

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

МОІСЄЄВ АНТОН ІГОРОВИЧ

УДК 57: 086.13:576.5.016

ДИСЕРТАЦІЯ
ОПТИМІЗАЦІЯ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ
СФЕРОЇДІВ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ КУЛЬТИВУВАННЯ

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Моїсєєв А.І.

Науковий керівник Божок Галина Анатоліївна, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, в.о. провідного наукового співробітника відділу кріоендокринології ІПКіК НАН України

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Моїсєєв А.І. Оптимізація режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (галузь знань 09 Біологія). – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2023.

Дисертаційна робота присвячена вивченню структурно-функціональних характеристик клітин лінії L929 при культивуванні в умовах 2D та 3D, визначенню оптимальних умов отримання клітинних сфероїдів (СФ) з клітин вищезазначеної лінії, розрахунку коефіцієнтів проникності і параметрів масопереносу для молекул води і кріопротектору диметилсульфоксиду (ДМСО) у СФ різних термінів культивування (7, 14 і 21 доби) за різних температур (10, 15, 25°C), визначенню оптимальних режимів кріоконсервування СФ на основі фізико-математичного моделювання, а також експериментальному апробуванню даних режимів за параметрами функціональної активності клітин (МТТ-тест, здатність до адгезії, проліферативна та міграторна активність) після розморожування СФ.

Відомо, що використання низькоадгезивної поверхні дозволяє одночасно отримувати велику кількість СФ. Однак одним з головних недоліків цього способу є велика розбіжність у розмірах отримуваних СФ, що ускладнює підбір параметрів режиму їх кріоконсервування. Враховуючи даний факт, на першому етапі роботи була визначена оптимальна посівна концентрація клітин L929 для отримання найбільшої кількості СФ з приблизно однаковим діаметром. Експериментально було отримано СФ при різних посівних концентраціях: 1×10^5 , 2×10^5 і 5×10^5 клітин/мл. На 7-му добу культивування СФ встановлено, що після використання концентрації

1×10^5 клітин/мл агрегати були переважно малоклітинними, пухкими і різної форми. При концентрації 2×10^5 клітин/мл формувалися переважно округлі СФ, діаметр $(70,0 \pm 2,5)\%$ з яких становив 80–150 мкм. Використання концентрації 5×10^5 клітин/мл призводило до значущого ($p < 0,05$) збільшення кількості крупних СФ з діаметром 150–300 мкм до $(48,0 \pm 0,3)\%$ або їх злиття у агрегати більш ніж 1000 мкм у діаметрі, що є неприйнятним для подальшого культивування СФ у зв'язку зі зниженням дифузії поживних речовин у внутрішні клітинні шари.

Для оцінки життєздатності СФ у залежності від посівної концентрації використовували флуоресцентні ДНК-барвники Hoechst 33342 і пропідіум йодид (PI) та пошарове сканування забарвлених СФ на конфокальному мікроскопі. У результаті проведених досліджень було з'ясовано, що за усіх використаних посівних концентрацій на 7-му добу культивування спостерігається значуще ($p < 0,05$) збільшення кількості некротичних PI-позитивних клітин у складі СФ порівняно з 3-ю добою культивування. Слід зазначити, що при концентрації 5×10^5 клітин/мл кількість PI-забарвлених клітин складала $(40,6 \pm 1,97)\%$, тоді як при концентраціях 1×10^5 і 2×10^5 клітин/мл цей показник був менше: $(20,2 \pm 0,9)$ та $(13,1 \pm 0,9)\%$ відповідно.

Оцінка морфологічних змін ядер фібробластів за допомогою барвника Hoechst 33342 показала, що у найвищій використаній концентрації (5×10^5 клітин/мл) кількість клітин з фрагментацією ядра була більшою у 1,3 та 1,5 рази порівняно з концентраціями 1×10^5 і 2×10^5 клітин/мл відповідно. В цілому, за посівних концентрацій 1×10^5 і 2×10^5 клітин/мл біля 80% клітин у складі СФ мали ядра округлої форми з однорідною структурою та без ознак фрагментації.

Аналіз впливу посівної концентрації на здатність СФ до адгезії на 3-ю добу показав, що при концентраціях 1×10^5 та 2×10^5 клітин/мл кількість прикріплених СФ була більшою у 1,8 та 2 рази відповідно у порівнянні з концентрацією 5×10^5 клітин/мл. При збільшенні терміну культивування СФ до 7-ї доби культивування спостерігалась аналогічна тенденція.

На основі отриманих результатів було визначено, що посівна концентрація клітин 2×10^5 клітин/мл є оптимальною для отримання 70% СФ діаметром 80–150 мкм та з високим функціональним потенціалом. Дану концентрацію клітин було використано для отримання і оцінки функціональних показників СФ на подальших етапах роботи.

У подальших дослідженнях було з'ясовано вплив термінів культивування (7, 14 і 21 доби) на зміну діаметра СФ. Встановлено, що кількість СФ з діаметрами 20–80 мкм на 14 і 21-у добу культивування зменшувалась у 2,1 і 3,4 рази відповідно порівняно з 7-ю добою. Відсоток СФ з діаметром 80–150 мкм протягом 21-ї доби культивування складав в середньому 60–70%. Кількість СФ з діаметром 150–300 мкм збільшувалась на 14 і 21-у добу культивування у 1,5 і 2,3 рази відповідно у порівнянні з 7-ю добою.

На наступному етапі роботи було проведено аналіз секреторно-метаболическої активності клітин лінії L929 в умовах моношарового (2D) і об'ємного (3D) культивування. Активність клітин була оцінена на 7-му добу культивування методом гель-фільтрації за спектром речовин пептидної природи у середовищі культивування. Пептидний профіль у 3D-культурі відрізнявся від моношарової культури. Він характеризувався появою піку з молекулярною масою 1600 Да ($(1,41 \pm 0,09)\%$ від загальної площі) та збільшенням у 4 та 7,2 рази ($p < 0,05$) кількості пептидів з молекулярними масами 1067–1045 та 718–705 Да.

У подальших дослідженнях на основі фізико-математичного моделювання були розраховані коефіцієнти проникності для молекул води і ДМСО у СФ різних термінів культивування і поодинокі клітини. Так, результати визначення коефіцієнтів проникності води і ДМСО у СФ на 7, 14 і 21 добу культивування при різних температурах кріозахисного середовища показали, що параметри проникності значуще ($p < 0,05$) зменшувались зі зниженням температури від 25 до 10°C та зі збільшенням термінів культивування. Зокрема, за температури 10°C коефіцієнти проникності у СФ

14 та 21-ї доби для молекул води та ДМСО значуще знижувались у 2,3 та 5,7 рази (14 доба) та у 2,6 і 6,5 рази (21 доба) порівняно зі СФ 7-ї доби.

За результатами аналізу параметрів проникності для клітин у складі СФ було встановлено, що коефіцієнти проникності для ДМСО у клітини внутрішнього шару СФ зменшувались у 3,2 рази відносно клітин зовнішнього шару, в той час, як параметри проникності для молекул води суттєво не змінювались.

При порівнянні параметрів проникності для поодиноких клітин у моношарі та клітин у складі СФ були визначені суттєві відмінності. Так, значення коефіцієнтів проникності для молекул води і ДМСО у клітини зовнішнього шару СФ у 1,7 та 1,2 рази відповідно були меншими порівняно з даним показником поодиноких клітин. За збільшення глибини їхньої локалізації параметри проникності для молекул води та ДМСО значуще ($p < 0,05$) зменшувались у 1,9 та 3,8 рази відповідно порівняно з поодинокими клітинами.

На основі отриманих часових залежностей відносного об'єму СФ у розчинах з кріопротектором була визначена тривалість процедури їх експозиції в 1М ДМСО у залежності від терміну культивування і температури кріозахисного розчину. Встановлено, що за температур кріозахисного розчину 25, 15 та 10°C час експозиції для СФ 7-ї доби культивування становив відповідно $(43,0 \pm 1,75)$, $(51,8 \pm 3,6)$ та $(64,8 \pm 2,9)$ с; для СФ 14-ї доби — $(67,7 \pm 8,7)$, $(109,1 \pm 10,0)$ та $(216,2 \pm 10,9)$ с; для СФ 21-ї доби — $(100,0 \pm 11,2)$, $(270,3 \pm 19,0)$ та $(440,5 \pm 12,4)$ с.

Для розрахунку коефіцієнтів проникності плазматичних мембран поодиноких клітин L929 та клітин у складі СФ були визначені чисельні значення осмотично неактивного об'єму $\alpha_{\text{кл}}$. Встановлено, що даний показник для поодиноких клітин дорівнював 0,32, для СФ 10-ї доби культивування — 0,41. Збільшення терміну культивування СФ з 7 до 21-ї доби приводило до підвищення $\alpha_{\text{кл}}$ з 0,40 до 0,54 відповідно, що свідчить про структурні зміни СФ протягом культивування.

Перенос крізь клітинні мембрани проникної речовини, зокрема кріопротектору, є енерговитратним процесом, який характеризується різними значеннями енергії активації (E_A). Збільшення терміну культивування СФ також приводило до підвищення значень E_A для молекул води та ДМСО у 1,8 та 1,9 рази відповідно у СФ 14-ї доби в інтервалі температур (10–25°C) порівняно зі СФ 7-ї доби. Подібна тенденція встановлена й для СФ 21-ї доби культивування в інтервалі температур (10–15°C) і (15–25°C).

Використовуючи отримані значення коефіцієнтів проникності у фізико-математичній моделі, що описує кінетику змін відносного об'єму клітин у процесі позаклітинної кристалізації за певної швидкості охолодження, була спрогнозована ступінь зневоднення СФ. Це дало змогу теоретично визначити оптимальну швидкість охолодження СФ і кінцеву температуру їх заморожування перед зануренням у рідкий азот (–196°C). Так для СФ 7-ї доби культивування оптимальною програмою заморожування є охолодження зі швидкістю 2°C/хв до –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот. Для СФ 14 та 21-ї діб культивування оптимальною програмою заморожування є охолодження зі швидкістю 0,5°C/хв до –40°C з подальшим зануренням у рідкий азот.

Ефективність режимів, визначених на основі фізико-математичного моделювання, була перевірена експериментально за функціональними показниками деконсервованих СФ такими як метаболічна активність клітин (МТТ-тест), здатність до адгезії, проліферативна та міграторна активність. Режим 1 (експериментальний) включав теоретично визначені час насичення СФ у кріосередовищі 65 с (за температури 10°C), швидкість охолодження 2°C/хв та кінцеву температуру охолодження –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C). Для порівняння було використано два стандартних режими, які включали найбільш розповсюджені у кріобіологічній практиці час насичення СФ впродовж 10 хв, швидкість охолодження 1°C/хв, кінцеву температуру охолодження –40°C з подальшим зануренням у рідкий азот

(режим 2) або кінцеву температуру охолодження -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (режим 3).

Після розморожування СФ на моделі «подряпина» оцінювали проліферативний і міграторний показник за площею ушкодженого моношару утвореного клітинами зі СФ, кріоконсервованих за теоретично визначеним режимом 1. Площа ушкодженого моношару після 24 і 48 годин культивування в 1,3 рази і 2,4 рази відповідно була меншою у порівнянні зі стандартним режимом 2.

Для з'ясування впливу кінцевої температури охолодження на функціональні показники деконсервованих СФ при дослідженні міграторної активності клітин, яку оцінювали за площею сформованого на 3-ю добу моношару, використовували режими 2 і 3. Показник для СФ, кріоконсервованих за теоретично розрахованим режимом 1, значуще ($p < 0,05$) перевищував показник для СФ, кріоконсервованих за стандартними режимами 2 і 3.

Схожа тенденція була виявлена при визначенні метаболічної активності деконсервованих СФ за МТТ-тестом. Після розморожування СФ, кріоконсервованих за стандартними режимами 2 і 3, рівень утворення формагану з МТТ у 1,9 і 1,5 рази відповідно був меншим відносно значень накопичення формагану у СФ, кріоконсервованих за теоретично визначеним режимом 1.

Оцінка адгезивної активності деконсервованих СФ показала, що показник середньої кількості прикріплених СФ через 24 години знаходився у межах 78–87% незалежно від використаних у роботі режимів і не відрізнявся від контролю, в якому він складав 88%.

Таким чином, в проведених дослідженнях була визначена оптимальна посівна концентрація клітин L929 (2×10^5 клітин/мл), при використанні якої було отримано найбільшу кількість функціонально повноцінних СФ з приблизно однаковим діаметром (80–150 мкм). На основі розрахованих коефіцієнтів проникності і параметрів масопереносу для молекул води і

кріопротектору ДМСО у СФ різних термінів культивування (7, 14 і 21 доба) і температур (10, 15, 25°C) були визначені оптимальні режими їхнього кріоконсервування. За даними оцінки площі моношару, утвореного клітинами після міграції зі СФ, МТТ-тесту та тесту «подряпина» доведено, що кріоконсервування СФ з клітин лінії L929 за режимом, розрахованим на основі фізико-математичної моделі, приводить до більш ефективного збереження метаболічного стану, проліферативного та міграторного потенціалу СФ порівняно зі стандартними режимами.

Запропонований у роботі алгоритм визначення оптимальних режимів кріоконсервування може бути використаний для багатоклітинних об'єктів різних розмірів, які отримані з різних типів клітин, для кріозахисних середовищ різного складу і температури.

Ключові слова: кріоконсервування, кріозахист, кріопротектори, диметилсульфоксид, 3D-культивування, осмотично неактивний об'єм, клітини лінії L929.

ANNOTATION

Moisieiev A.I. Optimization of cryopreservation modes for cell spheroids of different cultivation terms. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for the degree Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology (field of study 09 Biology). – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The thesis is devoted to: the study of structural and functional characteristics of L 929 cells during 2D and 3D cultivation; determination of optimal conditions for obtaining cell spheroids from cells of the aforementioned line, calculation of permeability coefficients and mass transfer parameters for water molecules and dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotectant into spheroids of different cultivation terms (7, 14 and 21 days) at various temperatures (10, 15, 25°C), determination of optimal modes of cryopreservation for spheroids based on physical and mathematical modeling, as well as experimental testing of the determined modes according to parameters of functional activity of cells (MTT assay, ability to adhesion, proliferative and migratory activity) after spheroid thawing.

The use of low-adhesive surface is known to allow the obtaining of a large amount of spheroids at the same time. However, one of the main disadvantages of this method is a large divergence in the sizes of the obtained spheroids which complicates the selection of their cryopreservation mode parameters. In this regard, at the first stage of the work, the optimal seeding concentration of L929 cells was determined in order to obtain the largest number of spheroids with nearly the same diameter. Spheroids were experimentally obtained at different seeding concentrations: 1×10^5 , 2×10^5 and 5×10^5 cells/ml. On day 7 of spheroid cultivation it was found that at a concentration of 1×10^5 cells/ml, the aggregates were mostly small-celled, loose and their shapes were different. At a concentration of 2×10^5 cells/ml, mostly rounded spheroids were formed, the diameter $(70.0 \pm 2.5)\%$ of which was 80–150 μm . The use of the concentration of

5×10^5 cells/ml led to a significant ($p < 0.05$) increase in the number of large spheroids with a diameter of 150–300 μm to $(48.0 \pm 0.3)\%$ of them or their merging into aggregates of more than 1,000 μm in diameter which is unacceptable for further cultivation of spheroids due to reduced diffusion of nutrients into the inner cell layers.

Fluorescent DNA dyes Hoechst 33342, propidium iodide (PI) and layer-by-layer scanning of stained spheroids with the use of confocal microscope were used to assess the viability of spheroids depending on the seeding concentration. As a result of carried out research, it was found that regardless of seeding concentration on day 7 of cultivation there was a significant ($p < 0.05$) increase in the number of necrotic PI-positive cells in the composition of spheroids compared to day 3 of cultivation. It should be noted, that at a concentration of 5×10^5 cells/ml, the number of PI-stained cells was $(40.6 \pm 1.97)\%$, whereas, at the concentrations of 1×10^5 and 2×10^5 cells/ml this index was lower: (20.2 ± 0.9) and $(13.1 \pm 0.9)\%$ respectively.

Evaluation of morphological changes in fibroblast nuclei with the use of Hoechst 33342 dye showed that at the highest concentration (5×10^5 cells/ml) the number of cells with nuclear fragmentation was 1.3 and 1.5 times higher compared to concentrations of 1×10^5 and 2×10^5 cells/ml respectively. In general, there are about 80% of cells in the composition of spheroids that had rounded nuclei with a uniform structure and no signs of fragmentation at seeding concentrations of 1×10^5 and 2×10^5 cells/ml.

The analysis of the influence of seeding concentration on the adhesion ability of spheroids on day 3 of cultivation showed that at concentrations of 1×10^5 and 2×10^5 cells/ml, the number of attached spheroids was 1.8 and 2 times higher respectively compared to the concentration of 5×10^5 cells/ml. A similar trend was observed when the period of spheroids cultivation was prolonged up to 7 days.

We determined that the cell seeding concentration of 2×10^5 cells/ml was optimal concentration for obtaining 70% of spheroids with a diameter of 80–150 μm and high functional potential. This cell concentration was used for

obtaining and evaluating the functional parameters of spheroids at following research stages.

In further studies, the influence of cultivation terms (7, 14 and 21 days) on the change in diameter of spheroids was clarified. It was established that the number of spheroids with diameters of 20–80 μm on days 14 and 21 of cultivation decreased by 2.1 and 3.4 times respectively compared to day 7 of cultivation. The percentage of spheroids with a diameter of 80–150 μm during the 21st day of cultivation on average was equal to 60–66%. The number of spheroids with a diameter of 150–300 μm on days 14 and 21 of cultivation increased by 1.5 and 2.3 times respectively compared to day 7.

At the next stage of work, secretory-metabolic activity of L929 cells was analyzed under the conditions of monolayer (2D) and volumetric (3D) cultivation. The activity of cells was evaluated on day 7 of cultivation by gel filtration method according to the spectrum of peptide nature substances in the cultivation medium. The peptide profile in 3D culture differed from monolayer culture. It was characterized by the appearance of a peak with a molecular mass of 1600 Da ((1.41 $\pm$ 0.09)% of the total area) and a 4-fold and 7.2-fold increase ($p < 0.05$) in the number of peptides with molecular masses of 1,067–1,045 Da and 718–705 Da.

In further studies, on the basis of physical and mathematical modeling, permeability coefficients for water molecules and DMSO into spheroids of different cultivation terms and single cells were calculated. Thus, the results of determining the permeability coefficients for water and DMSO into spheroids on days 7, 14 and 21 of cultivation at different temperatures of the cryoprotective medium showed that the permeability parameters decreased significantly ($p < 0.05$) when lowering the temperature from 25 to 10°C and when increasing the cultivation terms. In particular, at a temperature of 10°C, the permeability coefficients into spheroids on days 14 and 21 for water molecules and DMSO significantly decreased by 2.3 and 5.7 times (for 14 days) and by 2.6 and 6.5 times (for 21 days) compared to the spheroids of day 7.

According to the results from the analysis of permeability parameters for cells in the composition of spheroids, it was established that permeability coefficients for DMSO in cells of the inner layer of spheroids decreased by 3.2 times compared to cells of the outer layer, while the permeability parameters for water molecules did not change significantly.

When comparing the permeability parameters for single cells in monolayer and cells as a part of spheroids, significant differences were determined. Thus, the values of permeability coefficients for water and DMSO molecules into cells of the outer layer of spheroids were lower by 1.7 and 1.2 times respectively compared to this indicator of single cells. As their localization depth increased, the permeability parameters for water and DMSO molecules decreased significantly ($p < 0.05$) by 1.9 and 3.8 times respectively compared to single cells.

Based on the obtained time dependences of the relative volume of spheroids in solutions with cryoprotectant, the duration of their exposure procedure in 1M DMSO was determined depending on the cultivation term and the cryoprotectant solution temperature. It was established that at cryoprotective solution temperatures of 25, 15, and 10°C, the exposure time for spheroids on day 7 of cultivation was: (43.0 ± 1.75) , (51.8 ± 3.6) , and (64.8 ± 2.9) seconds respectively; for spheroids on day 14 – (67.7 ± 8.7) , (109.1 ± 10.0) and (216.2 ± 10.9) seconds respectively; for spheroids on day 21 – (100.0 ± 11.2) , (270.3 ± 19.0) and (440.5 ± 12.4) seconds respectively.

The numerical values of osmotically inactive volume were determined to calculate the permeability coefficients of plasma membranes of single L929 cells and those being a part of spheroids. It was established that this index for single cells was equal to $\alpha_{\text{cell}} = 0.32$ and for spheroids on day 10 of cultivation the index was $\alpha_{\text{spheroid}} = 0.41$. Prolonging the terms of spheroid cultivation from day 7 to day 21 led to an increase in this index from 0.40 to 0.54 respectively which indicates structural changes in spheroids during cultivation.

The transfer of a penetrating substance, in particular a cryoprotectant, through cell membranes is an energy-consuming process characterized by different

values of activation energy. Prolonging the spheroid cultivation terms also led to an increase in the activation energy (E_A) values for water and DMSO molecules into spheroids on day 14 of cultivation within the temperature range (10–25°C) by 1.8 and 1.9 times respectively compared to spheroids on day 7. A similar trend was established for spheroids on day 21 of cultivation within the temperature interval (10–15°C) and (15–25°C).

Using the obtained values of permeability coefficients in the physical and mathematical model, kinetics of changes in relative volume of cells in the process of extracellular crystallization at a certain cooling rate was described. Using this, the degree of dehydration of spheroids was predicted. This made it possible to theoretically determine the optimal cooling rate for spheroids and the final temperature of their freezing before immersion into liquid nitrogen (–196°C). Thus, for spheroids on day 7 of cultivation, the optimal freezing program was cooling at a rate of 2°C/min to –80°C with subsequent immersion into liquid nitrogen. For spheroids on days 14 and 21 of cultivation, the optimal freezing program was cooling at a rate of 0.5°C/min to –40°C with subsequent immersion into liquid nitrogen.

The effectiveness of modes determined on the basis of physical and mathematical modeling was experimentally tested according to functional indicators of thawed spheroids such as cell metabolic activity (MTT assay), adhesion ability, proliferative and migratory activity. The mode 1 (experimental) included the theoretically determined spheroid saturation time in the cryoprotective medium which was equal to 65 seconds (at the temperature of 10°C), a cooling rate of 2°C/min and a final cooling temperature of –80°C with subsequent immersion into liquid nitrogen (–196°C). The aforementioned experimental mode 1 was compared to two standard modes which included the most widespread in cryobiological practice spheroid saturation time of 10 minutes, the cooling rate of 1°C/min, the final cooling temperature of –40°C with subsequent immersion into liquid nitrogen (mode 2) or the final cooling temperature of –80°C followed by immersion into liquid nitrogen (mode 3).

After thawing of spheroids, the proliferation and migration indicators were evaluated using the “scratch” model, based on the area of the damaged monolayer formed by cells from spheroids, cryopreserved according to the theoretically determined mode 1. The area of damaged monolayer after 24 and 48 hours of cultivation was found to be 1.3 and 2.4 times smaller respectively compared to the standard mode 2.

When studying the migratory activity of cells, assessed by the area of the monolayer, formed on day 3, the modes 2 and 3 were used to find out the influence of the final cooling temperature on the functional parameters of the thawed spheroids. The index for spheroids, cryopreserved with the theoretically calculated mode 1, significantly ($p < 0.05$) exceeded the one for spheroids cryopreserved with standard modes 2 and 3.

A similar trend was noted when examining the metabolic activity of the thawed spheroids using the MTT assay. After thawing of spheroids, cryopreserved on the standard modes 2 and 3, the level of formazan formation from MTT was 1.9 and 1.5 times lower respectively relative to the values of formazan accumulation in spheroids cryopreserved according to the theoretically determined mode 1.

The evaluation of adhesive activity of the thawed spheroids showed that an average number of attached spheroids after 24 hours was within the limits of 78–87% regardless of the modes used in the work and did not differ from the control, in which this indicator was equal to 88%.

Thus, the optimal seeding concentration of L929 cells (2×10^5 cells/ml) was determined in the performed studies when the largest number of functionally complete spheroids with approximately the same diameter (80–150 μm) was obtained. Based on the calculated permeability coefficients and mass transfer parameters for water and DMSO molecules into spheroids of different cultivation terms (7, 14, and 21 days) and temperatures (10, 15, 25°C), the optimal modes of their cryopreservation were determined. According to the assessment of the monolayer area formed by cells after their migration from spheroids, the MTT and the “scratch” assays, the cryopreservation of spheroids derived from L929 cells

with the mode calculated using a physical and mathematical model has been proven to lead to a more effective preservation of metabolic state, proliferative and migratory potential of spheroids compared to standard modes.

The algorithm to determine the optimal cryopreservation modes proposed in our study can be used for multicellular objects of various sizes, obtained from different cell types, as well as for cryoprotective media of different composition and temperature.

Key words: cryopreservation, cryoprotection, cryoprotectants, dimethyl sulfoxide, 3D-cultivation, osmotically inactive volume, L929 cells.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових виданнях України

1. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА, Горіна ОЛ. Порівняльна характеристика тривимірного та моношарового культивування перещеплюваної лінії фібробластів L929. Доповіді Національної академії наук України. 2019;(8):93–101. DOI: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.08.093>
2. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА, Горіна ОЛ, Бондаренко ТП. Морфофункціональні особливості фібробластів лінії L929 в умовах 3D-культивування. Фізіологічний журнал. 2019;65(3):34–40. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.03.034>
3. **Moisieiev AI**, Bozhok GA. Influence of the theoretically established cryopreservation regimen on the functional state of deconservate. Вісник проблем біології і медицини. 2022;2(1):100–108. DOI: <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-100-108>

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus

4. **Моїсєєв АІ**, Коваленко ІФ, Коваленко СС, Божок ГА, Гордієнко ОІ. Динаміка проникання диметилсульфоксиду в клітини лінії L929 і сфероїди з них. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2021;31(4):316–25. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.316>
5. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ. Теоретичні підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування. Біофізичний вісник. 2021;46:7–22. DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

Корисна модель за матеріалами дисертації

6. Божок ГА, **Моїсєєв АІ**, Горіна ОЛ, Ахатова ЮС, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб стандартизації розмірів тривимірних сфероїдів з фібробластів. Патент України №145824. 2021 січ. 6.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

7. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА. Сравнительная характеристика морфофункциональных особенностей фибробластов после 2D и 3D культивирования. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої 25-річному ювілею НАМН України та Дню науки «Профілактична медицина сьогодні: внесок молодих спеціалістів»; 2018 трав. 24; Харків. Харків; 2018. с.37.
8. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА. Дослідження метаболічної активності фібробластів після 2D та 3D культивування. Матеріали 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 черв. 18–21; Яремче. Яремче; 2019. с.170.
9. **Моїсєєв АІ**. Дослідження часу експозиції сфероїдів у кріозахисному середовищі в залежності від діаметру. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої Дню науки Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення; 2020 трав. 22; Харків. Харків; 2020. с.26.
10. **Моїсєєв АІ**, Коваленко ІФ. Кінетика зневоднення і відновлення об'єму багатоклітинних агрегатів на етапі експозиції в кріозахисному середовищі у залежності від строків культивування. Матеріали The 1st International scientific and practical conference — Modern science: problems and innovations; 2020 квіт. 5–7; Стокгольм. Стокгольм; 2020. с.33–39.
11. **Моїсєєв АІ**. Проникність поодиноких клітин та клітинних сфероїдів для молекул води та диметилсульфоксиду. Матеріали 45-ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених Холод в біології і медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології; 2021 трав. 19–20; Харків. Харків; 2021. с.11.
12. **Моїсєєв АІ**, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ, Божок ГА. Дослідження енергії активації переносу молекул води та диметилсульфоксиду у сфероїди в залежності від температури. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю, присвяченої Дню науки Наукові

дослідження та інновації в медицині: актуальні питання, відкриття і досягнення; 2021 трав. 21; Харків. Харків; 2021. с.31.

13. **Moisieiev AI**. Methodical approaches to cryopreservation of cellular spheroids. Proceedings of the 58-th annual meeting of the society for cryobiology «CRYO 2021»; 2021 July 21–23; Chicago. Chicago; 2021. p.108.

14. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА. Функціональна активність сфероїдів після кріоконсервування за режимом визначеним на основі фізико-математичної моделі. Матеріали VII міжнародної науково-практичної конференції Topical issues of modern science, society and education; 2022 січ. 29–31; Харків. Харків; 2022. с.161–164.

15. **Moisieiev AI**, Bozhok GA, Moisieieva NN, Gorina OL, Akhatova JS. Experimental substantiation of the theoretically determined mode of 3D culture cryopreservation. Proceedings of the Joint meeting of the society for cryobiology and the society for low temperature biology «CRYO 2022»; 2022 July 19–22; Dublin. Dublin; 2022. p.139.

ЗМІСТ

	Стор.
АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1 Тривимірне культивування клітин.....	31
1.1.1 Короткий історичний огляд технологій 3D-культивування....	31
1.1.2 Закономірності формування клітинних сфероїдів.....	33
1.1.3 Структура та метаболізм клітинних сфероїдів.....	35
1.1.4 Переваги та недоліки 2D та 3D-культивування клітин.....	37
1.1.5 Методи отримання сфероїдів.....	40
1.1.6 Вплив посівної концентрації на формування життєздатних сфероїдів.....	44
1.2 Кріоконсервування сфероїдів.....	46
1.3 Вплив коефіцієнтів проникності кріопротекторів і параметрів масопереносу на осмотичну поведінку клітин на етапах кріоконсервування.....	52
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	60
2.1 Загальні положення.....	60
2.2 Культури клітин.....	60
2.3 Загальний дизайн дослідження.....	61
2.4 Пасаж культури клітин.....	62
2.5 Отримання клітинних сфероїдів.....	62
2.6 Оцінка параметрів сфероїдоутворення.....	62
2.7 Оцінка спектру низькомолекулярних речовин білково – пептидної природи.....	63
2.8 Визначення об’ємних змін поодиноких клітин та СФ у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО.....	63

	20
2.9 Визначення параметрів проникності для клітин у зовнішньому і внутрішньому шарах сфероїдів і сфероїдах in toto.....	66
2.10 Осмотично неактивний об'єм СФ.....	67
2.11 Прогнозування осмотичної поведінки СФ при заморожуванні з різними швидкостями охолодження	68
2.12 Кріоконсервування СФ.....	70
2.13 Визначення життєздатності клітин у складі СФ.....	71
2.14 Оцінка параметрів функціональної активності СФ підданих різним режимам кріоконсервування.....	72
2.14.1 Оцінка здатності клітин до проліферації та міграції у тесті «подряпина».....	72
2.14.2 Визначення здатності СФ до адгезії.....	73
2.14.3 Здатність клітин СФ до міграції.....	73
2.14.4 Визначення метаболічної активності клітин СФ за МТТ-тестом.....	73
2.15 Статистична обробка отриманих результатів.....	74
РОЗДІЛ 3 МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН ЛІНІЇ L929 У ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ПОСІВНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ	75
3.1 Вплив умов культивування на морфологічні особливості культури клітин лінії L929.....	76
3.2 Вплив посівної концентрації клітин лінії L 929 на діаметр СФ протягом культивування.....	81
3.3 Дослідження секреторних характеристик клітин лінії L929 при культивуванні у вигляді моношару та сфероїдів.....	89
РОЗДІЛ 4 ТЕОРЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ КУЛЬТИВУВАННЯ.....	95
4.1. Динаміка проникання молекул води і диметилсульфоксиду у поодинокі клітини лінії L929 та утворені з них сфероїди.....	95

4.2 Визначення параметрів проникності для клітинних сфероїдів у залежності від термінів культивування.....	100
РОЗДІЛ 5 ВИВЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СФЕРОЇДІВ ЗА РІЗНИМИ РЕЖИМАМИ.....	117
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	126
ВИСНОВКИ.....	134
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	138
Додаток А.....	160
Додаток Б.....	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДМСО – диметилсульфоксид

E_A – енергія активації

ЕТС – ембріональна теляча сироватка

МСК - мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини

ПКМ –позаклітинний матрикс

НК – нейрональні клітини

НЧ – наночастинки

T – температура

C – концентрація речовини

СФ – сфероїд

ФТС – фетальна теляча сироватка

DMEM/F12 (англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12) – середовище Ігла у модифікації Дюльбекко з додаванням поживної суміші Ham's F-12

k_p – коефіцієнт проникності для кріопротектору

L_p – коефіцієнт фільтрації

МТТ – (3 - [4,5 - діметілтіазол-2-іл] -2,5 - діфенілтетразоліум бромід)

PBS – фосфатно-сольовий буфер

PI – пропідіум йодид

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Тривимірні (3D) культуральні системи є унікальною платформою для вивчення складних біологічних процесів *in vitro*, зокрема, проліферації, диференціювання, та різних функцій клітин. Унікальність 3D-об'єктів полягає у збереженні тривимірної організації, характерної для тканин цілісного організму [1–5]. Тому за останні десятиліття було здійснено численні спроби розробки підходів об'ємного культивування клітин різних органів, а також їх використання як тест-систем для вивчення цитотоксичності, ефективності дії фармакологічних препаратів, одержання стовбурових клітин, лікування низки захворювань тощо.

Важливим етапом у реалізації клітинних технологій є розроблення способів кріоконсервування для створення низькотемпературних банків біоматеріалу, які дозволяють економити час та реактиви, необхідні для постійного підтримання культур, запобігання їх втрат через фенотиповий дрейф та старіння і можливості сертифікувати культури та використовувати за запитом для наукових або практичних цілей.

На сьогодні існує вкрай мало досліджень із кріоконсервування багатоклітинних об'єктів. Наразі існують роботи, в яких сфероїди (СФ) різного походження заморожували зі швидкостями охолодження 1°C/хв або нижче у присутності 5–30% кріопротектору диметилсульфоксиду (ДМСО) з додаванням сироватки крові або без додавання [6–9]. При цьому вибір концентрації ДМСО та швидкості охолодження у цих роботах був емпіричним: без розуміння ролі проникності мембран клітин у складі СФ для молекул води і ДМСО, а також процесів масообміну між клітинами і середовищем на всіх етапах кріоконсервування.

Наявні протоколи кріоконсервування клітинних суспензій (поодинокі клітин) не вирішують проблеми щодо їх кріочутливості у складі багатоклітинних сфероїдів, які мають тривимірну структурну організацію і

складні міжклітинні взаємодії. Тому для розроблення оптимальних способів заморожування СФ потрібен ґрунтовний підхід, а саме дослідження осмотичної поведінки багатоклітинних об'єктів на різних етапах кріоконсервування. Зневоднення і насичення біологічних об'єктів захисними речовинами є важливими процесам на етапі охолодження під час кріоконсервування. Коефіцієнти проникності плазматичної мембрани для води та кріопротектору визначають часові характеристики масопереносу крізь клітинні мембрани, а отже, і ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації, яка впливає на виживання/загибель клітин [10]. Оскільки структурна організація СФ є складнішою порівняно з структурною організацією ізольованих клітин, то параметри дифузії сполук, зокрема, кріопротекторів і молекул води, у СФ будуть відрізнятися від таких для клітинної суспензії.

На теперішній час існує теоретичний підхід на основі фізико-математичної моделі для визначення оптимальних параметрів кріоконсервування поодиноких клітин, заснований на результатах дослідження із осмотичної поведінки у кріозахисному середовищі та під час охолодження, він дозволяє визначити оптимальні умови для кріоконсервування клітин різного походження [10–12]. У представлений роботі вперше запропоновано фізико-математичного моделювання процесів зневоднення, насичення кріопротектором і масопереносу для багатоклітинних сфероїдів на різних термінах культивування. На основі одержаних результатів визначено оптимальні параметри кріоконсервування СФ (час інкубації у кріозахисному середовищі, швидкість і кінцева температура охолодження).

Відомо, що клітини лінії L929 утворюють СФ різного діаметру [7] та можуть підтримуватись в умовах 3D тривалий час. Спираючись на даний факт, клітини лінії L929 були використані у роботі як модельна система для підбору оптимальних умов кріоконсервування СФ.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) в рамках науково-дослідних тем «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (№ 0116U003494, НАН України, 2016–2020 рр.); «Теоретичне та експериментальне дослідження електричних характеристик клітинних мембран на етапах кріоконсервування та їх взаємозв'язку зі здатністю клітин до адгезії на плоских поверхнях та в об'ємних конструкціях», (№ 0121U108756, НАН України, 2021–2025 рр.), «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D- і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребня» (№ 0121U100, НАН України, 2021–2025 рр.).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи — на основі фізико-математичного моделювання процесів зневоднення та проникності кріопротектора ДМСО визначити оптимальний режим кріоконсервування сфероїдів, отриманих із клітин лінії L929 на різних термінах культивування, та оцінити ефективність теоретично визначеного режиму за функціональними показниками сфероїдів після розморожування.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити такі **завдання:**

1. Оцінити вплив посівної концентрації та терміну культивування на кількісні та розмірні характеристики СФ з клітин лінії L929.
2. Визначити чисельні значення осмотично-неактивного об'єму поодиноких клітин та СФ різних термінів культивування (7, 14, 21-ї доби) для подальшого розрахунку коефіцієнтів проникності для молекул води та кріопротектору ДМСО.

3. Визначити оптимальний час експозиції СФ різних термінів культивування (7, 14, 21 доби) у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО при температурах 10, 15 та 25°C.

4. Розрахувати коефіцієнти проникності для молекул води та кріопротектору ДМСО для поодиноких клітин, клітин у внутрішньому і зовнішньому шарах СФ, а також СФ різних термінів культивування (7, 14, 21 доби).

5. З'ясувати вплив температури кріозахисного розчину (10, 15 та 25°C) на коефіцієнти проникності і значення енергії активації для проникнення молекул води та кріопротектору ДМСО у СФ різних термінів культивування (7, 14, 21 доби).

6. Визначити на підставі досліджених параметрів (відносний осмотично-неактивний об'єм, коефіцієнти проникності для молекул води та ДМСО, енергія активації) оптимальну швидкість і кінцеву температуру охолодження до занурення в рідкий азот (-196°C) для СФ різних термінів культивування (7, 14, 21 доби).

7. Оцінити ефективність отриманого режиму кріоконсервування за функціональними показниками СФ (МТТ-тест, здатність СФ до адгезії, мігаторно-проліферативна активність клітин у складі СФ) після розморожування.

Об'єкт дослідження — процеси зневоднення та насичення кріопротектором ДМСО поодиноких клітин лінії L929, а також клітин цієї лінії у складі СФ, у залежності від температури кріозахисного середовища, локалізації у шарах СФ, терміну культивування СФ.

Предмет дослідження — морфофункціональні характеристики клітинних СФ, отриманих з клітин лінії L929 на різних термінах культивування, після інкубації у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО при різних температурах та кріоконсервування за різними режимами.

Методи дослідження. У роботі були використані методи моношарового (2D) і об'ємного (3D) культивування, кріоконсервування,

фізико-математичний аналіз, світлова, конфокальна та флуоресцентна мікроскопія, спектрофотометрія, морфометричний аналіз, гель-проникаюча хроматографія, визначення здатності сфероїдів до адгезії та проліферативної активності клітин, метод «подряпини», МТТ-тест, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів

Уперше встановлено підвищення метаболічної, міграторно-проліферативної та секреторної активності клітин лінії L929 за умов 3D-культивування (сфероїди) порівняно з 2D-культивуванням (моношар). *Уперше* проведено аналіз осмотичної поведінки СФ, отриманих з клітин лінії L929 на різних термінах культивування (7, 14 та 21 доби), під час експозиції у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО за різних температур (10, 15 та 25°C). *Уперше* шляхом фізико-математичного моделювання розраховано коефіцієнти проникності для молекул води та ДМСО, осмотично-неактивний об'єм та значення енергії активації для СФ різних термінів культивування за вищевказаних температур. *Уперше* шляхом фізико-математичного моделювання встановлено відмінності коефіцієнтів проникності для молекул води і ДМСО у клітини зовнішнього та внутрішнього шарів СФ. *Уперше* встановлено залежність коефіцієнтів проникності для ДМСО і води та оптимального часу насичення СФ у кріозахисному середовищі від терміну їх культивування та температури кріозахисного середовища. *Уперше* доведено ефективність розробленого на основі фізико-математичного моделювання підходу для оптимізації режиму кріоконсервування клітинних СФ, який включає визначення часу експозиції у захисному середовищі, швидкості та кінцевої температури охолодження під час заморожування. Ефективність теоретично визначеного режиму кріоконсервування СФ з клітин лінії L929 було підтверджено експериментально у порівнянні зі стандартними режимами.

Практичне значення отриманих результатів

Запропонований у роботі алгоритм визначення оптимальних режимів охолодження СФ на основі фізико-математичних розрахунків дозволить визначити оптимальні режими кріоконсервування для багатоклітинних об'єктів, які мають форму наближену до сферичної, за різних системних параметрів (тип клітин, термін культивування, температура кріозахисного середовища). За розрахованими у роботі параметрами проникності СФ різних термінів культивування для води та кріопротектору визначені оптимальні терміни, на яких доцільно проводити консервування, що підвищить ефективність використання СФ у галузі біології, медицини та фармакології.

Отримані результати щодо впливу локалізації клітин у СФ, температури інкубаційного середовища, термінів культивування СФ на параметри масообміну речовин є підґрунтям для розробки підходів до насичення багатоклітинних об'єктів, зокрема пухлинних СФ препаратами протипухлинної дії.

