

**INFLUENCE OF THEORETICALLY ESTABLISHED CRYOPRESERVATION REGIMEN
ON THE FUNCTIONAL STATE OF DECONSERVATED CELLULAR SPHEROIDS****Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine
(Kharkiv, Ukraine)**

bozhokgaru@gmail.com

Cryopreservation is used for the long-term storage of cell cultures widely. However, cryopreservation programs for single cells do not provide high viability and preservation of the multicellular object's functional properties, including spheroids. Therefore, the cryopreservation mode determined based on physical and mathematical modeling was used in the presented work. Furthermore, the efficiency of the theoretically determined regime in comparison with empirically established cryopreservation regimes was experimentally evaluated based on theoretically determined coefficients of water molecules permeability and dimethyl sulfoxide cryoprotectant (DMSO) in cellular spheroids.

The experiments were performed on a cryopreserved L929 cell line. Spheroids were obtained on the 7th day of cultivation in low-adhesion conditions. A cryopreservation medium with 1 M DMSO and 10 % fetal calf serum was used for cryopreservation. The regime, calculated based on a physico-mathematical model, included a saturation time of spheroids in a cryoenvironment of 65 seconds, a cooling rate of 2 °C/min, and a final cooling temperature of –80 °C followed by immersion in liquid nitrogen (–196 °C). The two empirically determined modes differed from the theoretically determined by saturation time (10 minutes) and cooling rate (1 °C/min).

It is proved that cryopreservation according to the theoretically calculated regime leads to more effective preservation of the metabolic state and proliferative and migratory potential of spheroids compared to other regimes. It was established by assessing the cell monolayer area, MTT test, and scratch test. Furthermore, the used algorithm allows for determining the optimal cryopreservation protocols for spheroids of different sizes, obtained from any cell type, for the cryoprotective medium of different compositions.

Key words: *spheroid, L929 cell line, cryopreservation, migration, proliferation, MTT test.*

Relationship between the publication and planned research work. The study was performed as part of the research work «Morphofunctional characteristics, cryopreservation, and therapeutic potential of 2D and 3D cultures of cells derived from nerve crest derivatives», № state registration 0121U 100.

Introduction. 3D cell cultures, which include cellular spheroids (SF), have been successfully used as preclinical models in the study of tumor growth and are also used in transplantation and tissue engineering [1–3]. Today, working with cell cultures, cryopreservation is always used for their long-term storage. However, cryopreservation programs designed for 2D cell cultures do not provide high viability and preservation of all functional properties of SF. Because of this, an important and topical issue of modern biology and medicine is the development of cryopreservation regimes SF.

In previous studies, a physico-mathematical approach to selecting the SF cryopreservation optimal regime based on the parameters determination of the permeability and mass transfer of water molecules and cryoprotectant was presented [4, 5]. However, to confirm the effectiveness of the theoretically determined regime of SF cryopreservation, an experimental study of their structural and functional state after thawing is necessary.

The aim of the work is to determine the functional state of SF from L929 cells after cryopreservation

according to the regime determined based on physical and mathematical modeling.

Object and methods of research. The experiments were performed on a transplanted L929 cell line. Spheroids were obtained for seven days of cultivation in low-adhesion conditions at a seeding concentration of 2×10^5 cells/ml, as described in [4–7].

For cryopreservation of SF was used cryoprotective medium based on DMEM/F12 («Biowest», France), containing 10 % fetal calf serum (FCS, «BioSera», France) and cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO) in a final concentration of 1 M. For cryoenvironment saturation with double the concentration of DMSO and FCS was slowly added dropwise to an equal volume of culture medium containing SF. Refrigeration of the samples was performed using a software freezer.

The following cryopreservation regimes were used. Regime 1 (experimental) included the theoretically determined time of saturation of SF in the cryoenvironment of 65 seconds, the cooling rate of 2 °C/min, and the final cooling temperature of –80 °C followed by immersion in liquid nitrogen (–196 °C). The two standard regimes included the most common in cryobiological practice, the saturation time of SF for 10 minutes, the cooling rate of 1 °C/min, the final cooling temperature of –40 °C followed by immersion in liquid nitrogen (regime 2) or the final cooling temperature –80 °C further immersion in liquid nitrogen (regime 3). Defrosting

of SF was performed in a water bath at 37 °C, followed by washing from the cryoprotectant in DMEM / F12 medium with 10 % FCS by centrifugation. Spheroids that have not been cryopreserved were used as controls.

The functional state of deconserved SF was assessed by the metabolic activity of cells and the ability of SF cells to migrate, proliferate and adhere.

The metabolic activity of spheroids was determined by the MTT test [8].

The ability of SF to adhesion was determined 5 and 24 hours after thawing and transfer to cultivation conditions (adhesive cultivation surface, DMEM / F12 medium with 10 % FCS, 37 °C, atmosphere with 5 % CO₂). The relative number of attached SF was calculated by the formula:

$$A = \text{AMS} / \text{TMS} \times 100 \%,$$

where AMS – is the number of attached SF; TMS – is the total number of SF.

