

---

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.08.093>

УДК 611.013.395.085.23

**А.І. Моїсєєв, Г.А. Божок, О.Л. Горіна**

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: bozhokgaru@gmail.com

## **Порівняльна характеристика тривимірного та моношарового культивування перещеплюваної лінії фібробластів L 929**

*Представлено академіком НАН України А.М. Гольцевим*

*Виконано порівняльне дослідження функціонального і метаболічного потенціалу фібробластів клітинної лінії L 929 за умов моношарового (2D) і об'ємного (3D) культивування. З'ясовано, що спосіб культивування фібробластів впливає на їхню життєздатність і проліферативний потенціал. Зокрема, після об'ємного культивування фібробластів протягом 7 діб виявлено, що кількість життєздатних клітин та їхній проліферативний потенціал вірогідно ( $p < 0,05$ ) перевищували аналогічні показники після моношарового культивування.*

*За даними гель-проникної хроматографії встановлені достовірні відмінності за кількісним та якісним складом речовин білково-пептидної природи в середовищах культивування клітин у 2D і 3D форматах. Особливу увагу привертають результати щодо розбіжності за кількістю пептидів у діапазоні молекулярних мас 705–1607 Да у середовищі об'ємного культивування, що може бути наслідком активного синтезу ростових факторів. Отримані результати свідчать про істотний вплив об'ємного (3D) культивування на синтетичні і морфофункціональні показники фібробластів клітинної лінії L 929 порівняно з 2D форматом.*

**Ключові слова:** моношарове і об'ємне культивування, фібробласти, речовини білково-пептидної природи, проліферативний потенціал.

На сьогодні відомо, що трансплантація фібробластів є одним із перспективних методів в області регенеративної медицини. Доведено, що моношарова культура фібробластів, яка широко використовується в доклінічних випробуваннях, за багатьма параметрами не відображає справжньої картини зростання і диференціювання клітин на рівні організму, де велике значення мають міжклітинні взаємодії [1]. Тому альтернативою моношаровій культурі як інформативні модельні системи можуть використовуватися мультиклітинні сфероїди (МС), в яких умови функціонування фібробластів максимально наближені до умов *in vivo*. Застосування сфероїдів як модельних систем може надати нові можливості в області регенеративної медицини.

Відомо, що одним із способів отримання багатоклітинних сфероїдів є культивування в неадгезивних умовах (Carlsson, Yuhas, 1984; Ivascu, Kubbies, 2006; Friedrich et al., 2009).

© А.І. Моїсєєв, Г.А. Божок, О.Л. Горіна, 2019

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2019. № 8: 93–101

93

Оскільки в таких умовах клітини не здатні прикріплюватися до поверхні культивування, вони самоорганізуються в агрегати, що містять від одного до декількох типів клітин. Встановлено, що клітини, культивовані у складі багатоклітинних утворень, відрізняються від клітин моношарових культур за деякими структурно-функціональними ознаками [2, 3].

Однак отримання життєздатних клітин у складі МС в неадгезивних умовах є непростим завданням. Зокрема, в роботі [4], було встановлено, що на життєздатність і на повноцінну дифузію поживних речовин сформованих клітинних конгломератів впливають їхні розміри, які залежать від посівної концентрації клітин. Тому дослідження безпосередньо впливу об'ємного культивування клітин на їхні функціональні та метаболічні показники в порівнянні з моношаровою культурою є актуальним завданням.

З огляду на вищесказане за мету дослідження ставилося вивчення в порівняльному аспекті функціонального і метаболічного потенціалу фібробластів клітинної лінії L 929 за умов моношарового (2D) і об'ємного (3D) культивування.

**Матеріали та методи.** Дослідження виконані на перещеплюваній лінії клітин L929, отриманій після чотирьох пасажів з криоконсервованої культури, що зберігалася при  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Клітини культивували в живильному середовищі DMEM/F12 ("Biowest", Франція) з додаванням антибіотиків (200 Од/мл бензилпеніциліну ("Arterium", Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину ("Arterium", Україна)) та 10 % фетальної телячої сироватки при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в атмосфері з 5 %  $\text{CO}_2$ . Для культивування моношарової культури використовували пластикові флакони ("SPL Life Sciences", Корея). МС отримували на чашках Петрі з площею поверхні росту  $22,1\text{ cm}^2$  ("TPP", Швейцарія), які попередньо обробляли 2 % розчином агару ("Ferak", Німеччина) для утворення низькоадгезивної поверхні. Посівна концентрація фібробластів для моношарової культури та культури МС становила  $2 \cdot 10^5$  кл/мл. Культивування проводили протягом 7 діб, на 3-тю добу здійснювали заміну середовища.