Теоретично розраховані та практично отримані у роботі дані можуть бути використані для читання курсів лекцій і проведення практичних занять для студентів вищих навчальних закладів біологічного, медичного та біофізичного профілю.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено патентний та інформаційний пошук, проаналізовано джерела літератури за темою дисертаційної роботи, написано всі розділи дисертації. За допомогою наукового керівника здобувачем визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримано експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистичну обробку та зроблено попередні висновки. Спільно з науковим керівником автором були інтерпретовані результати та зроблені остаточні висновки. Здобувачем спільно з к.б.н. Коваленком І. Ф. проведені дослідження з використанням флуоресцентної і конфокальної мікроскопії, спільно з д. фіз.-мат. наук проф. Гордієнко О.І. проведено аналіз отриманих параметрів проникності за фізико-математичними розрахунками.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [14, 15, 20, 21] у отриманні СФ з клітин L929 за різних посівних концентрацій, визначенні життєздатності, міграторної та проліферативної активності, порівняльному аналізі функціонального потенціалу 3D- та 2D-культур, аналізі результатів та формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботі [19] у аналізі результатів щодо впливу різних посівних концентрацій на життєздатність, проліферативні та адгезивні властивості СФ, визначенні діаметру СФ на різних термінах культивування, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [16, 17, 22, 23, 24, 25, 26] у отриманні клітинних СФ на різних термінах культивування, експериментальних дослідженнях щодо визначення об'ємних змін поодиноких клітин і СФ у кріозахисному середовищі, обговоренні і узагальненні результатів дослідження динаміки проникання ДМСО і молекул води у поодинокі клітини і сфероїди та значень енергії активації у залежності від термінів культивування і температур кріозахисного середовища, інтерпретації визначених у роботі оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів, статистичній обробці результатів та підготовці матеріалів до друку.
- у роботах [18, 27, 28] у вивченні ефективності теоретично визначеного режиму кріоконсервування СФ, оцінці структурно-функціонального стану деконсервованих СФ (здатність СФ до адгезії та клітин у їх складі до міграції та проліферації), аналізі результатів та формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

Апробація роботи. матеріалів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченій 25-річному ювілею НАМН України та Дню науки «Профілактична медицина сьогодні: внесок молодих спеціалістів» (Харків, 2018); 6-му Українському конгресі з клітинної біології

з міжнародною участю (Яремча, 2019); науково-практичній конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченій Дню науки «Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення» (Харків, 2020); 1-й Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасна наука: проблеми та інновації» (Стокгольм, 2020); конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (Харків, 2021); конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченій Дню науки «Наукові дослідження та інновації в медицині: актуальні питання, відкриття і досягнення» (Харків, 2021); конференції CRYO 2021 58-th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (Чикаго, 2021), VII Міжнародній науково-практичній конференції «Topical issues of modern science, society and education» (Харків, 2022); конференції CRYO 2021 Joint Meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology (Дублін, 2022).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 робіт, з них 5 статей у фахових виданнях України (2 – входять у міжнародну наукометричну базу Scopus), 1 корисна модель, 9 публікацій у збірках тез конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 163 сторінках друкованого тексту й складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, три розділи результатів досліджень, узагальнення та обговорення результатів, висновки, список використаних джерел, додатки. Список використаних джерел включає 178 найменувань, розміщених на 22 сторінках. Робота проілюстрована 14 рисунками, 13 мікрофотографіями та 9 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Тривимірне культивування клітин

1.1.1 Короткий історичний огляд технологій 3D-культивування

Тенденції останніх років в медико-біологічних дослідженнях вказують на переваги культивування клітин в тривимірних умовах [2–5, 13]. Сучасна біологія і медицина переживає «бум» 3D-технологій вирощування тканиноподібних мініструктур, зокрема клітинних СФ. Така увага пояснюється тим, що СФ імітують архітектурні та функціональні характеристики нативних тканин. Більшість клітин в організмі людини взаємодіють із сусідніми клітинами та компонентами позаклітинного матриксу (ПКМ), ці взаємодії утворюють складну комунікаційну мережу біохімічних та механічних сигналів, яку не можна відтворити в 2D-форматі [4, 5, 29–33].

Тому для зменшення відриву між експериментальними даними, які отримуються на моношарових культурах, від реально існуючих у тканині взаємозв'язків за останні два десятиліття були зроблені численні спроби для розробки тривимірних клітинних моделей [33]. На теперішній час існує кілька типів клітинних 3-D моделей. Однією з таких моделей, яка найбільше нагадує нативні тканини, є органотипові експланти – невеликі фрагменти тканини, які підтримуються *in vitro* в умовах культивування. Проте така модель має ряд недоліків. По-перше, високодиференційовані клітини у центрі фрагменту відчувають брак поживних речовин та кисню, оскільки відсутнє їх постачання через кровотік. У зв'язку з цим, органотипову культуру неможливо підтримувати тривалий час. По-друге, під час культивування у фрагментах відбуваються зміни субпопуляційного складу (частина клітин може мігрувати з експланту, частина – відмирати тощо), що є

випадковим процесом. Все це унеможливило стандартизацію такої культури та знижує відтворюваність отриманих експериментальних результатів. З огляду на ці проблеми, клітинні СФ є корисною альтернативою тканинним експлантатам. У порівнянні з моношаровими культурами СФ демонструють досить близьку подібність до реальних тканин і тому останнім часом вони здобувають все більшого визнання в біомедицині.

Феномен сфероїдоутворення вперше був досліджений Хольтфретером при культивуванні ембріонів амфібій. Пізніше було встановлено, що клітини пухлин при культивуванні *in vitro* теж формують СФ. Потім було виявлено, що клітини, виділені з різних органів шляхом дезагрегації, також мають здатність до формування СФ [34]. А. Каррель першим показав, що експлантанти серця та інших органів здатні не тільки переживати в культурі кілька місяців, але і зберігати фізіологічні функції (ритмічні скорочення) [35]. З цієї причини А. Каррель зосередився на вирощуванні 3-D «гісто-культур». У 50-х роках минулого століття J. Leighton розробив технологію 3D-великопористого матриксу для тривалого вирощування клітин. На штучному губчатому матеріалі J. Leighton не тільки навчився вирощувати багато соматичних ліній клітин, але і перший показав, що ракові лінії клітин на матриксі формували клітинні агрегати (на відміну від нормальних клітин) [35].

Міжклітинні взаємодії в ранньому ембріогенезі описані у роботах А. Москоне. Вони присвячені селективній самоагрегації зародкових клітин на базі високоафінної спорідненості поверхневих лігандів і комплементарних рецепторів [36]. Ідеї А. Москоне були далі розвинені М. Стейнбергом в концепції морфогенезу органів і тканин, заснованого на регіональній диференціальній адгезії клітин. Стейнберг М. отримав комплексні агрегати клітин сітківки та хондрогенного зачатку кінцівки ембріона ссавців [37]. На початку 60-х років минулого століття П. Вайс «побудував перший експериментальний міст» між 2D та 3D-культурами в лабораторних умовах, застосувавши в якості матриксу біоіндуктивні пористі матеріали. Почалася

ера лабораторної тканинної інженерії. Пористий біоматеріал служив просторовою матрицею для організованого заселення, міграції та диференціювання клітинних прогеніторів. Найчастіше створення «лабораторної тканини» йшло в обхід ембріогенезу та органогенезу.

На сучасному етапі розвитку в останні два десятиліття бурхливо розвивається концепція СФ як серійно повторюваних клітинних модулів, що відтворюють і накопичують ключові події ембріогенезу [38, 39]. Тому останнім часом здобувають все більшого визнання в біомедицині СФ, отримані з кардіоміоцитів, які б'ються у серцеподібному ритмі; гепатоцитів, що підтримують основні печінкові функції; ендотеліоцитів, що васкуляризують мікротканини фібробластів [39–41]. Сфероїдна форма є найбільш підходящою моделлю для дослідження раку [42] та скринінгу ліків [13], а також для використання в регенеративній медицині у сфері новітніх технологій 3D-принтингу [38]. Було виявлено, що СФ мезенхімальних стовбурових клітин мають більший регенеративний та протизапальний потенціал, а також кращий показник виживання після трансплантації порівняно зі своїми 2D-аналогами [43].

1.1.2 Закономірності формування клітинних сфероїдів

Поняття «клітинний сфероїд» трактується багатьма авторами по-різному та неоднозначно. У деяких наукових джерелах автори називають багатоклітинні сферичні утворення агрегатами, мультіклітинними сфероїдами або цитосферами [34, 44, 46, 47]. Автори [34] дають визначення СФ з пухлинних клітин як багатоклітинної тривимірної структури, клітини якої спіралеподібно орієнтовані за годинниковою стрілкою навколо центру в 10-12 рядів.

Клітини на периферії СФ розташовані відносно вільно, тоді як в його центрі вони скомпоновані досить щільно [34, 41, 45–47]. У роботі [6] СФ

описані як самоорганізовані сферичні кластери-колонії з тканиноподібною архітектурою.

Більшість авторів характеризує СФ як агрегати клітин, які мають складну міжклітинну адгезію та міжклітинну взаємодію, що призводить до утворення градієнтів поживних речовин, газів, факторів росту та сигнальних молекул. Ця структура практично відтворює клітинні взаємозв'язки та мікрооточення, які спостерігаються в нативних тканинах [5]. Багато типів клітин, які традиційно культивувалися у вигляді моношару, були адаптовані для 3D-сфероїдних систем, наприклад, багаточисельні пухлинні сфероїди, нейросфери, маммосфери, гепатосфери, ембріоїдні тільця.

У роботі [33] охарактеризовано основні етапи сфероїдоутворення. Формування СФ включає три етапи: спочатку ізольовані клітини, притягаючи одна одну, утворюють пухкі агрегати різної форми. Прямий фізичний контакт між клітинами призводить до підвищеної експресії молекул міжклітинної адгезії, зокрема кадгеринів. Вони накопичуються на поверхні мембран клітин, після чого клітини починають формувати біологічні клітинні контакти (junctions), що приводить до ущільнення агрегатів та набуття ними округлої форми [33].

Для різних видів клітин тип і концентрація кадгеринів можуть відрізнятися [47–51]. Білки міжклітинної адгезії, такі як конексин та панексин, які впливають на міжклітинні контакти, сприяють утворенню СФ. Також важливу роль грає цитоскелет клітин, які входять до складу СФ, оскільки він зберігає стабільність багатоклітинної структури протягом сфероїдоутворення [33].

Потрібно відзначити, що механізми формування СФ також залежать від умов культивування. Наприклад, за умов так званої scaffold-based технології, СФ утворюються завдяки штучному ПКМ, який надає фізичну підтримку клітинам для прикріплення та реорганізації в тривимірні структури. ПКМ може секретувати розчинні фактори росту, гормони та інші компоненти, які

можуть впливати на ріст, проліферацію та диференціювання клітин, експресію генів і білків у них.

Інший механізм лежить в основі, так званої, технології сфероїдоутворення шляхом самозбірки клітин (self-assembly scaffold-free). У цьому процесі клітини виділяють власні компоненти ПКМ, що точніше відтворює події, які відбуваються під час ембріогенезу, морфогенезу та органогенезу *in vivo* [47, 52, 53]. На відміну від scaffold-based технології, де у формуванні СФ приймають участь практично усі клітини (високодиференційовані також), це дозволяє селектувати стовбурові/прогеніторні клітини, здатні до утворення клітинних колоній. Для вивчення експресії генів або чутливості пухлинних СФ до ліків зазвичай використовують методи самозбірки СФ, щоб уникнути впливу штучного ПКМ на їхні біологічні властивості [3, 33].

1.1.3 Структура та метаболізм клітинних сфероїдів

У роботі [33] було показано, що у структурі СФ умовно виділяють три зони: зовнішню – зону проліферативних і міграційних процесів; середню – зону клітин у стані спокою; внутрішню – зону некротичних клітин. Таким чином, клітинні шари у СФ визначаються через градієнти поживних речовин та кисню, які встановлюються внаслідок обмеженої дифузії ззовні до центру СФ. Тобто клітини зовнішнього шару СФ мають у достатку кисень, поживні компоненти та фактори росту із середовища, що пояснює активні процеси проліферації в даному шарі. У середньому шарі обмежена дифузія речовин змушує клітини переходити у фазу G_0 клітинного циклу. У внутрішній зоні великих СФ (> 500 мкм) дефіцит кисню викликає змінену експресію генів за рахунок стабілізації фактора транскрипції HIF-1 α , що запускає ефект Варбурга, сприяючи анаеробному гліколізу та виробництву молочної кислоти, тим самим знижуючи рН внутрішнього шару СФ [3, 34]. Нестача

поживних речовин і кисню, разом із накопиченням метаболічних відходів, викликає некротичну смерть клітин у внутрішньому шарі [33, 53].

Проте потрібно відзначити, що така уява про структуру СФ та проліферативно-метаболічний стан клітин у їхньому складі досить умовна. З'являються дані про те, що у деяких великорозмірних СФ не спостерігається некротичної зони. Наприклад, у дослідженні Takezawa T. та співавторів, СФ діаметром близько 600 мкм, отримані з фібробластів шкіри людини, містили живі клітини у центральній області [54]. У різних шарах СФ, отриманих із зірчастих клітин печінки, спостерігалися різноспрямовані зміни експресії генів та, відповідно, метаболічного профілю [55]. Знижувалася експресія α -актину гладеньких м'язів (α -SMA), пригнічуючи проліферацію; відбувалися зміни метаболізму глюкози, включаючи шлях глутатіону; спостерігалось збільшення синтезу ліпідів. У СФ зі стовбурових клітин, отриманих зі жирової клітковини (hADSCs), низька життєздатність клітин могла бути покращена за допомогою підвищення рівню глюкози у живильному середовищі, але не завдяки підвищенню доступності кисню [56].

У СФ, отриманих з клітин лінії шлунково-кишкових клітин райдужної форелі RTgutGC, споживання кисню та розмір центральної некротичної зони залежав від вихідної посівної концентрації клітин [57]. При використанні оптимальної концентрації на 14 добу культивування гіпоксична зона СФ навіть зменшувалася порівняно з 7 добою.

Отже, як показують сучасні дослідження, метаболічний профіль у СФ різного клітинного складу може змінюватися нерівнозначно. Багато в чому він залежить від типу клітин, з яких складається СФ, та їх індивідуальних особливостей (чутливості до гіпоксії, активності метаболізму тощо). Це стосується і питань процесів злиття клітин різного походження. Так, в роботі [5] автори порівнювали злиття гомотипічних СФ з двох типів клітин міокарду (міоцитів і фібробластів) та гетеротипічних СФ (зі змішаним складом клітин) з метою наближення до гетеротипової міжклітинної взаємодії у міокарді в умовах *in vivo*. Результати проведених досліджень

довели, що гомотипічні пари СФ, утворені з фібробластів, зливалися у 1,7 рази швидше, ніж пари СФ, утворені з міоцитів, але повільніше, ніж пари зі змішаним складом клітин.

У дослідженнях [1] було з'ясовано вплив міжклітинного матриксу на метаболічні показники сфероїдів, утворених з мезенхимальних стовбурових клітин (МСК). Автори зробили припущення що включення клітинно-секретованого позаклітинного матриксу (ПКМ) до культурального середовища під час агрегації сфероїдів буде посилювати остеогенний потенціал МСК шляхом стимулювання клітинно-матриксних і клітинно-клітинних взаємодій. Результати проведених досліджень встановили, що сформовані СФ з додаванням ПКМ мали більш високий вміст колагену та глікозаміногліканів, а МСК проявляли підвищену механочутливість до ПКМ за рахунок активації Yes-асоційованого білка (YAP) за допомогою інтегрину $\alpha 2 \beta 1$. Також СФ з додаванням до середовища ПКМ зберігали більш активний функціональний потенціал (проліферацію МСК) та виявляли більшу чутливість до розчинних сигналів стосовно диференціації клітин порівняно зі СФ без додавання ПКМ або додаванням колагену. Інкапсуляція сфероїдів, сформованих у культуральному середовищі з ПКМ, в альгінатному гелі призводила до злиття сфероїдів і посилення остеогенної диференціації клітин [1].

1.1.4 Переваги та недоліки 2D- та 3D-культивування клітин

Питанням щодо особливостей і переваг культивування клітин у 3D-форматі (у вигляді СФ) у порівнянні з 2D-культурами присвячена велика кількість робіт [2–5, 46, 59–61]. Клітини моношарової культури контактують одна з одною тільки в одній площині, що є відмінним від умов цілісного організму та впливає на експресію відповідного клітинного фенотипу [2, 33, 46, 58]. На відміну від цього, 3D-культура реалізує наближені до фізіологічних взаємодії клітина-клітина та клітина-матрикс [2–4],

забезпечуючи подібне до природного фізико-хімічне середовище *in vivo*; підтримує фенотипічні властивості клітин; сприяє експресії маркерів «стовбуровості»; полегшує секрецію цитокінів, хемокінів та інших факторів росту; покращує життєздатність та проліферацію клітин.

В дослідженнях [11, 59] було доведено, що тривимірне культивування клітин покращує їх функціональний потенціал порівняно з моношаровим. Зокрема, гепатоцити у СФ демонструють вищу життєздатність клітин і здатність до детоксикації, ніж гепатоцити моношарових культур [60, 61]. Саме тому в роботі [62] автори рекомендують використовувати у апараті штучної печінки (BAL) гепатоцитарні СФ, а не поодинокі гепатоцити. При дослідженні синтезу колагену клітинами, отриманими зі СФ клітин лінії ретинобластоми (RB)Y79, було показано, що після культивування деконсервованих СФ протягом п'яти діб кількість синтезованого колагену на 1×10^6 клітин складала $59,8 \pm 1,2$ мкг, що значуще перевищувало вміст колагену при моношаровому культивуванні [63].

Особливу увагу привертають дослідження щодо пластичності фенотипу і потенціалу клітин в умовах тривимірного культивування порівняно з моношаровим. Так, автори [2] повідомили, що окрім покращених ангіогенних та протизапальних/імуномодуючих властивостей, агрегація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) у 3D-сфероїди істотно впливає на характеристики стовбуровості клітин порівняно з моношаровими культурами. Також МСК у складі сфероїдів показали підвищену здатність до диференціювання в нервові та печінкові клітини [2]. В дослідженнях [45] було доведено, що первинні остеобласти людини похилого віку у 3D-культурі володіли значно вищим рівнем експресії генів OPG, Col1 і OP порівняно з 2D-культурою.

В роботі [64] аналізували причини, які впливають на відмінності культивування клітин у моношарі і 3D-культурі. Основні відмінності автори пояснили тим, що клітини в моношарі мають необмежений доступ до інгредієнтів середовища, таких як кисень, поживні речовини, метаболіти та

сигнальні молекули, яких суттєво не вистачає в умовах 3D-культивування. Саме такі розбіжності, на думку авторів, призводять до різної реакції клітин в моношарі і об'ємному культивуванні щодо стійкості клітин до впливу різних негативних процесів, таких як апоптоз і токсична дія [64]. Так, у роботі [65] були встановлені значно менші ознаки апоптозу мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини у тривимірному форматі порівняно з моношаровим. В роботі [63] була досліджена стійкість 3D-культури до токсичного впливу наночастинок (НЧ), які в останні десятиліття використовують для доставки ліків при різних патологіях, зокрема терапії раку [66–69]. Доведено, що токсичний ефект НЧ значно знижується (від 5 до 20 разів) при культивуванні клітин у тривимірному форматі у порівнянні з монокультурами [63], що узгоджується з результатами роботи Lee зі співав., де показано, що кількість нежиттєздатних клітин після токсичного впливу НЧ золота у моношарі була значно більшою у порівнянні з 3D-культурою [68].

Також однією з вагомих переваг тривимірних систем є більш тривалий порівняно з монокультурами термін їхнього існування протягом культивування у життєздатному стані [69, 70].

Однак, незважаючи на вищевказані переваги тривимірних об'єктів, аналіз літератури продемонстрував, що не можна повністю виключати моношарове культивування клітин. Однією з найбільш важливих переваг 2D-культивування є можливість великомасштабного (large-scale) тестування ліків за короткий час. Також, саме моношарові культури є більш ефективними в дослідженнях цитотоксичності та антимікобактеріальної активності препарату. Крім того, моношарові культури є зручним об'єктом для дослідження такого параметру як здібність клітин в культурі до міграції. Зокрема, для вивчення даного параметру для окремих клітин (у разі фібробластів), або колективної міграції (у разі епітеліального пласту клітин) в клітинній біології використовують тест «загоєння подряпини» (scratch assay) [71].

Беручи до уваги все вищесказане, тривимірні культури можуть краще відтворювати клітинні відповіді на медикаментозне лікування та мають потенціал для того, щоб стати чудовою платформою для нового розвитку і пошуку лікарських засобів. Тому існує велика потреба в створенні нових моделей та методів *in vitro* аналізу на 3D-культурах. Оскільки сучасні клітинні технології широко використовують кріоконсервування для тривалого зберігання клітинних культур, розробка та оптимізація режимів кріоконсервування СФ є актуальними.

1.1.5 Методи отримання сфероїдів

За останні три десятиліття для отримання клітин у 3D форматі використовують методи так званої безкаркасної та каркасної біоінженерії, у кожному методі є свої позитивні та негативні сторони. До безкаркасних методів відносять: ротаційне культивування, культивування клітин у «висячих краплях», на неадгезивних поверхнях та ін. [3, 33]. До переваг безкаркасної технології відносять: 1) обмеження виділення шкідливих побічних продуктів; 2) біоконструювання тканин без скафолдів дозволяє уникнути проблем цитотоксичності; 3) зниження ймовірності розвитку імунної відповіді на чужорідні матеріали [33].

До безкаркасних технологій відноситься метод пелетної культури (*pellet culture*). В основі методу лежить концентрування клітин за рахунок центрифугування та використання неадгезивної поверхні культивування [72]. Клітинно-клітинна адгезія при цьому максимізується за рахунок злипання або наближення клітин у осаді після центрифугування.

У статичній суспензійній культурі (*static suspension culture*) використовується принцип зниженої адгезії поверхні культивування. Оскільки прикріплення клітин пригнічується, вони спонтанно утворюють СФ [4, 73, 74]. Неадгезивна поверхня зазвичай складається з агару або агарозного гелю. Агароза є дуже ефективним матеріалом для інгібування прикріплення

клітин і перевершує агар за своїми неадгезивними властивостями. Потрібно відзначити, що «статичною» ця культура називається умовно, оскільки незначне перемішування в ній все ж таки існує за рахунок конвекційних потоків у рідині при температурних змінах, а також при заміні живильного середовища.

Техніка культивування у висячій краплі – технологія тривимірного культивування на основі використання переваг самоагрегації клітин у сфероїди, що утворюються внаслідок одночасної дії поверхневого натягу та сили тяжіння [39, 53, 75]. Головною перевагою методу є можливість отримувати СФ приблизно однакового розміру. Коефіцієнт варіації розміру СФ, утворених за цим методом, складає від 10 до 15%, тоді як при формуванні СФ на неадгезивній поверхні – від 40 до 60% [76]. Оскільки клітини природнім способом з'єднуються один з одним, цей метод не потребує штучних каркасів, але він обмежений малими об'ємами при пипетуванні на поверхню (до 50 мкл) та відсутністю можливості зміни середовища, що перешкоджає культивуванню клітин протягом більш 3 діб без переносу на іншу платформу [70]. Техніка висячої краплі зручна при тестуванні токсичності хімічних речовин та ліків, але для великомасштабного культивування не підходить [53]. Крім того, нестабільність крапель під час формування сфероїду залишається невирішеною проблемою.

Техніка спінерного культивування (Spinner culture) та техніка ротаційного культивування (Rotating wall vessel) засновані на безперервному перемішуванні суспензії клітин у біореакторах або системах для культивування. У першому випадку клітини перебувають у постійному перемішуванні за рахунок використання міксерних насадок. У другому випадку реконструюється мікрогравітація шляхом постійного кругового обертання культурального флакону. Було встановлено, що мікрогравітація має неабиякий вплив на експресію клітинних генів. В умовах мікрогравітації експресія хондрогенних і остеогенних генів стовбурових клітин знижується,

тоді як експресія адипогенних генів підвищується [77]. Мікрогравітація покращує внутрішньоклітинне накопичення ліпідів та пригнічує експресію колагену I гена остеобластного маркера та сигнального шляху інтегрин/колаген I під час остеобластної диференціації, а також розвиток стресових волокон [78].

Мікрофлюїдна технологія (microfluidic culture technique) інтегрує кілька процесів, включаючи накопичування клітин, змішування та культивування клітин. Це наука та технологія систем, які обробляють або маніпулюють невеликими кількостями рідин та частинок у каналах з розмірами від десятків до сотень мікрометрів [79]. Мікрофлюїдні пристрої використовують матеріали, проникні для кисню та факторів росту, що впливають на проліферацію клітин. Через свій невеликий масштаб мікрофлюїдика має конкурентні переваги в порівнянні з традиційними підходами, такі як нижча витрата реагентів і відходів, підвищена ефективність реакції, скорочення часу аналізу, спрощені процедури та висока портативність [79]. Крім того, існують різні сили, такі як гідродинамічна електрокінетична, акустична, магнітна, відцентрова та капілярна сила, які доступні для маніпулювання мікрочастинками або біологічними об'єктами [79].

Культивування на основі магнітної левітації (magnetic levitation-based culturing) передбачає використання магнітних частинок та інтеграцію з гідрогелями відповідно до заданих умов. У системі магнітної левітації клітини змішуються з магнітними частинками і піддаються впливу магнітної сили під час культивування [80]. У цій системі використовується негативний магнітофорез, який може імітувати стан невагомості. Завдяки магнітній силі клітини, об'єднані магнітними частинками, залишаються левітованими проти сили тяжіння. Ця умова сприяє контакту між клітинами, що призводить до їх агрегації та формування СФ.

Також одним із перспективних та багатообіцяючих методів тканинної інженерії є каркасна біоінженерія. У якості позаклітинних каркасів використовуються гідрогелі, біоплівки, мікро- та наночастинки. Наприклад

інкапсуляція клітин у гранули, що виготовлені з різних матеріалів природного походження (альгінат, фібрин) та синтетичного походження (модифікованих форм гіалуронової кислоти, поліетиленгліколю, тощо) [33]. Основними вимогами, що висуваються до матеріалів які використовують для інкапсуляції клітин, є їхня біосумісність, проникність (безперешкодна дифузія необхідних поживних речовин та продуктів секреції), можливість стерилізації, тривала біологічна стійкість, відсутність токсичних хімічних компонентів та можливість формування тривимірних структур за фізіологічних умов [33, 81-84].

Однак 3D-моделі, створені на каркасах, мають обмеження щодо аналізу життєздатності і функціональної повноцінності клітин через обмежені можливості їхнього вилучення із сфероїдів і контролю умов культивування [85].

Тому, одним з перспективних методів тканинної інженерії, є індукція самозборки багатоклітинних об'єктів який призводить до формування функціональної тканини завдяки міжклітинним взаємодіям [86, 87].

Крім того, в дослідженнях [75] була доведена успішна стратегія отримання сфероїдів при використанні декількох клітинних ліній. Наприклад, різні клітини, у тому числі ендотеліальні клітини (ЕК), кератиноцити дорослої людини (HaCaT) та мезенхімальні стовбурові клітини, культивувалися спільно з гепатоцитами, що призводило до збільшення специфічних для печінки функцій. Зокрема, автори довели, що система яка складається з декілька культур може підвищити складність і надійність сфероїдних моделей для досягнення більш високої точності при тестуванні ліків і трансплантації [75].

1.1.6 Вплив посівної концентрації на формування життєздатних сфероїдів

Одним з головних недоліків тривимірних клітинних культур є зниження дифузії поживних речовин, що обмежує розміри сфероїдних конгломератів. Тому одним з важливих критеріїв для отримання життєздатних СФ є початкова посівна концентрація клітин і умови культивування [34, 88]. Зокрема, в роботі [89] автори виявили, що при формуванні сфероїду з клітин гепатокарциноми С3А на неадгезивній поверхні оптимальною початковою кількістю є 750 клітин в об'ємі 100 мкл середовища. Оскільки такі сфероїди залишались найбільш однорідними за формою з найменшими змінами в розмірах та діаметрі впродовж 32 діб. Зменшення кількості клітин призводило до формування сфероїдів з неоднорідною та нестабільною формою, а збільшення кількості – до створення сфероїдів з великим діаметром та неправильної форми, що призводило до втрати структурної цілісності на 25 добу культивування. Аналіз внутрішньої морфології та розподілу клітин також показав перевагу використання даної концентрації. Зіставляючи дані про ріст клітин, сфероїди з 750 клітин поступово збільшувались у розмірах, але залишались однорідно сферичними з обмеженим ступенем некрозу до 32 доби культивування порівняно з використанням більших концентрацій клітин.

У роботі [90] на клітинній лінії раку шлунку HGC-27 було доведено, що незалежно від посівної концентрації клітин формувались щільні СФ правильної форми однак кінетика збільшення діаметру СФ у часі залежала від посівної концентрації клітин. Розмір сформованих СФ був пропорційний вихідної кількості клітин. Так, при посівній концентрації 300 клітин на лунку діаметр СФ на 4 добу культивування складав 400 мкм [90]. У роботах [44] при використанні нейрональних клітин (НК) в концентраціях менше 1×10^6 кл/мл здатність формувати агрегати знижувалася, а при концентрації менше $0,5 \times 10^6$ клітин/мл утворення агрегатів не відбувалося. У дослідженнях [91]

було з'ясовано вплив посівної концентрації клітин (1×10^5 , 2×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 кл/мл) та сироватки KnockOut™ (0, 5, 10, 15%) на кількість і розмір сформованих СФ зі стовбурових клітин-попередників зубної пульпи людини (DPCs). Кількість і морфологічні параметри СФ оцінювали на 1, 2 і 3 доби культивування. Автори даних досліджень відносили до СФ клітинні агрегати округлої форми і напівпрозорі, діаметр яких перевищував 10 мкм. Результати представлених у роботі досліджень довели, що використання посівної концентрації більше ніж 2×10^5 кл/см² та високих концентрацій сироватки (10–15%) призводило до злиття СФ. На основі проведених досліджень автори зробили висновки щодо оптимальних умов отримання повноцінних СФ: відсоток сироватки у культуральному середовищі не повинен перевищувати 10–15%, а посівна щільність клітин повинна складати $1\text{--}2 \times 10^5$ кл/мл [91].

У роботах [3, 92] також наведені приклади щодо впливу посівної концентрації клітин на формування СФ з різних типів клітин та їх діаметр, що свідчить про специфічність і важливість даного критерію. Так, автори [92], варіюючи кількістю клітин (плюрипотентні кардіоміоцити hiPSC-CM) на сфероїд та враховуючи функціональний аналіз амплітуди зменшення його площі, імуноферментний аналіз білків й дослідження надходження кисню, вказують на принцип оптимальної концентрації клітин для формування сфероїду. Це пов'язано з існуванням двох конкуруючих факторів – зменшення надходження кисню та посилення тривимірної адгезії клітин внаслідок збільшення числа клітин у сфероїді. Отже, враховуючи ці фактори, оптимальна концентрація клітин на один сфероїд максимізує корисні ефекти мікросередовища тривимірних структур.

Підсумовуючи все вищесказане можна зробити висновок, що вибір посівної концентрації клітин за умов 3D-культивування впливає на життєздатність і функціональну повноцінність багатоклітинних об'єктів. Таким чином, при використанні 3D-культивування першочерговим завданням є підбір посівної концентрації клітин для отримання повноцінних для експериментальних досліджень СФ.

1.2 Кріоконсервування сфероїдів

Важливим і актуальним питанням щодо багатоклітинних об'єктів є пошук методів їхнього кріоконсервування, вирішення якого дозволить більш ефективно використання СФ у регенеративній медицині та тканинній інженерії. Тривалий період збереження СФ може застосовуватися як в альтернативній терапії для трансплантації, так і під час розробки нових препаратів. Тому одним із актуальних завдань сучасної науки є розробка способів збереження і консервування багатоклітинних біологічних об'єктів шляхом їхнього глибокого заморожування.

Згідно двофакторній теорії кріоушкодження Мейзура, на життєздатність клітин протягом кристалізації впливає два основні типи явищ, які ініціюють пошкодження клітин протягом охолодження: 1) осмотичне зневоднення клітин, яке призводить до збільшення концентрації внутріклітинних сполук і, як наслідок, ушкодження мембранних структур; 2) утворення позаклітинних кристалів льоду, що призведе до зневоднення клітин і, як наслідок, ушкодженню мембрани [6, 93–96]. Протягом кріоконсервування основні фізико-хімічні процеси, які призводять до ушкодження клітин, є наслідком процесів кристалізації і рекристалізації кристалів льоду у клітині та поза її межами, а також на етапі плавління протягом нагрівання [97–104].

Існуючі на теперішній час дослідження щодо підбору режимів кріоконсервування СФ засновані на емпіричному підході, тоді як ґрунтовний теоретичний підхід відсутній. Експериментально встановлено, що для кріоконсервування СФ доцільно використовувати проникальний кріопротектор ДМСО в концентрації 5–15% [6–9, 13, 105–107]. ДМСО – ендоцелюлярний кріопротектор, механізм дії якого реалізується шляхом зв'язування внутрішньоклітинної води при швидкому проникненні через мембрану. Зв'язування води призводить до зменшення кількості утворення

кристалів льоду, що дозволяє зберегти клітину від осмотичного лізису [105, 107].

Сучасні дослідження показали, що захисна дія кріопротекторів полягає не тільки в перешкоджанні утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду, але й в модифікації клітинної мембрани, що сприяє підвищенню її стійкості до умов кріоконсервування [84]. Так, виявлено, що ДМСО та етиленгліколь модулюють властивості плазматичних мембран клітин HeLa, впливаючи на рухливість ліпідів, що сприяє зменшенню внутрішньоклітинної кристалізації [104].

Відомо, що вміст ДМСО у кріозахисному середовищі по-різному впливає на процес кристалізації в клітинних суспензіях, однак питання щодо підбору оптимального вмісту ДМСО для кріоконсервування СФ вивчено недостатньо. Питання щодо часу насичення багатоклітинних об'єктів кріопротектором ДМСО у кріозахисному середовищі при різних температурах також залишається відкритим.

Відомо, що при концентраціях ДМСО від 10% і вище спостерігається формування гідрофільних пор і дефектів у клітинній мембрані, в багатьох роботах доведено, що підвищення вмісту кріопротектору може призводити до руйнації клітин [6, 105, 108–113]. Наприклад, дані приведені у роботі [105] свідчать про те, що низькі концентрації (5%) ДМСО зменшують товщину мембрани, що, в свою чергу, збільшує її проникність. При зазвичай використовуваних концентраціях (10%) індукується утворення водяних пор в біологічних мембранах. В свою чергу, утворення пор може бути корисним, оскільки внутрішньоклітинну воду легше замінити кріопротекторами, які сприяють вітрифікації. Однак при використанні більш високих, токсичних концентрацій ДМСО (40%) спостерігається руйнування ліпідного бішару клітин.

Тому вибір відповідної концентрації кріопротектору має вирішальне значення щодо структурної цілісності і, відповідно, життєздатності клітин на етапах охолодження і відтавання.

Авторами [114] було також доведено дозозалежний вплив ДМСО на клітинний склад сфероїдів (СФ) отриманих зі спинальних гангліїв новонароджених поросят. Зокрема, після кріоконсервування СФ у присутності 10% ДМСО моношар, сформований клітинами з МС після розморожування, здебільшого складався з фібробластоподібних клітин, тоді як при концентраціях 5 і 7,5% – з клітин периферичної нейроглії [114].

Такі спостереження сприяли пошуку способів мінімізації негативних ефектів шляхом зниження концентрації ДМСО, видалення кріопротектору з кріоконсервованих клітинних трансплантатів перед застосуванням, додавання до складу кріозахисного розчину додаткових захисних компонентів [115]. Так, авторами деяких досліджень встановлено, що додавання до культурального середовища олігосахаридів (сахарози, трегалози та рафінози) [116], гормонів, середовища Університету Віконсина (UW) [6], глюкози, глютаміну, бікарбонату натрію може значно сприяти збереженню життєздатності СФ. Зокрема у роботі [116] було встановлено, що додавання до культурального середовища олігосахаридів у різних концентраціях значно підвищувало кріостійкість мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) при кріоконсервуванні. Однак все не так однозначно, щодо покращення життєздатності клітин при використанні багатоконпонентних кріопротекторних середовищ. Зокрема, в дослідженнях [117] було доведено, що трегалозу (50 мМ) можна використовувати для зниження концентрації ДМСО, тоді як низька концентрація ДМСО (2%) або трегалози (50 мМ) самі по собі недостатні для захисту мікроінкапсульованих МСК від негативного впливу заморожування та відтавання. Так, при використанні 10% ДМСО життєздатність клітин складала (88%), при комбінації обробки МСК трегалозою (50 мМ) і ДМСО (2%) не перевищувала 75%. Обробка клітин лише трегалозою призводила до зменшення їхньої життєздатності до 50%, однак найбільша руйнація клітин спостерігалась при використанні ДМСО у концентрації (2%).

Відомо, що концентрація ФТС як ще одної популярної домішки до кріосередовищ теж суттєво впливає на життєздатність клітин під час кріоконсервування [118]. У роботі [119] було протестоване ряд кріозахисних середовищ з ДМСО у концентрації 5–10% та ФТС у концентрації 25% при кріоконсервуванні СФ. Авторами роботи було доведено, що після кріоконсервування СФ зберігали свою здібність до адгезії, проте даний показник змінювався у залежності від складу середовища та швидкості охолодження. Найкращі показники адгезивної здатності СФ були отримані при консервуванні в кріозахисному середовищі з 10% ДМСО та 25% ФТС при швидкості охолодження 0,5 град/хв. Найбільша життєздатність СФ з виселенням нейробластоподібних клітин була відзначена у разі кріоконсервування зі швидкістю охолодження 1 град/хв у присутності 10% ДМСО з 25% ФТС [119].

У роботі Агаї К. та співав. СФ з фібробластів кріоконсервували у спеціальному кріозахисному розчині StemSure® та зберігали протягом 1 тижня [120]. Охолодження проводили у спеціальному пристрої, в якому створюється швидкість близько 1 град/хв, до -80°C . Після розморожування СФ зберігали свої основні біологічні властивості.

Багато робіт присвячено кріоконсервуванню колоній нейральних стовбурових клітин – нейросфер [119, 113, 121]. При цьому, потрібно відзначити, що автори найчастіше використовують комерційні кріозахисні розчини або розчини на основі ДМСО та настільні пристрої для заморожування, які створюють швидкість охолодження близько 1 град/хв, кінцеву температуру охолодження -80°C , зберігання у парах азоту [7].

У роботі Ма Х. та співав. нейросфери, отримані з гіпокампу, консервували у кріосередовищі з різними концентраціями ДМСО (3, 5, 7, 8, 10, 15, 20%) зі швидкістю охолодження 1 град/хв [121]. Час насичення ДМСО був 15 хвилин. Зразки відтаювали на водяній бані, кріопротектор видаляли шляхом центрифугування. Цікаво, що концентрація ДМСО 8% була

оптимальною для СФ діаметром 80–100 мкм, тоді як 7% для СФ діаметром 30–50 мкм.

У роботі Тап F. та співав. було порівняно результати різних способів кріоконсервування нейросфер – вітрифікації та повільного охолодження [122]. Розмір СФ, які підлягали кріоконсервуванню, коливався від 90 до 900 мкм в діаметрі, що становило приблизно від 2000 до 2000000 клітин. У протоколі вітрифікації нейросфери поетапно піддавали дії кріопротекторних розчинів, до складу яких входили етиленгліколь і сахароза. Повільне охолодження здійснювали у пристрої для заморожування зі швидкістю охолодження 1 град/хв., кінцева температура охолодження -70°C , після чого занурювали у рідкий азот (-196°C). При цьому використовували 10% ДМСО у кріозахисному середовищі. Швидке охолодження проводили в кріозахисних розчинах етиленгліколь і сахароза шляхом прямого занурення у рідкий азот. Протокол вітрифікації виявився кращим за повільне заморожування для збереження структурної цілісності нейросфер, після відтавання життєздатності клітин ($>96\%$) у їхньому складі, збереженні здібності до диференціювання. Життєздатність деконсервованих нейросфер, які зазнали швидкого охолодження, складала 77% і було виявлено ушкодження їхньої структури. Після використання повільного охолодження також було визначено значне пошкодження структури нейросфер і життєздатність не перевищувала 65%. Це дослідження передбачає, що, на відміну від заморожування, вітрифікація має величезний потенціал для кріоконсервування стовбурових клітин. Однак автори не оцінювали «вихід» або кількість нейросфер після кріоконсервування, отже неможливо чітко сказати, якими були втрати біоматеріалу у процесі кріоконсервування.

Доведено, що одним із важливих параметрів процесу кріоконсервування біологічних об'єктів є швидкість охолодження. Існування оптимальної швидкості охолодження було пояснено в межах двофакторної теорії Мейзура [123, 124]. При різній швидкості охолодження змінюється внесок двох конкуруючих типів пошкоджень: пов'язаних зі зневодненням

клітин, з одного боку, та внутрішньоклітинною кристалізацією з іншого. Зі збільшенням зневоднення клітини зменшується величина ефективного переохолодження протоплазми та ймовірність утворення кристалів у клітині [123].

Отже для кожного типу клітин існує оптимальна швидкість охолодження (яка забезпечує максимальну збереженість), що прямо пов'язана зі швидкістю, з якою внутрішньоклітинна вода може виходити з клітин, тобто з коефіцієнтом проникності клітинної мембрани для води. Оскільки проникність для молекул води мембран різних видів клітин може відрізнятися на декілька порядків, то і значення оптимальної швидкості охолодження для цих клітин суттєво відрізняються. Так, наприклад, для еритроцитів людини оптимальна швидкість охолодження становить біля 3000 град/хв, а ооцитів миші – 0,1 град/хв. Надзвичайно високе значення оптимальної швидкості охолодження для еритроцитів людини, з погляду двохфакторної теорії, пояснюється дуже високою проникністю їх мембран для води і великим поверхнево-об'ємним відношенням [123].

В роботах [91, 113, 123] було показано вагомий вплив швидкості охолодження на життєздатність клітин у складі СФ. Так, для кріоконсервування СФ переважно використовується повільна 1–0,5 град/хв швидкість охолодження, яка зарекомендувала себе як ефективна [91, 113].

