспарагінової кислоти − на 12%, а також треоніну і ізоваліну − на 12% порівняно з контролем (табл. 3.5.3.1). Концентрація 11 із 13 фракцій вільних АК була на контрольному рівні.

На четверту добу культивування клітин досліджуваної лінії при додаванні 10-12 моль/л NaHS у живильне середовище зросла концентрація аланіну і глутаміну (на 14%); аргініну, гістидину і таурину (на 19%); гліцину і метіоніну (на 46%). Концентрація цистеїну і цистину була нижча на 22%, валіну і триптофану – на 27%, проліну і оксипроліну – на 30%, серину і аспарагінової кислоти – на 35%, фенілаланіну – на 16% i лейцину – на 20% щодо контролю (див. табл. 3.5.3.1).

Таблиця 3.5.3.1

Вплив гідросульфіду натрію (10-12 моль/л) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини при атмосферній концентрації кисню (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 21% О2 + 10-12 М NaHS  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 21% О2 + 10-12 М NaHS  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,40±0,02 | 0,38±0,03 | -5 | 0,37±0,02 | 0,29±0,02\* | -22 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,23±0,09 | 1,14±0,05 | -7 | 1,40±0,05 | 1,67±0,06\* | +19 |
| лізин, аспарагін | 2,76±0,11 | 2,99±0,12 | +8 | 2,92±0,13 | 3,19±0,14 | +9 |
| гліцин, метіонін | 3,26±0,08 | 3,08±0,17 | -5 | 3,02±0,06 | 4,38±0,13\* | +46 |
| серин,  аспарагінова к-та | 1,00±0,04 | 0,88±0,04\* | -12 | 1,10±0,04 | 0,71±0,02\* | -35 |
| аланін, глутамін | 3,89±0,06 | 3,84±0,05 | -1 | 4,29±0,14 | 4,88±0,15\* | +14 |
| валін, триптофан | 0,61±0,02 | 0,62±0,02 | +2 | 0,60±0,03 | 0,44±0,02\* | -27 |
| тирозин,  глутамінова к-та | 4,34±0,23 | 3,97±0,16 | -9 | 4,79±0,12 | 5,13±0,23 | +7 |
| треонін, ізовалін | 2,01±0,06 | 1,77±0,04\* | -12 | 1,66±0,05 | 1,58±0,04 | -5 |
| пролін, оксипролін | 0,94±0,02 | 0,91±0,04 | -3 | 0,71±0,02 | 0,50±0,02\* | -30 |
| лейцин | 1,10±0,04 | 1,06±0,04 | -4 | 1,06±0,04 | 0,85±0,03\* | -20 |
| фенілаланін | 0,61±0,02 | 0,62±0,02 | +2 | 0,49±0,02 | 0,41±0,03\* | -16 |
| ізолейцин | 0,13±0,01 | 0,15±0,02 | +15 | 0,12±0,02 | 0,10±0,01 | -17 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю;

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Гідросульфід натрію у досліджуваній концентрації при 5% О2 по-різному впливав на амінокислотний склад культуральної рідини МСК лінії 4*BL* людини (табл. 3.5.3.2). Ми наведемо дані тих фракцій амінокислот, що змінювалися вірогідно (р<0,05). Так, на 4-ту добу концентрація цистеїну і цистину, які зміцнюють сполучну тканину, була нижчою відносно контрольних значень на 51%; серину і аспарагінової кислоти − на 38%; валіну і триптофану − на 53%; тирозину і глутамінової кислоти – на 31%, ізоваліну і треоніну − на 22%; а проліну і оксипроліну, які входять до складу колагену − на 50%. Збільшився вміст аргініну, гістидину і таурину на 33%, аланіну і глутаміну − на 35%, гліцину і метіоніну − на 24% порівняно з контролем (див. табл. 3.5.3.2).

Таблиця 3.5.3.2

Сумісний вплив гідросульфіду натрію (10-12 моль/л) та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню (38 мм рт. ст., що еквівалентно 5% О2 у газовій суміші) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 5% О2 + 10-12 М NaHS  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 5% О2 + 10-12 М NaHS  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,40±0,02 | 0,44±0,04 | +10 | 0,37±0,02 | 0,18±0,03\* | -51 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,23±0,09 | 1,20±0,12 | -2 | 1,40±0,05 | 1,86±0,08\* | +33 |
| лізин, аспарагін | 2,76±0,11 | 2,76±0,24 | 0 | 2,92±0,13 | 3,02±0,06 | +3 |
| гліцин, метіонін | 3,26±0,08 | 3,35±0,29 | +3 | 3,02±0,06 | 3,74±0,12\* | +24 |
| серин, аспарагінова к-та | 1,00±0,04 | 1,03±0,15 | +3 | 1,10±0,04 | 0,68±0,03\* | -38 |
| аланін, глутамін | 3,89±0,06 | 3,68±0,26 | -5 | 4,29±0,14 | 5,78±0,12\* | +35 |
| валін, триптофан | 0,61±0,02 | 0,67±0,06 | +10 | 0,60±0,03 | 0,28±0,02\* | -53 |
| тирозин, глутамінова к-та | 4,34±0,23 | 3,92±0,29 | -10 | 4,79±0,12 | 3,30±0,15\* | -31 |
| треонін, ізовалін | 2,01±0,06 | 1,94±0,08 | -3 | 1,66±0,05 | 1,29±0,04\* | -22 |
| пролін, оксипролін | 0,94±0,02 | 0,80±0,02\* | -14 | 0,71±0,02 | 0,36±0,02\* | -50 |
| лейцин | 1,10±0,04 | 1,01±0,07 | -8 | 1,06±0,14 | 0,89±0,08 | -16 |
| фенілаланін | 0,61±0,02 | 0,54±0,02\* | -13 | 0,49±0,02 | 0,60±0,09 | +22 |
| ізолейцин | 0,13±0,01 | 0,12±0,03 | -8 | 0,12±0,02 | 0,10±0,02 | -17 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю;

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Культивування клітин при додаванні 10-12 моль/л NaHS в умовах зниженої концентрації кисню до 3% змінювало амінокислотний склад культуральної рідини МСК лінії 4*BL* людини (табл. 3.5.3.3).

Таблиця 3.5.3.3

Сумісний вплив гідросульфіду натрію (10-12 М) та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню (23 мм рт. ст., що еквівалентно 3% О2 у газовій суміші) на концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині клітинної лінії 4*BL* людини (мг/мл, М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показники | Контроль  (3-тя доба) | 3% О2 + 10-12 М NaHS  (3-тя доба) | Δ, % | Контроль  (4-та доба) | 3% О2 + 10-12 М NaHS  (4-та доба) | Δ, % |
| цистеїн, цистин | 0,40±0,02 | 0,31±0,02\* | -22 | 0,37±0,02 | 0,22±0,03\* | -41 |
| аргінін, гістидин, таурин | 1,23±0,09 | 1,34±0,18 | +9 | 1,40±0,05 | 2,04±0,09\* | +46 |
| лізин, аспарагін | 2,76±0,11 | 2,48±0,21 | -10 | 2,92±0,13 | 3,51±0,15\* | +20 |
| гліцин, метіонін | 3,26±0,08 | 2,92±0,26 | -10 | 3,02±0,06 | 5,19±0,16\* | +72 |
| серин, аспарагінова к-та | 1,00±0,04 | 0,91±0,06 | -8 | 1,10±0,04 | 0,50±0,03\* | -54 |
| аланін, глутамін | 3,89±0,06 | 3,98±0,09 | +2 | 4,29±0,14 | 5,19±0,15\* | +21 |
| валін, триптофан | 0,61±0,02 | 0,55±0,05 | +10 | 0,60±0,03 | 0,36±0,04\* | -40 |
| тирозин, глутамінова к-та | 4,34±0,23 | 4,25±0,11 | -2 | 4,79±0,12 | 5,82±0,26\* | +22 |
| треонін, ізовалін | 2,01±0,06 | 2,27±0,06\* | +13 | 1,66±0,05 | 1,27±0,08\* | -23 |
| пролін, оксипролін | 0,94±0,02 | 0,68±0,03\* | -27 | 0,71±0,02 | 0,46±0,03\* | -35 |
| лейцин | 1,10±0,04 | 1,11±0,03 | +1 | 1,06±0,04 | 1,12±0,05 | +6 |
| фенілаланін | 0,61±0,02 | 0,51±0,03\* | -16 | 0,49±0,02 | 0,52±0,03 | +6 |
| ізолейцин | 0,13±0,01 | 0,09±0,03 | -31 | 0,12±0,02 | 0,13±0,02 | +8 |

Δ – різниця між показником дослідного варіанту відносно контролю;

\*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Показано, що на четверту добу концентрація цистеїну і цистину була вірогідно (р<0,05) нижчою на 41%; серину і аспарагінової кислоти − на 54%; валіну і триптофану − на 40%; ізоваліну і треоніну − на 23%; а проліну і оксипроліну − на 35% порівняно з контрольними даними. Збільшився вміст Arg+His+Taurine на 46%, Lys+Asn – на 20%, Ala+Gln − на 21%, Gly+Met − на 72%, Tyr+Glu – на 22% порівняно з контролем.

Знижений рівень амінокислот у культуральній рідині може свідчити про їх більш інтенсивне поглинання клітиною. Незамінні амінокислоти, на відміну від замінних, не синтезуються у людському організмі і повинні обов'язково надходити з їжею. До них відносять наступні амінокислоти: валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін, гістидин (для дітей), аргінін (для дітей та осіб похилого віку) [100]. У наших дослідах, зниження концентрації фенілаланіну, лейцину, валіну і триптофану у живильному середовищі клітинної лінії 4*BL* людини можна пояснити їх незамінністю.

Цистеїн входить до складу багатьох білків, тому він активно поглинається клітиною. До складу цистеїну входить тіольна група -SH, завдяки чому дві молекули (чи їх залишки у складі пептидів) цієї речовини можуть з'єднуватись дисульфідним зв'язком, що формується шляхом окиснення -SH груп, утворюючи сполуку цистин. Такі зв'язки важливі для формування і підтримання третинної структури білків. Відомо, що ендогенний H2S синтезується із L-цистеїну за допомогою цистатіонін-β-синтази, цистатіонін-γ-ліази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази [61].

У літературі ми не виявили даних щодо впливу донора сірководню на амінокислотний склад культуральної рідини стовбурових клітин в умовах зниженої концентрації кисню. Проте Аніскіна А.І. зі співавторами [4] дослідили вплив 20 амінокислот (0,05 нг/мл) на клітинну проліферацію і апоптоз в органотиповій культурі тканин (селезінка, печінка, нервова тканина) молодих (1-місячних) і старих (18-місячних) щурів. Виявлено стимуляцію зони росту при дії чотирьох амінокислот – лізину, аспарагіну, аргініну і глутамінової кислоти в культурі тканин селезінки і печінки. Інші амінокислоти інгібували, або не впливали на проліферацію клітин. Протилежні ефекти спостерігали в експлантатах кори головного мозку. Стимулюючу дію мали амінокислоти з високою гідрофобністю: аспарагінова кислота, тирозин, валін, треонін, метіонін, лейцин, а інгібуючу – гліцин, пролін, триптофан [4].

Будь-яка із замінних амінокислот може синтезуватися в організмі у необхідних кількостях. При цьому вуглецева частина амінокислоти утворюється з глюкози, а α-аміногрупа вводиться з інших амінокислот шляхом трансамінування [134]. Слід відмітити, що у всіх дослідних варіантах нашого експерименту у культуральній рідині зростала концентрація аргініну, гліцину, аланіну і глутаміну, які є замінними амінокислотами, а концентрація серину і аспарагінової кислоти, навпаки, знижувалася. Таку закономірність можна пояснити тим, що гліцин синтезується із серину під дією сериноксиметилтрансферази у присутності тетрагідрофолієвої кислоти. Серин утворюється з гліколітичного проміжного продукту 3-фосфогліцерату. Аланін, аспартат (попередник аспарагіну), глутамат (попередник глютаміну, аргініну) утворюються із пірувату, оксалоацетату й α-кетоглутарату − відповідно. Аргінін у клітині служить джерелом NO [139]. Під дією аргінази аргінін перетворюється на амінокислоту орнітин, яка не входить до складу білків організму. З орнітину синтезуються поліаміни: путресцин, спермідин і спермін. Вони мають великий позитивний заряд, легко зв'язуються з негативно зарядженими молекулами ДНК і РНК, входять до складу хроматину і беруть участь у реплікації ДНК, стимулюють процеси транскрипції і трансляції. Їх концентрація сильно зростає при інтенсивній проліферації тканин [139].