Evaluation of the SF cell's ability to proliferate was performed on the area of the monolayer formed on the 1st and 3rd day after the transfer of SF to the conditions of cultivation on the adhesive surface.

To assess the migratory-proliferative potential of SF was transferred to the conditions of cultivation on the adhesive surface. After the attachment of SF was formed, a monolayer of cells migrated from them. The «scratch» test was used, as described in [9], when the confluent monolayer was reached. The monolayer damage area was estimated after 24 and 48 hours of cultivation and determined as a damaged area percentage immediately after reproducing the «scratch».

Microscopic analysis and morphometric measurements were performed using an inverted light microscope AmScope XYL-403 («AmScope», China) and software AxioVision Rel 4.8 and Zeiss LSM Image Examiner (Zeiss, Germany).

Statistica 10 (StatSoft, USA) and Excel were used for statistical data analysis. The normality of the distribution was determined using the Shapiro-Wilkie W test. The results of the experiments are presented as the mean ± standard deviation for data with normal distribution.

Research results and their discussion. It was found that after 1 and 3 days, the area of the monolayer formed by SF cells, which were cryopreserved by the experimental regime, was significantly ($p < 0.05$) higher by 3.3 and 2.5 times, respectively, compared to the standard regime 2 (fig. 1). A similar result was obtained in comparison with the standard regime 3. At the same time, the area of the monolayer for SF cryopreserved by

the experimental regime did not differ from the native control, while modes 2 and 3 were significantly lower than the control (fig. 1).

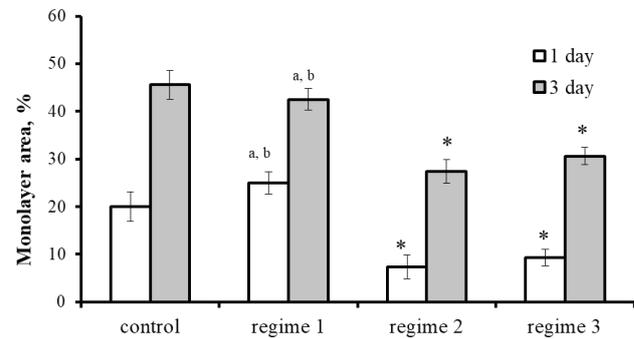


Figure 1 – Monolayer area formed by SF cells that have been cryopreserved under different regimes.

Notes: * – differences are significant compared to control, $p < 0,05$; a – differences are significant compared to mode 2, $p < 0,05$; b – differences are significant compared to mode 3, $p < 0,05$.

Further studies have established the effect of cryopreservation on the metabolic state of SF after thawing (fig. 2). After using standard regimes 2 and 3, the metabolic activity of SF in the MTT test was significantly reduced to (0.18 ± 0.03) and (0.22 ± 0.02) units of optical density (UOD) compared to the control ((0.35 ± 0.01) UOD). The accumulation rates of formazan in SF cryopreserved by experimental regimen 1 did not change significantly relative to native control but differed considerably from standard regimens 2 and 3. In particular, the metabolic activity of SF cryopreserved by standard regimens 2 and 3 in 1.9 and 1, 4 times, respectively, was lower than the values for SF, cryopreserved by regime 1.

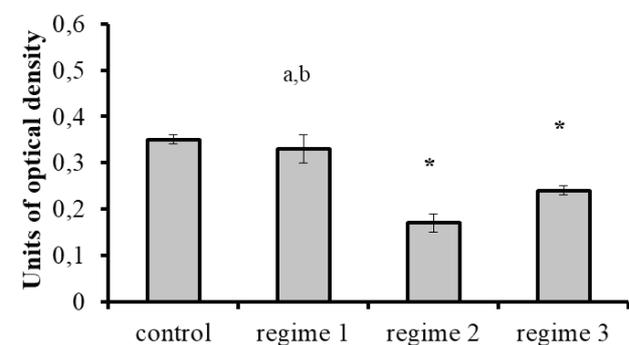


Figure 2 – The degree of MTT restoration in SF before cryopreservation (control) and after cryopreservation in different regimes.

Notes: * – differences are significant compared to control, $p < 0,05$; a – differences are significant compared to regime 2, $p < 0,05$; b – differences are significant compared to regime 3, $p < 0,05$.

It is known that one of the markers of functional cell integrity and SF is the adhesion ability. As a result of the conducted research, it was established that the indicator of the average number of attached SF after 24 hours

was in the range of 78–87 % for all used regimes (fig. 3). These values did not differ from the control, in which the indicator was 88 %.