Відомо, що для збільшення життєздатності клітин у 3D умовах після кріоконсервування, використовуються технології інкапсуляції клітин. У чисельних роботах була показана можливість застосування технології інкапсуляції, наприклад, з використанням альгілату [126, 127].

Важливо відзначити, що технології, розроблені для кріоконсервування клітинних суспензій, відрізняються для клітин у складі інкапсуляції в альгілатні гранули [11]. Це обумовлено зміною швидкості розподілу води та кріопротекторів між клітинами. У процесі кріоконсервування клітин у складі альгілатних гранул необхідно враховувати, що протоколи повинні забезпечувати не тільки збереження морфофункціональних властивостей

клітин, але і структурну цілісність носія, механічне пошкодження якого неминуче призведе до загибелі інкапсульованих у нього клітин. Альгінатний гідрогель уповільнює розподіл кріопротектору всередині альгінатних гранул, що проявляється при концентрації кріопротектору нижче оптимального рівня. На користь цього припущення свідчать результати роботи [93], у якій високі показники життєздатності клітин після заморожування-відтавання у присутності 5% ДМСО досягалися при тривалій еквілібрації з кріопротектором.

На сьогоднішній день показана можливість кріоконсервування різних типів клітин, наприклад, мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) у складі альгінатних гранул шляхом вітрифікації або повільного заморожування під захистом ДМСО [11].

1.3 Вплив коефіцієнтів проникності кріопротекторів і параметрів масопереносу на осмотичну поведінку клітин на етапах кріоконсервування

У роботах [128, 129] було доведено, що математичне моделювання є одним з ефективних підходів щодо прогнозування біологічних процесів, який допомагає інтерпретувати складні фізіологічні взаємодії. Авторами дослідження [11, 94, 98, 101, 123, 124] запропоновано використання фізико-математичного моделювання для прогнозування осмотичної поведінки клітин при охолодженні і використанні кріопротекторів з метою визначення оптимальних протоколів їхнього кріоконсервування.

Відомо, що додавання кріопротектору до клітинної суспензії, як правило, призводить до зсуву оптимальної швидкості охолодження у бік менших значень. Це пов'язано зі здатністю кріопротекторів ускладнювати процеси утворення та росту кристалів, досягнення клітиною мінімального об'єму. Важливого значення при цьому набувають здатність кріопротектору проникати в клітини та швидкість його проникнення. Отже, іншим суттєвим

кріобіологічним параметром клітинної мембрани є її проникність для кріопротекторів [10, 11, 12, 123], від значень якого залежать умови еквілібрації клітин у кріопротекторному середовищі до початку охолодження, а також умови відмивання клітин від кріопротектору після розморожування. Також однією з важливих характеристик транспортних процесів є їх залежність від температури. Вплив температури на константи швидкостей, що характеризують хімічні або біологічні процеси, часто аналізують в термінах емпіричної енергії активації (E_A). Проникання води і розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани різними структурно обумовленими шляхами характеризуються відмінними значеннями видимої енергії активації [123]. Взагалі, розуміння осмотичної поведінки клітин і транспортних властивостей мембрани (коефіцієнту проникності для молекул води і кріопротектору), а також значень E_A є обов'язковим процесом на етапі кріоконсервування біологічних об'єктів для запобігання втрати функціональних властивостей у процесі заморожування-відтавання [10, 93, 94, 108].

Для підтвердження важливості розуміння осмотичної поведінки клітин під час охолодження, температури кріозахисного середовища, параметрів проникності і швидкості охолодження необхідно мати уяву про кріобіологічні процеси на рівні клітин під час заморожування-відтавання. Відомо, що процес заморожування-відтавання викликає подвійний стрес для клітин, а саме термічний і гіперосмотичний стреси, які діють одночасно при охолодженні [94, 123, 124]. Чим нижче температура середовища, тим більша концентрація не замороженого розчину і тим більша втрата внутрішньоклітинної води. Цей масоперенос обмежується гідравлічною проникністю (L_p) мембрани клітини. Коли суспензія клітин охолоджується нижче точки замерзання, клітини і оточуюче їх середовище спочатку залишаються у не замороженому стані внаслідок переохолодження. Оскільки більш ефективні джерела утворення зародків льоду знаходяться у позаклітинному середовищі, лід спочатку формується в позаклітинному

розчині між -2 і -15°C , тоді як внутрішньоклітинний розчин залишається переохолодженим, внаслідок того, що мембрана клітини запобігає проростанню льоду в клітину [123]. Переохолоджена внутрішньоклітинна вода, таким чином, має вищий хімічний потенціал, ніж вода в частково замерзлому позаклітинному розчині, який знаходиться в рівновазі з фазою льоду. Хімічна рівновага може досягатися або витіканням води з клітин, або утворенням внутрішньоклітинного льоду. Спосіб, за допомогою якого досягається рівновага, є функцією швидкості охолодження клітин відносно здатності до виходу води з клітини назовні. Кількість води, яка повинна вийти, щоб відновити хімічну рівновагу, залежатиме від початкової осмотичності внутрішньоклітинного розчину і кінцевої температури суспензії клітин. Чи вийде ця кількість води з клітини – залежить, перш за все, від проникності плазматичної мембрани, площі поверхні доступної для виходу води і швидкості охолодження. Якщо вихідний потік не є адекватним, що є звичайним явищем у випадку високих швидкостей охолодження, то теплообмін буде домінувати над масообміном, і буде мати місце незначне зневоднення клітин, або воно буде відсутнє. Внутрішньоклітинний розчин, таким чином, стане надмірно переохолодженим, і внутрішньоклітинний лід буде формуватись за більш низьких температур. Якщо вихід води є адекватним, що має місце зазвичай при більш повільних швидкостях охолодження, то масоперенос буде превалювати над теплопереносом, і клітини будуть зневоднюватись. Спочатку клітини уникнуть внутрішньоклітинної кристалізації, оскільки як внутрішньоклітинний, так і позаклітинний розчини стануть більш сконцентрованими і урівноваженими. Проте при більш низьких температурах внутрішньоклітинний та позаклітинний розчини цілком затвердіють внаслідок формування евтектичної суміші, а не льоду [123].

Взагалі оцінка осмотичної поведінки клітин дає можливість визначити оптимальні режими кріоконсервування для запобігання ушкодження клітин на етапах заморожування-відтавання [10, 93, 94, 108]. Зокрема, у роботі [123]

на основі визначених біофізичних параметрів для клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (осмотично неактивний об'єм, коефіцієнти фільтрації в середовищах з кріопротекторами гліцерином, 1,2-пропандіолом та ДМСО) були визначені механізми проникності для даних кріопротекторів. Зокрема, автори вважають, що, якщо кріопротектор є суб'єктом метаболізму клітини, як у випадку гліцерину для клітин *Saccharomyces cerevisiae*, то можуть існувати спеціальні механізми транспорту для молекул цієї речовини (канали або переносники). Пасивна проникність мембрани для конкретної речовини визначається фізико-хімічними властивостями її молекул, які впливають на їх можливу взаємодію з макромолекулами мембрани. Автори роботи зробили висновки, які свідчать про те, що проникність плазматичних мембран для полярних гідрофільних молекул має залежність від їх розміру [123].

У роботі [10] за допомогою методу волюмометрії були визначені коефіцієнти проникності мембран клітин лінії СПЕВ (ембріональна нирка свині) для молекул води та ДМСО. В результаті проведених досліджень було встановлено, що при збільшенні розмірів клітин проникність їх мембран для молекул ДМСО зменшується. Чисельне моделювання осмотичної поведінки клітин СПЕВ при заморожуванні в присутності ДМСО показало, що при охолодженні зі швидкістю 1град/хв дегідратація клітин СПЕВ відбувається в діапазоні температур -7,5...-13°C, а збільшення швидкості охолодження до 5град/хв і вище може бути причиною внутрішньоклітинної кристалізації.

Взагалі визначення коефіцієнтів проникності для кріопротекторів і води надає можливість контролювати зміни об'єму клітин на ключових етапах кріоконсервування з метою запобігання внутрішньоклітинної кристалізації і дегідратації клітин на етапах заморожування-відтавання [10, 94, 123].

Також в роботах [98, 100, 101] було доведено, що однією з важливих характеристик транспортних процесів є їх залежність від температури. Вплив температури на константи швидкостей, що характеризують хімічні або

біологічні процеси, часто аналізують в термінах емпіричної енергії активації (E_A). Проникання води і розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани різними структурно обумовленими шляхами характеризується відмінними значеннями видимої E_A . Тому для розрахунку значень масопереносу, що відбуваються з клітиною впродовж охолодження, важливо враховувати залежність проникності плазматичних мембран для молекул води та кріопротекторів від температури [10, 130, 131]. Прониканню речовин за каналним механізмом відповідають, як правило, значення енергії активації в діапазоні 12–25 кДж/моль, які узгоджуються з величинами енергії активації дифузії в об'ємному розчині. При прониканні молекул шляхом розчинення та дифузії в ліпідному матриксі енергія активації набуває значень 30–85 кДж/моль і навіть більших [123]. Тобто визначення величин E_A проникності для молекул різних речовин є можливістю з'ясувати механізми їх проникання крізь плазматичні мембрани конкретних клітин. Зокрема, у роботі [123] на клітинах дріжджів було показано, що у середовищі з 1,2-ПД значення коефіцієнта фільтрації є вірогідно більшим, а значення $E_{A, \text{проникання молекул води}}$ у два рази меншим, ніж у середовищах з гліцерином та ДМСО. Це, на думку авторів, свідчить про негативний вплив 1,2-ПД на мембрани дріжджів. В роботі також було доведено, що $E_{A, \text{проникання молекул ДМСО}}$ є вірогідно більшою, ніж для молекул гліцерину та 1,2-ПД, що свідчить, як вважають автори, про часткове проникання молекул ДМСО крізь ліпідний бішар.

В роботі [131] було доведено, що чутливість клітин до фізико-хімічних процесів, які відбуваються протягом низькотемпературного охолодження, суттєво залежить від їхньої структурної організації. Зокрема, було показано, що проникність мембран еритроцитів щура та кролика для вивчених речовин залежить від хімічної структури, геометричних параметрів молекул та фізико-хімічних властивостей цих сполук, зокрема гідрофільно-гідрофобного балансу їх молекул. Встановлено, що проникність речовин через мембрану еритроцитів щура вища, ніж через мембрану еритроцитів кролика, що

зумовлено видовою специфічністю цих клітин. Авторами була виявлена різниця між проникністю мембран еритроцитів щура та кролика для певних речовин. Це обумовлено тим, що склад і фізико-хімічні властивості їх мембран значно відрізняються. Зокрема, було з'ясовано той факт, що індекси подвійних зв'язків сумарних ліпідів мембран еритроцитів щура та кролика дорівнюють 1,7 та 1,2 відповідно, а вміст холестерину в еритроцитарних мембранах щура становить 26,1%, кролика – 29,9% [131]. Такі розбіжності на думку авторів свідчать про значно нижчу в'язкість ліпідної фази мембран еритроцитів щура у порівнянні з мембранами еритроцитів кролика, що, в свою чергу, може бути причиною високої швидкості проникнення діолів та амідів у еритроцити щурів.

Таким чином, розуміння транспортних властивостей мембрани є необхідною складовою для кріобіологічних досліджень і визначення умов експозиції та протоколу заморожування для конкретних видів клітин у залежності від їхньої структурної організації [94, 123, 131, 132]. Саме тому, численні протоколи кріоконсервування для клітинних суспензій, тобто поодиноких клітин, не вирішують питання щодо кріочутливості клітин у складі багатоклітинних сфероїдів, які мають зовсім іншу структурну організацію [1–7].

З метою скорочення витрат, економії часу та підвищення ефективності наукових досліджень на етапі розробки способів кріоконсервування біоб'єктів доцільно використовувати метод чисельного моделювання процесів та явищ, що відбуваються при їх заморожуванні та подальшому відтаванні [132–134]. Чисельне моделювання процесів, що протікають протягом циклу «заморожування-відтавання» клітинних суспензій, дозволяє на підставі розрахунків прогнозувати які протоколи кріоконсервування є більш ефективними, ніж інші, і, тим самим, замінити частину реальних експериментів на теоретичні розрахунки [10–12, 94, 123, 124, 130, 131–134]. Однак необхідно акцентувати увагу на тому факті, що, як було з'ясовано вище, такі розрахунки знайшли широке застосування на клітинах, в свою

чергу для багатоклітинних об'єктів (більш ніж 50 клітин) такі підходи не використовувались.

На теперішній час є деякі роботи в яких використовувались теоретичні розрахунки біофізичних параметрів (проникності молекул води і кріопротекторів) для клітинних суспензій у складі альгінатних гранул, в яких умови для клітин наближені до 3D-формату у порівнянні з клітинними суспензіями. Зокрема, у роботі [11] були проведені дослідження щодо транспортних характеристик МСК методом волюмометрії. На основі експериментально визначеної осмотичної відповіді МСК в суспензії або у складі альгінатних гранул з діаметром 200 мкм на 1М розчин ДМСО з залученням математичного моделювання були розраховані коефіцієнти проникності для води та кріопротектору. З'ясовано, що осмотична реакція МСК у складі альгінатних гранул уповільнена у порівнянні з відповіддю клітин у суспензії. Підставляючи отримані коефіцієнти проникності у фізико-математичну модель, яка описує кінетику зміни відносного об'єму МСК у процесі позаклітинної кристалізації суспензії, у цій роботі була спрогнозована ступінь зневоднення клітин залежно від швидкості охолодження суспензії МСК та клітин у складі АМС [11].

В роботах [130, 133] на основі методу волюмометрії досліджували кінетику осмотичної поведінки ембріону миші на різних етапах кріоконсервування у етиленгліколь-сахарозному середовищі. На основі проведених досліджень було доведено, що основний внесок у кріопшкодження ембріонів належить етапам експозиції у середовищі заморожування та етапі заморожування-відтавання. Аналогічні дослідження були проведені щодо вивчення впливу різних етапів швидкого заморожування в гліцерин-сахарозному середовищі на життєздатність та осмотичну стійкість 8-клітинних ембріонів миші. Було показано, що тривалість попередньої еквілібрації ембріонів у середовищі заморожування є ключовим етапом, що впливає на кінцеву збереженість ембріонів. Виявлено, що одно- та двоетапне додавання розчинів гліцерину має різний вплив на

кількісні значення транспортних характеристик плазматичних мембран раннях зародків. Авторами на основі отриманих результатів було обговорено можливі механізми пошкоджуючої дії розчинів гліцерину великих концентрацій на мембранні структури ембріонів миші [133].

Таким чином, приймаючи до уваги все вищесказане, одним з оптимальних методичних рішень визначення коефіцієнту проникності плазматичних мембран клітин для молекул води і кріопротектору у СФ може бути метод волюмометрії і метод диференціальних рівнянь Кедем-Качальського [10–12, 93, 94, 123, 124, 130–135]. З'ясування коефіцієнтів проникності клітинних мембран для молекул ДМСО і води, осмотично неактивного об'єму, масопереносу за даними методами можуть бути використані для прогнозування осмотичної поведінки СФ під час охолодження, що сприятиме удосконаленню існуючих протоколів кріоконсервування для багатоклітинних об'єктів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальні положення

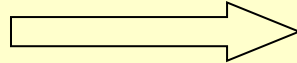
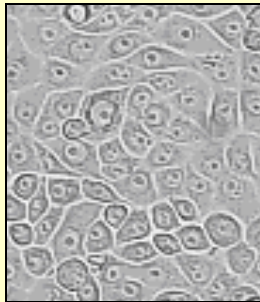
Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в рамках науково-дослідних тем «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (№ 0116U003494, НАН України, 2016–2020 рр.); «Теоретичне та експериментальне дослідження електричних характеристик клітинних мембран на етапах кріоконсервування та їх взаємозв'язку зі здатністю клітин до адгезії на плоских поверхнях та в об'ємних конструкціях» (№ 0121U108756, НАН України, 2021–2025 рр.), «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D- і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребня» (№ 0121U100, НАН України, 2021-2025 рр.).

2.2 Культура клітин

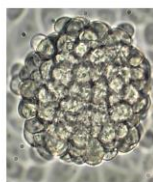
Дослідження виконані на перещеплюваній лінії клітин L929, отриманої після 4 пасажів з кріоконсервованої культури, що зберігалася при температурі -196°C у кріобанку ІПКіК НАН України. Клітини культивували у живильному середовищі DMEM/F12 («Biowest», Франція) з додаванням антибіотиків (200 Од/МП бензилпеніциліну («Arterium», Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна) та 10% ФТС при 37°C в атмосфері з 5% CO_2 . Для культивування моношарової культури використовували пластикові флакони («SPL Life Sciences», Корея). Посівна концентрація клітин для отримання вихідної культури становила 2×10^5 кл/мл.

2.3 Загальний дизайн дослідження

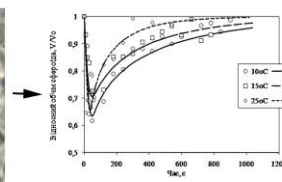
Етап I. Визначення умов утворення СФ з клітин лінії L929



Етап II. На основі фізико-математичного моделювання визначення оптимальних режимів кріоконсервування СФ різних термінів культивування



Багатоклітинні тривимірні об'єкти (сфероїди)

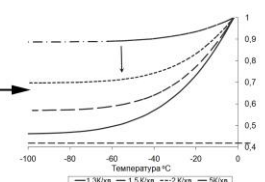


Визначення об'ємних змін сфероїдів у кріозахисних розчинах за різної температури

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{E_H}{R_p T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right]$$

$$k(T) = k(T_0) \exp \left[\frac{E_A}{R_p T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right]$$

Визначення коефіцієнтів проникності сфероїдів для води та кріопротектору шляхом фізико-математичного моделювання



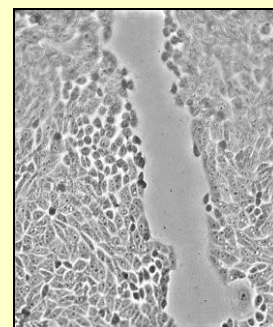
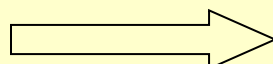
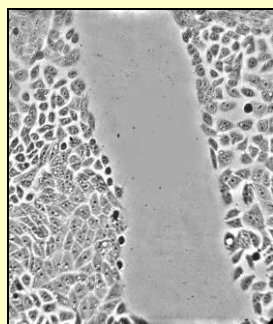
Визначення оптимального режиму кріоконсервування сфероїдів (час інкубації з кріопротектором, швидкість охолодження)



Кріоконсервування сфероїдів

Етап III. Кріоконсервування СФ за теоретично розрахованим режимом

Етап IV. Експериментальне апробування визначеного режиму кріоконсервування за функціональними параметрами СФ після розморожування (МТТ-тест, здатність до адгезії, тест «подряпина»)



2.4. Пасаж культури клітин

Моношарову культуру клітин лінії L929 відкріпляли від поверхні культивування шляхом обробки сумішшю розчинів 0,5% трипсину («Sigma», США) та Версену («РАА», США) у співвідношенні 1:1. Витримували 5 хв при температурі 37°C та відмивали одноразово від ферментного розчину середовищем DMEM/F12 шляхом центрифугування (центрифуга ОПН-3) Україна «Дастан».

2.5 Отримання клітинних сфероїдів

Отримання СФ з клітин лінії L929 проводили методом культивування на низькоадгезивній поверхні. Для цього чашки Петрі з площею поверхні 22,1см² («ТРР», Швейцарія) обробляли 2% розчином агару («Ferak», Німеччина). Вихідну суспензію клітин переносили в оброблені чашки Петрі та культивували у живильному середовищі DMEM/F12 з додаванням антибіотиків та 10% ФТС (Biosera, Франція) при 37°C в атмосфері з 5% CO₂.

Для дослідження впливу посівної концентрації клітин на формування СФ використовували концентрації 1×10^5 , 2×10^5 та 5×10^5 клітин/мл. Культивування проводили протягом 21-ї доби, кожну 3-тю доби здійснювали заміну живильного середовища. Для цього СФ переносили у центрифужні пробірки, центрифугували при 500g протягом 5 хв, відбирали надосад, додавали свіже середовище та знов переносили СФ у чашки Петрі для подальшого культивування.

2.6 Оцінка параметрів сфероїдоутворення

Для з'ясування впливу посівної концентрації на діаметр та кількість СФ у чашки Петрі висівали клітини у різних концентраціях (1×10^5 , 2×10^5 та 5×10^5 клітин/мл). Діаметр і кількість СФ оцінювали на 3-тю та 7-му

добу за допомогою мікроскопу Axio Observer Z1 LSM 510 META («CarlZeiss», Німеччина) та комп'ютерної програми «AxioVisionRel. 4.8» («CarlZeiss», Німеччина). Кількість сфероїдів підраховували у 100 полях зору.

2.7 Оцінка спектру низькомолекулярних речовин білково-пептидної природи у середовищі культивування

Спектр низькомолекулярних речовин білково-пептидної природи у кондиціонованих середовищах, отриманих від 2D і 3D-культур, оцінювали за допомогою гель-проникної хроматографії [136] на пластиковій колонці (1,6 x 40 см), яка була заповнена полівініловим гелем Toyopeas 1HW-40 Fine («Toyo Soda», Japan), що дозволяє розділити молекули у діапазоні молекулярних мас від 0,1 до 100 кДа. В якості елюента використовували фосфатно-сольовий буфер (Na_2HPO_4 30 мМ, NaCl 200 мМ, pH 7,6), що подавався в колонку за допомогою перистальтичного насосу Microperplex 2132 («LKB», Швеція) зі швидкістю потоку 1,7 мл/хв. В колонку вводився зразок в об'ємі 0,4 мл за допомогою петлевого інжектора. Вихід компонентів реєструвався ультрафіолетовим оптичним монітором LKB 2238 Unicord s11 при довжині хвилі 260 нм в двох діапазонах відносних оптичних одиниць (AUFS) 0–2 і 0–0,02 AUFS сигналом із самописним потенціометром «LKB 2210 Recoder».

2.8 Визначення об'ємних змін поодиноких клітин та СФ у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО

Поодинокі клітини або СФ із діаметром 80–100 мкм переносили у чашки Петрі з адгезивною поверхнею та культивували у вищевказаних умовах протягом 24 годин. Чашки Петрі переміщали до термостатованої камери, встановленій на предметному столику конфокального мікроскопа Axio Observer Z1 LSM 510 META. Температуру у камері реєстрували за

допомогою термопари та підтримували за допомогою водяної бані (рис. 2.1). До експериментальних зразків після видалення живильного середовища одразу додавали кріозахисне середовище з 1М ДМСО, приготовлене на фізіологічному розчині при температурах 10, 15 та 25°C. Дослідження зміни об'єму поодиноких клітин, клітин у складі СФ та СФ *in toto* у часі фіксували за допомогою фотозйомки з інтервалом 5 сек. За допомогою комп'ютерної програми «AxioVisionRel. 4.8» вимірювали діаметр (d) поодиноких клітин, клітин у складі СФ та СФ цілком (рис. 2.2).

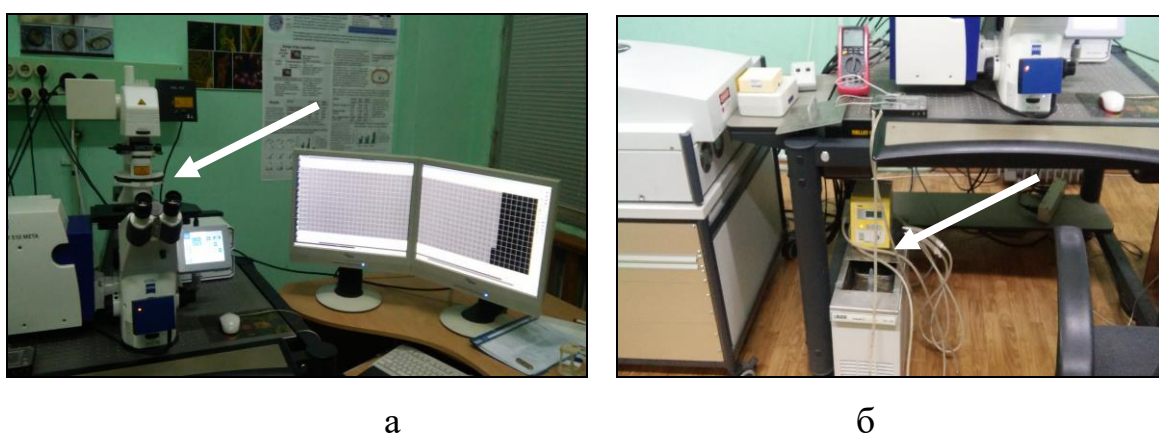


Рис. 2.1 Устаткування для дослідження змін об'єму біооб'єктів у часі при різних температурах: а – конфокальний мікроскоп Axio Observer Z1 LSM 510 META; б – реєстрація температури у термостатованій камері, встановленої на предметному столику мікроскопа.

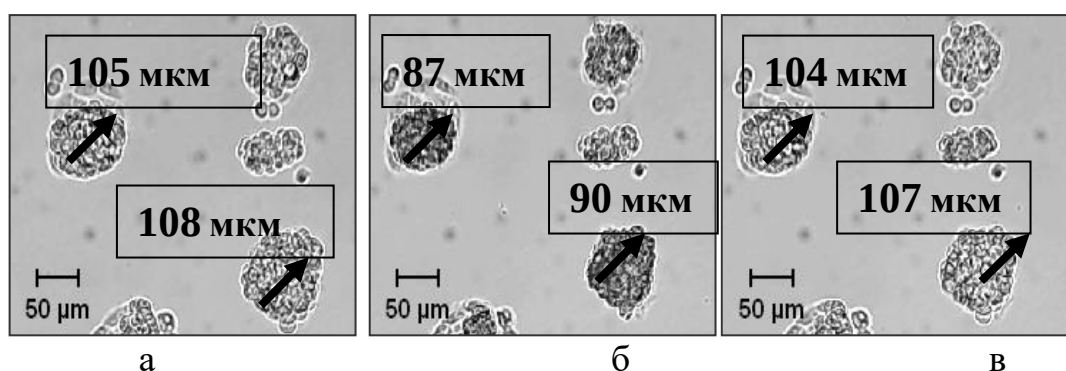


Рис. 2.2 Репрезентативні фотографії об'ємних змін СФ у часі за умов експозиції у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО: а – 0 с; б – 300 с; в – 440 с.

Обчислювали об'єм вищезазначених об'єктів за формулою:

$$V=4/3\pi(d/2)^3$$

Відповідно до робіт [12, 97] відносний об'єм вищезазначених об'єктів обчислювали за формулою:

$$V=V(t)/V_0,$$

де $V(t)$ – об'єм клітини в момент часу t , V_0 – вихідний об'єм

Для визначення зміни об'єму клітин у різних шарах СФ використовували Z-сканування із кроком 4,2 мкм. Оцінювали зміни об'єму клітин внутрішнього шару на глибині 45 мкм та зовнішнього шару на глибині 15 мкм (рис. 2.3).

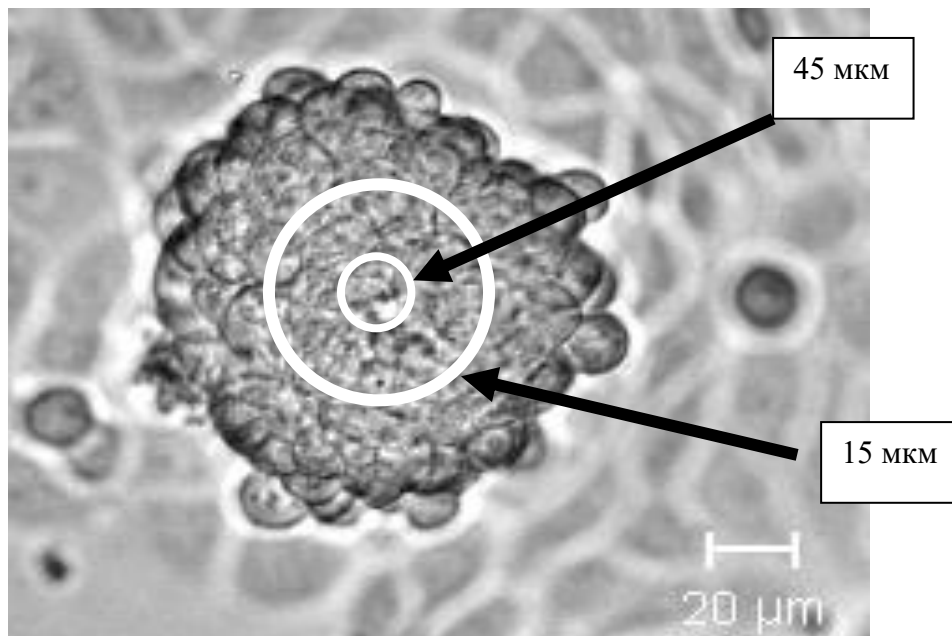


Рис. 2.3 Параметри оцінки об'ємних змін клітин у різних шарах СФ: внутрішній шар клітин на глибині 45 мкм та зовнішній шар клітин на глибині 15 мкм

Для визначення середнього діаметру клітин у зовнішньому і внутрішньому шарах брали середнє значення по 30 клітинам.

2.9 Визначення параметрів проникності для клітин у зовнішньому і внутрішньому шарах сфероїдів і сфероїдах *in toto*

Для визначення інтегральних характеристик СФ, що описують масообмін між ними і оточуючим середовищем, адаптували фізико-математичну модель розвинуту для клітинних суспензій [12].

У випадку, коли через поверхню сфероїда проникають тільки молекули розчинника, тобто, води і однієї (s-ої) з розчинених в n-компонентному розчині речовин, рівняння мають вигляд:

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{1}{\tau_w} \left[\sigma_s \Delta \pi_s + \frac{1 + \sigma_s \hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1}^n (k \neq w, s) \hat{\pi}_k \right] \quad (1)$$

$$\frac{d\pi_s}{dt} = -\frac{\sigma_s (1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{(y - \alpha)} \frac{dy}{dt} + \frac{1}{\tau_s} \frac{(1 + \hat{\pi}_s^{in}) \hat{\pi}_s^{in}}{(y - \alpha)} \left(\Delta \hat{\pi}_s + \frac{\hat{\pi}_s^{in}}{1 + \hat{\pi}_s^{in}} \sum_{k=1}^n (k \neq w, s) \Delta \hat{\pi}_k \right) \quad (2)$$

$$\hat{\pi}_k^{in} = \hat{\pi}_{k0}^{in} \frac{(1 + \hat{\pi}_s^{in})(1 - \alpha)}{(1 + \hat{\pi}_{s0}^{in})(y - \alpha)} \quad (3)$$

де для нашого випадку $y = V/V_0$ – відносний об'єм СФ, V – поточний об'єм; V_0 – початкове значення об'єму; $\tau_w = \left(\frac{S}{V_0} L_p \frac{RT}{v_s} \right)^{-1}$, $\tau_s = \left(\frac{S}{V} k_s \right)^{-1}$ – величини, що мають розмірність часу; S – площа поверхні СФ; L_p – інтегральний коефіцієнт фільтрації для СФ; R – універсальна газова константа; T – абсолютна температура; v_s (v_k) – парціальний молярний об'єм проникаючої (непроникаючої) розчиненої речовини; k_s – інтегральний коефіцієнт проникності СФ для проникаючої розчиненої речовини; σ_s – коефіцієнт відбиття для проникаючої розчиненої речовини; $\Delta \hat{\pi}_s$ і $\Delta \hat{\pi}_k$ – трансмембранний перепад приведенного осмотичного тиску проникаючої і непроникаючої речовин відповідно; нижні індекси s , k і w позначають величини, що відносяться відповідно до розчинених речовин (проникаючих та непроникаючих) і розчинника, $\hat{\pi}_k = \frac{\pi_k v_k}{RT}$ – приведений осмотичний тиск k-ої

розчиненої речовини; π_s^{in} и π_k^{in} – осмотичний тиск проникаючої і непроникаючої внутрішньоклітинних речовин відповідно; π_{s0}^{in} і π_{k0}^{in} – початкові значення цих величин; t – час; π_s^{out} і π_k^{out} – осмотичний тиск проникаючої і непроникаючої позаклітинних речовин відповідно; $\alpha = \frac{1}{V_0} \sum_{k=1(k \neq w, s)}^n v_k N_{k0}$ – об’ємна частка непроникаючих речовин усередині СФ або осмотично неактивний об’єм СФ.

2.10 Осмотично неактивний об’єм СФ

Осмотично неактивний об’єм клітин лінії L929 та СФ визначали за методом, описаним у роботі [134]. Для цього отримували залежність відносного об’єму клітин/СФ від оберненого приведенного осмотичного тиску у розчинах хлориду натрію із концентраціями 0,5; 1; 2,0 моль/л.

У випадку двокомпонентного розчину непроникаючої (к-ої) речовини рівняння, що описує зміну об’єму СФ у часі (t), має вигляд [134]:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{(y-\alpha)} - \frac{n_k^{\text{out}}}{n_{kn}^{\text{in}}} \right] \quad (4)$$

де α – осмотично неактивний об’єм СФ, n_k^{out} – мольна частка розчиненої в оточуючому середовищі к-ї речовини; n_{kn}^{in} – початкове значення мольної частки розчиненої всередині СФ речовини; τ_w – характерний час проникання молекул води у СФ.

При $t \rightarrow \infty$, (тобто $t \gg \tau_w$) зміна відносного об’єму СФ в розчині непроникаючої речовини $\frac{dy}{dt} \rightarrow 0$, отже отримуємо

$$\frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{(y-\alpha)} - \frac{n_k^{\text{out}}}{n_{kn}^{\text{in}}} \right] = 0, \quad (1-\alpha) = (y_\infty - \alpha) \frac{n_k^{\text{out}}}{n_{kn}^{\text{in}}} = (y_\infty - \alpha) \frac{\pi_k^{\text{out}}}{\pi_{kn}^{\text{in}}}, \quad (5)$$

$$\text{або } y_\infty = \alpha + (1-\alpha) \frac{\pi_{ko}^{\text{in}}}{\pi_k^{\text{out}}} = \alpha + (1-\alpha)x, \quad (6)$$

$$\text{де } \chi = \frac{\pi_{ko}^{in}}{\pi_k^{out}}$$

Визначаючи об'єм СФ за $t \gg \tau_w$ у серії розчинів непроникаючої речовини зі зростаючою концентрацією, знаходимо залежність асимптотичного відносного об'єму від оберненого приведенного осмотичного тиску розчину. Експериментальні дані апроксимували рівнянням (6), що описує поведінку об'єму СФ у розчині непроникаючої речовини методом найменших квадратів. Значення осмотично неактивного об'єму отримували за перетином апроксимованої прямої з віссю ординат.

2.11 Прогнозування осмотичної поведінки СФ при заморожуванні з різними швидкостями охолодження

Диференціальне рівняння, що описує кінетику зміни відносного об'єму клітини в процесі позаклітинної кристалізації кріопротекторного розчину, було запропоноване в роботі [97]:

$$\frac{dy}{d\bar{T}} = p \exp[a(\bar{T} - 1)/\bar{T}] \left\{ \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} + \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} - \left[1 + \sigma_1 \frac{\hat{\pi}_{1\infty}(1 - \alpha g_0) - \hat{\pi}_1^{in}(y - \alpha)g_0}{\hat{\pi}_{2\infty}(1 - \alpha g_0) - (1 - \alpha)g_0} \right] \hat{\pi}_2^{out} \right\}, \quad (7)$$

де $y = V/V_0$ – відносний об'єм клітини; g_0 – початкове значення відношення сумарного об'єму клітин до повного об'єму клітинної суспензії; α – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин,

$$p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}, \quad a \equiv \frac{E_{a_0}}{R_0 T_0}, \quad b \equiv \frac{E_{a_1}}{R_0 T_0}, \quad \tau_0 = (\gamma_0 L_p \pi_{20}^{in})^{-1}, \quad \tau_1 = (\gamma_0 k_{pg})^{-1}, \quad \beta - \text{швидкість}$$

охолодження, γ_0 – вихідне поверхнево-об'ємне відношення клітини, σ_1 – коефіцієнт відбиття плазматичної мембрани для проникаючої крізь мембрану речовини, $\hat{\pi}_1^{out} = \pi_1^{out} / \pi_{20}^{in}$, $\hat{\pi}_2^{out} = \pi_2^{out} / \pi_{20}^{in}$ – приведені значення позаклітинного осмотичного тиску відповідно проникаючої і непроникаючої речовин;

$\hat{\pi}_1^{in} = \pi_1^{in} / \pi_{20}^{in}$ – приведені значення внутрішньоклітинного осмотичного тиску проникаючої через плазматичну мембрану речовини; π_{20}^{in} – початкове значення сумарного осмотичного тиску непроникаючих речовин всередині клітини; $\pi_{1\infty}, \pi_{2\infty}$ – асимптотичні значення осмотичного тиску відповідно проникаючої та непроникаючої через плазматичну мембрану речовин, що відповідають рівномірному їх розподілу уздовж системи; $\hat{\pi}_{1\infty}, \hat{\pi}_{2\infty}$ – приведені асимптотичні значення осмотичного тиску відповідно проникаючої та непроникаючої речовин.

Такий алгоритм розрахунку був застосований для прогнозування осмотичної поведінки СФ в умовах охолодження з використанням інтегральних характеристик проникності молекул води і кріопротектору у СФ *in toto*. Для розрахунку також приймали, що інтегральні коефіцієнти фільтрації L_p та проникності для кріопротектору k_p зі зниженням температури системи в умовах кристалізації підпорядковуються ареніусовій залежності:

$$L_p(T) = L_p(T_0) \exp \left[\frac{E_{AL}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right] \quad (8)$$

$$k(T) = k(T_0) \exp \left[\frac{E_{Ak}}{R_0 T_0} \left(1 - \frac{T_0}{T} \right) \right] \quad (9)$$

де T_0 – вихідна (до початку охолодження) температура в градусах Кельвіна, E_{AL} і E_{Ak} – значення енергії активації процесу переносу через поверхню сфероїда молекул води і розчиненої речовини відповідно, R_0 – універсальна газова стала.

Прогнозування осмотичної поведінки СФ при заморожуванні з різними швидкостями здійснювали підставляючи в рівняння моделі визначені величини інтегральних коефіцієнтів проникності L_p і k_p та енергії активації E_{AL} і E_{Ak} . Кінетику зміни концентрації позаклітинного розчину в процесі

заморожування при розрахунках задавали аналітично шляхом апроксимації фазової діаграми плавлення розчину ДМСО у вигляді [137]:

$$\hat{c}(\hat{T}) = -83,595\hat{T}^2 + 125,95\hat{T} - 41,355 \quad (10)$$

де $\hat{c} \equiv \frac{c}{c_0}$, $\hat{c}(\hat{T})$ – концентрація позаклітинного розчину, за якої він знаходиться в термодинамічній рівновазі з льодом при температурі T ; c_0 – вихідна (до заморожування) концентрація розчиненої речовини позаклітинного розчину; $\hat{T} = \frac{T}{T_{k0}}$ – приведена температура; T – поточне значення абсолютної температури, T_{k0} – значення температури плавлення розчину.

Вирішуючи рівняння (7) для визначених транспортних характеристик СФ і вибраних швидкостей охолодження отримували залежності об'єму СФ від температури охолодження. З урахуванням значень ступеня дегідратації робили висновок про оптимальну швидкість охолодження, спираючись на відповідну імовірність внутрішньоклітинної кристалізації при даному режимі охолодження СФ, як описано у роботах [93, 94].

2.12 Кріоконсервування СФ

У якості кріозахисного середовища використовували культуральне середовище DMEM/F12, що містило 10% ФТС і ДМСО в кінцевій концентрації 1М (7,5%). Культуральне середовище з подвійною концентрацією ДМСО та ФТС повільно по краплях додавали в рівний об'єм культурального середовища, що містило СФ 7 доби культивування (приблизно 1×10^3 СФ/мл). Температура насичення кріопротектором складала 10°C протягом 65 с. Охолодження зразків проводили за допомогою програмного заморожувача УОП–6 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України).

Через 3 доби проводили розморожування СФ на водяній бані при 37°C з подальшим відмиванням від кріопротектору. Для цього до зразка розморожених СФ додавали культуральне середовище DMEM/F12 з 10%

ФТС у співвідношенні 1:10. Центрифугували при 150g протягом 10 хв, після чого до осаду додавали свіже культуральне середовище у кількості 10 мл і визначали функціональну активність деконсервованих СФ.

СФ, які не були піддані кріоконсервуванню, використовували в якості контролю.

2.13 Визначення життєздатності клітин у складі СФ

Життєздатність клітин у складі СФ досліджували за морфологічними особливостями клітинних ядер та кількістю некротичних клітин у складі СФ з використанням», 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 флуоресцентних барвників Hoechst 33342 («Sigma», США) та пропідій йодид (PI, «Sigma змішували у співвідношенні 1:1 з середовищем культивування, в якому знаходилися СФ. Витримували 30 хвилин у темряві при кімнатній температурі та видаляли барвники шляхом центрифугування.

Інтенсивність флуоресценції реєстрували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа Axio Observer Z1 LSM 510 META. Для візуалізації, підрахунку кількості забарвлених клітин та аналізу морфологічних ознак ядер використовували програми «LSM 510 та LSM Image Examiner». Кількість некротичних і життєздатних клітин у складі СФ оцінювали за кількістю клітин з ядрами, забарвленими флуоресцентним барвником PI (некротичні) і ядрами прокрашеними Hoechst (життєздатні), результат нормували на 200 клітин.

