

Original article

In print article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

UDC 57.086.13:577.352.43:51-76:576.5

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

А. І. Моїсєєв , І. Ф. Коваленко , Г. А. Божок , О. І. Гордієнко 

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,

вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016

e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Надійшла до редакції 28 жовтня 2021 р. Переглянута 19 листопада 2021 р.

Прийнята до друку 24 листопада 2021 р.

Актуальність. Тривимірні культуральні системи — це унікальні платформи для вивчення складних біологічних процесів *in vitro*. Взаємодії клітина-клітина та клітина — позаклітинний матрикс утворюють комунікаційну мережу біохімічних та механічних сигналів, що наближує сфероїди (СФ) до нативних тканин і суттєво відрізняє їх від моношарових культур. Важливим для клітинних технологій є розробка способів кріоконсервування 3D-культур, що дозволить створювати запаси цінних клітинних зразків, економити час та матеріали, буде запобігати втраті культур через технічні збої, контамінацію, дрейф фенотипу та старіння.

Мета роботи. Розробка підходів до кріоконсервування клітинних сфероїдів. Визначення параметрів проникності сфероїдів з клітин лінії L929 різних строків культивування для теоретичної оцінки оптимальних режимів заморожування.

Матеріали і методи. У роботі були використані клітини лінії L929, які утворюють СФ різного діаметру, і можуть бути підтримані тривалий час у 3D — умовах. Для визначення інтегральних коефіцієнтів фільтрації L_p і проникності для ДМСО k_p у СФ на різних строках культивування, був використаний вольюмометричний метод. Дослідження динаміки зміни об'єму сфероїдів у часі здійснювали на конфокальному мікроскопі LSM 510 META. Чисельні значення інтегральних коефіцієнтів проникності СФ визначали шляхом апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму СФ від часу експозиції в досліджуваному розчині теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного масообміну між сфероїдом і оточуючим середовищем за умови їх максимального збігу. Прогнозування осмотичної поведінки СФ в умовах охолодження здійснювали на підставі диференціального рівняння, що описує кінетику зміни відносного об'єму клітини в процесі позаклітинної кристалізації кріопротекторного розчину, 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.

Результати. Визначені коефіцієнти фільтрації та проникності для молекул ДМСО у СФ та показано, що вони вірогідно зменшуються зі збільшенням строків культивування. Розраховані величини енергії активації проникання молекул води та ДМСО у СФ та визначена їх залежність від строків

Як цитувати: Моїсєєв АІ, Коваленко ІФ, Божок ГА, Гордієнко ОІ. Теоретичні підходи до визначення оптимальних режимів кріоконсервування клітинних сфероїдів різних термінів культивування. Біофізичний вісник. 2021;46:7-22. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>

In cites: Moisieiev AI, Kovalenko IF, Bozhok GA, Gordiyenko OI. Theoretical approaches to determination of optimal cryopreservation regimens for cell spheroids of different cultivation terms. Biophysical Bulletin. 2021;46:7-22. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01> (in Ukrainian)

© Моїсєєв А. І., Коваленко І. Ф., Божок Г. А., Гордієнко О. І., 2021.

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

культивування. На підставі визначених параметрів проникності розрахована динаміка зміни об'єму СФ різних строків культивування за різних швидкостей охолодження.

Висновки. Теоретично визначені оптимальні режими охолодження СФ з клітин лінії L929: для 7 діб культивування — 1,5–2 °C/хв з охолодженням до -80°C і подальшим зануренням у азот; для 14 і 21 доби культивування — 0,5 °C/хв до -40°C і подальшим зануренням у азот.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сфероїди, кріоконсервування, фібробласти лінії L929, коефіцієнти фільтрації, коефіцієнти проникності для ДМСО, енергія активації, швидкість охолодження.

Тривимірні (3-D) культуральні системи — це унікальні платформи для вивчення складних біологічних процесів *in vitro*, зокрема, проліферації, диференціювання, стресової реакції клітин, пухлинного росту, а також для застосування в якості тканино-інженерних конструкцій, біосенсорів, тест-систем для пошуку нових лікарських засобів та імунотерапії [1–3]. Дослідження останніх років показали високу функціональну активність клітин, які було культивовано у вигляді сфероїдів, а також посилення протизапальної дії, ангіогенетичні ефекти та краще виживання після трансплантації [4–6]. Очікується, що у недалекому майбутньому сфероїдні культури (spheroid-based cultures) будуть більш затребувані у регенеративній медицині, ніж існуючі моношарові [7, 8].

Унікальність тривимірних об'єктів полягає у складній регуляторно-трофічній взаємодії клітин, які входять до їхнього складу. Як відомо, взаємодії клітина-клітина та клітина — позаклітинний матрикс (ПКМ) утворюють комунікаційну мережу біохімічних та механічних сигналів, що наближує сфероїди (СФ) до нативних тканин і суттєво відрізняє від 2-D моношарових культур [9–12]. Тому за останні два десятиліття були зроблені численні спроби для розробки тривимірних моделей тканин для подолання розриву між клітинними аналізами та дослідженнями на тваринах для зменшення експериментальної невизначеності при використанні моношарових культур.

Важливим для клітинних технологій є розробка способів кріоконсервування 3D-культур, що дозволить створювати запаси цінних клітинних зразків, економити час та матеріали, необхідні для постійного пересіву культур; буде запобігати втраті культур через технічні збої, контамінацію, дрейф фенотипу та старіння; надасть можливість сертифікувати їх, транспортувати й використовувати для наукових або практичних цілей.

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 кріопротектора визначають часові характеристики масопереносу крізь клітинні мембрани, а отже і ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації, яка є вирішальною умовою виживання/загибелі клітини [13]. Оскільки структурна організація СФ є складнішою в порівнянні з ізольованою клітиною, параметри дифузії сполук, зокрема кріопротекторів і молекул води, у СФ будуть відрізнятися від таких для клітинної суспензії.

Наразі існує низка робіт, в яких СФ різного походження заморожували з швидкостями охолодження 1 °C/хв або нижче у присутності 5–30% кріопротектора ДМСО з додаванням сироватки або без неї [14–17]. Однак потрібно відзначити, що 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 на протікання процесів масообміну між клітинами і середовищем на всіх етапах кріоконсервування.