Отримані нами дані подібні до результатів досліджень Higuera G зі співавторами [146]. За допомогою високоафінної рідинної хроматографії вони дослідили закономірності метаболізму амінокислот у МСК кісткового мозку людини при статичному (на пластику, 8 діб) та динамічному (у біореакторі, 5 діб) культивуванні. Клітини секретували у культуральну рідину аланін, гліцин, глутамат та орнітин, а поглинали – глутамін, гістидин, серин, тирозин, аспартат і 8 незамінних амінокислот [146].

Отримані нами дані свідчать, що поєднаний вплив гіпоксії (3%, 5% О2) і сірководню знижує проліферацію соматичних клітин людини лінії 4*BL*. Зміни вмісту вільних амінокислот у культуральній рідині мали свої особливості. Зменшувалась концентрація вільних амінокислот, що беруть участь у синтезі колагену (пролін, оксипролін) та інших білків. Підвищувалася концентрація амінокислот (гліцину, аланіну, аргініну, глутаміну), які можуть включатися в енергетичний обмін.

Підсумовуючи результати досліджень сумісного впливу гідросульфіду натрію (10-12 моль/л) та 24-годинного зниженого парціального тиску кисню (23 і 38 мм рт. ст.), наведені у підрозділі 3.5, можна зробити наступні узагальнення:

1. У культуральній рідині всіх дослідних груп клітин лінії 4*BL* людини при сумісному впливі зниженої концентрації кисню (5%, 3% О2) та донора сірководню (10-12 моль/л NаHS) вірогідно (р<0,05) підвищувалася концентрація трьох фракцій амінокислот: Arg+His+Taurine, Gly+Met та Ala+Gln. Концентрація цистеїну і цистину, серину і аспарагінової кислоти, валіну і триптофану, проліну і оксипроліну знижувалася відносно контрольних значень.

2. Додавання NаHS (10-12 моль/л) у живильне середовище при 21% О2 гальмувало проліферацію соматичних клітин лінії 4*BL* людини в 1,4-1,7 раза та знижувало активність лужної фосфатази на 21-29%.

3. Донор сірководню, в умовах зниженої концентрації кисню (5%, 3% О2), пригнічував проліферацію клітинної лінії 4*BL* людини на 4-ту добу культивування на 33, 54% відповідно порівняно з контролем. За тих же умов гальмувалась остеогенна диференціація, одним із маркерних показників якої є активність лужної фосфатази, на 35, 46% відповідно щодо контрольних значень.

4. Понижений парціальний тиск кисню здатний посилювати гальмівний вплив H2S на проліферацію та інтенсивність метаболізму клітин лінії 4*BL* людини, тому культивування даної популяції при сумісній дії цих двох факторів не сприяє фізіологічному розмноженню клітин.

**РОЗДІЛ 4**

**ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ**

У лабораторії Фріденштейна О.Я. в 70-х рр. ХХ ст. вперше виділили з кісткового мозку щурів, мурчаків і людини, успішно культивували і описали фібробластоподібні клітини, що отримали в подальшому назву мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини [128-129]. Крім кісткового мозку, ММСК або ММСК-подібні клітини були виділені з безлічі інших тканин – скелетного м'яза [239], жирової тканини [255-256], пупкового канатика [124], синовіальної оболонки [112], периферичної крові [168], пульпи зуба [138], амніотичної рідини [204, 227], а також з ембріональних і фетальних тканин: крові, печінки, кісткового мозку і легень [91, 125, 193].

Відомо, що МСК здатні до самовідтворення, а також до диференціації в різні типи тканин мезенхімального та іншого походження, включаючи остеоцити, хондроцити, гепатоцити, адипоцити, нейрони, м’язові, епітеліальні клітини [154, 170, 200] в залежності від мікрооточення або факторів диференціювання. Показано, що МСК мають протизапальну та імуномодулювальну дію [34, 106, 191]. Завдяки своїм властивостям МСК нині знаходять усе більш широке використання в регенеративній медицині, трансплантології та тканинній інженерії [3, 120, 209].

Cучасні технології надають широкі можливості для контрольованої зміни параметрів культивування різних типів клітин. Однак найчастіше ці зміни стосуються хімічних компонентів живильного середовища (вмісту поживних речовин, факторів росту, солей і амінокислот). Газовий склад традиційно залишається найбільш консервативним параметром при культивуванні, при цьому рівень СО2 наближається до тканинного, тоді як вміст кисню в звичайних СО2-інкубаторах відповідає Ро2 в атмосферному повітрі (близько 159 мм рт. ст., що еквівалентно 21%). Питання про те, яка концентрація О2 є фізіологічною для клітин *in vitro*, активно обговорюється в науковій літературі [12, 45, 49, 189]. У зв'язку з цим робляться спроби вивчення стану культивованих клітин при різному вмісті кисню. Однак немає єдиної думки про те, яку концентрацію кисню треба використовувати, який час клітини повинні піддаватися впливу зміненого вмісту кисню, як при цьому слід враховувати такі фактори, як склад середовища, щільність субкультивування клітин та ін. В організмі концентрація О2 значно нижча, ніж в атмосферному повітрі, а саме: в альвеолах – 15%, у венозній крові – 5%, у кістковому мозку концентрація О2 варіює від 1 до 7% [111]. Культивування фібробластоподібних клітин лінії 4*BL* людини в умовах зниженого Ро2 23, 38 і 76 мм рт. ст., що еквівалентно 3, 5 і 10% О2, обрана нами як модель, що відповідає фізіологічному середньотканинному рівню кисню.

Культивування клітин лінії 4*BL*, що мають властивості ММСК, при зниженій концентрації кисню (3%) протягом 24-х годин призводило до 2-кратного зменшення кількості клітин відносно контролю на третю добу, проте морфологічних ознак дегенерації цих клітин не виявлено (див. рис. 3.2.1.1 і 3.2.1.2). З літературних даних відомо, що низьке напруження О2 8-23 мм рт. ст. (1 і 3%) може стабілізувати частку МСК людини у стані спокою [176]. Цим можна пояснити зниження проліферації і диференціації МСК при зазначених концентраціях кисню.

Штучні газові суміші зі зниженим Ро2 38 і 76 мм рт. ст, що подавалися у І режимі (24 год безперервно) – не впливали на інтенсивність проліферації досліджуваних клітин, проте спостерігалась тенденція до зростання. ІІ режим подачі газової суміші (8 год/добу, 3 доби) зі зниженим Ро2 38 і 76 мм рт. ст – вірогідно підвищував проліферацію соматичних клітин людини лінії 4*BL* на 27 і 45% відповідно порівняно з контролем на 4-ту добу культивування.

Аналіз ступеня взаємозв`язків між проліферацією клітин лінії 4*BL* людини і рівнем Ро2 І-го режиму, при якому росли клітини, виявив високу позитивну кореляцію (r=0,87) на 3-тю добу і середню позитивну (r=0,69) на 4-ту добу культивування (рис. 4.1).

24 год безперервно (І)

N•103, клітин/мл

Ро2, мм рт. ст.

8 год/добу × 3 доби = 24 год (ІІ)

N•103, клітин/мл

Ро2, мм рт. ст.

Рис. 4.1. Кореляційні зв’язки між активністю проліферації клітин лінії 4*BL* людини та зниженням Ро2 у безперервному (І) та переривчастому (ІІ) режимах. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Слід зазначити, що Ро2 159 мм рт. ст. є контрольним значенням, що відповідає рівню кисню у атмосфері. Показано негативний середній кореляційний зв`язок (r=-0,60) між кількістю клітин та ІІ режимом подачі газової суміші з різним рівнем Ро2 на 4-ту добу і середній позитивний (r=0,5) – на 3-тю добу культивування (див. рис. 4.1).

Виявлено високий ступінь позитивної кореляції (r=0,95) між активністю ЛФ та впливом Ро2 ІІ режиму на четверту добу культивування. Високий позитивний кореляційний зв’язок (r=0,85) був між дослідженими показниками при І режимі подачі газової суміші на 4-ту добу (рис. 4.2).

А, МО/л

А, МО/л

24 год безперервно (І)

Ро2, мм рт. ст.

А, МО/л

8 год/добу × 3 доби = 24 год (ІІ)

Ро2, мм рт. ст.

Рис. 4.2. Кореляційні зв’язки між активністю лужної фосфатази у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини та зниженням Ро2 у безперервному (І) та переривчастому (ІІ) режимах

Остеогенна диференціація клітин лінії 4*BL* людини, одним із маркерних показників якої є активність ЛФ, у разі зниженого Ро2 38 і 76 мм рт. ст. ІІ режиму, відбувалася на 25% повільніше, ніж в умовах атмосферного кисню (159 мм рт. ст.) на 4-ту добу культивування.

Активність ЛФ зростала із збільшенням концентрації кисню незалежно від режиму культивування. Отримані нами дані дозволяють зробити висновок про гальмування інтенсивності метаболізму і початку остеогенної диференціації МСК клітин лінії 4*BL* людини при знижені рівня Ро2.

Одним із можливих пояснень активації проліферації клітин при пониженій концентрації кисню може вважатися зниження окисного пошкодження клітин. Відомо, що підвищення концентрації кисню (гіпероксія) призводить до розвитку оксидативного стресу, збільшенню кількості розривів у ДНК, в тому числі і особливо в теломерній ДНК [231].

При прямому вимірюванні продукції активних форм кисню (АФК) в клітинах показано, що при зниженні концентрації кисню в клітинах збільшується продукція супероксид-аніону і перекису водню [84, 89]. Показано, що одним із наслідків гіпоксії-реоксигенації міокарду є зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу клітин завдяки посиленому утворенню і накопиченню АФК, що призводило до ремоделювання структурних компонентів та геному клітин, змін у метаболічних та регуляторних процесах [97]. Відомо, що за умов гіпоксії головним внутрішньоклітинним джерелом генерації активних кисневих радикалів є дихальний ланцюг мітохондрій [220]. Мітохондрії відіграють особливо важливу інтегративну роль у біоенергетичних процесах, сигнальних, регуляторних та проліферативних шляхах клітин, їх відповідях на метаболічні зміни ті фізіологічні стреси, кисневій та субстратній чутливості, міжорганельних взаємодіях, апоптотичних процесах у міокарді, кардіопротекції тощо [220, 222].

Одним із важливих факторів життєдіяльності є окислювально-відновний потенціал (редокс-потенціал) середовища культивування. Цей потенціал відображає доступність (недоступність) електронів в середовищі для різноманітних, в тому числі повністю оборотних окислювально-відновних реакцій. Особливий інтерес представляють реакції за участю цистеїну і метіоніну. Окиснення-відновлення цистеїну в більшості випадків проявляється як утворення-руйнування дисульфідних зв'язків. Цистеїнові залишки входять до складу активних центрів багатьох ферментів, вони забезпечуют зв'язування різних білкових субодиниць один з одним. В загальному вигляді утворення-руйнування дисульфідних зв'язків змінює конформацію білків, що неминуче веде до змін їх функцій [156]. Для проходження певних клітинних процесів, таких як проліферація, диференціювання, апоптоз, потрібні певні окислювально-відновні умови [155]. Оскільки кисень є окислювачем, то зниження його рівня, безумовно, повинно зрушувати редокс-потенціал середовища в бік відновлення. Пряме вимірювання показало, що при 3% О2 у розчині редокс-потенціал середовища знижується приблизно на 20мВ [14]. Автори хімічно (за допомогою відновника) знизили редокс-потенціал середовища культивування і вивчили, як це впливає на колонієутворення. В результаті проведених експериментів показано, що колонієутворення при додаванні 30 мкг/мл дитіотреілолу посилилося навіть більшою мірою, ніж при дії зниженої концентрації кисню. Підбір редокс-потенціалу середовища особливо важливий саме при клонуванні клітин. Клітини здатні ефективно регулювати редокс-потенціал середовища, поглинаючи і секретуючи цистеїн або цистин [135]. Це може бути одним із пояснень змін амінокислотного складу культуральної рідини клітин лінії 4*BL* людини, а саме фракції цистеїну і цистину в наших дослідженнях (див. 3.2.3, 3.3.3, 3.4.3 і 3.5.3).