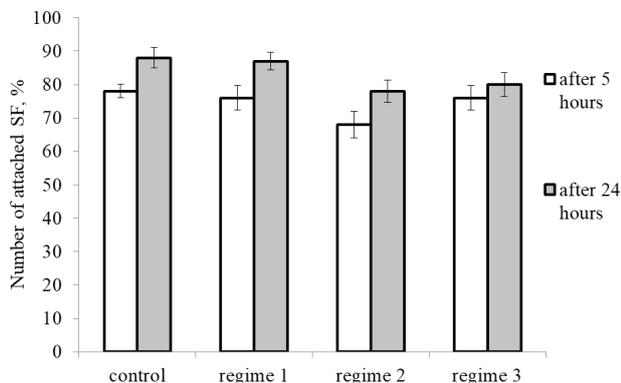


Figure 3 – Adhesion SF ability before cryopreservation (control) and after cryopreservation under different regimes.

It is known that the «scratch» test of the monolayer is a convenient model for in vitro studies to analyze the migratory-proliferative cell's potential and the influence of any factors on it [9, 10]. In our work, this test allowed us to establish the difference in migratory and proliferative cell activity depending on the regime of cryopreservation of SF. In the case of using regime 2, the area of monolayer damage after 24 and 48 hours of cultivation was significantly ($p < 0.05$) 1.3 and 2.4 times, respectively, higher than this indicator for cryopreserved SF according to experimental regime 1 (fig. 4).

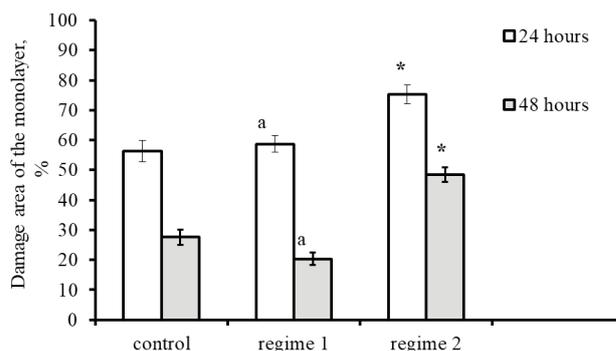


Figure 4 – Damage area of the monolayer by the «scratch» test after 24 and 48 hours.

Notes: * – differences are significant compared to control, $p < 0,05$; a – differences are significant compared to regime 2, $p < 0,05$.

Conclusions. Thus, according to the assessment of the monolayer area is formed by cells after migration from SF, MTT test, and scratch test, it is proved that cryopreservation of SF from L929 cells according to the calculated regime based on the physico-mathematical model leads to more efficient preservation metabolic state, proliferative and migratory potential of SF in comparison with the widespread empirically selected regimes.

Prospects for further research. The determined efficiency of the cryopreservation regime of SF based on the physico-mathematical model allows us to determine in further research optimal cryopreservation protocols for SF of different sizes, obtained from any cell types, for the cryoprotective environment of different compositions.

References

- Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J.R. Soc. Interface.* 2017;(127):20160877. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
- Pinto B, Henriques AC, Silva PM, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020;12:1186. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0383-5>.
- 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;44:1015–7.
- Moisieiev AI, Kovalenko IF, Kovalenko SYe, Bozhok GA, Gordiyenko OI. Dynamika pronykannya dymetylsulfoksydu v klityny liniyi L929 i sferoyidy z nykh. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2021;31(4):316–325. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.316>. [in Ukrainian].
- Moisieiev AI, Kovalenko IF, Bozhok GA, Gordiyenko OI. Teoretychni pidkhody do vyznachennya optymal'nykh rezhymiv kriokonservuvannya klitynykh sferoyidiv riznykh terminiv kul'tyuvannya. *Biofizychnyy visnyk.* 2021;46:7–22. DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>. [in Ukrainian].
- Moisieiev AI, Bozhok GA, Gorina OL. Porivnyal'na kharakterystyka tryvymirnoho ta monosharovoho kul'tyuvannya pereshcheplyuvanoyi liniyi fibroblastiv L929. *Dopovidi Natsional'noyi Akademiyi Nauk Ukrayiny.* 2019;8:93–101. DOI: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.08.093>. [in Ukrainian].
- Bozhok GA, Moisieiev AI, Gorina OL, Bondarenko TP. Morfofunktsional'ni osoblyvosti fibroblastiv liniyi L929 v umovakh 3D-kul'tyuvannya. *Fiziologichnyy zhurnal.* 2019;65(3):34–40. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.03.034>. [in Ukrainian].
- 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. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016;26(2):133–144. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo26.02>.
- Denker SP, Barber DL. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE 1. *J Cell Biol.* 2002;159:1087–96. DOI: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.20020805>.
- Salas-Oropeza J, Jimenez-Estrada M, Perez-Torres A, Castell-Rodriguez AE, Becerril-Millan R, Rodriguez-Monroy MA, et al. Wound healing activity of the essential oil of *Bursera morelensis*, in mice. *Molecules.* 2020;25(8):1795. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25081795>.

