

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИИ С МОЛ. МАССОЙ ДО 5 кДа КОРДОВОЙ КРОВИ И «АКТОВЕГИНА» НА РОСТ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК

© А. К. Гулевский,¹ А. В. Трифонова,¹ А. А. Лаврик²

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков,

и ² Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов УААН, Киев;

¹ электронный адрес: trifonova_ann@rambler.ru

Изучено влияние фракции, полученной из кордовой крови крупного рогатого скота, с мол. массой компонентов до 5 кДа на адгезивные и пролиферативные свойства перевиваемых линий ВНК-21 клон 13/04 и РК-15-IECVМ в сравнении с препаратом «Актовегин». Показано, что включение указанной фракции и «Актовегина» в состав ростовых сред не влияет на эффективность прикрепления культур, ускоряет распластывание культур и улучшает морфологию их клеток, а также стимулирует митотическую активность культур. Установлена большая эффективность по исследуемым показателям фракции до 5 кДа кордовой крови по сравнению с «Актовегином» при культивировании в средах с различным содержанием сыворотки крови.

Ключевые слова: фракция до 5 кДа из кордовой крови, «Актовегин», перевиваемые культуры клеток, адгезия, митотический режим, пролиферация.

Принятые сокращения: ИП — индекс пролиферации, КРС — крупный рогатый скот, ФКК — фракция до 5 кДа, полученная из кордовой крови крупного рогатого скота.

В предыдущих исследованиях была показана способность низкомолекулярной фракции (до 5 кДа), полученной нами из цельной кордовой крови КРС, стимулировать регенерацию кожи (Гулевский и др., 2008б), слизистой оболочки желудка (Гулевский др., 2007) и хряща коленного сустава (Гулевский др., 2009а) у экспериментальных животных. Влияние указанной фракции по ряду показателей превосходило действие известного в клинической практике препарата «Актовегин», созданного на основе фракции крови молочных телят с аналогичной молекулярной массой компонентов.

Остается неясным, в какой мере эффект стимуляции репаративной регенерации тканей фракцией до 5 кДа из кордовой крови связан с ее непосредственным влиянием на клеточном уровне. Относительно «Актовегина» было установлено, что при его добавлении в ростовые среды следующих клеточных культур — фибробластов мыши (Riede et al., 1974) и человека (Al-Watban, Andres, 2001), различных клеток эмбрионального происхождения (Lindner et al., 1977; Brasseur, De Paermentier, 1979; Tsutsui et al., 1984), перевиваемых культур СНО (Al-Watban, Andres, 2001) и V 79 (Miltenburger, 1985) и культуры моноцит-макрофагов (Spessotto et al., 1993) — происходило увеличение пролиферации и миграции клеток, повышение количества митозов, а также улучшение клеточной морфологии.

В наших исследованиях (Гулевский и др., 2009б) при культивировании диплоидной культуры эмбриональных фибробластов человека было показано ускорение распластывания данной культуры и увеличение ее пролиферации под влиянием препарата «Актовегин». Фракция до

5 кДа из кордовой крови также оказывала влияние на эти показатели, однако ее стимулирующее действие на данной культуре было аналогичным действию «Актовегина».

Изучали действие фракции (до 5 кДа), полученной из кордовой крови КРС, в сравнительном аспекте с препаратом «Актовегин» на других клеточных культурах с целью выяснения универсальности биологического действия указанных низкомолекулярных фракций крови.

Материал и методика

Исследования были выполнены на двух перевиваемых культурах клеток ВНК-21 клон 13/04 (почка новорожденного сирийского хомячка) и РК-15-IECVМ (почка свиньи), которые были получены из коллекции клеточных культур ННЦ «ИЭКВМ» УААН (Харьков, Украина). Стандартным условием для линии ВНК-21 клон 13/04 было культивирование на среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крови КРС (HyClone, США). Посевная концентрация клеток составляла $0.6\text{--}0.8 \cdot 10^5$ на 1 мл ростовой среды. Линию РК-15-IECVМ культивировали на смеси (1 : 1) сред 199 и Игла DMEM (ВетМед, Украина) с добавлением 10 % сыворотки крови КРС (ВетМед, Украина). Посевная концентрация клеток составляла $0.7\text{--}0.9 \cdot 10^5$ на 1 мл ростовой среды.

Выделение фракции с мол. массой компонентов до 5 кДа проводили методом ультрафильтрации (Брок, 1987) с использованием мембранного модуля Vivaflow-200 (Sartorius, Германия) из цельной кордовой крови КРС,

