

Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции из кордовой крови на адгезию и пролиферацию культуры фибробластов человека после криоконсервирования

UDC 615.361.018.5.013.8.014.41:611.013.395.085.23

A.K. GULEVSKY*, A.V. TRIFONOVA, T.F. PETRENKO

Stimulating Effect of Low-Molecular Fraction from Cord Blood on Adhesion and Proliferation of Human Fibroblast Culture After Cryopreservation

Изучено влияние фракции до 5 кДа, полученной из кордовой крови, на адгезивные и пролиферативные свойства диплоидной культуры эмбриональных фибробластов человека. Показано, что указанная фракция не влияет на эффективность прикрепления клеток, увеличивает скорость расплывания клеток на подложке и стимулирует пролиферацию как нативной культуры, так и после ее криоконсервирования. Сделан вывод о стимулирующем влиянии фракции из кордовой крови на рост культуры фибробластов человека, показано ее репаративное действие на нарушенный в результате криоконсервирования клеточный метаболизм.

Ключевые слова: фракция до 5 кДа из кордовой крови, фибробласты человека, криоконсервирование, адгезия, пролиферация.

Вивчена дія фракції до 5 кДа, що отримана з кордової крові, на адгезивні та проліферативні властивості диплоїдної культури ембріональних фібробластів людини. Показано, що ця фракція не впливає на ефективність прикріплення клітин, підвищує швидкість розшаровування клітин на підложці та стимулює проліферацію як нативної культури, так і після криоконсервування. Зроблено висновок про стимулюючу дію фракції з кордової крові на ріст культури фібробластів людини, показана її репаративна дія на порушений клітинний метаболізм після криоконсервування.

Ключові слова: фракція до 5 кДа із кордової крові, фібробласти людини, криоконсервування, адгезія, проліферація.

The effect of the fraction below 5 kDa, procured from cord blood, on adhesive and proliferative properties of human embryonic fibroblast diploid culture was studied. The mentioned fraction was shown as not affecting the efficiency of cell attachment, increasing the rate of cell flattening on substrate and stimulating proliferation of both native culture and after cryopreservation. There was concluded about a stimulating effect of cord blood fraction on human fibroblast culture growth, with demonstrating its reparative effect on a disordered cellular metabolism after cryopreservation.

Key words: cord blood fraction below 5 kDa, human fibroblasts, cryopreservation, adhesion, proliferation.

Перспективность применения фибробластов человека в медицине [7–9, 15] обуславливает необходимость создания банков для долговременного хранения, что требует разработки технологий криоконсервирования, а также поиска путей для быстрого восстановления клеток после криоконсервирования с сохранением морфофункциональных свойств.

Существующие подходы, которые обеспечивают восстановление повреждений в клетках после криоконсервирования, основаны на применении мембранстабилизирующих веществ [3], повышении энергетики клетки путем внесения дополнительных субстратов энергетического обмена [21], добавлении различных ростостимулирующих веществ [19].

Известно, что кордовая кровь содержит уникальный сбалансированный комплекс специфических плацентарных факторов, которые определяют рост и дифференцирование тканей плода,

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:(+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

The perspectiveness of applying human fibroblasts in medicine [7–9, 15] stipulates the necessity in establishing banks for long-term storage, requiring the design of cryopreservation technologies, as well as the search for ways of rapid cell recovery after cryopreservation with preserving morphofunctional properties.

Current approaches, providing the recovery of damaged cells after cryopreservation, are based on applying the membrane-stabilising substances [3], increasing the cell energetics via introducing the additional substrates of energetic metabolism [21], adding different growth-stimulating substances [19].

Cord blood is known to contain a unique balanced complex of specific placental factors, determining the growth, differentiation of fetal tissues and regulating its metabolism [4]. The inclusion of fraction with molecular weight below 5 kDa, procured from cord blood, into the growth media composition of different lines, was shown to stimulate their proliferation [6, 16].

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

регулируют его метаболизм [4]. Показано, что включение фракции с молекулярным весом до 5кДа, полученной из кордовой крови, в состав ростовых сред различных линий стимулирует их пролиферацию [6, 16].

Цель работы – изучение способности фракции до 5 кДа, полученной из кордовой крови, оказывать восстанавливающее действие на клетки диплоидной культуры человека после хранения в криобанке при -196°C .

Материалы и методы

Исследования выполнены на диплоидной культуре эмбриональных фибробластов человека (ФЧ) [17] на 4–6 пассажах. Клетки культивировали по общепринятой методике [11], их посевная концентрация составила $0,8-1,0 \times 10^5$ кл/мл.

Криоконсервирование ФЧ осуществляли по программам, разработанным для перевиваемых клеточных культур [11].

Низкомолекулярную фракцию кордовой крови (ФКК) получали из кордовой крови крупного рогатого скота по оригинальной технологии [6].

Фракцию в концентрации 5,6 мкл/мл [6] добавляли в стандартную ростовую среду с 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота и минимальным содержанием ЭС – 2%, которое обеспечивало пролиферацию клеток и формирование монослоя.

Препаратом сравнения служил фармакологический препарат “Актовегин” (Nuscomed, Австрия) в аналогичной концентрации [13].

О морфофункциональном состоянии диплоидной культуры судили по адгезивным свойствам и пролиферативной активности. Эффективность прикрепления определяли подсчетом неприкрепившихся клеток через 24 ч после начала культивирования [18]. Для определения скорости распластывания культуры подсчитывали клетки различной степени распластности на фиксированных препаратах через 1,5; 3; 5 и 24 ч после посева. Препараты фиксировали в растворе Буэна, окрашивали гематоксилином Карачи и 1%-м раствором эозина [14]. Пролиферативную активность определяли на 4-е сутки культивирования по отношению количества снятых клеток к количеству посеянных клеток в 1 мл. Результат выражали с помощью коэффициента пролиферации (K). Клетки подсчитывали в камере Горяева общепринятым способом [10].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета “Statgraphic plus for Windows”, версии 2.1 с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Адгезия клеток – энергозависимый процесс, который осуществляется посредством молекул

The research aim was to study the capability of the fraction below 5kDa, derived from cord blood, to cause a recovering effect on human diploid culture cells after storage at cryobank under -196°C .

Materials and methods

The research was accomplished in diploid culture of embryonic human fibroblasts (HFs) [17] with 4-6 passages. Cells were cultured according to the standard technique [11] with $0.8-1.0 \times 10^5$ cells/ml inoculating concentration.

The HFs were cryopreserved by the programs, designed for recultured cell cultures [11].

Low-molecular fraction of cord blood (FCB) was derived from the cattle cord blood according to the original technique [6].

The fraction in 5.6 $\mu\text{l/ml}$ concentration [6] was added into the standard growth medium with 10% fetal bovine serum (FBS) and the minimum 2% FBS content, providing the cell proliferation and monolayer formation.

The pharmacological preparation Actovegin (Nuscomed, Austria) in the similar concentration served as the reference substance [13].