Результати наших експериментів показали, що донор сірководню NaHS у досліджуваних концентраціях пригнічував проліферативну активність клітин лінії 4*BL* людини. Виявлено високий ступінь кореляції (r=0,96) між проліферацією і різною концентрацією NaHS. Таким чином, зниження вмісту екзогенного донора сірководню від 10-8 до 10-15 моль/л NaHS корелювало із зростанням кількості клітин. Максимальне збільшення чисельності клітин на 3-тю добу культивування було у контролі, вільного від додавання NaHS у живильне середовище (рис. 4.3).

N•103, клітин/мл

СNaHS, моль/л

Рис. 4.3. Лінійна кореляція між проліферацією клітин лінії 4*BL* людини та концентрацією донора сірководню NaHS на третю добу культивування. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Високий негативний кореляційний зв’язок (r=-0,84) був між активністю лужної фосфатази у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини та різною концентрацією донора сірководню NaHS (рис. 4.4). Важливо зазначити дозозалежне зниження активності ЛФ. Таким чином, додавання NaHS у зростаючих концентраціях (від 10-15 до 10-8 моль/л) викликало гальмування остеогенної диференціації, одним із маркерних показників якої є зниження активності ЛФ [50].

А, МО/л

СNaHS, моль/л

Рис. 4.4. Кореляційні зв’язки між активністю лужної фосфатази у культуральній рідині та різною концентрацією донора сірководню NaHS на третю добу культивування

Проведені нами експерименти показали, що додавання 10-12 моль/л NаHS у живильне середовище при 21, 5, 3% О2 знижувало проліферацію як 3-добової так і 4-добової культури мезенхімальних стромальних клітин лінії 4*BL* людини. Понижений парціальний тиск кисню здатний посилювати гальмівний вплив H2S на проліферативну активність, про що свідчить високий кореляційний зв’язок (r=0,96) на 3-тю і (r=0,97) на 4-ту добу культивування (рис. 4.5, а).

Найвища активність ЛФ була у контрольній группі, що культивувалась у стандартних умовах СО2-інкубатора. При сумісній дії двох факторів відмічено спадання активності ЛФ, що корелювало зі зниженням концентрації О2 при додаванні 10-12 моль/л NаHS (рис. 4.5, б).

N•103, клітин/мл

а

А, МО/л

б

Рис. 4.5. Кореляційні зв’язки між проліферацією (а) і активності лужної фосфатази (б) у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини та параметрами сумісного впливу донора сірководню 10-12 моль/л NaHS і концентрацією 3, 5, 21% О2. \*р<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

Показано високу кореляцію (r=0,97) 3-добової і (r=0,99) 4-добової культури клітин лінії 4*BL* людини між активністю лужної фосфатази та параметрами сумісного впливу донора сірководню 10-12 моль/л NaHS і концентрацією 3, 5, 21% О2.

Механізми дії H2S мало вивчені і включають, за різними даними, систему аденілатциклази, АТФ-залежні К-канали та потенціал-залежні Са-канали L-типу в залежності від виду тварини [65, 157, 247]. Крім того, сірководень здійснює посттрансляційні модифікації білків, регулює експресію генів, які кодують сигнальні білки та транскрипційні фактори, а також бере участь у метаболічних реакціях, впливаючи на функціональний стан мітохондрій [65, 217, 188]. Екзогенним джерелом H2S в організмі тварин і людини є ентеробактеріальна флора, яка має спеціальну систему ензимів, що здійснює метаболізм сульфіду (S2-) в тіосульфат (S2O32-) і сульфат (SO42-). Метою цього процесу є захист мікрофлори кишечника від високих концентрацій сульфіду і запобігання потраплянню великої їх кількості в організм [177].

Під час ембріонального розвитку і регенерації тканин ключову роль у процесах проліферації і диференціювання різних типів стовбурових клітин і клітин-попередників грає не тільки молекулярна, але і біофізична сигналізація, тобто біоелектричні сигнали, які генеруються за участю іонних каналів, наявних в клітинній мембрані [17]. Одним із напрямків у вивченні біоелектричних сигнальних систем є контроль поведінки стовбурових клітин. Дослідження показують, що стовбурові клітини в недиференційованому стані демонструють унікальний профіль електро-фізіологічних характеристик мембрани [90, 145]. При диференціюванні і злитті міобластів потенціал їх мембрани змінюється від -10 до -70 mV (мембрана стає більш негативно зарядженою, або гіперполяризується) [17]. Sundelacruz S. із співавторами [223] охарактеризували зміни мембранного потенціалу (Vmem) мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) кісткового мозку людини при їх диференціюванні в адипогенному і остеогенному напрямках, а також вивчили функціональний взаємозв'язок змін мембранного потенціалу і здатності клітин до диференціювання. З'ясувалося, що при диференціюванні ММСК їх мембранний потенціал знижується і відбувається гіперполяризація мембрани. Штучно викликана деполяризація клітинної мембрани за допомогою іонів К+ (концентрація в середовищі культивування була від 20 до 80 мМ) інгібувала адипогенну і остеогенну диференціацію ММСК. При цьому інгібування диференціювання було оборотним. ММСК, що диференціювалися в остеогенному напрямку, піддали дії речовин, що активують калієві АТФ-залежні канали: пінациділа і діазоксида. Ці речовини призводять до гіперполяризації мембран клітин. Через 7 діб після впливу гіперполяризуючих агентів була оцінена експресія маркерних генів остеогенної диференціації. Виявилося, що експресія цих генів підвищується: пінациділ різко підвищував експресію кісткового сіалопротеіна (приблизно в 2 рази) і практично не впливав на експресію гена лужної фосфатази. Діазоксид підвищував експресію обох генів в 2-4 рази. Ефект обох гіперполяризуючий агентів був дозозалежним – із збільшенням концентрацій агентів підвищувалася і експресія маркерних генів, досягаючи свого максимуму при Vmem = 10 mV [17, 223].

Таким чином, мембранний потенціал грає важливу роль при диференціюванні МСК. Можливо H2S робить свій внесок у цей процес, оскільки здатен інгібувати та активувати іонні канали мембрани.

На процеси життєдіяльності клітин лінії 4*BL* людини у наших експериментах впливав як знижений парціальний тиск кисню, так і сірководень. Основою життєдіяльності клітин є метаболізм, тобто обмін речовин. Тому було цікаво дослідити зміни концентрацій вільних амінокислот у культуральній рідині. Визначити, які АК поглинаються, а які виділяються у живильне середовище. За рахунок процесів обміну речовин можна пояснити зміни концентрації амінокислот у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини з часом культивування. Спостерігали тенденцію, а іноді і вірогідне зниження усіх незамінних, та деяких фракцій замінних АК.

ММСК синтезують компоненти міжклітинної речовини (проколаген, ламінін, фібронектин, протеоглікани тощо), а також деякі фактори росту [21]. Попередник колагену – проколаген за допомогою секреторних гранул виводиться в міжклітинний простір. Тут молекули проколагену перетворюються в молекули тропоколагену, з яких складаються колагенові фібрили. Головною функцією колагенового волокна є формування й підтримка структури органів і тканин, для яких воно є каркасом. Особливе значення колаген (так само, як інший білок – еластин) має для підтримки пружності шкіри. Молекула колагену являє собою правозакручену спіраль з трьох α-ланцюгів. Для первинної структури білка характерний високий вміст гліцину (33,50%), проліну (11,82%), аланіну (10,93%), оксипроліну (9,21%) і аспарагінової кислоти (4,90%), а також низький вміст сірковмісних амінокислот і відсутність триптофану [60].

Необхідно підкреслити, що білковий обмін тісно інтегрований з обміном вуглеводів, ліпідів і нуклеїнових кислот через амінокислоти або α-кетокислоти (α-кетоглутарат, оксалоацетат і піруват). Так, аспарагінова кислота або аланін шляхом трансамінування оборотно перетворюються відповідно в оксалоацетат і піруват, які безпосередньо включаються до вуглеводного обміну.

Особливо дефіцитними для життєдіяльності клітин є лізин, метіонін і триптофан (незамінні амінокислоти). Зокрема, метіонін бере участь в обміні жирів, фосфатидів, ціанокобаламіну (вітаміну В12) та фолієвої кислоти [25].

Підсумовуючи усе вищесказане, можна дійти висновку, що використання штучних газових сумішей зі зниженим Ро2 38 і 76 мм рт. ст. переривчастого режиму (8 год/добу, 3 дні) вірогідно підвищує проліферативну активність клітин клітин лінії 4*BL* людини. Донор сірководню NaHS (10-8-10-15 моль/л) пригнічує проліферативну активність. Остеогенна диференціація МСК, одним із маркерних показників якої є активність ЛФ, у разі зниженого парціального тиску кисню (23, 38 і 76 мм рт. ст.) і додаванні NaHS у живильне середовище відбувалася повільніше, ніж в контрольній групі при стандартних умовах СО2-інкубатора. Понижений парціальний тиск кисню здатний посилювати гальмівний вплив H2S на проліферацію та інтенсивність метаболізму соматичних клітин лінії людини 4*BL*, тому культивування клітин при сумісній дії цих двох факторів не сприяє фізіологічному розмноженні клітин. При інкубації клітин лінії 4*BL* у газовому середовищі з 76 мм рт. ст. кисню на четверту добу культивування спостерігали статистично вірогідне зниження концентрації проліну і оксипроліну (на 21%), а також аланіну і глутаміну (на 12%) в культуральній рідині. Максимальну інтенсивність споживання амінокислот, необхідних для синтезу колагену спостерігали при концентрації кисню у газовій фазі культурального середовища 5% (38 мм рт. ст.). У культуральній рідині всіх дослідних груп клітин лінії 4*BL* людини під сумісним впливом зниженої концентрації кисню (5%, 3% О2) та донора сірководню (10-12 моль/л NаHS) вірогідно (р<0,05) підвищувалася концентрація трьох фракцій амінокислот: аргініну, гістидину і таурину; гліцину і метіоніну, а також аланіну і глутаміну. Концентрація цистеїну і цистину, серину і аспарагінової кислоти, валіну і триптофану, проліну і оксипроліну знизилася відносно контрольних значень. Це може свідчити про їхнє включення в процеси метаболізму клітин.

**ВИСНОВКИ**

У дисертаційній роботі наведено результати власних досліджень щодо впливу зниженого парціального тиску кисню та донора сірководню, як окремо так і сумісно, на проліферацію соматичних клітин людини лінії 4*BL*.