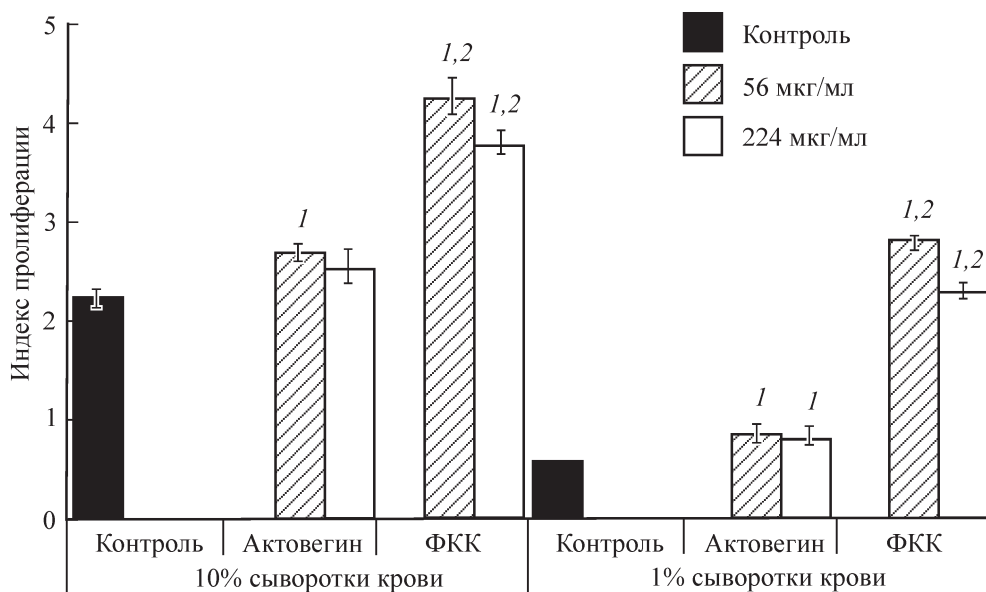


Рис. 1. Показатели пролиферации перевиваемой линии ВНК-21 клон 13/04 при содержании различных концентраций ФКК и «Актовегина» в ростовой среде.

1 — различия статистически достоверны по сравнению с соответствующим контролем ($P < 0.05$), 2 — различия достоверны между соответствующими концентрациями ФКК и «Актовегина» при добавлении в одинаковые среды культивирования (10 и 1 % сыворотки крови) ($P < 0.05$).

подвергнутой криодеструкции. Полученный объем ФКК лиофилизировали. Перед применением сухую фракцию разводили стерильным 0.9%-ным раствором NaCl.

Препарат «Актовегин» использовали в виде готового раствора для инъекций с содержанием сухого вещества 40 мг/мл. ФКК и «Актовегин» добавляли в ростовую среду культур клеток при их посевах в культуральные флаконы в двух концентрациях — 56 и 224 мкг/мл, которые были рассчитаны нами исходя из инструкции по применению «Актовегина» в клинике. Контролем служил рост клеточных культур в среде культивирования без добавления изучаемых препаратов.

Скорость пролиферации культур оценивали по отношению количества снятых клеток через 96 ч культивирования к количеству посеянных клеток на 1 мл ростовой среды. Выражали рост культур через индекс пролиферации. Через 96 ч культивирования все изученные культуры в указанных посевных концентрациях не достигали конfluence в контроле при стандартных условиях культивирования. Эффективность прикрепления определяли путем подсчета неприкрепившихся клеток через 24 ч после посева (Davis, 2001). Концентрацию клеток в исследуемые сроки подсчитывали в камере Горяева стандартным лабораторным методом. Прижизненную оценку морфологии клеток монослоя проводили с применением инвертированного микроскопа фирмы Zeiss через 24 и 96 ч роста культуры.

Изучение митотического режима клеточных культур проводили на препаратах клеток, выращенных на покровных стеклах, которые фиксировали каждые 24 ч. Клетки окрашивали гематоксилином Карачи. Митотическую активность определяли по общему числу делящихся клеток на 1000 посчитанных. Показатель митотической активности выражали в промилле (‰). Количество патологических форм митоза учитывали одновременно с проведением анализа митотической активности. Долю (в %) патологических делений определяли по отношению к среднему количеству выявленных митозов (Блюмкин, Жданов, 1973).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета Statgraphic plus for Windows, версии 2.1 непараметрическим методом при помощи критерия Манна—Уитни (Уилкинсона). Результаты представлены как $M \pm m$. Уровень достоверности составлял 0.05.

Результаты и обсуждение

На первом этапе нашей работы мы проводили изучение влияния ФКК и «Актовегина» в различных концентрациях на пролиферативные показатели клеточных культур. ИП через 96 ч культивирования линии ВНК-21 клон 13/04 в стандартных условиях составлял 2.23 ± 0.08 . При добавлении ФКК в концентрации 56 мкг/мл ИП культуры в эти же сроки составил 4.23 ± 0.21 , а в концентрации 224 мкг/мл — 3.79 ± 0.12 , что соответственно на 89 и 70 % выше, чем в контроле. Влияние «Актовегина» на рост культуры в стандартных условиях было значительно ниже. Достоверные отличия от контроля были получены при добавлении «Актовегина» в концентрации 56 мкг/мл. ИП в этом варианте составил 2.68 ± 0.09 , что превысило контрольные значения на 20 % (рис. 1).

Снижение сыворотки крови в среде культивирования до 1 % приводило к значительному ухудшению состояния культуры ВНК-21 клон 13/04. Прижизненное наблюдение показало, что при таких условиях культивирования не происходило формирования монослоя и изменялась морфология клеток (рис. 2, б). ИП в исследуемые сроки составлял 0.55 ± 0.02 , что говорит о гибели культуры.

