

**СТИМУЛЯЦИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР
ФРАКЦИЕЙ (ДО 5 кДа) КОРДОВОЙ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
ИЛИ ПРЕПАРАТОМ АКТОВЕГИН**

© А. К. Гулевский, А. В. Трифонова, А. А. Лаврик

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
электронный адрес: trifonova_ann@rambler.ru*

Проведено сравнительное изучение способности низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови крупного рогатого скота (КРС) и препарата Актовегин восстанавливать функции клеточных культур после криоконсервирования. Изучено их влияние на пролиферацию деконсервированных клеточных культур, а также отдельные этапы их роста — эффективность прикрепления, скорость расплывания и митотический режим. Показано, что более эффективно фракция кордовой крови и Актовегин в концентрации 224 мкг/мл стимулируют рост культуральных фибробластов человека и ВНК-21 клон 13/04 после криоконсервирования. Однако несмотря на обнаруженный стимулирующий эффект, их применение на 1-м пассаже после криоконсервирования не позволяет достичь показателей нативной культуры. Стимулирующее влияние фракции кордовой крови и Актовегина на эффективность прикрепления, скорость расплывания и скорость пролиферации фибробластов человека не различались. В культуре ВНК-21 клон 13/04 влияние Актовегина было слабовыраженным, в то время как фракция кордовой крови КРС значительно стимулировала адгезию и пролиферацию клеток, что выражалось в нормализации их эффективности прикрепления и повышении индекса пролиферации на 83.7 % на 4-е сут роста. Проведенные исследования могут служить основой для создания регенерационных сред с целью быстрого восстановления пролиферативных свойств клеточных культур после криоконсервирования, в которых в качестве активных компонентов может использоваться фракция (до 5 кДа) кордовой крови КРС или Актовегин в концентрации 224 мкг/мл.

Ключевые слова: криоконсервирование, фракция (до 5 кДа) кордовой крови, Актовегин, клеточные культуры, восстановление, пролиферация, адгезия, митотический режим.

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

Использование изолированных клеток и клеточных культур животного происхождения в современной медицине и биотехнологии связано с необходимостью их консервирования в низкотемпературных банках. Исследования в этой области направлены на разработку новых и совершенствование уже существующих криозащитных сред и протоколов криоконсервирования (Цуцаева и др., 1983; Фуллер и др., 2003). В результате для каждого типа клеток подбираются индивидуальные условия консервирования, позволяющие максимально сохранить их морфофункциональные свойства. Тем не менее в клетках происходит ряд нелетальных повреждений, таких как нарушение барьерной, транспортной и рецепторной функций плазматической мембраны (Гулевский и др., 1988), повреждение митохондрий (Петренко, 1987), лизосом (Луговой, Кравченко, 1976), эндоплазматического ретикулаума (Юрченко и др., 1992; Капрельянец и др., 2002) и ядра (Фуллер и др., 2004), снижение уровня синтеза белка (Гулевский и др., 1988), изменение баланса мембрано-связанных и растворенных ферментов (Луговой, Мойсеев, 1978; Луговой, Гусева, 1981).

При дальнейшей инкубации в стандартных условиях (Семенченко и др., 1989; Федец, 1989; Белочкина, Волкова, 1994) часть таких повреждений восстанавливается. Однако для полного восстановления свойств клеточных популяций требуется немало времени. В частности, свойства клеточных культур полностью восстанавливаются к 4-му пассажу (Глушко и др., 1981). Это затрудняет биотехнологическое производство и снижает эффективность использования изолированных и культивируемых клеток в медицине.

Существующие на сегодняшний день способы восстановления клеток после криоконсервирования, связанные со стабилизацией плазматической мембраны (Kravchenko, Lugovoi, 1982; Виноградов, Суханов, 1988) и стимулированием энергетического метаболизма (Виноградов, Суханов, 1988; Тибилова и др., 1988), разработаны для клеток донорской крови с целью повышения эффективности их дальнейшей трансфузии. При культивировании культур клеток используют повышенные концентрации сыворотки крови в ростовой среде, добавление фибронектина (Стегний, Бусол, 1993) или конди-

ционированной среды (Петренко и др., 1985). Поиск компонентов для создания регенерационных сред, обеспечивающих быстрое восстановление свойств клеточных культур после их низкотемпературного хранения, является одной из актуальных задач современной биотехнологии.

Перспективными препаратами для восстановления клеток, имеющих функциональные нарушения в результате криоконсервирования, могут служить низкомолекулярные фракции, полученные из крови животных. Было показано, что препарат Актовегин (Nycomed, Австрия), произведенный на основе фракции (с мол. массой до 5 кДа) крови молочных телят, в опытах *in vitro* способен повышать жизнеспособность клеток (Holtmann, Stein, 1976), улучшать их морфологию (Miltenburger, 1972) и ускорять рост клеточных культур (Riede et al., 1974) благодаря стимуляции энергетического обмена клеток (Румянцева, 2002).