Morphofunctional state of diploid culture was judged by adhesive properties and proliferative activity. The attachment efficiency was determined by calculating the unattached cells in 24 hrs after culturing beginning [18]. In order to determine the rates of culture flattening we calculated the cells with different flattening rate on the fixed preparations in 1.5; 3; 5 and 24 hrs after inoculation. Preparations were fixed in the Bouen's solution, stained with Karachi hematoxylin and 1% eosin solution [14]. Proliferative activity was determined to the 4th culturing day in respect to the number of removed cells to that of inoculated ones in 1 ml. The result was expressed with the proliferation coefficient (K). Cells were calculated in Goryaev chamber according to the standard methods [10].

The results were statistically processed with the “Statgraphic plus for Windows” software, 2.1 version with Mann-Whitney criterion.

Results and discussion

Cell adhesion is the energy-dependent process, realising by means of molecules of intercellular adhesion, representing proteins on a plasmatic membrane. These proteins mediate the cell interactions among themselves and with extracellular matrix as well [2]. Under monolayer culturing this process may be represented as the successive stages, starting from cell attachment to the substrate and finishing by their flattening with getting a typical morphology.

In our experiments the attachment efficiency of HFs native culture (Table) was established as not dependent on ES concentration in growth medium and making 59–61% of a number of inoculated cells.

межклеточной адгезии, представляющие собой белки на плазматической мембране. Эти белки опосредуют взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом [2]. В условиях моно-слойного культивирования этот процесс можно представить как последовательные этапы, начинающиеся с прикрепления клеток к подложке и завершающиеся их распластыванием с приобретением характерной морфологии.

В наших экспериментах было установлено, что эффективность прикрепления нативной культуры ФЧ (таблица) не зависит от концентрации ЭС в ростовой среде и составляет 59–61% от количества посеянных клеток. Изучение влияния ФКК на эффективность прикрепления ФЧ показало, что количество прикрепленных клеток достоверно не отличалось от их количества в соответствующих контролях. “Актовегин” также не влиял на этот показатель. Установлено, что процесс криоконсервирования по выбранной программе не оказывал влияния на эффективность прикрепления ФЧ по сравнению с нативной культурой во всех образцах. “Актовегин” и ФКК в культуре после криоконсервирования также не влияли на этот показатель по сравнению с контролем.

Известно, что распластанность клеток на подложке влияет на запуск механизмов деления, цитоскелетные перестройки, регуляцию экспрессии генов [12, 20]. В случае, когда положительные сигналы от адгезивных белков не поступают, блокируется не только вступление клеток в митотический цикл, но и происходит активация апоптоза [22, 23]. Высказывается также предположение, что существует зависимость между площадью распластанной клетки и количеством контактирующих молекул факторов роста, а также потребленных питательных веществ [1]. Таким образом, количественный учет прикрепившихся клеток было целесообразно дополнить изучением скорости их распластывания, что является важным показателем

Studying the FCB effect on the efficiency of HF attachment demonstrated the number of attached cells as not statistically and significantly different from that in the corresponding controls. Actovegin did not affect this index either. Cryopreservation process according to the selected program was established as not affecting the HF attachment efficiency, compared to a native culture in all the samples. FCB and Actovegin in culture after cryopreservation did not affect this index either, compared to the control.

Cell flattening on a substrate is known to affect the triggering of fission mechanisms, cytoskeletal rearrangements and gene expression regulation [12, 20]. In this case, when the positive signals from adhesive proteins do not income, not only the cell entry into a mitotic cycle is blocked, but there is occurred the apoptosis activation as well [22, 23]. There is a suggestion about the existence of dependence between the flattened cell area and a number of contacting molecules of growth factors, as well as the taken nutritives [1]. Thus, it was expedient to perform a quantitative accounting of attached cells with studying their flattening rate, being an important index for culture physiological state and necessary for its further growth forecasting.

When studying the FCB effect on flattening processes it was established as not causing a significant effect on a total number of flattened cells of native culture, independently on ES content in growth medium (Fig. 1). Calculation of all the cells, manifesting flattening signs, but being at different stages (from initial to final ones) demonstrated, that in a native culture even in 1.5 hrs after inoculation in media with various ERS content (2 and 10%) and FCB adding, a total number of flattened cells made 96.8 ± 0.9 and $96.6 \pm 0.5\%$, correspondingly. This index did not statistically and significantly differ from that in FCB-free media. No statistically significant differences in total number of flattened cells within following 3; 5 and 24 hrs in the samples with FCB adding and corresponding control

Эффективность прикрепления ФЧ через 24 ч культивирования, % (n = 6)
Efficiency of HF attachment in 24 hrs of culturing, % (n = 6)

Культура Culture	Содержание ЭС в среде культивирования, % ES content in cultivation medium, %	Контроль Control	При добавлении ФКК Adding of CBF	При добавлении “Актовегина” Adding of "Actovegin"
Нативная Non-frozen	10	59 ± 3	63 ± 0,6	58 ± 0,6
	2	61 ± 4	63 ± 6,3	61 ± 6
Криоконсервированная Frozen-thawed	10	61 ± 2	63 ± 2	59 ± 3
	2	62 ± 3	59 ± 1	64 ± 4

физиологического состояния культуры и необходимо для прогноза ее дальнейшего роста.

При изучении влияния ФКК на процессы распластывания установлено, что она не оказывала существенного воздействия на общее количество распластанных клеток нативной культуры, независимо от содержания ЭС в ростовой среде (рис. 1). Подсчет всех клеток, проявляющих признаки распластывания, но находящихся на разных стадиях (от начальных до конечных) показал, что в нативной культуре уже через 1,5 ч после посева в средах с различным содержанием ЭС (2 и 10%) и добавлением ФКК общее количество распластанных клеток составляло $96,8 \pm 0,9$ и $96,6 \pm 0,5\%$ соответственно. Данный показатель достоверно не отличался от такового в средах без добавления ФКК. Не было отмечено и достоверных различий общего количества распластанных клеток в последующие 3; 5 и 24 ч в образцах с добавлением ФКК и соответствующем контроле. "Актовегин" также не влиял на этот показатель.

Отмечено, что опытные образцы визуально отличались от контрольных. Показано, что степень распластности ФЧ, которую мы определяли по количеству клеток с характерной для фибробластов веретенообразной формой, имеет существенные различия во всех изученных вариантах (рис. 1).

В начальные сроки исследования (1,5 и 3 ч) количество веретенообразных клеток при культивировании в среде с 10% ЭС в 9 и 1,5 раза превышало их количество в среде с 2% ЭС. К 5 часам наблюдения процесс распластывания клеток в среде, содержащей 2% ЭС, значительно активировался. Количество веретенообразных клеток в среде с 2% ЭС превышало таковое в среде с 10% в 1,5 раза. Однако через 24 ч роста культуры количество клеток веретенообразной формы в среде, содержащей 10% ЭС, было достоверно выше, чем в среде с 2% ЭС.

ФКК при добавлении в среду, содержащую 10% ЭС, оказывала достоверное стимулирующее действие на количество веретенообразных клеток относительно контроля с 3-х часов роста культуры – на 15,4%; через 5 ч – на 18% и 24 ч – на 13,6%.

