

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577:27

РОЛЬ ПРОДУКТІВ ДЕГРАДАЦІЇ ФІБРИНОВОГО ЗГУСТКА В РЕГУЛЯЦІЇ ЖИТТЄВИХ ФУНКЦІЙ КЛІТИН ЛІНІЇ РС-12

О. М. КАЛАШНИК, Ю. І. ПЕТРОВА, Т. М. ПЛАТОНОВА, М. В. СКОК,
С. СЕДЕРХОЛЬМ-ВІЛЬЯМС

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: lk56@yandex.ru

Показано, что продукты деградации фибриновых сгустков, полученные под действием клеток феохромоцитомы РС-12, дозозависимо модулируют скорость пролиферации последних и способствуют их выживанию при посеве в субоптимальной плотности. При этом возрастает также степень адгезии клеток к поверхности пластика и увеличивается количество $\alpha 3$ - и $\alpha 5$ -субъединиц никотинового ацетилюхолинового рецептора. Такой разнонаправленный и комплексный эффект обусловлен воздействием продуктов гидролиза фибрина, отличающихся по молекулярной массе. Низкомолекулярная фракция с молекулярной массой меньше 30 кДа, но не очищенный α C-домен, стимулировала пролиферацию клеток, ослабляла их адгезию к подложке, увеличивала экспрессию никотинового рецептора и стимулировала образование нейритов, чего не наблюдалось при действии суммарного гидролизата. Напротив, высокомолекулярные продукты гидролиза фибрина, в частности фрагменты D, DD и E, существенно усиливают адгезию клеток к пластику и замедляют их деление. Выживанию клеток способствуют как высоко-, так и низкомолекулярная фракции. Полученные данные свидетельствуют о том, что продукты гидролиза фибрина стабилизируют жизнедеятельность нейроноподобных клеток, усиливают их контакт с окружающим матриксом и способствуют проявлению нейроноподобных свойств.

К л ю ч е в ы е с л о в а: клетки РС-12, фрагменты фибрина, пролиферация, адгезия, дифференцировка.

Фібриноген, що під дією тромбіну перетворюється на нерозчинний фібрин, є ключовим білком системи зсідання крові. Разом з агрегованими тромбоцитами, він забезпечує формування згустка у відповідь на пошкодження ендотелію судин. Наступний протеоліз згустка призводить до утворення продуктів деградації фібрину, які виявляють біологічну активність стосовно клітин і тканин організму, стимулюючи, зокрема, розвиток запалення [1], міграцію фібробластів і тромбоцитів, які, у свою чергу, синтезують білки позаклітинного матриксу і забезпечують формування рубця [2, 3]. Фібрин та продукти його деградації здатні впливати на клітини як безпосередньо, так і опосередковано – завдяки сорбції на поверхні різних речовин, наприклад плазміногену, який стимулює міграцію кератиноцитів [4]. Так, фібриновий клей, який використовують у хірургії для з'єднання оперованих тканин, все частіше пропонують для прискореного загоєння ран, у т.ч. і як джерело речовин, які стимулюють відновлення тканин [5, 6].

Відновлення тканин після поранення або хірургічного втручання неможливе без регене-

рації нервів. Фібриновий матрикс позитивно впливає на цей процес, сприяючи регенерації сенсорних аксонів *in vivo* [7]. Починаючи із 70-х років минулого століття [8], фібриновий клей пропонують для з'єднання [9, 10] і стабілізації нервів під час операцій [11], а також як депо речовин, що збільшують швидкість та якість їхньої регенерації [12, 13]. Окрім того, запропоновано використання фібринового клею як середовища у разі трансплантації нервових клітин, зокрема симпатoadренальних, для полегшення стану організму при хронічних болях [14], покращення моторних функцій у літніх людей [15] та лікування хворих при деяких нейродегенеративних захворюваннях [16]. Проте механізм дії фібринового матриксу на нервові клітини остаточно не з'ясовано.

У нашій попередній роботі [17] було встановлено, що клітини лінії РС-12, які мають симпатoadренальне походження, продукували плазміноген і тканинний активатор плазміногену (ТАП), що сприяло руйнуванню фібринового згустка. Метою проведених нами досліджень було вивчення впливу фібринового згустка і продуктів

його деградації на виживання, проліферацію, диференціювання та адгезивні властивості клітин РС-12.