Добавление ФКК в изучаемых концентрациях в ростовую среду с пониженной концентрацией сыворотки крови при культивировании указанной перевиваемой линии способствовало значительной стимуляции ($P < 0.05$) ее пролиферации. Пролиферативные показатели превысили контрольные значения в 5 раз при добавлении ФКК в концентрации 56 мкг/мл и в 4.17 раза — при добавлении в

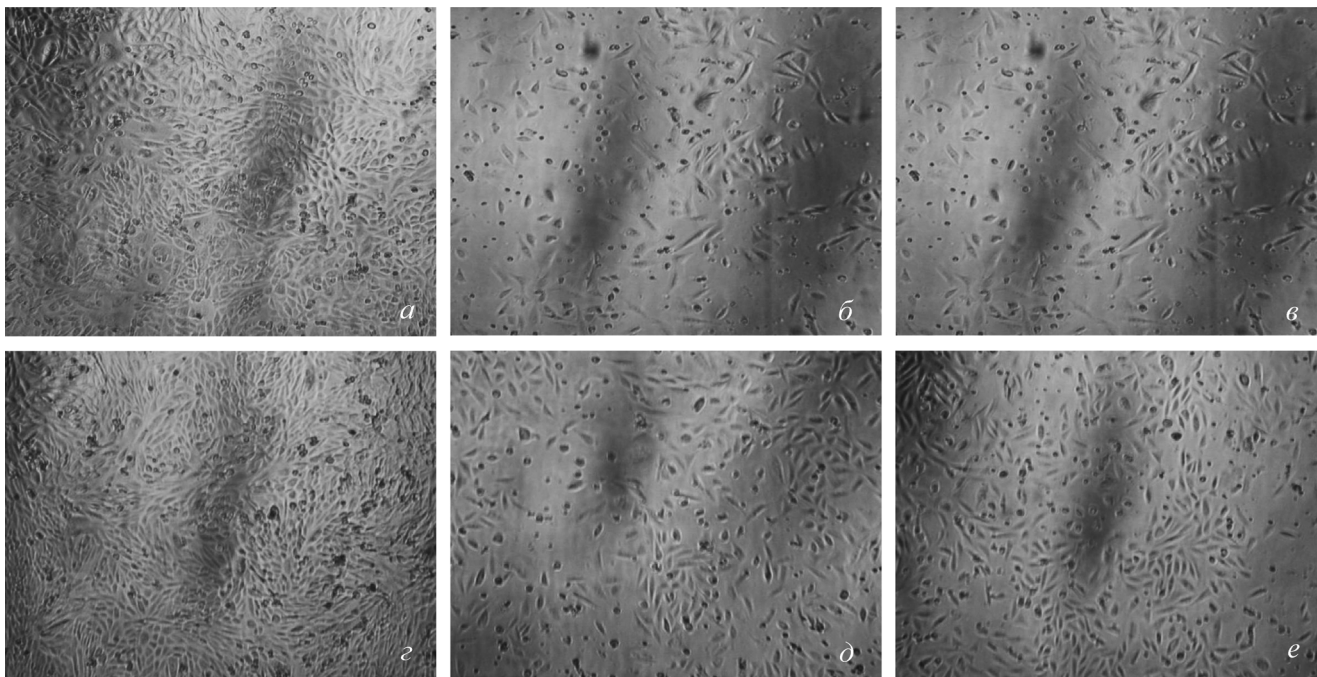


Рис. 2. Линия ВНК-21 клон 13/04 через 96 ч культивирования в различных вариантах ростовой среды.

a — в стандартных условиях, *б* — контроль (1 % сыворотки крови), *в* — с добавлением ФКК в концентрации 56 мкг/мл, *г* — с добавлением ФКК в концентрации 224 мкг/мл, *д* — с добавлением «Актовегина» в концентрации 56 мкг/мл, *е* — с добавлением «Актовегина» в концентрации 224 мкг/мл. 450×.

концентрации 224 мкг/мл, что значительно превысило показатели пролиферации при добавлении «Актовегина». При добавлении «Актовегина» в концентрации 56 мкг/мл ИП культуры составил 0.84 ± 0.03 , а в концентрации 224 мкг/мл — 0.80 ± 0.03 , что на ~50 % выше контрольных значений (рис. 1).

Прижизненное наблюдение показало, что в исследуемые сроки в вариантах с добавлением ФКК в среды с пониженной концентрацией сыворотки крови происходит формирование монослоя культуры и нормализуется морфология ее клеток, чего не наблюдается в вариантах с добавлением «Актовегина» (рис. 2).

На рис. 1 также можно видеть, что при культивировании линии ВНК-21 клон 13/04 в среде, содержащей 1 % сыворотки крови, добавление ФКК стимулировало пролиферацию культуры и позволяло достичь пролиферативных показателей при росте этой культуры в стандартных условиях. «Актовегин» в условиях значительного дефицита сыворотки крови в ростовой среде, вероятно, оказывал только протекторное действие на клетки, несколько замедляя гибель культуры.

Перевиваемая культура РК-15-IECVМ в стандартных условиях культивирования, так же как и ВНК-21 клон 13/04, имеет высокую скорость роста. ИП через 96 ч культивирования составил 2.44 ± 0.10 . При добавлении ФКК в эти условия ИП составил в концентрации 56 мкг/мл 3.44 ± 0.09 , а в концентрации 224 мкг/мл — 3.21 ± 0.08 , что соответственно на 40.5 и 31.5 % выше, чем в контроле. Влияние «Актовегина», как и в культуре ВНК-21 клон 13/04, было значительно меньше. Достоверное увеличение пролиферативных показателей культуры происходило только при его добавлении в концентрации 56 мкг/мл — на 13.7 % (рис. 3).