На 3-тю та 7-му добу збирали МС і моношарову культуру шляхом обробки 1 : 1 сумішшю 0,5 % трипсину ("Sigma", США) та розчину Версену ("PAA", США) у співвідношенні 1 : 1, витримували 5 хв і відмивали від ферментного розчину середовищем DMEM/F12. У випадку МС розчин трипсину—Версену використовували для дезінтеграції на поодинокі клітини. Досліджували загальну кількість та збереженість фібробластів за стандартною методикою за допомогою забарвлення 0,4 %-м розчином трипанового синього. Аналіз отриманих результатів проводили за формулою  $\text{Життєздатність} = a/c \cdot 100\%$ , де  $a$  — кількість клітин, які не забарвлювалися;  $c$  — загальна кількість клітин [5].

Для оцінки регенераційного потенціалу моношарової культури відтворювали модель ушкодження моношару "ранової поверхні" у вигляді подряпини [6]. Такий метод характеризує міграцію і ступінь проліферації фібробластів. Ушкодження наносили на клітинну культуру зі 100 % конфлюентністю моношару, який пошкоджували за допомогою пластикового наконечника (для піпет-дозатора об'ємом 200 мкл) діаметром 0,8 мм. Після відтворення подряпини поверхні оцінювали площу "загоєння" через 24 і 48 год за допомогою програми Zeiss LSM Image Examiner.

Спектр низькомолекулярних речовин білково-пептидної природи, що містяться в зразках середовищ після 7 діб культивування, оцінювали за допомогою рідинної гель-хроматографії [7] на пластиковій колонці ( $1,6 \times 40$  см), заповненій полівініловим гелем TSKGel Toyopearl 1HW-40 Fine ("Toyo Soda", Японія). Об'єм проби становив 0,2 мл. Як елюент ви-

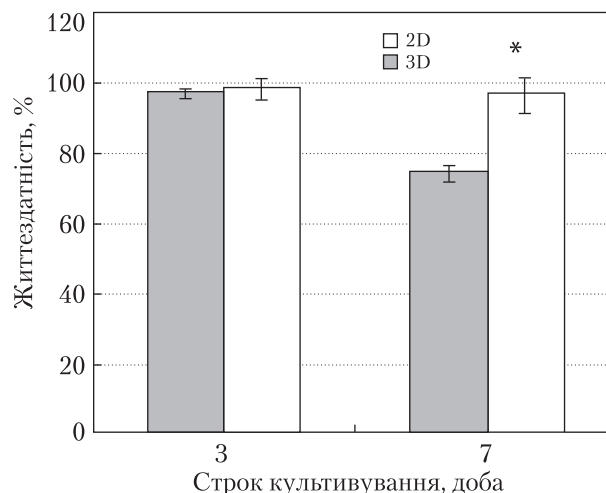
користували фосфатно-сольовий буфер ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  30 мМ,  $\text{NaCl}$  100 мМ; рН 7,4). Колонку калібрували стандартними маркерними білками — БСА (67 кДа), овальбумін (45 кДа) та декстран блакитний (2000 кДа).

Статистичний аналіз експериментальних даних здійснювали за допомогою комп'ютерної обробки з використанням програмного пакета "STATGRAPHIC plus for Windows" версії 2.1 за непараметричним критерієм Манна—Уїтні. Експериментальні дані наведені як середнє арифметичне  $\pm$  середнє квадратичне відхилення. Ступінь вірогідності становив 0,05.

