

USE OF AUTOFLUORESCENCE FOR VISUALIZATION OF VIABLE NEURAL CELLS IN THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences
of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

²H.S. Skovoroda Kharkiv National Pedagogical University (Kharkiv, Ukraine)

³State Biotechnological University (Kharkiv, Ukraine)

alexsukach587@gmail.com

The search for simple, non-invasive and non-toxic methods of visualizing neural cells as part of three-dimensional structures is an urgent problem in cell biology and biotechnology. As such a method, in vivo autofluorescence can be used to provide information about the viability, morphological, and physiological state of neural cells in three-dimensional structures.

The aim is to investigate the possibility of using NAD(P)H and flavin autofluorescence to visualize and assess the viability of neuronal cells within aggregates and spheroids.

In the experiments on three-dimensional aggregates and spheroids of neural cells obtained from the brain tissue of newborn rats, the autofluorescence of cells was studied depending on their viability.

It was found that the use of a laser with a wavelength of 405 nm leads to the excitation of neural cell autofluorescence in the green region of the spectrum, which allows for non-invasive, in vivo visualization of living cells as part of three-dimensional structures and estimation of their number and packing density. Analyzing the intensity of green autofluorescence of neural cells in three-dimensional structures opens opportunities for monitoring their metabolic state in real-time.

Key words: aggregates, spheroids, neural cells, autofluorescence, visualization.

Connection of the publication to planned research works.

The work is a fragment of the research work "Cryo-preservation of three-dimensional cell structures of different degrees of heterogeneity based on physical and mathematical modelling" (state registration number 0123U102365).

Introduction.

Self-assembled three-dimensional cellular structures (spheroids and organoids) have recently been increasingly used in biomedical, pharmacological, and biotechnological research [1-5]. This is due to their greater resemblance to tissues in terms of their actual characteristics (physiological, biochemical, genetic) *in vivo* [6, 7] compared to single-layer cell models.

When working with three-dimensional structures, it is important for researchers to visualize the cells within them and assess their viability and metabolic activity.

For this purpose, immunofluorescence staining of fixed three-dimensional structures is usually used. However, this method is laborious, time-consuming, and expensive.

In addition, both immunofluorescence staining of three-dimensional structures and the use of traditional methods for determining cell viability, such as the MTT assay, the neutral red absorbance assay, or the ATP bioluminescence assay, do not allow for the assessment of cellular status throughout the entire volume of a three-dimensional structure without destroying it (disaggregation into single cells or preparation of sections). Therefore, there is a need for noninvasive methods that will allow both visualization of cells within three-dimensional structures and assessment of their viability and metabolic activity. At the same time, it is known that a large amount of information about the morphological and physiological state of cells can be provided by their