ВПЛИВ ТЕОРЕТИЧНО ВИЗНАЧЕНОГО РЕЖИМУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ДЕКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ**Моїсєєв А. І., Божок Г. А.**

Резюме. Пошук і оптимізація методів кріоконсервування багатоклітинних об'єктів, зокрема сфероїдів (СФ), є актуальним питанням, вирішення якого дозволить більш ефективно їх використання у біологічних дослідженнях, біотехнології, регенеративній медицині та тканинної інженерії. У представленій роботі було використано режим кріоконсервування, який включав температурно – швидкісні параметри та час насичення СФ у кріозахисному середовищі, визначені раніше шляхом фізико – математичного моделювання на підставі коефіцієнтів проникності молекул води та кріопротектору диметилсульфоксиду (ДМСО).

Мета роботи – визначення функціонального стану СФ з клітин лінії L929 після кріоконсервування за режимом, визначеним на основі фізико – математичного моделювання.

Експериментальні дослідження проводили на СФ з клітин лінії L929 після кріоконсервування за режимом, визначеним на основі теоретичних розрахунків (експозиція у кріозахисному середовищі впродовж 65 сек, швидкість охолодження 2°C/хв до – 80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C)), у порівнянні з емпірично встановленими режимами (експозиція у кріозахисному середовищі впродовж 10 хвилин, швидкість охолодження 1°C/хв до – 40°C або до – 80°C з подальшим зануренням у рідкий азот). Після розморожування СФ поміщали до умов культивування, після чого вивчали здібність СФ до адгезії та їх метаболічну активність у ММТ – тесті, проліферативну активність клітин, які мігрували зі СФ, та міграторно – проліферативний потенціал у тесті «подряпини» моношару.

Встановлено, що усі вищезазначені показники, крім здібності СФ до адгезії, були вище у разі використання СФ, кріоконсервованих за теоретично визначеним режимом, порівняно зі СФ, кріоконсервованими за емпірично підібраними режимами.

Таким чином, кріоконсервування за режимом, розрахованим на основі фізико – математичної моделі, призводить до більш ефективного збереження функціональних властивостей (міграції і проліферації клітин) та метаболічного стану (ММТ – тест) СФ після розморожування порівняно з іншими використаними режимами.

Ключові слова: сфероїд, клітини лінії L929, кріоконсервування, міграція, проліферація, ММТ тест.

INFLUENCE OF THEORETICALLY ESTABLISHED CRYOPRESERVATION REGIMEN ON THE FUNCTIONAL STATE OF DECONSERVATED CELLULAR SPHEROIDS**Moisieiev A. I., Bozhok G. A.**

Abstract. Search and optimization of methods of cryopreservation of multicellular objects, in particular spheroids (SF), is an urgent issue, the solution of which will allow more efficient application of SF in biological research, biotechnology, regenerative medicine and tissue engineering. In the present study, a cryopreservation regime was used, which included temperature and cooling rate parameters, and SF saturation time in a cryoprotective medium, previously determined by physical and mathematical modeling based on the permeability coefficients of water molecules and dimethyl sulfoxide cryoprotectant (DMSO).

The goal of the work is to study the functional state of SF from L929 cells after cryopreservation according to the regimen established on the basis of physical and mathematical modeling.

Experimental studies were performed on SF from L929 cells after cryopreservation according to the regime determined on the basis of theoretical calculations (exposure in a cryoprotective medium for 65 sec, cooling rate 2°C/min to – 80°C followed by immersion into liquid nitrogen (– 196°C)) in comparison with empirically established regimens (exposure in a cryoprotective medium for 10 minutes, cooling rate 1°C/min to – 40°C or to – 80°C followed by immersion into liquid nitrogen). Post thawing, SF was placed in culture conditions, after which the ability of SF to adhere and their metabolic activity in the MMT assay, the proliferative activity of cells that migrated from SF, and the migratory – proliferative potential in the monolayer “scratch assay” were studied.

It was found that all the above indicators, except for the ability of SF to adhesion, were higher when using SF cryopreserved in a theoretically determined regimen, compared with SF cryopreserved in empirically selected regimens.

Thus, cryopreservation according to the regimen established on the basis of physical and mathematical modeling leads to more effective preservation of functional properties (cell migration and proliferation) and metabolic state (MTT – assay) of SF after thawing compared to other regimens.

Key words: spheroid, L929 cell line, cryopreservation, migration, proliferation, MTT test.

ORCID and contributionship:Moisieiev A. I.: 0000 – 0003 – 4585 – 1194 ^{BCDE}Bozhok G. A.: 0000 – 0002 – 4188 – 9286 ^{ADF}**Conflict of interest:**

The Authors declare no conflict of interest.

Corresponding author
Bozhok Galyna Anatoliyivna
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine
Ukraine, 61016, Kharkiv, 23 Pereyaslavskaya str.
Tel.: +38(067)9911072
E – mail: bozhokgaru@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article.

Received 17.11.2021

Accepted 27.04.2022

DOI 10.29254/2077-4214-2022-2-1-164-100-108

УДК 57.086.13:576.5.016

Моїсєєв А. І., Божок Г. А.