Матеріали і методи

Як модель нервових клітин було використано пухлинну клітинну лінію феохромоцитоми РС-12, що походить із хромафінних клітин надниркових залоз щура і диференціюється в культурі у клітини, подібні до симпатичних нейронів [18]. Клітини, які було одержано з Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (Київ), вирощували в культуральних флаконах у живильному середовищі RPMI-1640 із додаванням до нього 20 мМ Нерес, 20 мМ L-глутаміну, $5 \cdot 10^{-5}$ М β -меркаптоетанолу, 40 мкг/мл гентаміцину та 10% сироватки теляти («Gibco BRL», Німеччина). Для експерименту зняті із пластику піпетуванням або 0,2%-м розчином ЕДТА клітини відмивали, після чого 1 мл суспензії ($2 \cdot 10^4$ клітин/мл), сіяли у 96-лункові планшети або 100-міліметрові чашки Петрі.

Фібриноген виділяли з донорської цитратної плазми крові у присутності 100 мг/мл соєвого інгібітора трипсину переосадженням із 8,5%-м сірчаноокислим натрієм методом Т. В. Варецької [19]. Згусток готували з розчинів фібриногену (20 мг/мл) та тромбіну («Merck», Німеччина; 1 мг/мл, активність 100 од./мл) у співвідношенні 4 од. тромбіну на 1 мл фібриногену. Цю суміш витримували 30 с у пробірці і вносили в лунки або чашки Петрі (10–400 мкл/мл живильного середовища залежно від умов експерименту). Клітини наносили на поверхню згустка або додавали до суміші фібриноген–тромбін під час полімеризації. Упродовж експерименту за станом згустка спостерігали візуально, а рівень його деградації клітинами РС-12 визначали за даними вимірювання його діаметра або фотографування. Контрольний згусток інкубували в живильному середовищі, яке не містило клітин.

Після повної деградації згустка одержаний гідролізат фракціонували ультрафільтрацією з метою розділення молекулярної маси 30 кДа. Фракції високо- та низькомолекулярних компонентів діалізували проти живильного середовища, стерилізували фільтрацією і відбирали проби для дослідження компонентного складу методом електрофорезу як описано раніше [17].

Для визначення інтенсивності проліферації клітини засівали в 96-лункові планшети у присутності фібринового згустка, продуктів його деградації або тромбіну. Для контролю клітини засівали в чисте живильне середовище без згустка. Після 5–7 діб інкубації кількість живих клітин визначали за включенням в них тріазолу блакитного [20].

Силу адгезії клітин РС-12 до культурального (адгезивного) пластику після 5 діб інкубації зі згустком або продуктами його деградації визначали двома методами. У першому варіанті досліду вирощені в чашках Петрі клітини знімали з пластику 0,2%-м розчином ЕДТА, відмивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином (ЗФР) і засівали в 96-лункові планшети. Через 3,5 год планшети 30 хв струшували на шейкері, клітини, що відкріпилися, змивали ЗФР, а кількість клітин, що залишилися прикріпленими, визначали за ступенем забарвлення в них тріазолу блакитного. Загальну кількість клітин (без струшування) визначали окремо і результат наведено як відсоток клітин, що залишилися прикріпленими. У другому варіанті експерименту клітини відразу вирощували в 96-лункових планшетах, після чого досліди проводили як описано вище.

Диференціювання клітин РС-12 в нейроноподібному або ендокринному напрямі визначали цитохімічно за вмістом катехоламінів (КА), ферментів їхнього синтезу і розщеплення: тирозингідроксилази (ТГ) та моноаміноксидази (МАО) відповідно, а також за рівнем експресії $\alpha 3$ - і $\alpha 5$ -субодиниць нікотинового ацетилхолінового рецептора (НАХР). Для цього клітини вирощували 5 діб на предметних скельцях, заздалегідь покритих 5%-м розчином желатину, у скляних кільцях або в чашках Петрі з наступним нанесенням на предметні скельця шляхом цитоцентрифугування. Вміст катехоламінів визначали стандартним методом флуоресцентної мікроскопії [21]. Активність МАО виявляли за Гленнером [22]. Наявність ТГ визначали імуноцитохімічно, використовуючи специфічні моноклональні антитіла («Sigma», США) [23]. Для імуноцитохімічного тесту на визначення $\alpha 3$ - і $\alpha 5$ -субодиниць НАХР клітини на скельцях 30 хв фіксували 4%-м параформальдегідом при 4 °С і обробляли впродовж ночі при 4 °С біотинильованими антитілами, специфічними до $\alpha 3$ - і $\alpha 5$ -субодиниць, у концентрації 10 мкг/мл, розведеними в ЗФР з 1%-м бичачим сироватковим альбуміном (БСА) і 0,02%-м NaN_3 . Як контроль використовували клітини, оброблені біотинильованими нормальними імуноглобулінами кроля. Ендогенну пероксидазну активність блокували 1%-м H_2O_2 протягом 20 хв. Після цього скельця 1 год обробляли авідин-пероксидазним кон'югатом у ЗФР/БСА. Забарвлення проявляли розчином 3,3'-діамінобензидину (2мг/мл) та 0,1%-м H_2O_2 в 0,05 М трис-НСІ-буфері (рН 7,6) і ступінь його аналізували за допомогою світлового мікроскопа.