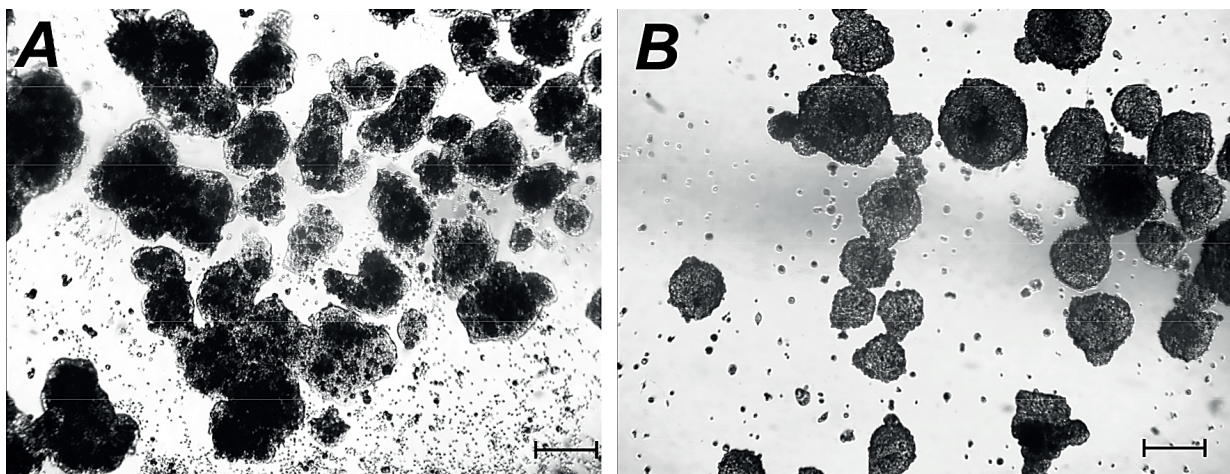


Figure 1 – Aggregates formed during the cultivation of freshly obtained neural cells of newborn rats for 6 hours: A – loose, irregularly shaped aggregates; B – spherical aggregates with densely packed cells. Scale bar: 200 μm.

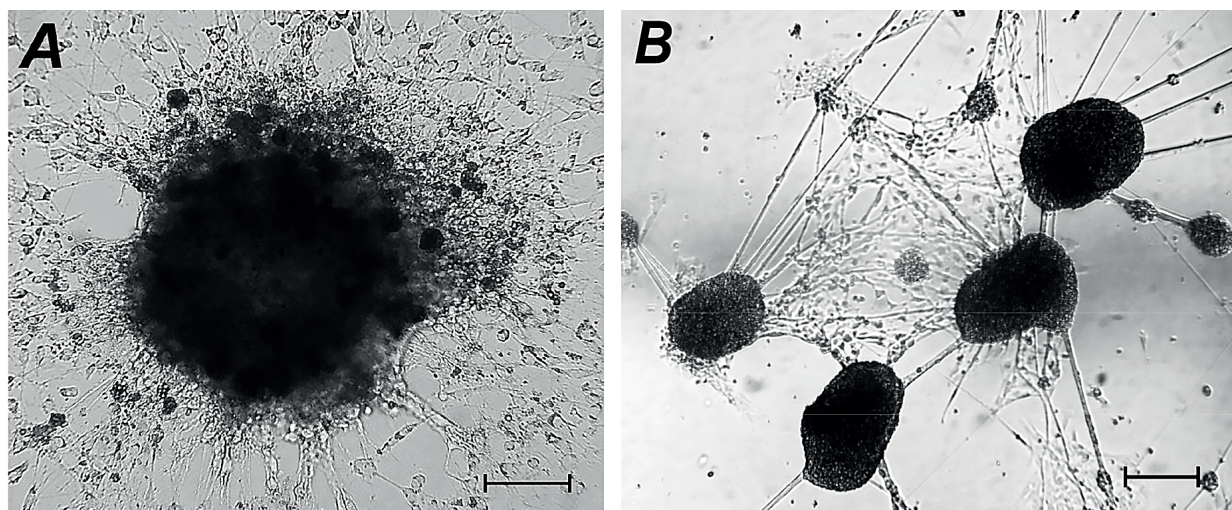


Figure 2 – A – Migration and differentiation of cells of an attached aggregate; B – Formation of a network by migrating cells. Scale bars: A – 100 μ m, B – 200 μ m.

autofluorescence (AF), which is lifelong, and its registration is a simple procedure that does not require the introduction of expensive labels. At the same time, NAD(P)H and flavins are practically the only ones responsible for the AF signal of cells [8].

The aim of the study.

To determine the possibility of using NAD(P)H and flavin autofluorescence to visualise and assess cell viability in three-dimensional structures.

Object and research methods.

Neural cells (NCs) were isolated from the brain tissue of newborn rats. For this purpose, the tissue was incubated for 2 minutes in a 0.5% trypsin solution at 37°C, after which it was mechanically disaggregated into single cells using vibration [9]. The resulting suspension was filtered through a nylon filter and then washed from trypsin by centrifugation at 100g for 2 min. Cell viability was assessed by staining with 0.4% trypan blue (Sigma, USA).