ВПЛИВ ТЕОРЕТИЧНО ВИЗНАЧЕНОГО РЕЖИМУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ДЕКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

bozhokgaru@gmail.com

Кріоконсервування широко застосовується для довготривалого зберігання клітинних культур. Програми кріоконсервування, розроблені для поодиноких клітин, не забезпечують високу життєздатність та збереження функціональних властивостей багатоклітинних об'єктів, зокрема сфероїдів. У представлений роботі було використано режим кріоконсервування, визначений на основі фізико – математичного моделювання. На підставі теоретично визначених раніше коефіцієнтів проникності молекул води та кріопротектору диметилсульфоксиду (ДМСО) у клітинні сфероїди було експериментально оцінено ефективність теоретично визначеного режиму у порівнянні з емпірично встановленими режимами кріоконсервування.

Експерименти виконані на перецелюваній лінії клітин L929. Сфероїди отримували на 7 добу культивування в низькоадгезивних умовах. Для кріоконсервування використовували кріозахисне середовище з 1 М ДМСО та 10 % фетальної телячої сироватки. Режим, розрахований на основі фізико – математичної моделі, включав час насичення сфероїдів у кріосередовищі 65 секунд, швидкість охолодження 2°C/хв та кінцеву температуру охолодження – 80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (–196°C). Два емпірично визначених режими відрізнялися від теоретично визначеного за часом насичення (10 хвилин) та швидкістю охолодження (1°C/хв).

На основі оцінки площі клітинного моношару, МТТ – тесту та тесту «подряпина», доведено, що кріоконсервування за теоретично розрахованим режимом приводить до більш ефективного збереження метаболічного стану, проліферативного та міграторного потенціалу сфероїдів порівняно з іншими режимами. Використаний алгоритм дозволяє визначати оптимальні протоколи кріоконсервування для сфероїдів різних розмірів, отриманих з будь яких типів клітин, для кріозахисних середовищ різного складу.

Ключові слова: сфероїд, клітини лінії L929, кріоконсервування, міграція, проліферація, МТТ тест.

Зв'язок публікації з плановими науково – дослідними роботами. Дослідження виконано в рамках науково – дослідної роботи «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D- і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребня», № державної реєстрації 0121U100.

Вступ. 3D-культури клітин, до яких відносяться клітинні сфероїди (СФ), успішно використовуються як доклінічні моделі при вивченні пухлинного росту, а також знаходять своє використання у трансплантології та тканинній інженерії [1–3]. На теперішній час при роботі з клітинними культурами кріоконсервування обов'язково застосовується для їх довготривалого зберігання. Програми кріоконсервування, розроблені для 2D-культур клітин, не забезпечують високу життєздатність та збереження усіх

функціональних властивостей СФ. З огляду на це, важливим і актуальним питанням сучасної біології та медицини є розробка режимів кріоконсервування СФ.

У попередніх дослідженнях було представлено фізико – математичний підхід до вибору оптимального режиму кріоконсервування СФ на основі визначення параметрів проникності і масопереносу молекул води та кріопротектору [4, 5]. Однак для підтвердження ефективності теоретично визначеного режиму кріоконсервування СФ необхідно експериментальне дослідження їх структурно – функціонального стану після розморожування.

Мета дослідження – визначення функціонального стану СФ з клітин лінії L929 після кріоконсервування за режимом, визначеним на основі фізико – математичного моделювання.

Об'єкт і методи дослідження. Експерименти виконані на перещеплюваній лінії клітин L929. Сфероїди отримували на 7 добу культивування у низькоадгезивних умовах при посівній концентрації 2×10^5 клітин/мл, як описано у роботах [4–7].

Для кріоконсервування СФ використовували кріозахисне середовище на основі DMEM/F12 («Biowest», Франція), що містило 10% фетальної телячої сироватки (ФТС, «BioSera», Франція) і кріопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) в кінцевій концентрації 1 М. Для насичення кріосередовища з подвійною концентрацією ДМСО та ФТС повільно по краплях додавали до рівного об'єму культурального середовища, що містило СФ. Охолодження зразків проводили за допомогою програмного заморозувача.

Було використано наступні режими кріоконсервування. Режим 1 (експериментальний) включав теоретично визначені час насичення СФ у кріосередовищі 65 секунд, швидкість охолодження $2^\circ\text{C}/\text{хв}$ та кінцеву температуру охолодження -80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (-196°C). Два стандартних режими включали найбільш розповсюджені у кріобіологічній практиці час насичення СФ впродовж 10 хвилин, швидкість охолодження $1^\circ\text{C}/\text{хв}$, 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). Розморожування СФ проводили на водяній бані при 37°C з подальшим відмиванням від кріопротектору у середовищі DMEM/F12 з 10% ФТС шляхом центрифугування. Сфероїди, які не були піддані кріоконсервуванню, використовували в якості контролю.

Функціональний стан деконсервованих СФ оцінювали за метаболічною активністю клітин і здібністю клітин СФ до міграції, проліферації та адгезії.

Метаболічну активність сфероїдів визначали за МТТ – тестом [8].