Действие ФКК, стимулирующее распластывание ФЧ, при добавлении в среду с 2% ЭС проявлялось в более ранние сроки после посева. Количество веретенообразных клеток достоверно превышало контроль через 1,5 ч роста культуры на 5,2%, 3 ч – на 20,2%; 5 ч – на 16,8% и 24 ч – на 18,4%.

Как можно видеть из рис. 1, после 3-х часов роста культуры распластывание ФЧ при добавлении ФКК в среды культивирования более выражено в среде, содержащей 2% ЭС. Через 5 ч количество веретенообразных клеток в этом варианте было в 1,3 раза больше, чем при добавлении ФКК в среду

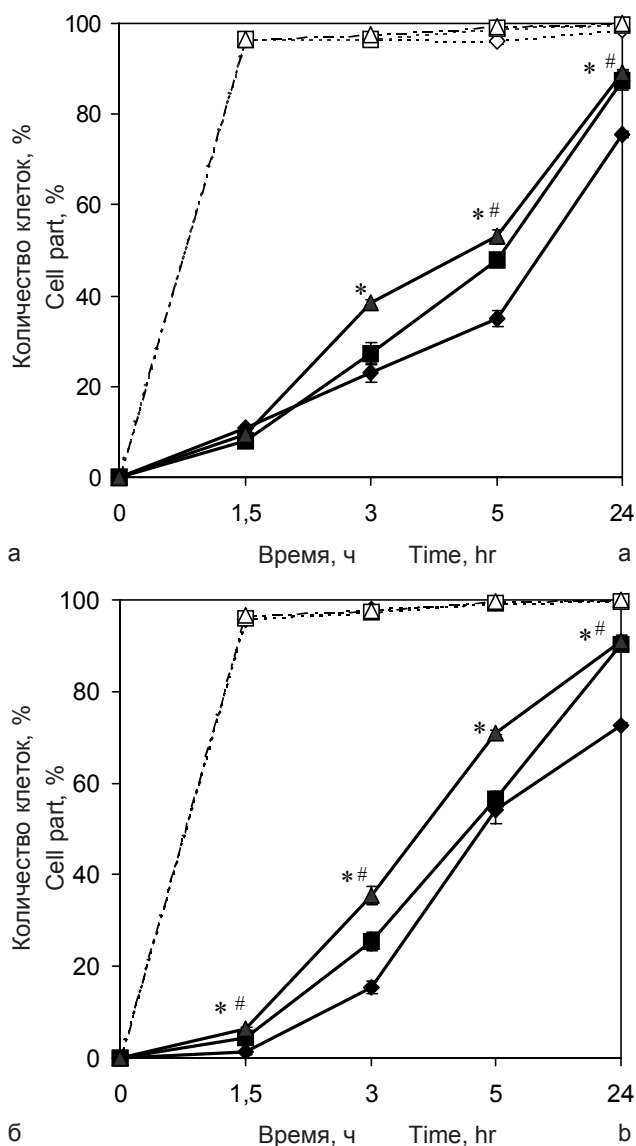


Рис. 1. Динамика распластывания нативной культуры ФЧ при добавлении ФКК и "Актовегина" в среду культивирования в присутствии 10% ЭС (а) и 2% ЭС (б) (n=5). Общее количество распластанных клеток: \diamond – контроль, \square – при добавлении "Актовегина", \triangle – при добавлении ФКК. Количество веретенообразных клеток: \blacklozenge – контроль; \blacksquare – при добавлении "Актовегина"; \blacktriangle – при добавлении ФКК. *, # – различия статистически достоверны для варианта с добавлением ФКК и "Актовегина" по сравнению с контролем соответственно ($p < 0,05$).

Fig. 1. Dynamics of HF flattening in native culture flattening when adding FCB and Actovegin into the culturing medium in the presence of 10% ES (a) and 2% ES (b) (n=5). Total number of flattened cells: \diamond – the control, \square – under Actovegin adding, \triangle – under FCB adding. Number of spindle-shaped cells: \blacklozenge – the control, \blacksquare – under Actovegin adding, \blacktriangle – under FCB adding. *, # – differences are statistically significant for the variant with FCB and Actovegin adding, compared to the control, correspondingly ($p < 0.05$).

were revealed. Actovegin did not affect this index either.

The samples were observed as visually differing from the control ones. The HF flattening degree,

с 10% ЭС. После 24 ч наблюдения достоверных отличий между этими вариантами установлено не было.

Влияние “Актовегина” на скорость распластывания культуры ФЧ аналогично ФКК, но количество веретенообразных клеток в первые часы роста культуры было достоверно ниже. Стимулирующее действие “Актовегина” достигло уровня ФКК только к 24 ч роста культуры.

Таким образом, стимулирующее действие ФКК на скорость распластывания нативной культуры ФЧ проявляется уже в первые часы после посева. Через 24 ч роста нативной культуры количество веретенообразных клеток в образцах с добавлением ФКК в среды культивирования, содержащие 10 и 2% ЭС, превышает аналогичный показатель в соответствующих контролях. Возможно, это является признаком ускорения репарации незначительных повреждений клеток, возникающих при пересеве.

На следующем этапе работы изучали влияние криоконсервирования на скорость распластывания культуры ФЧ. Установлено, что распластывание на подложке деконсервированных клеток при их последующем культивировании существенно замедляется (рис. 2). Если в нативной культуре уже через 1,5 ч после посева клеток практически все прикрепившиеся клетки, независимо от содержания ЭС в среде культивирования, проявляли признаки распластывания (см. рис. 1), то после криоконсервирования этот показатель в средах, содержащих 10 и 2% ЭС, составил $45,2 \pm 1,8$ и $56,6 \pm 2,8\%$ соответственно. В последующие сроки наблюдения (3 и 5 ч после посева) общее количество распластанных клеток при культивировании ФЧ в среде с 2% ЭС было больше, чем в среде, содержащей 10% ЭС. Представленные данные свидетельствуют о том, что распластывание деконсервированных клеток в ранние сроки было более выражено при культивировании ФЧ в среде, содержащей 2% ЭС. Однако к 24 ч наблюдения этот показатель достоверно не отличался в обоих вариантах и составлял 92,4–94,2%.

Возможно, для протекания адгезивных процессов, особенно на начальных этапах, в нативных и деконсервированных культурах клеток достаточно некоторого порогового количества факторов адгезии, содержащихся в сыворотке крови. Высокое содержание в среде культивирования сывороточных антител и других высокомолекулярных белков, напротив, тормозит начальные этапы распластывания клеток на подложке.

Изучение скорости распластывания ФЧ после криоконсервирования показало, что количество веретенообразных клеток при культивировании в среде, содержащей 10% ЭС, в течение 5 ч после посева оставалось очень низким и составляло 2,8–

determined by the number of cells with a spindle shape, typical for fibroblasts, was shown to have significant differences in all the studied variants (Fig. 1).