Зміну експресії $\alpha 3$ - і $\alpha 5$ -субодиниць НАХР під впливом фібрину та продуктів його дегра-

дації вивчали також на живих клітинах за допомогою імуноферментного аналізу (К-ІФА). Для цього клітини РС-12 вирощували 5 діб у 100-міліметрових чашках Петрі (у присутності фібрину і продуктів його деградації або без них), після чого їх знімали із пластику, переносили в мікропробірки та інкубували 30 хв на льоду із біотинильованими антитілами (10 мкг/мл), специфічними до $\alpha 3$ - і $\alpha 5$ -субодиниць nАХР. Ендогенну пероксидазну активність блокували (1%-й H_2O_2 , 20 хв), а клітини обробляли авідинпероксидазним кон'югатом у ЗФР/БСА (30 хв). Забарвлення проявляли розчином ортофенілендіаміну (0,4 мг/мл) і 0,05%-м H_2O_2 в 0,05 М KH_2PO_4 (рН 5,0). Реакцію зупиняли додаванням 4 н розчину H_2SO_4 . Клітини осаджували центрифугуванням, а надклітинну рідину переносили в лунки 96-лункового планшета. Світлопоглинання вимірювали на спектрофотометрі Microelisa Autoreader («Dunattech», Швейцарія) у двопробеному режимі при довжині хвилі 490 та 630 нм.

Результати та обговорення

Під час культивування клітин з фібриновим згустком швидкість їхньої проліферації змінювалась. Характер цих змін залежав від об'єму згустка: згустки об'ємом до 10 мкл на 100 мкл поживного середовища стимулювали проліферацію, тимчасом як згустки більшого об'єму пригнічували її (рис. 1, А). Подібний ефект спостері-

гався у разі додавання до клітин кондиційованого середовища, яке одержували під час сумісної інкубації клітин ($5 \cdot 10^3$) з фібриновим згустком (100 мкл) в 400 мкл середовища до повного лізису його: малі дози супернатанта (5–10 мкл/100 мкл поживного середовища) виявляли стимулювальний, а великі (20–100 мкл) – інгібувальний ефект. Стимулювальний ефект згустка не можна пояснити дією тромбіну, присутнього у його складі, оскільки в концентрації, яку було використано в експерименті (0,8 мкг/мл, що відповідає активності 0,08 од./мл), тромбін не впливав на проліферацію клітин РС-12. Крім того, стимулювання згустком проліферації не відтворювалося за дії фібринопептидів А і В (дані на рисунках не наведено). Раніше ми показали, що клітини РС-12 активували плазміновий тип гідролізу фібринового згустка [17]. Апротинін, який пригнічував його деградацію, знімав цей вплив на проліферацію клітин. Зазначені результати свідчать, що саме продукти деградації фібринового згустка впливають на інтенсивність проліферації клітин РС-12.

Сумісне культивування клітин РС-12 з фібриновим згустком збільшувало їхню життєздатність у разі засівання у субоптимальній густині (меншій ніж $1 \cdot 10^4$ клітин/мл; рис. 1, Б). При цьому оптимальний об'єм згустка (10 мкл/100 мкл живильного середовища) був значно більшим за той, який ефективно стимулював поділ

