

# Морфофункціональні особливості фібробластів лінії L929 в умовах 3D-культивування

Г.А. Божок, А.І. Моїсєєв, О.Л. Горіна, Т.П. Бондаренко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;  
e-mail: ukrainanataliy@gmail.com

*Метою роботи була стандартизація умов отримання життєздатних і функціонально повноцінних клітин у складі мультиклітинних сфероїдів (МС). Останні отримано в умовах 3D-культивування (7 діб) при висіванні фібробластів у концентраціях  $1 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^5$  та  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл. Доведено, що посівна концентрація фібробластів впливає на розмір сформованих МС, а також на життєздатність, морфологічні показники, проліферативну та адгезивну властивості клітин у їхньому складі. Максимальна використана концентрація негативно впливала на сфероїдоутворення, здатність клітин до адгезії, знижувала життєздатність клітин на 19%, коефіцієнт збільшення кількості клітин – в 4,25 рази та підвищувала кількість клітин з фрагментацією ядер і конденсацією хроматину на 20% порівняно з посівною концентрацією  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл. При концентрації  $1 \cdot 10^5$  клітин/мл формувалися переважно поодинокі та малі (близько 10 - 20 мкм) МС, життєздатність клітин в яких становила  $89,5 \pm 1,2\%$ . Фібробласти мали нормальні морфологічні ознаки, однак коефіцієнт збільшення кількості клітин був значно меншим щодо аналогічного показника при посівній концентрації  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл. Таким чином, встановлено, що концентрація  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл є оптимальною для формування МС з морфологічно і функціонально повноцінних фібробластів.*

*Ключові слова:* фібробласти лінії L929; 3D-культивування; мультиклітинні сфероїди; життєздатність, проліферативні та адгезивні властивості клітин у складі мультиклітинних сфероїдів.

## ВСТУП

Тенденції медико-біологічних досліджень останніх років вказують на переваги культивування клітин в умовах 3D [1-4]. Розробка простих і інформативних культуральних модельних систем, в яких функціонування фібробластів максимально наближені до умов *in vivo* є актуальним завданням [5-9]. Зокрема, багатоклітинні сфероїди використовують для скринінгу препаратів, оскільки вони мають значну перевагу порівняно з моношаровими культурами: експериментатори отримують можливість проводити аналіз у просторовому контексті взаємодій клітина-клітина і клітина-матрикс [5]. Однак відомо, що одним з головних недоліком при формуванні мультиклітинних сфероїдів (МС), в будь яких умовах, є розміри сформованих клітинних конгломератів, які впливають на повноцінну

© Г.А. Божок, А.І. Моїсєєв, О.Л. Горіна, Т.П. Бондаренко

дифузію поживних речовин, і відповідно, на їхню життєздатність [10]. Тому стандартизація умов отримання життєздатних і функціонально повноцінних багатоклітинних агрегатів є актуальним завданням.

Метою нашої роботи було з'ясування оптимальної посівної концентрації для отримання життєздатних і функціонально активних клітин у складі МС.

## МЕТОДИКА

Дослідження виконані на перещеплюваній лінії фібробластів L929, яку підтримували протягом 4 пасажів. До цього культура була кріоконсервована згідно з протоколом та зберігалася у низькотемпературному банку ІПКіК НАН України. Клітинну лінію підтримували живильним середовищем DMEM/F12 («Biowest», Франція), що містило 200 Од/мл бензилпеніциліну («Arterium», Украї-

на), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна) та 10% фетальної телячої сироватки («Biowest», Франція) при 37°C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> в пластикових флаконах для культивування («SPL Life Sciences», Корея).

Для отримання МС використовували низькоадгезивну поверхню, для цього чашки Петрі обробляли 2%-м розчином агару («Ferak», Німеччина). Посівна концентрація фібробластів становила  $1 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^5$  та  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл. Культивування проводили протягом 7 діб, на 3-тю добу змінювали половину об'єму середовища.