In initial research terms (1.5 and 3 hrs) the number of spindle-shaped cells during culturing in 10% ES-containing medium exceeded in 9 and 1.5 times their number in the medium with 2% ES. To the 5 hrs of observation the process of cell flattening in the 2% ES-containing medium significantly activated. The number of spindle-shaped cells in the medium with 2% ES exceeded in 1.5 times that in 10% medium. However 24 hrs after culture growth the number of spindle-like cells in 10% ES-containing medium, was statistically and significantly higher, compared to the 2% one.

FCB during adding into the medium with 10% ES, caused a statically significant stimulating effect on a number of spindle-like cells in respect to the control in 3, 5 and 24 hrs by 15.4; 18 and 13.6%, correspondingly.

The FCB effect, stimulating the HF's flattening, when adding into the medium with 2% ES, manifested in earlier terms after inoculation. The number of spindle-like cells statistically and significantly exceeded the control by 5.2, 20.2, 16.8 and 18.4% in 1.5, 3, 5 and 24 hrs of culture growth, correspondingly.

The Fig. 1 shows, that 3 hrs after culture growth the HF's flattening under FCB adding in culturing media is more manifested in the medium with 2% ES. The number of spindle-like cells in this variant 5 hrs later was 1.3 times higher, compared to FCB adding into the medium with 10% ES. After 24 hrs of observation no statistically significant differences between these variants were established.

Actovegin effect on flattening rate of HF's culture is similar to FCB, but the number of spindle-shaped cells within the first hours of culture growth was statistically and significantly lower. Stimulating effect of Actovegin reached the FCB level only to 24 hrs of culture growth.

Thus, a stimulating effect of FCB on the flattening rate of HF's native culture is manifested even within the first hours after inoculation. In 24 hrs of native culture growth the number of spindle-like cells in the samples with FCB adding into the culturing media, containing 10 and 2% ES, exceeds the similar index in the corresponding controls. Possibly, this is a feature of accelerated reparation of insignificant cell damages, occurring during reinoculation.

At the following research stage we studied the cryopreservation effect on HF's culture flattening rate. The flattening on a substrate of frozen-thawed cells under their following culturing was established as significantly slowed down (Fig. 2). If in a native culture even 1.5 hrs after cell inoculation practically all the attached cells, independently on ES content in culturing medium, manifested the flattening signs (Fig. 1), after

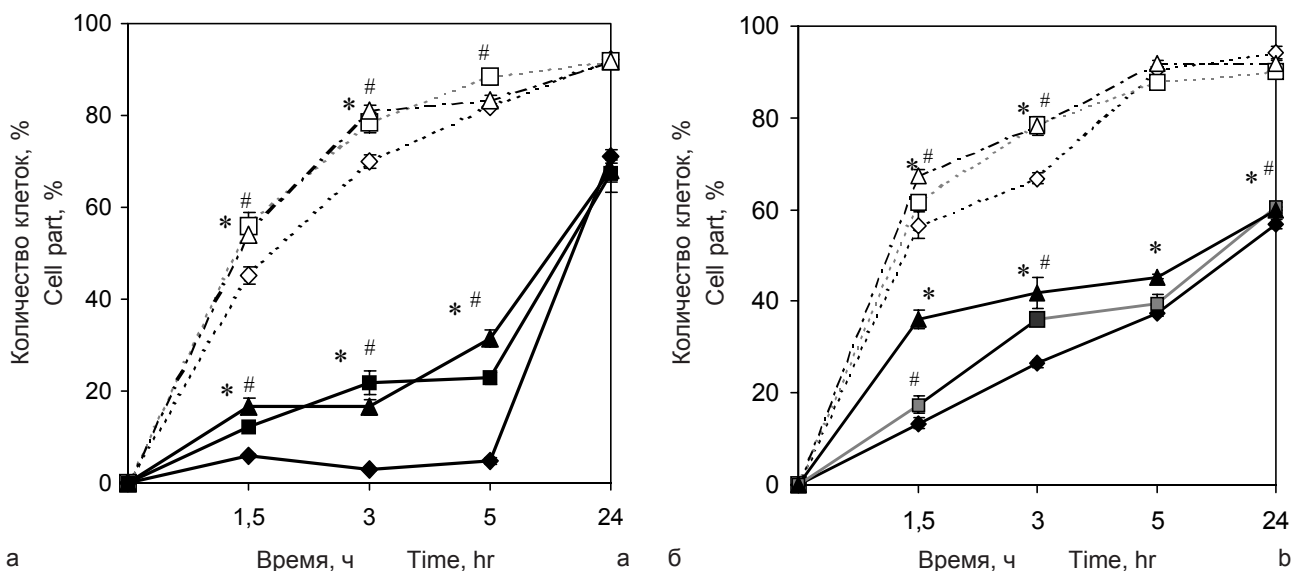


Рис. 2. Динамика распластывания культуры ФЧ после криоконсервирования при добавлении ФКК и “Актовегина” в среду культивирования в присутствии 10% ЭС (а) и 2% ЭС (б) (n=5). Общее количество распластанных клеток: \diamond – контроль, \square – при добавлении “Актовегина”, \triangle – при добавлении ФКК. Количество веретенообразных клеток: \blacklozenge – контроль; \blacksquare – при добавлении “Актовегина”; \blacktriangle – при добавлении ФКК. *, # – различия статистически достоверны для варианта с добавлением ФКК и “Актовегина” по сравнению с контролем соответственно ($p < 0,05$).

Fig. 2. Dynamics of HF culture flattening after cryopreservation when adding FCB and Actovegin into the culturing medium in the presence of 10% ES (a) and 2% ES (b) (n=5). Total number of flattened cells: \diamond – the control, \square – under Actovegin adding, \triangle – under FCB adding. Number of spindle-shaped cells: \blacklozenge – the control, \blacksquare – under Actovegin adding, \blacktriangle – under FCB adding. *, # – differences are statistically significant for the variant with FCB and Actovegin adding, compared to the control, correspondingly ($p < 0.05$).

5,8%. Это свидетельствует о замедленности процессов распластывания деконсервированных ФЧ в среде, содержащей 10% ЭС (рис. 2). В эти сроки наблюдения количество веретенообразных клеток при культивировании в среде, содержащей 2% ЭС, было достоверно выше, чем в среде с 10% ЭС: в первые 1,5 ч после посева оно составило $13,4 \pm 1,1\%$, а к 5 ч увеличилось до $37,4 \pm 0,5\%$. К 24 часам культивирования ситуация изменилась: количество веретенообразных клеток в среде, содержащей 10% ЭС, достигло $71,2 \pm 1,5\%$, а в среде с 2% ЭС – $56,8 \pm 0,9\%$.

Полученные результаты динамики распластывания ФЧ на подложке свидетельствуют о том, что сыворотка крови в среде культивирования важна для протекания репаративных процессов в клетках после криоконсервирования. Несмотря на большую скорость распластывания ФЧ на начальных этапах культивирования в среде, содержащей 2% ЭС, в итоге была получена меньшая степень распластанности клеток по сравнению с культивированием в среде с 10% ЭС, что свидетельствует о недостатке сывороточных факторов адгезии.