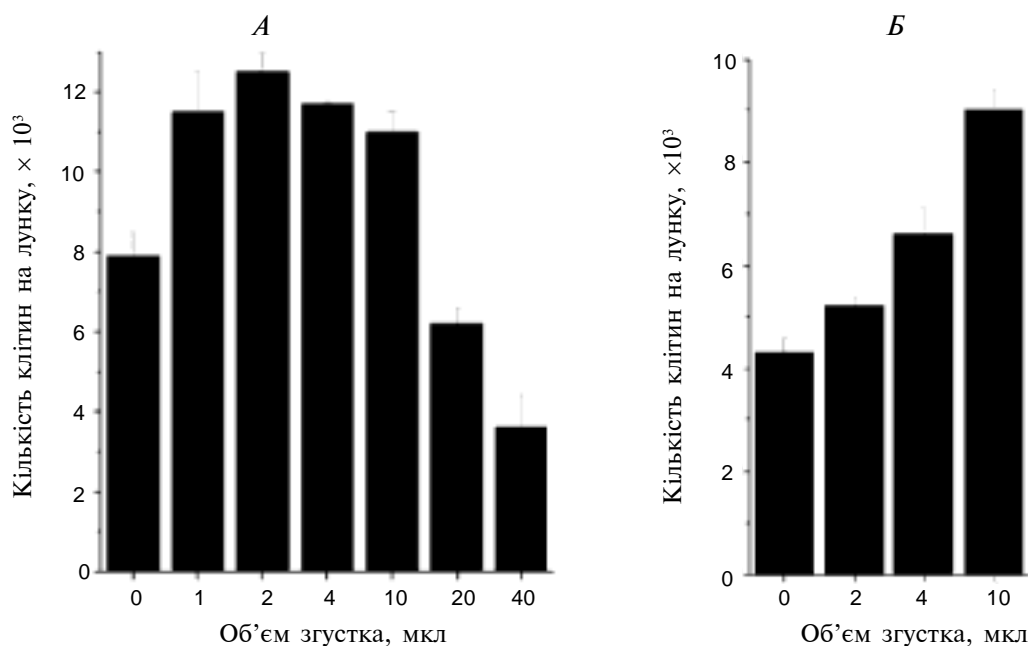


Рис. 1. Вплив фібринових згустків різного об'єму (обчислено на 100 мкл живильного середовища): А – на проліферацію клітин РС-12; Б – на виживання клітин РС-12 у разі засівання їх у субоптимальній густині.

клітин, посіяних у звичайній густині (2 мкл/100 мл середовища; рис. 1, А). Це означає, що продукти деградації фібрину не тільки сприяють поділу клітин, але й запобігають їхній загибелі.

У попередніх експериментах нами було виявлено, що для виживання клітин РС-12 критичною є адгезія до підложки: позбавлення їх можливості прикріпитися до неї упродовж лише двох годин істотно зменшувало життєздатність культури і збільшувало час її подвоєння. З даних літератури відомо, що фрагменти білків матриксу, що є розчинними лігандами інтегринів, як і певні ростові фактори, здатні захищати клітини від апоптозу, спричиненого перебуванням їх у неадгезивних умовах [24]. Оскільки фібрин є лігандом деяких типів інтегринів, ми поставили за мету вивчити, як продукти його деградації впливають на адгезивні властивості клітин РС-12. Виявлено, що продукти гідролізу фібрину істотно посилювали адгезію їх до культурального пластику. В разі оброблення однаковою кількістю розчину EDTA відокремлення клітин від підложки в контролі спостерігалось через 7 хв, а клітин, які інкубували зі згустком протягом 3–5 діб, — лише через 12 хв. Клітини, внесені в середовище для повторного прикріплення до пластику після відмивання від EDTA також відрізнялися за швидкістю розпластування: через 3 год контрольні клітини були менш плоскими, ніж ті, що культивувалися у присутності згустка (рис. 2). Ці спостереження було підтверджено дослідями, в яких визначали силу адгезії клітин РС-12 до культурального пластику: після струшування на шейкері прикріпленими залишалось значно більше тих клітин, які інкубували 5 діб з фібриновим згустком або кондиційованим середовищем. При цьому оптимальний об'єм згустка (10 мкл) був

істотно більшим, ніж той, що найефективніше стимулював поділ клітин (2 мкл). Одержані дані свідчать, що саме сигнал через адгезивні рецептори міг сприяти виживанню клітин, посіяних у субоптимальній густині.

Одна з особливостей клітин лінії РС-12 полягає в тому, що вони зберігають той множинний потенціал первинного попередника, який дозволяє їм за дії певних факторів диференціюватися у хромафінні клітини або в симпатичні нейрони [18]. Диференціювання в нейронному напрямі відбувається за дії фактора росту нервів (ФРН) і характеризується зменшенням або припиненням проліферації, ослабленням адгезії, формуванням нейритів і зростанням кількості холінергічних маркерів, зокрема nAHP [25]. При цьому рівень катехоламінів, як і ферментів їхнього утворення та розщеплення, залишається майже незмінним [18]. Навпаки, диференціювання в ендокринному напрямі, яке відбувається, наприклад, за дії дексаметазону, зумовлює збільшення вмісту катехоламінів на тлі відсутності росту нейритів і змін в експресії nAHP [25]. Ми порівняли вплив ФРН та продуктів деградації фібрину на морфологію клітин, вміст катехоламінів і ферментів їхнього метаболізму, а також експресію nAHP у клітинах РС-12. ФРН дійсно посилював ріст нейритів і сприяв збільшенню кількості $\alpha 5$ - і $\alpha 3$ -субодиниць nAHP, при цьому вміст КА, ТГ і MAO не змінювався. За дії продуктів гідролізу фібрину ріст нейритів не спостерігався, вміст КА, ТГ та MAO також не змінювався, але експресія $\alpha 3$ - і $\alpha 5$ -субодиниць nAHP порівняно з контролем зростала.