1. Зниження парціального тиску кисню у середовищі інкубації до 38 і 76 мм рт. ст. у переривчастому режимі (по 8 год/добу, 3 доби) вірогідно збільшує (на 27 і 45%) кількість клітин лінії 4*BL* людини без змін типових морфологічних ознак, тобто стимулює їх проліферацію.
2. Інкубація клітин людини лінії 4*BL* за умов більш різкого зниження парціального тиску кисню до 23 мм рт. ст. у безперервному режимі (24 год) гальмує їх проліферацію*.*
3. Активність лужної фосфатази у культуральній рідині при Ро2 38 мм рт. ст. була нижчою (незалежно від режиму подачі газової суміші), ніж в умовах атмосферного повітря (159 мм рт. ст.), що може бути наслідком гальмування процесів дефосфорилювання за цих умов.
4. В умовах як безперервного, так і переривчастого режиму подачі газової суміші зі зниженим Ро2 концентрація проліну і оксипроліну у культуральній рідині зменшувалась, що може свідчити про включення цих амінокислот у первинну структуру колагену.
5. Як самостійна, так і сумісна дія донора сірководню та нестачі кисню пригнічує проліферацію клітин та знижує активність лужної фосфатази. Це може свідчити про інгібування даного ферменту і гальмування інтенсивності метаболізму клітин лінії 4*BL* людини. Коефіцієнт кореляції між кількістю клітин та концентрацією донора сірководню (10-8 – 10-15 моль/л NaHS) становив -0,96.
6. Після сумісного впливу донора сірководню NaHS (10-12 моль/л) та 24-годинного зниженого Ро2 23, або 38 мм рт. ст. у культуральній рідині клітин лінії 4*BL* людини вірогідно зменшувалась концентрація цистеїну і цистину, серину і аспарагінової кислоти, валіну і триптофану, проліну і оксипроліну. Це може бути наслідком включення цих амінокислот у процеси метаболізму.
7. Порівняння результатів дії двох різних режимів зниження Ро2 свідчить про більш інтенсивну стимуляцію проліферації за умов переривчастої дії нормобаричної гіпоксії 76 мм рт. ст.

**CПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Абатуров А.Е. Активированные кислородсодержащие метаболиты – компонент системы неспецифической защиты респираторного тракта / А.Е. Абатуров // Здоровье ребёнка. – 2009. – Т. 2, №17. – С. 120-125.
2. Абрамочкин Д.В. Влияние сероводорода на электрическую активность предсердного миокарда крысы / Д.В. Абрамочкин, Л.С. Моисеенко, В.С. Кузьмин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 6. – С. 617-620.
3. Андреева Е.Р. Репаративный остеогенез при трансплантации мультипотентных стромальных клеток костного мозга, культивируемых при различном содержании кислорода / Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова, В.И. Логинов, М.П. Валюшкина // Морфология. – 2011. – №1. – С. 81-85.
4. Анискина А.И. Влияние аминокислот на клеточную пролиферацию и апоптоз в органотипической культуре тканей молодых и старых крыс / А.И. Анискина, Н.И. Чалисова, А.Н. Закуцкий, А.В. Комашня, С.В. Филиппов, П.Н. Зезюлин // Успехи геронтологии. – 2006. – Т. 19. – С. 55-59.
5. Астахова В.С. Клонування стромальних клітин-попередників кісткового мозку людини за умов зниженого парціального тиску кисню / В.С. Астахова, В.Я. Березовський, Л.М. Панченко, І.А. Хасабова // Фізіол. журн. – 2001. – Т. 47, №1. – С. 40-44.
6. Баскаков М.Б. Влияние сероводорода на сократительную активность гладкомышечных клеток аорты крысы / М.Б. Баскаков, С.В. Гусакова, А.С. Жолудева, Л.В. Смаглий, И.В. Ковалёв, Т.А. Вторушина, Д.С. Носов, К.В. Ерёменко, М.А. Медведев, С.Н. Орлов // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №6. – С. 12-17.
7. Березовский В.А. Природная и инструментальная оротерапия / В.А. Березовский. – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2012. – 304 с.
8. Березовский В.А. Физиологические предпосылки и механизмы нормализующего действия нормобарической гипоксии и оротерапии / В.А. Березовский, М.И. Левашов // Физиол. журн. – 1992. – Т. 38, №5. – С. 3-12.
9. Березовський В.Я. Вплив зниженого РО2 на модуляцію остеодистрофії у щурів за різних статокінетичних умов / В.Я. Березовський, І.Г. Літовка, О.Г. Чака, П.В. Лахін // Фізіол. журн. – 2001. – Т. 47, №1 (частина 2). – С. 50-54.
10. Бозо И.Я. «Фибробласт» – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? / И.Я. Бозо, Р.В. Деев, Г.П. Пинаев // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 99-109.
11. Буравкова Л.Б. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека / Л.Б. Буравкова, Е.Р. Андреева, А.И. Григорьев // Физиология человека. – 2012. – Т. 38, №4. – С. 121-130.
12. Буравкова Л.Б. Репаративный остеогенез при трансплантации мультипотентных стромальных клеток костного мозга, культивируемых при различном содержании кислорода / Л.Б. Буравкова, М.П. Валюшкина, Е.Р. Андреева, В.И. Логинов // Морфология. – 2011. – Т. 139, № 1. – С. 81-85.
13. Буравкова Л.Б. Характеристика мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода / Л.Б. Буравкова, О.С. Гринаковская, Е.Р. Андреева, А.П. Жамбалова, М.П. Козионова // Цитология. – 2009. – Т. 51, №1. – С. 5-11.
14. Бурнаевский Н.С. Влияние парциального давления кислорода на эффективность колониеобразования и дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток человека, полученных из различных источников / Н.С. Бурнаевский, Х.С. Вишнякова, А.В. Сафенина, Д.В. Рыбалко, К.В. Попов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №4. – С. 24-30.
15. Валюшкина М.П. Влияние содержания О2 в среде на мультипотентные мезенхимальные клетки-предшественники костного мозга разновозрастных крыс / М.П. Валюшкина, Л.Б. Буравкова // Медицинский академический журнал. – 2012. – №3. – С. 57-59.
16. Вараксин А.А. Сероводород как регулятор системных функций у позвоночных / А.А. Вараксин, Е.В. Пущина // Нейрофизиология. – 2011. – Т. 43, № 1. – С. 73-84.
17. Григорян А.С. Мембранный потенциал играет важную роль в дифференцировке ММСК / А.С. Григорян // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 4, №1. – С. 24-27.
18. Гринаковская О.С. Пониженное содержание О2 замедляет коммитирование культивируемых мезенхимальных стромальных клеток-предшественников из жировой ткани в ответ на остеогенные стимулы / О.С. Гринаковская, Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова, Ю.В. Рылова, Г.Ю. Косовский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – № 6. – С. 704-707.
19. Досон P. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
20. Егоров Е.Е. Действие кислорода на культуры фибробластов человека / Е.Е. Егоров, М.В. Молдавер, Х.С. Вишнякова, С.М. Терехов, A.B. Зеленин // Биологические мембраны. – 2005. – Т. 22. – С. 43-51.
21. Жамбалова А.П. Влияние пониженного содержания кислорода на дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека *in vitro* / А.П. Жамбалова, Ю.Г. Гершович, Л.Б. Буравкова, C.B. Гальчук, Ю.А. Романов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. –Т. 4, №3. – С. 47-51.
22. Зорина А.И. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи / А.И. Зорина, В.Л. Зорин, В.Р. Черкасов // Эстетическая медицина. – 2012. – Т. 11, №1. – С. 15-31.
23. Зуева Н.Н. Свойства, получение и практическое применение щелочной фосфатазы / Н.Н. Зуева, П.Г. Далев, Д.Л. Лазарова // Биохимия. – 1993. – Т. 58, №7. – С. 1009-1022.
24. Казначеева А.И. Содержание свободных аминокислот у практически здоровых лиц в плазме крови, эритроцитах и моче / А.И. Казначеева, Н.З. Злыднев // Лаб. дело. – 1976. – №8. – С. 479-480.
25. Караев А.Л. Аминокислоты – основа жизни / А.Л. Караев // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. – 2008. – Т. 11, №3. – С. 37-39 .
26. Киселева Е.В. Сравнение дифференцировочных потенций фибробластоподобных клеток стромы костного мозга, жировой ткани, волосяного сосочка и фибробластов дермы человека / Е.В. Киселева, Э.С. Чермных, Е.А. Воротеляк, А.И. Воложин, А.В. Васильев, В.В. Терских // Цитология. – 2009. – Т. 51, №1. – С. 12-19.
27. Коваленко В.М. Дослідження впливу хондроїтину сульфату, глюкозаміну гідрохлориду та їх комбінації на культуру стовбурових стромальних клітин кісткового мозку людини / В.М. Коваленко, І.В. Лисенко, Л.М. Панченко // Український ревматологічний журнал. – 2007. – Т. 28, №2. – С. 51-55.
28. Коржов В.И. Монооксид углерода / В.И. Коржов, А.В. Видмаченко, М.В. Коржов // Журн. АМН Украины. – 2010. – Т. 16, №1. – С. 23-37.
29. Коробейникова Э.М. Определение содержания свободных аминокислот в сыворотке крови и моче здоровых детей / Э.М. Коробейникова, Г.В. Мещерякова // Лаб. дело. – 1981. – №4. – С. 221-224.
30. Кругляков П.В. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма / П.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Д.Г. Полынцев // Цитология – 2008. – Т. 50, №7. – С. 557-567.
31. Кушнірук В.О. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4*BL*6 при тривалому культивуванні *in vitro* / В.О. Кушнірук, Т.П. Кочубей, Л.Л. Мацевич, Т.П. Рубан, Л.Л. Лукаш // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2012. – Т. 3. – С. 313-318.
32. Кушнірук В.О. Морфологічні та ростові особливості нової лінії клітин людини 4BL / В.О. Кушнірук, Т.П. Рубан, Л.Л. Лукаш // Фактори експериментальної еволюції організмів . – 2013. – Т. 13. – С. 315-319.
33. Литовка И.Г. Органический матрикс в адаптации и ремоделировании костной ткани / И.Г. Литовка, В.А. Березовский. – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2014. – 256 с.
34. Лісяний М.І. Мезенхімальні стовбурові клітини та їх імунні властивості / М.І. Лісяний // Фізіологічний журнал. – 2013. – Т. 59, №3. – С. 126-134.
35. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження / І.Г. Літовка. – К.: ДП «Інформаційно-аналітичне агенство», 2011. – 243 с.
36. Літовка І.Г. Ремоделювання кісткової тканини у низько- і високоактивних щурів в умовах 45-добової гіпокінезії та впливу дозованої кисневої депривації / І.Г. Літовка // Косм. наука і технологія. – 2003. – Т. 9, №1. – С. 92-95.
37. Літовка І.Г. Ремоделювання кісткової тканини щурів при гіпокінезії різної тривалості / І.Г. Літовка // Укр. мед. альманах. – 2003а. – Т. 6, №2. – С. 171-174.
38. Літовка І.Г. Киснева депривація як ініціатор остеогенезу при гіпокінезії / І.Г. Літовка, О.П. Березовська // Фізіол. журн. – 2003. – Т. 49, №2. – С. 58-65.
39. Лукаш Л.Л. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека in vitro / Л.Л. Лукаш, А.П. Яцишина, В.О. Кушнирук, О.В. Пидпала // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т. 11. – С. 493-498.
40. Лукьянова Л.Д. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Г.В. Сукоян // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, №4. – С. 238-252.
41. Маньковська І.М. Мітохондрії як мішень інтервальної гіпоксії / І.М. Маньковська, Т.В. Серебровська // Фізіол. журн. – 2014. – Т. 60. №6. – С. 75-87.
42. Медик В.А. Статистика в медицине и биологии / В.А. Медик, М.С. Токмачев, Б.Б. Фишман. – М.: Медицина, 2000. – 412 с.
43. Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний / А.В. Мисюрин // Онкогематология. – 2009. – Т. 2, №3. – С. 211-219.
44. Мишуніна Т.М. Механізми, переваги та наслідки активації гліколізу у пухлинних клітинах / Т.М. Мишуніна // Журн. АМН України. – 2009. – Т. 15, №3. – С. 417-447.
45. Молдавер М.В. Влияние кислорода на теломеризованные клетки разного типа, полученные от одного донора / М.В. Молдавер, Э.Б. Дашинимаев, Х.С. Вишнякова, П.М. Чумаков, Е.Е, Егоров // Биол. мембраны. – 2007. –Т. 24. – С. 388-398
46. Мясоедова О.А. Роль сероводорода в реализации физиологических функций организма / О.А. Мясоедова, В.И. Коржов // Журн. НАМН Украины. – 2011. – Т. 17, №3. – С. 191-199.
47. Новицкий В.В. Регуляция апоптоза клеток с использованием газовых трансмиттеров (оксида азота, монооксид углерода и сульфид водорода) / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева // Вестник науки Сибири. – 2011. – Т. 1, №1. – С. 635-640.
48. Обухов Д.К. Газообразные медиаторы в ЦНС позвоночных животных / Д.К. Обухов, Е.В. Пущина, А.А. Вараксин // Материалы конференций «Успехи современного естествознания». – 2011. – №12. – С. 49-51.
49. Панюхин Н.В. Влияние парциального давления кислорода на выживаемость, пролиферацию и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга мыши / Н.В. Панюхин, Х.С. Вишнякова, Е.Е. Егоров // Биологические мембраны. – 2008. – Т. 25, №5. – С. 352-359.
50. Поляченко Ю.В. Направлена диференціація стовбурових клітин, що виділені з жирової тканини / Ю.В. Поляченко, Е.М. Запольська, Р.В. Салютін // Буковинський медичний вісник. – 2013. – Т. 17, №1. – С. 90-92
51. Пулин А.А. Поверхностные маркеры, характеризующие мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека / А.А. Пулин, И.Н. Сабурина, В.С. Репин // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, №3. – С. 25-30.
52. Расулов М.Ф. Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и эмбриональных фибробластов в лечении ожоговых ран / М.Ф. Расулов // Pacific Medical Journal. – 2004. – №4. – С. 7-9.
53. Резник Н.Л. Третий газ: сульфид водорода как нейротрансмиттер / Н.Л. Резник // Химия и жизнь. – 2009. – T. 10. – C. 24-29.
54. Рылова Ю.В. Пролиферация и метаболический статус мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани при различном содержании кислорода в среде культивирования / Ю.В. Рылова, Е.Р. Андреева, Л.Б. Буравкова // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2010. – Т. 44, №5. – С. 38-41.
55. Рылова Ю.В. Постоянное культивирование мультипотентых мезенхимных стромальных клеток при пониженном содержании кислорода / Ю.В. Рылова, Л.Б. Буравкова // Цитология. – 2013. – №12. – С. 852-859.
56. Сагач В.Ф. Вплив стимуляції та блокади синтезу ендогенного сірководню на функцію серця в умовах ішемії-реперфузії / В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська // Фізіол. журн. –2013. – Т. 59, №4. – С. 8-15.
57. Сагач В.Ф. Фактор, який вивільнюється під час реперфузії ішемізованого серця, може бути маркером відкриття мітохондріальної пори / В.Ф. Сагач, Т.В. Шиманська, С.М. Надточій // Фізіол. журн. – 2003. – Т. 49, №4. – С. 6-12.
58. Сазонтова Т.Г. Роль активных форм кислорода и редокс-сигнализации при адаптации к изменению содержания кислорода / Т.Г. Сазонтова, Н.А. Анчишкина, А.Г. Жукова, И.В. Бедарева, Е.А. Пылаева, Н.А. Кривенцова, А.А. Полянская, А.Р. Юрасов, Ю.В. Архипенко // Фізіол. журн. – 2008. – Т. 54, №2. – С. 18-32.
59. Самойлов В.И. Механизмы социального поведения тканевых клеток позвоночных: культуральные модели / В.И. Самойлов, Ю.М. Васильев // Журнал общей биологии. – 2009. – Т. 70, № 3. – С. 239-244.
60. Северин Е.С. Биохимия: Учеб. для вузов / Е.С. Северин. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 779 с.
61. Семенихіна О.М. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів / О.М. Семенихіна, Н.А. Струтинська, А.Ю. Будько, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2013. – Т. 59, №2. – С. 9-17.
62. Ситдикова Г.Ф. Сероводород: от канализации Парижа к сигнальной молекуле / Г.Ф. Ситдикова, А.Л. Зефиров // Природа. – 2010. – №9. – С. 29-37.
63. Старикова Е.Г. Роль внутриклеточных газовых трансмиттеров сульфида водорода и оксида азота в регуляции апоптоза нормальных и бласттрансформированных клеток / Е.Г. Старикова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Л.А. Таширева, Ю.В. Стариков, Е.А. Степовая, И.А. Осихов, О.А. Васильева, В.Д. Якушина // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 6. – С. 40-45.