2.14 Оцінка параметрів функціональної активності СФ підданих різним режимам кріоконсервування

Для оцінки функціональної активності деконсервованих СФ кріоконсервованих за теоретично визначеним режимом 1 у якості порівняння були використані два стандартних режими 2 і 3, які включали найбільш розповсюджені у кріобіологічній практиці режимні параметри кріоконсервування СФ (табл.2.1)

Таблиця 2.1

Режими охолодження використані при кріоконсервуванні СФ 7-ї доби культивування

Режим кріоконсервування	Умови		
	Час насичення з ДМСО, с	Швидкість охолодження, °C/хв.	Кінцева температура охолодження перед зануренням у рідкий азот, °C
Режим 1	65	2	-80
Режим 2	600	1	-40
Режим 3	600	1	-80

2.14.1 Оцінка здатності клітин до проліферації та міграції у тесті «подряпина»

Для оцінки проліферативного та міграторного потенціалу клітин використовували тест «подряпина» (scratch assay) [71]. Для цього за допомогою пластикового наконечнику діаметром 0,8 мм для піпет-дозатору (об'єм 200 мкл) наносили вертикальну подряпину на моношар клітин зі 100% конфлюентністю. Обережно видаляли живильне середовище, додавали свіже та поміщали в умови культивування. За допомогою світлооптичного мікроскопа AmScope XYL-403 («AmScope» КНР) з цифровою камерою робили мікрофотознімки вихідної подряпини (0 годин) та її змінення через 24 та 48 годин. Площу подряпини оцінювали за допомогою програми

«Axio Vision Rel. 4.8». Результати представляли як співвідношення площі подряпини на 24 або 48 годину до площі вихідної подряпини, виражене у відсотках.

2.14.2 Визначення здатності СФ до адгезії

Отримували СФ у низькоадгезивних умовах, як описано вище. Після цього переносили СФ на адгезивну поверхню та культивували протягом 5 і 24 годин. За допомогою світлооптичного мікроскопа AmScope XYL-403 оцінювали кількість флотуючих СФ. Відносну кількість прикріплених СФ вираховували за формулою:

$$A = (1 - \Phi_{\text{СФ}}/Z_{\text{СФ}}) \times 100\%,$$

де $\Phi_{\text{СФ}}$ – кількість флотуючих СФ; $Z_{\text{СФ}}$ – загальна кількість СФ.

2.14.3 Здатність клітин СФ до міграції

Здібність клітин СФ до міграції оцінювали після розморожування СФ і переміщення їх на адгезивну поверхню. Здатність клітин СФ до міграції оцінювали за площею моношару, сформованого клітинами, які мігрували зі СФ на 1, 2 і 3 добу культивування. Площу утвореного моношару оцінювали за допомогою програми «Zeiss LSM Image Examiner» («Zeiss», Німеччина).

2.14.4 Визначення метаболічної активності клітин СФ за МТТ-тестом

Метаболічну активність СФ оцінювали за допомогою МТТ-тесту. Це колориметричний тест, який дозволяє оцінювати життєздатність і метаболічну активність клітин. Розчинний у воді тетразолієвий барвник 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід (МТТ) легко проникає крізь мембрани живих клітин і відновлюється у пурпурний

нерозчинний у воді формазан. У відновленні МТТ, як і всіх тетразолієвих барвників, беруть участь НАД(Ф)Н/ФАДН-залежні оксидоредуктазні ферменти, локалізовані переважно в мітохондріях, а також цитозолі клітин. Таким чином, МТТ-тест є інтегральним показником клітинного метаболізму [11].

У експериментах до зразка СФ (0,5 мл) вносили розчин МТТ (5 мг/мл) і витримували протягом 2 годин при 37°C. Після цього зразок центрифугували протягом 3 хв. при 500g. Надосад видаляли, зразки одноразово відмивали PBS, після чого екстрагували внутрішньоклітинно утворений формазан внесенням до осаду 500 мкл 100% ДМСО. Після додавання ДМСО осад ресуспендували та витримували 10 хв. при кімнатній температурі. Оптичну щільність отриманих розчинів оцінювали при 550 нм на фотоколориметрі КФК-2. Холоста проба містила 0,9% NaCl. Результати представляли в одиницях оптичної щільності (ООЩ), які визначалися як різниця між оптичною щільністю дослідної і холостої проб.

2.15 Статистична обробка отриманих результатів

Для статистичного аналізу даних використовували програми Statistica 10 («StatSoft», США) та Excel. Нормальність розподілу визначали за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлкі. Результати експериментів представлені у вигляді середнього значення $\pm$ стандартне відхилення для даних з нормальним розподілом. Статистичну значимість відмінностей між групами оцінювали за допомогою критерію Манна-Уїтні (для усіх даних) або t-критерію Стюдента (для даних з нормальним розподілом). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН ЛІНІЇ L929 У ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ПОСІВНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ

Тенденції медико-біологічних досліджень останніх років вказують на переваги культивування в умовах 3D [1–3, 11, 33, 46–48, 59–61–64, 74, 92, 114, 119, 120, 139, 140]. Розробка простих і інформативних культуральних модельних систем, в яких функціонування клітин максимально наближено до умов *in vivo* є актуальним завданням [1, 3, 29, 33, 74, 138–141].

Моношарове (2D) культивування є традиційною моделлю для дослідження метаболічної та проліферативної активності, особливостей диференціювання, фенотипу та генотипу клітин *in vitro*. Однак моношарове культивування є досить штучною моделлю, оскільки в організмі клітини знаходяться в мікрооточенні, яке створює особливі умови їх функціонування.

З метою відтворення більш натуральних умов клітинного росту останнім часом розробляються системи 3D-культивування, в яких утворюються багатоклітинні об'єкти (агрегати, органоїди, сфероїди). Зокрема, СФ використовують для скринінгу препаратів, оскільки вони мають значну перевагу порівняно з моношаровими культурами: експериментатори отримують можливість проводити аналіз у просторовому контексті взаємодій клітина-мікрооточення [1, 3, 74]. Відомо, що однією з проблем при отриманні культури СФ є проблема контролю їх розмірів, які впливають на повноцінну дифузію поживних речовин протягом формування, час насичення кріозахисним середовищем, процеси зневоднення на етапі кріоконсервування і, як наслідок, на їхню життєздатність [3, 74, 89, 92]. Тому, пошук умов для отримання життєздатних і функціонально повноцінних СФ протягом культивування, що сприятиме більш ефективному їхньому кріоконсервуванню, є актуальним завданням кріобіології.

3.1 Вплив умов культивування на морфологічні особливості культури клітин лінії L929

Одним із способів отримання сфероїдів (СФ) у клітинних культурах є культивування з використанням низькоадгезивної поверхні [73, 142]. У цих умовах клітини не здатні прикріплюватися до поверхні культивування, отже вони збираються в агрегати, після чого активується клітинно-клітинна адгезія та формування СФ.

Багато клітинних ліній, отриманих з будь-яких органів можуть утворювати СФ [75, 143, 144]. Однак у деяких ліній такі властивості міжклітинної адгезії втрачені. Отже, на першому етапі роботи нами було перевірено здібність клітин лінії L929 до формування СФ у низькоадгезивних умовах.

Так, культура клітин лінії L929 за умов росту в адгезивних умовах характеризується фібробластоподібною морфологією (рис. 3.1).

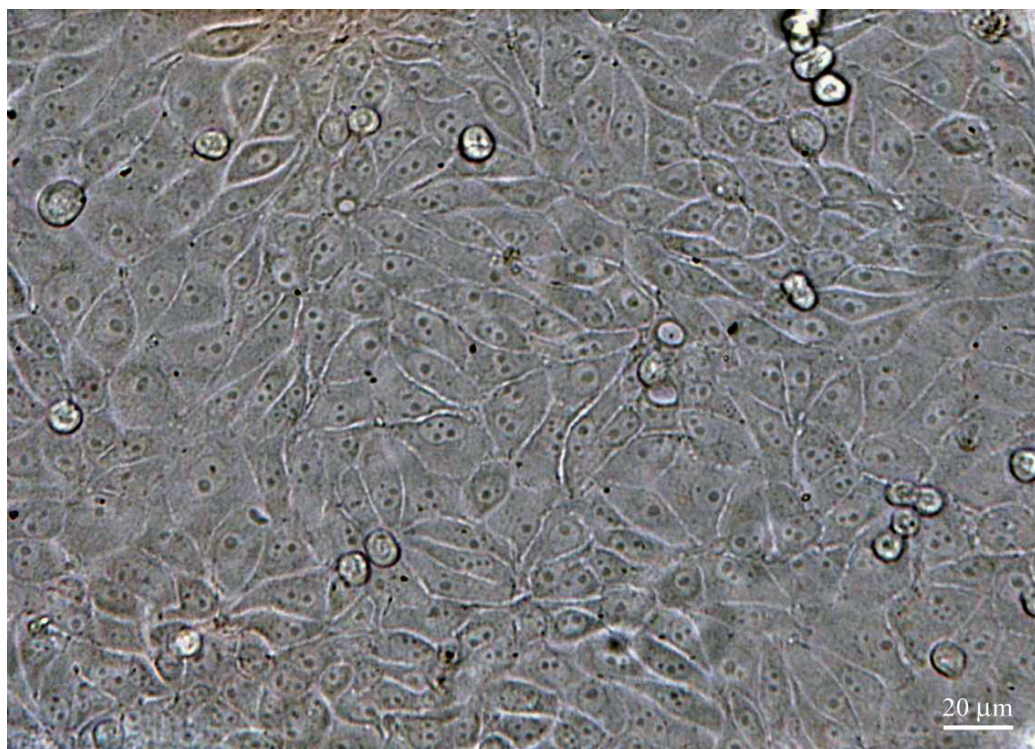


Рис. 3.1. Моношар клітин лінії L929, утворений в адгезивних умовах. Світлова мікроскопія.

Після перенесення клітин в умови культивування на адгезивну поверхню, вони змінювали форму з округлої на овальну з одним або більше короткими відростками. На наступну добу морфологія клітин в основному характеризувалася веретеноподібною формою. Клітини мали одне добре помітне ядро з одним або декількома ядерцями. У цитоплазмі клітин були добре помітні гранули і світлі вакуолі. Також у полі зору спостерігались декілька (2–5) клітин на стадії мітозу (рис. 3.1).

У низькоадгезивних умовах на першу добу культивування з клітин лінії L929 формувалися пухкі флотуючі агрегати, які склалися з невеликої кількості клітин (рис. 3.2).

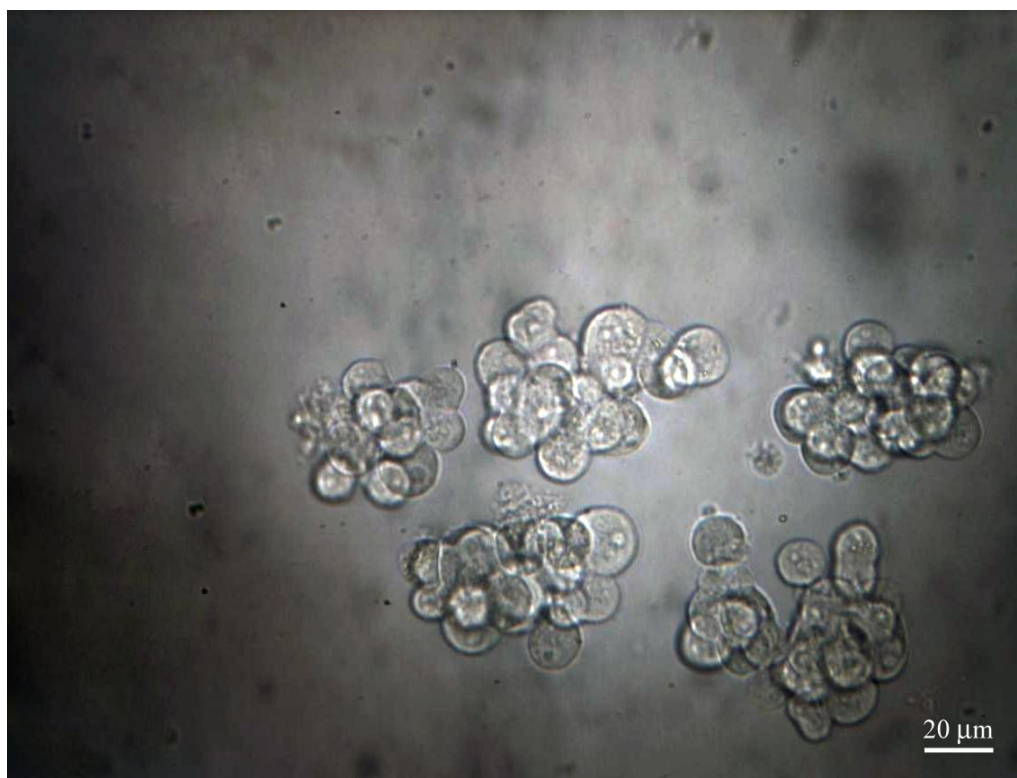


Рис. 3.2. Морфологія СФ з клітин лінії L929 на першу добу культивування у низькоадгезивних умовах. Посівна концентрація 2×10^5 кл/мл. Світлова мікроскопія

На третю добу кількість клітин у агрегатах зростала, але вони переважно мали неправильну форму (рідше овальну або округлу) та пухку структуру (рис. 3.3, а). Також спостерігалися поодинокі флотуючі клітини та

маленькі агрегати, які склалися з 3–4 клітин. При збільшенні термінів культивування (14, 21 доба) флотуючі агрегати набували сфероїдну форму з чітким контуром, іноді з округлими клітинами по краях (рис. 3.3, б, в, г), що співпадає з результатами авторів [145, 146]. Розміри СФ збільшувалися, при цьому темних зон у центрі СФ протягом 21-ї доби культивування не спостерігалось.

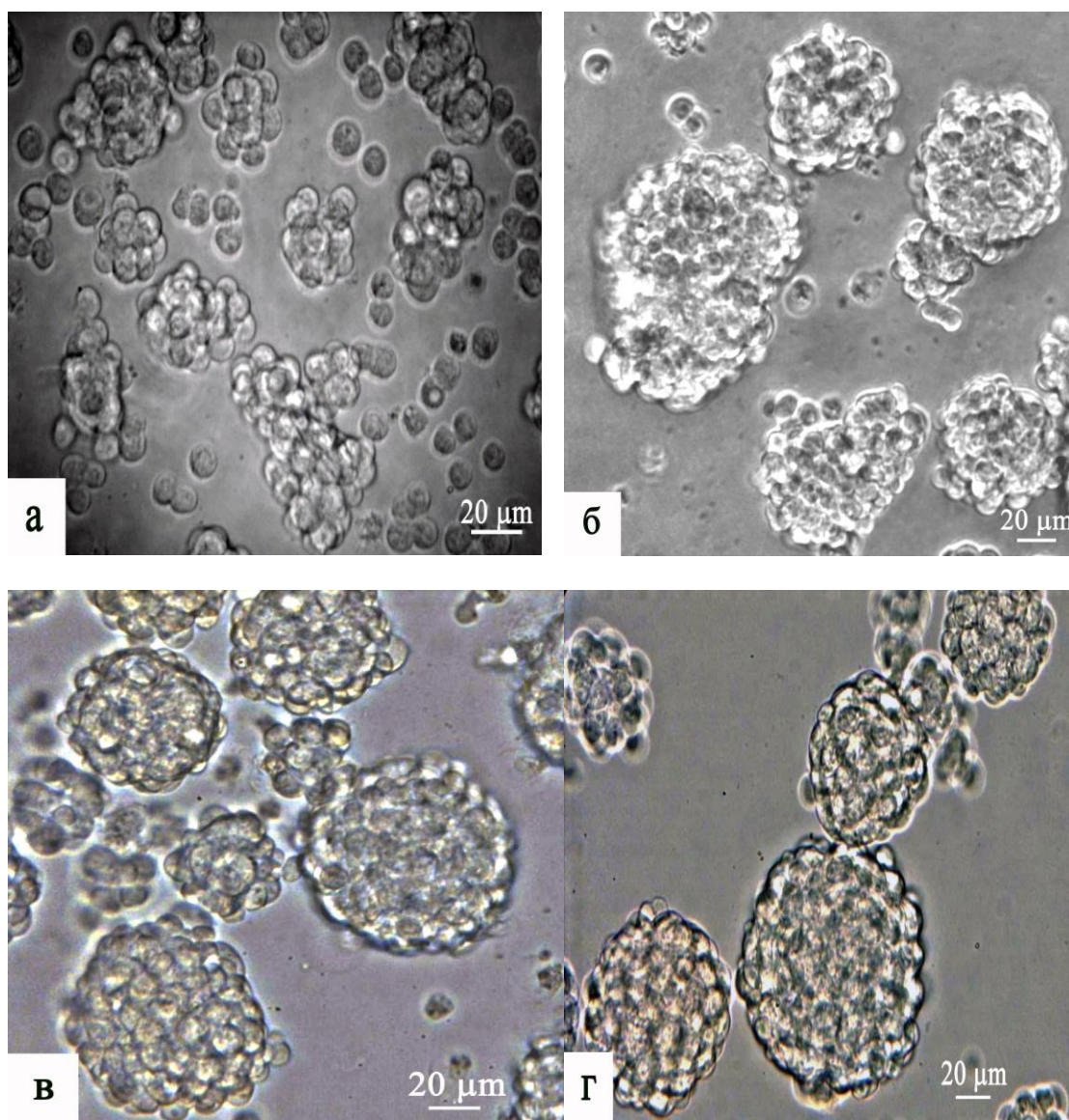


Рис. 3.3. Морфологія СФ з клітин лінії L929 у низькоадгезивних умовах на: а – 3-ю добу культивування, б – 7-му добу культивування, в – 14-у добу культивування, г – 21-у добу культивування. Посівна концентрація складала 2×10^5 кл/мл. Світлова мікроскопія.

Необхідно відзначити, що на 7-му добу культивування в деяких полях зору спостерігалось злиття СФ (рис. 3.4).

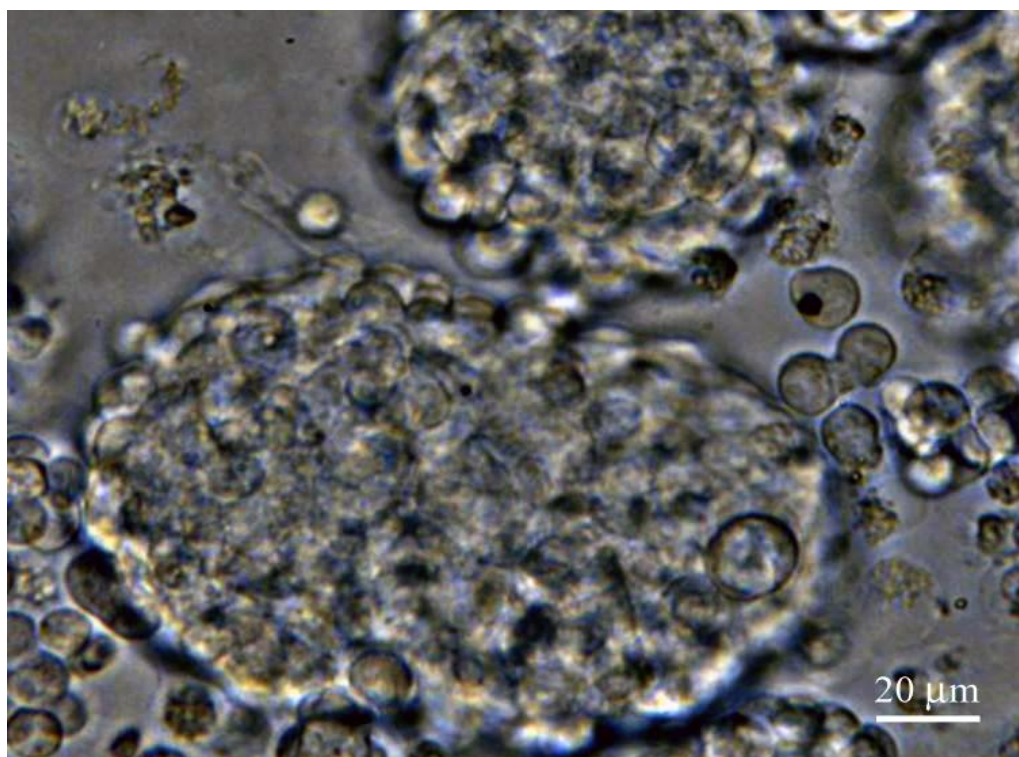


Рис. 3.4. Злиття СФ на 7-му добу культивування; посівна концентрація 2×10^5 кл/мл. Світлова мікроскопія.

Відомо, що процес злиття СФ залежить від багатьох факторів, зокрема, в роботі [5] було досліджено вплив різних за походженням клітин і термінів культивування на даний процес. Автори провели аналіз морфології та механічних властивостей СФ з різних за походженням клітин і встановили, що злиття відбувалось швидше у СФ з клітин з більш низьким поверхневим натягом. Також автори [5] довели, що збільшення кількості позаклітинного матриксу у зовнішньому шарі та щільна упаковка клітин у складі СФ призводила до уповільнення їхнього злиття. У наших дослідженнях ймовірність злиття СФ також суттєво зменшувалась при збільшенні термінів культивування до 14 та 21-ї доби.

За умов перенесення СФ з низькоадгезивних умов на адгезивну культуральну поверхню спостерігалось прикріплення СФ та міграція клітин з

них (рис. 3.5). При цьому адгезивні властивості СФ та здібність їх клітин до міграції збільшувалися протягом культивування.



Рис. 3.5. Міграція клітин зі СФ. Перенесення СФ з низькоадгезивних умов на адгезивну культуральну поверхню на 14-у добу культивування. Світлова мікроскопія.

Відомо, що на морфологію, структуру та адгезію СФ протягом культивування впливає велика кількість чинників: тип клітин та щільність посіву, склад культурального середовища, кількість синтезованого позаклітинного матриксу [5, 74, 146, 147] та механічний стрес [146].

Одним із вагомих факторів, який впливає на розміри і взагалі життєздатність СФ протягом формування, є посівна концентрація клітин [88, 89, 90]. Зокрема, в дослідженнях [88–90] було доведено, що кінетика збільшення діаметру СФ у часі залежала від посівної концентрації клітин. Приймаючи до уваги все вищесказане, на наступному етапі наших досліджень було проведено визначення оптимальної посівної концентрації для утворення СФ з клітин лінії L929.

3.2 Вплив посівної концентрації клітин лінії L929 на діаметр СФ протягом культивування

У результаті проведення експериментів було встановлено вплив посівної концентрації клітин лінії L929 на діаметр СФ, які сформувалися на сьому добу культивування (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Вплив посівної концентрації клітин лінії L929 на діаметр СФ, які сформувалися на 7-му добу культивування

Посівна концентрація, кл/мл	Кількість СФ, %		
	Діаметр СФ, мкм		
	20–80	80–150	150–300
1×10^5	$42,0 \pm 2,7$	$41,0 \pm 3,7$	$17,0 \pm 2,3^*$
2×10^5	$8,0 \pm 1,9^*$	$70,0 \pm 2,5$	$22,0 \pm 1,7^*$
5×10^5	$3,0 \pm 0,1^*$	$49,0 \pm 1,2$	$48,0 \pm 0,3^*$

Примітка: * – відмінності статистично значуще відрізняються у порівнянні з кількістю СФ діаметром 80–150 мкм ($p < 0,05$).

В результаті проведених досліджень було доведено, що розмір СФ на етапі культивування залежить від вихідної посівної концентрації клітин. Зокрема, при концентрації 1×10^5 кл/мл на 7-му добу культивування формувались переважно пухкі агрегати, з яких $42,0 \pm 2,7\%$ мали діаметр 20–80 мкм і $41,0 \pm 3,7\%$ – 80–150 мкм. Найменший відсоток СФ $17,0 \pm 2,3\%$ при використанні цієї концентрації складали агрегати з діаметром 150–300 мкм.

Зовсім інша тенденція спостерігалася при використанні посівної концентрації 2×10^5 кл/мл. Зокрема, формувались $70,0 \pm 2,5\%$ переважно округлих СФ, діаметр яких становив 80–150 мкм.

Використання посівної концентрації 5×10^5 кл/мл приводило до значущого ($p < 0,05$) збільшення кількості СФ до $48,0 \pm 0,3\%$ з діаметром 150–300 мкм. У більшості випадків (50%) спостерігалось їх злиття у агрегати більш ніж 1000 мкм у діаметрі, що є неприйнятним для подальшого культивування у зв'язку зі зниженням дифузії поживних речовин у внутрішні шари СФ. Необхідно зазначити, що при концентраціях 1×10^5 і 2×10^5 кл/мл злиття СФ складало не більше 10%.

В роботах [113, 148] було доведено, що структура та розмір СФ залежить від їхньої життєздатності. Тому в подальших дослідженнях було з'ясовано вплив посівної концентрації L929 на життєздатність сформованих СФ.

Усвідомлюючи, що метод оцінки за трипановим синім має обмеження, особливо при дезінтеграції СФ трипсином, для дослідження кількості нежиттєздатних (некротичних) клітин безпосередньо у складі СФ був використаний ДНК-барвник PI, який проникає у клітини тільки за умов пошкодженої мембрани (рис. 3.6). Відомо, що фізіологічна загибель клітин характеризується різноманітними морфологічними та біохімічними змінами ядра. Зокрема, під впливом ендонуклеаз відбувається фрагментація ДНК, яка вважається біохімічним маркером апоптозу та клітинної загибелі [149].

Оцінку життєздатності СФ на 3 та 7-му добу культивування проводили за допомогою флуоресцентної мікроскопії методом забарвлення з ДНК-зондами Hoechst 33342 та пропідій йодидом (PI).

В результаті проведених досліджень було з'ясовано, що на 3-ю добу культивування значущої ($p < 0,05$) різниці у забарвленні ядер клітин СФ фарбниками Hoechst 33342 та PI не спостерігалось при всіх початкових концентраціях клітин (рис. 3.6). На 7-му добу кількість PI-забарвлених СФ при посівних концентраціях 1×10^5 та 2×10^5 кл/мл також не мала значущих коливань і становила $20,2 \pm 0,9\%$ та $13,1 \pm 0,9\%$ відповідно. Інша тенденція спостерігалась при концентрації 5×10^5 кл/мл: кількість некротичних клітин значуще ($p < 0,05$) збільшувалась до $40,6 \pm 1,97\%$ ($p < 0,05$) (рис. 3.7).

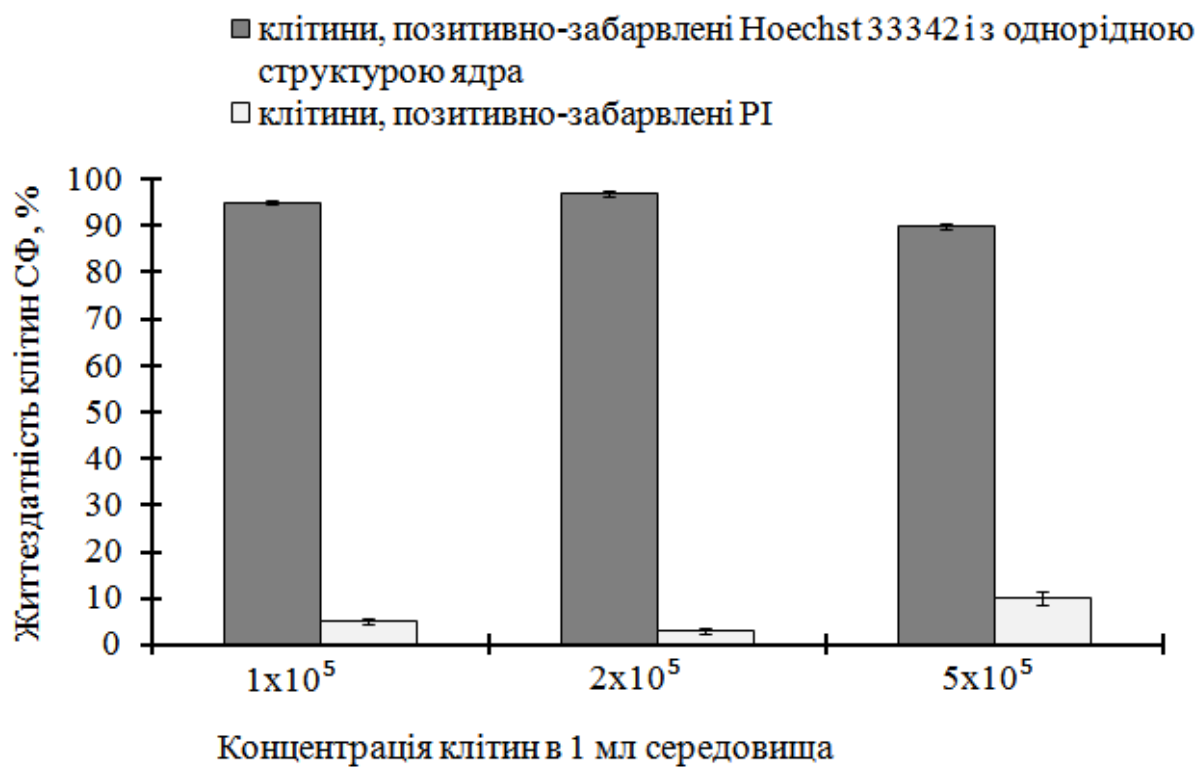


Рис. 3.6. Життєздатність і морфологія ядер клітин у складі СФ на 3-ю добу культивування за даними конфокальної мікроскопії після забарвлення PI і Hoechst 33342.

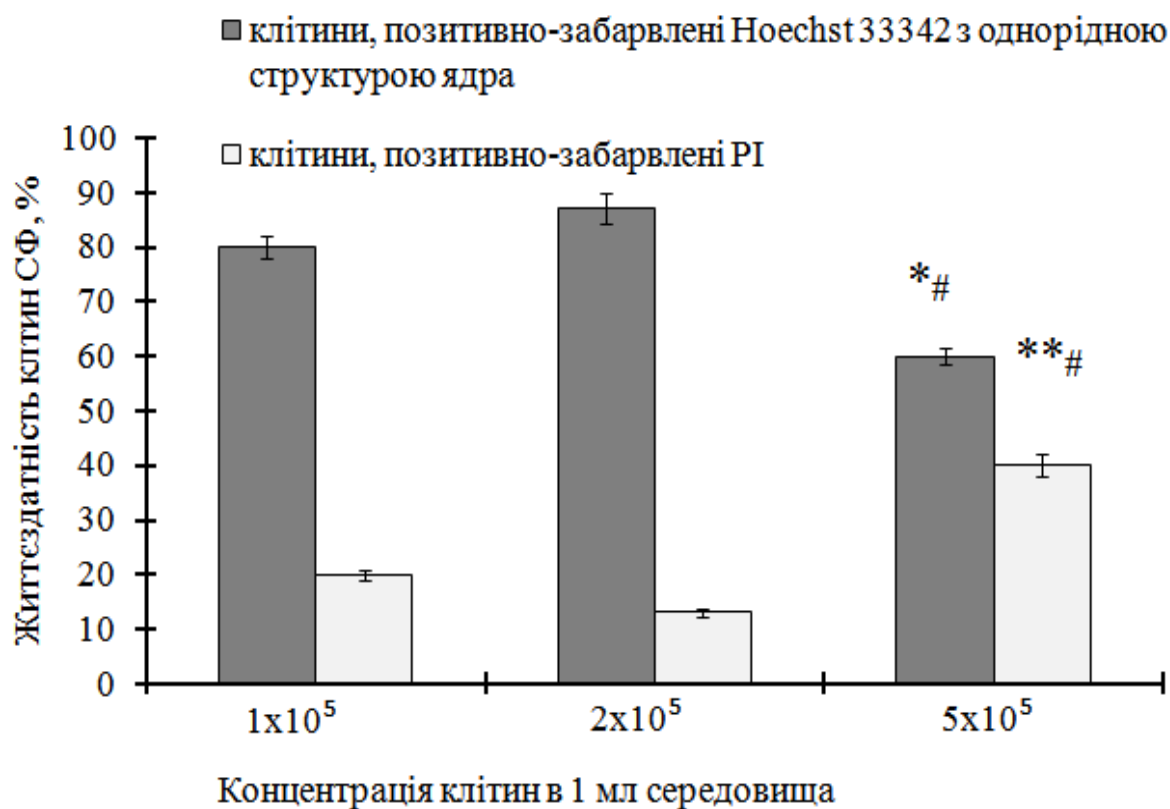


Рис.3.7. Життєздатність і морфологія ядер клітин у складі СФ на 7-му добу культивування за даними конфокальної мікроскопії після забарвлення PI і Hoechst 33342; ^{*#} – показник значуще відрізняється по відношенню до клітин забарвлених Hoechst 33342 при концентрації 1×10^5 і 2×10^5 кл/мл ($p < 0,05$); ^{**#} – показник значуще відрізняється по відношенню до клітин забарвлених PI при посівній концентрації 1×10^5 і 2×10^5 кл/мл ($p < 0,05$).

Взагалі, при використанні посівної концентрації 1×10^5 і 2×10^5 кл/мл біля 80% фібробластів у складі СФ на 7-му добу культивування мали округлу форму ядра з однорідною структурою без ознак фрагментації і ушкодження (рис. 3.8).

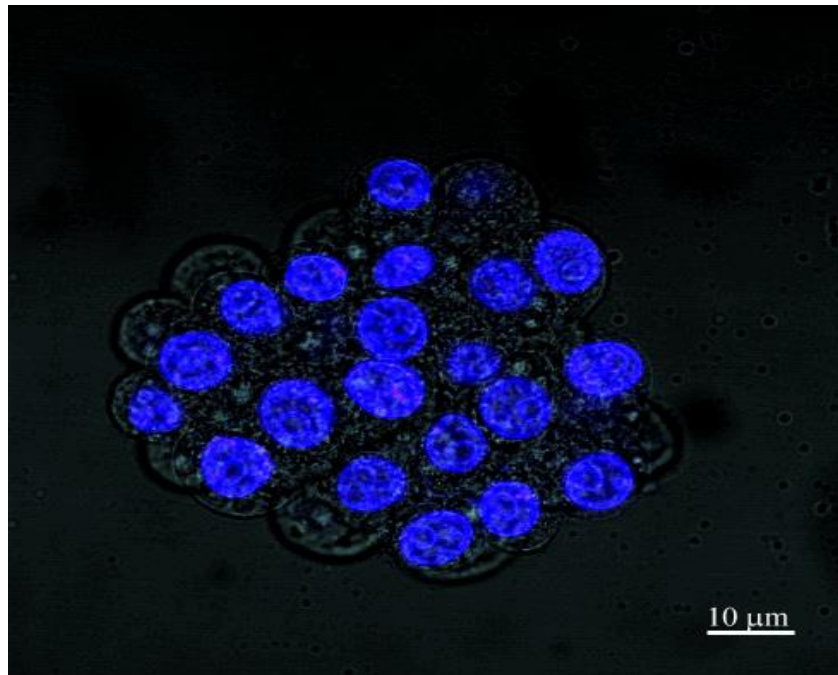


Рис. 3.8. Морфологія ядер у складі СФ на 7-му добу культивування після фарбування флуоресцентним барвником Hoechst 33342 за даними конфокальної мікроскопії при посівній концентрації 2×10^5 кл/мл. Флуоресцентна мікроскопія.

Приймаючи до уваги висновки багатьох попередніх робіт інших авторів [150], показники життєздатності не гарантують збереження функціонального потенціалу СФ, тому окрім структурної повноцінності необхідно оцінювати їх певні функціональні показники. Відомо, що одним з показників функціональної активності і повноцінності 3D-культур є властивість СФ до адгезії. Зокрема, у роботі [148] було показано, що дрібні та пухкі агрегати, утворені з нервових клітин, в процесі культивування практично не прикріплюються до поверхні. Автори [151] довели залежність адгезивних властивостей клітин у складі сфероїдів від умов культивування.

Нами було вивчено вплив посівної концентрації на здатність СФ до адгезії після перенесення на 3 та 7-му добу на адгезивну поверхню культивування. В результаті проведених досліджень було встановлено, що посівна концентрація значно впливала на цей показник. Так, при концентрації 5×10^5 кл/мл кількість прикріплених СФ 3-ї доби культивування

у 1,8 та 2,0 рази була менше у порівнянні з показником при використанні посівних концентрацій 1×10^5 та 2×10^5 кл/мл відповідно (рис. 3.9). При збільшенні термінів культивування СФ до 7 діб спостерігалась подібна тенденція.

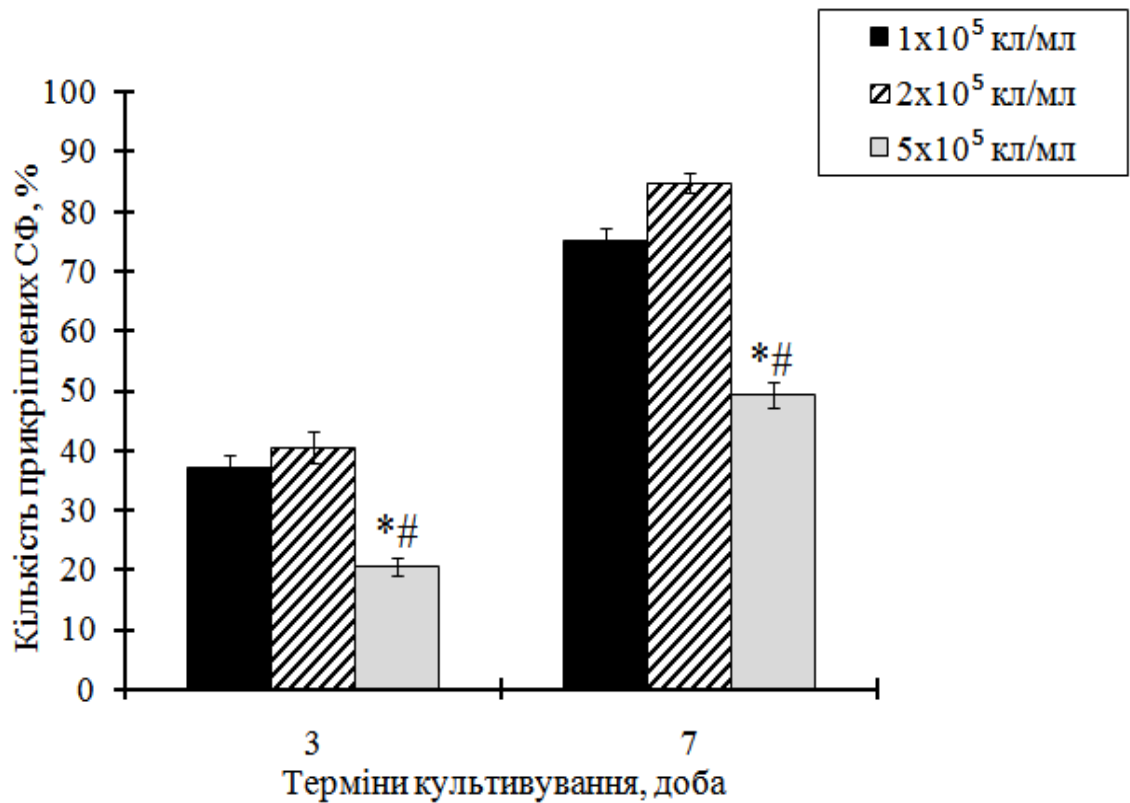


Рис. 3.9. Кількість прикріплених СФ на 3 і 7-му добу культивування при використанні посівних концентрацій 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 кл/мл; *, # – відмінності статистично значущі у порівнянні з концентраціями 1×10^5 кл/мл та 2×10^5 кл/мл ($p < 0,05$).

Відомо, що на обмін речовин та дифузію сполук у СФ впливає термін їхнього культивування [5]. Тому в подальших дослідженнях було проведено аналіз зміни діаметра СФ у залежності від термінів культивування на 7, 14 і 21 добу при концентрації 2×10^5 кл/мл (рис. 3.10).