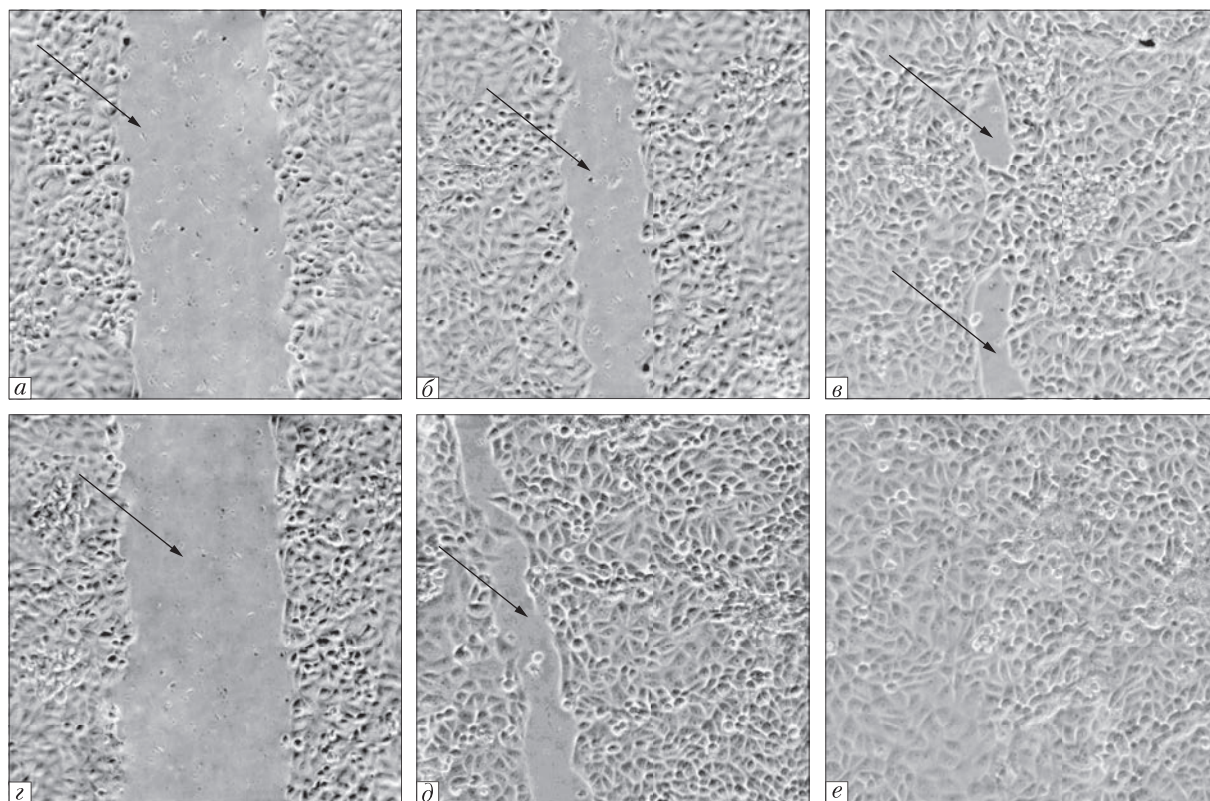
**Результати та їх обговорення.** На першому етапі експерименту отримували культуру клітинної лінії фібробластів при посівній концентрації  $2 \cdot 10^5$  кл/мл і двох варіантах культивування — за стандартних умов на адгезивній (моношарова культура, 2D) та неадгезивній (культура 3D) поверхні протягом 7 діб. У першу чергу після моношарового і об'ємного культивування фібробластів у неадгезивних умовах протягом 7 діб оцінювали життєздатність клітин за трипановим синім (рис. 1). З рис. 1 видно, що життєздатність фібробластів після моношарового і об'ємного культивування не відрізнялася на 3-тю добу, але після культивування фібробластів у форматі 2D протягом 7 діб кількість життєздатних клітин становила  $68 \pm 2,3$  %, що було значуще ( $p < 0,05$ ) менше значень даного показника після 3D культивування ( $88 \pm 3,0$  %). Результати нашого дослідження узгоджуються з літературними даними щодо життєздатності клітин після культивування в 2D і 3D форматі [8–11].

Для вивчення функціонального (проліферативного) потенціалу клітин після культивування в 2D і 3D форматі відтворювали модель пошкодження моношару у вигляді подряпини. Відомо, що моделювання рани *in vitro* на моношарових культурах дає можливість вивчати такі параметри поведінки клітин, як швидкість міграції і проліферації. Беручи до уваги особливості міжклітинних взаємодій у 3D форматі, ми зосередились на питанні впливу об'ємного культивування на проліферативний потенціал фібробластів після міграції з МС і формування моношару. Для цього сфероїди після культивування протягом 7 діб переміщували на адгезивну поверхню. Початок прикріплення сфероїдів (80 % МС) до адгезивної поверхні було зареєстровано вже через годину культивування, при цьому 100 % прикріплення МС до культуральної поверхні було визначено через 5 год. Міграцію клітин з МС і формування моношару виявлено через 24 год після перенесення сфероїдів в адгезивні умови.

