

Л.М. Плотнікова<sup>1</sup>, В.Я. Березовський<sup>1</sup>, С.П. Весельський<sup>2</sup>

## Вплив зниженої концентрації кисню та сірководню на амінокислотний метаболізм і проліферацію мезенхімальних клітин

<sup>1</sup>Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології», Науково-дослідний інститут фізіології імені академіка Петра Богача; E-mail: lidiiianik@i.ua

*Досліджено вплив донора сірководню ( $10^{-12}$  моль/л NaHS – I група) окремо та разом із зниженою концентрацією кисню (5%  $O_2$  – II група, 3%  $O_2$  – III група, 24 год) на життєдіяльність культури стовбурових клітин людини. Показано, що проліферація клітин знижувалася на 3-тю добу культивування у I, II і III групі в 1,7; 2,8 і 4,2 рази. На 4-ту добу цей показник був меншим у I, II і III групі на 29; 33 і 54% порівняно з контролем. Отже, несприятливий вплив NaHS підсилювався при зниженні концентрації кисню. Встановлено, що в усіх дослідних варіантах інтенсивно поглиналися із живильного середовища амінокислоти: цистеїн і цистин; серин і аспарагінова кислота; валін і триптофан; пролін і оксипролін, що беруть участь у синтезі білків, зокрема колагену. У культуральній рідині підвищувалася концентрація вільних амінокислот трьох фракцій: аргініну, гістидину і таурину; гліцину і метіоніну; аланіну і глутаміну. Вважаємо, що у застосованій концентрації донор сірководню за умов зниженого вмісту кисню у газовому середовищі інкубування гальмує проліферацію і змінює амінокислотний метаболізм клітин лінії 4BL людини.*

*Ключові слова:* мезенхімальні стовбурові клітини; сірководень; амінокислотний склад; проліферація.

### ВСТУП

У регенеративній медицині широко використовують стовбурові клітини (СК) [1]. Це зумовлено їх здатністю до самовідновлення, високим проліферативним потенціалом і можливістю перетворюватися в різні клітини організму. Джерелами СК можуть бути: кістковий мозок, жирова тканина, пуповинна і периферична кров [2, 3]. Проте до цього часу питання вибору оптимальних умов їх культивування залишається не вирішеним. Не існує єдиної точки зору щодо впливу газових сумішей зі зниженим вмістом кисню ( $O_2$ ) та газотрансмітерів, зокрема сірководню ( $H_2S$ ), на процеси життєдіяльності клітин. Одні дослідники виявляли зростання проліферативної активності СК жирової тканини людини

© Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський, С.П. Весельський

при зниженні концентрації  $O_2$  до 5% [4, 5], інші – гальмування проліферації СК пуповини через 72 год культивування при 1,5%  $O_2$  [6]. Показано, що  $H_2S$  також здатен впливати на клітинну проліферацію: стимулювати [7] або гальмувати її [8]. Розбіжність даних, можливо, є наслідком використання різної концентрації  $O_2$  та  $H_2S$ , тривалості впливу того чи іншого фактора, вибором клітинної культури.

Мета нашої роботи – дослідити сумісний вплив зниженої концентрації кисню та донора сірководню на амінокислотний метаболізм і проліферацію стовбурових клітин людини.

### МЕТОДИКА

Клітинна лінія 4BL людини – це мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), одержані

з периферичної крові здорового донора і переведені в умови стандартної моношарової культури. Вона отримана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України [9].

Живильне середовище культивування містило: DMEM («Sigma», США), 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Sigma», США), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Донором сірководню у ньому був гідросульфід натрію (NaHS, «Sigma», США) у концентрації  $10^{-12}$  моль/л. Контрольну групу клітин культивували при  $37^{\circ}\text{C}$  в стандартних умовах  $\text{CO}_2$ -інкубатора: 5%  $\text{CO}_2$  і 95% повітря (21%  $\text{O}_2$ ). У дослідних варіантах використано дві газові суміші зі зниженою концентрацією кисню, яка відповідає фізіологічному напруженню  $\text{O}_2$  у тканинах: 1) 5%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  + 90%  $\text{N}_2$ ; 2) 10%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  + 85%  $\text{N}_2$ .