Понижение концентрации сыворотки крови в ростовой среде культуры РК-15-IECVМ до 1 % приводило к

снижению ИП через 96 ч культивирования более чем в 2 раза, что означает еще большую гибель клеток этой культуры, чем клеток ВНК-21 клон 13/04 при такой же концентрации сыворотки. Вероятно, это связано с использованием при культивировании линии РК-15-IECVМ сыворотки крови взрослых животных, которая обладает худшими ростостимулирующими свойствами, чем эмбриональная сыворотка. Добавление в среду культивирования линии РК-15-IECVМ 2 % сыворотки крови оказалось достаточным для обеспечения ее пролиферации, однако скорость роста была несколько меньше, чем в стандартных условиях культивирования. ИП составил 1.67 ± 0.07 , что ниже на 31.5 %, чем при росте культуры в стандартных условиях. Поэтому на данной культуре мы проводили изучение влияния ФКК и «Актовегина» на фоне сниженной до 2 % концентрации сыворотки крови в среде культивирования.

При добавлении ФКК в концентрации 56 мкг/мл в данные условия культивирования линии РК-15-IECVМ ИП составил 3.18 ± 0.11 , что превысило контрольные значения на 90 %. ИП при добавлении ФКК в концентрации 224 мкг/мл составил 2.66 ± 0.07 , что на 59 % выше, чем в контроле. Добавление «Актовегина» достоверно стимулировало пролиферацию культуры относительно контроля только в концентрации 56 мкг/мл — на 39 %.

Таким образом, изучение роста перевиваемых культур ВНК-21 клон 13/04 и РК-15-IECVМ выявило следующие закономерности. Больше ростостимулирующее влияние оказывало добавление как ФКК, так и «Актовегина» в концентрации 56 мкг/мл. При культивировании обеих культур в стандартных условиях действие «Актовегина» слабо выражено. При создании неблагоприятных условий для роста культур, таких как снижение концентрации сыворотки крови в ростовой среде, стимулирующее действие ФКК и «Актовегина» значительно более выражено,

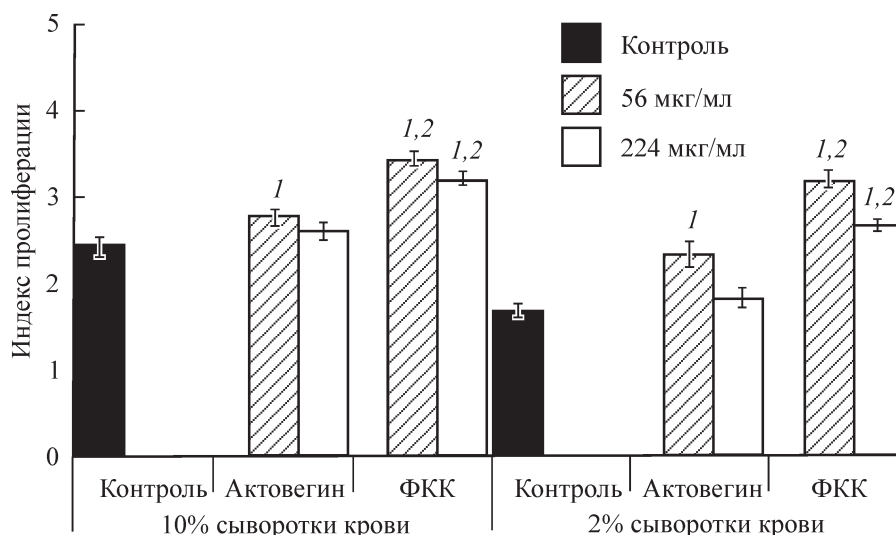


Рис. 3. Показатели пролиферации перевиваемой линии РК-15-IECVL при содержании различных концентраций ФКК и «Актовегина» в ростовой среде.

1 — различия статистически достоверны по сравнению с соответствующим контролем ($P < 0.05$), 2 — различия достоверны между соответствующими концентрациями ФКК и «Актовегина» при добавлении в одинаковые среды культивирования (10 и 2 % сыворотки крови) ($P < 0.05$).

чем при росте культуры в стандартных условиях. Установлено, что клетки линии РК-15-IECVL менее чувствительны к действию ФКК и «Актовегина», чем клетки линии ВНК-21 клон 13/04.

Данные, полученные нами относительно влияния «Актовегина» на рост клеточных культур ВНК-21 клон 13/04 и РК-15-IECVL, согласуются с данными (Lindner et al., 1977; Miltenburger, 1985; Spessotto et al., 1993; Tominaga et al., 1996; Al-Watban, Andres, 2001), где также было показано, что положительный эффект наблюдался как в средах с нормальным для данной культуры количеством сыворотки крови в ростовой среде, так и при ее понижен-

ном содержании, а степень его выраженности зависела от количества вносимого «Актовегина».

Известно, что для роста монослойных культур необходимо успешное прохождение нескольких этапов: прикрепление клеток к субстрату, их распластывание с формированием характерной морфологии, подготовка и осуществление процессов деления (Фрешни, 1989; Дьяконов, Ситьков, 2000). Мы провели изучение влияния ФКК и «Актовегина» на протекание этих этапов в концентрации 56 мкг/мл, которая, как было установлено, оказывает большой стимулирующий эффект на рост перевиваемых культур.