Очевидно, что отсутствие характерных признаков распластывания в течение первых суток после посева отражает функциональные повреждения клеток, полученные в процессе криоконсервирования, которые не были выявлены по прижизнен-

cryopreservation this index in the media, containing 10 and 2% ES, made 45.2 ± 1.8 and $56.6 \pm 2.8\%$, correspondingly. Within the following observation terms (3 and 5 hrs after inoculation), the total number of flattened cells during HF's culturing in the medium with 2% ES was higher, than in the 10% ES-containing one. The presented data testify to the fact, that the flattening of frozen-thawed cells in early terms was more manifested under HF's culturing in the medium, containing 2% ES. However to 24 hrs of observation this index did not statistically and significantly differ in both variants and made 92.4–94.2%.

Possibly, for adhesive process proceeding, especially at initial stages, in native and frozen-thawed cell cultures, it is sufficient a certain threshold number of adhesive factors, contained in blood serum. High content in culturing medium of serum antibodies and other high-molecular proteins, conversely, inhibits the initial stages of cell flattening in a substrate.

Studying the rate of HF's flattening after cryopreservation demonstrated a number of spindle-shaped cells during culturing in the medium, containing 10% ES, as remaining very low within 5 hrs after inoculation and making 2.8–5.8%. This testifies to the deceleration of frozen-thawed HF's flattening processes in the medium, containing 10% ES (Fig. 2). Within these observation terms the number of spindle-shaped cells under culturing in the medium, containing 2% ES, was statistically

ному окрашиванию и даже по количеству прикрепившихся к подложке клеток.

Исследование общего количества распластанных клеток в культуре ФЧ после криоконсервирования (рис. 2) при добавлении ФКК в среду, содержащую 10% ЭС, выявило, что через 1,5 ч после посева этот показатель составил $54 \pm 1\%$, что на 8,8% выше, чем в контроле. Действие “Актовегина” достоверно не отличалось от действия ФКК. Через 3 ч после посева общее количество распластанных клеток в среде, содержащей 10% ЭС, с добавлением ФКК и “Актовегина” составило $81 \pm 1,4$ и $78,4 \pm 2,2\%$ соответственно, что достоверно отличалось от контроля. К 24 ч культивирования достоверных отличий от контроля в общем количестве распластанных клеток при добавлении ФКК и “Актовегина” в среду, содержащую 10% ЭС, обнаружено не было.

При добавлении ФКК в среду, содержащую 2% ЭС, через 1,5 ч после посева общее количество распластанных клеток составило $67,4 \pm 1,4\%$, что на 10,8% больше, чем в контроле, и на 13,4%, чем в среде с 10% ЭС. При добавлении “Актовегина” этот показатель достоверно превышал контроль, но был достоверно ниже, чем в среде с ФКК. Через 3 ч после посева общее количество распластанных клеток при добавлении в среду культивирования, содержащую 2% ЭС, как ФКК, так и “Актовегина”, также достоверно превышало контроль и достоверно не отличалось от этого показателя в среде, содержащей 10% ЭС. Во всех образцах через 5 и 24 ч культивирования ФЧ в среде с 2% ЭС не было обнаружено достоверных отличий в общем количестве распластанных клеток.

Изучение степени распластанности ФЧ под влиянием ФКК показало (рис. 2), что количество веретенообразных клеток при его добавлении в среду, содержащую 10% ЭС, увеличивалось через 1,5; 3 и 5 ч в 2,8; 5,9 и 6,5 раз соответственно по сравнению с контролем. Через 24 ч количество веретенообразных клеток при добавлении ФКК в среду, содержащую 10% ЭС, составило $68 \pm 2,4\%$ и достоверно не отличалось от контроля. Действие “Актовегина” было аналогичным.

Добавление ФКК в среду культивирования, содержащую 2% ЭС, показало, что уже через 1,5 ч количество веретенообразных клеток составило $36,0 \pm 2\%$, что в 2,7 и 2,0 раза больше, чем в контроле и при добавлении “Актовегина” соответственно. Через 3 и 5 ч количество веретенообразных клеток при добавлении ФКК в среду культивирования было достоверно выше в 1,6 и 1,2 раза соответственно, чем в контроле, и превышало действие “Актовегина” в 1,1 и 1,3 раза. К 24 ч количество веретенообразных клеток при добавлении ФКК и “Актовегина” в среду культивирования с 2% ЭС

and significantly higher, than in the one with 10% ES: within the first 1.5 hrs after inoculation it made $13.4 \pm 1.1\%$, but to the 5 hrs increased to $37.4 \pm 0.5\%$. To 24 hrs of culturing the situation changed: the number of spindle-shaped cells in the media, containing 10 and 2% ES achieved 71.2 ± 1.5 and $56.8 \pm 0.9\%$, correspondingly.

The obtained results of HF's flattening dynamics on a substrate testify to the fact, that the blood serum in culturing medium is important for reparative process proceeding in cells after cryopreservation. In spite of a high rate of HF's flattening at initial stages of culturing in the 2%-containing medium, there was finally obtained a less degree of cell flattening, compared to the culturing in the medium with 10% ES, testifying to a lack in adhesive serum factors.

Obviously, the absence of flattening features within the first days after inoculation reflects the functional damages of cells, obtained under cryopreservation, not revealed during supravital staining and even by the number of cells, attached to a substrate.

Studying the total number of flattened cells in HF's culture after cryopreservation (Fig. 2), when adding FCB into the medium, containing 10%ES, demonstrated, that 1.5 hrs after inoculation this index was $54 \pm 1\%$, that was by 8.8% times higher, than in the control. Actovegin effect remained statistically and significantly unchanged, compared to FCB one. In 3 hrs after inoculation the total number of flattened cells in the medium, containing 10% ES, with adding FCB and Actovegin was 81 ± 1.4 and $78.4 \pm 2.2\%$, correspondingly, that statistically and significantly differed from the control. To the 24 hrs of culturing no statistically significant differences from the control in a total number of flattened cells under FCB and Actovegin adding into the 10% ES-containing medium, were revealed.

When adding FCB into the medium with 2% ES, in 1.5 hrs after inoculation the total number of flattened cells was $67.4 \pm 1.4\%$, that was by 10.8 and 13.4% higher, compared to the control and the medium with 10% ES, correspondingly. Under Actovegin adding this index statistically and significantly exceeded the control, but remained statistically and significantly lower, than in the medium with FCB. In 3 hrs after inoculation the total number of flattened cells under the adding into 2% ES-containing culturing medium of both FCB and Actovegin statistically and significantly exceeded the control as well and remained statistically and significantly unchanged from this index in the medium with 10% ES. In all the samples in 5 and 24 hrs after HF's culturing with 2% ES no statistically significant differences were found out in the total number of flattened cells.

Studying the HF's flattening rate under FCB effect demonstrated (Fig. 2) a number of spindle-shaped cells

составило соответственно $59,8 \pm 0,9$ и $60,6 \pm 0,8\%$, что достоверно выше, чем в контроле.