З іншого боку, існує підхід, який на основі спостереження зміни відносного об'єму клітин у часі при інкубації у кріозахисному розчині дозволяє встановити коефіцієнти проникності плазматичних мембран для води та кріопротектора [18, 19]. Це дає можливість визначити оптимальні час експозиції з кріопротектором та швидкість

охолодження для успішного кріоконсервування клітинної суспензії [13]. У представленій роботі запропоновано такий підхід до кріоконсервування багатоклітинних СФ. Для коректного вирішення цієї задачі може бути використано фізико-математичне моделювання процесів зневоднення і проникності кріопротектора у СФ. При цьому, форму клітинного СФ можна апроксимувати еліпсоїдом обертання, окремим випадком якого є сфера, що приймається у різних існуючих математичних моделях [20, 21]. СФ можна розглядати як цілісний об'єкт *in toto*. При цьому, інтегральні характеристики, що визначають часові параметри масообміну між сфероїдом і середовищем можна розглядати як аналоги коефіцієнтів проникності мембран окремих клітин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі нами були використані клітини лінії L929, які утворюють СФ різного діаметру, можуть бути підтримані тривалий час у 3D — умовах та використовуються як модельна система для підбору оптимальних умов кріоконсервування СФ [15, 22]. Клітинну лінію підтримували протягом 4 пасажів. До цього культура була кріоконсервована згідно з протоколом та зберігалася у низькотемпературному банку ПККіК НАН України. Клітини культивували на середовищі DMEM/F12 («Biowest», Франція), що містило 200 Од/мл бензилпеніциліну («Arterium», Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна) та 10% фетальної телячої сироватки («Biowest», Франція) при 37°C в атмосфері з 5% CO₂ в пластикових флаконах для культивування («SPL Life Sciences», Корея). Для отримання сфероїдів використовували низькоадгезивну поверхню, для цього чашки Петрі обробляли 2%-м розчином агару («Ferak», Німеччина). Посівна концентрація клітин становила $2 \cdot 10^5$ кл/мл. Сфероїди культивували протягом 21 діб.

Для визначення інтегральних коефіцієнтів проникності для молекул води L_p і проникаючого кріопротектора ДМСО k_p у сфероїди на різних строках культивування (7–14–21 доба), був використаний вольюмометричний метод. З метою фіксації сфероїди що утворились протягом 7, 14 і 21 діб культивування, переміщували на адгезивну культуральну поверхню чашки Петрі після чого інкубували в CO₂ інкубаторі протягом 24 годин за 37°C. Дослідження динаміки зміни об'єму сфероїдів у часі в процесі їх зневоднення і відновлення в 1М розчині ДМСО у діапазоні температур 10, 15 и 25 °С здійснювали на конфокальному мікроскопі LSM 510 META. Температуру у камері, встановленій на предметному столику мікроскопа, підтримували за допомогою термостата та реєстрували за допомогою термопари. Об'єм сфероїда визначали шляхом вимірювання діаметрів сфероїда у часі за допомогою комп'ютерної програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss», Німеччина). Чисельні значення інтегральних коефіцієнтів фільтрації і проникності для молекул диметилсульфоксиду для сфероїдів визначали шляхом апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму сфероїдів від часу експозиції в досліджуваних розчинах теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і проникаючих речовин за умови їх максимального збігу [18]. Осмотично неактивний об'єм сфероїда визначали як описано в роботі [23], отримуючи залежність відносного об'єму сфероїдів від оберненого приведенного осмотичного тиску у розчинах непроникаючої речовини (хлорид натрію із концентраціями від 0,5 до 2 моль/л). За цим алгоритмом визначали осмотично неактивний об'єм сфероїдів на 7, 14 та 21 добу культивування. Час встановлення рівноваги між СФ і кріопротекторним середовищем вважали час, за який СФ відновлював свій об'єм на 90%.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми «Statgraphics plus for Windows 2.1» («Manugistics Inc.», США) за

непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Достовірними вважались відмінності при $p < 0,05$.

ТЕОРЕТИЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

Визначення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин у складі сфероїдів

Для визначення інтегральних характеристик сфероїдів, що описують масообмін між ними і оточуючим середовищем, адаптували фізико-математичну модель, розвинуту для клітинних суспензій [18]. 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 сфероїда, 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 сфероїда; L_p — інтегральний коефіцієнт фільтрації для сфероїда; R — універсальна газова константа; T — абсолютна температура; v_s (v_k) — парціальний молярний об'єм проникаючої (непроникаючої) розчиненої речовини; k_s — інтегральний коефіцієнт проникності сфероїда 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} і 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; $\alpha = \frac{1}{V_0} \sum_{k=1}^n (k \neq w, s) v_k N_{k0}$ — об'ємна частка непроникаючих речовин усередині сфероїда, або осмотично неактивний об'єм сфероїда.

Осмотично неактивний об'єм сфероїда

У випадку двокомпонентного розчину непроникаючої (k-ої) речовини рівняння, що описує зміну об'єму сфероїда у часі (t), має вигляд [23]:

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1 - \alpha)}{(y - \alpha)} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right] \quad (4)$$

де α — осмотично неактивний об'єм сфероїда, n_k^{out} — мольна частка розчиненої в оточуючому середовищі k-ї речовини; n_{k0}^{in} — початкове значення мольної частки

розчиненої всередині сфероїда речовини.; τ_w — характерний час проникання молекул води в сфероїди.

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

$$\frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{(y-\alpha)} - \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} \right] = 0, \quad (1-\alpha) = (y_\infty - \alpha) \frac{n_k^{out}}{n_{k0}^{in}} = (y_\infty - \alpha) \frac{\pi_k^{out}}{\pi_{k0}^{in}}, \quad (5)$$

$$\text{або } y_\infty = \alpha + (1-\alpha) \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}} = \alpha + (1-\alpha)x, \quad (6)$$

$$\text{де } x = \frac{\pi_{k0}^{in}}{\pi_k^{out}}$$

Визначаючи об'єм сфероїда 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 сфероїда у розчині непроникаючої речовини методом найменших квадратів. Значення осмотично неактивного об'єму отримували за перетином апроксимованої прямої з віссю ординат.