Здатність СФ до адгезії визначали через 5 та 24 години після розморожування та перенесення до умов культивування (адгезивна поверхня культивування, середовище DMEM/F12 з 10 % ФТС, 37°C , атмосфера з 5 % CO_2). Відносну кількість прикріплених СФ вираховували за формулою:

$$A = \text{ПМС}/\text{ЗМС} \times 100\%,$$

де ПМС – кількість прикріплених СФ; ЗМС – загальна кількість СФ.

Оцінку здібності клітин СФ до проліферації проводили за площею моношару, сформованого на 1 та 3 добу після перенесення СФ до умов культивування на адгезивну поверхню.

Для оцінки міграторно – проліферативного потенціалу СФ переносили до умов культивування на адгезивну поверхню. Після прикріплення СФ формувалася моношар з клітин, які мігрували з них.

При досягненні конфлуентного моношару використовували тест «подряпини», як описано у роботі [9]. Площу ушкодження моношару оцінювали через 24 та 48 годин культивування та визначали у відсотках до площі ушкодження безпосередньо після відтворення «подряпини».

Мікроскопічний аналіз та морфометричні вимірювання проводили за допомогою інвертованого світлового мікроскопа AmScope XYL-403 («AmScope», KHP) та програм програми AxioVision Rel. 4.8 та Zeiss LSM Image Examiner («Zeiss», Німеччина).

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.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що через 1 та 3 доби площа моношару, утвореного клітинами СФ, які були кріоконсервовані за експериментальним режимом, була значуще ($p < 0,05$) вище у 3,3 та 2,5 рази, відповідно, порівняно зі стандартним режимом 2 (рис. 1). Схожий результат було отримано й у порівнянні зі стандартним режимом 3. Водночас, показник площі моношару для СФ, кріоконсервованих за експериментальним режимом, не відрізнявся від нативного контролю, тоді як за використання режимів 2 та 3 був значуще нижче контролю (рис. 1).

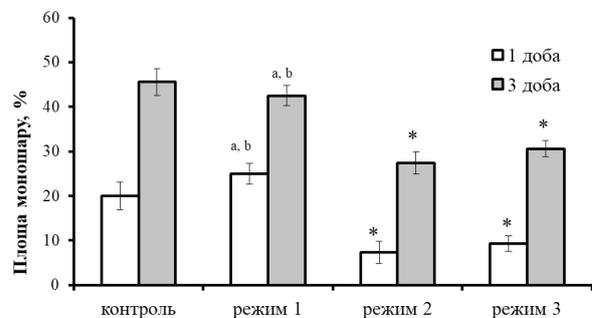


Рисунок 1 – Площа моношару, утвореного клітинами СФ, які були кріоконсервовані за різними режимами.

Примітки: * – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$; ^a – відмінності значущі порівняно з режимом 2, $p < 0,05$; ^b – відмінності значущі порівняно з режимом 3, $p < 0,05$.

У подальших дослідженнях було з'ясовано вплив кріоконсервування на метаболічний стан СФ після розморожування (рис. 2). Після використання стандартних режимів 2 та 3 метаболічна активність СФ у МТТ – тесті значуще зменшувалася до $(0,18 \pm 0,03)$ та $(0,22 \pm 0,02)$ одиниць оптичної щільності (ООЩ) у порівнянні з контролем $((0,35 \pm 0,01)$ ООЩ). Показники накопичення формазану у СФ, кріоконсервованих за експериментальним режимом 1, суттєво не змінювались відносно нативного контролю, однак значуще відрізнялись від

стандартних режимів 2 та 3. Зокрема, метаболічна активність СФ, кріоконсервованих за стандартними режимами 2 і 3, у 1,9 та 1,4 рази, відповідно, була меншою відносно показників для СФ, кріоконсервованих за режимом 1.

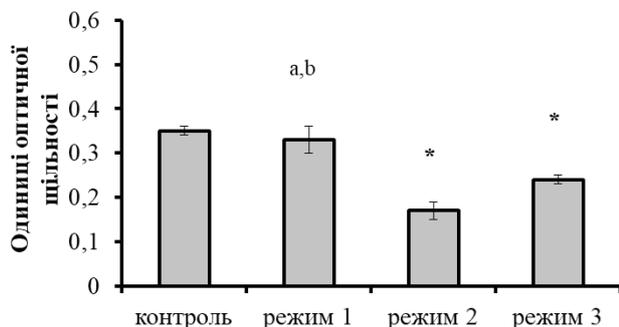


Рисунок 2 – Ступінь відновлення МТТ у СФ до кріоконсервування (контроль) та після кріоконсервування за різними режимами.

Примітки: * – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$; ^a – відмінності значущі порівняно з режимом 2, $p < 0,05$; ^b – відмінності значущі порівняно з режимом 3, $p < 0,05$.