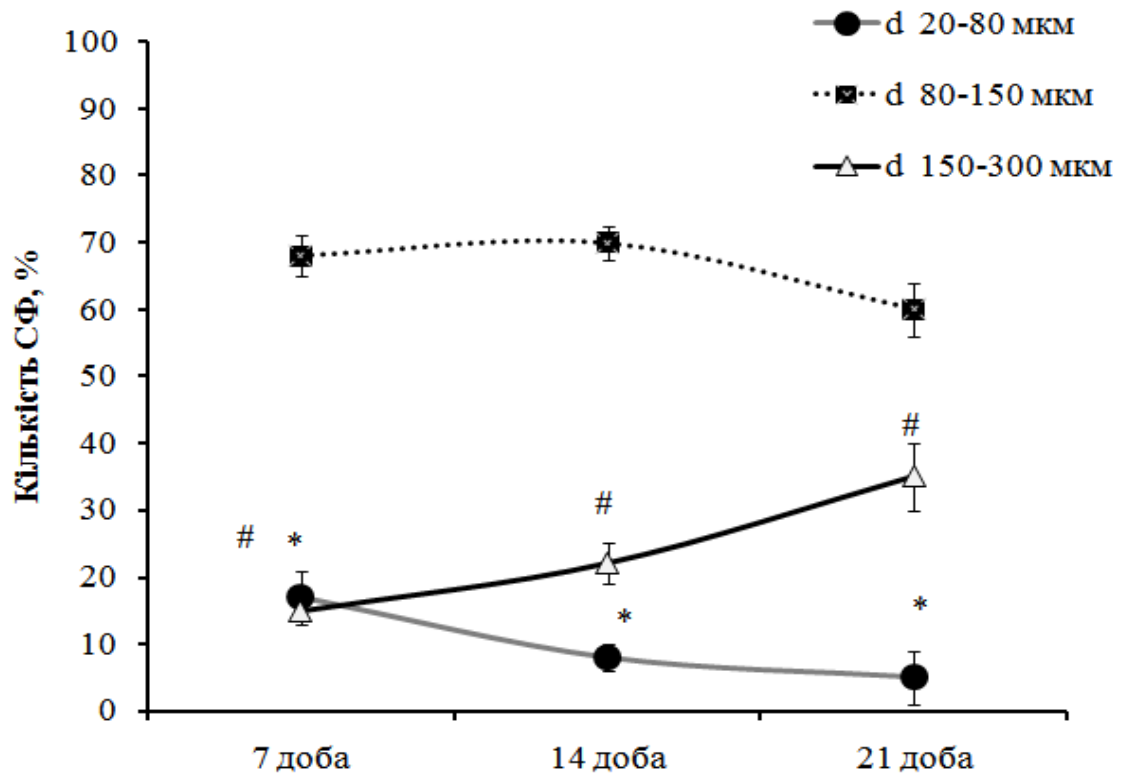
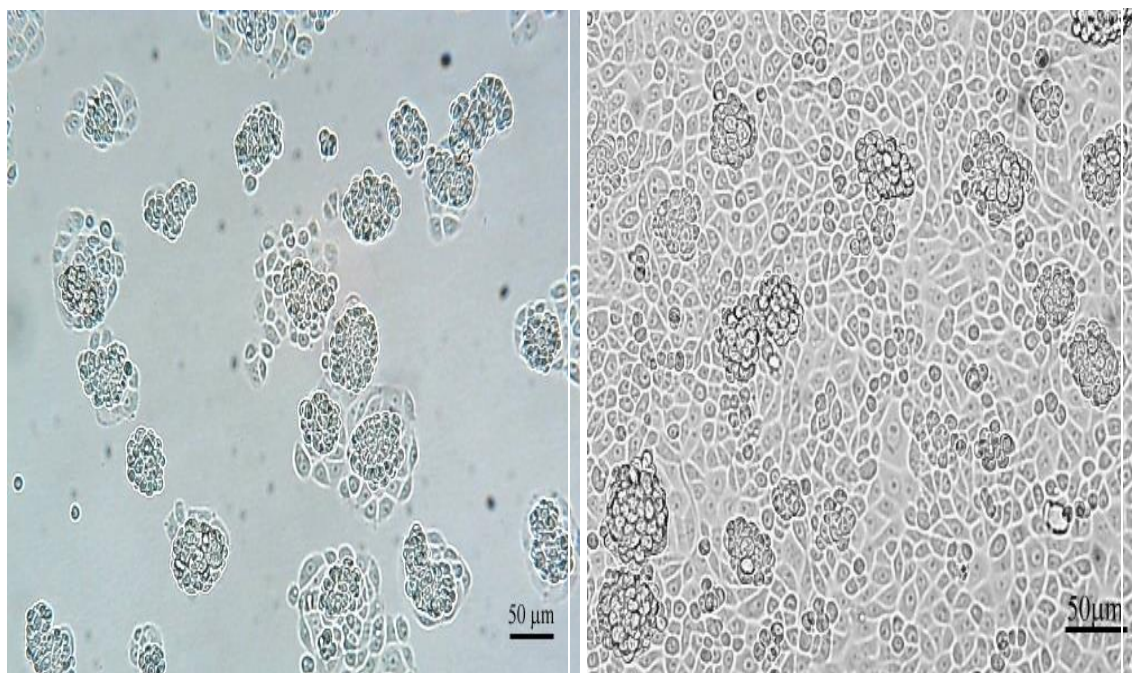


Рис. 3.10. Вплив терміну культивування на діаметр СФ, сформованих клітинами лінії L929 у посівній концентрації 2×10^5 кл/мл; *, # – відмінності статистично значущі по відношенню до СФ з діаметром 80–150 мкм ($p < 0,05$).

Як видно з рис. 3.10 найбільші зміни протягом культивування відбувалися стосовно кількості СФ з діаметрами 20–80 і 150–300 мкм. Так, кількість СФ з діаметром 20–80 мкм на 14 і 21-у добу культивування зменшувалась у 2,1 і 3,4 рази відповідно порівняно з 7-ю добою. Відсоток СФ з діаметром 80–150 мкм протягом 21-ї доби культивування складав в середньому 60–70%. Кількість СФ з діаметром 150–300 мкм збільшувалась на 14 і 21-у добу культивування у 1,5 і 2,3 рази відповідно у порівнянні з 7-ю добою (рис. 3.10).

За умов перенесення СФ на адгезивну поверхню, зо всіх СФ, незалежно від терміну культивування та діаметра, мігрували клітини, які з часом створювали ділянки моношару (рис. 3.11).



а

б

Рис. 3.11. Моношар утворений клітинами після перенесення на адгезивну поверхню СФ 7-ї доби культивування: а – через 5 годин; б – через 24 години. Фазово-контрастна мікроскопія.

Підсумовуючи отримані результати, можна відзначити, що посівна концентрація клітин лінії L929 суттєво впливає на процеси сфероїдоутворення. Основні етапи сфероїдоутворення для клітин цієї лінії узгоджуються з досвідом багатьох попередніх дослідників [33, 89, 90, 92]. Відомо, що у низькоадгезивних умовах, дезінтегровані у середовищі клітини спочатку 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 приводить до зміцнення зв'язків та ущільнення агрегатів, які набувають правильної сферичної форми.

Виходячи з цієї концепції, кількість клітин при посіві повинна бути достатньою для перших ключових кроків їх об'єднання в агрегати, а функціональний потенціал високим для підтримки процесів синтезу білків міжклітинної адгезії та формування щільних міжклітинних контактів. Відомо,

що при недостатній посівній концентрації для формування СФ потрібно більше часу, утворені агрегати при цьому переважно дрібні та пухкі [113, 148]. В свою чергу, передозування посівної концентрації призводить до формування величезних за розміром агрегатів, збільшення некрозу клітин у їхньому складі та зниження їх функціональної активності [33, 140].

Отримані нами результати підтверджують цю закономірність й для клітин лінії L929. Зокрема, доведено, що життєздатність СФ значно зменшувалась при збільшенні посівної концентрації до 5×10^5 кл/мл. На основі результатів досліджень було зроблено висновок, що посівна концентрація 2×10^5 кл/мл є оптимальною для отримання 70% СФ з діаметром 80–150 мкм та з високим функціональним потенціалом. Можливо, це пов'язане з тим, що в таких умовах до складу СФ входить оптимальна кількість клітин, яка не запобігає їх повноцінному забезпеченню поживними речовинами у всіх шарах СФ.

Таким чином, на усіх подальших етапах роботи для отримання СФ з клітин лінії L929 було використано посівну концентрацію 2×10^5 кл/мл.

3.3 Дослідження секреторних характеристик клітин лінії L929 при культивуванні у вигляді моношару та сфероїдів

Раніше було встановлено, що клітини культивовані у складі СФ, відрізняються від моношарових культур за морфологічними, фенотиповими та проліферативними характеристиками [58]. Проте, досліджень функціональної активності клітин за умов 2D та 3D-культивування проведено недостатньо.

На наступному етапі нашої роботи методом рідинної гель-хроматографії нами було вивчено білково-пептидний спектр культурального середовища (кондиціонованого середовища) при тривимірному культивуванні у порівнянні з моношаровим. Потрібно відзначити, що базове середовище культивування містить широкий спектр білків та пептидів.

Клітини, які перебувають у ньому, використовують частку поживних компонентів та секретують свій унікальний профіль речовин.

Для проведення порівняльного аналізу використовували культури 7-ї доби культивування (посівна концентрація 2×10^5 кл/мл).

Результати досліджень наведені на рис. 3.12 та в таблиці 3.2.

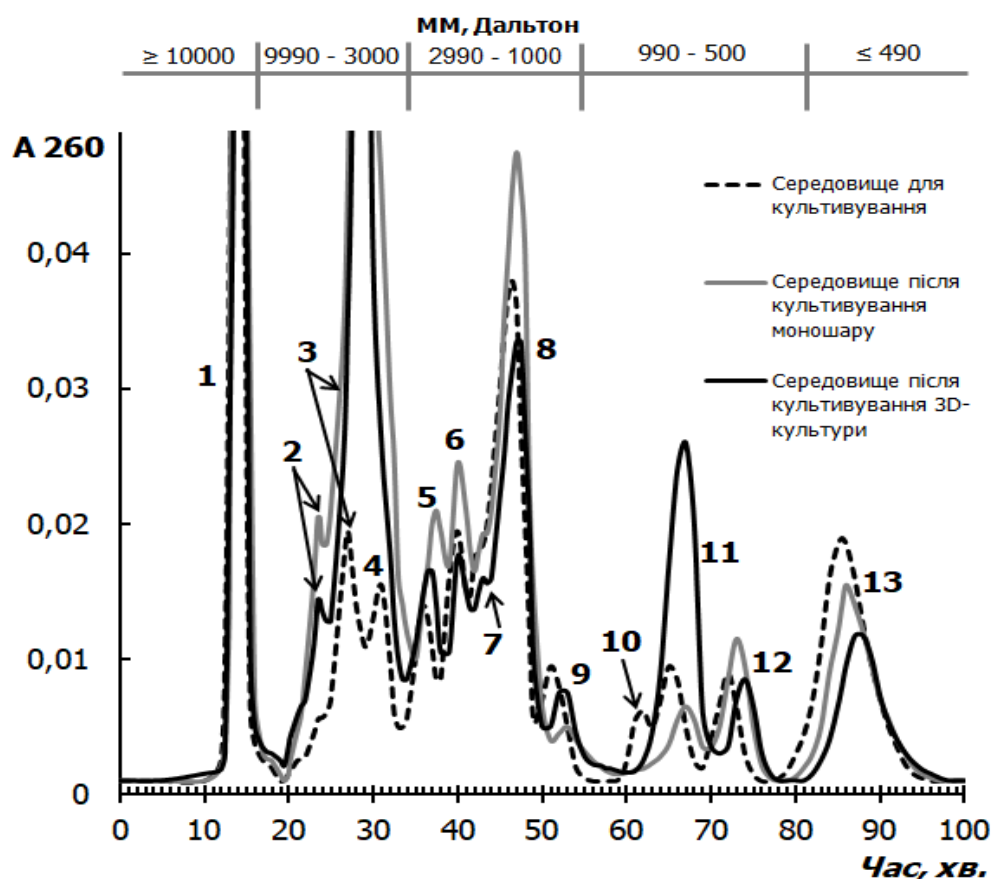


Рис. 3.12. Типові хроматограми середовищ після 7-добового культивування клітин лінії L929 у вигляді моношару або СФ. По осі абсцис – час утримування (хвилини); по осі ординат – поглинання при довжині хвилі 260 нм (A 260); 1–13 – виявлені піки.

З рис. 3.12 та табл. 3.2 видно, що хроматографічні профілі усіх досліджених середовищ мали по 10–11 основних піків та різнилися за загальною площею під піками.

Аналіз пептидного складу живильних середовищ після 7-добового культивування клітин лінії L929 у вигляді моношару або СФ

Пік	Молекулярна маса, Да	Площа піків, мм ²		
		Базове живильне середовище	Середовище від культури у вигляді моношару	Середовище від культури у вигляді СФ
1	≥ 12 000	54,14 ± 0,38	41,37 ± 0,80	43,16 ± 0,40
2	5691–5657	–	2,70 ± 0,11	2,23 ± 0,24
3	4345–3791	4,75 ± 0,18	#35,20 ± 0,26	#28,37 ± 0,16
4	3184	3,47 ± 0,10	–	–
5	2301–2205	2,81 ± 0,09	#1,45 ± 0,18	#1,48 ± 0,21
6	1867–1821	3,55 ± 0,07	#2,24 ± 0,12	#1,75 ± 0,30
7	1600	–	–	1,41 ± 0,09
8	1328–1302	13,13 ± 0,34	#9,24 ± 0,19	#7,25 ± 0,27
9	1067–1045	2,01 ± 0,09	#0,21 ± 0,08	*#0,84 ± 0,10
10	781	1,04 ± 0,11	–	–
11	718–705	2,63 ± 0,41	#0,92 ± 0,11	*#6,66 ± 0,39
12	621–616	2,41 ± 0,12	#1,90 ± 0,09	#1,98 ± 0,11
13	498–490	10,07 ± 0,23	#4,78 ± 0,18	#4,88 ± 0,15
Загальна площа піків, мм ²		2125,99 ± 8,45	#3043,06 ± 2,92	*2304,70 ± 4,06

Примітка: # – відмінності статистично значущі по відношенню до базового живильного середовища ($p < 0,05$); * – відмінності статистично значущі по відношенню до середовища після культивування моношару ($p < 0,05$).

Так, у середовищі після культивування у 3D-форматі, загальна площа під піками, що прямо пропорційна загальній кількості речовин у середовищі, суттєво не відрізнялася від контролю (базове середовище до культивування), але цей показник був нижче у порівнянні з моношаровою культурою у 1,3 рази ($2304,70 \pm 4,06$ та $3043,06 \pm 2,92$ мм² відповідно). При цьому кількісний і якісний склад пептидів в середовищах після моношарового і об'ємного культивування мали суттєві відмінності.

Як видно з таблиці 3.2 серед основних піків домінували піки 1 (середня молекулярна маса ≥ 12000 Да), 3 (середня молекулярна маса речовин близько 3791–4345 Да), 8 (середня молекулярна маса близько 1302–1328 Да) та 13 (середня молекулярна маса сполук складала близько 490–498 Да). Основним за площею для всіх варіантів виявився пік 1, який складав у базовому середовищі $54,14 \pm 8,45\%$ від загальної площі під піками, тоді як у середовищі після культивування моношару – $41,37 \pm 2,92\%$, у середовищі після культивування СФ – $43,16 \pm 0,40\%$.

Також суттєва різниця виявилася у піку 3, який містить пептиди у діапазоні молекулярних мас близько 4345–3791 Да. При цьому у контролі пік 3 мав найменше значення – $4,75 \pm 0,18\%$, що у 7,4 та 6 разів нижче ніж в середовищах після культивування моношару та СФ.

Інша картина спостерігалась по відношенню до піків 5, 9 та 13. Зокрема, пік 5 (2301–2205 Да) складав в контролі $2,81 \pm 0,09\%$, що в 1,9 разів було більше даного показника у порівнянні з 2D і 3D-форматом культивування. Кількість пептидів у діапазоні молекулярних мас 1067–1045 та 498–490 Да в базовому середовищі також достовірно ($p < 0,05$) перевищували відповідні показники після 2D та 3D-форматів.

При аналізі піку 11 (молекулярна маса 705–718 Да), який зареєстровано в усіх трьох варіантах середовищ, виявилось, що в контролі кількість пептидів даного піку перевищувала показники моношарового культивування у 2,85 рази. При цьому показник при моношаровому культивуванні вірогідно зменшувався у 7,2 рази відносно 3D-культивування. Піки 2 (5657–5691 Да) і

7 (1600 Да) взагалі не були виявлені в базовому середовищі. Пептиди з молекулярними масами 3184 та 781 Да не були зареєстровані в середовищах після моношарового та об'ємного культивування.

Таким чином, при порівнянні профілю секреції та кількості пептидів в середовищах після культивування протягом 7 діб у різних умовах виявлені вірогідні відмінності. Особливу увагу привертають піки 7 (1600 Да), а також 9 (1067–1045 Да) і 11 (705–718 Да). Зокрема, після культивування в 3D-умовах встановлена поява піку 7 з відсотковим вмістом від загальної площі $1,41 \pm 0,09\%$. При аналізі піку 9 (1067–1045 Да) встановлено збільшення пептидів у 4 рази саме після об'ємного культивування. Також суттєві відмінності у залежності від умов культивування були зареєстровані у діапазоні 705–718 Да (пік 11). Зокрема, після культивування клітин у вигляді моношару, пік 11 складав $0,92 \pm 0,11\%$ від 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 як в 2D, так і в 3D-форматі відносно показників базового середовища (табл. 3.2).

Встановлені в наших дослідженнях розбіжності щодо пептидного складу середовищ після культивування клітин у вигляді СФ у порівнянні з моношаровою культурою узгоджуються з результатами досліджень [152, 153]. Зокрема, в роботі [153] було показано, що синтез фібробластами білків позаклітинного матриксу суттєво відрізняється при 2D та 3D-культивуванні.

Висновки за розділом:

1. Клітини лінії L929 здатні утворювати СФ за умов культивування на низькоадгезивній поверхні. Розмір та функціональні властивості СФ залежать від посівної концентрації клітин. Посівна концентрація клітин 2×10^5 кл/мл є оптимальною для отримання СФ діаметром 80–150 мкм, до складу яких входять життєздатні клітини з високим функціональним потенціалом.

2. Здатність до адгезії СФ сформованих при використанні посівних концентрацій 1×10^5 та 2×10^5 кл/мл значуще ($p < 0,05$) перевищує даний показник для СФ, утворених при використанні концентрації 5×10^5 кл/мл незалежно від терміну культивування СФ (3 або 7-ї доби).
3. Профіль секреції та кількість речовин білково-пептидної природи відрізняється у культурах клітин лінії L929 в залежності від культивування у вигляді моношару або СФ.

Публікації за розділом [14, 15, 19, 20, 21].

РОЗДІЛ 4

ТЕОРЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ РЕЖИМІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ КУЛЬТИВУВАННЯ

4.1 Динаміка проникання молекул води і диметилсульфоксиду у поодинокі клітини лінії L929 та утворені з них сфероїди

Наразі існує низка робіт, в яких СФ різного походження заморожували зі швидкостями охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ або нижче у присутності 5–30% кріопротектора ДМСО з додаванням сироватки або без неї [8, 9, 105, 106, 115, 118, 119, 121]. Однак вибір концентрації ДМСО та швидкості охолодження відбувався у цих роботах емпірично, без застосування ґрунтовного підходу, заснованого на розумінні ролі проникності мембран клітин у складі СФ для води та кріопротектору, протікання процесів масообміну між клітинами і середовищем на всіх етапах кріоконсервування. Зневоднення і насичення біологічних об'єктів кріопротекторами є одними з найважливіших процесів на етапі охолодження під час кріоконсервування. Коефіцієнти проникності плазматичної мембрани для води та кріопротектору визначають часові характеристики масопереносу крізь клітинні мембрани, а отже і ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації, яка є вирішальною умовою виживання/загибелі клітини [11, 93, 94, 123, 124, 131, 132]. Оскільки структурна організація СФ є складнішою у порівнянні з ізольованою клітиною, параметри дифузії сполук, зокрема кріопротекторів і молекул води у СФ, будуть відрізнятися від таких для клітинної суспензії.

Авторами робіт [11, 131, 132] запропоновано теоретичний підхід на основі фізико-математичного моделювання процесів зневоднення і проникності кріопротектору для визначення оптимальних режимів кріоконсервування поодиноких клітин різного походження, який підтвердив

свою доцільність і ефективність. Тому, в представленій роботі запропоновано вперше використати цей підхід для багатоклітинних СФ з метою визначення оптимального часу експозиції з кріопротектором, швидкості і кінцевої температури охолодження під час кріоконсервування.

Форму клітинного СФ можна апроксимувати еліпсоїдом обертання, окремим випадком якого є сфера, що приймається у різних існуючих математичних моделях [7, 8, 129]. СФ можна розглядати як цілісний об'єкт *in toto*. Інтегральні характеристики, що визначають часові параметри масообміну між СФ і середовищем можна розглядати як аналоги коефіцієнтів проникності мембран окремих клітин.

Визначення і порівняння параметрів проникності здійснювали на поодиноких клітинах лінії L929 і СФ з них із діаметром 80–150 мкм, оскільки кількість СФ із таким розміром при використанні концентрації 2×10^5 кл/мл незалежно від терміну культивування складала біля 70% (див. розділ 3). Для розрахунку коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин L929 та СФ з них за даними волюмометрії з використанням фізико-математичного моделювання процесів масопереносу були визначені чисельні значення осмотично неактивного об'єму α та поверхнево-об'ємного відношення γ .

Залежність відносного об'єму СФ (10 діб культивування) у порівнянні з поодинокими клітинами від оберненого приведенного осмотичного тиску у розчинах NaCl з концентраціями 0,5; 1; 2,0 моль/л, представлено на рис. 4.1.

Згідно з графіками, осмотично неактивний об'єм поодиноких клітин L929 становить $\alpha_{\text{кл}} = 0,32$. Для СФ після культивування протягом 10 діб цей показник збільшувався та дорівнював $\alpha_{\text{сф}} = 0,41$. Відомо, що формування СФ відбувається на основі міжклітинної адгезії, яка приводить до підвищення експресії білків міжклітинної адгезії (кадгерину, конексину та панексину) і ущільнення клітин у складі СФ протягом культивування [39], наслідком чого, зокрема, може бути збільшення осмотично неактивного об'єму.

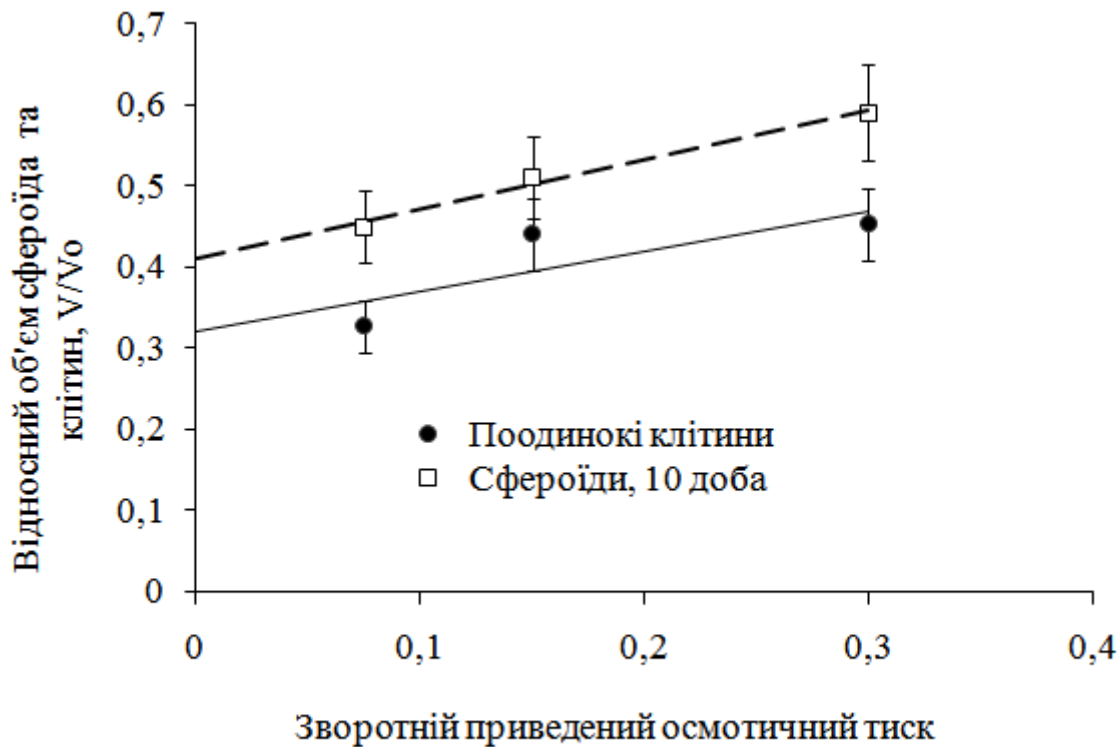


Рис. 4.1. Зміна відносного об'єму поодиноких клітин L929 (----) та СФ 10-ї доби культивування (—) залежно від зворотного приведенного осмотичного тиску розчину NaCl при температурі 15°C.

На наступному етапі вивчали зміни об'єму поодиноких клітин, СФ (10 діб культивування) *in toto* та клітин у найбільш показових з точки зору проникності шарах СФ (зовнішньому та внутрішньому) під час інкубації у 1М ДМСО (рис. 4.2). Динаміка показника була схожою для всіх вищеназваних об'єктів та характеризувалася різким зменшенням відносного об'єму на початкових етапах інкубації у кріопротекторному розчині та повільним відновленням об'єму на подальшому терміні інкубації.

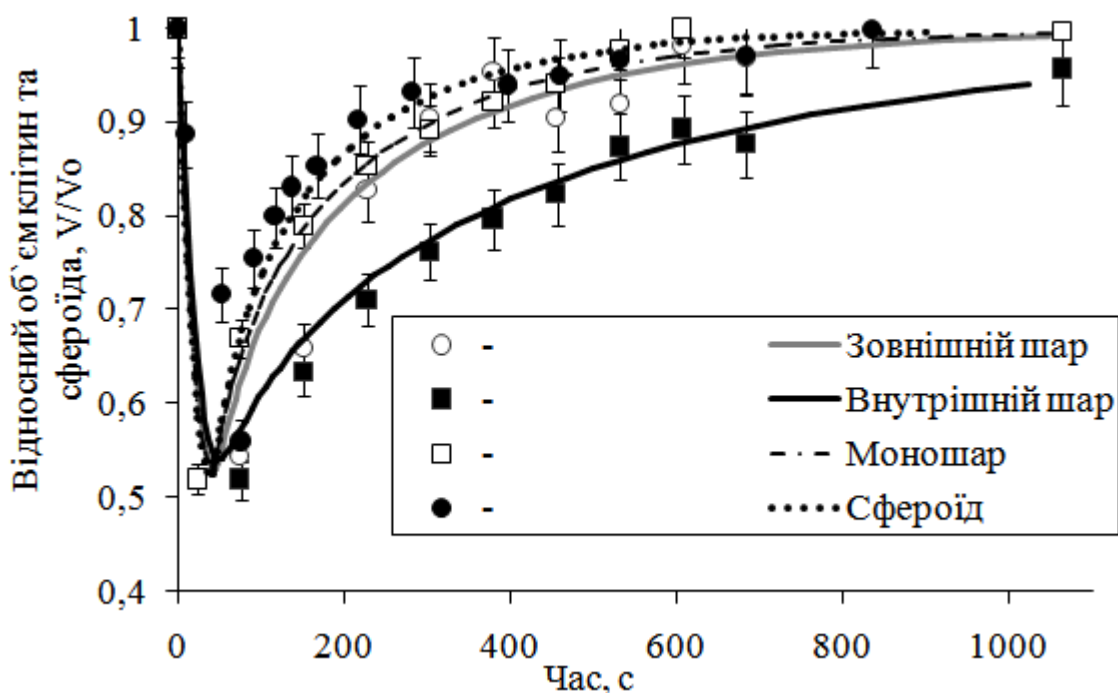


Рис. 4.2. Зміна відносного об'єму СФ, поодиноких клітин L929, клітин у зовнішньому та внутрішньому шарах СФ в 1М ДМСО, приготовленому на фізіологічному розчині при температурі 15°C.

У таблиці 4.1 представлені розраховані коефіцієнти проникності для води (L_p) та ДМСО (k_p) плазматичних мембран поодиноких клітин L929, СФ *in toto*, клітин у зовнішньому та внутрішньому шарах СФ.

Таблиця 4.1

Коефіцієнти проникності для води та кріопротектору ДМСО для поодиноких клітин L929, СФ *in toto* та клітин у зовнішньому та внутрішньому шарах СФ за температури 15°C.

Об'єкт	Коефіцієнти проникності	
	H ₂ O ($L_p \times 10^{14} \text{ м}^3/\text{Н с}$)	ДМСО ($k_p \times 10^8 \text{ м/с}$)
Поодинокі клітини	$2,32 \pm 0,28$	$6,47 \pm 0,28$
СФ <i>in toto</i>	$5,64 \pm 0,35$	$33,30 \pm 0,14$
Зовнішній шар СФ	$1,38 \pm 0,26^*$	$5,44 \pm 0,22$
Внутрішній шар СФ	$1,21 \pm 0,22^*$	$1,71 \pm 0,14^{* \#}$

Примітка: показники значуще ($p < 0,05$) відрізняються порівняно з поодинокими клітинами (*) та клітинами у зовнішньому шарі СФ (#).

При порівнянні параметрів проникності для поодиноких клітин та клітин у складі СФ були визначені суттєві відмінності у залежності від локалізації. Так, значення коефіцієнтів проникності для молекул води у клітині зовнішнього та внутрішнього шару СФ у 1,7 і 1,9 рази відповідно були меншими порівняно з поодинокими клітинами.

Ідентична тенденція була виявлена стосовно проникнення молекул ДМСО у клітини зовнішнього і внутрішнього шару СФ: коефіцієнти проникності зменшувались у 1,2 і 3,8 рази відповідно порівняно з поодинокими клітинами.

В роботі навмисно не проводилося порівняння коефіцієнтів проникності для поодиноких клітин і СФ *in toto*. Приймаючи до уваги той факт, що для визначення коефіцієнтів проникності для СФ необхідно враховувати всю сумарну площу і наслідки ущільнення клітин у їхньому складі, порівняння значень проникності для СФ *in toto* не є коректним по відношенню до поодиноких клітин і потребує додаткових досліджень.

Цікаво, що коефіцієнти проникності для води у клітині зовнішнього та внутрішнього шарів СФ значуще не відрізнялися, тоді як для коефіцієнтів проникності ДМСО було відмічено досить значну різницю. Аналіз показав, що при збільшенні глибини розташування клітин у СФ відбувається зменшення значень k_p ДМСО у 3,2 рази відносно клітин зовнішнього шару. Відомо, що у СФ виділяють три клітинні шари (зовнішній, середній і внутрішній), в яких відрізняється дифузія поживних речовин і кисню залежно від глибини розташування клітин. Доведено, що при збільшенні глибини розташування міжклітинні контакти ущільнюються, а дифузія поживних речовин зменшується [39]. Виявлене в роботі зменшення проникності саме для молекул ДМСО у клітині внутрішнього шару СФ може бути пов'язано безпосередньо як з особливостями їхнього формування, так і зі ступенем гідрофобності ДМСО. Зокрема, відомо, що на здатність молекул ДМСО до проникання може впливати їх порівняно висока гідрофобність (коефіцієнт розподілу ДМСО між гідрофобною та гідрофільною фазами

становить 0,247) [154]. В свою чергу, наявність білків міжклітинної адгезії, великої кількості клітин, які контактують одна з одною, ущільнення клітин та зменшення доступної поверхні їх мембран можуть призводити до обмеження дифузії гідрофобних молекул у внутрішні шари СФ [39].

Висновки до розділу 4.1:

1. Осмотично неактивний об'єм СФ 10-ї доби культивування отриманих з клітин L929 за умов інкубації у розчинах NaCl складає $\alpha_{\text{сф}} = 0,41$, що в 1,3 рази перевищує показник, встановлений для поодиноких клітин лінії L929 ($\alpha_{\text{кл}} = 0,32$).

2. Коефіцієнт проникності для молекул ДМСО (за температури 15°C) у клітини внутрішнього шару СФ у 3,2 рази менше ($p < 0,05$) порівняно з показником для клітин зовнішнього шару СФ.

3. Значення коефіцієнтів проникності (за температури 15°C) для молекул води і ДМСО у клітини зовнішнього шару СФ у 1,7 та 1,2 рази відповідно та у клітини внутрішнього шару у 1,9 та 3,8 рази відповідно зменшувались порівняно з поодинокими клітинами.

4.2 Визначення параметрів проникності для клітинних сфероїдів у залежності від термінів культивування

У роботах [94, 123, 131, 132] було доведено, що чутливість клітин до фізико-хімічних процесів, які відбуваються протягом охолодження, суттєво залежить від їхньої структурної організації. Тому на наступному етапі роботи були проведені дослідження щодо з'ясування впливу терміну культивування на структуру СФ з клітин лінії L929 і відповідно коефіцієнти проникності для молекул води і ДМСО за умов експозиції у кріозахисному середовищі та охолодження. Аналіз показників проводили на 7, 14 та 21 добу культивування СФ.

Візуально після 7-ї доби культивування спостерігалось ущільнення СФ та набуття ними більш чітких контурів. Відсутність некротичних зон у СФ на

різних термінах культивування було підтверджено за допомогою отриманих на конфокальному мікроскопі пошарових сканів (рис. 4.3).

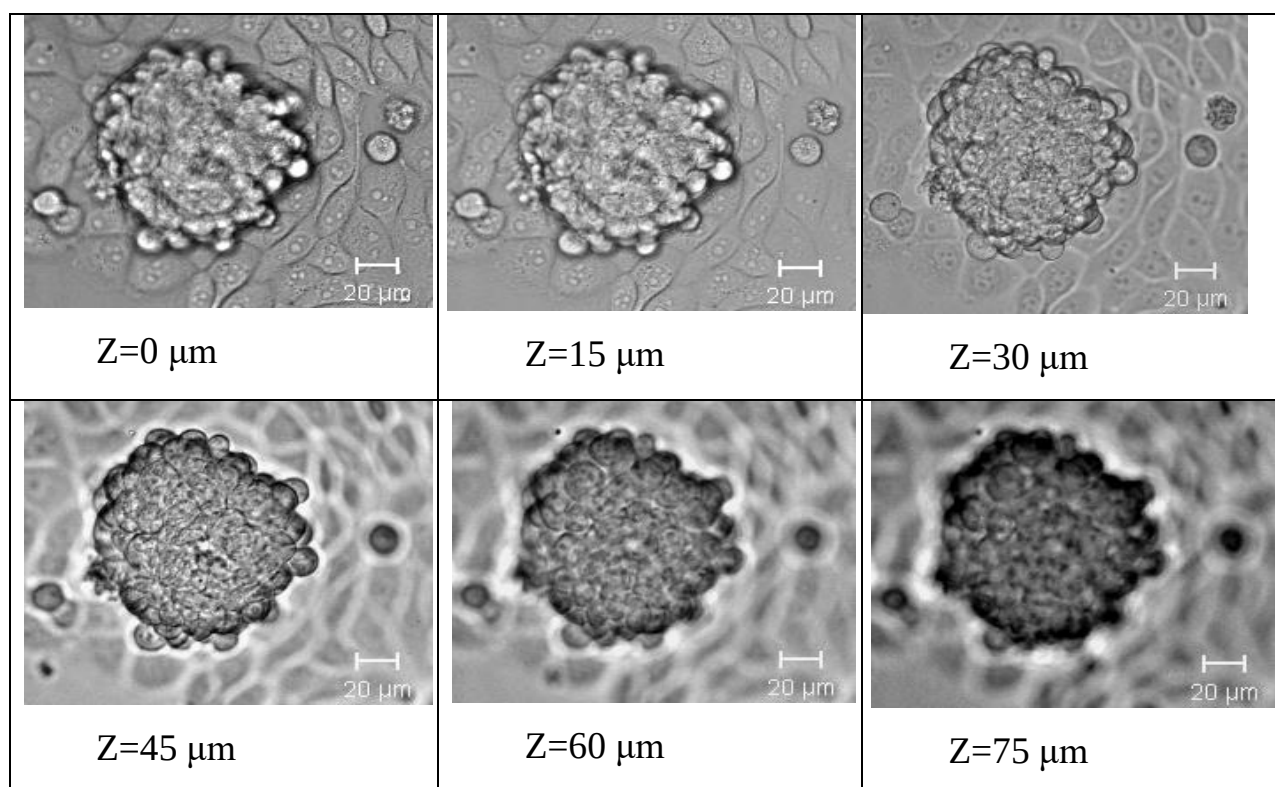


Рис. 4.3. Z-скани СФ на 14-у добу культивування (некротичних зон не виявлено).

Протягом 21-ї доби культивування формувались переважно (70%) сфероїди округлої форми з діаметром 80–100 мкм.

Для розрахунку параметрів проникності СФ *in toto* були визначені чисельні значення їх осмотично неактивного об'єму α . В результаті проведених досліджень було встановлено, що при збільшенні термінів культивування осмотично неактивний об'єм СФ збільшувався (рис. 4.4). Для СФ 7-ї доби культивування він становив 0,40, тоді, як для СФ 14 та 21-ї доби культивування – 0,47 та 0,54 відповідно. Після 21-ї доби значення показника значуще не змінювалося весь подальший термін культивування (34 доби). Таке збільшення осмотично неактивного об'єму СФ, очевидно, пов'язано з утворенням міжклітинних зв'язків і синтезом міжклітинного матриксу.

Таким чином, можна припустити, що формування міжклітинного матриксу у СФ з клітин лінії L929 практично завершується на 21-у добу культивування.

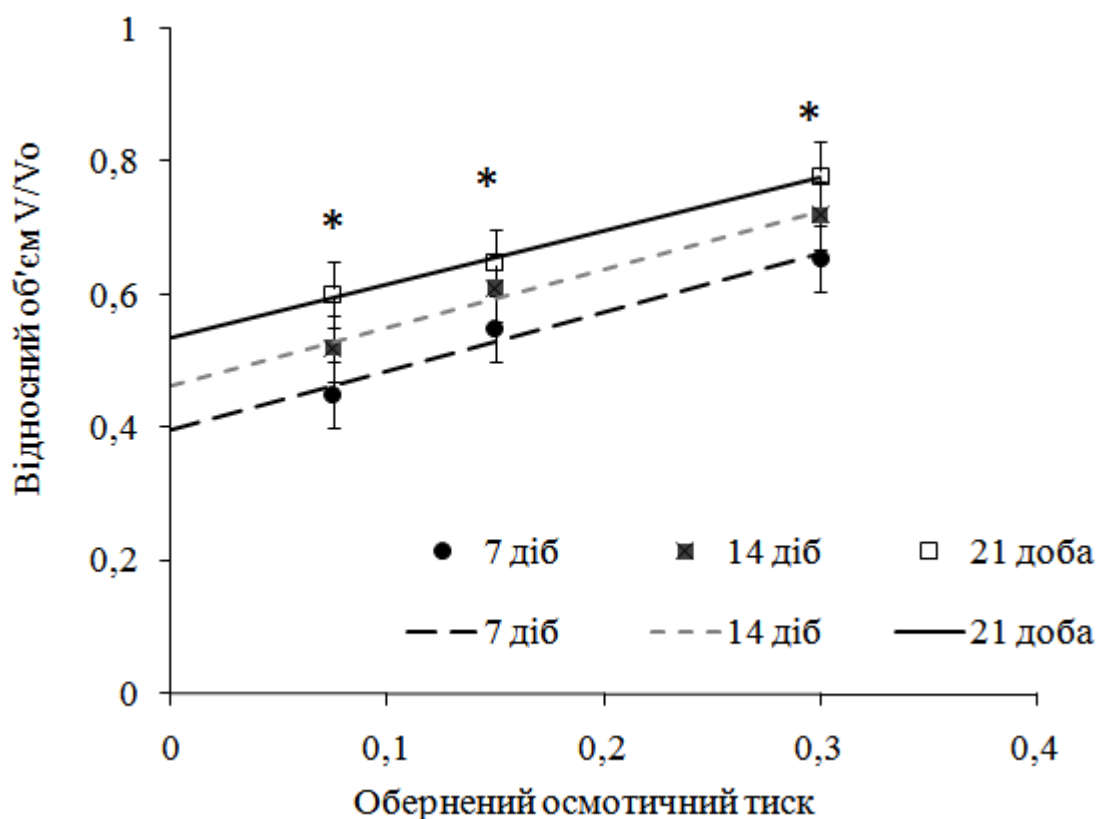
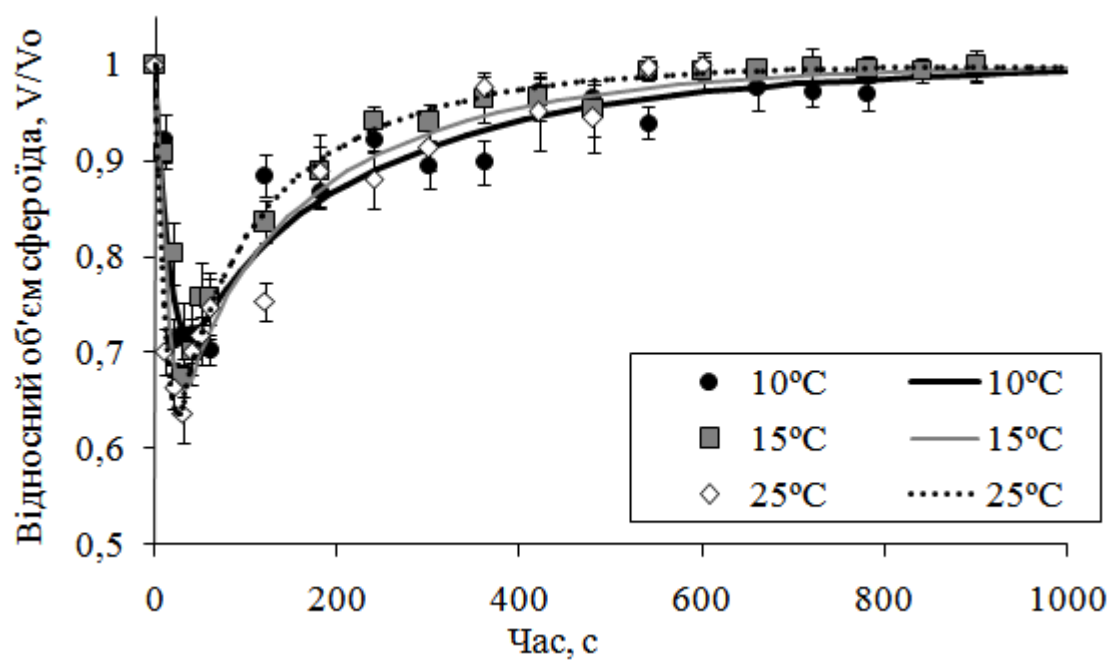


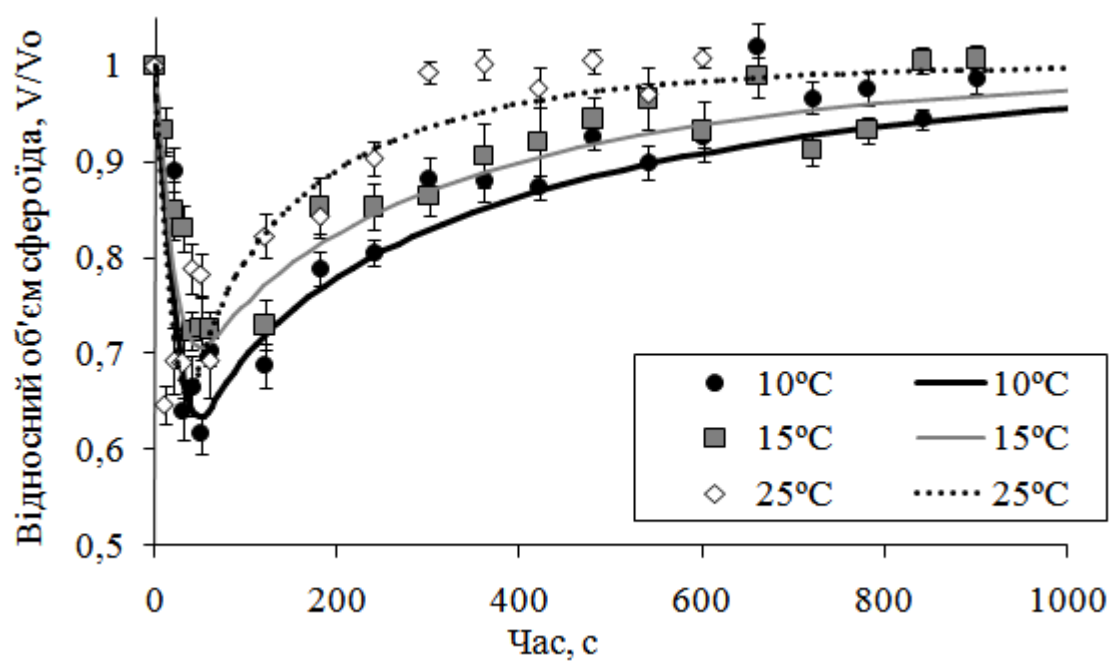
Рис. 4.4. Відносний осмотично неактивний об'єм СФ *in toto* на 7, 14 і 21 добу культивування; * – відмінності статистично значущі у порівнянні з 7-ю добою культивування ($p < 0,05$).