Прогнозування осмотичної поведінки сфероїдів в умовах охолодження

Диференціальне рівняння, що описує кінетику зміни відносного об'єму клітини в процесі позаклітинної кристалізації кріопротекторного розчину, було запропоноване в роботі [24]:

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

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, $p \equiv \frac{T_0}{\beta \tau_0}$, $a \equiv \frac{E_{a_0}}{R_0 T_0}$, $b \equiv \frac{E_{a_1}}{R_0 T_0}$,

$\tau_0 = (\gamma_0 L_p \pi_{20}^{in})^{-1}$, $\tau_1 = (\gamma_0 k_{pg})^{-1}$, β — 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 і не проникаючої 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 і непроникаючої речовин.

Такий алгоритм розрахунку був застосований для прогнозування осмотичної поведінки мультиклітинних сфероїдів в умовах охолодження з використанням інтегральних характеристик проникності молекул води і кріопротектора у сфероїди *in toto*. Для розрахунку також приймали, що інтегральні коефіцієнти фільтрації L_p та проникності для кріопротектора 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 сфероїдів 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 [25]:

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

де $\hat{c} \equiv \frac{\tilde{c}}{c_0}$, $\tilde{c}(\hat{T})$ — 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 сфероїдів і вибраних швидкостей охолодження отримували залежності об'єму сфероїдів від температури заморожування. 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 [13, 26].

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Протягом 21 доби культивування формувались переважно (70%) сфероїди округлої форми з діаметром 80–100 мкм. Після 7 доби спостерігалось ущільнення клітин у складі сфероїдів і більш чіткі контури (рис. 1). Відсутність некротичних зон у СФ на різних строках культивування була підтверджена за допомогою отриманих на конфокальному мікроскопі пошарових сканів СФ (рис. 2).

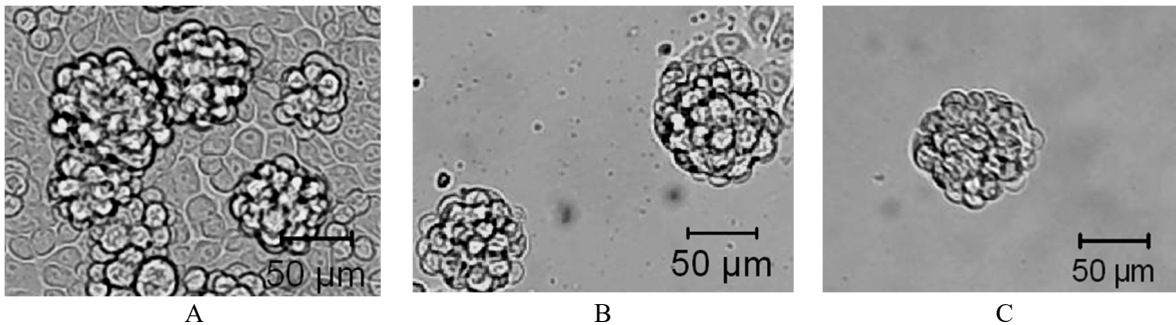


Рис. 1 Морфологія сфероїдів протягом культивування: А — 7 діб культивування, В — 14 діб культивування, С — 21 доба культивування.

Fig. 1 Spheroids morphology during cultivation: A — 7, B — 14, C — 21 days of cultivation.

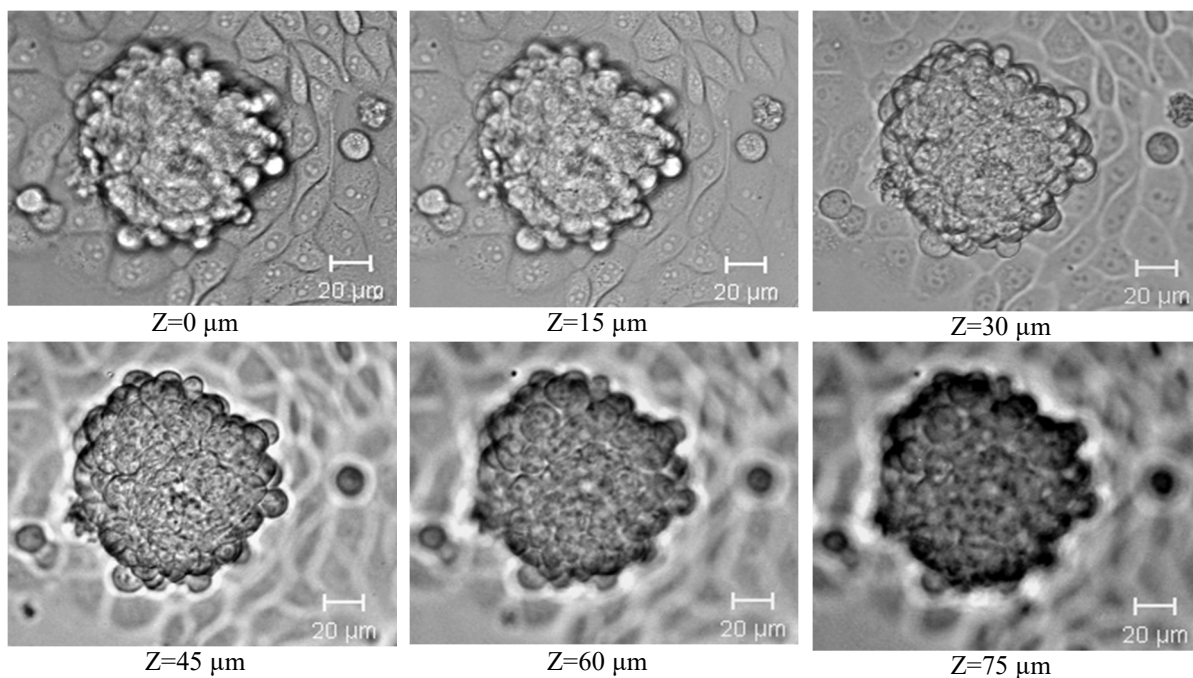


Рис. 2. Z-скани сфероїдів 14 доби культивування для різної глибини сканування (некротичних зон не виявлено).

Fig. 2. Z-scans of 14 cultivation days spheroids for different depth of scanning (necrotic zones are not revealed).