Таким чином, продукти деградації фібрину впливали на експресію nAHP подібно до ФРН, але, на відміну від ФРН, прискорювали проліфе-



Рис. 2. Зовнішній вигляд клітин РС-12 під світловим інвертованим мікроскопом ($\times 100$) після 3-годинного прикріплення до культурального пластику: А — контрольні клітини; Б — клітини, які інкубували із фібриновим згустком упродовж 5 діб.

рацію клітин РС-12 і підвищували їхні адгезивні властивості (рис. 1, А; 2, Б). Крім того, виявлено протилежні ефекти залежно від об'єму згустка (рис. 1, А, Б). Це дало підставу припустити, що ми спостерігали певну суму дій окремих компонентів гідролізату, які вивільнюються зі згустка з неоднаковою швидкістю [26].

Як показано нами раніше, гідроліз фібринового згустка клітинами РС-12 зумовлював утворення як порівняно високомолекулярних фрагментів D, DD та E, так і низькомолекулярних поліпептидів із молекулярною масою 6, 7–8 та 25–26 кДа [17]. Ми розділили низько- і високомолекулярні фрагменти за допомогою ультрафільтрації з межею 30 кДа. Наступний діаліз призводив до втрати фрагментів із молекулярною масою меншою, за 10 кДа і, відповідно, низькомолекулярна фракція, яка використовувалася в наступних експериментах, містила, переважно, фрагменти з молекулярною масою близько 25–26 кДа, яка притаманна α C-домену – одному із кінцевих продуктів гідролізу фібрину плазміном. Тому в дослідях також використовували α C-домен.

Виявилось, що саме низькомолекулярні фрагменти фібрину (далі – НМФ) прискорювали проліферацію клітин РС-12, тимчасом як α C-домен був значно менш ефективним, а у вищій концентрації навіть пригнічував проліферацію (рис. 3, А). Це свідчить про те, що у складі низькомолекулярної фракції, крім α C-домену,

містяться інші компоненти із близькою до нього молекулярною масою, від яких залежить стимулювальний ефект. Навпаки, високомолекулярні фрагменти (ВМФ) дозозалежно уповільнювали проліферацію клітин (рис. 3, Б). Таким чином, уповільнення проліферації клітин РС-12 за дії фібринових згустків великих об'ємів (рис. 1, А) могло бути зумовлено накопиченням ВМФ (і α C-домену), вплив яких переважав стимулювальний ефект НМФ.

На відміну від сумарного гідролізату, НМФ активували ріст нейритів (рис. 4) і послаблювали адгезію клітин до пластику. Вони також ефективніше, порівняно із сумарними продуктами деградації, підвищували експресію α 3- і α 5-субодиниць nAHP (рис. 5). Отже, під дією низькомолекулярної фракції гідролізату клітини РС-12 набували властивостей нервових клітин, одночасно зберігаючи і навіть збільшуючи здатність до проліферації. Високомолекулярні фрагменти, навпаки, посилювали адгезію клітин до підложки (рис. 6, А) і не впливали на експресію nAHP та ріст нейритів.

Як НМФ, так і DD-фрагмент фібрину підвищували життєздатність клітин у разі внесення їх у середовище інкубації у субоптимальній густині, хоч і не так ефективно, як сумарний гідролізат. Характерно, що за дії НМФ та частина клітин, яка вижила, утворювала розвиненіші аксони, ніж клітини в контролі, посіяні в оптимальній густині.