На рис. 4.5 представлено зміни відносного об'єму СФ *in toto* різних діб культивування (7, 14 та 21 діб) під час інкубації за різних температур (10, 15 та 25°C) в 1М розчині ДМСО, приготовленому на фізіологічному розчині.

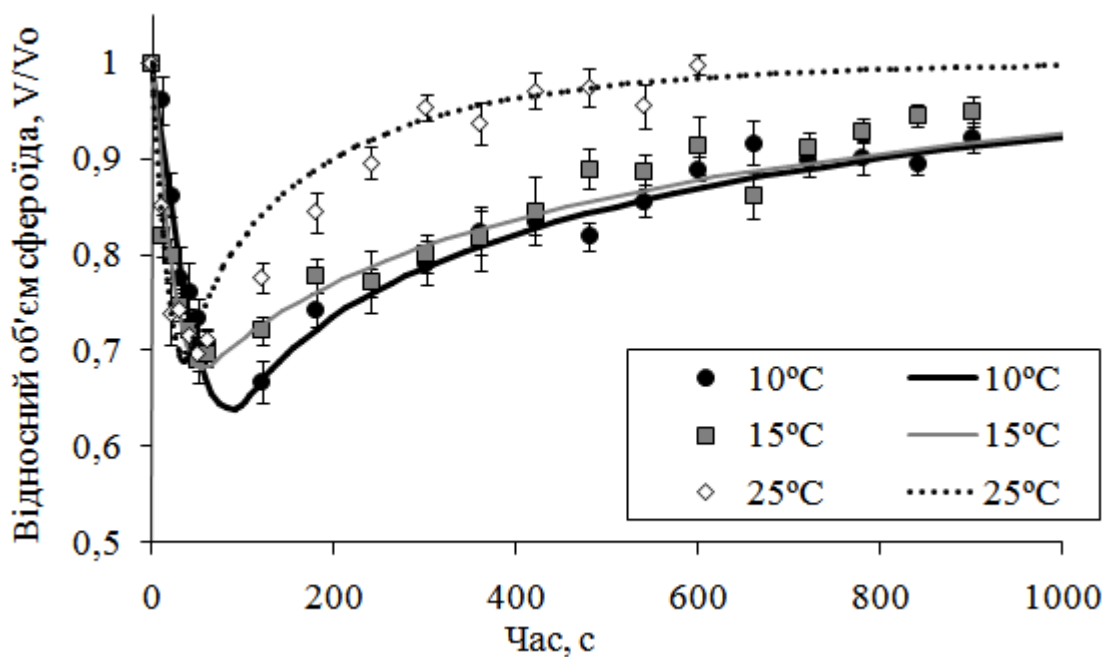
За апроксимацією експериментальних даних теоретичними кривими були знайдені інтегральні коефіцієнти проникності для води та ДМСО у СФ *in toto* різних діб культивування (табл. 4.2).



a



б



в

Рис. 4.5. Зміна відносного об'єму СФ *in toto* під час інкубації за різних температур (10, 15, 25°C) в 1М розчині ДМСО на різних термінах культивування: а – 7 діб; б – 14 діб; в – 21 доба.

Результати експериментів свідчать, що коефіцієнти проникності для води та ДМСО для СФ залежать від терміну культивування та температури інкубації у кріозахисному розчині. Показники проникності СФ зменшуються зі збільшенням термінів культивування. Зокрема, культивування СФ протягом 14 і 21-ї доби призводить до значущого ($p < 0,05$) зменшення коефіцієнтів проникності для води та ДМСО при всіх використаних температурах.

За температури кріозахисного середовища 10°C зниження коефіцієнтів проникності для води та ДМСО відбувалося у 2,3 та 5,7 рази для СФ 14-ї доби відповідно, тоді, як для СФ 21-ї доби – у 2,6 і 6,5 рази відповідно порівняно зі СФ 7-ї доби. Подібна тенденція спостерігалась й при інкубації за температур 15 та 25°C.

Таблиця 4.2

Коефіцієнти проникності для води ($L_p \times 10^{14}$, м³/Н·с) та ДМСО ($k_p \times 10^7$, м/с) у СФ *in toto* різних термінів культивування за умов інкубації у кріозахисному середовищі за температур 10, 15 та 25°C

Доба Культивування	Коефіцієнти проникності	Температура, °C		
		10	15	25
7	L_p	$7,93 \pm 0,74$	$8,93 \pm 1,6$	$13,71 \pm 2,11$
	k_p	$2,79 \pm 0,68$	$6,86 \pm 2,7$	$8,51 \pm 1,86$
14	L_p	$3,46 \pm 0,06^*$	$5,16 \pm 0,8^*$	$9,50 \pm 0,86^*$
	k_p	$0,49 \pm 0,14\#$	$0,96 \pm 0,68\#$	$4,12 \pm 1,62\#$
21	L_p	$3,03 \pm 0,13^*$	$4,59 \pm 1,78^*$	$8,71 \pm 1,14^*$
	k_p	$0,43 \pm 0,20\#$	$0,64 \pm 0,63\#$	$3,27 \pm 1,30\#$

Примітка: * – коефіцієнт проникності для води (L_p) статистично значуще відрізняється від показника для СФ на 7-му добу культивування ($p < 0,05$); # – коефіцієнт проникності для ДМСО (k_p) статистично значуще відрізняється від показника для СФ на 7-му добу культивування ($p < 0,05$).

Помітно, що досягнення вихідних значень об'єму СФ після додавання кріозахисного розчину з 1М ДМСО спостерігається за різний період часу, причому цей процес відбувається повільніше при зниженні температури кріозахисного середовища. На основі отриманих даних щодо відновлення вихідного об'єму СФ була визначена тривалість процедури їх інкубації в 1М ДМСО, необхідна для досягнення рівноваги між СФ й оточуючим середовищем на різних термінах культивування за температур 10, 15 та 25°C (табл. 4.3).

Наведені в таблиці 4.3 дані свідчать про те, що температура кріозахисного середовища і терміни культивування суттєво впливають на час експозиції СФ в кріопротекторному розчині. Так, при температурі 10°C за збільшення терміну культивування СФ до 14 і 21-ї доби час насичення СФ збільшувався у 3,3 і 6,8 разів відповідно. Подібний ефект спостерігався й для СФ на 14 і 21-у добу культивування при температурах 15 і 25°C. Необхідно відзначити той факт, що при збільшенні температури кріозахисного

середовища до 25°C час експозиції для СФ значуще ($p < 0,05$) зменшувався у порівнянні з температурами 15 і 10°C незалежно від терміну їхнього культивування.

Таблиця 4.3

Час, необхідний для досягнення рівноваги у системі СФ/кріозахисний розчин (1М ДМСО) у залежності від термінів культивування СФ і температури інкубації.

Термін культивування СФ, доба	Час, с		
	25°C	15°C	10°C
7	43,0 ± 1,75	51,8 ± 3,6	64,8 ± 2,9
14	67,7 ± 8,7 *	109,1 ± 10,0 *	216,2 ± 10,9 *
21	100,0 ± 11,2 *	270,3 ± 19,0 *	440,5 ± 12,4 *

Примітка : (*) – показники значуще відрізняються у порівнянні з 7-ю добою культивування СФ ($p < 0,05$).

Розуміння транспортних властивостей мембрани є необхідною складовою для кріобіологічних досліджень, а саме для визначення умов експозиції з кріопротектором та параметрів протоколу заморожування конкретного типу клітин або багатоклітинного об'єкта певної структурної організації [97, 123]. Проникання води і розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани різні за структурою та хімічним складом відрізняється значеннями енергії активації. Результати роботи [98] свідчать про те, що відхилення арреніусової залежності транспортного процесу від простого лінійного співвідношення свідчить про те, що один або кілька факторів, що визначають його перебіг, змінює свої характеристики залежно від температури. Для мембранозв'язаних білкових транспортних систем та ферментів часто отримують нелінійний графік Арреніуса, що містить відносно різкий злам між двома (іноді більше) лінійними сегментами. Для визначення зламів на арреніусових залежностях,

необхідно дослідити якомога більше температурних точок температурного діапазону [98]. Злам або зміна нахилу у графіку Арреніуса може бути наслідком багатьох причин [98]. В роботах [98] було встановлено зв'язок між зламами арреніусових залежностей мембранозв'язаних процесів з фазовими переходами у ліпідах мембран або проникності білкових каналів. З'ясування температурної залежності пасивної проникності дозволяє отримати важливу інформацію стосовно процесів, які відбуваються в клітинній мембрані при охолодженні. Зокрема, в роботах [11, 98] прогнозування осмотичної поведінки клітин при заморожуванні з різними швидкостями здійснювали підставляючи в рівняння моделі визначені величини інтегральних коефіцієнтів проникності L_p і k_p та енергії активації E_{AL} і E_{AK} . Кінетику зміни концентрації позаклітинного розчину в процесі заморожування при розрахунках задавали аналітично шляхом апроксимації фазової діаграми плавлення розчину ДМСО у вигляді формули (10) (див. розділ «матеріали і методи»).

Приймаючи до уваги вищесказане, нами були розраховані значення енергії активації проникання молекул води і ДМСО у СФ на різних термінах культивування за різних температурних інтервалів (табл. 4.4 і табл. 4.5).

Таблиця 4.4

Енергія активації проникання молекул води (L_p) у СФ на різних термінах культивування за різних температурних інтервалів

Доба	Коефіцієнти проникності	Енергія активації, кДж/моль		
		10–15°C	10–25°C	15–25°C
7	L_p	$15,83 \pm 0,1^{*,\#}$	$24,33 \pm 0,08^{*,\#}$	$29,6 \pm 0,1^{*,\#}$
14	L_p	$53,18 \pm 0,2$	$44,89 \pm 0,23$	$42,14 \pm 0,3$
21	L_p	$55,37 \pm 0,4$	$46,92 \pm 0,4$	$44,22 \pm 0,2$

Примітка: * – показник значуще відрізняється у порівнянні з показником 14-ї доби; # – показник значуще відрізняється у порівнянні з показником 21-ї доби ($p < 0,05$).

Таблиця 4.5

Енергія активації проникання молекул ДМСО (K_p) у СФ на різних термінах культивування за різних температурних інтервалів

Доба	Коефіцієнти проникності	Енергія активації кДж/моль		
		10–15°C	10–25°C	15–25°C
7	k_p	$119,9 \pm 0,03\#$	$49,59 \pm 0,15^*,\#$	$14,88 \pm 0,3^*,\#$
14	k_p	$89,66 \pm 0,5$	$94,62 \pm 0,3$	$100,56 \pm 0,4$
21	k_p	$53,02 \pm 0,5$	$90,15 \pm 0,6$	$112,6 \pm 0,1$

Примітка: * – показник значуще відрізняється у порівнянні з показником 14-ї доби; # – показник значуще відрізняється у порівнянні з показником 21-ї доби ($p < 0,05$).

З таблиці 4.4 видно, що збільшення терміну культивування СФ до 14 і 21-ї доби незалежно від температури кріосередовища приводить до більшої енергетичної витратності процесів проникання молекул води (L_p) у СФ порівняно з 7-ю добою. Зокрема, в інтервалі (10–25°C) на 14 і 21-у добу культивування СФ значення енергії активації для молекул води L_p значуще ($p < 0,05$) збільшувались у 1,8 і 1,9 рази відповідно порівняно з 7-ю добою.

Енергія активація проникання молекул ДМСО у СФ на різні терміни культивування представлена в табл. 4.5, з якої видно, що при збільшенні термінів культивування до 14-ї доби за температур в інтервалі (10–15°C) відбувалось незначне зменшення значень енергії активації по відношенню до 7-ї доби. Підвищення температури в інтервалі (15–25°C) призводило до значущого. ($p < 0,05$) збільшення енерговитрат у 6,8 разів порівняно з 7-ю добою ($p < 0,05$). На 21-у добу культивування СФ визначена аналогічна динаміка енерговитратних процесів при проникненні ДМСО. При зменшенні температури в інтервалі (10–15°C) значення енергії активації для СФ 14 і 21-ї доби значуще ($p < 0,05$) знижувались у 1,3 та 2,3 рази відповідно відносно СФ 7-ї доби (табл. 4.5).

В результаті проведених досліджень була проаналізована залежність параметрів проникності для СФ на різних термінах культивування від температури кріозахисного середовища (табл. 4.4, 4.5). Так, на 7-му добу при зниженні температури в інтервалі (10–15°C) проникність для молекул води значуще ($p < 0,05$) зменшувалась до $15,83 \pm 0,1$ кДж/моль відносно температур в інтервалі (15–25°C) – $29,6 \pm 0,1$ кДж/моль (табл. 4.4). При збільшенні термінів культивування СФ до 14 і 21-ї доби температура кріорозчину не впливала на енергетичну витратність проникання молекул води.

Значення енергії активації для молекул ДМСО у СФ на різних термінах культивування в залежності від температури кріорозчину представлено в табл. 4.5. Так, при зниженні температури в інтервалі (10–15°C) енергетична витратність для проникання молекул ДМСО у СФ на 7-му добу збільшувалась у 2,4 та 8,1 рази відносно інтервалу температур (10–25°C) і (15–25°C) відповідно. При збільшенні терміну культивування СФ спостерігалась інша тенденція стосовно впливу температур кріорозчину на енерговитратність проникнення ДМСО. Так, на 14-у добу значущих ($p < 0,05$) відмінностей по даному критерію незалежно від температури не визначено. На 21-у добу зниження температури кріозахисного середовища в інтервалі температур (10–15°C) призводило до зменшення значень енергії активації у 1,7 і 2,1 рази для молекул ДМСО відносно інтервалу температур (10–25°C) і (15–25°C).

Таким чином, встановлено, що енергозатратність масопереносу молекул води і ДМСО залежить від термінів культивування СФ та температури кріозахисного середовища.

Приймаючи до уваги дослідження [98], підвищення значень енергії при прониканні молекул ДМСО за різних температур у клітини може вказувати на структурні зміни в мембранах клітин. Наведені вище результати свідчать про неоднозначний вплив температури кріозахисного розчину на процеси масопереносу для молекул води і ДМСО у СФ на різних термінах

культивування. Такі розбіжності можуть бути наслідком особливостей формування СФ протягом культивування: збільшення кількості міжклітинного матриксу, ущільнення клітин.

На основі визначених значень енергії активації у дослідженому діапазоні температур, використовуючи формулу (10) (див. розділ «матеріали і методи»), згідно роботам [11], ми можемо розрахувати коефіцієнти проникності для молекул води і ДМСО в інтервалі температур (10–25°C) і прогнозувати осмотичну поведінку клітин при заморожуванні з різними швидкостями .

Приймаючи до уваги результати щодо зменшення параметрів проникності для СФ при збільшенні терміну культивування, тобто зменшення дифузії сполук, оптимальним терміном для отримання життєздатних СФ і використання їх у якості експериментальної моделі є сьома доба культивування.

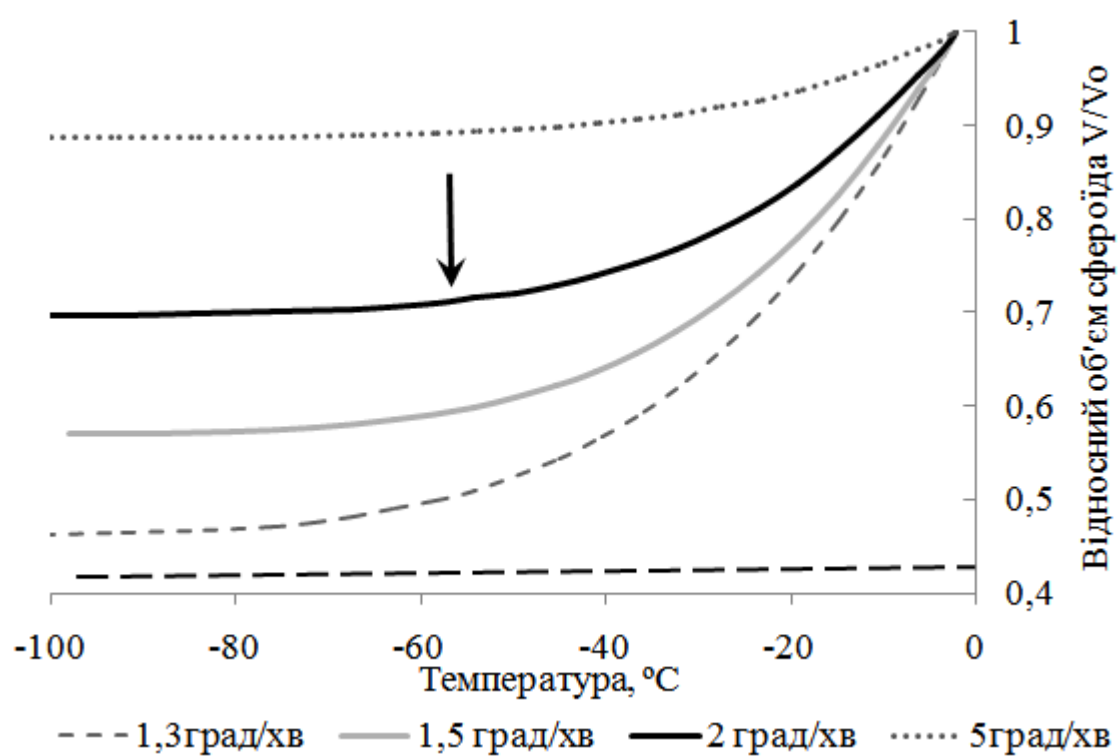
На наступному етапі досліджень, на основі розрахованих значень енергії активації і коефіцієнтів проникності молекул води і ДМСО у СФ за допомогою формули (10) (див. розділ «матеріали і методи») було зроблено прогнозування процесів зневоднення СФ 7-ї доби культивування протягом охолодження з різними швидкостями заморожування.

Відомо, що хімічна рівновага між клітиною і оточуючим середовищем, що кристалізується, може бути досягнена за умов проникання внутрішньоклітинної води крізь мембранний бар'єр у позаклітинний розчин або утворенням внутрішньоклітинного льоду. Спосіб, за допомогою якого досягається рівновага, зумовлений швидкістю охолодження клітин та здатністю води до виходу з клітини назовні. Це масоперенесення обмежується гідравлічною проникністю (L_p) плазматичної мембрани клітини та площею її поверхні, доступної для виходу води. Якщо вихід води є достатнім (за більш низьких швидкостей охолодження), то масоперенесення превалюватиме над теплоперенесенням. При цьому зневоднення клітини буде забезпечувати підтримку хімічної рівноваги, що відтермінує утворення

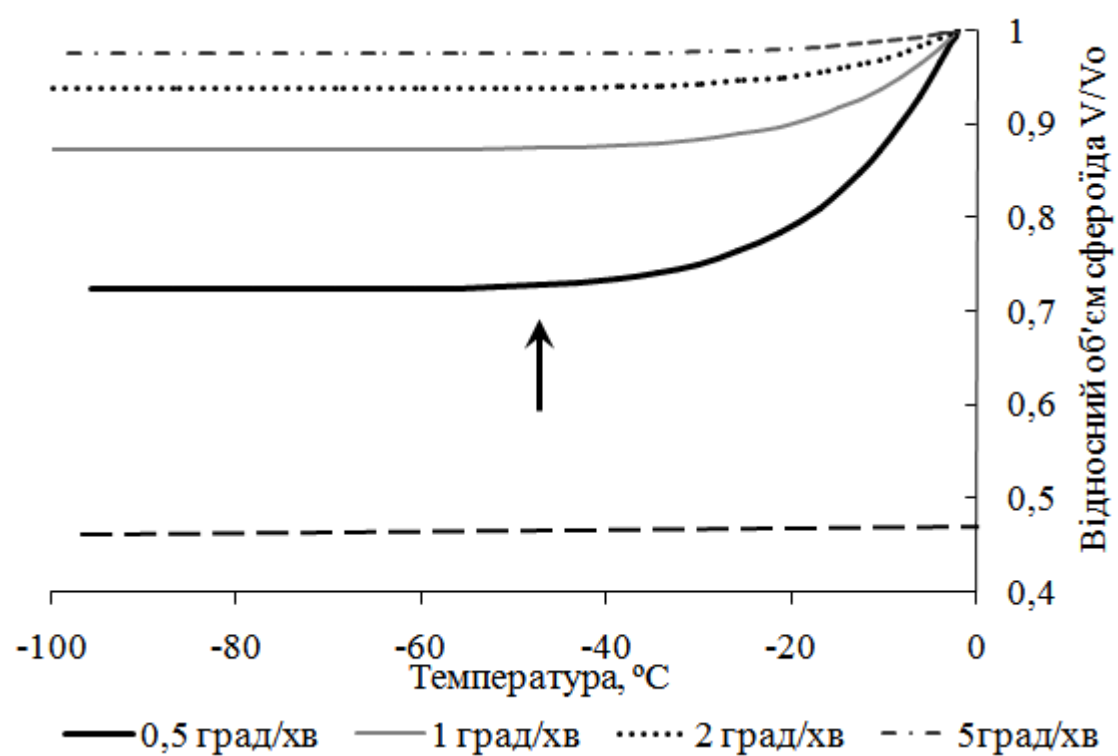
внутрішньоклітинного льоду. Перенос крізь клітинні мембрани проникаючої речовини, зокрема кріопротектору, вносить свої корективи у масообмін між клітиною і оточуючим середовищем. Внаслідок цього на збереженість клітин у процесі кристалізації клітинної суспензії впливають два типи пошкоджуючих чинників. Перший тип кріопошкоджень спричиняється зневодненням клітин під час кристалізації позаклітинного середовища і, отже, підвищенням концентрації поза- та внутрішньоклітинних розчинів. При збільшенні швидкості охолодження, ступінь пошкоджень першого типу зменшується внаслідок скорочення часу дії пошкоджуючих чинників [95, 155]. Другий тип кріопошкодження клітин обумовлений утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, які викликають ті ж самі ефекти, що й чинники першого типу, і, крім того, здатні механічно руйнувати мембранні структури [155, 156, 157]. Внутрішньоклітинна кристалізація, ймовірність якої зростає при високих швидкостях охолодження, вважається максимально згубною для клітин [103, 115, 158, 159]. Таким чином, збереженість клітин під час кріоконсервування куполоподібно залежить від швидкості охолодження на етапі кристалізації [158]. Указані міркування можна віднести і до більш складних об'єктів, таких як багатоклітинні СФ [160].

Приймаючи до уваги той факт, що швидкість охолодження прямо пов'язана зі швидкістю, з якою внутрішньоклітинна вода може виходити з клітин, тобто з коефіцієнтом проникності клітинної мембрани для води, в подальших дослідженнях за допомогою рівняння 7 (див. розділ «матеріали та методи») були розраховані величини відносного об'єму СФ при заморожуванні з 1М ДМСО зі швидкостями охолодження охолодження 0,5–5°C/хв (рис. 4.7).

На підставі ступеня дегідратації СФ за різних швидкостей охолодження та значеннях їх осмотично неактивного об'єму робили попередній висновок про оптимальний режим охолодження в залежності від термінів культивування (рис. 4.7).



а



б

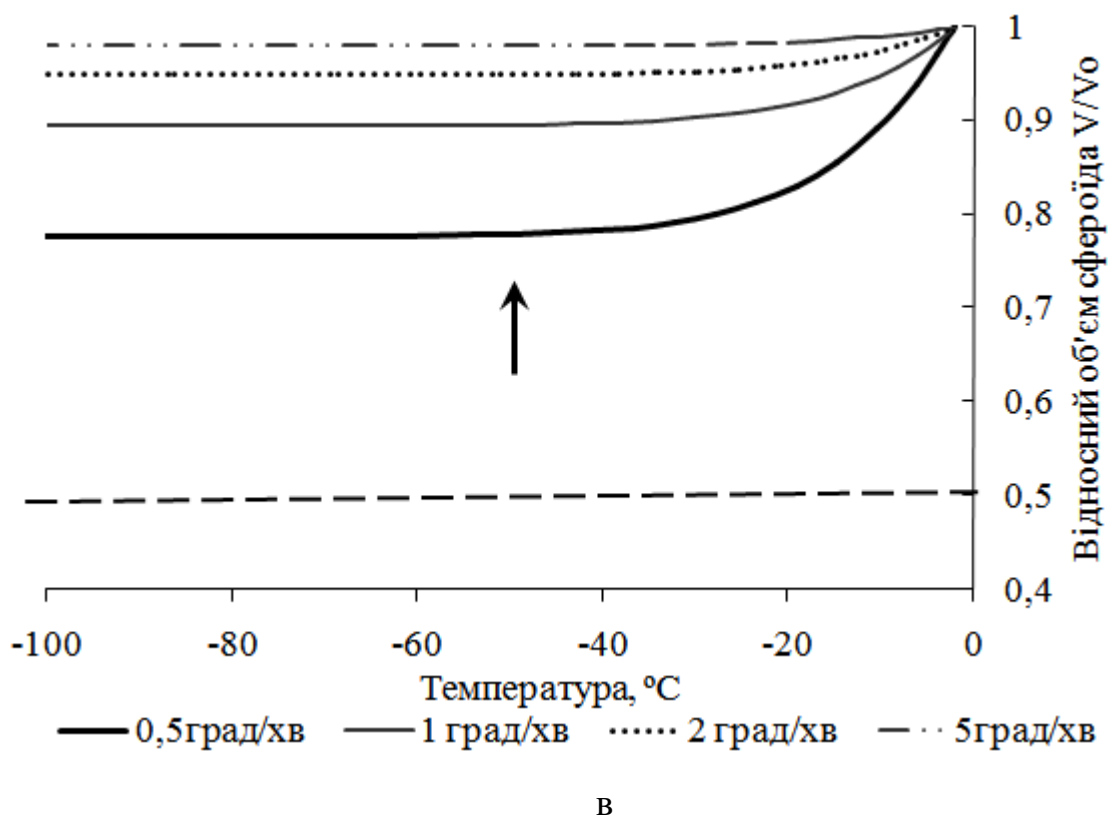


Рис. 4.7. Розрахована кінетика зміни об'єму СФ за швидкостей охолодження 0,5–5 $^{\circ}\text{C/h}$ для СФ різних термінів культивування: а – 7 діб; б – 14 діб; в – 21 доба. Стрілкою вказана оптимальна швидкість охолодження.

Згідно з результатами, представленими на рис. 4.7, зневоднення СФ суттєво відрізняється залежно від термінів культивування. Для СФ 7 діб культивування (рис. 4.7) мінімальне значення відносного об'єму досягає величини 0,48 вже при швидкості охолодження 1,3 $^{\circ}\text{C/h}$. За менших швидкостей охолодження об'єм СФ 7 діб культивування наближається до осмотично неактивного об'єму ($\alpha_7 = 0,40$). Таке зневоднення очевидно є критичним і може викликати суттєві пошкодження структури СФ.

Для СФ 14-ї (рис. 4.7, б) та 21-ї доби культивування (рис. 4.7, в) відносний об'єм за цієї швидкості охолодження досягає величини $\sim 0,73$ та 0,78 відповідно, що суттєво більше осмотично неактивного об'єму для таких термінів культивування ($\alpha_{14} = 0,47$, $\alpha_{21} = 0,54$).

Виходячи з кривих зневоднення СФ за різних швидкостей охолодження, можна зробити висновок, що для СФ 7 діб культивування оптимальні

швидкості охолодження будуть знаходитись у діапазоні $1,5-2^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Відносний об'єм СФ при цьому досягає значень $0,6-0,7$ при охолодженні до температурного інтервалу $-60\dots-80^{\circ}\text{C}$. Такий рівень зневоднення суттєво знижує ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації та не призводить до пошкодження клітинних структур за рахунок ефекту розчину.

Для СФ 14 та 21-ї доби культивування відповідний рівень зневоднення (відносний об'єм $\sim 0,75$) досягається за швидкості охолодження $0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ при охолодженні до температурного інтервалу $-40\dots-50^{\circ}\text{C}$. Більш високі швидкості охолодження не можуть забезпечити потрібне зневоднення СФ та низьку ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації.

Таким чином, на основі аналізу осмотичної поведінки СФ у кріопротекторному розчині за допомогою фізико-математичного моделювання процесів масопереносу були визначені і проаналізовані параметри проникності для молекул води і кріопротектору у СФ у залежності від термінів культивування і температури кріозахисного розчину. Отримані результати свідчать про те, що процеси проникності для молекул води і ДМСО у СФ зі збільшенням термінів культивування уповільнюються. Показано, що найбільш вагомі зміни наведених у роботі показників проникності відбуваються після 7 діб культивування СФ. Найбільші відмінності часу експозиції СФ у кріопротекторному розчині, необхідного для досягнення рівноваги, при зміні температури спостерігався саме для СФ на 14 і 21-у добу культивування, що пов'язано зі значним зменшенням коефіцієнтів проникності СФ для молекул води і кріопротектору. Такий суттєвий вплив часу культивування на приведені у роботі показники, очевидно, пов'язаний з особливостями формування СФ, а саме експресією міжклітинного матриксу, до складу якого входять речовини, які впливають на його гідрофільні характеристики (протеоглікани і глікозаміноглікани). Збільшення кількості клітин у складі СФ і, як наслідок, міжклітинного матриксу можуть впливати на проникність СФ для кріопротектору.

Подібні припущення були зроблені в роботі [5], в якій було досліджено вплив міжклітинного матриксу на процеси злиття СФ. Автори показали, що кількість позаклітинного матриксу протягом культивування СФ збільшувалась, що призводило на їх думку до уповільнення їхнього злиття.

На підставі теоретичних розрахунків було визначено оптимальні режими кріоконсервування у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО для СФ, отриманих з клітин лінії L929 на різних термінах культивування: час експозиції, кінцева температура охолодження до занурення у рідкий азот з метою подальшого зберігання (таблиця 4.6).

Таблиця 4.6

Оптимальний режим кріоконсервування для СФ 7-ї доби культивування

Термін культив ування, доба	Час інкубації у кріозахисному середовищі з 1М ДМСО, с			Швидкість охолодженн я, зразків°С/хв	Температура охолодження зразків, °С
	25°С	15°С	10°С		
7	43 ± 1,75	52 ± 3,6	65 ± 2,9	2	–80
14	68 ± 8,7	109 ± 10,0	216 ± 10,9	0,5	–40
21	100 ± 11,2	270 ± 19,0	441 ± 12,4	0,5	–40

Підсумовуючи все вищесказане, можна зробити висновок про те, що використана в роботі фізико-математична модель дозволяє проаналізувати осмотичну поведінку СФ на етапі охолодження. У роботі запропоновано алгоритм розрахунку коефіцієнтів проникності та зміни об'єму СФ під час охолодження з різними швидкостями у кріозахисному середовищі. Отримані результати можуть бути використані для визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних СФ різних за клітинним складом, терміном культивування у відповідних кріозахисних розчинах.

Висновки за розділом 4.2:

1. Доведено, що відносний осмотично неактивний об'єм СФ, отриманих з клітин лінії L929, залежить від терміну їх культивування. Підвищення терміну культивування приводить до збільшення показника з 0,40 (7 доба) до 0,47 (14 доба) та 0,54 (21 доба), що свідчить про структурні зміни СФ протягом культивування.

2. Доведено, що збільшення температури кріозахисного середовища з 1М ДМСО до 25°C призводить до зменшення часу експозиції СФ усіх термінів культивування (7, 14 та 21 доба) у порівнянні з температурами 10 і 15°C.

3. Коефіцієнти проникності для молекул води і ДМСО значуще ($p < 0,05$) зменшуються зі зниженням температури і збільшенням терміну культивування СФ.

4. У роботі доведено, що при збільшенні терміну культивування СФ до 14 і 21-ї доби енергетична витратність процесів масопереносу молекул води і ДМСО в інтервалі температур (10–25°C) значуще ($p < 0,05$) збільшується відносно 7-ї доби.

5. За результатами проникності молекул ДМСО і води у СФ найбільш оптимальною є сьома доба культивування.

6. На підставі визначення коефіцієнтів проникності і процесів масопереносу молекул води і ДМСО встановлено швидкість і кінцеву температуру охолодження до занурення у рідкий азот для СФ з клітин L929 різних термінів культивування. Запропонований режим кріоконсервування для СФ 7-ї доби культивування включає швидкість охолодження 2°C/хв та кінцеву температуру охолодження –80°C; для СФ 14 та 21-ї доби культивування – швидкість охолодження 0,5°C/хв та кінцеву температуру охолодження –40°C з подальшим зануренням у рідкий азот.

Публікації за розділом [16, 17, 22, 23, 24, 25, 26].

РОЗДІЛ 5

ВИВЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СФЕРОЇДІВ ЗА РІЗНИМИ РЕЖИМАМИ

В дослідженнях, наведених у розділі 4, були представлені підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних СФ на основі фізико-математичного моделювання параметрів проникності і масопереносу. Однак, для підтвердження ефективності теоретичних розрахунків необхідні експериментальні підтвердження. Тому, на наступному етапі роботи була проведена експериментальна апробація визначеного у роботі режиму кріоконсервування СФ. На основі результатів досліджень щодо суттєвого зменшення коефіцієнтів проникності молекул ДМСО та води у СФ при збільшенні терміну культивування до 14 і 21-ї доби (див. розд. 4) було визначено оптимальний термін культивування для СФ (7 доба). Виходячи з вищесказаного, апробацію визначеного у роботі режиму проводили для СФ 7-ї доби.

Функціональну повноцінність кріоконсервованих СФ 7-ї доби культивування за визначеним у роботі на основі фізико-математичної моделі режимом 1 (час насичення СФ у кріосередовищі 65 секунд за температури 10°C, швидкість охолодження 2°C/хв та кінцеву температуру охолодження –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C) оцінювали за проліферативним, міграційним, метаболічним та адгезивним потенціалом клітин СФ. У якості порівняння був використаний стандартний режим 2 (час насичення СФ впродовж 10 хвилин, швидкість охолодження 1°C/хв, кінцеву температуру охолодження –40°C з подальшим зануренням у рідкий азот).

Дослідження проліферативного та міграційного потенціалу клітин СФ 7-ї доби культивування, кріоконсервованих за режимом 1, розрахованим у роботі, оцінювали після розморожування на моделі «подряпина» моношару (scratch assay) (рис. 5.1).

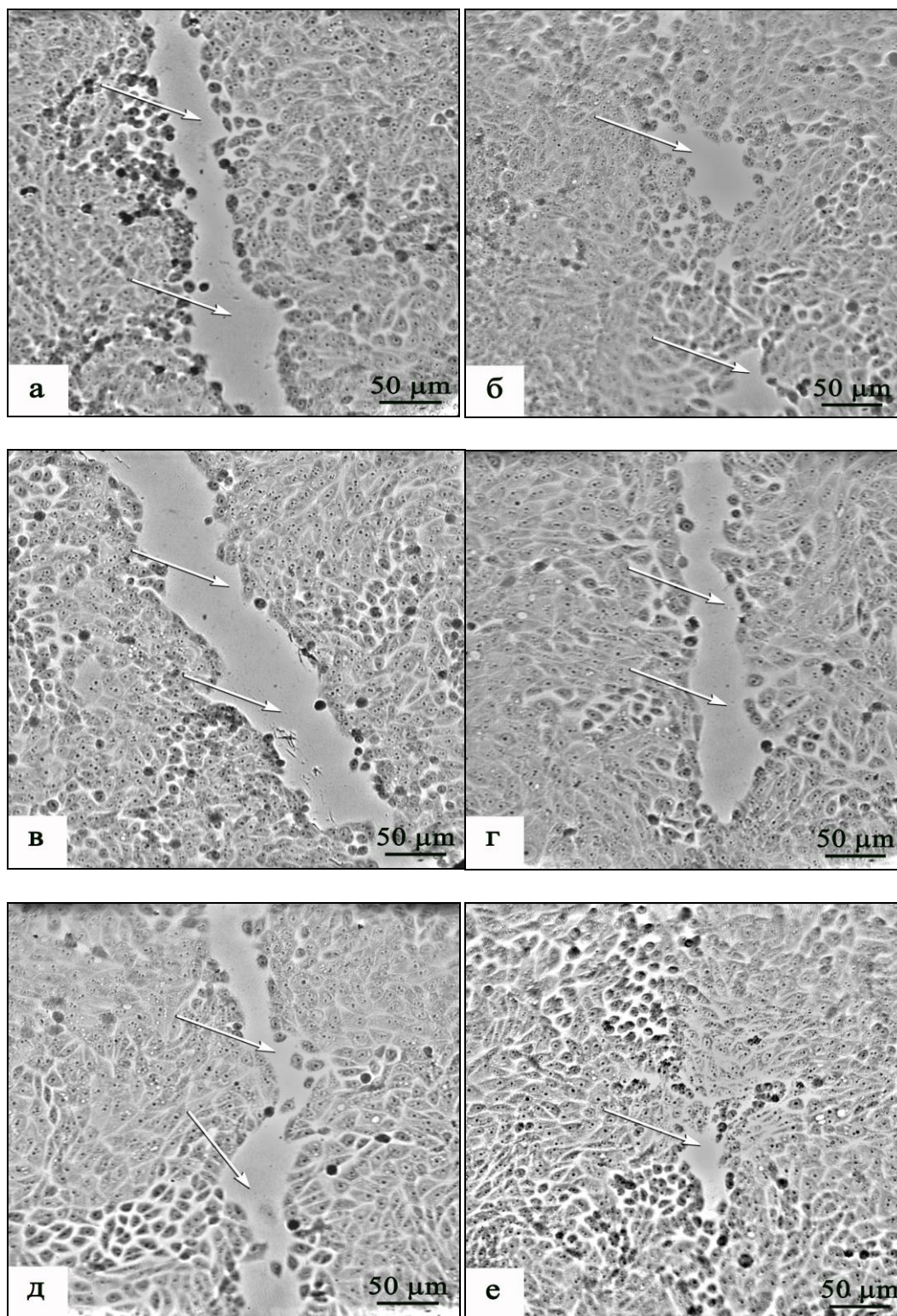


Рис. 5.1. Морфологія ушкодженого моношару сформованого клітинами зі СФ: а, б – нативних; в, г – після кріоконсервування за стандартним режимом 2; д, е – кріоконсервованих за теоретично визначеним у роботі режимом 1. Стрілкою вказано місце пошкодження. Світлова мікроскопія.

Відомо, що ця модель широко використовується у дослідженнях *in vitro* для аналізу, перш за все, міграційного потенціалу клітин, а також їх проліферативних властивостей [71, 161].

У наших експериментах площу ушкодженого моношару оцінювали через 24 і 48 годин культивування, у якості режиму порівняння був використаний стандартний режим кріоконсервування, (режим 2).

Морфологічні зміни моношару представлені на рисунку 5.1, з якого видно, що в області пошкодженої ділянки не було зареєстровано хаотичної міграції поодиноких клітин незалежно від часу культивування.

Приймаючи до уваги результати робот [161], ймовірно зменшення площі ушкодження моношару відбувалось за рахунок «колективної» міграції клітин. Необхідно відзначити той факт, що незалежно від режиму кріоконсервування, відновлення механічного ушкодження відбувалось за однаковим типом міграції.

Кількісний аналіз показав, що у разі використання режиму 2, площа ушкодження моношару через 24 і 48 годин культивування значуще ($p < 0,05$) у 1,3 та 2,4 рази відповідно перевищувала даний показник для СФ, кріоконсервованих за експериментальним режимом 1 (рис. 5.2).

Доведено, що вже через 24 і 48 годин площа ушкодження в моношарі клітин СФ, кріоконсервованих за експериментальним режимом 1, вірогідно не відрізнялась від площі ушкодження моношару в нативному контролі, чого не було визначено після використання режиму 2.