Після 100 % конфлюентності клітин двох форматів (2D і 3D) на наступному етапі роботи відтворювали експериментальну "подряпину" і оцінювали проліферативний потенціал клітин за площею ушкодження через 24 і 48 год культивування. З рис. 2, а, б видно, що через



**Рис. 1.** Життєздатність фібробластів лінії L 929 за умов моношарового та об'ємного культивування; \* — відмінності вірогідні порівняно з моношаровою культурою фібробластів відповідної доби культивування ( $p < 0,05$ )

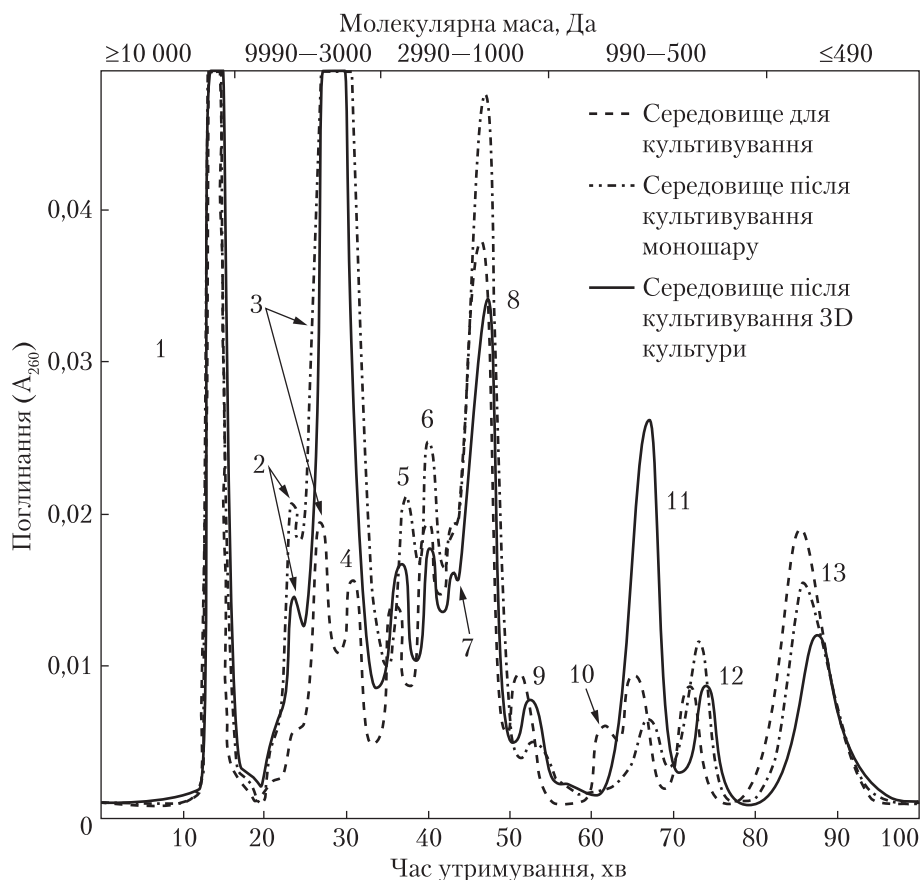


**Рис. 2.** Моношар фібробластів після відтворення “подряпини” і через 24 і 48 год культивування: *a* – початкова площа uszkodження моношару фібробластів, отриманих за стандартних умов культивування; *б* – площа uszkodження моношару фібробластів, отриманих за стандартних умов культивування через 24 год після “подряпини”; *в* – площа uszkodження моношару фібробластів, отриманих за стандартних умов культивування через 48 год після “подряпини”; *г* – початкова площа uszkodження моношару фібробластів, отриманих за умов 3D культивування; *д* – площа uszkodження моношару фібробластів, отриманих за умов 3D культивування через 24 год після “подряпини”; *е* – моношар фібробластів, отриманих за умов 3D культивування, через 48 год після відтворення “подряпини”. Збільшення: об.  $\times 20$ , ок.  $\times 10$

24 год площа uszkodження моношару в культурі, отриманій в умовах 2D і 3D, зменшувалася на 33 і 72 % відповідно порівняно з початковою площею uszkodження (див. рис. 2, *в*, *г*).