64. Степовая Е.А. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов / Е.А. Степовая, Т.В. Жаворонок, Ю.В. Стариков, В.А. Бычков, Н.Ю. Часовских, Е.Г. Старикова, Г.В. Петина, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 12. – С. 646-650.
65. Струтинська Н.А. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів / Н.А. Струтинська, О.М. Семенихіна, С.В. Чорна, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2011. – Т. 57, №6. – С. 3-14.
66. Струтинська Н.А. Сірководень пригнічує кальційіндуковане відкривання мітохондріальної пори у серці щурів зі спонтанною гіпертензією / Н.А. Струтинська, Н.О. Дорофеєва, Г.Л. Вавілова, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2013. – Т. 59, №1. – С. 3-10.
67. Суздальцева Ю.Г. «Сравнение способности к дифференцировке мезенхимальных клеток человека, выделенных из разных источников, в ткани мезодермального происхождения» / Ю.Г. Суздальцева, В.В. Бурунова, И.В. Вахрушев, В.Н. Ярыгин, К.Н. Ярыгин // Клеточн. технологии биологии и мед. – 2007. – №1. – С. 3-10.
68. Сукманський А.І. Газотрансмітери – новий вид біорегуляторів / О.І. Сукманський, І.О. Сукманський // Журнал НАМН України. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 153-159.
69. Тимчук Л. Стовбурові клітини. Їх диференціація та принципи взаємодії / Л. Тимчук // Біологія. – 2013. – Т. 715, №7. – С. 10-16.
70. Топчий М.К. Руководство к практическим занятиям по вирусологии / М.К. Топчий, Н.П. Корнюшенко. – К.: Изд-во Киев. ун-та, 1967. – 93 с.
71. Фриденштейн А.Я. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники / А.Я. Фриденштейн, К.С. Лалыкина. – М.: Медицина, 1973. – 223 с.
72. Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворного микроокружения / А.Я. Фриденштейн, Е.А. Лурия. – М.: Медицина, 1980. – 214 с.
73. Шиманська Т.В. Вплив сірководню на реакції ізольованого серця щурів при навантаженні об’ємом і ішемії-реперфузії / Т.В. Шиманська, Ю.В. Гошовська, О.М. Семенихіна, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2012. – Т. 58, №6. – С. 57-66.
74. Шипунова И.Н. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) / И.Н. Шипунова, А.Е. Бигильдеев, О.А. Жиронкина, Н.В. Сац, Н.И. Дризе // Стволовые клетки и регенеративная медицина. IV Всероссийская научная школа-конференция. Москва, 24-27 октября 2011 года. – С. 30-32.
75. Шувалова Н.С. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пуповинного канатика людини при знижених концентраціях кисню / Н.С. Шувалова, О.Г. Дерябіна, С.М. Жукова, М.П. Сорока // Журн. АМН України. – 2010. – Т. 16, додаток. – С. 191.
76. Яцишина А.П. Цитоморфологічна характеристика нової клітинної лінії миші G1 / А.П. Яцишина, О.В. Підпала, Т.П. Рубан, О.В. Тімощук, Л.Л. Лукаш // Цитология и генетика. – 2006. – №3. – С. 49-58.
77. Abe R. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migrationto wound sites / R. Abe, S. Donnelly, T. Peng, R. Bucala, C. Metz // J. Immunol. – 2001. – Vol. 166. – P. 7556-7562.
78. Adhikari S. H2S induced pancreatic acinar cell apoptosis is mediated via Jnk and p38 MAP / S. Adhikari, M. Bhatia // J. Cell. Biol. Med. – 2007. – Vol. 12, №4. – P. 1374-1383.
79. Aggarwal S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M. Pittenger // Blood. – 2005. – Vol. 105. – P. 1815-1820.
80. Amable P. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly / P. Amable, M. Teixeira, R. Carias, J. Granjeiro, R. Borojevic // Stem Cell Res Ther. – 2014. – Vol. 5, №2. – Р. 53-66.
81. Appelhoff R. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD 1, PHD 2 and PHD 3 in the regulation of hypoxia-inducible factor / R. Appelhoff, Y. Tian, R. Raval, H. Turley, A. Harris, C. Pugh, P. Ratcliffe, J. Gleadle // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 38458-38465.
82. Arnett J. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption / J. Arnett, D. Gibbons, J. Utting, I. Orriss // J. Cell Physiol. – 2003. – Vol. 196, №1. – Р. 2-8.
83. Baskar R. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and change in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells / R. Baskar, L. Li, Р. Moore1 // The FASEB Journal. – 2007. – Vol. 21. – P. 247-255.
84. Bell E. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia / E. Bell, T. Klimova, J. Eisenbart, P. Schumacker, N. Chandel // Mol Cell Biol. – 2007. – Vol. 27, №16. – Р. 5737-5745.
85. Bhatia M. Hydrogen sulfide as a vasodilator / M. Bhatia // IUBMB Life. – 2005. – Vol. 57, №9. – P. 603-606.
86. Bian J. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes / J. Bian, Q. Yong, T. Pan, Z. Feng, M. Ali, S. Zhou, P. Moore // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 316. – P. 670-678.
87. Bianco P. Skeletal stem cells / P. Bianco, PG. Robey // Development. – 2015. – Vol. 142, №6. – Р. 1023-1027.
88. Brohlin M. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells / M. Brohlin, D. Mahay, L. Novikov, G. Terenghi, M. Wiberg, S. Shawcross, L. Novikiva // Neurosci. Res. – 2009. – Vol. 64. – P. 41-49.
89. Butler A. Induction of the proliferative phenotype in differentiated myogenic cells by hypoxia /A. Butler, M. Eagleton, D. Wang, R. Howell, A. Strauch, V. Khasgiwala, H. Smith // J Biol Chem. – 1991. – Vol. 266, №27. – Р. 18250-18258.
90. Cai J. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells / J. Cai, A. Cheng, Y. Luo, C. Lu, M. Mattson, M. Rao, K. Furukawa // Journal of Neurochemistry. – 2004. – Vol. 88. – Р. 212-226.
91. Campagnoli C. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow / C. Campagnoli, I. Roberts, S. Kumar, P. Bennett, I. Bellantuono, N. Fisk // Blood. – 2001. – Vol. 98. – Р. 2396-2402.
92. Cao Y. Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulﬁde / Y. Cao, S. Adhikari, AD. Ang, PK. Moore, M. Bhatia // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2006. – Vol. 291, №3. – P. 503-C510.
93. Caplan A. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / A. Caplan, J. Dennis // J. Cell. Biochem. – 2006. – Vol. 98. – P. 1076-1084.
94. Carroll V. Role hypoxia-inducible factor (HIF)-1α versus HIF-2α in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-1 or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway / V. Carroll, M. Ashcroft // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66, №12. – Р. 6264–6270.
95. Carsten A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator / A. Carsten // J. Nephrol. – 2009. – Vol. 22. – P. 173-176.
96. Cechin S. Influence of in vitro and in vivo oxygen modulation on β cell differentiation from human embryonic stem cells / S. Cechin, S. Alvarez-Cubela, J. Giraldo, R. Molano, S. Villate, C. Ricordi, A. Pileggi, L. Inverardi, C. Fraker, J. Domínguez-Bendala // Stem Cells Transl Med. – 2014. – Vol. 3, №3. – Р. 277-289.
97. Chandel N. The cellular basis for diverse responses to oxygen / N. Chandel, G. Budinger // Free Radical Biol. Med. – 2007. – Vol. 42. – Р. 165-174.
98. Chen C. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair / C. Chen, Y. Ou, S. Liao, W. Chen, C. Wu, C. Wang, W. Wang, Y. Huang, S. Hsu // Exp. Neurol. – 2007. –Vol. 204. – Р. 443-453.
99. Chen G. Ligand-еnabled β-C-H arylation of α-amino acids using a simple and practical auxiliary / G. Chen, T. Shigenari, P. Jain, Z. Zhang, Z. Jin, J. He, S. Li, C. Mapelli, MM. Miller, MA. Poss, PM. Scola, KS. Yeung, JQ. Yu // J Am Chem Soc. – 2015. – Vol. 137, №9. – Р. 3338-3351.
100. Chen G. Threonine metabolism and embryonic stem cell self-renewal / G. Chen, J. Wang // Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. –2014. – Vol. 17, №1. – Р. 80-85.
101. Chen X. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production / X. Chen, M. Katakowski, D. Li, D. Lu, L. Wang, L. Zhang, J. Chen, Y. Xu, S. Gautam, A. Mahmood, M. Chopp // J. Neurosci. Res. – 2002. – Vol. 69. – Р. 687-691.
102. Chen X. Study of in vivo differentiat ion of rat bone marrow stromal cells into schwamm cell-like cells / X. Chen, X.-D. Wang, G. Chen, W.-W. Lin, J. Yao, X.-S. Gu // Microsurgery. – 2006. – Vol. 26. – Р. 111-115.
103. Cheng Y. Hydrogen sulfide induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats / Y. Cheng, J. Ndisang, G. Tang, K. Cao, R. Wang // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – Vol. 287. – P. 2316-2323.
104. Chesney J. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. / J. Chesney, C. Metz, A. Stavitsky, M. Bacher, R. Bucala // J. Immunol. – 1998. – Vol. 160. – P. 419-425.
105. Chinen Y. Long-term therapeutic efficacy of allogenic bone marrow transplantation in a patient with mucopolysaccharidosis IVA / Y. Chinen, T. Higa, S. Tomatsu, Y. Suzuki, T. Orii, N. Hyakuna // Mol Genet Metab Rep. – 2014. – Vol. 1. – Р. 31-41.
106. Choi Y. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy / Y. Choi, A. Kurtz, C. Stamm // Hum Gene Ther. – 2011. – Vol. 22, №1. – Р. 3-17.
107. Cockman M. Oxygen sensing / M. Cockman, C. Pugh // Haematologica. – 2005. – Vol. 90. – Р. 8-12.
108. Covas DT. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts / DT. Covas, RA. Panepucci, AM. Fontes, WA Jr. Silva, MD. Orellana, MC. Freitas, L. Neder, AR. Santos, LC. Peres, MC. Jamur, MA. Zago // Exp Hematol. – 2008. – Vol. 36, №5. – Р. 642-654.
109. Dalloul A. Hypoxia and visualization of the stem cell niche / A. Dalloul // Methods Mol Biol. – 2013. – Vol. 1035. – Р. 199-205.
110. D’Andrea A. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation / A. D’Andrea, L. Zon // J. Clin. Invest. – 1990. – Vol. 86. – Р. 681-687.
111. D’Ippolito G. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells / G. D’Ippolito, S. Diabira, G. Howard, B. Roos, P. Schiller // Bone. – 2006. – Vol. 39, №3. – Р. 513-522.
112. De Bari C. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane / C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, F. Luyten // Arthritis Rheum. – 2001. – Vol. 44. – Р. 1928-1942.
113. Dennis J. Origin and differentiation of human and murine stroma / J. Dennis, P. Charbord // Stem cells. – 2002. – Vol. 20. – Р. 205-214.
114. Dezawa M. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells / M. Dezawa, I. Takahashi, M. Esaki, M. Takano, H. Sawada // Eur. J. Neurosci. – 2001. – Vol. 14. – Р. 1771-1776.
115. Diaz-Prado S. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane / S. Díaz-Prado, E. Muiños-López, T. Hermida-Gómez, M. Rendal-Vázquez, I. Fuentes-Boquete, F. de Toro, F. Blanco // J. Cell Biochem. – 2010. – Vol. 111, №4. – Р. 846-857.
116. Ding D. Mesenchymal stem cells / D. Ding, W. Shyu, S. Lin // Cell. Transplant. – 2011. – Vol. 20. – Р. 5-14.
117. Ding F. Use of tissueengineered nerve grafts consisting of a chitosan/poly(lactic-co-glycolic acid)-based scaffold included with bone marrow mesenchymal cells for bridging 50-mm dog sciatic nerve gaps / F. Ding, J. Wu, Y. Yang, W. Hu, Q. Zhu, X. Tang, J. Liu, X. Gu // Tissue. Eng. Part. A. – 2010. – Vol. 16. – Р. 3779-3790.
118. Dodd J. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway / J. Dodd, J. Raleigh, T. Gross // Am J Physiol. – 1999. – Vol. 277, №3. – Р. 598-602.
119. Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, Dj. Prockop, E. Horwitz // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, №4. – 315-317.
120. Dong Y. Transplantation of neurotrophin-3-transfected bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of spinal cord injury / Y. Dong, L. Yang, L. Yang, H. Zhao, C. Zhang, D. Wu // Neural Regen Res. – 2014. – Vol. 9, №16. – Р. 1520-1524.
121. Ebert B. Regulation of the erythropoietin gene / B. Ebert, H. Bunn // Blood. – 1999. – Vol. 94. – Р. 1864-1877.
122. Egusa H. Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing / H. Egusa, F. Schweizer, C. Wang, Y. Matsuka, I. Nishimura // J Biol Chem – 2005. – Vol. 280, №25. – P. 23691-23697.
123. Elsey D. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H(2)S) / D. Elsey, R. Fowkes, G. Baxter // Cell Biochem Funct. – 2010. – Vol. 28, №2. – P. 95-106.
124. Erices A. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood / A. Erices, P. Conget, J. Minguell // Br J Haematol. – 2000. – Vol. 109. – Р. 235-242.
125. Fan C. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells / C. Fan, F. Tang, Q. Zhang, S. Lu, H. Liu, Z. Zhao, B. Liu, ZB. Han, ZC. Han // Cell Transplant. – 2005. – Vol. 14, №5. – Р. 311-321.
126. Fiorucci S. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver / S. Fiorucci, E. Distrutti, G. Cirino, J. Wallace // J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 131. – P. 259-271.
127. Fisher J. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys / J. Fisher, D. Koury, T. Ducey, S. Mendel // Br J Haematol. – 1996. – Vol. 95, №1. – P. 27-32.
128. Friedenstein A. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers / A. Friedenstein, R. Chailakhyan, U. Gerasimov // Cell. Tissue. Kinet. – 1987. – Vol. 20. – P. 263-272.
129. Friedenstein A. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells / A. Friedenstein, I. Piatetzky-Shapiro, K. Petrakova // J. Embryol. Exp. Morph. –1966. – Vol. 16, №3. – P. 381-390.
130. Fukuda R. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells / R. Fukuda, H. Zhang, J. Kim, L. Shimoda, C. Dang, G. Semenza // Cell. – 2007. – Vol. 129, №1. – P. 111-122.