Для розрахунку параметрів проникності СФ були визначені чисельні значення їх осмотично неактивного об'єму α . Для сфероїдів 7 діб культивування $\alpha=0,41$. При збільшенні строків культивування осмотично неактивний об'єм збільшувався: на 14 добу культивування він становив $\alpha=0,485$ і на 21 добу культивування досягав значення $\alpha=0,54$, яке зберігалось і до 34 доби культивування (рис. 3). Таке збільшення осмотично неактивного об'єму СФ очевидно пов'язано з утворенням міжклітинних зв'язків. Таким чином, можна зробити висновок, що формування міжклітинного матриксу практично завершується на 21 добу культивування.

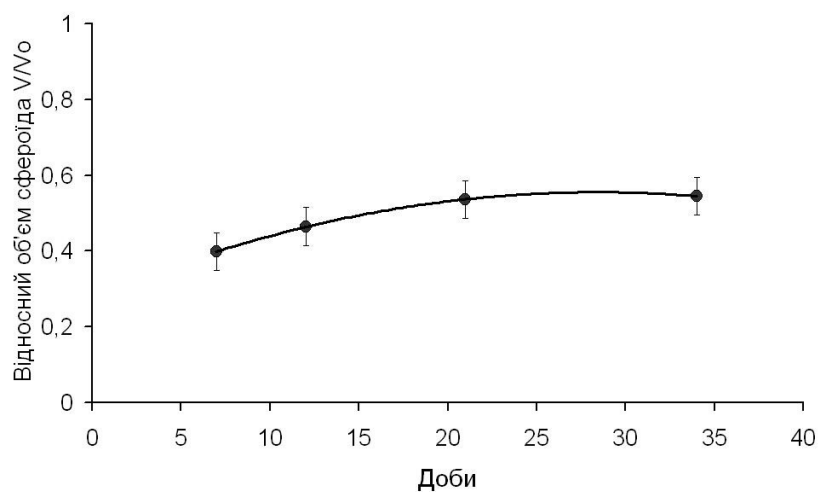


Рис. 3. Відносний осмотично неактивний об'єм сфероїдів у різні строки культивування.

Fig. 3. Relative osmotically inactive volume of spheroids at different cultivation stages.

На рис. 4 наведений приклад апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму сфероїдів при експозиції в розчинах 1 М ДМСО за температур 10, 15 та 25°C теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і проникаючих речовин [18, 19].

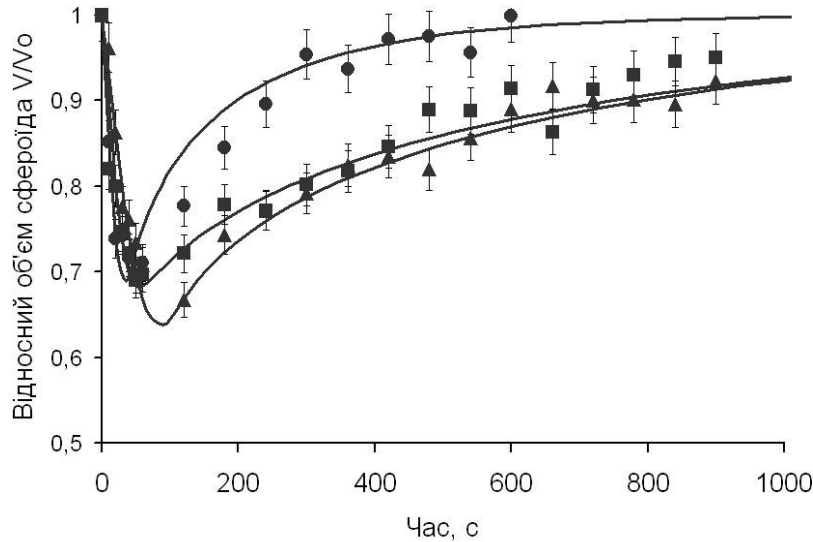


Рис. 4. Динаміка зміни відносного об'єму сфероїда 21 доби культивування в 1М ДМСО на фізіологічному розчині за різних температур (—●— 25°C—■— 15°C—▲— 10°C).

Fig. 4. Relative volume change dynamics of 21 cultivation days' spheroids in 1M DMSO on physiological solution at different temperatures (—●— 25°C—■— 15°C—▲— 10°C).

За апроксимацією експериментальних даних теоретичними кривими були знайдені інтегральні коефіцієнти фільтрації і проникності для ДМСО у СФ (табл. 1). Результати свідчать, що інтегральні показники проникності сфероїдів зменшуються зі збільшенням строків культивування. Так, культивування сфероїдів протягом 14 і 21 діб призводить до вірогідного ($p < 0,05$) зменшення коефіцієнтів фільтрації (L_p) і проникності для ДМСО у порівнянні з 7-ю добою культивування.

Таблиця 1. Коефіцієнти фільтрації ($L_p \times 10^{14}$, $m^3/N \cdot s$) та проникності для ДМСО ($k_p \times 10^7$, m/s) сфероїдів різних строків культивування

Table 1. Filtration ($L_p \times 10^{14}$, $m^3/N \cdot s$) and permeability for DMSO ($k_p \times 10^7$, m/s) coefficients of spheroids of different cultivation stages

Доба культивування	Коефіцієнти проникності	Температура, °C		
		10	15	25
7	L_p	7,93±0,74	8,93±1,6	13,71±2,11
	k_p	2,79±0,68	6,86±2,7	8,51±1,86
14	L_p	3,46±0,06	5,16±,08	9,50±0,86
	k_p	0,49±0,14	0,96±0,68	4,12±1,62
21	L_p	3,03±0,13	4,59±1,78	8,71±1,14
	k_p	0,43±0,20	0,64±0,63	3,27±1,30

На основі отриманих часових залежностей відносного об'єму СФ в розчинах з кріопротектором також була визначена тривалість процедури їх еквілібрації в 1М ДМСО

на фізіологічному розчині, необхідна для досягнення рівноваги між СФ і оточуючим середовищем на різних строках культивування за температур (10-15-25°C) (табл. 2). Наведені в таблиці 2 дані свідчать про те, що температура криозахисного середовища і строки культивування суттєво впливають на необхідний оптимальний час експозиції СФ в криопротекторному розчині.