Після 48-годинного культивування повноцінне загоєння uszkodженого моношару спостерігалось тільки у випадку фібробластів, які отримували після 3D культивування (рис. 3, *б*). При цьому площа uszkodження моношару фібробластів, отриманих в умовах 2D культивування, становила 20 % порівняно з початковою площею uszkodження. Таким чином, проліферативний потенціал клітин після розпластування сфероїдів вірогідно ( $p < 0,05$ ) збільшувався порівняно з аналогічним показником після моношарового культивування, що свідчить про істотний вплив об’ємного культивування на функціональні показники клітин.

Для оцінки метаболічної активності фібробластів залежно від умов отримання клітин на наступному етапі роботи методом гель-проникної хроматографії було досліджено спектр речовин білково-пептидної природи в середовищах культивування через 7 діб. Результати досліджень наведені в таблиці і на рис. 3.



**Рис. 3.** Типові хроматограми середовищ після 7-добового культивування фібробластів лінії L 929 у 2D та 3D форматі. Як контроль використовували живильне середовище на основі DMEM/F12 та 10 % фетальної телячої сироватки (пластикові колонки 1,6 × 40 см, гель TSK Toyopearas 1HW-40 Fine). 1–13 – виявлені піки

З рис. 3 і таблиці видно, що хроматографічні профілі усіх досліджених середовищ мали по 10–11 основних піків та різнилися за загальною площею під піками. Так, у середовищі після культивування клітин у 3D форматі загальна площа під піками, що прямо пропорційна загальній кількості речовин у середовищі, істотно не відрізнялася від контролю (середовище до культивування), але цей показник був нижче порівняно з моношаровою культурою в 1,3 раза ( $2304,70 \pm 4,06$  та  $3043,06 \pm 2,92$  мм<sup>2</sup> відповідно). При цьому кількісний і якісний склад пептидів у середовищах після моношарового і об'ємного культивування мали значні відмінності.

Серед основних піків у середовищах до та після культивування культур домінували піки 1 (середня молекулярна маса  $\geq 12000$  Да), 3 (середня молекулярна маса близько 3791–4345 Да), 8 (середня молекулярна маса близько 1302–1328 Да) та 13 (середня молекулярна маса близько 490–498 Да). Основним за площею для всіх варіантів виявився пік 1:  $54,14 \pm 8,45$  % загальної площі під піками у контролі,  $41,37 \pm 2,92$  % у середовищі після культивування моношару та  $43,16 \pm 0,40$  % у середовищі після 3D-культури. Також істотним за кількістю речовин пептидно-білкової природи був пік 3, який містив пептиди в діапазоні молекуляр-

них мас 4345–3791 Да. При цьому в контролі пік 3 мав найменше значення –  $4,75 \pm 0,18$  %, що у 7,4 та 6 разів нижче, ніж у середовищах після культивування моношару та 3D-культури. Інша картина спостерігалася для піків 5, 9 та 13. Зокрема, пік 5 (2301–2205 Да) складав в контролі  $2,81 \pm 0,09$  %, що в 1,9 раза було більше даного показника порівняно з 2D і 3D форматом культивування. Кількість пептидів у діапазоні молекулярних мас 1067–1045 Да і 498–490 у контрольному середовищі також достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищувала відповідні показники після 2D та 3D форматів. Інша картина спостерігалася при аналізі піка 11 (молекулярна маса 705–718 Да), який зареєстровано в усіх трьох варіантах середовищ, але в контролі кількість пептидів даного піка перевищувала показники моношарового культивування в 2,53 раза, при цьому була вірогідно меншою в 7,2 раза відносно 3D культивування. Піки 2 (5657–5691 Да) і 7 (1600 Да) взагалі не виявлені в контрольному середовищі, у свою чергу, пептиди з молекулярними масами 3184 і 781 Да не зареєстровані в середовищах після моношарового та об'ємного культивування.