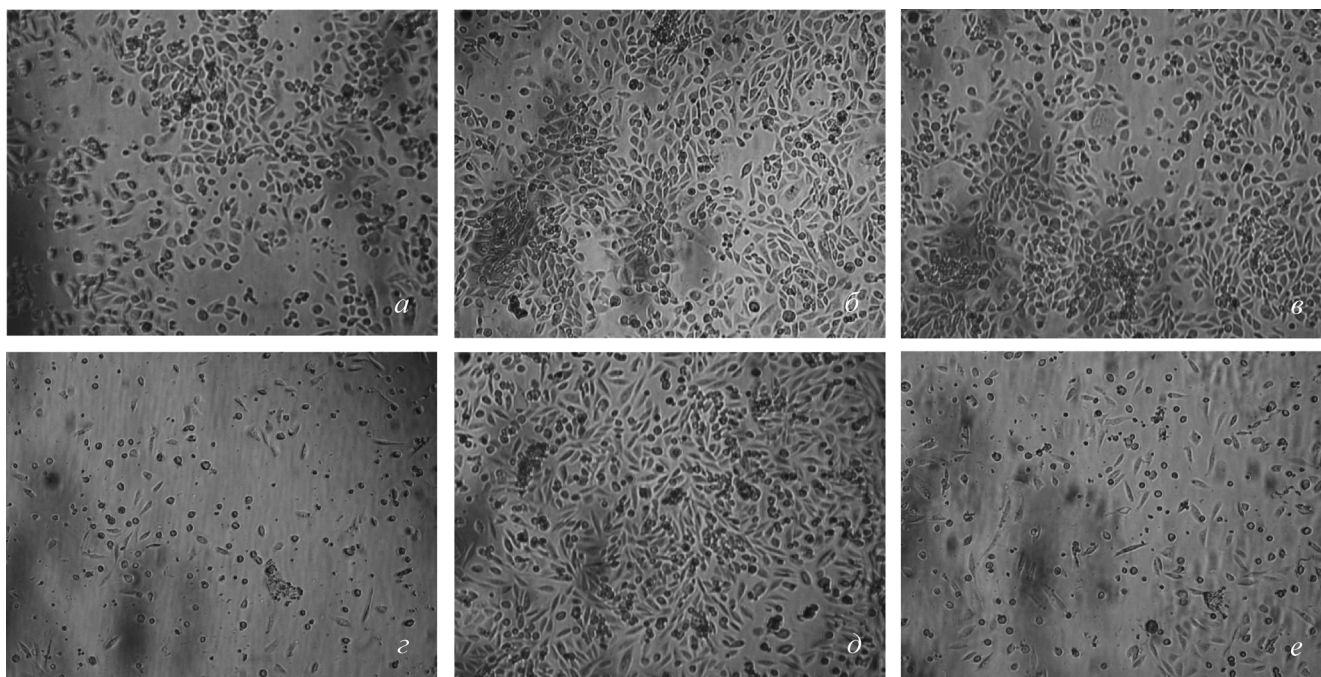


Рис. 4. Морфология клеток линии ВНК-21 клон 13/04 через 24 ч роста в различных вариантах ростовой среды.

а–в — в стандартных условиях культивирования; г–е — на фоне 1 % сыворотки крови; а, г — контроль; б, д — с добавлением ФКК в концентрации 56 мкг/мл; в, е — с добавлением «Актовегина» в концентрации 56 мкг/мл. 450×.

Эффективность прикрепления клеток линии ВНК-21 клон 13/04 при культивировании в стандартных условиях составила 90.2 ± 0.4 %. Добавление в этих условиях как ФКК, так и «Актовегина» влияния на этот показатель не оказывало. При снижении сыворотки крови в среде культивирования до 1 % изменения эффективности прикрепления культуры не происходило, так же как и при добавлении в эти условия ФКК и «Актовегина».

Прижизненное изучение состояния культуры ВНК-21 клон 13/04 в эти же сроки наблюдения (24 ч) позволило выявить следующие закономерности. При культивировании в стандартных условиях (рис. 4, а—в) во всех вариантах прикрепившиеся клетки хорошо распластаны и большинство клеток приобрело характерную для начальных этапов роста данной культуры эпителиоподобную морфологию. В вариантах с добавлением ФКК и «Актовегина» в исследуемые сроки можно видеть большее количество клеток на подложке, что свидетельствует о более активном росте культуры уже на ранних сроках после посева.

Снижение в ростовой среде концентрации сыворотки крови до 1 % приводит к нарушению процессов роста культуры уже на этапе распластывания клеток (рис. 4, з). В контроле часть прикрепленных клеток остаются нераспластанными, большинство клеток находится на начальных стадиях распластывания и небольшая часть хорошо распластывается, однако эпителиоподобной морфологии клеток не формируется. При добавлении ФКК происходит нормализация морфологии клеток и активизация процессов роста культуры (рис. 4, д). Добавление «Актовегина» лишь незначительно улучшает процессы распластывания культуры по сравнению с контролем (рис. 4, е).

Проведенные исследования позволили установить, что ФКК и «Актовегин» не оказывают влияния на способность клеток культуры ВНК-21 клон 13/04 прикрепляться к подложке. Однако добавление ФКК в ростовые среды значительно улучшает распластывание клеток и ускоряет протекание процессов адгезии. Стимулирующее влияние «Актовегина» на эти процессы менее выражено.