Із джерел літератури відомо, що фібрин та

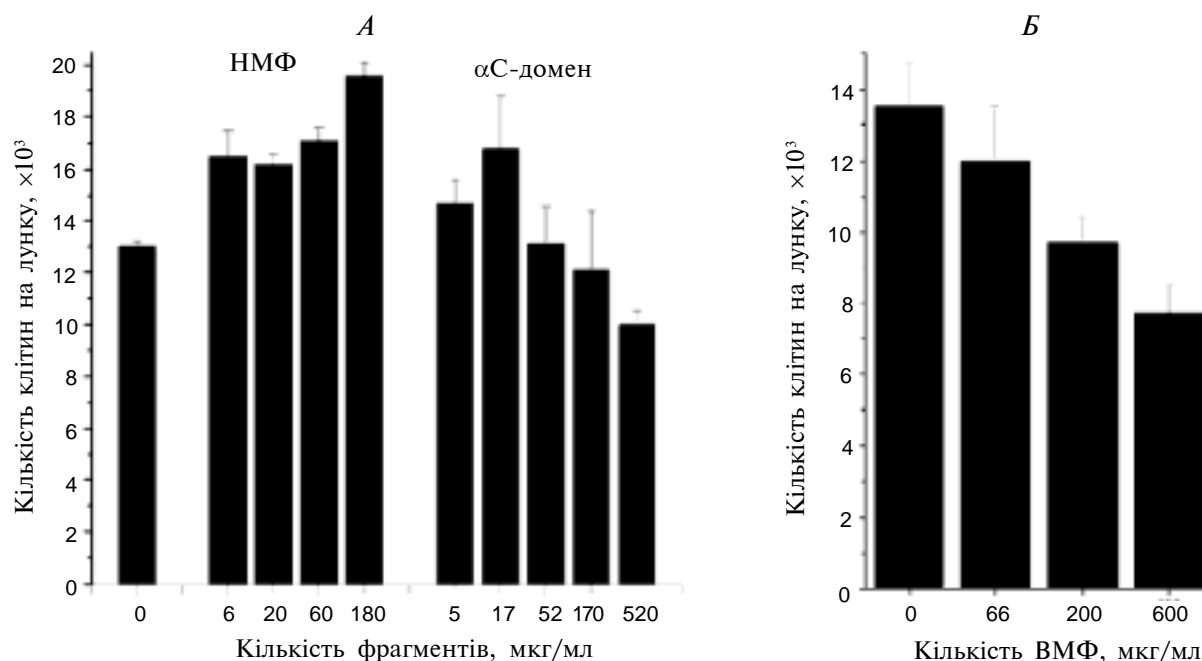


Рис. 3. Вплив на проліферацію клітин РС-12: А – низькомолекулярних фрагментів (НМФ) і α C-домену фібрину, Б – високомолекулярних фрагментів (ВМФ).

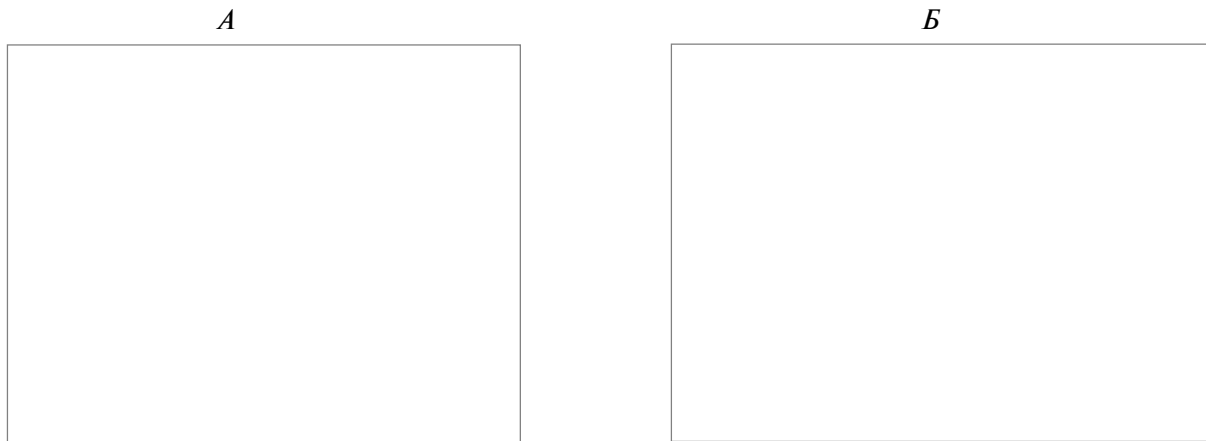


Рис. 4. Зовнішній вигляд клітин PC-12 під світловим інвертованим мікроскопом ($\times 80$) після 5 днів інкубації: А – в контролі; Б – у присутності 2 мкг/мл низькомолекулярних фрагментів фібрину.

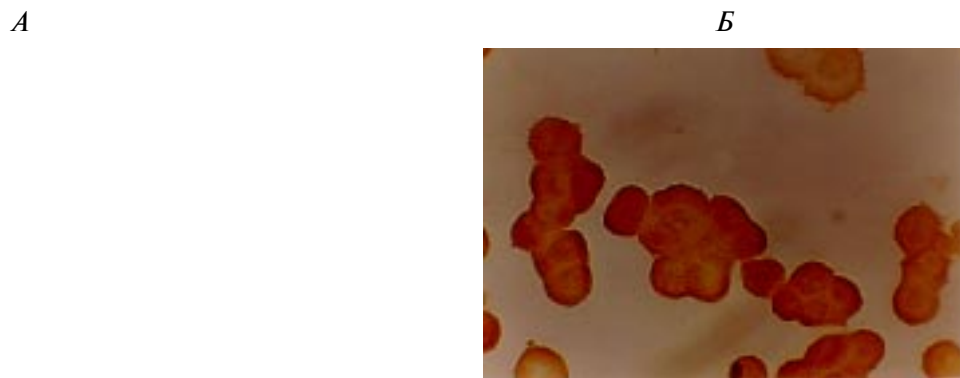


Рис. 5. Імуноцитохімічне забарвлення клітин PC-12 антитілами проти $\alpha 3$ -субодиниці НАХР: А – у контролі; Б – за дії на них низькомолекулярних продуктів гідролізу фібринового згустка.