Необхідно відзначити той факт, що в результаті порівняння спектра і кількості пептидів у середовищах безпосередньо після 2D та 3D культивування протягом 7 діб виявлені вірогідні відмінності (див. таблицю). Особливу увагу привертають піки 7 (1600 Да), 9 (1067–1045 Да) та 11 (705–718 Да). Зокрема, після культивування клітин в умовах 3D встановлена поява піка 7 з відсотковим вмістом від загальної площі  $1,41 \pm 0,09$  %. У результаті аналізу піка 9 (1067–1045 Да) встановлено збільшення пептидів у даному молекулярному діапазоні в 4 рази саме після об'ємного культивування. Також значні відмінності залежно від умов

**Аналіз пептидного складу (%) середовищ після 7-добового культивування фібробластів лінії L 929, вирощених у моношарі та 3D-культури**

Пік	Молекулярна маса, Да	Живильне середовище на основі DMEM/F12 та 10 % фетальної телячої сироватки	Середовище після культивування моношару	Середовище після культивування 3D-культури
1	$\geq 12\ 000$	$54,14 \pm 0,38$	$41,37 \pm 0,80$	$43,16 \pm 0,40$
2	5691–5657	–	$2,70 \pm 0,11$	$2,23 \pm 0,24$
3	4345–3791	$4,75 \pm 0,18$	$35,20 \pm 0,26^{\#}$	$28,37 \pm 0,16^{\#}$
4	3184	$3,47 \pm 0,10$	–	–
5	2301–2205	$2,81 \pm 0,09$	$1,45 \pm 0,18^{\#}$	$1,48 \pm 0,21^{\#}$
6	1867–1821	$3,55 \pm 0,07$	$2,24 \pm 0,12^{\#}$	$1,75 \pm 0,30^{\#}$
7	1600	–	–	$1,41 \pm 0,09$
8	1328–1302	$13,13 \pm 0,34$	$9,24 \pm 0,19^{\#}$	$7,25 \pm 0,27^{\#}$
9	1067–1045	$2,01 \pm 0,09$	$0,21 \pm 0,08^{\#}$	$0,84 \pm 0,10^{*\#}$
10	781	$1,04 \pm 0,11$	–	–
11	718–705	$2,63 \pm 0,41$	$0,92 \pm 0,11^{\#}$	$6,66 \pm 0,39^{*\#}$
12	621–616	$2,41 \pm 0,12$	$1,90 \pm 0,09^{\#}$	$1,98 \pm 0,11^{\#}$
13	498–490	$10,07 \pm 0,23$	$4,78 \pm 0,18^{\#}$	$4,88 \pm 0,15^{\#}$
Загальна площа піків, мм <sup>2</sup>		$2125,99 \pm 8,45$	$3043,06 \pm 2,92^{\#}$	$2304,70 \pm 4,06^*$

\* Відмінності вірогідні порівняно з культурою після 2D культивування ( $p < 0,05$ ).

<sup>#</sup> Відмінності вірогідні порівняно з середовищем культивування DMEM/F12 та 10 % фетальної телячої сироватки,  $p < 0,05$

культивування за кількістю речовин пептидно-білкової природи зареєстровані в молекулярному діапазоні 705–718 Да. Зокрема, пік 11 складав у середовищі після культивування моношару  $0,92 \pm 0,11$  % загальної площі під піками, а після об'ємного культивування —  $6,66 \pm 0,39$  %.

Для решти піків після порівняльного аналізу встановлено характерне зменшення вмісту речовин після 7-добового культивування фібробластів як у 2D, так і в 3D форматі відносно показників контрольного середовища (див. таблицю).

Встановлені в наших дослідженнях розбіжності щодо складу середовищ МС порівняно з моношаровою культурою узгоджуються з результатами досліджень [1, 12, 13]. Зокрема, у роботах [1, 12] показано, що після дво- та тривимірного культивування синтез фібробластами білків позаклітинного матриксу значно відрізняється.

Таким чином, аналіз спектра речовин за молекулярною масою може частково пояснити істотні відмінності функціонального потенціалу клітин після об'ємного і моношарового культивування. Особливу увагу привертають результати щодо розбіжності за кількістю сполук у діапазоні низькомолекулярних мас (705–1607 Да) залежно від умов культивування, що може бути наслідком активного синтезу ростових факторів, молекул міжклітинного матриксу та інших біологічних речовин, а також пояснити переваги функціональної активності МС порівняно з моношаровою культурою. Підтвердженням цього факту є результати досліджень щодо прискорення відновлення ушкодженого після “подряпини” моношару в умовах 3D культивування порівняно з 2D.