Фракция компонентов с аналогичной мол. массой (до 5 кДа), но полученная из кордовой крови и богатая биологически активными веществами плацентарного комплекса (Грищенко и др., 1997; Гулевский и др., 2005), в наших экспериментах оказывала более выраженное стимулирующее действие на нативные культуры клеток, чем препарат Актовегин (Гулевский и др., 2009, 2011).

Целью настоящей работы было изучить влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови крупного рогатого скота (КРС) и препарата Актовегин на восстановительные процессы в клеточных культурах после криоконсервирования.

Материал и методика

Исследования выполнены на эмбриональных фибробластах человека на 4—6-м пассажах после получения и перевиваемой культуре клеток ВНК-21 клон 13/04 (от почки новорожденного сирийского хомячка, которая была получена из коллекции клеточных культур ННЦ ИЭКВМ УААН, Харьков, Украина). Фибробласты человека культивировали в среде 199 (Санкт-Петербург, Россия), клетки ВНК-21 клон 13/04 — в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США). Обе среды содержали 10 % эмбриональной сыворотки крови КРС (HyClone, США). Клетки криоконсервировали под защитой 10%-ного ДМСО по общепринятой методике (Пинаев, 1988). Посевная концентрация клеток составляла $(0.8—1.0) \cdot 10^5$ и $(0.6—0.8) \cdot 10^5$ кл./мл для фибробластов человека и клеток ВНК-21 клон 13/04 соответственно.

Фракцию компонентов с мол. массой ниже 5 кДа (ФКК) получали методом ультрафильтрации из цельной кордовой крови КРС, подвергнутой криодеструкции. Полученный объем ФКК лиофилизировали и перед применением разводили 0.9%-ным раствором NaCl из расчета 40 мг/мл. Количество пептидов в ФКК, которое определяли по описанному методу (Мазор, 1986), составляло 9—10 мг на 100 г сухой массы.

Препарат Актовегин использовали в виде готового раствора для инъекций с содержанием сухого вещества 40 мг/мл. ФКК или Актовегин добавляли в среду культивирования деконсервированных клеточных культур в концентрациях, которые были рассчитаны исходя из терапевтических доз Актовегина, применяемых в клинике, — 5 и 20 мл. Для этого вначале указанные дозировки пересчитывали на массу тела лабораторных животных, а

затем — на объем внутренней жидкой среды в их организме. Полученные объемы препаратов — 1.4 и 5.6 мл (соответствующие 56 и 224 мкг сухой массы низкомолекулярной фракции) — добавляли на 1 мл ростовой среды. Контролем служили клеточные культуры в среде, не содержащей изучаемых фракций.

Индекс пролиферации (ИП) клеток оценивали по отношению количества снятых клеток через 96 ч культивирования к количеству посеянных клеток. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Об адгезивных свойствах клеточных культур судили по двум показателям — эффективности прикрепления и скорости расплывания клеток. Эффективность прикрепления определяли путем подсчета неприкрепившихся клеток через 24 ч после посева (Davis, 2001). Скорость расплывания культуры определяли путем подсчета клеток, находящихся в разной степени расплыванности через 1.5, 3, 5 и 24 ч после посева. В указанные сроки клеточный монослой фиксировали, окрашивали гематоксилином Карачи и 0.1%-ным раствором эозина. Степень расплыванности оценивали визуально в световом микроскопе по площади, занимаемой клеткой на подложке, и ее форме.

Для определения митотической активности каждые 24 ч после посева клеточный монослой фиксировали и 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 патологических делений определяли по отношению к среднему количеству выявленных митозов (Блюмкин, Жданов, 1973).

Статистическую обработку результатов проводили непараметрическим методом с помощью критерия Манна—Уитни (Уилкинсона). Уровень достоверности составлял 0.05. Результаты представлены в виде среднего и его статистической ошибки.

Результаты и обсуждение

ИП нативной культуры фибробластов человека (рис. 1, а) составил в наших экспериментах 1.15 ± 0.06 . После криоконсервирования этот показатель снижался в 2 раза и составлял 0.59 ± 0.017 . Добавление как Актовегина, так и ФКК в обеих концентрациях увеличивало ИП ($P < 0.05$) деконсервированных фибробластов человека. Более выраженное действие препараты оказывали при концентрации 224 мкг/мл: Актовегин повышал ИП на 29 %, ФКК — на 43.4 %, однако разница между ними была недостоверна.

Ранее мы показали (Гулевский и др., 2009), что в нативной культуре фибробластов человека влияние Актовегина и ФКК было более выраженным, чем в деконсервированной культуре, и не отличалось друг от друга. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФКК и Актовегин влияют на культуру фибробластов человека однотипно.