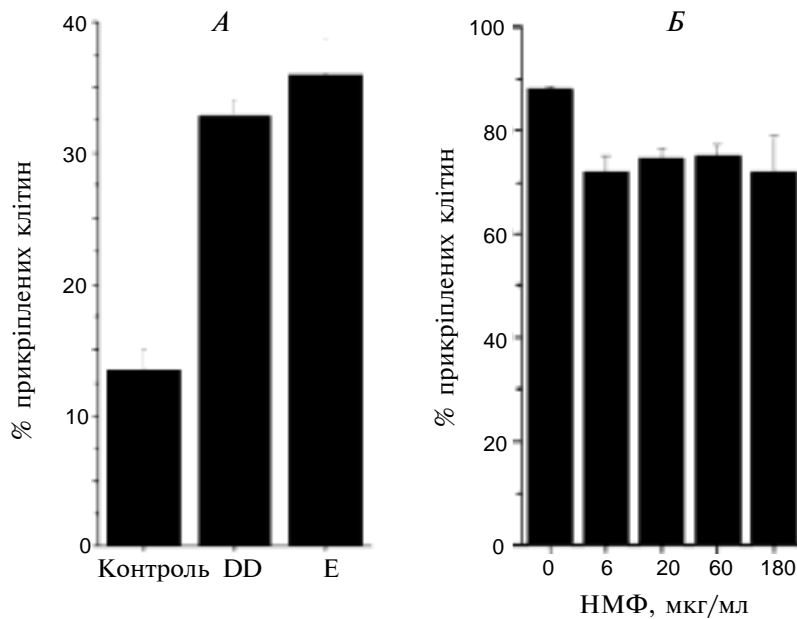


Рис. 6. Адгезія клітин PC-12 до культурального пластику після 5 днів інкубації: А – з DD- і E-фрагментами фібрину (40 і 20 мкг/мл відповідно); Б – з низькомолекулярними фрагментами фібрину (НМФ).

продукти його деградації виявляють біологічну активність щодо багатьох клітин, а не тільки тих, які безпосередньо залучені до системи коагуляції: кератиноцитів, нейтрофілів, клітин гладеньких м'язів судин та моноцитів. Вони здатні моделювати адгезію, міграцію і проліферацію зазначених клітин [1, 27], іноді селективно стосовно ступеня диференціювання їх [4].

Одержані нами дані дозволяють дійти висновку, що продукти деградації фібрину спричиняють комплексну і гетерогенну дію на життєдіяльність клітин лінії PC-12. Низькомолекулярні продукти (з молекулярною масою менше 30 кДа) діють подібно до ростових факторів, зменшуючи час подвоєння клітин, підвищуючи здатність до виживання у несприятливих умовах культивування і диференціювання у нейрони. Високомолекулярні фрагменти DD, D і E стимулювали міцне прикріплення клітин до підложки, що стримувало їхнє ділення, однак сприяло виживанню. Таким чином, нами вперше встановлено, що окремі ефекти опосередковано різними за молекулярною масою продуктами гідролізу фібрину. Їхній комплексний вплив стабілізує життєдіяльність клітин, посилює їхні контакти з навколишнім матриксом і підтримує нейроноподібні властивості, чим можна пояснити позитивний вплив фібринового згустка (за природних умов) або клею (у разі штучного застосування) на відновлення нервових клітин.

