

УДК 576.343.:577.121.:615.015.11.:615.076

ПРОЛІФЕРАТИВНИЙ РІСТ ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ КОНДИЦІЙНОГО СЕРЕДОВИЩА ЯК ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОСТІ ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВІДІВ КРОЛІВ НА МОДИФІКОВАНИХ ПОКРИТТЯХ

С. В. Федорова¹, О. В. Штапенко¹, І. І. Гевкан¹, І. О. Матюха¹, М. О. Жолобко², О. М. Огар²,
Ю. Б. Стецишин², Ю. І. Сливчук¹
shtapenko@ukr.net

¹Інститут біології тварин НААН, Україна, м. Львів, 79034, вул. В. Стуса, 38,
inenbiol@mail.lviv.ua

²Національний університет «Львівська Політехніка», 8 корпус, к. 204, пл. Святого
Георгія, 2, 79013, Львів, Україна

У статті описано використання модифікованих поверхонь культурального посуду як альтернативу звичайному пластику при інтенсифікації проліферативного росту та функціональної активності культури клітин яйцепровідів кролів. Для досягнення поставлених завдань досліджень було відтворено умови функціональності клітин цієї тканини *in vitro*. Було відтворено таку її модель, де зберігались не тільки самі клітини, а і вся сигнальна система, яка регулює поділ, диференціацію та функціонування клітин у тканині *in vivo*. Культуру клітин отримували звичайним методом холодної трипсинізації, який опрацьований у лабораторії репродуктивної біотехнології та розведення тварин. Клітини культивували в інкубаторі при температурі 37 °С, 5 % CO₂ за максимальної вологості повітря. Модифікацію поверхні скла здійснювали шляхом обробки скляних пластин 3-амінопропіл(триетокси)силаном (АПТЕСом), за рахунок чого на них іммобілізувались первинні аміногрупи. на поверхні «чистого скла» адсорбували наношар бичачого сироваткового

альбуміну (БСА) для створення біосумісних і біосенсорних поверхонь.

Порівняно вплив двох видів таких поверхонь — біогелю на основі білка і альбуміну, нанесеного методом органічного синтезу. Шляхом обрахунку індексу проліферації, проведення МТТ-тесту та біохімічних досліджень кондиційного середовища культури клітин протягом 72 годин культивування доведено, що культивування на біогелі природного походження сприяє вищій життєздатності та метаболічній активності культури за показниками активності лактатдегідрогенази та рівня глюкози у порівнянні з використанням нанопокриття з альбуміном. Отримані результати вказують на підвищення життєздатності та інтенсивності біосинтетичних процесів у культурі клітин.

Ключові слова: КУЛЬТУРА
КЛІТИН, ЯЙЦЕПРОВІДИ КРОЛІВ,
МОДИФІКОВАНИ ПОВЕРХНІ, ОБ'ЄМНА
КУЛЬТУРА, ГЛЮКОЗА,
ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗА

PROLIFERATIVE GROWTH AND BIOCHEMICAL CHANGES CONDITIONED MEDIUM AS AN INDICATOR OF FUNCTIONALLY MODIFIED COATINGS OF RABBITS OVIDUCTS CELL CULTURE

S. Fedorova¹, O. Shtapenko¹, I. Gevkan¹, I. Matiukha¹, M. Zolobko²,
O. Ogar², Y. Stetsyshyn², Yu. Slyvchuk¹
shtapenko@ukr.net

¹Institute of animal biology NAAS, V. Stus st., 38, Lviv, 79034, inenbiol@mail.lviv.ua

²National University «Lvivska Politechnika», VIII teach. building, room. 204, pl. St. George,
2, Lviv, 79013

The article describes the use of modified surfaces culture dish as an alternative to conventional plastics with the intensification of proliferative growth and functional activity of the rabbits oviduct cell culture. Accordingly to the tasks of research conditions were reproduced

functionality of the tissue cells *in vitro*. It has been produced a model, which has not only the cells themselves, but all the signaling system which regulates the division, differentiation and functioning of cells in a tissue *in vivo*. The cell culture was prepared by conventional cold

trypsinization, which was tested in laboratories of reproductive biotechnology and breeding animals. Cells were cultured in an incubator at 37 °C, 5 % CO₂ and maximal humidity. The modification of the glass surface was carried out by treating the glass plates 3-aminopropyl(triethoxy) silane (APTES), whereby to immobilize them on the primary amino group. On a surface of «clear glass» nanospheres adsorbed bovine serum albumin (BSA) for the creation of biocompatible surfaces and biosensor.