Следует отметить, что в первые 5 ч роста культуры количество веретенообразных клеток при добавлении ФКК в среду, содержащую 2% ЭС, было выше, чем при добавлении в среду с 10% ЭС. Однако через 24 ч количество веретенообразных клеток в среде с 2% ЭС было достоверно ниже по сравнению с показателями степени распластанности клеток в среде, содержащей 10% ЭС, как в контроле, так и при добавлении ФКК и “Актовегина”.

Таким образом, установлено, что при культивировании диплоидной культуры ФЧ после криоконсервирования ФКК оказывает действие, стимулирующее процессы клеточной адгезии, которое выражено на начальном этапе роста культуры в первые 5 ч. Отсутствие влияния ФКК при его добавлении в среду, содержащую 10% ЭС, на адгезию клеток через 24 ч роста культуры может свидетельствовать о завершении процесса распластывания сохранившихся после криоконсервирования клеток.

После изучения адгезии диплоидной культуры ФЧ мы исследовали дальнейший ее рост в средах с различным содержанием ЭС до и после криоконсервирования.

Известно, что после максимального распластывания клетки и формирования характерной морфологии на подложке она становится чувствительной к действию митогенов. Следовательно, увеличение скорости распластывания культуры приводит к более раннему запуску в клетках механизмов подготовки к делению и вступлению в митотический цикл. Также ранее мы установили, что ФКК и “Актовегин” стимулируют митотическую активность клеток [5, 16]. Таким образом, эти факторы приводят к увеличению пролиферации культуры.

Показано, что количество клеток на 4-е сутки роста нативной культуры ФЧ при культивировании в среде, содержащей 2% ЭС, составило 63,3% относительно этого показателя при культивировании в среде с 10% ЭС (рис. 3). Добавление ФКК в среду культивирования, содержащую 10% ЭС, приводило к увеличению количества клеток в исследуемые сроки относительно контрольных значений на 78%, что превышает данный показатель при добавлении “Актовегина”.

Добавление ФКК в ростовую среду, содержащую 2% ЭС, стимулировало прирост клеток относительно контроля на 72,8%, а добавление “Актовегина” в аналогичной концентрации оказалось менее эффективным и стимулировало прирост клеток относительно контроля на 45,2%.

По сравнению с ростом нативной культуры количество ФЧ после криоконсервирования во всех

under its adding into the medium, containing 10% ES, as increasing after 1.5, 3, and 5 hrs in 2.8, 5.9 and 6.5 times, correspondingly, compared to the control. After 24 hrs a number of spindle-like cells under FCB adding into the medium with 10% ES was $68 \pm 2.4\%$ and did not statistically and significantly differ from the control. Actovegin effect was similar.

FCB adding into the culturing medium, containing 2% ES, showed a number of spindle-like cells even in 1.5 hrs to make $36.0 \pm 2\%$, being in 2.7 and 2.0 times higher, than in the control and under Actovegin adding, correspondingly. In 3 and 5 hrs the number of spindle-shaped cells under FCB adding into culturing medium was statistically and significantly higher in 1.6 and 1.2 times, correspondingly, if comparing to the control and exceeded the Actovegin effect in 1.1 and 1.3 times. To the 24 hrs the number of spindle-shaped cells under FCB and Actovegin adding into the culturing medium with 2% ES was 59.8 ± 0.9 and $60.6 \pm 0.8\%$, correspondingly, being statistically and significantly higher, than in the control.

Of note is the fact, that within the first 5 hrs of culture growth the number of spindle-like cells under FCB adding into the medium with 2% ES, was higher, compared to adding in 10% one. However in 24 hrs the number of spindle-like cells in the medium with 2% ES was statistically and significantly lower, compared to the indices of cell flattening degree in that with 10% ES, both in the control and under FCB and Actovegin adding.

Thus, there was established, that under HF's diploid culture culturing after cryopreservation, the FCB caused the effect, stimulating the cell adhesion processes, manifested at an initial stage of culture growth within the first 5 hrs. No FCB effect under its adding into the medium with 10% ES on cell adhesion in 24 hrs of culture growth may testify to the completion of flattening process of the cells, preserved after cryopreservation.

After studying the adhesion of HF's diploid culture we investigated its further growth in the media with different ES content prior to and after cryopreservation.

It is known, that after maximum cell flattening and typical morphology formation on a substrate, it becomes sensitive to mitogen effect. Consequently, an increased rate in culture flattening results in earlier triggering in cells of preparative mechanisms for fission and entry into mitotic cycle. Previously we also established the FCB and Actovegin as stimulating the cell mitotic activity [5, 15]. Thus, these factors result in an increased cell proliferation.

Cell number to the 4th day of HF's native culture growth under culturing in the medium with 2% ES was shown to make 63.3% in respect to this index under culturing in that with 10% ES (Fig. 3). FCB adding into culturing medium with 10% ES resulted in an

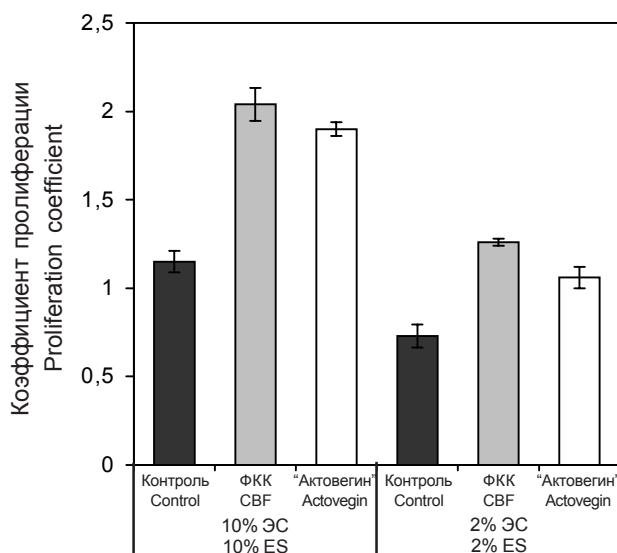


Рис. 3. Прирост клеток на 4-е сутки роста нативной культуры ФЧ при добавлении ФКК и “Актовегина” в ростовую среду с различной концентрацией ЭС; * – различия статистически достоверны по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0,05$).

Fig. 3. Cell increase to the 4th day of HF's native culture growth when adding FCB and Actovegin into the growth medium with differently concentrated ES; * – differences are statistically significant compared to the corresponding control ($p < 0.05$).

соответствующих вариантах снижено в 2–2,5 раза (рис. 4). При добавлении ФКК и “Актовегина” в среду культивирования деконсервированной культуры ФЧ, содержащую 10% ЭС, достоверно увеличивалось количество клеток в исследуемые сроки роста культуры по сравнению с контролем. Количество клеток при добавлении ФКК превысило контроль на 43,4%, а при добавлении “Актовегина” – на 29%. При культивировании ФЧ в среде, содержащей 2% ЭС, ФКК и “Актовегин” достоверно не влияли на рост культуры.

Выявленные отличия в действии ФКК на пролиферацию нативной и деконсервированной культур при их культивировании в среде с пониженной концентрацией ЭС требуют дальнейшего исследования. Эти данные, вероятно, указывают на повышенную потребность клеток после криоконсервирования в сывороточных факторах для восстановления полученных повреждений. При их недостатке стимулирующее действие ФКК и “Актовегина” не может быть реализовано.