Для визначення проліферативної активності культуру досліджуваної лінії розсівали по 50 тис клітин у скляні 35-ти мм чашки Петрі. Клітини інкубували протягом 24 год у газових сумішах, потім переносили у  $\text{CO}_2$ -інкубатор без зміни живильного середовища. Проби культуральної рідини відбирали на третю (72 год) й четверту (96 год) добу. Клітини ферментативно знімали за допомогою суміші 0,25%-го розчину трипсину і 0,02%-го ЕДТА (1:1) та підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва [10].

Концентрацію вільних амінокислот у культуральній рідині визначали методом тонкошарової хроматографії. Для цього до 1 мл безклітинного живильного середовища додавали 2 мл суміші спирту та ацетону (1:3), перемішували і через 30 хв центрифугували (10 хв при  $3\ 000\ \text{хв}^{-1}$ ). Супернатант випарювали до 1 мл і наносили на хроматографічний папір по 20 мкл. Амінокислоти розділяли на 13 фракцій: 1) цистеїн і цистин; 2) аргінін, гістидин і таурин; 3) лізин і аспарагін; 4) гліцин і метіонін; 5) серин і аспарагінова кислота; 6) аланін і глутамін; 7) валін і триптофан; 8) тирозин і глутамінова кислота; 9) ізовалін і

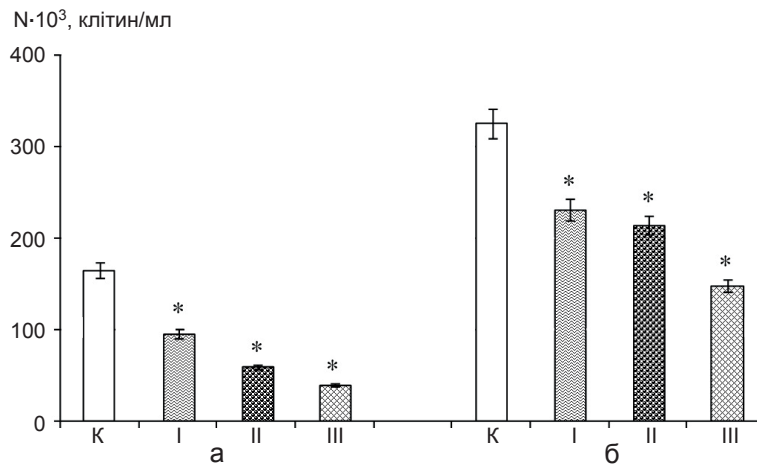
треонін; 10) пролін і оксипролін; 11) лейцин; 12) фенілаланін; 13) ізолейцин. Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий і бутиловий спирти, оцтову і мурашину кислоти та воду (9:7:4:2:5 за об'ємом) [11, 12].

Експериментальні результати обробляли математично з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2003 і OriginPro 7,5. Вірогідність різниці середніх значень визначали за критерієм t Стьюдента. Результати вважали статистично достовірними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Культивування в умовах зниженої концентрації кисню (3 або 5%  $\text{O}_2$ , 24 год) та за наявності донора сірководню ( $10^{-12}$  моль/л NaHS) призводило до змін проліферативної активності МСК периферичної крові людини. На третю добу у контролі кількість клітин в 1 мл була 165 тис, у I групі – 95,7 тис, у II – 59,4 тис, а у III – 39,6 тис (рисунок). На четверту добу цей показник вірогідно знизився у I, II і III групі на 29; 33 і 54% відповідно порівняно з контролем. Слід відмітити, що зниження концентрації кисню, при наявності у культуральній рідині NaHS, супроводжувалося додатковим зменшенням кількості клітин. Отже, ми зареєстрували посилення несприятливого впливу одного фактора (NaHS) дією іншого (3 або 5%  $\text{O}_2$ ).