Известно, что после прикрепления и формирования характерной морфологии на субстрате в клетках запускаются такие процессы, как подготовка к делению, перестройки цитоскелета, регуляция экспрессии генов (Folkman, Moscona, 1978; Мушкхамбаров, Кузнецов, 2003). Следовательно, ускорение прохождения клеткой этапа адгезии способствует более ранней активации в ней процессов деления. Мы провели изучение митотического режима культуры ВНК-21 клон 13/04 при добавлении ФКК и «Актовегина» в ростовые среды с различным содержанием сыворотки крови.

Установлено, что пик митотической активности линии ВНК-21 клон 13/04 при культивировании в стандартных условиях приходится на 2-е и 3-и сут роста культуры и составляет 33—36 % (рис. 5, а). Добавление ФКК в этих условиях увеличивало количество делящихся клеток относительно контроля в 1-е сут роста на 64.3 %, во 2-е — на 54.8 %, на 3-и — на 20.6 %. При добавлении «Актовегина» количество митозов превышало контроль: в 1-е сут на 18.7 %, во 2-е — на 17 %, на 3-и — на 16.5 %.

Как можно видеть из представленных данных, добавление ФКК значительно увеличивает количество делящихся клеток в 1-е сут, что согласуется с высказанным предположением о ранней активации процессов деления культуры. Снижение стимулирующего действия ФКК относительно контроля на 3-и сут роста культуры, очевидно, связано с образованием в этом варианте конfluence

энтного монослоя и возникновением контактного торможения.

Как было показано ранее, при культивировании линии ВНК-21 клон 13/04 в ростовой среде, содержащей 1 % сыворотки крови, наблюдается гибель культуры, однако полной остановки деления клеток не происходит. Митотический индекс составляет во все сутки роста культуры от 5.3 до 7.7 %, однако ~50 % из них составляют клетки в стадии профазы. При резком снижении концентрации сыворотки крови в ростовой среде делятся либо клетки, которые оказались наименее требовательны к количеству ростовых факторов, вносимых с сывороткой, либо клетки, осуществившие процессы подготовки к делению еще на предыдущем пассаже. Клетки, которые более требовательны к факторам ростовой среды, погибают или входят в состояние пролиферативного покоя.

Добавление ФКК в ростовую среду, содержащую 1 % сыворотки крови, в 1-е сут роста культуры приводит к повышению количества митозов относительно контроля в 4.7 раза, а добавление «Актовегина» — в 2.6 раза. На 2-е сут добавление ФКК стимулирует митотическую активность культуры в 4.9 раза, добавление «Актовегина» — в 2.4 раза. На 3-и сут роста культуры стимулирующее действие «Актовегина» снижается и составляет 1.6 раза относительно контроля, в то время как влияние ФКК остается на прежнем уровне. Ранее (Гулевский и др., 2008д) при изучении митотического режима культуры РК-15-IECVМ было показано снижение стимулирующего действия «Актовегина» на 3-и сут роста культуры при его добавлении в среду с пониженной концентрацией сыворотки крови. В обоих случаях, как мы предполагаем, это связано с исчерпыванием в среде сывороточных ростовых факторов, в отсутствие которых «Актовегин» не может реализовывать свое стимулирующее действие. Добавление ФКК в ростовую среду с пониженной концентрацией сыворотки крови, вероятно, компенсирует недостаток ростовых факторов, что стимулирует деление клеток до достижения культурой конfluence монослоя.

Параллельно с митотическим индексом мы подсчитывали количество патологических форм деления клеток. Установлено, что при культивировании линии ВНК-21 клон 13/04 в стандартных условиях количество патологических делений составляет от 12.3 ± 3.3 % (1-е сут) до 17.9 ± 1.7 % (3-и сут) от общего количества наблюдаемых митозов. Понижение концентрации сыворотки крови в ростовой среде не вызывало изменения этого показателя. В вариантах с добавлением ФКК и «Актовегина» количество патологических митозов также достоверно не отличалось от соответствующих контролей.

Проведенное изучение митотического режима линии ВНК-21 клон 13/04 показало, что добавление ФКК и «Актовегина» в ростовые среды активировало начало процессов деления культуры, стимулировало деление клеток до достижения культурой конfluence и не оказывало токсического действия на хромосомный и митотический аппараты клеток.

Однонаправленность влияния обеих исследуемых фракций по всем изученным показателям может объясняться общим механизмом действия, связанным с активацией потребления и утилизации глюкозы и кислорода, что доказано в многочисленных работах в отношении «Актовегина» (Schnellen, 1968; Saltiel, Cuatrecasas, 1986, и др.). Полученные нами ранее данные в сравнительных исследованиях влияния ФКК и «Актовегина» на уровень глюкозы в крови экспериментальных животных после