Відомо, що одним з маркерів функціональної повноцінності клітин та СФ є здібність до адгезії. В результаті проведених досліджень було встановлено, що показник середньої кількості прикріплених СФ через 24 години знаходився у межах 78–87 % для усіх використаних режимів (рис. 3). Ці значення не відрізнялися від контролю, в якому показник склав 88%.

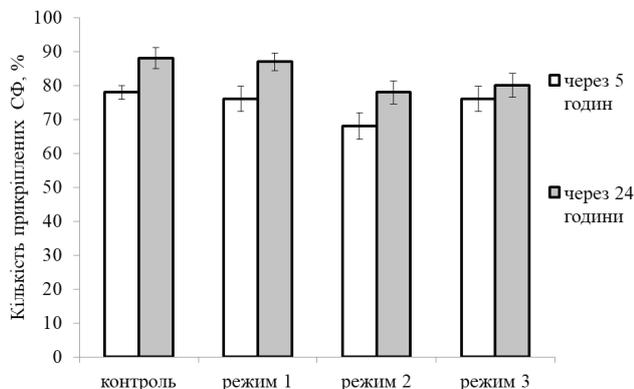


Рисунок 3 – Здібність до адгезії СФ до кріоконсервування (контроль) та після кріоконсервування за різними режимами.

Відомо, що тест «подряпини» моношару є зручною моделлю в дослідженнях *in vitro* для аналізу міграторно – проліферативного потенціалу клітин і впливу на нього будь – яких факторів [9, 10]. У нашій роботі застосування цього тесту дозволило встановити різницю у міграторної та проліферативної активності клітин в залежності від режиму кріоконсервування СФ. У разі використання режиму 2 площа ушкодження моношару через 24 та 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. 4).

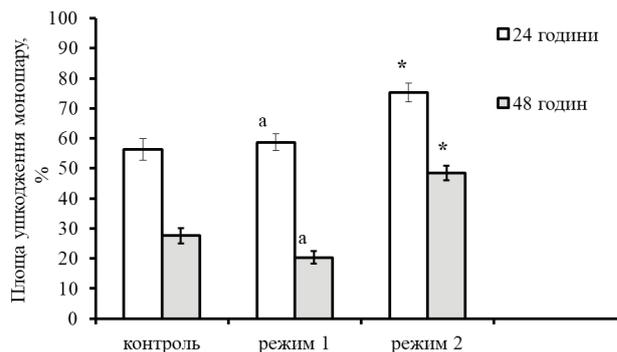


Рисунок 4 – Площа ушкодження моношару у тесті «подряпина» через 24 та 48 годин.

Примітки: * – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$; ^a – відмінності значущі порівняно з режимом 2, $p < 0,05$.

Висновки. Таким чином, 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 із розповсюдженими емпірично підібраними режимами.

Перспективи подальших досліджень. 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 будь яких типів клітин, для кріозахисних середовищ різного складу.

Література

1. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. J.R. Soc. Interface. 2017;(127):20160877. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0877>.
2. Pinto B, Henriques AC, Silva PM, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as *in vitro* preclinical models for cancer research. Pharmaceutics [Internet]. 2020;12:1186. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0383-5>.
3. 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;44:1015–7.
4. Moisieiev AI, Kovalenko IF, Kovalenko SYe, Bozhok GA, Gordiyenko OI. Dynamika pronykannya dymetylsul'foksydu v klityny liniyi L929 i sferoyidy z nykh. Probl Cryobiol Cryomed. 2021;31(4):316–325. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.316>. [in Ukrainian].
5. Moisieiev AI, Kovalenko IF, Bozhok GA, Gordiyenko OI. Teoretychni pidkhody do vyznachennya optymal'nykh rezhymiv kriokonservuvannya klitynynykh sferoyidiv riznykh terminiv kul'tyvuvannya. Biofizychnyy visnyk. 2021;46:7–22. DOI: <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-46-01>. [in Ukrainian].

- Moisieiev AI, Bozhok GA, Gorina OL. Porivnyal'na kharakterystyka tryvymirnoho ta monosharovoho kul'tyuvannya pereshcheplyuvanoy liniyi fibroblastiv L929. Dopovidi Natsional'noyi Akademiyi Nauk Ukrayiny. 2019;8:93–101. DOI: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.08.093>. [in Ukrainian].
- Bozhok GA, Moisieiev AI, Gorina OL, Bondarenko TP. Morfofunktsional'ni osoblyvosti fibroblastiv liniyi L929 v umovakh 3D-kul'tyuvannya. Fiziologichnyy zhurnal. 2019;65(3):34–40. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.03.034>. [in Ukrainian].
- 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. Probl Cryobiol Cryomed. 2016;26(2):133–144. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo26.02>.
- Denker SP, Barber DL. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE 1. J Cell Biol. 2002;159:1087–96. DOI: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.20020805>.
- Salas-Oropeza J, Jimenez-Estrada M, Perez-Torres A, Castell-Rodriguez AE, Becerril-Millan R, Rodriguez-Monroy MA, et al. Wound healing activity of the essential oil of *Bursera morelensis*, in mice. Molecules. 2020;25(8):1795. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25081795>.