Comparisons were made of the influence of the two species such surfaces — biogel based protein and albumin caused by organic synthesis. By calculating the index of proliferation of the

MTT-test, and biochemical studies of conditioned cell culture medium during 72 hours of culture demonstrated that culturing on Biogel natural origin promotes higher viability and metabolic activity of the culture in terms of the activity of lactate dehydrogenase and glucose compared to the use of nano albumin. The results indicate increased vitality and intensity of biosynthetic processes in the cell culture.

Keywords: RABBIT OVIDUCT CELL CULTURE, MODIFIED SURFACE, 3D-CULTURE, GLUCOSE, LACTATE DEHYDROGENASE

ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ РОСТ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНДИЦИОННОЙ СРЕДЫ КАК ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК ЯЙЦЕПРОВОДОВ КРОЛЕМАТОК.

С.В. Фёдорова¹, О.В. Штапенко¹, И.И. Гевкан¹, И.О. Матюха¹, М.О. Жолобка²,
О.М. Огар², Ю.Б. Стецишин², Ю.И. Слывчук¹
shtapenko@ukr.net

¹Институт биологии животных НААН Украины, ул. В. Стуса, 38, Львов, 79034, Украина

²Национальный университет «Львовская Политехника», 8 корпус, к. 204, пл. Святого Георгия, 2, 79013, Львов, Украина

В статье описано использование модифицированных поверхностей культуральной посуды как альтернативу обычному пластику при интенсификации пролиферативного роста и функциональной активности культуры клеток яйцепроводов кроликов. Соответственно поставленным задачам исследования были воспроизведены условия функциональности клеток данной ткани *in vitro*. Было воспроизведено такую ее модель, где сохранились бы не только сами клетки, но и вся сигнальная система, которая регулирует деление, дифференциацию и функционирование клеток в ткани *in vivo*. Культуру клеток получали обычным методом холодной трипсинизации, который был опробован в лаборатории репродуктивной биотехнологии и разведения животных. Клетки культивировали в инкубаторе при температуре 37 °C, 5 % CO₂ и максимальной влажности воздуха. Модификацию поверхности стекла осуществляли путем обработки стеклянных пластин 3-аминопропил(триэтокси)силаном (АПТЭСом), за счет чего на них иммобилизовались первичные аминогруппы. На поверхности «чистого стекла» адсорбировали наношар бычьего сывороточного альбумина (БСА) для

создания биосовместимых и биосенсорных поверхностей.

Проводили сравнение влияния двух видов таких поверхностей — биогеля на основе белка и альбумина, нанесенного методом органического синтеза. Путем расчета индекса пролиферации, проведения МТТ-теста и биохимических исследований кондиционной среды культуры клеток в течение 72 часов культивирования доказано, что культивирование на биогеле природного происхождения способствует высшей жизнеспособности и метаболической активности культуры по показателям активности лактатдегидрогеназы и уровня глюкозы по сравнению с использованием нанопокровов с альбумином. Полученные результаты указывают на повышение жизнеспособности и интенсивности биосинтетических процессов в культуре клеток.

Ключевые слова: КУЛЬТУРА КЛЕТОК, ЯЙЦЕПРОВОДЫ КРОЛЕМАТОК, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОВЕРХНОСТИ, ОБЪЕМНАЯ КУЛЬТУРА, ГЛЮКОЗА, ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Хімічний і фазовий склад поверхні, її топографія — головні складові фактори, які регулюють ріст клітин та їх функції [1]. Розуміння механізмів взаємодії клітинних мембран з поверхнями культурального посуду — одна із головних проблем у практичній біології та медицині [2, 3]. Створення стійких наношарів білків на поверхні матеріалів має велике значення при розробці імплантантів і біосенсорних систем [4–7]. Тому вивчення впливу різних модифікованих поверхонь скла на життєздатність клітин, з одного боку, та їхню цитотоксичність, з другого, є актуальним та має наукову новизну [8, 9].