131. Furne J. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values / J. Furne, A. Saeed, MD. Levitt // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2008. – Vol. 295, №5. – P. 1479-1485.
132. Gambari L. Sodium hydrosulfide inhibits the differentiation of osteoclast progenitor cells via NRF2-dependent mechanism / L. Gambari, G. Lisignoli, L. Cattini, C. Manferdini, A. Facchini, F. Grassi // Pharmacol Res. – 2014. – Vol. 87 – P. 99-112.
133. Garcia-Bereguiain MA. Hydrogen sulﬁde raises cytosolic calcium in neurons though activation of L-type Ca+2 channels / MA. García-Bereguiaín, AK. Samhan-Arias, FJ. Martín-Romero, C. Gutiérrez-Merino // Antioxd.Redox Signal. – 2008. – Vol. 10. – P. 31-42.
134. Gaspar JA. Unique metabolic features of stem cells, cardiomyocytes, and their progenitors / JA. Gaspar, MX. Doss, JG. Hengstler, C. Cadenas, J. Hescheler, A. Sachinidis // Circulation Research. – 2014. – Vol. 114. – P. 1346-1360.
135. Gmunder H. Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine / H. Gmünder, HP. Eck, B. Benninghoff, S. Roth, W. Dröge // Cell. Immunol. – 1990. – Vol. 129, №1. – P. 32-46.
136. Gobbi G. Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling / G. Gobbi, F. Ricci, C. Malinverno, C. Carubbi, M. Pambianco, Gd. Panfilis, M. Vitale, P. Mirandola // Laboratory Investigation. – 2009. – Vol. 89, №9. – P. 994-1006.
137. Goldberg M. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that oxygen sensor is a heme protein / M. Goldberg, S. Dunning, H. Bunn // Science. – 1988. – Vol. 242, №4884. – P. 1412-1425.
138. Gronthos S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo / S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, PG. Robey, S. Shi // Proc Natl Acad Sci USA. – 2000. – Vol. 97, №25. – P. 13625-13630.
139. Guoyao WU. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond / WU. Guoyao, M. Sidney // Biochem. J. – 1998. – Vol. 336. – P. 1-17.
140. Guzy RD. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia / RD. Guzy, PT. Schumacker // Exp Physiol. – 2006. – Vol. 91, №5. – P. 807-819.
141. Haase V. Hypoxia-inducible factors in the kidney / V. Haase // Am J Physiol Renal Physiol. – 2006. – Vol. 291. – P. 271-281.
142. Haase V. The VHL tumor suppressor in development and disease: functional studies in mise by conditional gene targeting / V. Haase // Semin. Cell Dev. Biol. – 2005. – Vol. 16. – P. 564-574.
143. Hegyi B. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall / B. Hegyi, B. Sagi1, J. Kovacs // Int. Immunology. – 2010. – Vol. 22, №7. – P. 551-559.
144. Hequet O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility / O. Hequet // J Blood Med. – 2015. – Vol. 6. – Р. 55-67.
145. Heubach J. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells / J. Heubach, E. Graf, J. Leutheuser, M. Bock, B. Balana, I. Zahanich, T. Christ, S. Boxberger, E. Wettwer, U. Ravens // Journal of Physiology. – 2004. – Vol. 554. – P. 659-672.
146. Higuera G. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells / G. Higuera, D. Schop, T. Spitters, R. van Dijkhuizen-Radersma, M. Bracke, J. de Bruijn, D. Martens, M. Karperien, A. van Boxtel, C. van Blitterswijk // Tissue Eng Part A. – 2012. – Vol. 18, №5-6. – P. 654-664.
147. Hirota K. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1 / K. Hirota, G. Semenza // Critical Reviews in oncology/hematology. – 2006. – Vol. 59. – P. 15-26.
148. Holzwarth C. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells / C. Holzwarth, M. Vaegler, F. Gieseke, S. Pfister, R. Handgretinger, G. Kerst, I. Müller // BMC Cell Biology. – 2010. – Vol. 11. – P. 1-11.
149. Hu CJ. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and HIF-2α in stem cells / CJ. Hu, S. Iyer, A. Sataur, KL. Covello, LA. Chodosh, MC. Simon // Molec. and Cell Biol. – 2006. – Vol. 26, №9. – P. 3514-3526.
150. Hu J. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells / J. Hu, Q. Zhu, X. Liu, Y. Xu, J. Zhu // Exp. Neurol. – 2007. – Vol. 204. – P. 658-666.
151. Hu Y. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways / Y. Hu, X. Chen, T. Pan, K. Neo, S. Lee, E. Khin, P. Moore, J. Bian // Pflugers. Arch. – 2008. – Vol. 455, №4. – P. 607-616.
152. Huh JE. Arginine enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis through the regulation of Wnt and NFATc signaling in human mesenchymal stem cells / JE. Huh, JY. Choi, YO. Shin, DS. Park, JW. Kang, D. Nam, DY. Choi, JD. Lee // Int J Mol Sci. – 2014. – Vol. 15, №7. – P. 13010-13029.
153. Ivan M. HIF-1α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation implications for O2 sensing / M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, JM. Asara, WS. Lane, WG. Kaelin // Science. – 2001. – Vol. 292, №5516. – P. 464-468.
154. Jiang Y. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow / Y. Jiang, BN. Jahagirdar, RL. Reinhardt, RE. Schwartz, CD. Keene, XR. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, WC. Low, DA. Largaespada, CM. Verfaillie // Nature. – 2002. – Vol. 418, №6893. – P. 41-49.
155. Jones D. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging / D. Jones // Rejuvenation Res. – 2006. – Vol. 9. – P. 169-181.
156. Jones D. Radical-free biology of oxidative stress / D. Jones // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – Vol. 295. – P. 849-868.
157. Kabil O. H2S and its role in redox signaling / O. Kabil, N. Motl, R. Banerjee // Biochim Biophys Acta. – 2014. – Vol. 1844, №8. – P. 1355-1366.
158. Kajimura M. Interactions of Multiple Gas-Transducing Systems: Hallmarks and Uncertainties of CO, NO and H2S Gas Biology / M. Kajimura, R. Fukuda, RM. Bateman, T. Yamamoto, M. Suematsu // Antioxidants & Redox signaling. – 2010. – Vol. 13, №2. – P. 157-192.
159. Keilhoff G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. / G. Keilhoff, A. Goihl, K. Langnase, H. Fansa, G. Wolf // Eur. J. Cell Biology. – 2006. – Vol. 85, №1. – P. 11-24.
160. Keilhoff G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells as alternative therapy in supporting nerve regeneration and myelination / G. Keilhoff, F. Stang, A. Goihl, G. Wolf, H. Fansa // Cell. Mol. Neurobiol. – 2006. – Vol. 26, №7-8. – P. 1235-1252.
161. Kim J. HIF-1 mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch reguired for cellular adaptation to hypoxi / J. Kim, I. Tchernyshyov, G. Semenza, C. Dang // Cell Metabolism. – 2006. – Vol. 3, №3. – P. 177-185.
162. Kimura H. Hydrogen Sulfide and Polysulfides as Biological Mediators / H. Kimura // Molecules. – 2014. – Vol. 19, №10. – P. 16146-16157.
163. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions / H. Kimura // Amino acids. – 2010. – Vol. 45. – P. 56-61.
164. Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide / H. Kimura // Antioxid Redox Signal. – 2014. – Vol. 20, №5. – P. 783-793.
165. Kimura Y. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress / Y. Kimura, H. Kimura // FASEB J. – 2004. – Vol. 18. – P. 1165-1167.
166. Kopen G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brain / G. Kopen, D. Prockop, D. Phinney // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 10711-10716.
167. Kubo S. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension / S. Kubo, I. Doe, Y. Kurokawa, H. Nishikawa, A. Kawabata // Toxicology. – 2007. – №232. – P. 132-146.
168. Kuznetsov SA. Circulating skeletal stem cells / SA. Kuznetsov, MH. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, PG. Robey // J Cell Biol. – 2001. – Vol. 153, №5. – P. 1133-1140.
169. Lee JH. Neurogenic differentiation of human dental stem cells in vitro / JH. Lee, S. Um, IS. Song, HY. Kim, BM. Seo // J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. – 2014. – Vol. 40, №4. – P. 173-180.
170. Lee OK. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood / OK. Lee, TK. Kuo, WM. Chen, KD. Lee, SL. Hsieh, TH. Chen // Blood. – 2004. – Vol. 103, №5. – P. 1669-1675.
171. Lee SK. Sodium hydrogen sulfide inhibits nicotine and lipopolysaccharide-induced osteoclastic differentiation and reversed osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells / SK. Lee, JH. Chung, SC. Choi, QS. Auh, YM. Lee, SI. Lee, EC. Kim // J Cell Biochem. – 2013. – Vol. 114, №5. – P. 1183-1193.
172. Leffler C. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messendgers in cerebrovascular circulation / C. Leffler, H. Parfenova, J. Jagger, R.Wang // J. Appl. Physiol. – 2006. – Vol. 100. – P. 1065-1076.
173. Levitt MD. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue / MD. Levitt, MS. Abdel-Rehim, J. Furne // Antioxid Redox Signal. – 2011. – Vol. 15, №2. – P. 373-378.
174. Liao C. Effect of hydrogen sulphide on the expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-κB ligand in human periodontal ligament cells induced by tension-force stimulation / C. Liao, Y. Hua // Archives of Oral Biology. – 2013. – Vol. 58, №12. – P. 1784-1790.
175. Lim J. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells / J. Lim, Y. Liu, E. Win Khin, J. Bian // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2008. – №295. – P. 1261-1270.
176. Lin Q. Oxygen and Cell Fate Decisions / Q. Lin, Y. Kim, R. Alarcon, Z. Yun // Gene Regulation and Systems Biology. – 2008. – Vol. 2. – P. 43-51.
177. Linden DR. Hydrogen sulfide signaling in the gastrointestinal tract / DR. Linden // Antioxid Redox Signal. – 2014. – Vol. 20, №5. – P. 818-830.
178. Liu D. Hydrogen sulfide promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells and protects hypoxia-induced decrease in hippocampal neurogenesis / D. Liu, Z. Wang, J. Zhan, Q. Zhang, J. Wang, Q. Zhang, X. Xian, Q. Luan, A. Hao // Pharmacol Biochem Behav. – 2014. – Vol. 116. – P. 55-63.
179. Liu Y. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca(2+) channel sulfhydration / Y. Liu, R. Yang, X. Liu, Y. Zhou, C. Qu, T. Kikuiri, S. Wang, E. Zandi, J. Du, IS. Ambudkar, S. Shi // Cell Stem Cell. – 2014. – Vol. 15, №1. – P. 66-78.
180. Lopes F. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice / F. Lopes, L. de Moura Campos, J. Correa, A. Balduino, S. Lora, F. Langone, R. Borojevic, A. Martines // Exp. Neurol. – 2006. – Vol. 198. – P. 457-468.
181. Lopes F. Transplantation of bone-marrow-derived cells into a nerve guide resulted in transdifferentiation into Schwann cells and effective regeneration of transected mouse sciatic nerve / F. Lopes, F. Frattini, SA. Marques, FM. de Almeida, LC. de Moura Campos, F. Langone, S. Lora, R. Borojevic, AMB. Martines // Micron. – 2010. – Vol. 41. – P. 783-790.
182. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H2S) — the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol. Rep. – 2007. – Vol. 59, №1. – P. 4-24.
183. Lundby C. The influence of intermittent altitude exposure to 4100 m on exercise capacity and blood variables / C. Lundby, TK. Nielsen, F. Dela, R. Damsgaard // Scand J Med Sci Sports. – 2005. – Vol. 15, №3. – P. 182-187.
184. Maddalena S. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes / S. Maddalena, V. Elsa, G. Lucia, Z. Fausto, D. Marco, A. Alberto, S. Georg, P. Ornella // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. – Vol. 1, №4. – P. 296-305.
185. Martin DR. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow / DR. Martin, NR. Cox, TL. Hathcock, GP. Niemeyer, HJ. Baker // Exp. Hematology. – 2002. – Vol. 30. – P. 879-886.
186. Maxwell P. HIF-1: An oxygen response system with special relevance to the kidney / P. Maxwell // J. Am. Soc. Nephrol. – 2003. – Vol. 14. – P. 2712-2722.
187. Maynard M. Multiple splice variants of the human HIF-3α locus are targets of the VHL E 3 ubiquitin ligase complex / M. Maynard, H. Qi, J. Chung, EH. Lee, Y. Kondo, S. Hara, RC. Conaway, JW. Conaway, M. Ohh // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278, №13. – P. 11032-11040.
188. Módis K. Hydrogen sulfide in cell signaling, signal transduction, cellular bioenergetics and physiology in C. Elegans / K. Módis, K. Wolanska, R. Vozdek // Gen Physiol Biophys. – 2013. – Vol. 32, №1. – P. 1-22.
189. Moldaver MV. Sparse plating increases the heterogeneity of proliferative potential of fibroblasts / MV. Moldaver, YE. Yegorov // Mech Ageing Dev. – 2009. – Vol. 130, №5. – P. 337-342.
190. Mustafa A. H2S signals through protein S-sulfhydration / A. Mustafa, M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, SK. Gazi, RK. Barrow, G. Yang, R. Wang, SH. Snyder // Sci. Signal. – 2009. – Vol. 2, №96. – P. 1-15.
191. Nauta AJ. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells / AJ. Nauta, WE. Fibbe // Blood. – 2007. – Vol. 110, №10. – 3499-3506.
192. Nguyen DC. Microscale generation of cardiospheres promotes robust enrichment of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells / DC. Nguyen, TA. Hookway, Q. Wu, R. Jha, MK. Preininger, X. Chen, CA. Easley, P. Spearman, SR. Deshpande, K. Maher, MB. Wagner, TC. McDevitt, C. Xu // Stem Cell Reports. – 2014. – Vpl. 3, №2. – P. 260-268.
193. Noort WA. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(-) cells in NOD/SCID mice / WA. Noort, AB. Kruisselbrink, PS. in't Anker, M. Kruger, RL. van Bezooijen, RA. de Paus, MH. Heemskerk, CW. Löwik, JH. Falkenburg, R. Willemze, WE. Fibbe // Exp Hematol. – 2002. – Vol. 30. – P. 870-878.