Таблиця 2. Час досягнення рівноваги у системі СФ/криопротекторний розчин, що містить 1М ДМСО, у залежності від строків культивування СФ і температури еквілібрації

Table 2. Equilibrium time in the system SP / cryoprotective solution containing 1M DMSO, depending on the cultivation time of SP and the equilibration temperature

Строки культивування сфероїдів, доби	Необхідний час експозиції у криозахисному середовищі, сек		
	25°C	15°C	10°C
7	43,0±1,8 ^a	51,8±3,6 ^a	64,8±2,9 ^a
14	67,7±8,7 ^{b,bb}	109,1±10,0 ^{b,bb}	216,2±10,9 ^{b,bb}
21	100,0±11,2 ^c	270,3±19,0 ^c	440,5±12,4 ^c

(a) — відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з (b) і (c); bb — відмінності достовірні ($p < 0,05$) у порівнянні з (c)

Вплив температури на константи швидкостей, що характеризують хімічні або біологічні процеси, часто аналізують в термінах енергії активації (E_A). Проникання води і розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани різними структурно обумовленими шляхами характеризуються відмінними значеннями енергії активації. Тому для оцінки змінення відносного об'єму СФ впродовж охолодження, важливо враховувати залежність інтегральних значень їх проникності для молекул води та криопротекторів від температури. Приймаючи до уваги вищесказане на наступному етапі дослідження розраховували значення енергії активації проникання молекул води і ДМСО у СФ на різних строках культивування (рис. 5).

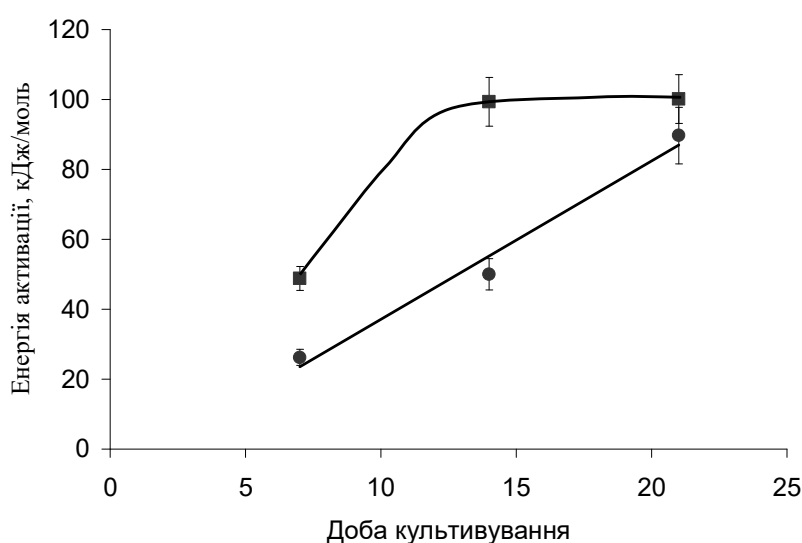


Рис. 5. Енергія активації проникання молекул води (●) та ДМСО (■) у СФ різних строків культивування.

Fig. 5. Activation energy of water (●) and DMSO (■) molecules penetration into SP at different cultivation stages.

Встановлено, що збільшення строків культивування впливає на показники енергії активації процесів переносу молекул води і ДМСО у СФ. Енергія активації проникання молекул води зростає зі збільшенням строків культивування у всьому досліджуваному діапазоні, тоді як енергія активації проникання ДМСО різко зростає на 14 добу та залишається на досягнутому високому рівні до 21 доби культивування. На здатність молекул ДМСО до проникання може впливати їх порівняно висока гідрофобність (коефіцієнт розподілу ДМСО між гідрофобною та гідрофільною фазами становить 0,247 [27]). Відомо, що формування СФ відбувається на основі міжклітинної адгезії, яка призводить до підвищення експресії білків міжклітинної адгезії (кадгерину, коннексину і паннексину) і ущільнення клітин у складі СФ протягом культивування [28], наслідком чого, зокрема, може бути обмеження дифузії гідрофобних молекул.

Хімічна рівновага між клітиною і оточуючим середовищем, що кристалізується, може досягатися або проникненням 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, зневоднення клітини буде забезпечувати підтримку хімічної рівноваги, що відтермінує утворення внутрішньоклітинного льоду. Перенос крізь клітинні мембрани проникаючої речовини, зокрема кріопротектора, 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 кріопшкоджень спричинюється зневодненням клітин під час кристалізації позаклітинного середовища і, отже, підвищенням концентрації поза- та внутрішньоклітинних розчинів. За збільшення швидкості охолодження ступінь пошкоджень першого типу зменшується внаслідок скорочення часу дії пошкоджуючих чинників [29–30]. Другий тип кріопшкодження клітин обумовлений утворенням внутрішньоклітинних кристалів льоду, які викликають ті ж самі ефекти, що і чинники першого типу, і крім того здатні механічно руйнувати мембранні структури [31, 32]. Внутрішньоклітинна кристалізація, ймовірність якої зростає при високих швидкостях охолодження, вважається максимально згубною для клітин [33–34]. Таким чином, збереженість клітин під час кріоконсервування куполоподібно залежить від швидкості охолодження на етапі кристалізації [33]. Указані міркування можна віднести і до більш складних об'єктів, таких як мультіклітинні сфероїди [35].

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) були розраховані величини відносного об'єму СФ при заморожуванні з кріопротектором ДМСО зі швидкостями охолодження 0,5–5 град/хв (рис. 6). 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 строків культивування.

Згідно з результатами, представленими на рис. 6, зневоднення СФ суттєво відрізняється залежно від строків культивування. Мінімальне значення відносного об'єму при швидкості охолодження 1,3 град/хв. для СФ 7 діб культивування (рис. 6 А)