Отже, на підставі результатів досліджень доходимо висновку, що культивування в 3D умовах сприяє підвищенню функціональних показників фібробластів клітинної лінії L 929. Однак для поглиблення розуміння метаболічних особливостей фібробластів після об'ємного культивування необхідні подальші дослідження цього питання, зокрема з'ясування складу речовин у молекулярному діапазоні мас 705–1607 Да.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Кожина К.В., Сабуріна І.Н., Горкун А.А., Зурина І.М., Кошелева Н.В., Волкова Е.Н., Морозов С.Г. Сравнительный анализ воздействия р199 на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека. *Патогенез*. 2015. № 4. С. 34–40.
2. Кошелева Н.В., Ильина И.В., Кожина К.В., Зурина И.М., Роскова А.Е., Горкун А.А., Овчинников А.В., Агранат М.Б., Морозов С.Г., Сабуріна І.Н. Разработка клеточной модели на основе лазерной микрохирургии сфероидов для изучения процессов репарации. *Онтогенез*. 2017. 48, № 1. С. 63–72. <https://doi.org/10.7868/S0475145017010074>
3. Плаксина Е.М., Сидоренко О.С., Легач Е.И., Коваленко І.Ф., Божок Г.А. Экспрессия  $\beta$ -III-тубулина в культуре клеток неонатальных надпочечников: сравнение монослойного и 3D-культивирования. *Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Сер. Біологія*. 2017. Вип. 28. С. 76–86. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2017-28-9>
4. Божок Г.А., Моїсєєв А.І., Горіна О.Л., Моїсєєва Н.М. Вплив посівної концентрації фібробластів L929 на морфофункціональні властивості 3D культури. *The development of medical sciences: problems and solutions: Proceedings of the International research and practical conference (Brno, 27–28 april, 2018)*. Brno, 2018. P. 135–138.
5. Armitage W.J., Mazur P. Osmotic tolerance of human granulocytes. *Am. J. Physiol.* 1984. 247, № 5. P. 373–381. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.5.C373>
6. Denker S.P., Barber D.L. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J. Cell Biol.* 2002. 159, № 6. P. 1087–1096. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208050>

7. Белоус А.М., Мохамед А.Н., Семенченко А.Ю., Яворская В.А. Исследование уровня пептидов “средних молекул” в плазме крови больных с различными формами острых нарушений мозгового кровообращения. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 1997. № 8. С. 177–181.
8. Cheng N.C., Wang N.C., Cheng S., Young T.H. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*. 2012. **33**, Iss. 6. P. 1748–1758. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.049>
9. 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. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. **54**, № 3. P. 1740–1749. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10068>
10. Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N., Repin V.S. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows. *J. Cytol. Histol.* 2015. **6**, № 6. <https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000378>
11. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. **16**, № 3. P. 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
12. Sangmyung R. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp. Mol. Med.* 2009. **41**, № 12. P. 858–865. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.12.096>
13. Eleanor K., Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J. Anat.* 2015. **227**, № 6. P. 746–756. <https://doi.org/10.1111/joa.12257>

Надійшло до редакції 10.04.2019

## REFERENCES

1. Kozina, K. V., Saburina, I. N., Gorkun, A. A., Zurina, I. N., Kosheleva, N. V., Volkova, E. N. & Morozov, S. G. (2015). Comparative study of p199 effect on 2D and 3D cultures of human dermal fibroblasts. *Pathogenesis*, No. 4, pp. 34-40 (in Russian).
2. Kosheleva, N. V., Il’ina, I. V., Kozhina, K. V., Zurina, I. V., Roskova, A. E., Gorkun, A. A., Ovchinnikov, A. V., Agranat, M. B., Morozov, S. G. & Saburina, I. N. (2017). Cellular model based on laser microsurgery of cells spheroids to study the repair process. *Ontogenez*, 48, No. 1, pp. 63-72 (in Russian). <https://doi.org/10.7868/S0475145017010074>
3. Plaksina, K. M., Sidorenko, O. S., Legach, Y. I., Kovalenko, I. F. & Bozhok, G. A. (2017). Expression of  $\beta$ -III-tubulin in the neonatal adrenal cell culture: comparison of monolayer and 3D-culture. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University, Ser. Biology*, Iss. 28, pp. 76-86 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2017-28-9>
4. Bozhok, G. A., Moisieiev, A. I., Gorina, O. L. & Moisieieva, N. N. (2018, April). The effect of sowing concentration of fibroblasts on the morphofunctional properties of 3D culture. *Proceedings of the International Research and Practical Conference The development of medical sciences: problems and solutions.* (pp. 135-138), Brno.
5. Armitage, W. J. & Mazur, P. (1984). Osmotic tolerance of human granulocytes. *Am. J. Physiol.*, 247, No. 5, pp. 373-381. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.5.C373>
6. Denker, S. P. & Barber, D. L. (2002). Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J. Cell Biol.*, 159, No. 6, pp. 1087-1096. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208050>
7. Belous, A. M., Mokhamed, A. N., Semenchenko, A. Yu. & Yavorskaya, V. A. (1997). Research of level of peptides of “middle molecules” in plasma of blood of patients with the different forms of violations of cerebral circulation of blood. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 8, pp. 177-181 (in Russian).
8. Cheng, N. C., Wang, N. C., Cheng, S. & Young, T. H. (2012). The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials*, 33, Iss. 6, pp. 1748-1758. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.049>
9. 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. (2013). Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch’s membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 54, No. 3, pp. 1740-1749. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10068>