Выводы

Установлено стимулирующее действие ФКК на адгезивные и пролиферативные свойства диплоидной культуры ФЧ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при культивировании ФЧ ФКК оказывает более

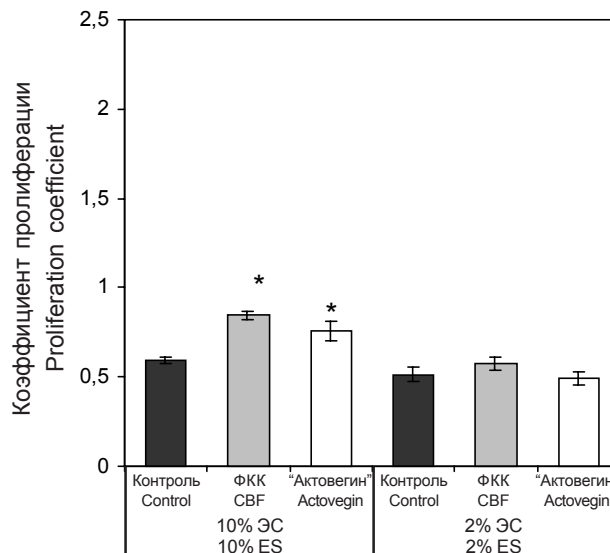


Рис. 4. Прирост клеток на 4-е сутки роста культуры ФЧ после криоконсервирования при добавлении ФКК и “Актовегина” в ростовую среду с различной концентрацией ЭС; * – различия статистически достоверны по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0,05$).

Fig. 4. Cell increase to the 4th day of HF culture after cryopreservation growth when adding FCB and Actovegin into the growth medium with differently concentrated ES; * – differences are statistically significant compared to the corresponding control ($p < 0.05$).

increase of cell number within the studied terms in respect to the control values by 78%, that exceeded this index for Actovegin.

FCB adding into the growth medium, containing 2% ES, stimulated the cell surplus in respect to the control by 72.8%, but Actovegin adding in the same concentration occurred to be less efficient and stimulated the cell surplus in respect to the control by 45.2%.

Comparing to the native culture growth, the HF's number after cryopreservation in all corresponding variants reduced in 2–2.5 times (Fig. 4). When adding FCB and Actovegin in culturing medium of frozen-thawed culture of HF's, containing 10% ES, there was a statistically significant increase in cell number within the studied terms of culture growth, compared to the control. Cell number under FCB and Actovegin adding exceeded the control by 43.4 and 29%, correspondingly. During HF's culturing in the medium with 2% ES, the FCB and Actovegin did not statistically and significantly affect the culture growth.

The revealed differences in FCB action on the proliferation of native and frozen-thawed cultures under their culturing in the media with reduced ES concentration need further investigations. These data probably indicate to an increased cell need in serum factors after cryopreservation to recover the obtained damages. Under their lack a stimulating effect of FCB and Actovegin can not be implemented.

выраженное стимулирующее действие на скорость распластывания клеток после криоконсервирования, чем в нативной культуре.

При сопоставлении данных о влиянии ФКК и "Актовегина" на пролиферацию нативной и деконсервированной культур ФЧ выявлено, что после криоконсервирования их стимулирующий эффект выражен менее, чем в нативной культуре.

Установленное стимулирующее действие ФКК на функциональный метаболизм клеток способствует их скорейшему восстановлению после криоконсервирования, что делает применение культивируемых ФЧ более эффективным с точки зрения клеточной терапии.

Авторы выражают благодарность с.н.с. ИПК и К НАН Украины Гончарук Е. И. за содействие в планировании экспериментов и обсуждении полученных результатов.

Литература

1. *Биотехнология: характеристика животных клеток, культивируемых in vitro* [Электронный ресурс] // [веб-сайт] www.biotechnolog.ru (30.04.2009).
2. *Боценовский В.А., Барышников А.Ю.* Молекулы клеточной адгезии человека // *Успехи совр. биологии.*— 1994.— Т. 144, №6.— С. 741–753.
3. *Виноградов В.Л., Суханов Ю.С.* Стабилизация метаболизма и мембран эритроцитов в целях усовершенствования их криоконсервирования // *Гематология и трансфузиология.*— 1988.— №6.— С. 44–51.
4. *Гулевский О.К., Грищенко В.И., Никольченко А.Ю., Моисеева Н.М.* Властивості і перспективи використання кордової крові в клінічній практиці // *Укр. журн. гематології та трансфузіології.*— 2005.— Т. 5, №1.— С. 5–14.
5. *Гулевский А.К., Трифонова А.В., Лаврик А.А.* Влияние актовегина на пролиферацию клеток перевиваемых линий // *Цитология и генетика.*— 2008.— Т. 42, №1.— С. 53–57.
6. *Гулевский А.К., Трифонова А.В., Петренко Т.Ф., Лаврик А.А.* Воздействие фракции из кордовой крови крупного рогатого скота (до 5 кДа) на пролиферативную активность клеток *in vitro* после криоконсервации // *Межвідомчий тематичн. наук. збірник "Ветеринарна медицина".*— 2008.— С. 147–153.
7. *Ерохин А.И.* Использование культуры фибробластов человека при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2002. С.9–13.
8. *Жилина Н.М., Иванова В.Б., Корень Н.Н. и др.* Сравнительный анализ кожной аутопластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов // *Вестник новых медицинских технологий.*— 1997.— Т. 4, №1.— С. 2.
9. *Колосов Н.Г., Повещенко О.В., Ефремов А.В. и др.* Использование фетальных клеток и тканей в лечении поверхностных ран и трофических язв // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*— 1998.— Т. 126, Прил. 1.— С. 128–129.
10. *Методические рекомендации по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани.*— Харьков, 1993.— 20 с.
11. *Методы культивирования клеток:* Сб. науч. тр. / Под ред. Г.П. Пинаева.— Л.: Наука, 1988.— 319 с.

Conclusions

Stimulating effect of FCB on adhesive and proliferative properties of HF's diploid culture was established.

The data obtained testify to the fact, that under HF's culturing the FCB causes a more pronounced stimulating effect on cell flattening rate after cryopreservation, compared to the native culture.

When comparing the data about FCB and Actovegin effects on proliferation of native and frozen-thawed HF's cultures, their stimulating effect after cryopreservation was revealed to be less manifested, compared to the native culture.

Revealed stimulating effect of FCB on cell functional metabolism contributes to their early recovery after cryopreservation, making the application of cryopreserved HF's more efficient from the point of view of cell therapy.

The authors express gratitude to the senior research fellow of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine Goncharuk E.I. for her assistance in experimental planning and discussion of the results obtained.