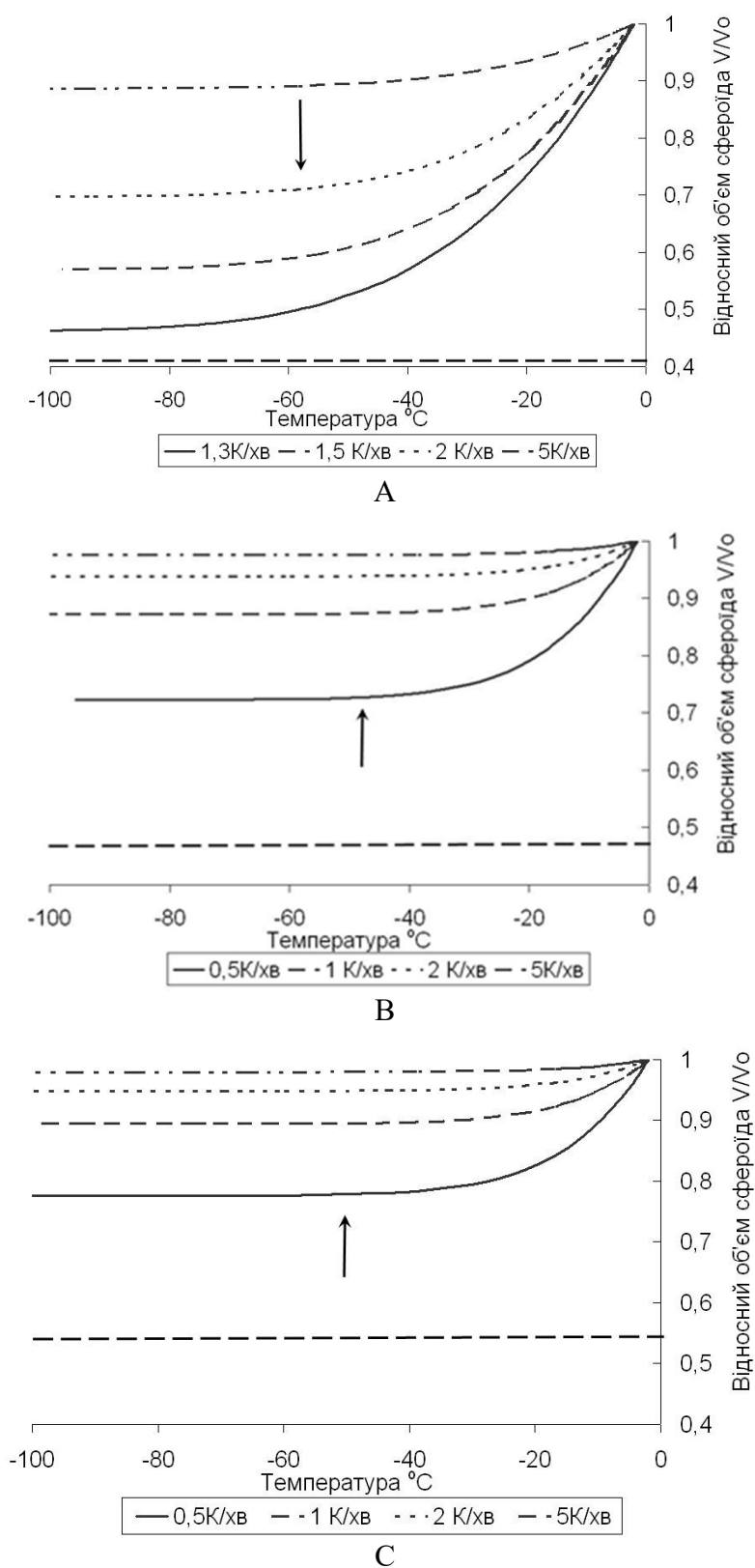


Рис. 6. Розрахована кінетика зміни об'єму СФ за швидкостей охолодження 0,5, 1, 2, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$; А- для СФ 7 діб; В - 14 діб; С – 21 доби; (—→) оптимальна швидкість).

Fig. 6. Calculated kinetics of SP volume change at cooling rates 0.5, 1, 2, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; А- for SP of 7 days; В - 14 days; С - 21 days (—→ optimal rate).

досягає величин 0,48. За менших швидкостей охолодження об'єм СФ 7 діб культивування наближається до осмотично неактивного об'єму ($\alpha_7=0,41$). Таке зневоднення очевидно є критичним і може викликати суттєві пошкодження структури СФ. Для СФ 14 діб культивування (рис. 6 В) та СФ 21 доби культивування (рис. 6 С) 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 строків культивування ($\alpha_{14}=0,485$, $\alpha_{21}=0,54$). Виходячи з кривих зневоднення СФ за різних швидкостей охолодження, можна зробити висновок, що для СФ 7 діб культивування оптимальні швидкості охолодження будуть знаходитись в інтервалі $1,5-2^\circ\text{C}/\text{хв}$. Відносний об'єм СФ при цьому досягає значень $0,6-0,7$ до температури $-60-80^\circ\text{C}$. Такий рівень зневоднення суттєво знижує ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації та не призводить до пошкоджень клітинних структур ефектами розчину. Для СФ 14 та 21 доби культивування відповідний рівень зневоднення (відносний об'єм $\sim 0,75$) досягається за швидкості охолодження $0,5^\circ\text{C}/\text{хв}$. до температури -40°C . Більші швидкості охолодження не можуть забезпечити низьку ймовірність внутрішньоклітинної кристалізації.

Таким чином, на основі аналізу осмотичної поведінки багатоклітинного СФ у кріопротекторному розчині за допомогою фізико-математичного моделювання процесів масопереносу були визначені і проаналізовані параметри проникності для молекул води і кріопротектора у СФ в залежності від строків культивування і температури кріозахисного розчину. Отримані результати свідчать про те, що процеси проникності для молекул води і ДМСО у СФ зі збільшенням строків 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 добу культивування, що пов'язано зі значним зменшення коефіцієнтів проникності СФ для молекул води і кріопротектора. Такий суттєвий вплив часу культивування на приведені у роботі показники, очевидно, пов'язаний з особливостями формування сфероїдів, а саме формуванням міжклітинного матриксу, до складу якого входять речовини які впливають на його гідрофільні характеристики (протеоглікани і глікозаміноглікани). Збільшення кількості клітин у складі сфероїдів і як наслідок міжклітинного матриксу в часі можуть впливати на проникність СФ для проникаючих речовин. Аналогічні припущення були зроблені в роботі [36], в якій було досліджено саме вплив міжклітинного матриксу на процеси злиття сфероїдів. Автори показали, що збільшення строків культивування СФ призводило до збільшення кількості позаклітинного матриксу, що призводило на їх думку, до уповільнення їхнього злиття.

Підсумовуючи, 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 та умовами культивування у відповідних кріозахисних розчинах.

ВИСНОВКИ

Показано, що необхідний час експозиції у 1М ДМСО в діапазоні температур ($10-25^\circ\text{C}$) для СФ 14 і 21 доби культивування вірогідно ($p<0,05$) збільшується у порівнянні з

даним параметром для СФ 7 діб культивування незалежно від температури криозахисного середовища.