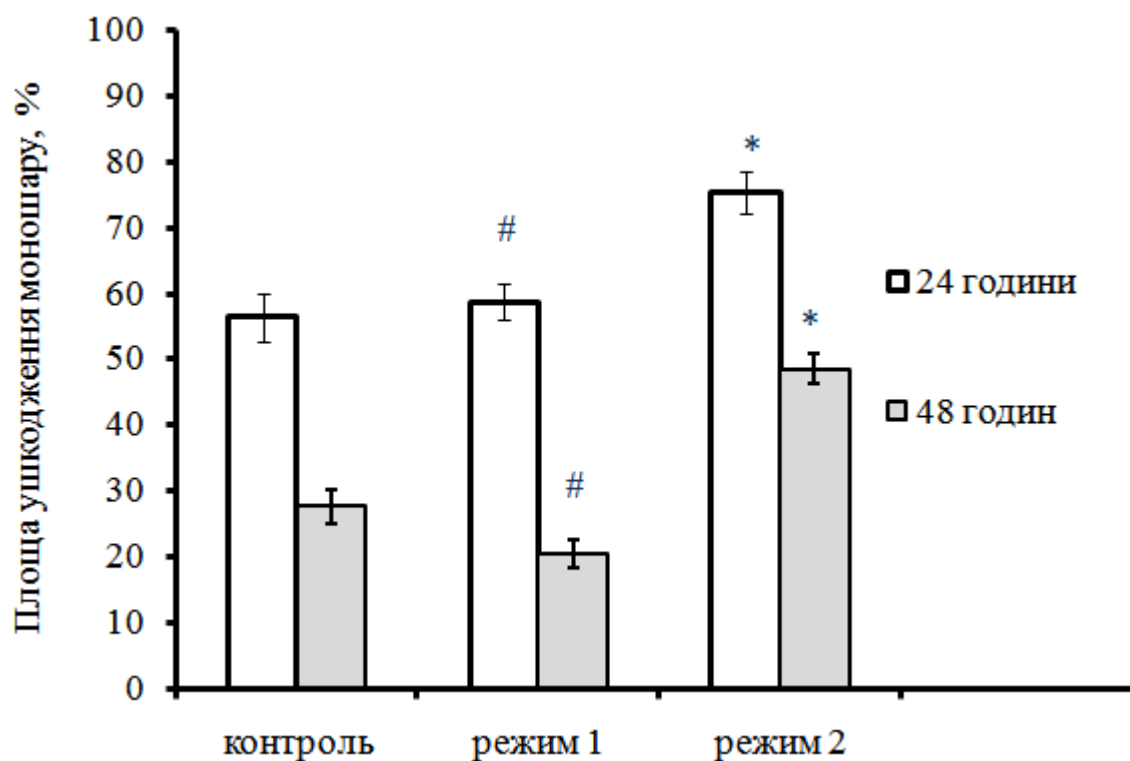


Рис. 5.2. Площа ушкодження моношару у тесті «подряпина» через 24 та 48 годин. Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем ($p < 0,05$); # – відмінності статистично значущі порівняно з режимом 2 ($p < 0,05$).

Приймаючи до уваги той факт, що згідно теоретичних розрахунків кінцева температура охолодження сфероїдів до занурення у рідкий азот становила -80°C , на наступному етапі досліджень у якості коректного порівняння з метою з'ясування впливу кінцевої температури охолодження (-80°C) на функціональні показники було використано ще один зі стандартних режимів, ефективність якого підтверджена в дослідженнях [13, 162], режим 3: час насичення кріопротектором СФ впродовж 10 хвилин, швидкість охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, кінцева температура охолодження -80 з подальшим зануренням у рідкий азот.

Дослідження здатності до міграції клітин СФ 7-ї доби культивування, кріоконсервованих за режимом 1, визначеним у роботі, було проведено після розморожування. Даний показник оцінювали за площею моношару утвореного його клітинами через 24 години і 3 доби (рис. 5.3).

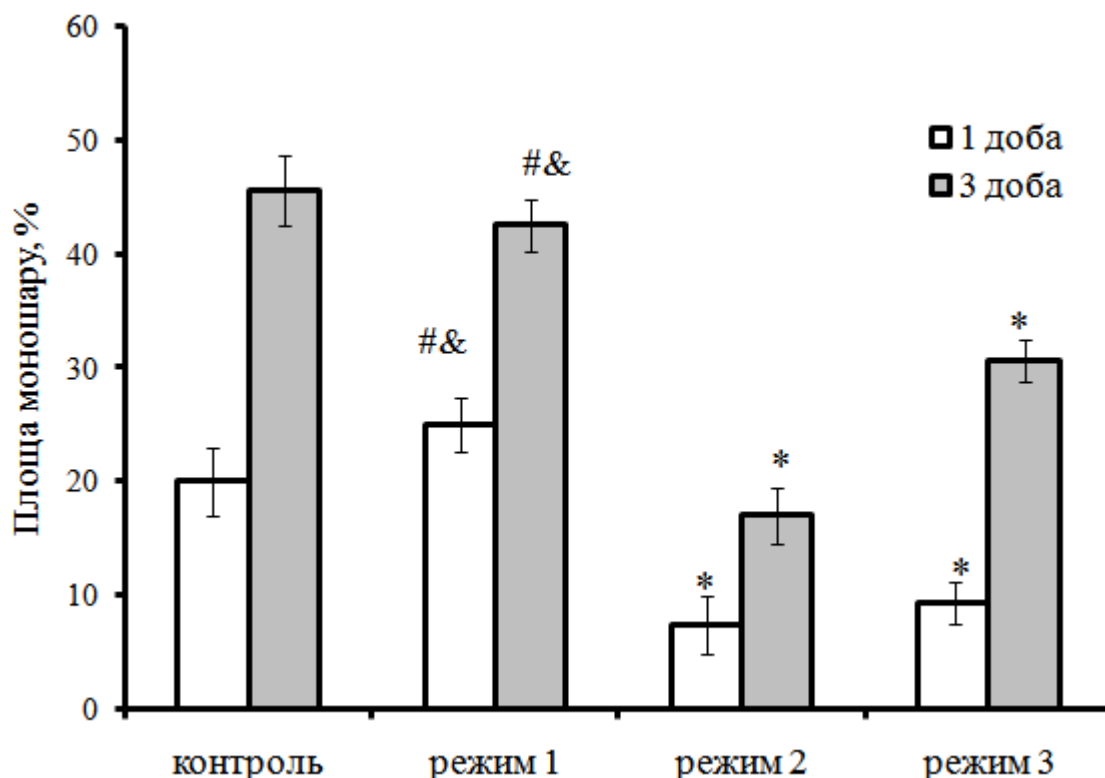


Рис. 5.3. Площа моношару утвореного клітинами, які мігрували зі СФ кріоконсервованих за різними режимами. Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем ($p < 0,05$); # – відмінності статистично значущі порівняно з режимом 2 ($p < 0,05$); & – відмінності статистично значущі порівняно з режимом 3 ($p < 0,05$). Контроль – не підданні кріоконсервуванню (нативні) СФ.

Встановлено, що через 1 та 3 доби площа моношару утвореного клітинами СФ кріоконсервованих за режимом 1, була більше у 3,3 і 2,5 рази відповідно порівняно з режимом 2 ($p < 0,05$). Подібний результат було отримано й у порівнянні зі стандартним режимом 3. Водночас, показник площі моношару для СФ, кріоконсервованих за режимом 1, значуще не відрізнявся від показника нативного контролю.

Для з'ясування метаболічного стану деконсервованих СФ використовували МТТ-тест. Принцип даного тесту ґрунтується на здатності живих клітин відновлювати тетраразолієву сіль МТТ у нерозчинний у воді

формазан [163, 164]. Тому, в подальших дослідженнях було з'ясовано вплив кріоконсервування СФ за теоретично розрахованим режимом 1 на відновлення МТТ у СФ після розморожування (рис. 5.4).

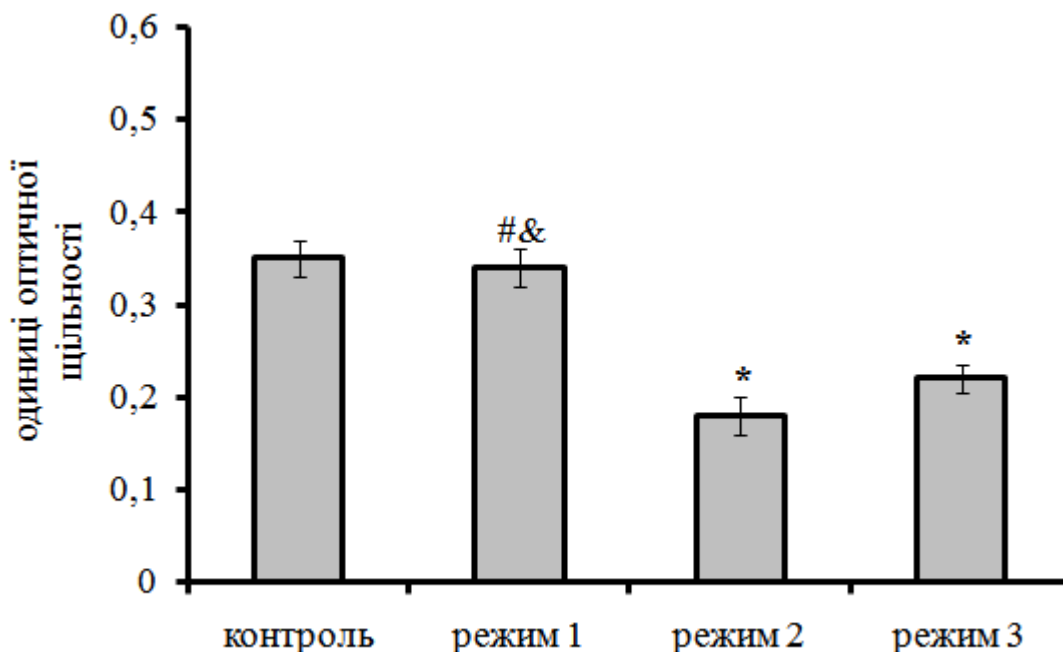


Рис. 5.4. Ступінь відновлення МТТ у СФ до кріоконсервування (контроль) та після кріоконсервування за різними режимами. Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем ($p < 0,05$); # – відмінності статистично значущі порівняно з режимом 2 ($p < 0,05$); & – відмінності статистично значущі порівняно з режимом 3 ($p < 0,05$).

Як видно з рис. 5.4, після використання режимів 2 та 3 метаболічна активність деконсервованих СФ за рівнем відновлення МТТ значуще зменшувалась до $(0,18 \pm 0,02)$ та $(0,22 \pm 0,015)$ одиниць оптичної щільності (ООЩ) у порівнянні з контролем $(0,35 \pm 0,02)$ ООЩ. Показники ООЩ для СФ, кріоконсервованих за експериментальним режимом 1, суттєво не змінювались відносно нативного контролю, однак значуще відрізнялись по відношенню до режимів 2 та 3. Зокрема, показники ООЩ для СФ, кріоконсервованих за стандартними режимами 2 і 3, у 1,9 та 1,5 рази

відповідно були меншими відносно показників для СФ кріоконсервованих за режимом 1 (рис. 5.4).

Відомо, що одним з маркерів функціональної повноцінності клітин та СФ є їхня здатність до адгезії (рис. 5.5).

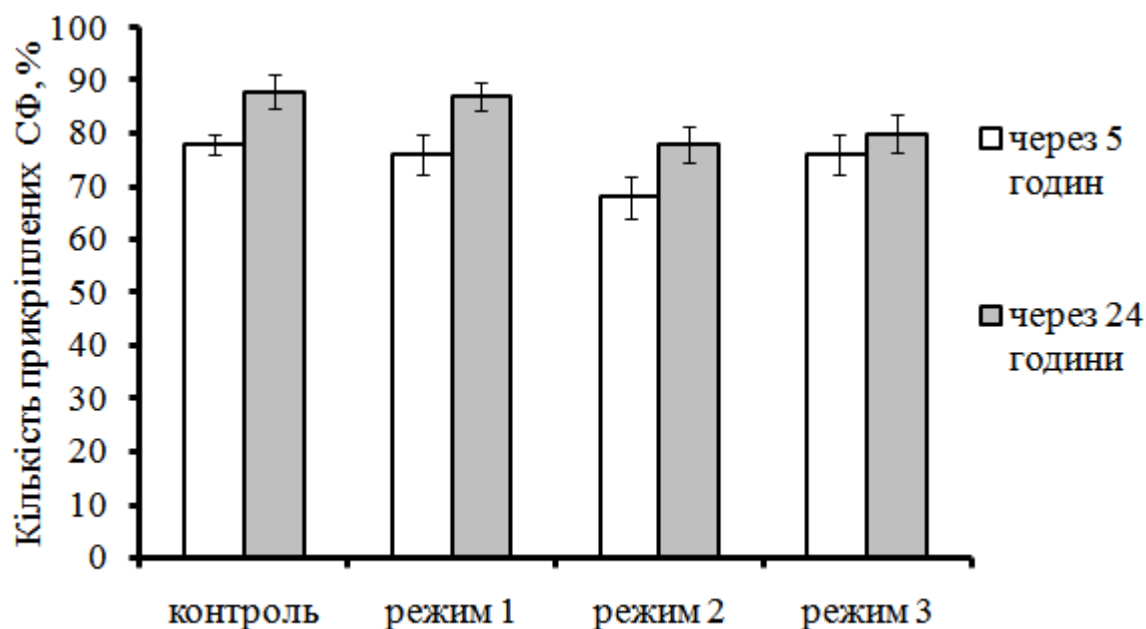


Рис. 5.5. Здатність СФ до адгезії до кріоконсервування (нативний контроль) та після кріоконсервування за різними режимами.

З рис. 5.5 видно, що використані у роботі режими кріоконсервування суттєво не призводили до зниження адгезивних властивостей СФ, зокрема, кількість прикріплених до культуральної поверхні СФ не відрізнялась від значень нативного контролю. Показник середньої кількості прикріплених СФ через 24 години знаходився у межах 78–87% для усіх використаних режимів. Значення значуще не відрізнялись від контролю, в якому цей показник складав близько 88%. Такий результат може вказувати на те, що режими 1, 2 і 3 суттєво не впливають на стан клітинних мембран у складі СФ, зокрема, на рецептори адгезії і, як наслідок, на їх адгезивні властивості.

Отримані у роботі результати доводять, що кріоконсервування СФ за режимом, розрахованим на основі фізико-математичної моделі у порівнянні зі стандартними режимами кріоконсервування 2 і 3, приводить до більш

ефективного збереження функціонального (проліферативного і міграційного) та метаболічного (здатністю клітин СФ відновлювати тетраразолієву сіль МТТ у формазан) потенціалу СФ. Приймаючи до уваги результати багатьох досліджень щодо дозозалежного впливу кріопротекторів на життєздатність клітин [115], ефективність теоретично розрахованого режиму може бути наслідком зменшення часу експозиції (у 10 разів) і, як наслідок, токсичної дії ДМСО на СФ у кріозахисному середовищі порівняно зі стандартними режимами. Представлені у роботі результати довели, що для більш ефективного використання кріопротекторів і запобігання руйнівної дії холоду, необхідно зосередити увагу не тільки на концентрації [165], технологіях видалення ДМСО з деконсервованого матеріалу, пошуку додаткових компонентів і складу кріозахисного розчину [115], але й з'ясуванні оптимального часу насичення кріопротектором біологічних об'єктів. Тому, існуючи на теперішній час поодинокі роботи стосовно впливу часу експозиції у кріозахисних середовищах на життєздатність і функціональні показники СФ потребують ретельних досліджень, які можуть сприяти ефективному кріоконсервуванню біологічних об'єктів різної організації.

Доведена у роботі ефективність визначеного на основі фізико-математичної моделі режиму кріоконсервування СФ дозволяє у подальших дослідженнях визначати оптимальні протоколи кріоконсервування для СФ різних розмірів, отриманих з різних типів клітин, для кріозахисних середовищ різного складу.

Висновки за розділом:

1. Встановлено, що площа ушкодженого моношару утвореного з клітин СФ кріоконсервованих за визначеним у роботі режимом 1 через 24 і 48 годин культивування у 1,3 та 2,4 рази відповідно була меншою відносно даного показника для СФ кріоконсервованих за стандартним режимом 2.

2. Доведено, що площа моношару, створеного після міграції клітин зі СФ, кріоконсервованих за визначеним у роботі режимом 1, через 24 години і 3 доби культивування була значуще ($p < 0,05$) більшою порівняно зі стандартними режимами 2 і 3
3. . Оцінка метаболічної активності деконсервованих СФ за даними МТТ-тесту показала, що рівень утворення формагану у СФ, кріоконсервованих за режимом 2 і 3, у 1,9 і 1,5 рази відповідно був меншим відносно режиму 1.
4. Режими кріоконсервування, які були досліджені у роботі, не впливали на адгезивні властивості деконсервованих СФ.
5. Ефективність теоретично розрахованого режиму кріоконсервування СФ є наслідком вірогідного (у 10 разів) зменшення часу їх експозиції у кріозахисному середовищі.

Публікації за розділом: [18, 27, 28].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Стрімко зростаюча галузь «сфероїдовиробництва» потребує розробки технологій кріоконсервування таких багатоклітинних об'єктів [2, 29, 166–171]. На теперішній час існують протоколи отримання СФ практично з усіх органів різного видового походження, а також багатьох клітинних культур [151, 167–169], однак ґрунтового кріобіологічного підходу для визначення ефективного протоколу їхнього кріоконсервування немає [7, 8, 11, 122, 130–133]. Раніше було доведено, що чисельне моделювання процесів, які відбуваються протягом циклу «заморожування-відтавання», дозволяє прогнозувати ефективність протоколів кріоконсервування клітин у суспензії [130–133, 161]. Приймаючи до уваги той факт, що багатоклітинні об'єкти мають складну структурну організацію, пряме перенесення протоколів кріоконсервування визначених для клітин у практику заморожування СФ не є коректним.

Представлене дисертаційне дослідження в цілому було спрямоване на розробку алгоритму визначення оптимальних режимів кріоконсервування СФ на основі фізико-математичного моделювання процесів зневоднення і проникності кріопротектору у СФ на етапі охолодження. При цьому, форму клітинного СФ апроксимовано еліпсоїдом обертання, що приймається у різних існуючих математичних моделях [128, 172]. Оскільки СФ є складною багат шаровою структурою, процеси було змодельовано як у СФ *in toto*, так й у різних шарах СФ. Інтегральні характеристики, що визначають часові параметри масообміну між СФ і середовищем, розглядали як аналоги коефіцієнтів проникності мембран окремих клітин. У якості модельного біологічного об'єкту для сфероїдоутворення було застосовано перещеплювану лінію клітин L929.

На першому етапі роботи було вирішене завдання щодо підбору умов сфероїдоутворення, а саме обрано оптимальну посівну концентрацію клітин

лінії L929 для отримання найбільшої кількості життєздатних СФ приблизно однакового діаметру. Встановлено, що при використанні посівних концентрацій клітин 1×10^5 , 2×10^5 та 5×10^5 кл/мл на 7-му добу культивування, найбільшу кількість ($70,0 \pm 2,5\%$) СФ з діаметром 80–150 мкм було отримано при концентрації 2×10^5 кл/мл.

В результаті проведених досліджень було з'ясовано, що на 3-ю добу культивування значущих ($p < 0,05$) змін у життєздатності клітин у складі СФ (визначеної за забарвленням ядер клітин PI) не спостерігалось при всіх посівних концентраціях. На 7-му добу культивування СФ кількість некротичних клітин значуще збільшувалась до ($40,6 \pm 1,9\%$) при посівній концентрації 5×10^5 кл/мл, тоді як при концентраціях 1×10^5 та 2×10^5 кл/мл не мала значущих коливань. Подібна тенденція була встановлена при використанні флуоресцентного ДНК-барвника Hoechst 33342. Так, при концентраціях 1×10^5 та 2×10^5 кл/мл кількість Hoechst-позитивних клітин була більшою на 20 і 27% відповідно порівняно з концентрацією 5×10^5 кл/мл.

При аналізі функціональної активності СФ було доведено вплив посівної концентрації на їхні адгезивні властивості. Зокрема, після розміщення СФ 3-ї доби культивування на адгезивну поверхню, кількість прикріплених СФ при концентраціях 1×10^5 та 2×10^5 кл/мл на 16,7 і 20,1% відповідно була більше порівняно з концентрацією 5×10^5 кл/мл. Через 7 діб культивування СФ зберігалась подібна тенденція. Отже, здатність до адгезії СФ, сформованих при посівних концентраціях 1×10^5 та 2×10^5 кл/мл, значуще ($p < 0,05$) перевищувала даний показник для СФ утворених при використанні максимальної концентрації незалежно від терміну культивування СФ (3 або 7 діб).

Приймаючи до уваги результати початкового етапу досліджень, у подальшій роботі для отримання СФ використовували концентрацію 2×10^5 кл/мл.

На наступному етапі було з'ясовано вплив термінів культивування (7, 14 і 21 доби) на зміну розміру СФ отриманих з клітин лінії L929 при посівній концентрації 2×10^5 кл/мл. Встановлено, що кількість СФ з діаметрами 20–80 мкм на 21-у добу значно зменшувалась (з 16,6 до 5%). Кількість СФ з діаметром 150–300 мкм збільшувалась на 14 і 21-у добу культивування у 1,5 і 2,3 рази відповідно порівняно з 7-ю добою. Це є цілком логічним відображенням процесу росту та збільшення розміру СФ, при якому їх кількість у діапазоні найменших значень діаметра зменшується на прикінцевих стадіях культивування.

Наступний етап робот був присвячений теоретичному прогнозуванню основних параметрів кріоконсервування СФ: 1) часу експозиції з кріопротектором; 2) швидкості охолодження; 3) кінцевої температури охолодження, після якої зразок має бути занурений у рідкий азот. Для цього, по-перше, були проведені експериментальні дослідження об'ємних змін СФ під час інкубації у розчинах NaCl різних концентрацій та кріозахисному середовищі на основі 1М ДМСО. По-друге, спираючись на отримані дані щодо осмотично неактивного об'єму СФ, теоретично було визначено коефіцієнти проникності для молекул води та ДМСО у СФ в цілому (*in toto*), а також у клітини зовнішнього/внутрішнього шарів СФ. Дані дослідження було проведено порівняно з поодинокими клітинами лінії L929.

Встановлено, що осмотично неактивний об'єм СФ за умов інкубації у розчинах NaCl на 10-у добу культивування складає $\alpha_{\text{сф}} = 0,41$, що значуще перевищує показник встановлений для поодиноких клітин L929 ($\alpha_{\text{кл}} = 0,32$). Збільшення терміну культивування СФ приводило до підвищення даного показника з 0,40 (7 доба) до 0,47 (14 доба) та 0,54 (21 доба). Ймовірно, підвищення осмотично неактивного об'єму протягом культивування є наслідком структурних змін, які відбуваються у СФ, зокрема, пов'язане зі збільшенням кількості клітин у складі СФ та формуванням позаклітинного матриксу.

З'ясовано, що коефіцієнти проникності (за температури 15°C) у клітини зовнішнього шару СФ зменшувались у 1,68 та 1,19 рази для молекул води (L_p) та ДМСО (k_p) відповідно, а у клітини внутрішнього шару – у 1,9 та 3,8 рази відповідно порівняно з поодинокими клітинами. При порівнянні параметрів проникності для клітин у залежності від локалізації у СФ значущі ($p < 0,05$) зменшення значень параметрів проникності були визначені для молекул ДМСО, що може бути пов'язано, як з високою гідрофобністю ДМСО (коефіцієнт розподілу ДМСО між гідрофобною та гідрофільною фазами становить 0,247), так і з синтезом міжклітинного матриксу або ущільненням клітин при збільшенні глибини їхнього розташування [34, 39, 41, 46, 47].

При дослідженні змін відносного об'єму СФ різних термінів культивування (7, 14, 21 доби) у розчині з 1М ДМСО при температурах 10, 15 та 25°C теоретично було визначено час, необхідний для досягнення рівноваги між СФ та оточуючим середовищем (час насичення СФ кріопротектором). Встановлено, що при збільшенні терміну культивування СФ до 14 і 21-ї доби, час насичення збільшувався відповідно у 3,3 та 6,8 рази відповідно при температурі 10°C; у 2,1 та 5,2 рази відповідно при температурі 15°C; у 1,5 та 2,3 рази відповідно при температурі 25°C (порівняно зі СФ 7-ї доби культивування). За збільшення температури інкубації до 25°C час насичення СФ значуще зменшувався у порівнянні з температурами 15 і 10°C.

У роботі доведено, що показники проникності СФ зменшуються зі збільшенням термінів культивування. Так, за температури кріозахисного середовища 10°C для СФ 14-ї доби спостерігалось зниження коефіцієнтів проникності для води та ДМСО у 2,3 та 5,7 рази відповідно, тоді як для СФ 21-ї доби – у 2,6 і 6,5 рази відповідно відносно 7-ї доби. Подібна тенденція спостерігалась і при інкубації СФ за температур 15 та 25°C.

З'ясовано, що енергозатратність масопереносу молекул води і ДМСО залежить від термінів культивування СФ та температури кріозахисного середовища. Зокрема, при збільшенні терміну культивування до 14 і 21-ї

доби енергетична витратність процесів масопереносу молекул води і ДМСО в інтервалі температур 10–25°C значуще ($p < 0,05$) збільшується відносно 7-ї доби.

На підставі визначення проникності і процесів масопереносу встановлено швидкість і кінцеву температуру охолодження до занурення в рідкий азот для режимів кріоконсервування СФ різних термінів культивування, зокрема для СФ 7-ї доби –2°C/хв до –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C).

Зменшення параметрів проникності і збільшення енергетичної витратності процесів їхнього масопереносу у СФ 14 і 21-ї доби культивування порівняно з 7-ю свідчить про те, що зі збільшенням терміну культивування процеси дифузії сполук ускладнюються, що корелює з даними літератури [33, 34, 41–47]. Тому, оптимальним терміном для отримання життєздатних СФ і використання їх у якості експериментальної моделі є сьома доба культивування.

На наступному етапі роботи було експериментально апробовано режим кріоконсервування встановлений теоретично для СФ 7-ї доби. Для порівняння СФ цієї ж доби було кріоконсервовано за широко використовуваними у кріобіологічній практиці режимами кріоконсервування.

Режим 1 (експериментальний) включав час насичення СФ у кріосередовищі 65 секунд (за температури 10°C), швидкість охолодження 2°C/хв та кінцеву температуру охолодження –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C). Режим 2: час насичення СФ 10 хвилин (за температури 10°C), швидкість охолодження 1°C/хв, кінцеву температуру охолодження –40°C з подальшим зануренням у рідкий азот. Режим 3: час насичення СФ 10 хвилин (за температури 10°C), швидкість охолодження 1°C/хв, кінцеву температуру охолодження –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот.

Морфофункціональні властивості СФ оцінювали після розморожування за наступними показниками: 1) міграційна і проліферативна активність

клітин СФ на моделі «подряпина моношару»; 2) проліферативний потенціал клітин, які мігрували зі СФ, за оцінкою площі моношару; 3) здатність СФ до адгезії; 4) метаболічна активність клітин СФ за МТТ-тестом.

На моделі «подряпина моношару» була досліджена проліферативна і міграційна здатність клітин, кріоконсервованих за теоретично розрахованим у роботі режимом 1 (експериментальний), який включав час насичення СФ у кріосередовищі 65 секунд (за температури 10°C), швидкість охолодження 2°C/хв та кінцеву температуру охолодження –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C) порівняно зі стандартним режимом 2: час насичення СФ 10 хвилин (за температури 10°C), швидкість охолодження 1°C/хв, кінцева температура охолодження –40°C з подальшим зануренням у рідкий азот. Площа пошкодженого моношару утвореного клітинами зі СФ, кріоконсервованих за режимом 1, після 24 і 48 годин культивування значуще зменшувалась до $(58,7 \pm 2,8)$ і $(20,3 \pm 2,1)$ мм² відповідно порівняно з показниками режиму 2 – $(75,3 \pm 3,1)$ та $(48,5 \pm 2,4)$ мм².

З метою з'ясування впливу кінцевої температури охолодження на функціональні показники у подальших дослідженнях було додано для порівняння режим 3: час насичення СФ 10 хвилин (за температури 10°C), швидкість охолодження 1°C/хв, кінцева температура охолодження –80°C з подальшим зануренням у рідкий азот. Так, площа моношару утвореного після міграції клітин зі СФ, кріоконсервованих за режимом 1, через 1 та 3 доби культивування була більшою у 3,3 і 2,5 рази відповідно порівняно зі стандартними режимом 2. Подібний результат було отримано також у порівнянні зі стандартним режимом 3.

Схожа тенденція була виявлена при визначенні метаболічної активності деконсервованих СФ за МТТ-тестом. Так, рівень утворення формагану після розморожування СФ, кріоконсервованих за стандартними режимами 2 і 3, значуще зменшувався відносно значень накопичення формагану у СФ при використанні режиму 1.

Використані у роботі режими кріоконсервування суттєво не приводили до зниження адгезивних властивостей СФ, зокрема кількість прикріплених до культуральної поверхні СФ, кріоконсервованих за режимами 1, 2 та 3, не відрізнялась від нативних значень.

Кріопротектором, що найчастіше використовується для кріоконсервування 3D-культур різного походження, зокрема СФ, є диметилсульфоксид (ДМСО) [115, 173, 174]. У більшості сучасних досліджень з кріоконсервування СФ використовують ДМСО у концентраціях 7,5–10% [11, 114, 117, 162]. Однак, у той же час, широко відома токсична дія ДМСО на різні типи клітин [115, 175, 176], отже визначення необхідного часу насичення СФ у кріозахисному середовищі є дуже важливим для отримання ефективного протоколу кріоконсервування.

Досить поширеним протоколом кріоконсервування СФ, отриманих з різних типів клітин, є заморожування у спеціалізованих контейнерах, заповнених пропанолом (наприклад, Mr. Frosty™), які переміщують у низькотемпературну морозильну камеру на 24 години [174, 177, 178]. Це, як вважається, забезпечує швидкість охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ та кінцеву температуру охолодження $-70\dots-80^{\circ}\text{C}$.

Дуже часто при цьому у сучасних експериментальних роботах з кріоконсервування зовсім не звертають увагу на час інкубації СФ з кріопротектором та не вважають за потрібне вказувати це у протоколі [174, 178]. Можна лише припустити, що у більшості досліджень час інкубації СФ у кріозахисному середовищі складає від 3 до 10 хвилин (мінімальний час на те, щоб перенести контейнер зі зразками до морозильної камери). Також не приділяється належної уваги температурі кріозахисного середовища, при якій відбувається насичення СФ кріопротектором.

Однак, як впливає з наших експериментів, цей параметр є дуже важливим. Він залежить від терміну культивування СФ та їх структурної організації. При цьому перевищення часу інкубації для СФ з клітин лінії L929 (7 доба культивування) у кріозахисному середовищі з 60 с до 10 хв

призводило до значного зниження їх функціональних показників після розморожування.

Таким чином, на основі отриманих результатів доведено, що кріоконсервування СФ за режимом, розрахованим на основі фізико-математичної моделі, приводить до більш ефективного збереження структурно-функціональних властивостей та метаболічного потенціалу СФ порівняно зі стандартними режимами кріоконсервування.

Запропонований та експериментально обґрунтований у роботі алгоритм визначення режиму кріоконсервування СФ може бути використано: для інших багатоклітинних об'єктів, отриманих з клітин іншого типу, різних термінів культивування, кріозахисних середовищ різного складу (в залежності від типу і концентрації проникаючого кріопротектору та стабілізуючих сполук), для різних температур інкубації у кріозахисному середовищі.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати теоретичного узагальнення та експериментального дослідження, яке полягало у визначенні оптимального протоколу кріоконсервування сфероїдів з клітин лінії L929 різних термінів культивування. Визначений протокол базується на основі фізико-математичного моделювання процесів зневоднення та проникності кріопротектору диметилсульфоксиду у сфероїди, а також теоретично обґрунтованого встановлення основних параметрів режиму кріоконсервування: часу експозиції з кріопротектором, температури кріозахисного середовища та швидкості охолодження.

1. Доведено, що клітини лінії L929 здатні утворювати сфероїди за умов культивування на низькоадгезивній поверхні. Профіль секреції та кількість речовин білково-пептидної природи відрізняються у культурах клітин L929 у залежності від культивування у вигляді моношару або сфероїдів. Встановлено, що оптимальна посівна концентрація для отримання 70% сфероїдів діаметром 80–150 мкм, до складу яких входять життєздатні клітини з високим функціональним потенціалом, складає 2×10^5 клітин/мл.

2. Осмотично неактивний об'єм сфероїдів, отриманих з клітин L929, за умов інкубації у розчинах NaCl перевищує показник, встановлений для поодиноких клітин. Встановлено, що осмотично неактивний об'єм сфероїдів $\alpha_{\text{сф}}$ 10 діб культивування складає 0,41, що в 1,3 рази перевищує показник, встановлений для поодиноких клітин ($\alpha_{\text{кл}} = 0,32$). Доведено, що подовження терміну культивування збільшує відносний осмотично неактивний об'єм сфероїдів з 0,40 (7 доба) до 0,47 (14 доба) та 0,54 (21 доба).

3. Теоретично обґрунтовано, що час експозиції сфероїдів, отриманих із клітин L929, у кріозахисному середовищі на основі 1М ДМСО залежить від температури середовища та терміну культивування. За зменшення температури розчину з 25 до 15 та 10°C час експозиції сфероїдів 7, 14 і 21-ї доби культивування у кріозахисному середовищі статистично збільшується у

1,2; 1,6 і 2,7 рази (15°C) та 1,5; 3,2 і 4,4 рази (10°C) відповідно. Встановлено статистично значуще збільшення часу експозиції сфероїдів у кріозахисному середовищі при збільшенні термінів їхнього культивування до 14 і 21-ї доби відносно 7-ї доби: за 25°C — у 1,6; 2,3 рази, за 15°C — у 2,1 та 5,2 рази, за 10°C — у 3,3 та 6,8 рази відповідно.

4. За допомогою фізико-математичного моделювання показано, що на коефіцієнти проникності молекул води та ДМСО у клітини впливає їхня локалізація у складі сфероїдів. Доведено зменшення у 3,2 рази коефіцієнта проникності для ДМСО у клітини внутрішнього шару сфероїдів відносно клітин зовнішнього шару, тоді як проникність для молекул води залежно від локалізації клітин суттєво не змінюється. Такий факт може бути обумовлений молекулярною масою досліджених речовин і механізмами їхнього проникнення у клітини. За температури кріозахисного середовища 15°C коефіцієнти проникності для молекул води і ДМСО у клітини зовнішнього шару сфероїда зменшувались у 1,7 та 1,2 рази відповідно та клітини внутрішнього шару у 1,9 та 3,8 рази відповідно порівняно з поодинокими клітинами.

5. Теоретично встановлено, що коефіцієнти проникності молекул води і ДМСО у клітини залежать від терміну культивування сфероїдів та температури кріозахисного середовища. З підвищенням терміну культивування відбувається статистично значуще зменшення коефіцієнтів проникності молекул води та ДМСО у сфероїди: за температури 10°C на 14-у добу — у 2,3 і 5,7 рази, на 21-у добу — у 2,6 та 6,5 рази відповідно порівняно з 7-ю добою. Подібна тенденція спостерігається також за температур 15 та 25°C . Підвищення температури кріозахисного середовища з 10 до 15 та 25°C сприяє збільшенню коефіцієнтів проникності для молекул води у сфероїди 7-ї доби у 1,1 (15°C) та 1,7 (25°C) рази; для молекул ДМСО — у 2,5 (15°C) та 3,1 рази (25°C). Подібна тенденція спостерігалась і для сфероїди 14 та 21-ї доби культивування.

6. На основі фізико-математичного моделювання процесів масопереносу доведено вплив температури кріозахисного розчину та термінів культивування на значення енергії активації у процесі проникнення молекул води та ДМСО у сфероїди. Збільшення термінів культивування сфероїдів з 7-ї до 14 та 21-ї доби призводило до підвищення значення енергії активації для молекул води в інтервалі температур 10–15°C у 3,4 (14 доба) та 3,5 (21 доба); в інтервалі температур 10–25°C — у 1,9 (14 доба) та 1,8 (21 доба) рази; в інтервалі температур 15–25°C — у 1,4 (14 доба) та 1,5 (21 доба) рази відповідно. Значуще збільшення значення енергії активації для молекул ДМСО у 1,9 та 1,8 рази встановлено для сфероїдів 14 та 21-ї доби відповідно в інтервалі температур 10–25°C, у 6,8 та 7,6 рази — в інтервалі температур 15–25°C.

7. На підставі визначення коефіцієнтів проникності і процесів масопереносу молекул води і ДМСО встановлено швидкість і кінцеву температуру охолодження до занурення у рідкий азот для сфероїдів з клітин L929 різних термінів культивування. Запропонований режим кріоконсервування для сфероїдів 7-ї доби культивування передбачає швидкість охолодження 2°C/хв та кінцеву температуру охолодження –80°C; для СФ 14 та 21-ї доби культивування — швидкість охолодження 0,5°C/хв та кінцеву температуру охолодження –40°C.

8. В результаті експериментальної апробації доведена доцільність використання теоретичного алгоритму визначення режиму кріоконсервування сфероїдів на основі фізико-математичного моделювання. Встановлено, що кріоконсервування за теоретично розрахованим режимом приводить до підвищення метаболічної активності клітин у складі деконсервованих сфероїдів у 1,9 в 1,5 рази порівняно зі стандартними режимами кріоконсервування, які відрізнялися від визначеного у роботі режиму за часом експозиції з ДМСО, швидкістю охолодження та кінцевою температурою перед зануренням у рідкий азот. Проліферативна активність клітин сфероїдів, кріоконсервованих за теоретично розрахованим режимом,

через 24 і 48 годин після пошкодження моношару була вище у 1,3 та 2,4 рази відповідно порівняно зі стандартними режимами. Мігаторна активність клітин сфероїдів, кріоконсервованих за теоретично розрахованим режимом, через 1 та 3 доби після перенесення на адгезивну поверхню була вище у 3,4 і 2,7 рази та 2,5 і 1,4 рази відповідно порівняно зі стандартними режимами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gonzalez-Fernandez T, Tenorio AJ, Saiz AM Jr, Leach JK. Engineered cell-secreted extracellular matrix modulates cell spheroid mechanosensing and amplifies their response to inductive cues for the formation of mineralized tissues. *Adv Healthc Mater.* 2022;11(10):e2102337. DOI: [10.1002/adhm.202102337](https://doi.org/10.1002/adhm.202102337)
2. Petrenko Yu, Syková E, Kubinová Š. The therapeutic potential of threedimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Research & Therapy.* 2017;8:94. DOI: [10.1186/s13287-017-0558-6](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0558-6)
3. Pinto B, Henriques AC, Silva PM, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. *Pharmaceutics.* 2020;12(12):1186. DOI: [10.3390/pharmaceutics12121186](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186)
4. Pulze L, Congiu T, Brevini TAL, Grimaldi A, Tettamanti G, D'Antona P, et al. MCF7 Spheroid development: new insight about spatio/temporal arrangements of TNTs, amyloid fibrils, cell connections, and cellular bridges. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(15):5400. DOI: [10.3390/ijms21155400](https://doi.org/10.3390/ijms21155400)
5. Kim TY, Kofron CM, King ME, Markes AR, Okundaye AO, Qu Z, et al. Directed fusion of cardiac spheroids into larger heterocellular microtissues enables investigation of cardiac action potential propagation via cardiac fibroblasts. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196714. DOI: [10.1371/journal.pone.0196714](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196714)
6. Lee JH, Jung DH, Lee DH, Park JK, Lee SK. Effect of spheroid aggregation on susceptibility of primary pig hepatocytes to cryopreservation. *Transplantation Proceedings.* 2012;44(4):1015–17. DOI: [10.1016/j.transproceed.2012.03.009](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.03.009)
7. Ehrhart F, Schulz JC, Katsen-Globa A, Shirley SG, Reuter D, Bach F, et al. A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology.* 2009;58(2):119–27. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2008.11.005](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.005)

8. Purcell WM, Atterwill CK, Xu J. Cryopreservation of organotypic brain spheroid cultures. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2003;31(6):563–73. DOI: [10.1177/026119290303100605](https://doi.org/10.1177/026119290303100605)

9. Sundlisaeter E, Wang J, Sakariassen P, Marie M, Mathisen JR, Karlsen BO, et al. Primary glioma spheroids maintain tumorigenicity and essential phenotypic traits after cryopreservation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2006;32(4):419–27. DOI: [10.1111/j.1365-2990.2006.00744.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00744.x)

10. Коваленко ИФ, Коций СВ, Тимофеева ЕВ, Сакун АВ, Коваленко СЕ, Высеканцев ИП, и др. Проницаемость мембран клеток СПЭВ для молекул воды и ДМСО. *Проблемы Криобиологии*. 2009;19(1):25–31. Доступно на: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/5394>

11. Tarusin DN, Kireyev VA, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Rozanov LF, Petrenko AYU. Selection of protocols to cryopreserve mesenchymal stromal cells in suspension and alginate microspheres by studying their osmotic responses in 1M DMSO. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016;26(2):133–44. DOI: [10.15407/cryo26.02.133](https://doi.org/10.15407/cryo26.02.133)

12. Гордієнко ЄО, Гордієнко ОІ, Марущенко ВВ, Сакун ОВ. Удосконалена модель пасивного массопереносу крізь плазматичну мембрану клітини. *Біофізичний вісник*. 2008;21(2):75–80.

13. Novikova OYu, Sidorenko OS, Bozhok GA, Bondarenko TP. Cryopreservation effect on chromogranin A expression in neonatal pig adrenal cell culture. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019;29(4):344–53. DOI: [10.15407/cryo29.04.344](https://doi.org/10.15407/cryo29.04.344)

14. Моїсєєв АІ, Божок ГА, Горіна ОЛ. Порівняльна характеристика тривимірного та моношарового культивування перещеплюваної лінії фібробластів L929. *Доповіді Національної академії наук України*. 2019;(8):93–101. DOI: [10.15407/dopovidi2019.08.093](https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.08.093)

15. Моїсєєв АІ, Божок ГА, Горіна ОЛ, Бондаренко ТП. Морфофункціональні особливості фібробластів лінії L929 в умовах 3D-

культивування. *Фізіологічний журнал*. 2019;65(3):34–40. DOI: [10.15407/fz65.03.034](https://doi.org/10.15407/fz65.03.034)

16. Моїсєєв АІ, Коваленко ІФ, Коваленко СС, Божок ГА, Гордієнко ОІ. Динаміка проникання диметилсульфоксиду в клітини лінії L929 і сфероїди з них. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2021;31(4):316–25. DOI: [10.15407/cryo31.04.316](https://doi.org/10.15407/cryo31.04.316)

17. Моїсєєв АІ, Божок ГА, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ. Теоретичні підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування. *Біофізичний Вісник*. 2021;46:7–22. DOI: [10.26565/2075-3810-2021-46-01](https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01)

18. Moisieiev AI, Bozhok GA. Influence of the theoretically established cryopreservation regimen on the functional state of deconservate. *Вісник проблем біології і медицини*. 2022;2(1):100–108. DOI: [10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-100-108](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-100-108)

19. Божок ГА, Моїсєєв АІ, Горіна ОЛ, Ахатова ЮС, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб стандартизації розмірів тривимірних сфероїдів з фібробластів. Патент України №145824. 2021 січ. 6.