Оцінювали загальну кількість та життєздатність клітин на 3-тю та 7-му добу за загальноприйнятою методикою за допомогою забарвлення 0,4%-м розчином трипанового синього. Для цього МС дезінтегрували і перетворювали в суспензію клітин обробкою 1:1 сумішшю 0,5%-го трипсину («Sigma», США) і розчину Версену («РАА», США), витримували 5 хв та відмивали від ферментного розчину середовищем DMEM/F12. Аналіз отриманих результатів проводили за формулою: життєздатність =  $\frac{a}{c} \cdot 100\%$ , де а - кількість клітин, які не забарвлювалися; с - загальна кількість клітин [12].

Здатність МС до адгезії досліджували на 7-му добу експерименту перенесенням їх на пластикові чашки Петрі з адгезивною поверхнею. Культивували МС протягом 48 год в умовах, як описано вище. По закінченні підраховували в культуральному середовищі кількість МС, що не прикріпилися до поверхні культивування, за допомогою світло-оптичного мікроскопа «AmScope IN300T-FL» (США). Результат оцінювали як відношення неприкріплених МС до посіяних та виражали у відсотках.

Коефіцієнт збільшення кількості клітин МС оцінювали за відношенням кількості отриманих клітин до посіяних та виражали у відсотках (на 3-тю та 7-му добу).

Досліджували морфологічні особливості клітинних ядер та кількість некротичних клітин у складі МС з використанням флуоресцент-

них барвників Hoechst 33342 («Sigma», США) та йодиду пропідію PI («Sigma», США). Аліквоти PI (7,5 мкмоль/л) та Hoechst 33342 (9 мкмоль/л), розведені фосфатно-сольовим буферним розчином (PBS; pH 7,4), додавали до 1 мл PBS та змішували у співвідношенні 1:1 з середовищем культивування, в якому знаходилися МС. Витримували 30 хв у темряві при кімнатній температурі та видаляли барвники розведенням до 5 мл PBS та центрифугування. Інтенсивність флуоресценції реєстрували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа («Carl Zeiss», Німеччина). Для візуалізації, підрахунку кількості забарвлених клітин та аналізу морфологічних ознак ядер використовували програми LSM 510 та LSM Image Examiner. Кількість клітин з ядрами, зафарбованими флуоресцентними барвниками, виражали у відсотках відносно загальної кількості фібробластів (200 клітин).

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою комп'ютерної обробки з використанням програмного пакету «Statgraphic plus for Windows» версії 2.1 за непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Наводили їх як середнє арифметичне  $\pm$  середнє квадратичне відхилення. Відмінності між групами вважали статистично вірогідними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що при посівній концентрації фібробластів  $1 \cdot 10^5$  клітин/мл на 3-тю добу культивування формувалися поодинокі МС, розміри яких не перевищували 5-10 мкм. При збільшенні концентрації до  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл підвищувалась ефективність сфероїдоутворення, змінювалася кількість клітин у складі МС та, відповідно, розмір агрегатів, який становив 30-40 мкм. Підвищення посівної концентрації до  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл призводило до формування рихлих клітинних агрегатів різної форми з великою кількістю клітин, розміром 200-300 мкм, які мали тенденцію до злиття (рис.1).