Визначені коефіцієнти фільтрації та проникності для молекул ДМСО у СФ та показано, що вони вірогідно зменшуються зі збільшенням строків культивування.

Розраховані величини енергії активації проникання молекул води та ДМСО у СФ та визначена їх залежність від строків культивування.

На підставі визначених параметрів проникності розрахована динаміка зміни об'єму СФ різних строків культивування за різних швидкостей охолодження. Зроблено оцінку оптимальних режимів охолодження СФ: для 7 діб культивування – 1,5-2 °С/хв. з охолодженням до -80°C і подальшим зануренням у азот; для 14 та 21 доби культивування - 0,5 °С/хв. до -40°C і подальшим зануренням у азот.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

A.I. Moisieiev  <https://orcid.org/0000-0003-4585-1194>
 I.F. Kovalenko  <https://orcid.org/0000-0002-7063-6712>
 G.A. Bozhok  <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>
 O.I. Gordiyenko  <https://orcid.org/0000-0002-4459-4213>

REFERENCES

1. Woappia Y, Altomareb D, Creek K, Pirisi L. Self-assembling 3D spheroid cultures of human neonatal keratinocytes have enhanced regenerative properties. *Stem Cell Research*. 2020;49:102048. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102048>
2. Petrenko Y, Syková E, Kubinová Š. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Research&Therapy*.2017;8:94. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0558-6>
3. Edmondson R, Broglie J, Adcock A, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
4. Xu Y, Shi T, Xu A, Zhang L. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney. *J Cell Mol Med*. 2016;20(7):1203-1213. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12651>
5. Seno K, Munakata Y, Sano M, et al. Aggregation of human trophoblast cells into three-dimensional culture system enhances anti-inflammatory characteristics through cytoskeleton regulation. *Int J Mol Sci*.2018;19:2322. <https://doi.org/10.3390/ijms19082322>
6. Baptista, LS, Kronemberger GS, Cortes I, et al. Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1285. <https://doi.org/10.3390/ijms19051285>
7. Dong H, Li X, Chen K, Li N, Kagami H. Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2021;27(4):253–263. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2021.0001>
8. Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?.*Front Mol Biosci*. 2020;7:33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>
9. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):211-224. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>
10. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 2008;3(9-10):1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
11. Pampaloni F, Reynaud E, Stelzer E. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8 (10): 839–845. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>
12. Ryu N, Lee S, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*. 2019;8(12):1620. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>
13. 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. *CryoLetters*. 2018;39(6):380–385.

14. Lee JH, Jung DH, Lee DH, Park JK, Lee SK. Effect of spheroid aggregation on susceptibility of primary pig hepatocytes to cryopreservation. *Transplant Proc.* 2012;44(4):1015–7. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.03.009>
15. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.005>
16. Purcell WM, Atterwill CK, Xu J. Cryopreservation of organotypic brain spheroid cultures. *Altern Lab Anim.* 2003 Dec; 31(6): 563–73. <https://doi.org/10.1177/026119290303100605>
17. Sundlisaeter E, Wang J, Sakariassen P, Marie M, Mathisen J, Karlsen B, et al. Primary glioma spheroids maintain tumorigenicity and essential phenotypic traits after cryopreservation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2006;32(4):419–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00744.x>
18. Gordiyenko YeO, Gordiyenko OI, Maruschenko VV, Sakun OV. [Improved model for the passive mass transfer through the cell plasma membrane]. *Biophysical bulletin.* 2008;21(2);75–80. (in Ukrainian).
19. 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):133–144. <https://doi.org/10.15407/cryo26.02>
20. Amereh M, Edwards R, Akbari M, Nadler B. In-silico modeling of tumor spheroid formation and growth. *Micromachines (Basel).* 2021;12(7):749. <https://doi.org/10.3390/mi12070749>
21. Netti L, Baxter Y, Boucher R, Skalak R, Jain M. Fluid transport in living tissues: application to solid tumors. *Aiche Journal.* 1997;43:818–834.
22. Demuyneck R, Efimova I, Lin A, Declercq H, Krysko D. A 3D cell death assay to quantitatively determine ferroptosis in spheroids. *Cells.* 2020 Mar 13; 9(3):703. <https://doi.org/10.3390/cells9030703>
23. Ogurtsova VV, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Gordiyenko OI. Determination of osmotically inactive volume of murine enterocytes, *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016;26(1):93-97. <https://doi.org/10.15407/cryo26.01.093>
24. Gordiyenko YeO, Pushkar NS. [Physical basis for low temperature preservation of cell suspensions]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 140 p. (In Russian).
25. Todrin OF, Popivnenko LI, Kovalenko SYE. Thermophysical properties of cryoprotectants. I. Temperature and Heat of Melting. *Problems of Cryobiology.* 2009;19(2):163–176.
26. Gordienko OI, Kovalenko IF, Kovalenko SYe, Kuleshova LG, Todrin OF. Theoretical estimation of optimal linear cooling rate for PK-15 cell suspension. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2021;31(3):214–222. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03>
27. Shevchenko NA, Strybul TF, Rozanov LF. Effect of multiatom alcohols, amides and DMSO on grape and potato meristems integrity. *Problems of Cryobiology.* 2004;3:79–85.
28. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(10):1347–60. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>
29. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology.* 1966;2:181–92.
30. Chang T, Zhao G. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Adv Sci (Weinh).* 2021;8(6):2002425. <https://doi.org/10.1002/advs.202002425>
31. Yu G, Yap Y, Pollock K, Hubel A. Characterizing Intracellular Ice Formation of Lymphoblasts Using Low-Temperature Raman Spectroscopy. *Biophys J.* 2017;112(12):2653–63. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.009>
32. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells at supraoptimal rates. *Cryobiology.* 1977;14(2):251–72.
33. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2015;1257:3–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_1
34. Wesley-Smith J, Walters C, Pammenter NW, Berjiak 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*. *Ann Bot.* 2015;115(6):991–1000. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv009>
35. Li R, Yu G., Azarin SM, Hubel A. Freezing Responses in DMSO-Based Cryopreservation of Human iPS Cells: Aggregates Versus Single Cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2018;24(5):289–99. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0531>
36. Kosheleva NV, Efremov YM, Shavkuta BS. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. *Sci. Rep.* 2020; 10:12614. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69540-8>

**THEORETICAL APPROACHES TO DETERMINATION OF OPTIMAL
CRYOPRESERVATION REGIMENS FOR CELL SPHEROIDS
OF DIFFERENT CULTIVATION TERMS**

A. I. Moisieiev, I. F. Kovalenko, G. A. Bozhok, O. I. Gordiyenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine
23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine, 61016
e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Submitted October 28, 2021; Revised November 19, 2021;

Accepted November 21, 2021

Background: Three-dimensional culture systems are unique platforms for studying complex biological processes *in vitro*. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions form a communication network of biochemical and mechanical signals, bring spheroids (SP) closer to native tissues and significantly distinguish them from monolayer cultures. It is important for cell technologies to develop methods for cryopreservation of 3D cultures, that allows creating the stocks of valuable cell samples, save time and materials, and prevent the loss of cultures due to technical failures, contamination, phenotype drift and aging.