ИП нативных клеток ВНК-21 клон 13/04 (рис. 1, б) составил в наших экспериментах 2.23 ± 0.08 . После криоконсервирования этот показатель снижался в 2.4 раза и составлял 0.92 ± 0.008 . Влияние Актовегина в обеих концентрациях и ФКК в концентрации 56 мкг/мл на декон-

сервированную культуру было незначительным. Однако ФКК в концентрации 224 мкг/мл стимулировала пролиферацию ВНК-21 клон 13/04 на 83.7 %, и ИП в этом варианте составлял 1.69 ± 0.053 , что значительно отличалось от действия Актовегина в той же концентрации и ФКК в меньшей концентрации. Полученные данные отличались от более ранних данных по влиянию обеих низкомолекулярных фракций на нативную культуру ВНК-21 клон 13/04 (Гулевский и др., 2011), согласно которым наиболее эффективным оказалось применение ФКК в концентрации 56 мкг/мл.

Анализ полученных результатов в обеих исследованных культурах не позволяет нам в большинстве случаев однозначно сделать вывод о природе влияния ФКК и Актовегина. Говорить о выраженной стимуляции пролиферации деконсервированной культуры можно только в случае добавления ФКК в концентрации 224 мкг/мл в среду культивирования ВНК-21 клон 13/04. Остается неясным, что происходит при добавлении ФКК и препарата Актовегин в среду деконсервированной культуры фибробластов человека: уменьшение гибели клеток после криоконсервирования или стимуляция пролиферации? Для ответа на этот вопрос мы исследовали влияние изучаемых фракций в более эффективной из двух концентраций — 224 мкг/мл — на протекание каждого этапа роста культур, а именно прикрепление клеток к подложке, распластывание с принятием характерной для каждой культуры морфологии клеток и их митотическим делением.

Оказалось, что клетки фибробластов человека имеют низкую эффективность прикрепления — на уровне 60 % (табл. 1). После криоконсервирования этот показатель не изменялся. ФКК и Актовегин после криоконсервирования не оказывали влияния на способность фибробластов прикрепляться к подложке. Эффективность прикрепления линии ВНК-21 клон 13/04 составляла около 90 %. После криоконсервирования этот показатель понижался. Добавление как ФКК, так и Актовегина в среду культивирования деконсервированной линии сохраняло способность клеток прикрепляться к подложке на уровне показателей нативной культуры.

Прикрепление клеток к подложке осуществляется с помощью клеточных рецепторов адгезии (Tamkun et al., 1986). При повреждении плазматической мембраны в процессе криоконсервирования клеточные рецепторы, в том числе и рецепторы адгезии, теряются (Takahashi et al., 1985; Terгу et al., 2007), что является причиной наблюдаемого нами снижения эффективности прикрепления клеток. После первичного прикрепления клеток к подложке и формирования фокальных контактов в клетке включается каскад реакций с участием белков цитоскеле-

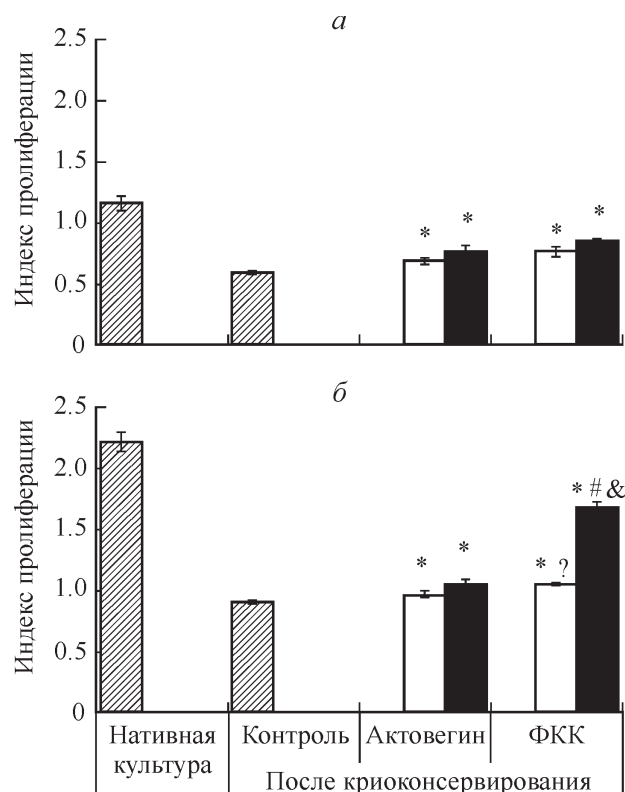


Рис. 1. Пролiferация фибробластов человека (а) и клеток ВНК-21 клон 13/04 (б) через 96 ч культивирования в среде, содержащей ФКК или Актовегин в концентрации 56 (светлые столбцы) или 224 (черные столбцы) мкг/мл.

а: n = 6, звездочкой показана достоверность различия с контролем ($P < 0.05$); б: n = 7, достоверность различия ($P < 0.05$) с контролем показана звездочкой, между ФКК и Актовегином в одинаковых концентрациях — знаком #, между концентрациями ФКК или Актовегина — знаком &.