ВПЛИВ ТЕОРЕТИЧНО ВИЗНАЧЕНОГО РЕЖИМУ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ДЕКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ

Моїсєєв А. І., Божок Г. А.

Резюме. Пошук і оптимізація методів кріоконсервування багатоклітинних об'єктів, зокрема сфероїдів (СФ), є актуальним питанням, вирішення якого дозволить більш ефективно їх використання у біологічних дослідженнях, біотехнології, регенеративній медицині та тканинній інженерії. У представлений роботі було використано режим кріоконсервування, який включав температурно – швидкісні параметри та час насичення СФ у кріозахисному середовищі, визначені раніше шляхом фізико – математичного моделювання на підставі коефіцієнтів проникності молекул води та кріопротектору диметилсульфоксиду (ДМСО).

Мета роботи – визначення функціонального стану СФ з клітин лінії L929 після кріоконсервування за режимом, визначеним на основі фізико – математичного моделювання.

Експериментальні дослідження проводили на СФ з клітин лінії L929 після кріоконсервування за режимом, визначеним на основі теоретичних розрахунків (експозиція у кріозахисному середовищі впродовж 65 сек, швидкість охолодження 2°C/хв до – 80°C з подальшим зануренням у рідкий азот (– 196°C)), у порівнянні з емпірично встановленими режимами (експозиція у кріозахисному середовищі впродовж 10 хвилин, швидкість охолодження 1°C/хв до – 40°C або до – 80°C з подальшим зануренням у рідкий азот). Після розморожування СФ поміщали до умов культивування, після чого вивчали здібність СФ до адгезії та їх метаболічну активність у ММТ – тесті, проліферативну активність клітин, які мігрували зі СФ, та міграторно – проліферативний потенціал у тесті «подряпини» моношару.

Встановлено, що усі вищезазначені показники, крім здібності СФ до адгезії, були вище у разі використання СФ, кріоконсервованих за теоретично визначеним режимом, порівняно зі СФ, кріоконсервованими за емпірично підібраними режимами.

Таким чином, кріоконсервування за режимом, розрахованим на основі фізико – математичної моделі, призводить до більш ефективного збереження функціональних властивостей (міграції і проліферації клітин) та метаболічного стану (МТТ – тест) СФ після розморожування порівняно з іншими використаними режимами.

Ключові слова: сфероїд, клітини лінії L929, кріоконсервування, міграція, проліферація, МТТ тест.

INFLUENCE OF THEORETICALLY ESTABLISHED CRYOPRESERVATION REGIMEN ON THE FUNCTIONAL STATE OF DECONSERVATED CELLULAR SPHEROIDS

Moisieiev A. I., Bozhok G. A.

Abstract. Search and optimization of methods of cryopreservation of multicellular objects, in particular spheroids (SF), is an urgent issue, the solution of which will allow more efficient application of SF in biological research, biotechnology, regenerative medicine and tissue engineering. In the present study, a cryopreservation regimen was used, which included temperature and cooling rate parameters, and SF saturation time in a cryoprotective medium, previously determined by physical and mathematical modeling based on the permeability coefficients of water molecules and dimethyl sulfoxide cryoprotectant (DMSO). The goal of the work is to study the functional state of SF from L929 cells after cryopreservation according to the regimen established on the basis of physical and mathematical modeling. Experimental studies were performed on SF from L929 cells after cryopreservation according to the regimen determined on the basis of theoretical calculations (exposure in a cryoprotective medium for 65 sec, cooling rate 2°C/min to – 80°C followed by immersion into liquid nitrogen (– 196°C)) in comparison with empirically established regimens (exposure in a cryoprotective medium for 10 minutes, cooling rate 1°C/min to – 40°C or to – 80°C followed by immersion into liquid nitrogen). Post thawing, SF was placed in culture conditions, after which the ability of SF to adhere and their metabolic activity in the MMT assay, the proliferative activity of cells that migrated from SF, and the migratory – proliferative potential in the monolayer “scratch assay” were studied. It was found that all the above indicators, except for the ability of SF to adhesion, were higher when using SF cryopreserved in a theoretically determined regimen, compared with SF cryopreserved in empirically selected

regimens. Thus, cryopreservation according to the regimen established on the basis of physical and mathematical modeling leads to more effective preservation of functional properties (cell migration and proliferation) and metabolic state (MTT – assay) of SF after thawing compared to other regimens.

Key words: spheroid, L929 cell line, cryopreservation, migration, proliferation, MTT test.

ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Moisieiev A. I.: 0000 – 0003 – 4585 – 1194 ^{BCDE}

Bozhok G. A.: 0000 – 0002 – 4188 – 9286 ^{ADF}

Конфлікт інтересів.

Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Божок Галина Анатоліївна

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська 23

Тел.: +38(067) 9911072

E – mail: bozhokgaru@gmail.com

A – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Стаття надійшла 17.11.2021 року
Стаття прийнята до друку 27.04.2022 року