В останні роки у галузі клітинних технологій багато досліджень присвячено використанню об'ємних клітинних культур на відміну від звичайних моношарів. Клітинний ріст на об'ємних матриксах відрізняється за своєю морфологією та ступенем диференціації клітин. У таких умовах взаємодії типу клітина/клітина та клітина/матрикс є найбільш наближеними до умов *in vivo*. На сьогодні зростає кількість досліджень з клітинної сигналізації, проліферативного росту та міграції клітин в умовах 3D (three dimensional) [10, 11]. При цьому використовується звичайне культуральне середовище, стандартне для цього типу клітин та спеціалізовані носії, які створюють об'єм. У складі такого носія на основі різноманітних речовин (фібрин, водорості, синтетичні пептиди, нанорешітка із діоксиду титану тощо) присутній специфічний екстрацелюлярний матрикс-протеїн (ЕСМ-протеїн), який виділяють із саркоми миші. На жаль, вартість доступних 3D-середовищ такого типу є дуже високою, що заважає їх широкому застосуванню у лабораторіях із низьким бюджетом [10, 12]. Тому групою дослідників із США запропонована методика культивування клітин у 3D-культурі з використанням звичайного білка курячого яйця, який володіє наступними перевагами: він достатньо підтримує ріст та розвиток нормальних клітин зародка курчати без додаткового зовнішнього живлення; вязкість змінюється зі зміною температури; білок прозорий, що дозволяє спостерігати за ростом та диференціацією клітинної культури; легкодоступний і недорогий у використанні [10, 12]. Основна частина

курячого білка складається із овальбуміну (до 50 %), авідину та цистатину С — саме вони відіграють роль факторів адгезії [10, 11, 13]. Враховуючи все вищеперераховане, метою нашої роботи було порівняти вплив двох видів модифікованих поверхонь на проліферативний ріст та життєздатність культури клітин яйцепроводів кролематок.

Методи і матеріали

Отримання культури клітин.

Яйцепроводи самок кролів отримували після планового забою на ПП «Паннон Карпатський» (м. Мукачеве, Закарпатської області). Культуру клітин отримували звичайним методом трипсинизації, який опрацьований у нашій лабораторії (Мадіч А. В. та ін., 2012) [13]. Клітини культивували в інкубаторі при t 37 °С, 5 % CO₂ за максимальної вологості повітря.

Культивування клітин на біогелі.

Курячі яйця транспортували в лабораторію. Яйця обмивали проточною водою з милом та обробляли шкарлупу 70 % розчином етилового спирту. Під ламінарною шафою в стерильних умовах у яйці зверху стерильним очним пінцетом робили отвір. Вміст яйця без жовтка обережно переливали в пробірку типу Фалькон. Після чого білок розділяли на аліквоти по 1,5 мл в пробірки типу ЕпENDORF та зберігали при -80 °С для подальшого використання.

Перед виготовленням культур необхідну кількість білка розморожували при кімнатній температурі. Для полегшення піпетування в'язкого білка наконечники для дозаторів підрізали під кутом одноразовим лезом. Відбираючи по 100 μ l, переносили білок у 8-лункові планшети точно на середину кожної лунки. Планшет з рідким білком поміщали у термостат (60 °С) на 30–60 хв під візуальним контролем. Між планшетами та металевою поверхнею термостата поміщали проміжний шар пенопласта. Після термообробки поверхня лунок мала залишитись прозорою — побілілі лунки вибраковували. Кожну лунку окремо

промивали культуральним середовищем для видалення залишків білка, що не висох, і зразу висівали культуру клітин (0,5 мл) з початковою концентрацією 0,5 млн кл/мл.

Культитивування культур клітин на нанопокриттях із альбуміном. Модифікацію поверхні скла здійснювали шляхом обробки скляних пластин 3-амінопропіл(триетокси)силаном (АПТЕСом), за рахунок чого на них іммобілізувались первинні аміногрупи. За участі цих аміногруп на поверхні модифікованого скла прищепляли диальдегіддекстран, який отримували шляхом часткового окислення декстрану перйодатною кислотою (модифікація скла проводилась на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка», доц. Ю. Стецишин). Крім того, на поверхні «чистого скла» адсорбували наночастинок біачого сироваткового альбуміну (БСА) для створення біосумісних та біосенсорних поверхонь.

Для встановлення ефективності формували групи відповідно: контроль — лунка без біогелю (звичайний культуральний пластик); група 1 — лунка з біогелем; група 2 — покривне скло з адсорбованим альбуміном. Всі групи культивувались в інкубаторі при t 37 °C, 5 % CO₂ при максимальній вологості повітря.