та, который приводит к «уплощению» клетки, увеличению площади ее соприкосновения с подложкой и ее прикреплению в других сайтах клеточной поверхности, вплоть до формирования характерной морфологии (Jockusch et al., 1995; Yamada, Geiger, 1997).

Скорость протекания этого процесса мы изучали на культуре фибробластов человека, где конечной стадией распластывания является четко выраженная веретенообразная форма клеток. В нативной культуре фибробластов человека (рис. 2, а) уже через 1.5 ч после посева 96 % клеток проявляют признаки распластывания, начиная с образования первичных псевдоподий, «уплощения» клетки и до принятия ею веретенообразной формы. Общее ко-

Таблица 1

Эффективность прикрепления клеточных культур до и после криоконсервирования (КК) при добавлении ФКК или Актовегина в концентрации 224 мкг/мл

Клетки	До КК	После КК		
		контроль	Актовегин	ФКК
Фибробласты человека	59.0 ± 3.0	61.0 ± 2.0	59.0 ± 3.0	63.0 ± 2.0
ВНК-21 клон 13/04	90.2 ± 0.4	83.6 ± 2.0^a	90.0 ± 1.9	90.0 ± 1.7

Примечание. Эффективность оценивали по отношению количества прикрепившихся клеток через 24 ч культивирования к количеству посеянных (%). ^a Достоверность различий с нативной культурой (до КК), $P < 0.05$.

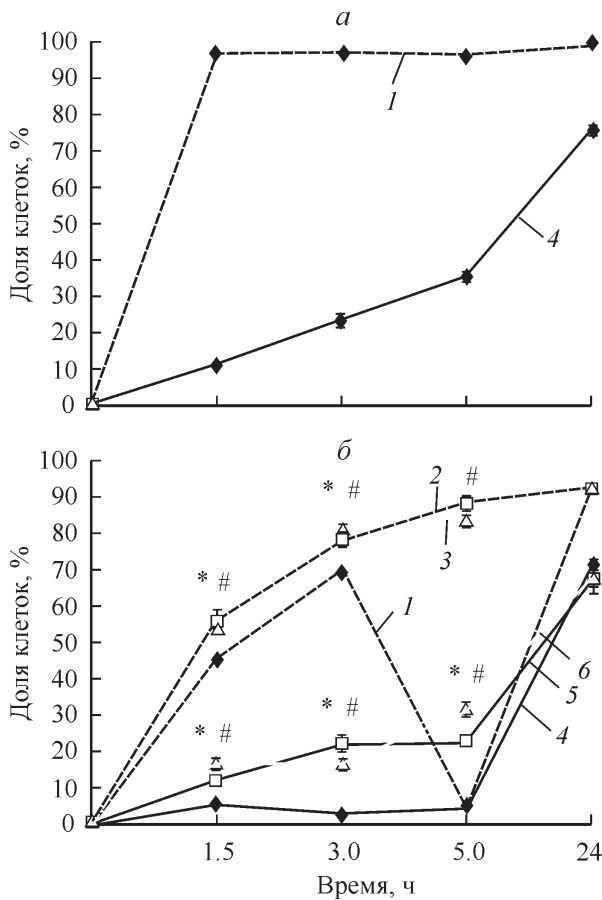


Рис. 2. Динамика расплывания фибробластов человека до (а) и после (б) криоконсервирования в среде, содержащей ФКК или Актовегин в концентрации 224 мкг/мл ($n = 5$).

Кривые 1—3 — изменение общей доли расплывшихся клеток в контроле, в присутствии Актовегина (2) и ФКК (3) соответственно. Кривые 4—6 — изменение доли веретенообразных клеток в контроле, в присутствии Актовегина (5) и ФКК (6) соответственно. Достоверность различий ($P < 0.05$) между ФКК и контролем показана звездочкой, между Актовегином и контролем — знаком #.

личество клеток, проявляющих признаки расплывания, не изменялось и через 24 ч культивирования. Доля клеток веретенообразной формы в первые 5 ч культивирования увеличивалась линейно до 36 % от общего числа расплывшихся клеток, затем скорость расплывания снижалась, и через 24 ч доля клеток веретенообразной формы составляла 76 %. После криоконсервирования скорость расплывания фибробластов человека значительно снижалась (рис. 2, б). Через 1.5 ч после посева доля клеток, проявляющих признаки расплывания, составляла 45 % от прикрепившихся к подложке, через 5 ч — 82 %, а далее изменялась незначительно и составляла (через 24 ч) около 92 %.