Objectives: Development of approaches to cellular spheroids cryopreservation. Determination of the permeability parameters of L929 cells spheroids at different cultivation periods for the theoretical assessment of optimal freezing regimens.

Materials and methods: We have used L929 cells, which form SPs of different diameters and can be maintained for a long time in 3D conditions. To determine the integral filtration L_p and permeability for DMSO k_p coefficients for SP at different periods of cultivation, the volumetric method was used. The study of the changes in the spheroids volume in time was carried out with a confocal microscope LSM 510 META. The numerical values of the integral SF permeability coefficients were determined by approximating the experimental data on the change in the relative volume of the SP versus the exposure time in the test solution with theoretical curves calculated on the basis of a physical and mathematical model for passive mass transfer between the spheroid and the environment, provided that they coincide as much as possible. Prediction of the osmotic behavior of spheroids under cooling conditions was carried out based on the differential equation describing the kinetics of changes in the relative cell volume during extracellular crystallization of a cryoprotective solution, substituting determined values of integral permeability coefficients L_p and k_p and activation energies E_{AL} and E_{AK} into the model equations. The kinetics of changes in the extracellular solution concentration during freezing was set analytically by approximating the phase melting diagram of the DMSO solution.

Results: The filtration and permeability for DMSO molecules coefficients in SP were determined and their significant decrease with a cultivation duration was shown. The activation energy values for the penetration of water and DMSO molecules into the SP were calculated and their dependence on the cultivation time was determined. Proceeding from the determined parameters of permeability, the dynamic of changes in the volume of SPs for different periods of cultivation at different rates of cooling was calculated.

Conclusions: The optimal cooling modes of SP from L929 cells were in theory determined: for 7 days of cultivation — 1,5-2 °C/min with cooling to -80°C and subsequent immersion in nitrogen; for 14 and 21 days of cultivation — 0.5 °C/min to -40°C and subsequent immersion in nitrogen.

KEY WORDS: Spheroids, cryopreservation, L929 line fibroblasts, filtration coefficients, permeability coefficients for DMSO, activation energy, cooling rate.

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОПТИМАЛЬНЫХ РЕЖИМОВ
КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ РАЗНЫХ СРОКОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

А. И. Моисеев, И. Ф. Коваленко, Г. А. Божок, О. И. Гордиенко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23, Харьков, Украина, 61016
e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Поступила в редакцию 28 октября 2021 г. Пересмотрена 19 ноября 2021 г.

Принята к печати 24 ноября 2021 г.

Актуальность. Трехмерные культуральные системы — это уникальные платформы для изучения сложных биологических процессов *in vitro*. Взаимодействия клетка-клетка и клетка - внеклеточный матрикс образуют коммуникационную сеть биохимических и механических сигналов, приближает сфероиды (СФ) к нативным тканям и существенно отличает их от монослойных культур. Важным

для клеточных технологий является разработка способов криоконсервирования 3D-культур, что позволит создавать запасы ценных клеточных образцов, экономить время и материалы, будет предотвращать потерю культур из-за технических сбоев, контаминации, дрейфа фенотипа и старения.

Цель работы. Разработка подходов к криоконсервированию клеточных сфероидов. Определение параметров проницаемости сфероидов из клеток линии L929 разных сроков культивирования для теоретической оценки оптимальных режимов замораживания.

Материалы и методы. В работе были использованы клетки линии L929, которые образуют СФ разного диаметра, и могут быть поддержаны длительное время в 3D — условиях. Для определения интегральных коэффициентов фильтрации L_p и проницаемости для ДМСО k_p в СФ на разных сроках культивирования был использован вольюмометрический метод. Исследование динамики изменения объема сфероидов во времени проводили на конфокальном микроскопе LSM 510 META. Численные значения интегральных коэффициентов проницаемости СФ определяли путем аппроксимации экспериментальных данных изменения относительного объема СФ от времени экспозиции в исследуемом растворе теоретическими кривыми, рассчитанными на основании физико-математической модели пассивного массообмена между сфероидом и окружающей средой при условии их максимального совпадения. Прогнозирование осмотического поведения сфероидов в условиях охлаждения осуществляли на основании дифференциального уравнения, описывающего кинетику изменения относительного объема клетки в процессе внеклеточной кристаллизации криопротекторного раствора, подставляя в уравнения модели определенные величины интегральных коэффициентов проницаемости L_p и k_p и энергии активации E_{AL} и E_{AK} . Кинетику изменения концентрации внеклеточного раствора в процессе замораживания при расчетах задавали аналитически путем аппроксимации фазовой диаграммы плавления раствора ДМСО.

Результаты. Определены коэффициенты фильтрации и проницаемости для молекул ДМСО в СФ и показано, что они достоверно уменьшаются с увеличением сроков культивирования. Рассчитаны величины энергии активации проникновения молекул воды и ДМСО в СФ и определена их зависимость от сроков культивирования. На основании определенных параметров проницаемости рассчитана динамика изменения объема СФ разных сроков культивирования при различных скоростях охлаждения.

Выводы. Теоретически определены оптимальные режимы охлаждения СФ из клеток линии L929: для 7 суток культивирования — 1,5-2 °C/мин с охлаждением до -80°C и последующим погружением в азот; для 14 и 21 суток культивирования — 0,5 °C / мин до -40°C и последующим погружением в азот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сфероиды, криоконсервирование, фибробласты линии L929, коэффициенты фильтрации, коэффициенты проницаемости для ДМСО, энергия активации, скорость охлаждения.