Проліферативну активність культури клітин було досліджено за інтенсивністю росту культури та здатністю її до утворення моношару. Клітини відбирали кожні 24 години. Після завершення періоду інкубації середовище відбирали, клітини промивали фосфатно-сольовим буфером і зафарбовували розчином трипанового синього (кінцева концентрація барвника 0,4 %). Кількість живих (незафарбованих) і мертвих (зафарбованих) клітин підраховували в камері Горяєва за допомогою світлового мікроскопа.

Визначення активності лактатдегідрогенази проводили за використання кінетичного УФ-методу, який базується на прямій реакції

відновлення молочної кислоти до пірувату з використанням автоматичного біохімічного аналізатора при довжині хвилі 300–400 нм.

Визначення концентрації глюкози у кондиційному середовищі проводилось кінетичним методом фотометрування за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора.

MTT-тест. За 5 год до завершення періоду інкубації з чашок відбирали середовище і додавали MTT-реагент, 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолію («Sigma-Aldrich») до кінцевої концентрації 500 мкг/мл. Після завершення періоду інкубації в чашки додавали диметилсульфоксид для розчинення фіолетових кристалів формагану, що утворилися внаслідок відновлення MTT-реагента редуктазами живих клітин. Концентрацію формагану в лунках визначали спектрофотометричним методом на апараті «Plate Reader BioTek» (США) за оптичним поглинанням при довжині хвилі 490 нм. Кількість живих клітин (у відсотках) визначали за співвідношенням оптичних густин, проміряних у чашках, в яких клітини інкубували на досліджуваних та контрольних середовищах.

Досліди повторювали тричі з трьома паралельними постановками для кожного варіанту експериментальних і контрольних умов. Порівняння двох мінливих значень здійснювали на підставі показника статистичної достовірності відмінностей p . Показник p обчислювали за критерієм Стюдента, який визначали шляхом проведення t -тесту для двох вибірок даних із різними дисперсіями σ^2 . Відмінність між двома значеннями вважали вірогідною, коли значення p було більше за 0,95.

Результати й обговорення

Для дослідження взаємодії клітин з біогелем та альбуміном проведено оцінку морфології клітин, індексу проліферації та кількості пошкоджених клітин через 24, 48

та 72 год культивування (табл. 1, 2).

Результати досліджень впливу модифікованих поверхонь на активність проліферації клітин яйцепроводів кролів представлені в таблиці 1. Культивування культури клітин яйцепроводів показало зростання проліферативного росту на 24 годину у дослідній групі з біогелем у порівнянні з контролем та другою дослідною групою, тоді як на 48 годину культивування відмічається підвищення

проліферативного росту в обох дослідних групах. Так, на 48 год культивування клітин яйцепроводів спостерігали підвищення рівня проліферації клітин у 1-й дослідній групі, при культивуванні на біогелі, концентрація клітин становила $2,52 \pm 0,09 \times 10^6$ та у 2-й дослідній групі при використанні поверхні з альбуміном — $2,07 \pm 0,09 \times 10^6$ проти $1,99 \pm 0,24 \times 10^6$ в 1 см^3 у контролі.

Таблиця 1

Динаміка проліферативного росту культури клітин яйцепроводів кролів за умов культивування на біогелі та альбуміні ($M \pm m$, $n=3$)

Група	Посівна концен-трація клітин $\times 10^6 / \text{см}^3$	Концентрація клітин $\times 10^6 / \text{см}^3$ через 24 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6 / \text{см}^3$ через 48 год культивування	Концентрація клітин $\times 10^6 / \text{см}^3$ через 72 год культивування
Контрольна	0,5	$1,05 \pm 0,05$	$1,99 \pm 0,24$	$2,63 \pm 0,11$
1-а (біогель)	0,5	$1,39 \pm 0,12$	$2,52 \pm 0,09$	$4,25 \pm 0,07^{***}$
2-а (альбумін)	0,5	$0,89 \pm 0,07$	$2,07 \pm 0,09$	$3,79 \pm 0,13^{**}$

При культивуванні культури клітин яйцепроводів впродовж 3 діб відмічено вірогідне збільшення кількості клітин на 72-гу год культивування у 1-й ($P < 0,001$) та 2-й ($P < 0,01$) дослідних групах, у порівнянні до відповідного показника контрольної групи.