В первые 5 ч культивирования как ФКК, так и Актовегин способствовали повышению общего количества расплывающихся клеток на 8—10 %. Однако через 24 ч различия с контролем по этому показателю не было. Деконсервированные фибробласты в первые часы после посева не достигали конечной стадии расплывания. Этот показатель в первые 5 ч культивирования находился на очень низком уровне — 3—6 %. Формирование веретенообразной формы активировалось позже, и через 24 ч доля этих клеток, так же как и в нативной культуре, до-

стигала 77 % от общего количества расплывшихся клеток. Добавление ФКК нормализовало скорость формирования клетками веретенообразной формы. Так же как и в нативной культуре, через 5 ч культивирования их количество составляло 37 % от общего количества расплывшихся клеток. Актовегин тоже стимулировал скорость формирования клетками веретенообразной формы, но менее эффективно, чем ФКК. К 5 ч культивирования их количество составляло 26 % от общего количества расплывшихся клеток. Однако через 24 ч различия между контролем и экспериментом с добавлением ФКК или Актовегина не было.

Обнаруженное нами увеличение скорости расплывания клеток приводит к более раннему запуску в них механизмов подготовки к делению и началу митоза (Folkman, Moscona, 1978).

На следующем этапе работы мы оценивали влияние ФКК и Актовегина на митотический режим линии ВНК-21 клон 13/04 (рис. 3). Эта культура имеет высокую митотическую активность, пик которой приходится на 2—3-и сут культивирования и составляет 33—36 %. Количество патологических митозов находится на уровне

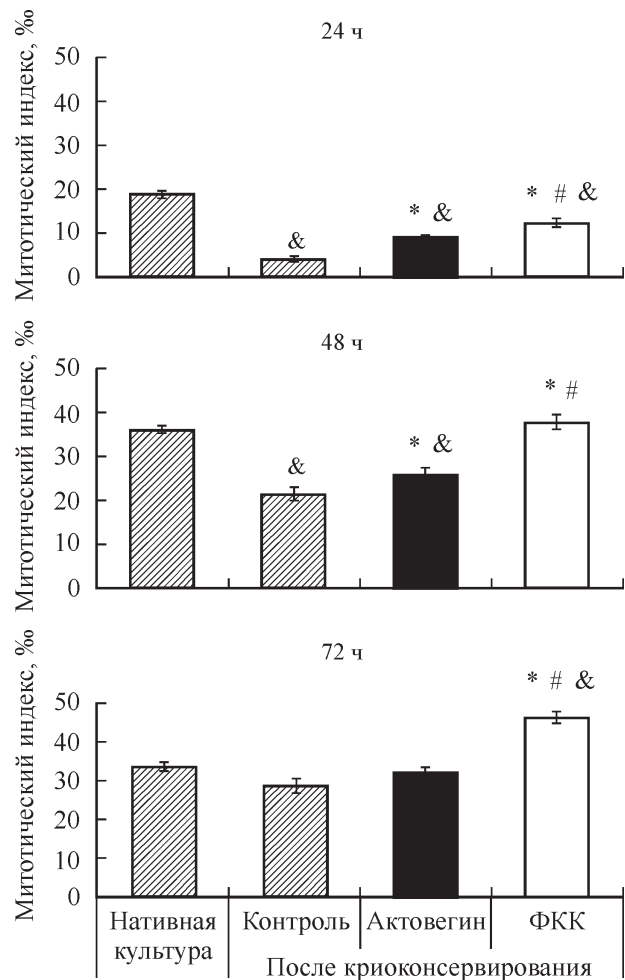


Рис. 3. Митотическая активность нативных клеток ВНК-21 клон 13/04 (до криоконсервирования) и после криоконсервирования в среде, содержащей в течение разного времени ФКК или Актовегин в концентрации 224 мкг/мл.

$n = 6$; достоверность различия по сравнению с контролем ($P < 0.05$) показана звездочкой, между ФКК и Актовегином — знаком # ($P < 0.05$), различия с нативной культурой — знаком & ($P < 0.05$).

Таблица 2

Доля патологических митозов (%) клеток линии ВНК-21 клон 13/04 до и после криоконсервирования (КК) при добавлении ФКК или Актовегина в концентрации 224 мкг/мл

Время культивирования, сут	До КК	После КК		
		контроль	Актовегин	ФКК
1	12.3 ± 3.2	41.7 ± 7.5 ^a	40.0 ± 3.1 ^a	40.8 ± 3.6 ^a
2	16.6 ± 1.7	31.6 ± 2.8 ^a	30.0 ± 2.1 ^{a, б}	32.9 ± 2.6 ^{a, б}
3	17.9 ± 1.7	28.9 ± 1.5 ^{a, б}	27.8 ± 1.8 ^{a, б}	28.7 ± 2.1 ^{a, б}

Примечание. Достоверность различий ($P < 0.05$): ^a с показателями нативной культуры (до КК) того же срока достоверна; ^б с показателями в 1-е сут роста.