Відомо, що  $\text{H}_2\text{S}$  може зупиняти клітинне дихання [13]. Механізм його токсичної дії пов'язаний здебільшого з 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. За іншими даними, донор  $\text{H}_2\text{S}$  (100 мкмоль/л NaHS) здійснював цитопротекторний вплив на первинну культуру ембріональних шурячих нейронів при використанні моделі окиснювального стресу, індукованого



Проліферація клітин лінії 4BL людини контрольних (К) і дослідних (I – 21% O<sub>2</sub> і 10<sup>-12</sup> моль/л NaHS; II – 5% O<sub>2</sub> і 10<sup>-12</sup> моль/л NaHS; III – 3% O<sub>2</sub> і 10<sup>-12</sup> моль/л NaHS) груп на третю (а) та четверту (б) добу культивування. \*P<0,05 – статистична вірогідність порівняно з контролем

глутаматом (1 ммоль/л, 2 год). Газотрансмітер підвищував внутрішньоклітинну концентрацію антиоксиданта глутатіону через активацію експресії  $\gamma$ -глутамілцистеїнінази [14]. Показано, що сірководень сприяв проліферації і диференціації нейрональних стовбурових клітин гіпокампа миші C57BL/6 після гіпоксії. Однодобові тварини зазнавали впливу гіпоксичної газової суміші (5% кисню в азоті) протягом 2 год. Внутрішньоочередово вводили NaHS (56 мкмоль·кг<sup>-1</sup>) протягом 30 днів. Було показано збільшення кількості проліферативних клітин у зубчастій звивині гіпокампа мишей після гіпоксії [7]. До захисних ефектів, які спостерігаються при дії сірководню на мітохондрії, ізольованих із тканини серця щурів, можуть бути частково залучені АТФ-залежні калієві канали. Низькі концентрації (10<sup>-12</sup>-10<sup>-8</sup> моль/л) збільшували набрякання органел, а фізіологічні (10<sup>-6</sup>-5·10<sup>-5</sup> моль/л) – здійснювали протекторний ефект щодо кальційіндукованого набрякання мітохондрій серця щурів [15].

Важливо також зазначити, що МСК кісткового мозку синтезують H<sub>2</sub>S для регулювання їх самовідновлення і остеогенної диференціації. Нестача H<sub>2</sub>S призводила до дефектів кісткової тканини (остеопороз)

миші [16]. Крім того було показано, що сірководень (0,1 нг/мл H<sub>2</sub>S, 9 діб) стимулював диференціацію МСК кісткового мозку людини і пульпи зуба у гепатоцитарному напрямку. Накопичення глікогену і синтез сечовини вважали маркерними показниками перетворення МСК у гепатоцити [17]. Інші дослідження виявили зниження проліферації фібробластів серця людини на 33-58% через гальмування активності калієвих каналів при концентрації NaHS 100-500 мкмоль/л. Виявлено зменшення їх диференціювання у бік міофібробластів [8]. Використані нами умови культивування (10<sup>-12</sup> моль/л NaHS окремо та разом із 3; 5% O<sub>2</sub>) пригнічували проліферативну активність МСК людини лінії 4BL у культурі.

Обмін речовин, або метаболізм – складає основу життєдіяльності клітини. Із зовнішнього середовища у клітину надходять 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. На третю добу культивування був вірогідно знижений вміст наступних вільних амінокис-

лот: серину і аспарагінової кислоти – на 12%, а також треоніну і ізоваліну – на 12% порівняно з контролем (таблиця). На четверту добу 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% і лейцину – на 20% щодо контролю.

Гідросульфід натрію у досліджуваній концентрації при 3 або 5% O<sub>2</sub> по-різному впливав на амінокислотний склад культуральної рідини МСК лінії 4BL людини. Ми наведемо тільки ті фракції амінокислот, що змінювалися вірогідно. Так, концентрація цистеїну і цистину, які зміцнюють сполучну

тканину, була нижчою відносно контрольних значень на 41-51%; серину і аспарагінової кислоти – на 38-54%; валіну і триптофану – на 40-53%; ізоваліну і треоніну – на 22-23%; а проліну і оксипроліну, які входять до складу колагену – на 35-50%. Збільшився вміст аргініну, гістидину і таурину на 33-46%; аланіну і глутаміну – на 21-35%, гліцину і метіоніну – на 24-72% порівняно з контролем.