References

1. *Biotechnology: characteristics of animal cells, cultured in vitro* [Electronic resource] // [web site] www.biotechnolog.ru (30.04.2009)
2. *Botsenovskiy V.A., Baryshnikov A.Yu.* Molecules of human cell adhesion // *Uspekhi Sovr. Biologii.*— 1994.— Vol. 144, N6.— P. 741–753.
3. *Vinogradov V.L., Sukhanov Yu.S.* Stabilisation of metabolism and erythrocyte membranes for improving their cryopreservation // *Gematologiya i Trasfuziologiya.*— 1988.— N6.— P. 44–51.
4. *Gulevsky O.K., Grishchneko V.I., Nikolchenko A.Yu., Moiseyeva N.M.* Properties and perspectiveness of cold blood application in clinical practice // *Ukr. Zhurn. Gematologii ta Transfuziologii.*— 2005.— Vol. 5, N1.— P.5–14.
5. *Gulevsky A.K., Trifonova A.V., Lavrik A.A.* Actovegin effect on cell proliferation of recultured lines // *Tsitologiya i Genetika.*— 2008.— Vol. 42, N1.— P. 53–57.
6. *Gulevsky A.K., Trifonova A.V., Petrenko T.F., Lavrik A.A.* Effect of fraction from cattle cord blood (below 5 kDa) on proliferative activity of cells *in vitro* after cryopreservation // *Interdepartm. Thematic Scient. Coll. "Veterynarna medytsyna".*— 2008.— P. 147–153.
7. *Erokhin A.I.* Usage of human fibroblast culture at surgical treatment of inflammatory diseases of parodontium: Author's abstract of thesis of candidate of medical sciences.— Moscow, 2002.— P. 9–13.
8. *Zhilina N.M., Ivanova V.B., Koren' N.N. et al.* Comparative analysis of skin autoplata using the standard methods and with cell culture of fibroblasts // *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy.*— 1977.— Vol. 4, N1.— P. 2.
9. *Kolosov N.G., Poveschenko O.V. Efremov A.V. et al.* The use of fetal cells and tissue in the therapy of superficial wounds and trophic ulcers // *Bull. eksperim. biologii i meditsyny.*— 1988.— Vol. 126, Suppl. 1.— P. 128–129.
10. *Methodical recommendations on cryopreservation and cytological control of quality of cell cultures and tissue fragments.*— Kharkov, 1993.— 20 p.

12. *Мушкambarов Н.Н., Кузнецов С.Л.* Молекулярная биология: Учебное пособие для студ. мед. вузов.– М.: Медицинское информационное агентство, 2003.– 544 с.
13. *Нордвик Б.* Актовегин. Новые аспекты клинического применения.– М., 2002.– 280 с.
14. *Практикум по цитологии: Учеб. пособие / Под ред. Ю.С. Ченцова.– М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988.– 294 с.*
15. *Саркисов Д.С.* Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении кожных покровов // *Вестн. РАН.– 1994.– №6.– С. 6–11.*
16. *Трифонова Г.В.* Використання низькомолекулярної фракції кордової крові у біотехнології культур клітин // *Конф. молодих вчених "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології".– Київ, 2007.– С. 43.*
17. *Пат. №6521, МПК⁷ А61К35/54 Україна.* Препарат "Культура диплоїдних клітин людини" для клітинної терапії // *О.І. Гончарук, Т.П. Петренко, Н.О. Волкова, В.І. Грищенко, Заявл. 20.09.04, опубл. 16.05.2005.– Бюл. №5.*
18. *Basic Cell Culture.* Practical approach. Second edition / Ed. by J.M. Davis.– Oxford: University Press, 2001.– 381 p.
19. *Dairkee Sh. H., Gilbert M.W.* Production of factors required for cell attachment and spreading is a constitutive property in mouse A9 cells // *J. Cell. Physiol.– 1979.– Vol. 99, N3.– P. 319–326.*
20. *Folkman J., Moscona A.* Role of cell shape in growth control // *Nature.– 1978.– Vol. 273, N5661.– P. 345–349.*
21. *Kane O., George E., Offner M. et al.* Nine days post-thawing red cell conservation in a synthetic medium. *Biochemical studies // Transfusion.– 1986.– Vol. 26, N5.– P. 437–440.*
22. *Liang Y., Besch-Williford C., Benakanakere I. et al.* Re-activation of the p53 pathway inhibits *in vivo* and *in vitro* growth of of hormone-dependent human breast cancer cells // *Int. J. Oncol.– 2007.– Vol. 31, N4.– P. 777–784.*
23. *Montgomery A.M.P., Reisfeld R.A., Cheres D.A.* Integrin $\alpha v \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in a three-dimensional dermal collagen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1994.– Vol. 91, N19.– P. 8856–8860.*
11. *Methods for cell culturing: Collection of scientific papers / Ed. by G.P. Pinayev.– Leningrad: Nauka, 1988.– 319 p.*
12. *Mushkambarov N.N., Kuznetsov S.L.* Molecular biology: Manual for students of medical universities.– Moscow: Medical Informational Agency, 2003.– 544 p.
13. *Nordvik B.* Actovegin. New aspects of clinical application.– Moscow, 2002.– 280 p.
14. *Practical course on cytology: Manual / Ed by Yu.S. Chentsov.– Moscow: Publishing House of Moscow University, 1988.– 294 p.*
15. *Sarkisov D.S.* Theoretical and practical aspects of using cultured fibroblasts during skin integument recovery // *Vestnik of Russian Academy of Sciences.– 1994.– N6.– P. 6–11.*
16. *Trifonova G.V.* Usage of low molecular fraction of cord blood in cell culture biotechnology // *Proc. of Conference of Young Scientists "Actual Problems of Biochemistry and Biotechnology".– Kiev, 2007.– P. 43.*
17. *Patent N 6521, IPC7 A61K35/54 Ukraine,* Preparation "Culture of human diploid cells" for cell therapy // *O.I. Goncharuk, T.P. Petrenko, N.O. Volkova, V.I. Grischenko, Applied 20.09.04, Published 16.05.2005.– Bull. N5.*
18. *Basic Cell Culture.* Practical approach. Second edition / Ed. by J.M. Davis.– Oxford: University Press, 2001.– 381 p.
19. *Dairkee Sh. H., Gilbert M.W.* Production of factors required for cell attachment and spreading is a constitutive property in mouse A9 cells // *J. Cell. Physiol.– 1979.– Vol. 99, N3.– P. 319–326.*
20. *Folkman J., Moscona A.* Role of cell shape in growth control // *Nature.– 1978.– Vol. 273, N5661.– P. 345–349.*
21. *Kane O., George E., Offner M. et al.* Nine days post-thawing red cell conservation in a synthetic medium. *Biochemical studies // Transfusion.– 1986.– Vol. 26, N5.– P. 437–440.*
22. *Liang Y., Besch-Williford C., Benakanakere I. et al.* Re-activation of the p53 pathway inhibits *in vivo* and *in vitro* growth of of hormone-dependent human breast cancer cells // *Int. J. Oncol.– 2007.– Vol. 31, N4.– P. 777–784.*
23. *Montgomery A.M.P., Reisfeld R.A., Cheres D.A.* Integrin $\alpha v \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in a three-dimensional dermal collagen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1994.– Vol. 91, N19.– P. 8856–8860.*

*Поступила 26.05.2009
Рецензент Е.И. Гончарук*

Accepted in 26.05.2009