12—18 % от общего количества наблюдаемых митозов. Криоконсервирование вызывает нарушение митотического режима культуры. В 1-е сут роста клеток митотический индекс снижался почти в 5 раз по сравнению с показателями нативной культуры и составлял 4.0 ± 0.6 %. В последующие сутки культивирования митотический индекс повышался и составлял на 2-е сут 21.5 ± 1.4 %, а на 3-и сут — 28.7 ± 2.0 %. Таким образом, митотическая активность деконсервированных клеток ВНК-21 клон 13/04 достигала показателей нативной культуры ($P < 0.05$) только на 3-и сут культивирования. При добавлении ФКК количество делящихся клеток деконсервированной линии ВНК-21 клон 13/04 превышало контроль в 1-е сут роста в 3 раза, на 2-е сут — на 75 %, на 3-и сут — на 61.5 %. При добавлении Актовегина митотический индекс превышал контроль в 1-е сут в 2.25 раза, на 2-е сут — на 20 %, а на 3-и сут отличий ($P > 0.05$) от контроля не было. При сравнении с показателями митотической активности нативной культуры можно видеть (рис. 3), что после добавления ФКК в среду культивирования деконсервированных клеток на 2-е сут показатель достигал уровня нативных клеток, а на 3-и сут значительно превышал его, чего не наблюдали при добавлении Актовегина.

Криоконсервирование вызывает значительное нарушение митотического аппарата клеток, в результате чего количество патологических делений клеток повышалось. В 1-е сут их доля составила 41.7 % от общего количества делящихся клеток, а к 3-м сут снижалась до 29 %. ФКК и Актовегин влияния на этот показатель не оказывали (табл. 2).

Известно, что повреждения клеток в результате криоконсервирования приводят к множественным метаболическим нарушениям и снижению их функциональной активности. Восстановление повреждений, полученных клетками, требует повышенных энергетических затрат. Именно это обстоятельство явилось основным аргументом для изучения способности препарата Актовегин и ФКК ускорять восстановление функциональной активности клеток и свойств клеточных популяций с целью дальнейшего использования их в качестве активных компонентов регенерационных сред.

Из данных литературы известно, что в основе механизма действия Актовегина лежит его способность активировать транспорт глюкозы внутрь клетки и скорость ее утилизации, а также повышать потребление клетками кислорода (Schnellen, 1968; Saltiel, Cuatrecasas, 1986; Obermaier-Kusser et al., 1989), что приводит к нормализации их энергетического потенциала. Наши эксперименты

(Гулевский и др., 2008б) с использованием глюкозной нагрузки на экспериментальных животных позволили сделать вывод о сходном влиянии Актовегина и ФКК на скорость утилизации глюкозы и, вероятно, на энергетический обмен клеток.

В составе Актовегина были найдены такие компоненты, как аминокислоты, пептиды, нуклеозиды, промежуточные продукты углеводного и жирового обмена (олигосахариды и гликолипиды), электролиты и микроэлементы (Jaeger et al., 1965), а также найдены основные компоненты, ответственные за стимуляцию энергетического обмена (инозитолфосфатогликосахариды — ИФО), обладающие инсулиноподобным действием (Machicao et al., 1990; Kellerer et al., 1993). Определение нами содержания отдельных веществ (гормонов, глюкозы, гликопротеинов и электролитов) показало, что они обнаруживаются как в ФКК, так и в Актовегине (Gulevsky et al., 2011), однако их содержание в ФКК значительно выше, чем в Актовегине. Сравнение хроматографических профилей ФКК и Актовегина (Гулевский и др., 2008а) показало, что по содержанию компонентов обе фракции различаются как качественно, так и количественно.

Эти данные, а также предыдущие результаты по влиянию ФКК и Актовегина на нативные клеточные культуры (Гулевский и др., 2009, 2011) дали нам возможность предположить присутствие большего количества факторов роста в ФКК и их важную роль в наблюдаемом действии на клетки в культуре.

Таким образом, было установлено, что низкомолекулярная фракция кордовой крови КРС стимулирует восстановление свойств клеток после криоконсервирования уже на 1-м пассаже культивирования, а ее действие превосходит таковое, оказываемое препаратом Актовегин. И ФКК, и Актовегин увеличивают скорость расплывания деконсервированных клеточных культур, способствуют сохранению эффективности прикрепления клеток на уровне показателей нативных культур, стимулируют начало деления клеток и увеличивают их митотическую активность, что в конечном итоге повышает пролиферацию клеток после хранения при низкой температуре.

Проведенные исследования могут служить основой для создания регенерационных сред с целью быстрого восстановления пролиферативных свойств клеток после криоконсервирования, где в качестве активных компонентов будут использованы низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови КРС или препарат Актовегин в концентрации 224 мкг/мл.