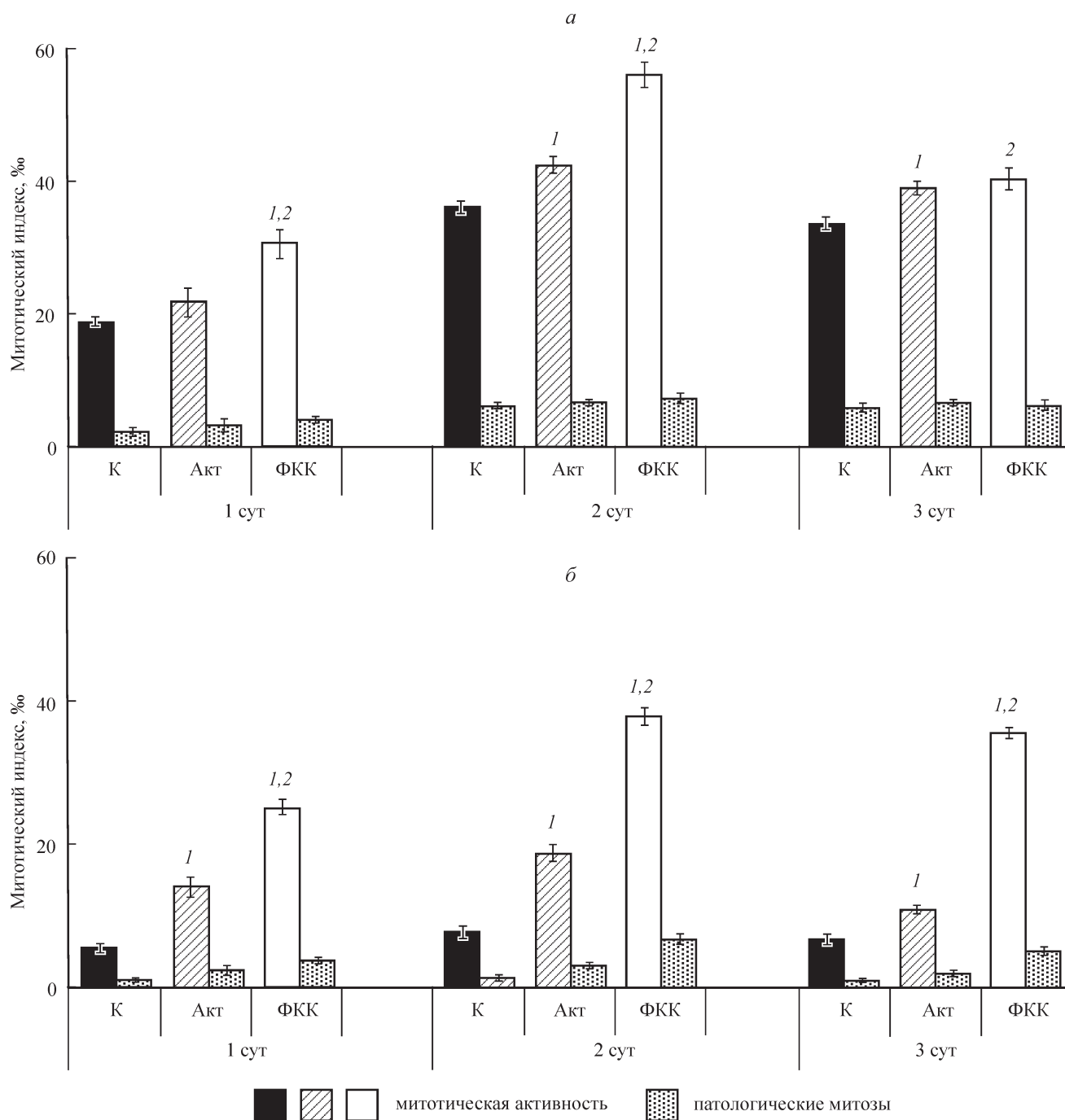


Рис. 5. Митотический режим культуры ВНК-21 клон 13/04 при добавлении ФКК и «Актовегина» в ростовую среду.

а — 10 % сыворотки крови в ростовой среде; б — 1 % сыворотки крови в ростовой среде. 1 — различия статистически достоверны по сравнению с соответствующим контролем ($P < 0.05$), 2 — различия достоверны между соответствующими вариантами с добавлением «Актовегина» и ФКК ($P < 0.05$).

глюкозной нагрузки подтверждают это предположение (Гулевский и др., 2008г). Вместе с тем, судя по данным хроматографии, химический состав ФКК и «Актовегина» существенно различается (Гулевский и др., 2008а, 2008в), что может объяснять различия в биологической активности сравниваемых субстанций.

Таким образом, полученные данные позволили установить, что низкомолекулярные компоненты, содержащиеся во фракции до 5 кДа из кордовой крови КРС и препарате «Актовегин», оказывают существенное стимулирующее влияние на такие этапы роста клеточных культур ВНК-21 клон 13/04 и РК-15-IECVМ, как скорость их рас-

пластывания, подготовка к делению и митотическая активность, и не влияют на способность культур прикрепляться к субстрату. Показано, что влияние, оказываемое ФКК на рост изученных перевиваемых культур, значительно превышает действие препарата «Актовегин». Проведенные исследования подтвердили предположение об универсальности биологического действия *in vitro* низкомолекулярных фракций кордовой крови и крови молочных телят, однако выраженность их стимулирующего действия различна для разных клеточных культур. Результаты данной работы в перспективе позволят обосновать применение фракции до 5 кДа из кордовой крови

КРС и препарата «Актовегин» в качестве ростостимулирующих добавок к стандартным питательным средам.

Работа выполнена при финансовой поддержке НАН Украины (проект 2.2.6.21 № ГР 0105U003917).