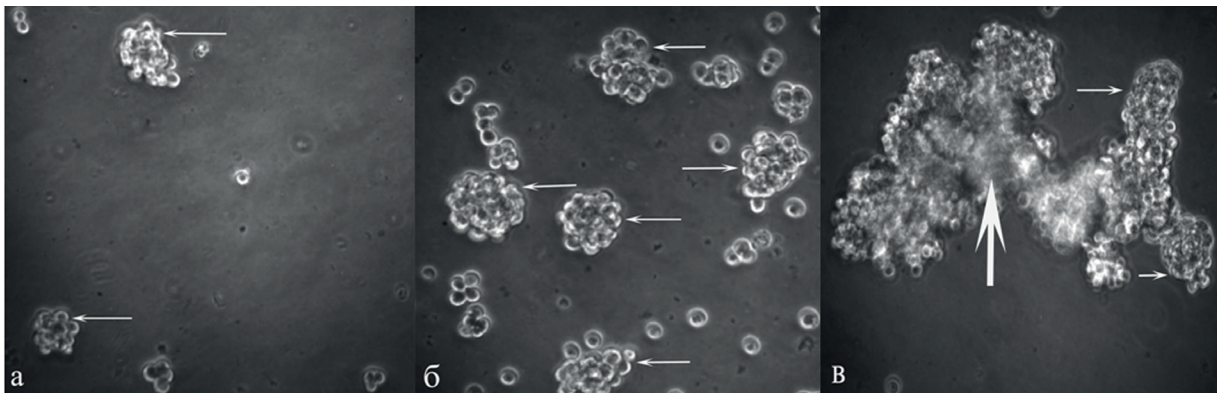


Рис. 1. Мультиклітинні сфероїди (МС) на 3-тю добу культивування при посівній концентрації фібробластів: а -  $1 \cdot 10^5$ ; б -  $2 \cdot 10^5$ ; в -  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл. Тонкими стрілками позначені МС, товстою – зона злиття МС. Фазово-контрастна мікроскопія

Після культивування фібробластів протягом 7 діб при початковій концентрації  $1 \cdot 10^5$  клітин/мл у культуральному середовищі спостерігалися переважно поодинокі МС розміром 10-20 мкм. У деяких полях зору були виявлені МС неправильної форми, діаметр яких сягав 90-100 мкм. У разі концентрації  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл поступово ущільнювалися клітинні агрегати, в результаті чого утворювалися численні МС діаметром 60-100 мкм. При збільшенні початкової концентрації до  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл виявлено злиття численних МС, діаметром понад 500 мкм (рис. 2).

Як було встановлено раніше [13, 14], структура, розмір та функціональні властивості клітин, що формують МС, залежать від їхньої життєздатності. Тому на наступному

етапі роботи досліджували цей критерій у культурі МС, отриманих з фібробластів лінії L929. У таблиці представлені результати щодо життєздатності клітин МС, оцінюваної методом забарвлення з трипановим синім, залежно від вихідної посівної концентрації. На 3-тю добу культивування не зареєстровано відмінностей цього показника між групами. Однак при посівній концентрації  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл на 7-му добу вірогідно знижувалась життєздатність до  $68,3 \pm 2,1\%$  порівняно з іншими концентраціями.

Усвідомлюючи, що метод оцінки за трипановим синім має обмеження, особливо при дезінтеграції МС трипсином, для дослідження кількості нежиттєздатних (некротичних) клітин безпосередньо у складі МС був ви-

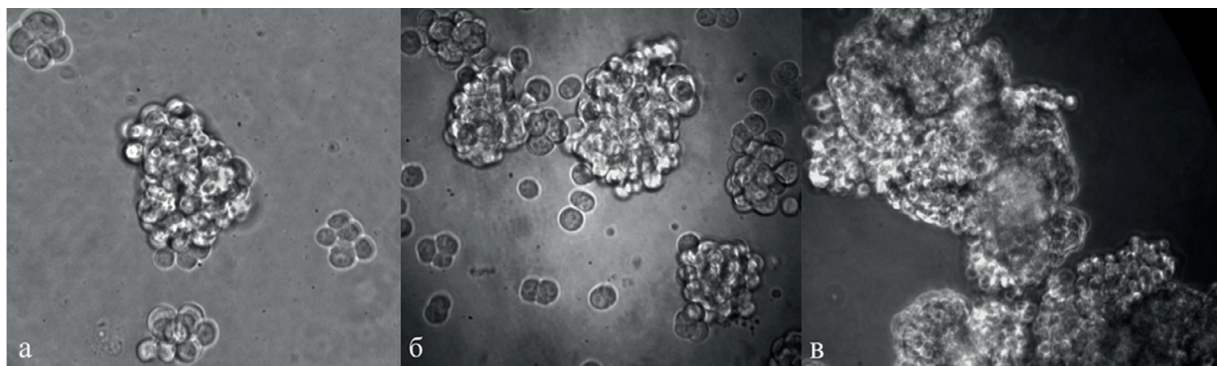


Рис. 2. Мультиклітинні сфероїди на 7-му добу культивування при посівній концентрації фібробластів: а -  $1 \cdot 10^5$ ; б -  $2 \cdot 10^5$ ; в -  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл. Фазово-контрастна мікроскопія