Зниження концентрації вільних 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 валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін, гістидин (для дітей), аргінін

**Таблиця. Вплив гідросульфиду натрію (10<sup>-12</sup> моль/л) на концентрацію вільних амінокислот (мг/мл) у культуральній рідині клітинної лінії 4BL людини (M±m, n = 6)**

Показники	Контроль	Дослід	Δ, %	Контроль	Дослід	Δ, %
	3-тя доба			4-та доба		
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 кислота	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 кислота	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

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

(для дітей та осіб похилого віку) [18]. У наших дослідях, зниження концентрації фенілаланіну, лейцину, валіну і триптофану у живильному середовищі клітинної лінії 4BL людини можна пояснити їх незамінністю.

Цистеїн є складовою багатьох білків, тому активно поглинається клітиною. До його складу входить тиольна група -SH, завдяки чому дві молекули (чи їх залишки у складі пептидів) цієї речовини можуть з'єднуватися дисульфідним зв'язком, що формується окисненням -SH груп, утворюючи сполуку цистин. Такі зв'язки важливі для формування і підтримання третинної структури білків. Відомо, що ендогенний  $H_2S$  синтезується із L-цистеїну за допомогою цистатіонін- $\beta$ -синтази, цистатіонін- $\gamma$ -ліази і 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази [15].

У літературі ми не виявили даних щодо впливу донора сірководню на амінокислотний метаболізм стовбурових клітин в умовах зниженої концентрації кисню. Проте Аніскіна та співавт. 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 4 амінокислот – лізину, аспарагіну, аргініну і глутамінової кислоти в культурі тканин селезінки і печінки. Інші амінокислоти пригнічували або не впливали на проліферацію клітин. Протилежні ефекти спостерігали в експлантатах кори головного мозку. Стимулювальну дію мали амінокислоти з високою гідрофобністю: аспарагінова кислота, тирозин, валін, треонін, метіонін, лейцин, а інгібувальну – гліцин, пролін, триптофан [19].

Будь-яка із замінних амінокислот може синтезуватися в організмі у необхідних кількостях. При цьому вуглецева частина амінокислоти утворюється з глюкози, а  $\alpha$ -аміногрупа вводиться з інших амінокислот трансамінуванням [20]. Слід відмітити, що у всіх варіантах нашого експерименту у культуральній рідині зростала концентрація

аргініну, гліцину, аланіну і глутаміну, які є замінними амінокислотами, а серину і аспарагінової кислоти, навпаки, знижувалася. Таку закономірність можна пояснити тим, що гліцин синтезується з серину під дією сериноксиметилтрансферази за наявності тетрагідрофолієвої кислоти. Серин утворюється з гліколітичного проміжного продукту 3-фосфогліцерату. Аланін, аспартат (попередник аспарагіну), глутамат (попередник глутаміну, аргініну) утворюються із пірувату, оксалоацетату й  $\alpha$ -кетоглутарату – відповідно. Аргінін у клітині є джерелом NO [21]. Під дією аргінази він 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. Їхня концентрація сильно зростає при інтенсивній проліферації тканин. Отримані нами результати подібні до даних досліджень Нігуєра та співавт., які за допомогою рідинної хроматографії встановили 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 [22].

Отримані нами результати свідчать, що поєднаний вплив гіпоксії (3 або 5%  $O_2$ ) і сірководню знижує проліферативну активність клітин лінії 4BL людини. Зменшувалася концентрація вільних амінокислот у культуральній рідині, що беруть участь у синтезі колагену (проліну і оксипролін) та інших білків. Підвищувалася концентрація амінокислот (гліцину, аланіну, аргініну, глутаміну), які можуть включатися в енергетичний обмін.