Індекс проліферації клітин на 24-ту год культивування був найвищим у 1-й дослідній групі, тоді як у контролі та 2-й дослідній групі цей показник був на приблизно на одному рівні (табл. 2). Аналогічна тенденція індексу проліферації зберігається і на 48-гу год культивування. На 72-гу год культивування індекс проліферації зростає в усіх групах. Так, у 1-й та 2-й дослідних групах на 72-гу год культивування відмічено підвищення у 1,6 та 1,4 рази індексу проліферації порівняно до показника контрольної групи (табл. 2).

Встановлено, що біогель викликає підвищення життєздатності та проліферативного індексу культури клітин яйцепроводів кролів впродовж всього періоду культивування, тоді як нанопокриття скляної поверхні альбуміном виявляє менш помітний стимулюючий вплив на проліферативну здатність клітин.

З метою вивчення впливу біогелю природнього походження та нанопокриття

з альбуміном на метаболічний стан культури клітин яйцепроводів в кондиційному середовищі через кожні 24 год впродовж 72-годинного культивування проводили визначенням активності ЛДГ і вмісту глюкози (табл. 3) та життєздатності культури клітин яйцепроводів за допомогою МТТ-тесту (табл. 4).

Дослідження життєздатності культури клітин яйцепроводів впродовж 72-годинного культивування проводили за допомогою мікротетразолевого тесту (МТТ-тесту), відображало інгібування клітинного дихання (табл. 4) Встановлено, що метаболічна активність клітин 1-ї дослідної групи впродовж всього періоду культивування вона була в межах 96,7–103,4 %, і була вищою за показники 2-ї дослідної групи. Метаболічна активність клітин яйцепроводів на першу добу культивування в 2-й дослідній групі була найнижчою, однак при подальшому культивуванні життєздатність клітин цієї групи зростає. Життєздатність клітин 2-ї дослідної групи також була високою і знаходилась в межах 86,3–96,0 %.

Таблиця 2

Динаміка життєздатності культури клітин та індекс проліферації культури клітин яйцепроводів кролів за умов культивування на біогелі та альбуміні ($M \pm m$, $n=3$)

Дослідні групи	Загальна кількість клітин, млн/см ³	Індекс проліферації клітин
<i>на 24 години культивування</i>		
Контроль	1,69±0,13	6,5
Д ₁ (біогель)	2,82±0,16**	8,9
Д ₂ (альбумін)	1,48±0,1	4,8
<i>на 48 години культивування</i>		
Контроль	3,29±0,16	6,5
Д ₁ (біогель)	4,46±0,04**	8,9
Д ₂ (альбумін)	2,43±0,01**	4,8
<i>на 72 години культивування</i>		
Контроль	4,19±0,22	8,3
Д ₁ (біогель)	5,44±0,22**	10,8
Д ₂ (альбумін)	3,55±0,2	7,1

Таблиця 3

Концентрація глюкози та лактатдегідрогенази в кондиційному середовищі після 24–72-годинного культивування культури клітин яйцепроводів на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном ($M \pm m$, $n=3$)

Група	Термін культивування год	Біохімічні показники	
		ЛДГ (УО)	глюкоза (г/л)
Контроль	24	50,5±0,73	15,5±0,17
	48	32,2±0,29	7,07±0,18
	72	11,1±0,22	1,23±0,04
1-а (біогель)	24	48,7±0,31	16,9±0,07***
	48	29,5±0,49**	5,53±0,18**
	72	9,03±0,51**	0,97±0,03**
2-а (альбумін)	24	48,4±0,62	15,9±0,13
	48	30,5±1,07	6,1±0,2***
	72	9,5±0,42*	1,05±0,07

У контролі активність ЛДГ у середовищі культивування культури клітин яйцепроводів на 24 год була найнижчою в порівнянні з дослідними групами. У контрольній, 1-й та 2-й дослідних групах на 48–72 год культивування активність

екстраклітинного ЛДГ знижувався відносно її концентрації на 24 години культивування, що пов'язано зі зростанням проліферативної активності клітин та їх високою життєздатністю.

Таблиця 4

Життєздатність культури клітин яйцепроводів за культивування модифікованих поверхнях ($M \pm m$, $n=3$)

Група	МТТ, % від контролю		
	Тривалість культивування, год.		
	24	48	72
Контроль			
1-а (біогель)	103,4	101,7	96,7
2-а (альбумін)	86,3	96,0	95,6

При визначенні інтенсивності споживання глюкози культурою клітин яйцепроводів впродовж культивування встановлено зниження її вмісту в кондиційному середовищі дослідних та

контрольної груп на 48-му годину культивування в 2,5 рази та на 72 год культивування — в 12 разів, що вказує на високий рівень біосинтетичних процесів культури клітин усіх груп та посилений

вуглеводневий обмін у клітинах в результаті інтенсивного проліферативного росту клітин.