Список литературы

- Белочкина И. В., Волкова Н. А. 1994. Культивирование изолированных гепатоцитов новорожденных поросят после низкотемпературного консервирования. Проблемы криобиологии. 4 (3) : 41—47.
- Блюмкин В. Н., Жданов В. М. 1973. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клетки. М.: Медицина. 267 с.
- Виноградов В. Л., Суханов Ю. С. 1988. Стабилизация метаболизма и мембран эритроцитов в целях усовершенствования их криоконсервирования. Гематология и трансфузиология. 6 : 44—51.
- Глушко Т. А., Маркова О. П., Панков Е. Д. 1981. Антимитотический и кинетический эффект криопротекторов в условиях культивирования некоторых клеток. В кн.: Тезисы докладов IV съезда генетиков и селекционеров Украины. Киев: Наукова думка. 1 : 202—204.
- Грищенко В. И., Прокопюк О. С. 1997. Перспективы и возможности использования плацентарной крови. Медицинские вести. 4 : 26—27.
- 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., Бондаренко В. А., Белоус А. М. 1988. Барьерные свойства мембран при низких температурах. Киев: Наукова думка. 208 с.
- 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., Трифонова А. В., Петренко Т. Ф. 2009. Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции из кордовой крови на адгезию и пролиферацию культуры фибробластов человека после криоконсервации. Проблемы криобиологии. 19 (4) : 395—405.
- Гулевский А. К., Трифонова А. В., Лаврик А. А. 2011. Стимулирующее влияние фракции до 5 кДа кордовой крови и «Актовегина» на рост перевиваемых культур клеток. Цитология. 53 (2) : 135—141.
- Лулевський О. К., Грищенко В. І., Никольченко А. Ю., Моисеева Н. М. 2005. Властивості і перспективи використання кордової крові в клінічній практиці. Укр. ж. гематології та трансфузіології. 5 (1) : 5—14.
- Капрельяни О. С., Марченко Л. М., Мігунова Р. К. 2002. Структурні аспекти реакції гепатоцитів печінки шурів на різні умови заморожування та ДМСО. Проблемы криобиологии. 12 (2) : 9—19.
- Луговой В. И., Гусева Н. Р. 1981. Изменение активности Na^+ , K^+ -АТФазы и ацетилхолинэстеразы плазматической мембраны эритроцитов после замораживания—оттаивания. Укр. биохим. журн. 53 (3) : 55—58.
- Луговой В. И., Кравченко Л. П. 1976. О механизмах повреждения лизосом. В кн.: Структура и функции лизосом. М. 85—86.
- Луговой В. И., Моисеев В. А. 1978. Влияние низких температур на растворимые ферменты. В кн.: Биофизика. ВИНТИ (Итоги науки и техники). 9 : 53—59.
- Мазор Л. 1986. Методы органического анализа. М.: Мир. 493 с.
- Петренко А. Ю. 1987. Изучение репарации мембран митохондрий после замораживания и отогрева. Криобиология. 2 : 24—28.
- Петренко Т. Ф., Цуцаева А. А., Микулинский Ю. Е. 1985. Культивирование перевиваемых клеточных культур после низкотемпературного консервирования. В кн.: Культивирование клеток животных и человека. Пушино. 16.
- Пинаев Г. П. 1988. Методы культивирования клеток. Л.: Наука. 319 с.
- Румянцева С. А. 2002. Фармакологическая характеристика и механизм действия актовегина. В кн.: Актовегин. Новые аспекты клинического применения. М. 3—9.
- Семенченко О. А., Кравченко Л. П., Загнойко В. И., Андриенко А. Н. 1989. Метаболическая активность криоконсервированных гепатоцитов. В кн.: Биохимические аспекты криоперезаждения и криозащиты клеточных систем. Харьков: ИПКиК АН УССР. 109—112.
- Стегний Б. Т., Бусол В. А. 1993. Влияние криоконсервирования и контаминации микоплазмами на сохранение стабильности биологических свойств клеточных культур. Проблемы криобиологии. 3 (4) : 48—54.
- Тибилова Н. Н., Маркова Н. А., Ермольчук О. Н., Платонова О. В., Аграненко В. А. 1988. Биохимическая модификация эритроцитарной массы, утратившей полноценность после сверхдлительных сроков хранения. Гематология и трансфузиология. 6 : 12—14.
- Федец О. И. 1989. Восстановление биоэнергетики и пролиферативной активности криоконсервированных суспензий АКЭ. В кн.: Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. Киев: Наукова думка. 29—33.
- Фуллер Б., Грин К., Грищенко В. И. 2003. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия. Проблемы криобиологии. 13 (2) : 62—83.
- Фуллер Б., Грин К., Грищенко В. И. 2004. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих. Проблемы криобиологии. 3 : 58—71.
- Цуцаева А. А., Аграненко В. А., Федорова Л. И. и др. 1983. Криоконсервирование клеточных суспензий. Киев: Наукова думка. 240 с.
- Юрченко Т. Н., Козлова В. Ф., Скорняков Б. А., Строна В. И., Репин Н. В. 1992. Влияние охлаждения на структуру клетки. Киев: Наукова думка. 145 с.
- Davis J. M. 2001. Basic cell culture. Practical approach. 2nd ed. Oxford: Univ. Press. 381 p.
- Folkman J., Moscona A. 1978. Role of cell shape in growth control. Nature. 273 : 345—349.
- Gulevsky A. K., Abakumova Ye. S., Moiseyeva N. M., Ivanov Ye. G. 2011. Influence of cord blood fraction (below 5 kDa) on reparative processes during subchronic ulcerative gastropathy. Ulcers. <http://www.hindawi.com/journals/ulc/2011/214124/>
- Holtmann H. W., Stein H. J. 1976. The influence of a metabolic stimulator on the vitality of preserved human corneas. Klin. Monbl. Augenheilkd. 168 : 337—341.
- Jaeger K. H., Leybold K., Mittenzwei H., Staudinger H., von Waldstätten L. 1965. Die Forderung der Zeilatmung durch einen Blutextrakt. Arzneim.-Forsch. 15 : 750—754.
- Jockusch B. M., Bubeck P., Giehl K., Kroemker M., Moschner J., Rothkegel M., Rüdiger M., Schlüter K., Stanke G., Winkler J. 1995. The molecular architecture of focal adhesions. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 11 : 379—416.
- Kellerer M., Machicao F., Berti L., Sixt B., Mushack J., Seffer E., Mosthaf L., Ullrich A., Haring H. U. 1993. Inositol phospho-oligosaccharides from rat fibroblasts and adipocytes stimulate 3-O-methylglucose transport. Biochem. J. 295 : 699—704.
- Kravchenko L. P., Lugovoi V. I. 1982. Effect of membranestabilizing agent on the preservation of leucocytes at low temperatures. Cryo-Letters. 3 : 185—190.
- Machicao F., Mushack J., Seffer E., Ermel B., Häring H. U. 1990. Mannose, glucosamine and inositol monophosphat inhibit the effects of insulin on lipogenesis. Further evidence for a role for inositolphosphat-oligosaccharides in insulin action. Biochem. J. 266 : 909—916.
- Miltenburger H. G. 1985. Qualitative and quantitative aspects of animal cell *in vitro* systems. Develop. Biol. Stand. 60 : 147—159.
- Obermaier-Kusser B., Mühlbacher C., Mushack J., Seffer E., Ermel B., Machicao F., Schmidt F., Häring H. U. 1989. Further evidence for a two-step model of glucose-transport regulation. Inositol phosphate-oligosaccharides regulate glucose-carrier activity. Biochem. J. 261 : 699—705.