194. Noritake K. Use of a gelatin hydrogel membrane containing β-tricalcium phosphate for guided bone regeneration enhances rapid bone formation / K. Noritake, S. Kuroda, M. Nyan, Y. Atsuzawa, M. Uo, K. Ohya, S. Kasugai // Dent Mater J. – 2014. – Vol. 33, №5. – P. 674-680.
195. Nworu CS. Hepato- and nephroprotective activities of a nigerian local king tuber oyster mushroom, pleurotus tuberregium (higher basidiomycetes), in chemically induced organ toxicities in rats / CS. Nworu, SA. Ihim, LE. Ugwu, KA. Laiyemo, PA. Akah // Int J Med Mushrooms. – 2014. – Vol. 16, №4. – P. 305-318.
196. O'Driscoll SW. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum / SW. O'Driscoll, JS. Fitzsimmons, CN. Commisso // J Orthop Res. – 1997. – Vol. 15, №5. – P. 682-687.
197. Okada M. Hydrogen sulphide increases hepatic differentiation of human tooth pulp stem cells compared with human bone marrow stem cells / M. Okada, N. Ishkitiev, K. Yaegaki, T. Imai1, T. Tanaka, M. Fukuda, S. Ono, M. Haapasalo // Article first published online: 20 MAR 2014. DOI: 10.1111/iej.12262.
198. Olson KR. Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood? / KR. Olson // Biochim Biophys Acta. – 2009. – Vol. 1787, №7. – P. 856-863.
199. Perey M.L. Genetically heterogeneous origins of idiopathic erythrocytosis // Hematology. – 2007. – Vol. 12. – P. 131-139.
200. Pittenger MF. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / MF. Pittenger, AM. Mackay, SC. Beck, RK. Jaiswal, R. Douglas, JD. Mosca, MA. Moorman, DW. Simonetti, S. Craig, DR. Marshak // Science. – 1999. – Vol. 284, №5411. – P. 143-147.
201. Pitterger M. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M. Pitterger, A. Mackay, S. Beck, R. Jaiswal, R. Douglas, J. Mosca, M. Moorman, D. Simonetti, S. Craig, D. Marshak // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143-147.
202. Plotnikov E. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromalcells and renal tubular cells in co-culture / E. Plotnikov, T. Khrvapenkova, S. Galkina, G. Sukhikh, D. Zorov // Experimental Cell Research. – 2010. – Vol. 316. – Р. 2447-2455.
203. Prabhakar N. Physiological and genomic consequences of intermittent hypoxia / N. Prabhakar // J. Appl. Physiol. – 2001. – Vol. 90, №5. – 1986. – P. 94.
204. Prusa AR. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? / AR. Prusa, E. Marton, M. Rosner, G. Bernaschek, M. Hengstschläger // Hum Reprod. – 2003. – Vol. 18, №7. – P. 1489-1493.
205. Qu Z. Cystathionine-gamma-lyase inhibitor attenuates acute lung injury induced by acute pancreatitis in rats / Z. Qu, Y. Jiang, BQ. Wu, YF. Duan, ZD. Sun, GH. Luo // Arch Med Sci. – 2014. – Vol. 10, №4. – P. 825-829.
206. Reiffenstein R. Toxicology of hydrogen sulfide / R. Reiffenstein, W. Hulbert // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1992. – Vol. 32. – P. 109-134.
207. Ren H. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions / H. Ren, Y. Cao, Q. Zhao, J. Li, C. Zhou, L. Liao, M. Jia, Q. Zhao, H. Cai, Z. Han, R. Yang, G. Chen, R. Zhao // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 347. – P. 12-21.
208. Rinaldi L. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3 / L. Rinaldi, G. Gobbi, M. Pambianco // Laboratory Investigation. – 2006. – Vol. 86. – P. 391-397.
209. Roura S. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells: New therapeutic weapons for idiopathic dilated cardiomyopathy? / S. Roura, C. Gálvez-Montón, A. Bayes-Genis // Int J Cardiol. – 2014. – Vol. 177, №3. – P. 809-818.
210. Schousboe A. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes / A. Schousboe, S. Scafidi, LK. Bak, HS. Waagepetersen, MC. McKenna // Adv Neurobiol. – 2014. – Vol. 11. – P. 13-30.
211. Semenza G. Life with oxygen / G. Semenza // Science. – 2007. – Vol. 318. – P. 62-64.
212. Semenza G. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics / G. Semenza // Trends Mol. Med. – 2002. – Vol. 8, № 4 (suppl.). – P. 62-67.
213. Semenza G. 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 / G. Semenza, G. Wang // Mol. Cell. Biol. –1992. – Vol. 12. – P. 5447-5454.
214. Semenza G. HIF-1 and human disease: one highly involved factor / G. Semenza // Genes Dev. – 2000. – Vol. 14. – P. 1983-1991.
215. Sheng J. Hydrogen sulfide suppresses human atrial fibroblast proliferation and transformation to myofibroblasts / J. Sheng, W. Shim, H. Wei, S. Lim, R. Liew, T. Lim, B. Ong, Y. Chua, Ph. Wong // J Cell Mol Med. – 2013. – Vol. 17, №10. – P. 1345-1354.
216. Shibuya N. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain / N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida, Y. Ogasawara, T. Togawa, K. Ishii, H. Kimura // Antioxid. Redox. Signal. – 2009. – Vol. 11, №4. – P. 703-714.
217. Shirozu K. Cystathionine γ-lyase deficiency protects mice from galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure / K. Shirozu, K. Tokuda, E. Marutani, D. Lefer, R. Wang, F. Ichinose // Antioxid Redox Signal. –2014. – Vol. 20, №2. – P. 204-216.
218. Shyh-Chang N. Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation / N. Shyh-Chang, JW. Locasale, CA. Lyssiotis, Y. Zheng, RY. Teo, S. Ratanasirintrawoot, J. Zhang, T. Onder, JJ. Unternaehrer, H. Zhu, JM. Asara, GQ. Daley, LC. Cantley // Science. – 2013. – Vol. 339, №6116. – P. 222-226.
219. Sivarajah A. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial i/r / A. Sivarajah, M. Collino, M. Yasin, E. Benetti, M. Gallicchio, E. Mazzon, S. Cuzzocrea, R. Fantozzi, C. Thiemermann // Shock. – 2009. – Vol. 31, №3. – P. 267-274.
220. Skulachev VP. New data on biochemical mechanism of programmed senescence of organisms and antioxidant defense of mitochondria / VP. Skulachev // Biochemistry. – 2009. – Vol. 74, №12. – P. 1400-1403.
221. Smith TG. The human side of hypoxia-inducible factor / TG. Smith, PA. Roblins, PJ. Ratelife // Brit. J. Haemot. – 2008. – Vol. 141. – P. 325-334.
222. Stefanova NA. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats / NA. Stefanova, AZh. Fursova, NG. Kolosova // J Alzheimers Dis. – 2010. – Vol. 21, №2. – P. 479-491.
223. Sundelacruz S. Membrane Potential Controls Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells / S. Sundelacruz, M. Levin, DL. Kaplan // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, №11. – e3737. –doi:10.1371/journal.pone.0003737.
224. Taghizadeh R. Wharton’s Jelly stem cells: Future clinical applications / R. Taghizadeh, K. Cetrulo // Placenta. – 2011. – Vol. 32, №4. – P. 311-315.
225. Takahashi K. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology / K. Takahashi, S. Yamanaka // Development. – 2013. – Vol. 140, №12. – P. 2457-2461.
226. Tripatara P. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gammalyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction / P. Tripatara, NS. Patel, M. Collino, M. Gallicchio, J. Kieswich, S. Castiglia, E. Benetti, KN. Stewart, PA. Brown, MM. Yaqoob, R. Fantozzi, C. Thiemermann // Lab. Invest. – 2008. – Vol. 88, №10. – P. 1038-1048.
227. Tsai MS. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol / MS. Tsai, JL. Lee, YJ. Chang, SM. Hwang // Hum Reprod. – 2004. – Vol. 19, №6. – P. 1450-1456.
228. Tsai SY. Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study / SY. Tsai, YC. Huang, LL. Chueh, LS. Yeh, CS. Lin // World J Transplant. – 2014. – Vol. 4, №3. – P. 196-205.
229. Tuncay OC. Oxygen tension regulates osteoblast function / OC. Tuncay, D. Ho, MK. Barker // Am J Orthod Dentofacial Orthop. – 1994. – Vol. 105, №5. – P. 457-463.
230. Uccelli A. Mesenchymal stem cells in health and disease / A. Uccelli, L. Morreta, V. Pistoia // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – Vol. 8, №9. – P. 726-736.
231. von Zglinicki T. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? / T. von Zglinicki, G. Saretzki, W. Döcke, C. Lotze // Exp. Cell Res. – 1995. – Vol. 220, №1. – P. 186-193.
232. Wang A. Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering / A. Wang, Z. Tang, IH. Park, Y. Zhu, S. Patel, G. Daley, S. Li // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, №22. – P. 5023-5032.
233. Wang D. Brindging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates / D. Wang, XL. Liu, JK. Zhu, L. Jiang, J. Hu, Y. Zhang, LM. Yang, HG. Wang, JH. Yi // Brain Res. – 2008. – Vol. 1188. – P. 44-53.
234. Wang G. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension / G. Wang, BH. Yiang, E. Rue, G. Semenza // PNAS USA. – 1995. – Vol. 92, №12. – P. 5510-5514.
235. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide / R. Wang // Antioxid Redox Signal. – 2003. – Vol. 5. – P. 493-501.
236. Wang R. Two’s company, three’s a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // FASEB J. – 2002. – Vol. 16. – P. 1792-1798.
237. Wang X. Schwann-like mesenchymal stem cells within vein graft facilitate facial nerve regeneration and remyelination / X. Wang, E. Luo, Y. Li, J. Hu // Brain Res. – 2011. – Vol. 1383. – P. 71-80.
238. Whiteman M. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite ‘scavenger’? / M. Whiteman, JS. Armstrong, SH. Chu, S. Jia-Ling, BS. Wong, NS. Cheung, B. Halliwell, PK. Moore // J. Neurochem. – 2004. – Vol. 90, № 3. – P. 765-768.
239. Williams JT. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes / JT. Williams, SS. Southerland, J. Souza, AF. Calcutt, RG. Cartledge // Am Surg. – 1999. – Vol. 65, №1. – P. 22-26.
240. Wislet-Gendebien S. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin / S. Wislet-Gendebien, F. Wautier, P. Leprince, B. Rogister // Brain Res. Bull. – 2005. – Vol. 68. – P. 95-102.
241. Wong RS. Mesenchymal stem cells: angels or demons? / RS. Wong // J. Biomed. Biotech. – 2011. – 459510. doi: 10.1155/2011/459510. Epub 2011 Jul 24.
242. Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons / D. Woodbury, E. Schwarz, D. Prockop, I. Black // J. Neurosci. Res. – 2000. – Vol. 61, №4. – P. 364-370.
243. Yan SK. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells / SK. Yan, T. Chang, H. Wang, L. Wu, R. Wang, QH. Meng // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – Vol. 351, №2. – P. 485-491.
244. Yang G. Hydrogen sulﬁde induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen activated protein kinases and caspase-3 / G. Yang, X. Sun, R. Wang // FASEB J. – 2004. – Vol. 18, №14. – P. 1782-1784.
245. Yang G. Pro-apoptotic effect of endogenous H2S on human aorta smooth muscle cells / G. Yang, L. Wu, R. Wang // FASEB J. – 2006. – V. 20, №3. – P. 253-255.
246. Yang G. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ-lyase / G. Yang, L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, AK. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, SH. Snyder, R. Wang // Science. – 2008. – Vol. 322, №5901. – P. 587-590.
247. Yang HY. Hydrogen sulfide attenuates opioid dependence by suppression of adenylate cyclase/cAMP pathway / HY. Yang, ZY. Wu, M. Wood, M. Whiteman, JS. Bian // Antioxid Redox Signal. – 2014. – Vol. 20, №1. – P. 31-41.
248. Yang J., Lou Q., Huang R., Shen L., Chen Z. Dorsal root ganglion neurons induce transdifferentiation of mesenchymal stem cells along a Schwann cell lineage / J. Yang, Q. Lou, R. Huang, L. Shen, Z. Chen // Neurosci. Lett. – 2008. – Vol. 445, №3. – P. 246-251.
249. Yoon D. Hypoxia-inducible factor 1 deficience results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development / D. Yoon, YD. Pastore, V. Divoky, E. Liu, AE. Mlodnicka, K. Rainey, P. Ponka, GL. Semenza, A. Schumacher, JT. Prchal // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281, №35. – P. 25703-25711.
250. Zavaczki E. Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells / E. Zavaczki, V. Jeney, A. Agarwal, A. Zarjou, M. Oros, M. Katkó, Z. Varga, G. Balla, J. Balla // Kidney Int. – 2011. – Vol. 80, №7. – P. 731-739.
251. Zhang J. Mesenchymal Stem Cells Promote Cardiac Muscle Repair via Enhanced Neovascularization / J. Zhang, Y. Wu, A. Chen, Q. Zhao // Cell Physiol Biochem. – 2015. – Vol. 35, №3. – Р. 1219-1229.
252. Zhao W. H2S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms / W. Zhao, R. Wang // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2002. – Vol. 283. – P. 474-480.
253. Zhao W. The vasorelaxant effect of H2S as novel endogenous gaseous KATP channel opener / W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang // EMBO J. – 2001. – Vol. 20, №21. – P. 6008-6016.
254. Zhou X. Roles of FGF-2 and TGF-beta/FGF-2 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards nucleus pulposus-like phenotype / X. Zhou, Y. Tao, J. Wang, C. Liang, J. Wang, H. Li, Q. Chen // Growth Factors. – 2015. – Vol. 33, №1. – P. 23-30.
255. Zuk PA. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / PA. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, DA. De Ugarte, JI. Huang, H. Mizuno, ZC. Alfonso, JK. Fraser, P. Benhaim, MH. Hedrick // Mol Biol Cell. – 2002. – Vol. 13, №12. – P. 4279-4295.
256. Zuk PA. Multilineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies / PA. Zuk, M. Zhu, H. Misino, J. Huang, JW. Futrell, AJ. Katz, P. Benheim, HP. Lorenz, MH. Hedrick // Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7. P. 211-228.