Отже, біогель природного походження та нанопокриття з альбуміном не викликають зниження адгезії та проліферативної активності культури клітин яйцепроводів.

Висновки

Біогель в більшій мірі підвищує життєздатність та проліферативний індекс культури клітин яйцепроводів кролів впродовж усього періоду культивування та сприяє метаболічній активності культури за показниками рівня ЛДГ та глюкози в кондиційних середовищах, що вказує про підвищення життєздатності та інтенсивності біосинтетичних процесів у культурі клітин, порівняно з нанопокриттям скляної поверхні альбуміном.

Перспективи подальших досліджень. Доцільним є дослідження життєздатності культур клітин на біогелі з використанням конфокальної мікроскопії, що дало би можливість продемонструвати об'ємність утвореної культури і глибше довело б доцільність використання такого типу покриття культурального посуду для наближення умов культивування клітин до умов *in vivo* та здешевило б метод в цілому.

1. Brynda E., M. Houska, M. Jirouskova et al. Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices. *Journal of Biomedical Material Research*, 2000; 51: 249–257.

2. Brynda E., M. Houska Ordered multilayer assemblies: Albumin/heparin for biocompatible coatings and monoclonal antibodies for optical immunosensors. In: Lvov Y, Mohwald H editors. *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000: 251–286

3. Ladam G., Schaaf P., Decher G. et al. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Biomolecular Engineering*. 2002; 19: 273–280.

4. Miksa D., Irish E. R., Chen D. et al. Dextran Functionalized Surfaces via Reductive

Amination: Morphology, Wetting, and Adhesion. *Biomacromolecules*. 2006; 7 : 557–564.

5. Rabe M., Verdes D., S. Seeger S. Surface-induced spreading phenomenon of protein clusters. *Soft Matter*. 2009; 5: 1039–1047.

6. Sapsford K. E., Ligler F. S. Real-time analysis of protein adsorption to a variety of thin films. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004; 19: 1045–1055.

7. Yu S. Y., Hu J. H., Pan X. Y. et al. Stable and pH-sensitive nanogels prepared by selfassembly of chitosan and ovalbumin. *Langmuir*. 2006, vol. 22, pp. 2754–2759.

8. Stetsyshyn Y. et. al. Issledovaniya adsorbtsiji albumina na poverchnosti modifitsirovannogo stekla metodom elipsometriji [Study the adsorption of albumin on the surface-modified glass by elipsometriya]. *Scientific journal «Visnyk of L'viv University» Biological Series*. 2010; no 54, pp. 51–58 (in Russian).

9. Shtapenko O. et. al. Proliferatsiya kul'tury kletok yajitseprovodov korov I otdel'nyje biochimicheskiye pokazateli sredy pri dejstviyi chloride nikelya [The proliferation of cows oviduct cell culture and some biochemical parameters of the medium under the action of nickel chloride]. *Naukov-tekhnichnyy byuleten Instytutu biolohiyi tvaryn i Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu veterynarnykh preparativ i kormovykh dobavok — Scientific and technical bulletin Institute of Animal Biology and State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives*, L'viv, 2009; 10 (1-2), 342–346 (in Russian).

10. Benny Abraham Kaiparettu, Isere Kuiatsel, Bonita Tak-Yee Chan, Meju Benny Kaiparettu et al. Novel egg white-based 3-D cell culture system. *BioTechniques*, 2008, Vol. 45, p. 165–171

11. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, Vol. 8, P. 839–845

12. Alon R., HersHKoviz E. A. Bayer et al. Streptavidin blocks immune reactions mediated by fibronectin-VLA-5 recognition through an Arg-Gly-Asp mimicking site. *European Journal of Immunology*, 1993, Vol. 23, P. 893–898.

13. Madich A. V. et.al. Klitynni kultury I mozhlyvist' jih vykorystan'nya v embrional'niy biotekhnologiyi. [Cell culture and their possible use in embryonic biotechnology] Textbook. Kyiv: ArtEkonom, 2012, 144 P.