## ВИСНОВКИ

1. У культуральній рідині всіх дослідних груп клітин лінії 4BL людини під сумісним впливом зниженої концентрації кисню (5 або 3% O<sub>2</sub>) та донора сірководню (10<sup>-12</sup> моль/л NaHS) вірогідно підвищувалася концентрація трьох фракцій амінокислот: аргініну, гістидину і таурину; гліцину і метіоніну; аланіну і глутаміну. Концентрація цистеїну і цистину, серину і аспарагінової кислоти, валіну і триптофану, проліну і оксипроліну знизилася відносно контрольних значень.

2. Додавання NaHS (10<sup>-12</sup> моль/л) у живильне середовище при 21% O<sub>2</sub> гальмувало проліферацію клітин лінії 4BL людини в 1,4-1,7 раза.

3. Донор сірководню, в умовах зниженої концентрації кисню (5 або 3% O<sub>2</sub>), пригнічував проліферацію клітин на 4-ту добу культивування на 33 та 54% відповідно порівняно з контролем.

4. Знижений парціальний тиск кисню здатний посилювати негативний вплив H<sub>2</sub>S на проліферацію стовбурових клітин людини, тому культивування при сумісній дії цих двох факторів не сприяє фізіологічному розмноженню клітин.

Л.Н. Плотнікова, В.А. Березовський,  
С.П. Весельський

## ВЛИЯНИЕ Пониженной Концентрации Кислорода и Сероводорода на Аминокислотный Метаболизм и Пролиферацию Мезенхимальных Клеток

Исследовано влияние донора сероводорода (10<sup>-12</sup> моль/л NaHS – I группа) отдельно и вместе с пониженной концентрацией кислорода (5% O<sub>2</sub> – II группа, 3% O<sub>2</sub> – III группа, 24 ч) на жизнедеятельность культуры стволовых клеток человека. Показано, что пролиферация клеток снижалась на 3-и сутки культивирования в I, II и III группе в 1,7; 2,8 и 4,2 раза. На 4-е сутки этот показатель был меньше в I, II и III группе на 29; 33 и 54% по сравнению с контролем. Итак, неблагоприятное воздействие NaHS усиливалось при снижении концентрации кислорода. Установлено, что во всех опытных вариантах интенсивно поглощались из питательной среды аминокислоты: цистеин и цистин,

серин и аспарагиновая кислота, валин и триптофан, пролин и оксипролин, которые участвуют в синтезе белков, в частности коллагена. В культуральной жидкости повышалась концентрация свободных аминокислот трех фракций: аргинина, гистидина и таурина; глицина и метионина; аланина и глутамина. Считаем, что в примененной концентрации донор сероводорода в условиях пониженного содержания кислорода в газовой среде инкубирования тормозит пролиферацию и изменяет аминокислотный метаболизм клеток линии 4BL человека.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; сероводород; аминокислотный состав; пролиферация.

L.N. Plotnikova, V.A. Berezovskii, S.P. Veselskii

## EFFECT OF REDUCED OXYGEN CONCENTRATIONS AND HYDROGEN SULFIDE ON THE AMINO ACID METABOLISM AND MESENCHYMAL CELLS PROLIFERATION

We investigated the effect of hydrogen sulfide donor (10<sup>-12</sup> mol/l NaHS – I group) alone and together with the reduced oxygen concentrations (5% O<sub>2</sub> – II group, 3% O<sub>2</sub> – III group, 24 h) on the biological processes of human stem cells culture. It was shown that the cells proliferation by the third day of cultivation in I, II and III group decreased 1,7; 2,8 and 4,2 times. On the 4<sup>th</sup> day of culture proliferation inhibited in I, II and III group by 29; 33 and 54% compared to the control. Thus, adverse effects NaHS enhanced by reducing the oxygen concentration. It was established that in all experimental versions rapidly absorbed from the culture medium amino acids: cysteine and cystine, serine and aspartic acid, valine and tryptophan, proline and hydroxyproline, which are involved in the synthesis of proteins, in particular collagen. In the culture medium increased the concentration of free amino acids of the three factions: arginine, histidine and taurine; glycine and methionine; alanine and glutamine. We believe that in the applied concentration of hydrogen sulfide donor in conditions of low oxygen in a gaseous medium incubation inhibits the proliferation and alters the amino acid metabolism of human cells line 4BL.