20. Моїсєєв АІ, Божок ГА. Сравнительная характеристика морфофункциональных особенностей фибробластов после 2D и 3D культивирования. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої 25-річному ювілею НАМН України та Дню науки «Профілактична медицина сьогодні: внесок молодих спеціалістів»; 2018 трав. 24; Харків. Харків, с.37.

21. Моїсєєв АІ, Божок ГА. Дослідження метаболічної активності фібробластів після 2D та 3D культивування. Матеріали 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 черв. 18–21; Яремче. Яремче; 2019. с.170.

22. Моїсєєв АІ. Дослідження часу експозиції сфероїдів у кріозахисному середовищі в залежності від діаметру. Матеріали науково-практичної

конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої Дню науки Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення; 2020 трав. 22; Харків. Харків; 2020. с.26.

23. Моїсєєв АІ, Коваленко ІФ. Кінетика зневоднення і відновлення об'єму багатоклітинних агрегатів на етапі експозиції в кріозахисному середовищі у залежності від строків культивування. Матеріали The 1st International scientific and practical conference — Modern science: problems and innovations; 2020 квіт. 5–7; Стокгольм. Стокгольм; 2020. с.33–39.

24. Моїсєєв АІ. Проникність поодиноких клітин та клітинних сфероїдів для молекул води та диметилсульфоксиду. Матеріали 45-ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених Холод в біології і медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології; 2021 трав. 19–20; Харків. Харків; 2021. с.11.

25. Моїсєєв АІ, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ, Божок ГА. Дослідження енергії активації переносу молекул води та диметилсульфоксиду у сфероїди в залежності від температури. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю, присвяченої Дню науки Наукові дослідження та інновації в медицині: актуальні питання, відкриття і досягнення; 2021 трав. 21; Харків. Харків; 2021. с.31.

26. Moisieiev AI. Methodical approaches to cryopreservation of cellular spheroids. Proceedings of the 58-th annual meeting of the society for cryobiology «CRYO 2021»; 2021 July 21–23; Chicago. Chicago; 2021. p.108.

27. Моїсєєв АІ, Божок ГА. Функціональна активність сфероїдів після кроконсервування за режимом визначеним на основі фізико-математичної моделі. Матеріали VII міжнародної науково-практичної конференції Topical issues of modern science, society and education; 2022 січ. 29–31; Харків. Харків; 2022. с.161–164.

28. Moisieiev AI, Bozhok GA, Moisieieva NN, Gorina OL, Akhatova JS. Experimental substantiation of the theoretically determined mode of 3D culture cryopreservation. Proceedings of the Joint meeting of the society for cryobiology

and the society for low temperature biology «CRYO 2022»; 2022 July 19–22; Dublin. Dublin; 2022. p.139.

29. Woappia Y, Altomare D, Creek KE, Pirisi L. Self-assembling 3D spheroid cultures of human neonatal keratinocytes have enhanced regenerative properties. *Stem Cell Research*. 2020;49:102048. DOI: [10.1016/j.scr.2020.102048](https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102048)

30. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(3):211–24. DOI: [10.1038/nrm1858](https://doi.org/10.1038/nrm1858)

31. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*. 2008;3(9–10):1172–84. DOI: [10.1002/biot.200700228](https://doi.org/10.1002/biot.200700228)

32. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(10):839–45. DOI: [10.1038/nrm2236](https://doi.org/10.1038/nrm2236)

33. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*. 2017;14(127):20160877. DOI: [10.1098/rsif.2016.0877](https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877)

34. Хомяк ОГ, Сидоренко МВ. Модель сфероидообразования и ее использование в онкологии. *Экспериментальная онкология*. 2001;23(4):236–41.

35. Hoffman RM. To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question. *Stem Cells*. 1993;11(2):105–11. DOI: [10.1002/stem.5530110205](https://doi.org/10.1002/stem.5530110205)

36. Moscona A, Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy*. 1952;86(3):287–301.

37. Steinberg MS. Differential adhesion in morphogenesis: a modern view. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2007;17(4):281–86. DOI: [10.1016/j.gde.2007.05.002](https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.05.002)

38. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*. 2009;30(12):2164–74. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2008.12.084](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.084)
39. Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012;12(10):1347–60. DOI: [10.1517/14712598.2012.707181](https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181)
40. Fukuda J, Nakazawa K. Orderly arrangement of hepatocyte spheroids on a microfabricated chip. *Tissue Engineering*. 2005;11(7–8):1254–62. DOI: [10.1089/ten.2005.11.1254](https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1254)
41. Kunz-Schughart LA, Schroeder JA, Wondrak M, van Rey F, Lehle K, Hofstaedter F, et al. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2006;290(5):1385–98. DOI: [10.1152/ajpcell.00248.2005](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2005)
42. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(9):645–58. DOI: [10.1038/nrc2192](https://doi.org/10.1038/nrc2192)
43. Labusca LS. Scaffold free 3D culture of mesenchymal stem cells; Implications for regenerative medicine. *Journal of Transplantation & Stem Cell Biology*. 2015;2(1):8. DOI: [10.13188/2374-9326.1000008](https://doi.org/10.13188/2374-9326.1000008)
44. Сукач АН. In vitro формирование агрегатов фетальными нервными клетками человека: потенциал их использования в регенеративной медицине. Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2012;13(1):118–121.
45. Payr S, Rosado-Balmayor E, Tiefenboeck T, Schuseil T, Unger M, Seeliger C, et al. Direct comparison of 3D and 2D cultivation reveals higher osteogenic capacity of elderly osteoblasts in 3D. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2021;16(1):13. DOI: [10.1186/s13018-020-02153-z](https://doi.org/10.1186/s13018-020-02153-z)
46. Catterall R, Kurdieh R, McCaffrey L. Studying cell polarity dynamics during cancer initiation using inducible 3D organotypic cultures. *Methods in Molecular Biology*. 2022;(2438):455–66. DOI: [10.1007/978-1-0716-2035-9_26](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2035-9_26)

47. Qu F, Zhao S, Cheng G, Rahman H, Xiao Q, Chan RWY, et al. Double emulsion-pretreated microwell culture for the in vitro production of multicellular spheroids and their in situ analysis. *Microsystems & Nanoengineering*. 2021;7:38. DOI: [10.1038/s41378-021-00267-w](https://doi.org/10.1038/s41378-021-00267-w)
48. Ivascu A, Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *International Journal of Oncology*. 2007;31(6):1403–13. DOI: [10.3892/ijo.31.6.1403](https://doi.org/10.3892/ijo.31.6.1403)
49. Shimazui T, Schalken JA, Kawai K, Kawamoto R, Van Bochoven A, Oosterwijk E, et al. Role of complex cadherins in cell-cell adhesion evaluated by spheroid formation in renal cell carcinoma cell lines. *Oncology Reports*. 2004;11(2):357–60. DOI: [10.3892/or.11.2.357](https://doi.org/10.3892/or.11.2.357)
50. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(2):118–32. DOI: [10.1038/nrc1276](https://doi.org/10.1038/nrc1276)
51. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*. 2006;11(8):922–32. DOI: [10.1177/1087057106292763](https://doi.org/10.1177/1087057106292763)
52. Vadivelu RK, Kamble H, Shiddiky MJA, Nguyen NT. Microfluidic technology for the generation of cell spheroids and their applications. *Micromachines*. 2017;8(4):94. DOI: [10.3390/mi8040094](https://doi.org/10.3390/mi8040094)
53. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7:33. DOI: [10.3389/fmolb.2020.00033](https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033)
54. Takezawa T, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K. Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 1993;208(2):430–41. DOI: [10.1006/excr.1993.1265](https://doi.org/10.1006/excr.1993.1265)
55. Fujisawa K, Takami T, Sasai N, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I. Metabolic alterations in spheroid-cultured hepatic stellate cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):3451. DOI: [10.3390/ijms21103451](https://doi.org/10.3390/ijms21103451)

56. Coyle R, Yao J, Richards D, Mei Y. The effects of metabolic substrate availability on human adipose-derived stem cell spheroid survival. *Tissue Engineering Part A*. 2019;25(7–8):620–31. DOI: [10.1089/ten.tea.2018.0163](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0163)
57. Langan LM, Owen SF, Trznadel M, Dodd NJF, Jackson SK, Purcell WM, et al. Spheroid size does not impact metabolism of the β -blocker propranolol in 3D intestinal fish model. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:947. DOI: [10.3389/fphar.2018.00947](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00947)
58. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures — examples of methods of preparation and the most important application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):6225. DOI: [10.3390/ijms21176225](https://doi.org/10.3390/ijms21176225)
59. Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnology*. 2014;14:105. DOI: [10.1186/s12896-014-0105-9](https://doi.org/10.1186/s12896-014-0105-9)
60. Nyberg SL, Hardin J, Amiot B, Argikar UA, Remmel RP, Rinaldo P. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. *Liver Transplantation*. 2005;11(8):901–10. DOI: [10.1002/lt.20446](https://doi.org/10.1002/lt.20446)
61. Abu-Absi SF, Friend JR, Hansen LK, Hu WS. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Experimental Cell Research*. 2002;274(1):56–67. DOI: [10.1006/excr.2001.5467](https://doi.org/10.1006/excr.2001.5467)
62. Selden C, Spearman CW, Kahn D, Miller M, Figaji A, Erro E, et al. Evaluation of encapsulated liver cell spheroids in a fluidised-bed bioartificial liver for treatment of ischaemic acute liver failure in pigs in a translational setting. *PLoS One*. 2013;8(12):e82312. DOI: [10.1371/journal.pone.0082312](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082312)
63. Mitra M, Mohanty C, Harilal A, Maheswari UK, Sahoo SK, Krishnakumar S. A novel in vitro three-dimensional retinoblastoma model for evaluating chemotherapeutic drugs. *Molecular Vision*. 2012;18(142–45):1361–78. Available from: <http://www.molvis.org/molvis/v18/a142>

64. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. 2018;14(4):910–19. DOI: [10.5114/aoms.2016.63743](https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743)
65. Justice BA, Badr NA, Felder RA. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discovery Today*. 2009;14(1):102–7. DOI: [10.1016/j.drudis.2008.11.006](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.11.006)
66. Li L, Sun J, He Z. Deep penetration of nanoparticulate drug delivery systems into tumors: challenges and solutions. *Current Medicinal Chemistry*. 2013;20(23):2881–91. DOI: [10.2174/09298673113209990004](https://doi.org/10.2174/09298673113209990004)
67. Huang K, Ma H, Liu J, Huo S, Kumar A, Wei T, et al. Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS Nano*. 2012;6(5):4483–93. DOI: [10.1021/nn301282m](https://doi.org/10.1021/nn301282m)
68. Lee J, Lilly GD, Doty RC, Podsiadlo P, Kotov NA. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small*. 2009;5(10):1213–21. DOI: [10.1002/smll.200801788](https://doi.org/10.1002/smll.200801788)
69. Hackenberg S, Zimmermann FZ, Scherzed A, Friehs G, Froelich K, Ginzkey C, et al. Repetitive exposure to zinc oxide nanoparticles induces dna damage in human nasal mucosa mini organ cultures. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2011;52(7):582–89. DOI: [10.1002/em.20661](https://doi.org/10.1002/em.20661)
70. Huang SW, Tzeng SC, Chen JK, Sun JS, Lin FH. A dynamic hanging-drop system for mesenchymal stem cell culture. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(12):4298. DOI: [10.3390/ijms21124298](https://doi.org/10.3390/ijms21124298)
71. Denker SP, Barber DL. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *The Journal of Cell Biology*. 2002;159(6):1087–96. DOI: [10.1083/jcb.200208050](https://doi.org/10.1083/jcb.200208050)
72. Maritan SM, Lian EY, Mulligan LM. An efficient and flexible cell aggregation method for 3D spheroid production. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;(121):55544. DOI: [10.3791/55544](https://doi.org/10.3791/55544)

73. Costa EC, de Melo-Diogo D, Moreira AF, Carvalho MP, Correia IJ. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: considerations and practical approaches. *Biotechnology Journal*. 2018;13(1):1700417. DOI: [10.1002/biot.201700417](https://doi.org/10.1002/biot.201700417)

74. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*. 2019;8(12):1620. DOI: [10.3390/cells8121620](https://doi.org/10.3390/cells8121620)

75. Wang A, Madden LA, Paunov VN. Advanced biomedical applications based on emerging 3D cell culturing platforms. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(46):10487–10501. DOI: [10.1039/d0tb01658f](https://doi.org/10.1039/d0tb01658f)

76. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;83(2):173–80. DOI: [10.1002/bit.10655](https://doi.org/10.1002/bit.10655)

77. Sheyn D, Pelled G, Netanel D, Domany E, Gazit D. The effect of simulated microgravity on human mesenchymal stem cells cultured in an osteogenic differentiation system: a bioinformatics study. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(11):3403–12. DOI: [10.1089/ten.tea.2009.0834](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0834)

78. Meyers VE, Zayzafoon M, Gonda SR, Gathings WE, McDonald JM. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004;93(4):697–707. DOI: [10.1002/jcb.20229](https://doi.org/10.1002/jcb.20229)

79 Juang YJ, Chiu YJ. Fabrication of polymer microfluidics: an overview. *Polymers*. 2022;14(10):2028. DOI: [10.3390/polym14102028](https://doi.org/10.3390/polym14102028)

80. Anil-Inevi M, Yaman S, Yildiz AA, Mese G, Yalcin-Ozuysal O, Tekin HC, et al. Biofabrication of in situ self assembled 3D cell cultures in a weightlessness environment generated using magnetic levitation. *Scientific Reports*. 2018;8(1):7239. DOI: [10.1038/s41598-018-25718-9](https://doi.org/10.1038/s41598-018-25718-9)

81. Komeri R, Muthu J. In situ crosslinkable elastomeric hydrogel for long-term cell encapsulation for cardiac applications. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2016;104(12):2936–44. DOI:[10.1002/jbm.a.35833](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35833)
82. Hoesli CA, Kiang RLJ, Raghuram K, Pedroza RG, Markwick KE, Colantuoni AMR, et al. Mammalian cell encapsulation in alginate beads using a simple stirred vessel. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;124:e55280. DOI:[10.3791/55280](https://doi.org/10.3791/55280)
83. Qayyum AS, Jain E, Kolar G, Kim Y, Sell SA, Zustiak SP. Design of electrohydrodynamic sprayed polyethylene glycol hydrogel microspheres for cell encapsulation. *Biofabrication*. 2017;9(2):025019. DOI: [10.1088/1758-5090/aa703c](https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa703c)
84. Qi C, Yan X, Huang C, Melerzanov A, Du Y. Biomaterials as carrier, barrier and reactor for cell-based regenerative medicine. *Protein & Cell*. 2015;6(9):638–53. DOI: [10.1007/s13238-015-0179-8](https://doi.org/10.1007/s13238-015-0179-8)
85. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):5517–27. DOI: [10.3390/ijms16035517](https://doi.org/10.3390/ijms16035517)
86. Mintser OP, Zaliskyi VM, Babintseva LYu. Generation of self-organization and self-assembly processes in biological tissue engineering and regenerative medicine. *Medical Informatics and Engineering*. 2019;(3):37–48. DOI: [10.11603/mie.1996-1960.2019.3.10431](https://doi.org/10.11603/mie.1996-1960.2019.3.10431)
87. Lee JK, Link JM, Hu JCY, Athanasiou KA. The self-assembling process and applications in tissue engineering. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(11):a025668. DOI: [10.1101/cshperspect.a025668](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025668)
88. Štampar M, Žabkar S, Filipič M, Žegura B. HepG2 spheroids as a biosensor-like cell-based system for (geno)toxicity assessment. *Chemosphere*. 2022;291(1):132805. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2021.132805](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132805)
89. Gaskell H, Sharma P, Colley HE, Murdoch C, Williams DP, Webb SD. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. *Toxicology Research*. 2016;5(4):1053–65. DOI: [10.1039/C6TX00101G](https://doi.org/10.1039/C6TX00101G)

90. Wang J, Zhang X, Li X, Zhang Y, Hou T, Wei L, et al. Anti-gastric cancer activity in three-dimensional tumor spheroids of bufadienolides. *Scientific Reports*. 2016;6:24772. DOI: [10.1038/srep24772](https://doi.org/10.1038/srep24772)

91. Zheng Y, Jiang LI, Yan M, Gosau M, Smeets R, Kluwe L, et al. Optimizing conditions for spheroid formation of dental pulp cells in cell culture. *In Vivo*. 2021;35(4):1965–72. DOI: [10.21873/invivo.12464](https://doi.org/10.21873/invivo.12464)

92. Tan Y, Richards D, Coyle RC, Yao J, Xu R, Gou W, et al. Cell number per spheroid and electrical conductivity of nanowires influence the function of silicon nanowired human cardiac spheroids. *Acta Biomaterialia*. 2017;51:495–504. DOI: [10.1016/j.actbio.2017.01.029](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.029)

93. Gordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Ogurtsova VV, Todrin AF. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two factor theory of cryodamage. *Cryo Letters*. 2018;39(6):380–85. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/330912572>

94. Gordienko OI, Kovalenko IF, Kovalenko SYe, Kuleshova LG, Todrin AF. Theoretical estimation of optimal linear cooling rate for PK-15 cell suspension. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021;31(3):214–22. DOI: [10.15407/cryo31.03.214](https://doi.org/10.15407/cryo31.03.214)

95. Chang T, Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced Science*. 2021;8(6):2002425. DOI: [10.1002/advs.202002425](https://doi.org/10.1002/advs.202002425)

96. Fahy GM, Wowk B. Principles of ice-free cryopreservation by vitrification. *Methods in Molecular Biology*. 2021;2180:27–97. DOI: [10.1007/978-1-0716-0783-1_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_2)

97. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наукова думка; 1994. 143 с.

98. Давыдова ЕВ, Гордиенко ОИ. Влияние температуры на проницаемость мембран эритроцитов для криопротекторов с различной степенью гидрофобности. *Проблемы криобиологии*. 2009;19(3):261–72. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2009_19_3_5
99. Joshi P, Rabin Y. Analysis of crystallization during rewarming in suboptimal vitrification conditions: a semi-empirical approach. *Cryobiology*. 2021;103:70–80. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2021.09.007](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.09.007)
100. Кулешова ЛГ, Коваленко ИФ. Определение транспортных характеристик плазматических мембран клеток в условиях внеклеточной кристаллизации. *Проблемы криобиологии*. 2006;16(1):3–12. Доступно на: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/137078>
101. Кулешова ЛГ, Коваленко ИФ. Теоретическое прогнозирование оптимальных скоростей охлаждения клеточных суспензий. *Вестник Харьковского национального университета. Биофизический вестник*. 2008; 20(1):56–64.
102. Кулешова ЛГ, Розанов ЛФ. Роль структуры внеклеточного льда в процессе криоповреждения клеток. Моделирование криобиологических процессов: Сборник научных трудов. 1988; 25–34.
103. Anderson DM, Benson JD, Kearsley AJ. Foundations of modeling in cryobiology — II: Heat and mass transport in bulk and at cell membrane and ice-liquid interfaces. *Cryobiology*. 2019;91:3–17. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2019.09.014](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.09.014)
104. Huebinger J. Modification of cellular membranes conveys cryoprotection to cells during rapid, non-equilibrium cryopreservation. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205520. DOI: [10.1371/journal.pone.0205520](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205520)
105. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JRT. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*. 2021;30:1–12. DOI: [10.1177/0963689721999617](https://doi.org/10.1177/0963689721999617)
106. Dlodla PV, Jack B, Viraragavan A, Pheiffer C, Johnson R, Louw J, et al. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and

oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *Toxicology Reports*. 2018;5:1014–20. DOI:[10.1016/j.toxrep.2018.10.002](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.10.002)

107. Wang M, Karlsson JOM, Aksan A. FTIR analysis of molecular changes associated with warming injury in cryopreserved leukocytes. *Langmuir*. 2019;35(23):7552–9. DOI: [10.1021/acs.langmuir.8b02982](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02982)

108. Cheng CY, Song J, Pas J, Meijer LHH, Han S. DMSO induces dehydration near lipid membrane surfaces. *Biophysical Journal*. 2015;109(2):330–39. DOI: [10.1016/j.bpj.2015.06.011](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.011)

109. Lee Y, Pincus PA, Hyeon C. Effects of dimethyl sulfoxide on surface water near phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*. 2016;111(11):2481–91. DOI: [10.1016/j.bpj.2016.10.033](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.10.033)

110. Nagahara Y, Sekine H, Otaki M, Hayashi M, Murase N. Use of high concentrations of dimethyl sulfoxide for cryopreservation of HepG2 cells adhered to glass and polydimethylsiloxane matrices. *Cryobiology*. 2016;72(1):53–9. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.11.004)

111. Chen X, Thibeault S. Effect of DMSO concentration, cell density and needle gauge on the viability of cryopreserved cells in three dimensional hyaluronan hydrogel. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2013; 6228–31. DOI: [10.1109/EMBC.2013.6610976](https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6610976)

112. Schwarz S, Spitzbarth I, Baumgärtner W, Lehmbecker A. Cryopreservation of canine primary dorsal root ganglion neurons and its impact upon susceptibility to paramyxovirus infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1058. DOI: [10.3390/ijms20051058](https://doi.org/10.3390/ijms20051058)

113. Сукач АН, Ляшенко ТД. Роль формирования агрегатов в процессе выживания изолированных нервных клеток новорожденных крыс после криоконсервирования. *Проблемы криобиологии*. 2011;21(4):395–405. Доступно на: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/68462>

114. Ali SG, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from primary culture of newborn piglet spinal ganglion cells. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019;29(4):354–64. DOI: [10.15407/cryo29.04.354](https://doi.org/10.15407/cryo29.04.354)
115. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative Medicine*. 2020;15(3):1463–91. DOI: [10.2217/rme-2019-0145](https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145)
116. Petrenko YA, Rogulska OY, Mutsenko VV, Petrenko AY. A sugar pretreatment as a new approach to the Me₂SO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells. *Cryo Letters*. 2014;35(3):239–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24997842/>
117. Nurhayati RW, Pratama G, Dinastri M. The cryoprotecting effects of trehalose and dimethyl sulfoxide on alginate-chitosan encapsulated mesenchymal stem cells. *AIP Conference Proceedings*. 2022; 2537: 020006. DOI: [10.1063/5.0107055](https://doi.org/10.1063/5.0107055)
118. Тамарина ИВ, Божок ГА, Гурина ТМ, Губина НФ, Бондаренко ТП. Криоконсервирование суспензии клеток надпочечников новорожденных мышей. II. Влияние концентраций сыворотки в составе криозащитной среды. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2013;23(1):66–74. Доступно на: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/68705>
119. Plaksina EM, Sidorenko OC, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from newborn piglet adrenal glands. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2017;27(4):322–33. DOI: [10.15407/cryo27.04.322](https://doi.org/10.15407/cryo27.04.322)
120. Arai K, Murata D, Takao S, Verissimo AR, Nakayama K. Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs. *PLoS One*. 2020;15(11):e0230428. DOI: [10.1371/journal.pone.0230428](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230428)
121. Ma XH, Shi Y, Hou Y, Liu Y, Zhang L, Fan WX, et al. Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. *Cryobiology*. 2010;60(2):184–91. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2009.10.013](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.013)

122. Tan FC, Lee KH, Gouk SS, Magalhaes R, Poonepalli A, Hande MP, et al. Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols. *Cryo Letters*. 2007;28(6):445–60. Available from: <http://www.cryoletters.org/index.htm>

123. Сакун ОВ, Коваленко ІФ, Сіренко АЮ, Висеканцев ПІ, Давидова ОВ, Гордієнко ЄО, та ін. Коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і кріопротекторів. *Вісник ХНУ імені В.Н. Каразіна. Серія: Біологія*. 2008;814(7):140–47. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VKhb_2008_814_7_24

124. Ogurtsova VV, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Gordiyenko OI. Permeability coefficients of murine enterocyte membranes for water and cryoprotectants. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016;26(3):221–28. DOI: [10.15407/cryo26.03.221](https://doi.org/10.15407/cryo26.03.221)

125. Goltsev AM, Yampolska KYe, Kisielova HG, Ostankov MV, Dubrava TG, Babenko NM, et al. Cryopreservation as biotechnological application of dendritic cells in clinical practice. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021;31(4):289–303. DOI: [10.15407/cryo31.04.289](https://doi.org/10.15407/cryo31.04.289)

126. García-Briega MI, Ródenas-Rochina J, Martins LA, Lanceros-Méndez S, Ferrer GG, Sempere A, et al. Stability of biomimetically functionalised alginate microspheres as 3D support in cell cultures. *Polymers (Basel)*. 2022;14(20):4282. DOI: [10.3390/polym14204282](https://doi.org/10.3390/polym14204282)

127. Gryshkov O, Mutsenko V, Tarusin D, Khayyat D, Naujok O, Riabchenko E, et al. Coaxial alginate hydrogels: from self-assembled 3D cellular constructs to long-term storage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(6):3096. DOI: [10.3390/ijms22063096](https://doi.org/10.3390/ijms22063096)

128. Amereh M, Edwards R, Akbari M, Nadler B. In-silico modeling of tumor spheroid formation and growth. *Micromachines*. 2021;12(7):749. DOI: [10.3390/mi12070749](https://doi.org/10.3390/mi12070749)

129. Anderson DM, Benson JD, Kearsley AJ. Foundations of modeling in cryobiology—III: Inward solidification of a ternary solution towards a permeable

spherical cell in the dilute limit. *Cryobiology*. 2020;92:34–46. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2019.09.013](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.09.013)

130. Пишко ОВ, Смольянинова ЕИ, Коваленко ИФ, Розанов ЛФ. Проницаемость мембран ооцитов и эмбрионов мыши для молекул 1,2-пропандиола и повреждающее действие его концентрированных растворов. *Проблемы криобиологии*. 2004;4:3–7. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2004_4_3

131. Коваленко ГВ, Коваленко ИФ, Линник ТП. Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда амидов и диолов. *Проблемы криобиологии*. 2007;17(4):365–73. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2007_17_4_8

132. Смольянинова ЕИ, Пишко ОВ, Лисина ЕГ, Колесникова АА, Розанов ЛФ. Анализ влияния различных этапов криоконсервирования методом витрификации в этиленгликоль-сахарозной среде на жизнеспособность 2-клеточных эмбрионов мыши. *Проблемы криобиологии*. 2007;17(4):385–93. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2007_17_4_10

133. Смольянинова ЕИ, Хроменкова ОБ, Жерноклев ГВ, Пишко ОВ. Влияние эквilibрации в среде замораживания на осмотическую устойчивость и жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мыши. *Проблемы криобиологии*. 2004;1:3–11. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2004_1_3

134. Ogurtsova VV, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Gordiyenko OI. Determination of osmotically inactive volume of murine enterocytes. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016;26(1):93–7. DOI: [10.15407/cryo26.01.093](https://doi.org/10.15407/cryo26.01.093)

135. Kuleshova LG, Kovalenko IF, Kovalenko SYe, Tsibulko TS, Gordienko OI. Transport characteristics of plasma membranes of PK-15 passaged cells. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2021;31(1):14–22. DOI: [10.15407/cryo31.01.014](https://doi.org/10.15407/cryo31.01.014)

136. Belous AM, Mokhamed AN, Semenchenko AYU, Yavorskaya VA. 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.* 1997; 8:177–81.

137. Todrin AF, Popivnenko LI, Kovalenko SYe. Thermophysical properties of cryoprotectants. I. Temperature and heat of melting. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* 2009;19(2):163–76. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/KrioBiol_2009_19_2_7

138. Armitage WJ, Mazur P. Osmotic tolerance of human granulocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology.* 1984;247(5):373–81. DOI: [10.1152/ajpcell.1984.247.5.C373](https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.5.C373)

139. Cheng NC, Wang S, Young TH. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. *Biomaterials.* 2012;33(6):1748–58. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2011.11.049](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.049)

140. Sato R, Yasukawa T, Kacza J, Eichler W, Nishiwaki A, Iandiev I, et al. Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch's membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2013;54(3):1740–49. DOI: [10.1167/iovs.12-10068](https://doi.org/10.1167/iovs.12-10068)

141. Roper SJ, Coyle B. Establishing an in vitro 3D spheroid model to study medulloblastoma drug response and tumor dissemination. *Current Protocols.* 2022;2(1):1–29. DOI: [10.1002/cpz1.357](https://doi.org/10.1002/cpz1.357)

142. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols.* 2009;4(3):309–24. DOI: [10.1038/nprot.2008.226](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226)

143. Decarli MC, Amaral R, Santos DP, Tofani LB, Katayama E, Rezende RA, et al. Cell spheroids as a versatile research platform: formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. *Biofabrication.* 2021;13(3). DOI: [10.1088/1758-5090/abe6f2](https://doi.org/10.1088/1758-5090/abe6f2)

144. Stadler M, Scherzer M, Walter S, Holzner S, Pudenko K, Riedl A, et al. Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion

molecules in colon cancer cells. *Scientific Reports*. 2018;8:1151. DOI: [10.1038/s41598-018-19384-0](https://doi.org/10.1038/s41598-018-19384-0)

145. Thakuri PS, Gupta M, Plaster M, Tavana H. Quantitative size-based analysis of tumor spheroids and responses to therapeutics. *Assay and Drug Development Technologies*. 2019;17(3):140–49. DOI: [10.1089/adt.2018.895](https://doi.org/10.1089/adt.2018.895)

146. Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One*. 2009;4(2):e4632. DOI: [10.1371/journal.pone.0004632](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004632)

147. Nicolas J, Magli S, Rabbachin L, Sampaolesi S, Nicotra F, Russo L. 3D extracellular matrix mimics: fundamental concepts and role of materials chemistry to influence stem cell fate. *Biomacromolecules*. 2020;21(6):1968–94. DOI: [10.1021/acs.biomac.0c00045](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00045)

148. 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. DOI: [10.15407/biotech6.03.063](https://doi.org/10.15407/biotech6.03.063)

149. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281(5381):1305–8. DOI: [10.1126/science.281.5381.1305](https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305)

150. Gulevsky AK, Moiseyeva NN, Gorina OL. Antiapoptotic effect of leu-enkephalin neuropeptide on donor blood leukocytes under cold stress. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr*. 2019;4:94–100. DOI: [10.15407/dopovidi2019.04.094](https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.04.094)

151. Petry F, Salzig D. The cultivation conditions affect the aggregation and functionality of β -cell lines alone and in coculture with mesenchymal stromal/stem cells. *Engineering in Life Sciences*. 2022;22(12):769–83. DOI: [10.1002/elsc.202100168](https://doi.org/10.1002/elsc.202100168)

152. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*. 2015;227(6):746–56. DOI: [10.1111/joa.12257](https://doi.org/10.1111/joa.12257)

153. Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Experimental & Molecular Medicine*. 2009;41(12):858–65. DOI: [10.3858/emm.2009.41.12.096](https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.12.096)

154. Shevchenko NA, Strybul TF, Rozanov LF. Effect of multiatom alcohols, amides and DMSO on grape and potato meristems integrity. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2004;3:79–85. Available from: <https://journal.cryo.org.ua/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/678>

155. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*. 1966;2(4):181–92. DOI: [10.1016/s0011-2240\(66\)80165-7](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(66)80165-7)

156. Yu G, Yap YR, Pollock K, Hubel A. Characterizing intracellular ice formation of lymphoblasts using low-temperature raman spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2017;112(12):2653–63. DOI: [10.1016/j.bpj.2017.05.009](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.009)

157. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 1977;14(3):251–72. DOI: [10.1016/0011-2240\(77\)90175-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90175-4)

158. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1257:3–19. DOI: [10.1007/978-1-4939-2193-5_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_1)

159. Wesley-Smith J, Walters C, Pammenter NW, Berjak P. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. *Annals of Botany*. 2015;115(6):991–1000. DOI: [10.1093/aob/mcv009](https://doi.org/10.1093/aob/mcv009)

160. Li R, Yu G, Azarin SM, Hubel A. Freezing responses in DMSO-based cryopreservation of human iPS cells: aggregates versus single cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2018;24(5):289–99. DOI: [10.1089/ten.tec.2017.0531](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0531)

161. Molinie N, Gautreau A. Directional collective migration in wound healing assays. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1749:11–19. DOI: [10.1007/978-1-4939-7701-7_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7701-7_2)

162. Волкова НО, Введенський ДБ, Юхта МС, Гольцев АМ. Вплив кріоконсервування на фенотип і функціональні властивості мультипотентних

мезенхімальних стромальних клітин із різних джерел. *Probl Cryobiol Cryomed* 2021; 31(3):268–272. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.268>

163. Tarusin D, Mazur S, Volkova N, Petrenko Yu, Zaikov V, Petrenko A. Encapsulation of mesenchymal stromal cells in alginate microspheres. *Biotechnologia Acta*. 2016;9(4):58–66. DOI: [10.15407/biotech9.04.058](https://doi.org/10.15407/biotech9.04.058)

164. Buch K, Peters T, Nawroth T, Sängner M, Schmidberger H, Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT assay - a comparative study. *Radiation Oncology*. 2012;7(1):1–6. DOI: [10.1186/1748-717X-7-1](https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-1)

165. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(3):1317–30. DOI: [10.1096/fj.13-235440](https://doi.org/10.1096/fj.13-235440)

166. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2014;12(4):207–18. DOI: [10.1089/adt.2014.573](https://doi.org/10.1089/adt.2014.573)

167. De Jongh D, Massey EK, VANGUARD consortium, Bunnik EM. Organoids: a systematic review of ethical issues. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):337. DOI: [10.1186/s13287-022-02950-9](https://doi.org/10.1186/s13287-022-02950-9)

168. Han SJ, Kwon S, Kim KS. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*. 2021;21(1):152. DOI: [10.1186/s12935-021-01853-8](https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8)

169. Sakalem ME, De Sibio MT, da Costa FADS, de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnology Journal*. 2021;16(5):e2000463. DOI: [10.1002/biot.202000463](https://doi.org/10.1002/biot.202000463)

170. Kim W, Gwon Y, Park S, Kim H, Kim J. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. *Bioactive Materials*. 2022;19:50–74. DOI: [10.1016/j.bioactmat.2022.03.039](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.039)

171. Gunti S, Hoke ATK, Vu KP, London NR. Organoid and spheroid tumor models: techniques and applications. *Cancers*. 2021;13(4):874. DOI: [10.3390/cancers13040874](https://doi.org/10.3390/cancers13040874)

172. Netti PA, Baxter LT, Boucher Y, Skalak R, Jain RK. Macro- and microscopic fluid transport in living tissues: Application to solid tumors. *AIChE Journal*. 1997;43(3):818–34. DOI: [10.1002/aic.690430327](https://doi.org/10.1002/aic.690430327)

173. Hiramatsu S, Morizane A, Kikuchi T, Doi D, Yoshida K, Takahashi J. Cryopreservation of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurospheres for clinical application. *Journal of Parkinson's Disease*. 2022;12(3):871–84. DOI: [10.3233/JPD-212934](https://doi.org/10.3233/JPD-212934)

174. Barenys M, Illa M, Hofrichter M, Loreiro C, Pla L, Klose J, et al. Rabbit neurospheres as a novel in vitro tool for studying neurodevelopmental effects induced by intrauterine growth restriction. *Stem Cells Translational Medicine*. 2021;10(2):209–21. DOI: [10.1002/sctm.20-0223](https://doi.org/10.1002/sctm.20-0223)

175. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of Disease*. 2009;34(1):1–10. DOI: [10.1016/j.nbd.2008.11.006](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006)

176. Yi X, Liu M, Luo Q, Zhuo H, Cao H, Wang J, et al. Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio*. 2017;7(4):485–94. DOI: [10.1002/2211-5463.12193](https://doi.org/10.1002/2211-5463.12193)

177. Deshpande K, Saatian B, Martirosian V, Lin M, Julian A, Neman J. Isolation of neural stem cells from whole brain tissues of adult mice. *Current Protocols in Stem Cell Biology*. 2019;49(1):e80. DOI: [10.1002/cpsc.80](https://doi.org/10.1002/cpsc.80)

178. Yamatoya K, Nagai Y, Teramoto N, Kang W, Miyado K, Nakata K, et al. Cryopreservation of undifferentiated and differentiated human neuronal cells. *Regenerative Therapy*. 2022;19:58–68. DOI: [10.1016/j.reth.2021.12.007](https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.12.007)

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА, Горіна ОЛ. Порівняльна характеристика тривимірного та моношарового культивування перещеплюваної лінії фібробластів L929. Доповіді Національної академії наук України. 2019;(8):93–101. DOI: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.08.093>
2. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА, Горіна ОЛ, Бондаренко ТП. Морфофункціональні особливості фібробластів лінії L929 в умовах 3D-культивування. Фізіологічний журнал. 2019;65(3):34–40. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.03.034>
3. **Moisieiev AI**, Bozhok GA. Influence of the theoretically established cryopreservation regimen on the functional state of deconservate. Вісник проблем біології і медицини. 2022;2(1):100–108. DOI: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-100-108>

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus

4. **Моїсєєв АІ**, Коваленко ІФ, Коваленко СС, Божок ГА, Гордієнко ОІ. Динаміка проникання диметилсульфоксиду в клітини лінії L929 і сфероїди з них. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2021;31(4):316–25. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.316>
5. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ. Теоретичні підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування. Біофізичний вісник. 2021;46:7–22. DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

Корисна модель за матеріалами дисертації

6. Божок ГА, **Моїсєєв АІ**, Горіна ОЛ, Ахатова ЮС, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб стандартизації розмірів тривимірних сфероїдів з фібробластів. Патент України №145824. 2021 січ. 6.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

7. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА. Сравнительная характеристика морфофункциональных особенностей фибробластов после 2D и 3D культивирования. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої 25-річному ювілею НАМН України та Дню науки «Профілактична медицина сьогодні: внесок молодих спеціалістів»; 2018 трав. 24; Харків. Харків; 2018. с.37.
8. **Моїсєєв АІ**, Божок ГА. Дослідження метаболічної активності фібробластів після 2D та 3D культивування. Матеріали 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 черв. 18–21; Яремче. Яремче; 2019. с.170.
9. **Моїсєєв АІ**. Дослідження часу експозиції сфероїдів у кріозахисному середовищі в залежності від діаметру. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої Дню науки Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення; 2020 трав. 22; Харків. Харків; 2020. с.26.
10. **Моїсєєв АІ**, Коваленко ІФ. Кінетика зневоднення і відновлення об'єму багатоклітинних агрегатів на етапі експозиції в кріозахисному середовищі у залежності від строків культивування. Матеріали The 1st International scientific and practical conference — Modern science: problems and innovations; 2020 квіт. 5–7; Стокгольм. Стокгольм; 2020. с.33–39.
11. **Моїсєєв АІ**. Проникність поодиноких клітин та клітинних сфероїдів для молекул води та диметилсульфоксиду. Матеріали 45-ої щорічної міжнародної конференції молодих вчених Холод в біології і медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології; 2021 трав. 19–20; Харків. Харків; 2021. с.11.
12. **Моїсєєв АІ**, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ, Божок ГА. Дослідження енергії активації переносу молекул води та диметилсульфоксиду у сфероїди в залежності від температури. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю, присвяченої Дню науки Наукові

дослідження та інновації в медицині: актуальні питання, відкриття і досягнення; 2021 трав. 21; Харків. Харків; 2021. с.31.

13. **Moisieiev AI.** Methodical approaches to cryopreservation of cellular spheroids. Proceedings of the 58-th annual meeting of the society for cryobiology «CRYO 2021»; 2021 July 21–23; Chicago. Chicago; 2021. p.108.

14. **Моїсєєв АІ,** Божок ГА. Функціональна активність сфероїдів після кріоконсервування за режимом визначеним на основі фізико-математичної моделі. Матеріали VII міжнародної науково-практичної конференції Topical issues of modern science, society and education; 2022 січ. 29–31; Харків. Харків; 2022. с.161–164.

15. **Moisieiev AI,** Bozhok GA, Moisieieva NN, Gorina OL, Akhatova JS. Experimental substantiation of the theoretically determined mode of 3D culture cryopreservation. Proceedings of the Joint meeting of the society for cryobiology and the society for low temperature biology «CRYO 2022»; 2022 July 19–22; Dublin. Dublin; 2022. p. 139.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

- На науково-практичній конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої 25-річному ювілею НАМН України та Дню науки «Профілактична медицина сьогодні: внесок молодих спеціалістів» (Харків, 2018);
- VI з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (2019 р., Яремча, Україна);
- The 1st International scientific and practical conference «Modern science: problems and innovations» (2020 р., Стокгольм, Швеція);
- Практичній конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої Дню науки «Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення» (2020 р., Харків, Україна);
- 45-й щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині: актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (2020 р., Харків, Україна);
- Науково-практичній конференції молодих вчених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої дню науки Наукові «дослідження та інновації в медицині: актуальні питання, відкриття і досягнення». (2021 р., Харків, Україна);
- 58-th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2021» (2021р., Чикаго, США);
- VII Международной научно-практической конференции «Topical issues of modern science, society and education» (2022 р., Харьков, Украина);
- Joint Meeting of the Society for Cryobiology and the Society for Low Temperature Biology «CRYO 2022» (Дублін, Ірландія, 2022 р.).