Riede U. N., Rohr H. P., Sandoz P. 1974. Animal experimental study on the effect of Solcoseryl. Morphometric analysis of the healing of a standardized burn-wound. 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. Natl. Acad. Sci. USA. 83 : 5793—5797.

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

Takahashi T., Inada S., Pommier C. G., O'Shea J. J., Brown E. J. 1985. Osmotic stress and the freeze-thaw cycle cause

shedding of Fc and C3b receptors by human polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol. 134 : 4062—4068.

Tamkun J. W., DeSimone D. W., Fonda D., Patel R. S., Buck C., Horwitz A. F., Hynes R. O. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. Cell. 46 : 271—282.

Terry C., Hughes R. D., Mitry R. R., Lehec S. C., Dhawan A. 2007. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. Cell Transplant. 16 : 639—647.

Yamada K. M., Geiger B. 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. Curr. Opin. Cell Biol. 9 : 76—85.

Поступила 20 VI 2012

STIMULATION OF CELL CULTURES RECOVERY AFTER CRYOPRESERVATION BY THE CATTLE CORD BLOOD FRACTION (BELOW 5 kDa) OR ACTOVEGIN

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

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine;

¹ e-mail: trifonova_ann@rambler.ru

The capacities of the cattle cord blood low-molecular fraction (below 5 kDa) and Actovegin (the vealer blood fraction (below 5 kDa)) for recovering functions of cell cultures after cryopreservation compared. Their influence proliferation of the flozen-thawed cell cultures, certain stages of their growth, cell attachment, rate of cell spreading, and mitotic regiment has been studied. Both the cord blood low-molecular fraction and Actovegin were shown to stimulate growth of the cell cultures after cryopreservation more efficiently at the concentration of 224 µg/ml. However, despite the stimulating effect discovered, their application did not bring proliferative indices on the 1st passage after cryopreservation to the values of the native culture. The effects of the cord blood low-molecular fraction and Actovegin on the human fibroblast culture were identical by the following parameters: cell attachment, rates of cell spreading and proliferation. In culture BHK-21 clone 13/04 the efficiency of Actovegin was low, while the cord blood low-molecular fraction has a conspicuous stimulating effect on its adhesion and proliferation. The investigations carried out can serve as a basis for the development of regenerative media containing the cattle cord blood low-molecular fraction (below 5 kDa) or Actovegin as active components at the concentration of 224 µg/ml with the purpose of fast recovery of culture proliferative properties after cryopreservation.

Key words: cryopreservation, cattle cord blood fraction (below 5 kDa), Actovegin, cell cultures, recovery, proliferation, adhesion, mitotic regimen.