**Життєздатність фібробластів лінії L 929 залежно від посівної концентрації за тестом забарвлення трипановим синім на 3-тню та 7-му добу культивування**

Посівна концентрація культури	Строк експерименту, доба	
	3	7
1·10 <sup>5</sup> клітин/мл	94,3±0,9	89,5±1,2
2·10 <sup>5</sup> клітин/мл	90,6±1,6	87,6±1,1
5·10 <sup>5</sup> клітин/мл	92,9±1,2	68,3±2,1*,**

\*P<0,05 порівняно з життєздатністю фібробластів у посівній концентрації 2·10<sup>5</sup> клітин/мл;

\*\*P<0,05 порівняно з життєздатністю фібробластів у посівній концентрації 1·10<sup>5</sup> клітин/мл

користаний ДНК-барвник PI. Дослідження щодо життєздатності фібробластів за цим барвником узгоджується з результатами за трипановим синім. При всіх початкових концентраціях фібробластів на 3-тню добу культивування вірогідні відмінності показника були відсутні. На 7-му добу кількість PI-забарвлених клітин становила  $20,2 \pm 3,2$  та  $13,1 \pm 5,1\%$  при посівних концентраціях  $1 \cdot 10^5$  та  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл відповідно. Порівняно з іншими групами кількість некротичних клітин збільшилася до  $40,6 \pm 4,2\%$  ( $P < 0,05$ ) при посівній концентрації  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл.

Для оцінки морфологічних змін ядер фібробластів використовували флуоресцентний ДНК-барвник Hoechst 33342, який вільно проникає в усі клітини, незалежно від ступеня пошкодження їх мембран. Значні морфологічні зміни ядер були відзначені після культивування протягом 7 діб при вихідній концентрації клітин  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл. Зокрема ядра фібробластів у  $80,0 \pm 2,0\%$  клітин змінювали форму, однорідність забарвлення і у  $50,0 \pm 1,3\%$  спостерігалася фрагментація ядра і конденсація хроматину. При концентраціях  $1 \cdot 10^5$  і  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл культивування МС ядра фібробластів переважно у  $70,0 \pm 2,5\%$  мали округлу форму і однорідну структуру без ознак ушкодження.

Одним з показників функціональної активності і повноцінності 3D- культур є адгезивні властивості МС. Зокрема було показано, що дрібні та пухкі агрегати, утворені з нервових клітин, в процесі культивування практично не прикріплюються до поверхні [13]. У дослідженні інших авторів [14] МС,

сформовані з клітин пігментного епітелію сітківки, мали різну здатність до адгезії залежно від форми. Ми перевіряли адгезивну здатність МС, що були утворені з фібробластів лінії L929 перенесенням їх на адгезивну поверхню після 7-ї доби 3D-культивування. З'ясувалося, що не всі МС прикріплювалися до поверхні. Максимальна кількість клітин ( $85,0 \pm 2,2\%$ ), які були здатні до адгезії, спостерігалася при посівній концентрації  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл, що на  $49,6\%$  ( $P < 0,05$ ) перевищувало значення цього показника при концентрації  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл, однак вірогідно не відрізнялася від концентрації  $1 \cdot 10^5$  клітин/мл ( $72,3 \pm 2,1\%$ ). З тих МС, що прикріплювалися, мігрували клітини, які з часом створювали ділянки моношару (рис. 3).