THE ROLE OF FIBRIN CLOT DEGRADATION PRODUCTS IN THE REGULATION OF VITAL FUNCTIONS OF PC-12 CELLS

*O. M. Kalashnik, Y. I. Petrova,
T. M. Platonova, M. V. Skok,
S. Cederholm-Williams*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: lk56@yandex.ru

S u m m a r y

The products of the fibrin clot hydrolysis performed by PC-12 cells modulated dose-dependently the rate of cell proliferation and favored their survival when seeded in suboptimal density. Co-incubation of PC-12 cells with fibrin degradation products enhanced cell adhesion to tissue culture plastic, as well as the number of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$ and $\alpha 5$ subunits expressed. It was demonstrated that, in fact, such a heterogeneous and comprehensive influence was a sum of effects exerted by different fibrin fragments. Low molecular weight fraction (below 30 kDa), but not a purified αC -domain, stim-

ulated PC-12 cell proliferation, diminished their adhesion to plastic, increased nicotinic receptor expression and caused processes outgrowth. On the contrary, high molecular weight products, in particular D, DD and E fragments, enhanced PC-12 adhesion to plastic and, as a result, slowed cell division. Both high and low molecular weight fragments favored the survival of PC-12 cells. These results showed that fibrin degradation products support the vital functions of neuron-like cells, favor their contacts with extracellular surrounding and act as neurotrophic factors.

К e y w o r d s: PC-12 cells, fibrin fragments, proliferation, adhesion, differentiation.

1. *Leavell K. J., Peterson M. W. and Gross T. J. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 1996. — 14, N 1. — P. 53–60.*
2. *Gray A. J., Bishop J. E., Mecham R. P. and Laurent G. J. // Ibid. — 1995. — 12, N 6. — P. 684–690.*
3. *Hamaguchi M., Bunce L. A., Sporn L. A. and Francis C. W. // Blood. — 1994. — 84, N 4. — P. 1143–1150.*
4. *Geer D. J. and Andreadis S. T. // J. Invest. Dermatol. 2003. — 121, N 5. — P. 1210–1216.*
5. *Sahni A., Altland O. D., Francis C. W. // J. Thromb. Haemost. — 2003. — 1, N 6. — P. 1304–1310.*
6. *Thorn J. J., Sorensen H., Weis-Fogh U. and Andersen M. // Int. J. Oral. Maxillofac. Surg. — 2004. — 33, N 1. — P. 95–100.*
7. *Zeng L., Huck S., Redl H., Schlag G. // Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. — 1995. — 29, N 3. — P. 199–204.*
8. *Matras H., Braun F., Lassmann H. et al. // J. Max. Fac. Surg. — 1973. — 1. — P. 236–247.*
9. *Dagum A. B. // J. Hand Ther. — 1998. — 11, N 2. — P. 111–117.*
10. *Suri A., Mehta V. S., Sarcar C. // Neurol. India. — 2002. — 50, N 1. — P. 23–29.*
11. *Menovsky T., Bartels R. H. // Neurosurgery. — 1999. — 44, N 1. — P. 224–229.*
12. *Yin Q., Kemp G. J., Yu L. G. et al. // Muscle Nerve. — 2001. — 24, N 3. — P. 345–351.*
13. *Jubran M., Widenfalk J. // Exp. Neurol. — 2003. — 181, N 2. — P. 204–212.*
14. *Sagen J. // ASAIO J. — 1992. — 3. — P. 24–28.*
15. *Emerich D. F., McDermott P. E., Krueger P. M. et al. // Exp. Neurol. — 1993. — 122, N 1. — P. 37–47.*
16. *Tresco P. A., Winn S. R., Aebischer P. // ASAIO J. — 1992. — 3. — P. 17–23.*
17. *Петрова Ю. І., Савчук О. М., Калашник О. М. та ін. // Укр. біохім. журн. — 2004. — 76, № 2. — С. 64–68.*

18. *Greene L. A. and Tischler A. S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1976. — **73**. — P. 2424–2428.
19. *Варецька Т. В.* // Укр. біохім. журн. — 1960. — **32**, № 1. — С. 13–24.
20. *Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F. et al.* // *Cancer Res.* — 1987. — **47**, N 4. — P. 943–946.
21. *Bjorklund A., Falck B., Owman Ch.* *Methods of Investigative and Diagnostic Endocrinology.* Ed. *Berson S. A.* North-Holland Publ. Comp., Amsterdam. — 1972. — **1**. — P. 318–368.
22. *Glennner G. G., Burtner H. I., Brown G. W.* // *J. Histochem. Cytochem.* — 1957. — **5**, N 6. — P. 591–602.
23. *Hassal C. J. S. and Burnstock G.* // *Brain. Res.* — 1986. — **364**. — P. 102–113.
24. *Bozzo C., Bellomo G., Silengo L. et al.* // *Exp. Cell Res.* — 1997. — **237**, N 2. — P. 326–337.
25. *Fujita, K., Lazarovici P., Guroff G.* // *Environ. Health Perspect.* — 1989. — **80**. — P. 127–142.
26. *Walker J. B., Nesheim M. E.* // *J. Biol. Chem.* — 1999. — **274**, N 8. — P. 5201–5212.
27. *Naito M.* // *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* — 2000. — **37**, N 6. — P. 458–463.

Отримано 30.02.2005