Key words: mesenchymal stem cells; hydrogen sulphide; amino acid composition; proliferation.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv*

*Peter Bogach Institute of Physiology ESC «Institute of biology» T.Shevchenko Kyiv National University*

## REFERENCES

1. Lisiany NI. Mesenchymal stem cells and immunological properties. *Fiziol Zh.* 2013;59(3):126-34.
2. Margini C, Vukotic R, Brodosi L, Bernardi M, Andreone P. Bone marrow derived stem cells for the treatment

- of end-stage liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(27):9098-105.
3. Wang X, Zhang H, Nie L, Xu L, Chen M, Ding Z. Myogenic differentiation and reparative activity of stromal cells derived from pericardial adipose in comparison to subcutaneous origin. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(4):92.
  4. Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, Zhamalova AP, Kozionova MP. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension. *Cytology.* 2009;51(1):5-11.
  5. Rylova YuV, Buravkova LB. Long-term expansion of multipotent mesenchymal stromal cells under reduced oxygen tension. *Cytology.* 2013;55(12):852-60.
  6. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal.* 2010;8:18-27.
  7. Liu D, Wang Z, Zhan J, Zhang Q, Wang J, Zhang Q, Xian X, Luan Q, Hao A. Hydrogen sulfide promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells and protects hypoxia-induced decrease in hippocampal neurogenesis. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;116:55-63.
  8. Sheng J, Shim W, Wei H, Lim S, Liew R, Lim T, Ong B, Chua Y, Wong Ph. Hydrogen sulfide suppresses human atrial fibroblast proliferation and transformation to myofibroblasts. *J Cell Mol Med.* 2013;17(10):1345-54.
  9. Lukash L, Yatsishina A, Kushniruk V, Pidpala O. Reprogramming of somatic cells in the adult human in vitro. *Factors Exp Evol Organisms.* 2011;11:493-8.
  10. Adams R. *Methods of cell culture for biochemists.* Moscow: Mir. 1983:264p.
  11. Kaznacheeva A, Zlydnev N. The content of free amino acids in healthy blood plasma, erythrocytes and urine. *Lab Work.* 1976;8:479-80.
  12. Korobeinikova E, Meshcheriakova G. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. *Lab Work.* 1981;4:221-4.
  13. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino acids.* 2010;45:56-61.
  14. Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* 2004;18(10):1165-7.
  15. Strutynska N, Semenykhina S, Vavilova G, Sagach V. Hydrogen sulfide inhibits Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh.* 2011;57(6):3-14.
  16. Liu Y, Yang R, Liu X, Zhou Y, Qu C, Kikui T, Wang S, Zandi E, Du J, Ambudkar IS, Shi S. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca(2+) channel sulphydration. *Cell Stem Cell.* 2014;15(1):66-78.
  17. Okada M, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Fukuda M, Ono S, Haapasalo M. Hydrogen sulphide increases hepatic differentiation of human tooth pulp stem cells compared with human bone marrow stem cells. Article first published online: 20 MAR 2014. DOI: 10.1111/iej.12262.
  18. Chen G, Wang J. Threonine metabolism and embryonic stem cell self-renewal. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 2014;17(1):80-5.
  19. Aniskina A, Chalisova N, Zakutskiy A, Komashnya A, Philippov S, Zezyulin P. Effect of amino acids on cell proliferation and apoptosis in organotypic tissue culture of rats of various age. *Adv Gerontol.* 2006;19:55-9.
  20. Gaspar JA, Doss MX, Hengstler JG, Cadenas C, Hescheler J, Sachinidis A. Unique metabolic features of stem cells, cardiomyocytes, and their progenitors. *Circulation Research.* 2014;114:1346-60.
  21. Guoyao WU, Sidney M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998;336:1-17.
  22. Higuera GA, Schop D, Spitters TW, van Dijkhuizen-Radersma R, Bracke M, de Bruijn JD, Martens D, Karperien M, van Boxtel A, van Blitterswijk CA. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(5-6):654-64.

*Матеріал надійшов  
до редакції 08.09.1014*