Коефіцієнт збільшення кількості клітин є ще одним показником проліферативної

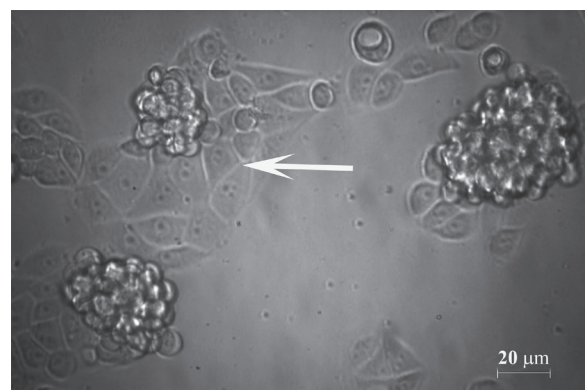


Рис.3. Мультиклітинні сфероїди, утворені при посівній концентрації фібробластів  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл, та перенесені на 7-му добу культивування в адгезивні умови. Стрілкою позначено формування моношару з клітин, які мігрують з МС. Фазово-контрастна мікроскопія

активності клітинних культур. Встановлено, що при посівній концентрації  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл коефіцієнт збільшення кількості клітин на 3-тю та 7-му добу культивування вірогідно був більшим за значення цього показника при посівних концентраціях  $1 \cdot 10^5$  та  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл (рис.4).

Концепція сфероїдоутворення вивчається ще з минулого сторіччя, накопичений великий досвід дав змогу пояснити деякі принципи та з'ясувати, що одним з домінуючих чинників цього процесу є посівна концентрація клітин [10]. Спочатку дезінтегровані у середовищі клітини наближаються одна до одної та слабо поєднуються між собою завдяки довгим ланцюгам волокон екстраклітинного матриксу. Початкова агрегація спричиняє підвищену експресію кадгерину сусідніми клітинами. Його накопичення на мембранах клітин призводить до зміцнення зв'язків та ущільнення агрегатів, які набувають правильної сферичної форми. Виходячи з цієї концепції, кількість клітин у середовищі повинна бути достатньою для

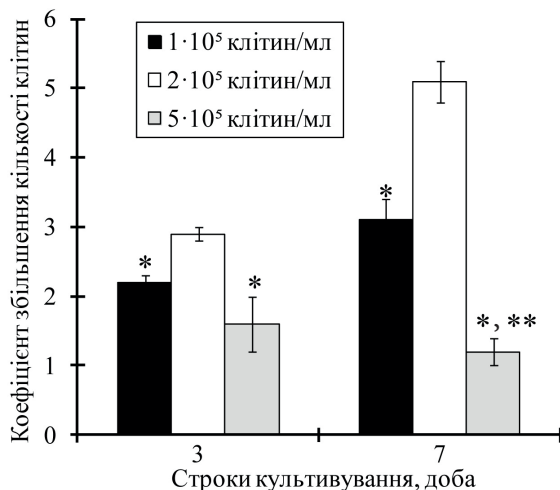


Рис. 4. Коефіцієнт збільшення кількості клітин, які були отримані з мультиклітинних сфероїдів на 3-тю та 7-му добу культивування при різних посівних концентраціях  $1 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^5$  та  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл

\* $P < 0,05$  порівняно з життєздатністю фібробластів у посівній концентрації  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл;

\*\* $P < 0,05$  порівняно з життєздатністю фібробластів у посівній концентрації  $1 \cdot 10^5$  клітин/мл

перших ключових кроків поєднання клітин. При зменшенні посівної концентрації клітинам потрібно більше часу для утворення агрегатів, при цьому вони переважно дрібні та пухкі [10, 13]. У свою чергу було продемонстровано, що підвищення посівної концентрації призводить до формування величезних за розміром клітинних агрегатів з великою кількістю некротичних клітин та зниженою здатністю до адгезії [10, 14, 15].

На фібробластах лінії L929 було підтверджено ці закономірності. Зокрема встановлено, що при посівній концентрації фібробластів  $5 \cdot 10^5$  клітин/мл порушуються процеси сфероїдоутворення, на 7-му добу культивування значно зменшується життєздатність клітин, коефіцієнт збільшення кількості клітин та здатність МС до адгезії. Суттєві морфологічні зміни клітинних ядер (фрагментація і конденсація хроматину) були також відзначені у цієї культури. Зменшення відсотка життєздатних клітин сповільнено в клітинних агрегатах з посівними концентраціями  $1 \cdot 10^5$  та  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл. Однак варто відзначити той факт, що при концентрації  $1 \cdot 10^5$  клітин/мл розміри МС значно коливалися і агрегати були переважно малоклітинними, пухкими і різної форми.