Список литературы

- Блюмкин В. Н., Жданов В. М. 1973. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. М.: Медицина. 267 с.
- Брок Т. 1987. Мембранная фильтрация. М.: Мир. 464 с.
- Гулевский А. К., Абакумова Е. С. 2007. Перспективы применения низкомолекулярной фракции кордовой крови в лечении язвенной болезни желудка. Трансплантология. 9 (1) : 63—65.
- Гулевский А. К., Абакумова Е. С., Моисеева Н. Н., Долгих О. Л. 2008а. Влияние фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка у крыс. Укр. биохим. журн. 80 (2) : 92—99.
- Гулевский А. К., Грищенко В. И., Иванов Е. Г. 2009а. Эффект стимуляции метаболизма в хрящевой ткани после механической травмы под влиянием низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови. Доповіді НАН України. 9 : 195—199.
- Гулевский А. К., Грищенко В. И., Моисеева Н. Н., Абакумова Е. С., Никольченко А. Ю., Щенявский И. И., Долгих О. Л. 2008б. Эффект стимуляции репаративных процессов под влиянием фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота. Доповіді НАН України. 2 : 157—160.
- Гулевский А. К., Моисеева Н. Н., Абакумова Е. С., Щенявский И. И., Никольченко А. Ю., Долгих О. Л., Трифонова А. В., Иванов Е. Г. 2008в. Исследование биологической активности фракции до 5 кДа из криогемолизата кордовой крови крупного рогатого скота. Проблемы криобиологии. 18 (4) : 531—534.
- Гулевский А. К., Никольченко А. Ю., Щенявский И. И. 2008г. Сахароснижающий эффект фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота. В кн.: Ветеринарна медицина. X. 1 : 144—147.
- Гулевский А. К., Трифонова А. В., Лаврик А. А. 2008д. Влияние актовегина на пролиферацию клеток перевиваемых линий. Цитология и генетика. 42 (1) : 53—57.
- Гулевский А. К., Трифонова А. В., Петренко Т. Ф. 2009б. Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции из кордовой крови на адгезию и пролиферацию культуры фибробла-

стов человека после криоконсервации. Проблемы криобиологии. 19(4) : 395—405.

Дьяконов Л. П., Ситьков В. И. 2000. Животная клетка в культуре. М. 369 с.

Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С. Л. 2003. Молекулярная биология: Учебное пособие для студентов мед. вузов. М.: ООО «Медицинское информационное агентство». 544 с.

Фрешии Р. 1989. Культура животных клеток. М.: Мир. 333 с.

Al-Watban F. A., Andres B. L. 2001. The effect of He-Ne laser (632.8 nm) and Solcoseryl *in vitro*. Lasers Med. Sci. 16 : 267—275.

Brasseur R., De Paermentier F. 1979. The effects of solcoseryl on the growth and multiplication of chick embryo fibroblasts cultivated «*in vitro*». Biochem. Exp. Biol. 15 : 349—353.

Davis J. M. 2001. Basic cell culture. Practical approach. Second ed. Oxford: Univ. Press. 381 p.

Folkman J., Moscona A. 1978. Role of cell shape in growth control. Nature. 273 : 345—349.

Lindner G., Grosse G., Lehmann A. 1977. The effect of Solcoseryl on *in vitro* cultured cells. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 91 : 195—214.

Miltenburger H. G. 1985. Qualitative and quantitative aspects of animal cell *in vitro* systems. Develop. Biol. Standard. 60 : 147—159.

Riede U. N., Rohr H. P., Sandoz P. 1974. Tierexperimentelle Studie zum Problem der Solcoseryl. Morphometrische Analyse der Abheilung einer nonnierten Verbrennungswunde. Schweiz. med. Wochenschr. 104 : 182—185.

Saltiel A. R., Cuatrecasas P. 1986. Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83 : 5793—5797.

Schnellen B. 1968. On the treatment of poorly healing ulcers with actihaemyl. Med. Welt. 3 : 198—200.

Spessotto P., Dri P., Baschong W., Mittenzwei H., Patriarca P. 1993. Effect of a protein-free dialysate from calf blood on human monocyte differentiation *in vitro*. Arzneimittelforschung. 43 : 747—751.

Tominaga K., Yoneda K., Utsumi K. 1996. Influence of «Solcoseryl» during culture on the sex-dependent repair of bovine demi-embryos. Mol. Reprod. Develop. 43 : 331—335.

Tsutsui T., Suzuki N., Maizumi H. 1984. Stimulation of anchorage-independent growth of Syrian hamster embryo cells by a deproteinized extract of calf blood (Solcoseryl). Jpn. J. Pharmacol. 34 : 471—474.

Поступила 12 IV 2010

STIMULATORY EFFECT OF THE CORD BLOOD FRACTION BELOW 5 kDa AND «ACTOVEGIN» ON THE GROWTH OF CONTINUOUS CELL LINES

A. K. Gulevsky,¹ A. V. Trifonova,¹ A. A. Lavrik²

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkov, and ² State Research Control Institute of Biotechnology and Microorganisms Strains, Kiev, Ukraine;

¹ e-mail: trifonova_ann@rambler.ru

The influence of the cattle cord blood fraction with molecular weight of components below 5 kDa on adhesive and proliferative properties of continuous cell lines BHK-21 clone q3/04 and PK-15-IECVM was investigated in comparison with the preparation «Actovegin». It was shown that adding this fraction as well as «Actovegin» to growth media did not affect the efficiency of culture attachment, promoted culture spreading, improved cell morphology and stimulated mitotic activity of the cultures. The efficiency of the cord blood fraction below 5 kDa estimated by the induces studied was found to be higher than the «Actovegin» efficiency when cells being cultivated in the media different contents of blood serum.

Key words: cord blood fraction below 5 kDa, «Actovegin», continuous cell lines, adhesion, mitotic regimen, proliferation.