10. Kubatiev, A. A., Zurina, I. M., Kosheleva, N. V., Gorkun, A. A., Saburina, I. N. & Repin, V. S. (2015). From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows. *J. Cytol. Histol.*, 6, No. 6. <https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000378>
11. Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, No. 3, pp. 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
12. Sangmyung, R. (2009). Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp. Mol., Med*, 41, No. 12, pp. 858-865. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.12.096>
13. Eleanor, K. & Przyborski, S. (2015). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J. Anat.*, 227, No. 6, pp. 746-756. <https://doi.org/10.1111/joa.12257>

Received 10.04.2019

*А.И. Моисеев, Г.А. Божок, О.Л. Горина*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: bozhokgaru@gmail.com

#### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЁХМЕРНОГО И МОНОСЛОЙНОГО КУЛЬГИВИРОВАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ ФИБРОБЛАСТОВ L 929

Выполнено сравнительное исследование функционального и метаболического потенциала фибробластов клеточной линии L 929 в условиях монослойного (2D) и объемного (3D) культивирования. Показано, что способ культивирования фибробластов влияет на их жизнеспособность и пролиферативный потенциал. В частности, после объемного культивирования фибробластов в течение 7 сут установлено, что количество жизнеспособных клеток и их пролиферативный потенциал достоверно ( $p < 0,05$ ) превышали аналогичные показатели после монослойного культивирования.

По данным гель-проникающей хроматографии установлены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) по количественному и качественному составу веществ белково-пептидной природы в средах культивирования клеток в 2D и 3D форматах. Особое внимание привлекают результаты по отличию количества пептидов в диапазоне молекулярных масс 705–1607 Да в среде объемного культивирования, что может быть следствием активного синтеза ростовых факторов. Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии объемного (3D) культивирования на синтетические и морфофункциональные показатели фибробластов клеточной линии L 929 по сравнению с 2D форматом.

**Ключевые слова:** монослойное и объёмное культивирование, фибробласты, соединения белково-пептидной природы, пролиферативный потенциал.

*A.I. Moisieiev, G.A. Bozhok, O.L. Gorina*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: bozhokgaru@gmail.com

#### THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF MONOLAYER AND THREE-DIMENSIONAL CULTIVATIONS OF THE CONTINUOUS CELL LINE OF FIBROBLASTS L 929

The comparative study of the functional and metabolic potentials of fibroblasts of cell line L 929 under conditions of the monolayer (2D) and three-dimensional cultivations is performed. It is found that the method of cultivation of fibroblasts affects their viability and proliferative potential. In particular, it is shown that, after the volumetric cultivation of fibroblasts during 7 days, the number of viable cells and their proliferative potential significantly ( $p < 0.05$ ) exceed similar indicators after the monolayer cultivation.

According to data of the gel permeation chromatography, we established significant differences ( $p < 0.05$ ) in the quantitative and qualitative compositions of protein-peptide substances in cell culture media in 2D and 3D formats. Special attention is attracted by the results on the difference in the amounts of peptides in the range of molecular masses (705–1607 Da) in the medium of volumetric cultivation, which may be due to the active synthesis of growth factors. The results obtained indicate that the volumetric cultivation has a significant impact on the synthetic and morphofunctional indicators of fibroblasts of the cell line L 929 in comparison with the 2D format.

**Keywords:** monolayer and volumetric cultivations, fibroblasts, protein-peptide substances, proliferative potential.