При посівній концентрації фібробластів  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл формувалися переважно округлі сфероїди, діаметр яких становив 40-60 мкм і кількість збільшувалася до 50-60 клітин, що не призводило до зниження їхньої життєздатності у складі МС. Показники функціональної активності (коефіцієнт збільшення кількості клітин та адгезивні властивості) при цій концентрації значно перевищували аналогічні показники МС, отримані при інших концентраціях. Можливо, таке явище пов'язане з тим, що на цьому терміні культивування і при такій посівній концентрації до складу МС входить оптимальна кількість клітин, яка не запобігає повноцінному забезпеченню їх поживними речовинами і є достатньою для активного синтезу міжклітинного матриксу. Це, з одного

боку, дає змогу створювати міцні міжклітинні зв'язки, а з іншого – оптимізувати обмін речовин та регуляторних факторів через щільні контакти.

Таким чином, посівна концентрація фібробластів лінії L929 суттєво впливає на їхні морфофункціональні характеристики у складі МС, причому оптимальною для цієї мети є концентрація  $2 \cdot 10^5$  клітин/мл. Для оцінки метаболічної активності фібробластів у складі МС потрібні подальші дослідження.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Г.А. Божок, А.И. Моисеев, О.Л. Горина,  
Т.П. Бондаренко**

### **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ ЛИНИИ L929 В УСЛОВИЯХ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Целью работы было изучение влияния концентрации фибробластов клеточной линии L929 на жизнеспособность и функциональную полноценность клеточек в составе мультиклеточных сфероидов (МС). Последние получали в условиях 3D-культивирования в течение 7 сут при посеве фибробластов в концентрациях  $1 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^5$  и  $5 \cdot 10^5$  клеток/мл. Доказано, что начальная концентрация фибробластов влияет на размер сформированных МС, а также на жизнеспособность, морфологические показатели, пролиферативные и адгезивные свойства клеток, находящихся в их составе. Максимально использованная концентрация отрицательно влияла на сфероидообразование, адгезию, снижала жизнеспособность клеточек на 19%, коэффициент увеличения количества клеток – в 4,25 раза, приводила к увеличению количества клеток с фрагментацией ядер и конденсацией хроматина на 20% по сравнению с посевной концентрацией  $2 \cdot 10^5$  клеток/мл. При концентрации  $1 \cdot 10^5$  клеток/мл формировались преимущественно единичные и малые (около 10-20 мкм) МС, жизнеспособность клеточек в которых составляла  $89,5 \pm 1,2\%$ . Фибробласты имели нормальные морфологические признаки, однако их пролиферативная активность значимо была меньше в сравнении с аналогичным показателем при посевной концентрации  $2 \cdot 10^5$  клеток/мл. Таким образом, концентрация  $2 \cdot 10^5$  клеток/мл является оптимальной для формирования морфологически и функционально полноценных МС при

3D-культивировании фибробластов линии L929.

Ключевые слова: фибробласты линии L929; 3D-культивирование; мультиклеточные сфероиды; жизнеспособность, пролиферативные и адгезивные свойства клеток в составе мультиклеточных сфероидов.

**G.A. Bozhok, A.I. Moisieiev, O.L. Gorina,  
T.P. Bondarenko**

### **MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF FIBROBLASTS LINE L929 IN 3D-CULTURE**

The aim of the work was to standardize the conditions for obtaining viable and functionally complete cells in the composition of multicellular spheroids (MS). The latter were obtained in the conditions of 7 days 3D cultivation with fibroblasts seeding at concentrations of  $1 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^5$  and  $5 \cdot 10^5$  cells/ml. It has been proved that the sowing concentration of fibroblasts affects the size of the formed MS as well as the viability, morphological parameters, proliferative and adhesive properties of cells they are composed of. The maximal concentration that have been used had a negative impact on spheroid formation, on the ability of cells to adhesion. This concentration reduced cell viability by 19%, coefficient of increasing the number of cells 4,25-fold and increased the number of cells with nuclear fragmentation and chromatin condensation by 20% in comparison with the sowing concentration of  $2 \cdot 10^5$  cells/ml. At a concentration of  $1 \cdot 10^5$  cells/ml, predominantly single and small (about 10-20 mkm) MS with a cell viability of about  $89,5 \pm 1,2\%$  were formed. The fibroblasts had normal morphological characteristics, but the coefficient of increasing the number of cells was significantly lower than the similar indicator at the sowing concentration of  $2 \cdot 10^5$  cells/ml. Thus, it has been established that the concentration of  $2 \cdot 10^5$  cells/ml is optimal for the formation of MS with morphologically and functionally complete fibroblasts.

Keywords: fibroblasts of L929 cell line; 3D-cultivation; multicellular spheroids; viability, proliferative and adhesive properties of cells in the composition of multicellular spheroids.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv;  
e-mail: ukrainanataliy@gmail.com*

### **REFERENCES**

1. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as a building blocks. *Biomaterials*. 2009;30(12):2164-74.
2. Gong X, Lin C, Cheng J, Su J, Zhao H, Liu T, Wen X, Zhao P. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130348.
3. Saburina IN, Repin VS. 3D culturing: from individual cells to blastemic tissue (Revisited the phenomenon of epithelial - mesenchymal plasticity). *Cellular Transplantation and*

- Tissue Engineering. 2010;5(2):75-86. [Russian].
4. Li CL, Tian T, Nan KJ, Zhao N, Guo YH, Cui J, Wang J, Zhang WG. Survival advantages of multicellular spheroids vs. monolayers of HepG2 cells in vitro. *Oncol Rep.* 2008;20(6):1465-71.
5. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* 2009;4(3):309-24.
6. Byun YS, Tibrewal S, Kim E, Yeo L, Sarkar J, Ivanir Y, Liu CY, Sano CM, Jain S. Keratocytes derived from spheroid culture of corneal stromal cells resemble tissue resident keratocytes. *PLoS One.* 2014;9(11):e112781.
7. Ramgolam K, Lauriol J, Lalou C, Lauden L, Michel L, de la Grange P, Khatib AM, Aoudjit F, Charron D, Alcaide-Loridan C, Al-Daccak R. Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function. *PLoS One.* 2011;6(4):e18784.
8. Li H, Dai Y, Shu J, Yu R, Guo Y, Chen J. Spheroid cultures promote the stemness of corneal stromal cells. *Tissue Cell.* 2015;47(1):39-48.
9. Repin VS, Saburina IN, Kosheleva NV, Gorkun AA, Zurina IM, Kubatiev AA. 3d-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro. *Bull Exp Biol Med.* 2014;158(1):137-44.
10. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface.* 2017;14(127):20160877.
11. Lai JY, Tu IH. Adhesion, phenotypic expression, and biosynthetic capacity of corneal keratocytes on surfaces coated with hyaluronic acid of different molecular weights. *Acta Biomater.* 2012;8(3):P.1068-79.
12. Armitage WJ, Mazur P. Osmotic tolerance of human granulocytes. *Am. J. Physiol.* 1984; 247(5):373-81.
13. Sukach AN, Liashenko TD, Shevchenko MV. Properties of isolated neural cells from newborn rat in tissue in vitro. *Biotechnologia acta.* 2013;6(3):63-8. [Russian].
14. Borzenok SA, Popov IA, Saburina IN, Arbukhanova PM. In vitro investigation of the transplantation prospects of multicellular spheroid microaggregates of donor retinal pigment epithelium. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2015;17(3):58-64. [Russian].
15. Sato R, Yasukawa T, Kacza J, Eichler W, Nishiwaki A, Iandiev I, Ohbayashi M, Kato A, Yafai Y, Bringmann A, Takase A, Ogura Y, Seeger J, Wiedemann P Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch's membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(3):1740-9.

*Матеріал надійшов  
до редакції 04.06.2018*