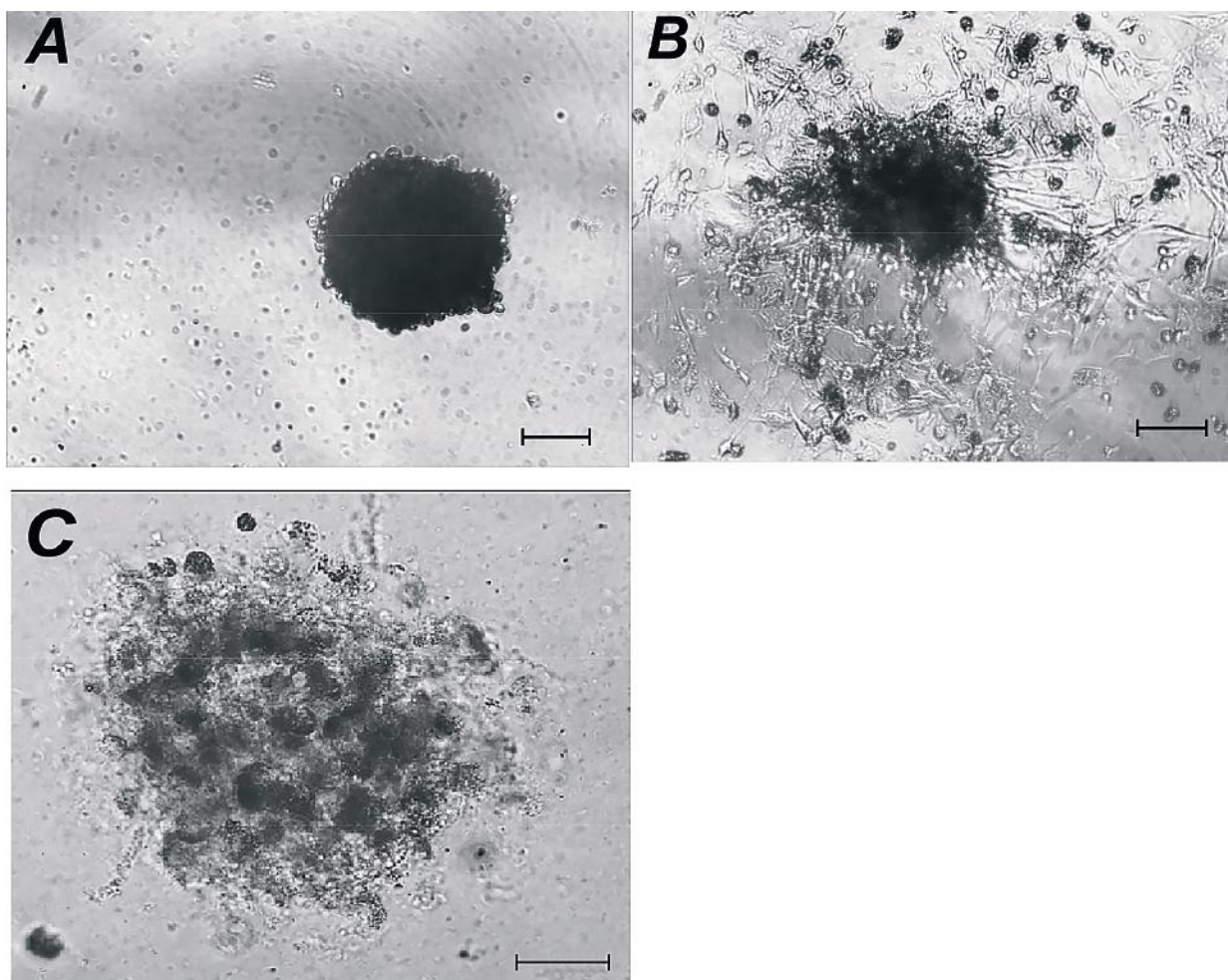


Figure 3 – A – Spheroid formed by culturing NCs in a drop; B – Cell migration of an attached spheroid formed in a drop; C – Disruption of the packing density of a spheroid subjected to triple freeze-thaw. Scale bar: 100 μ m.

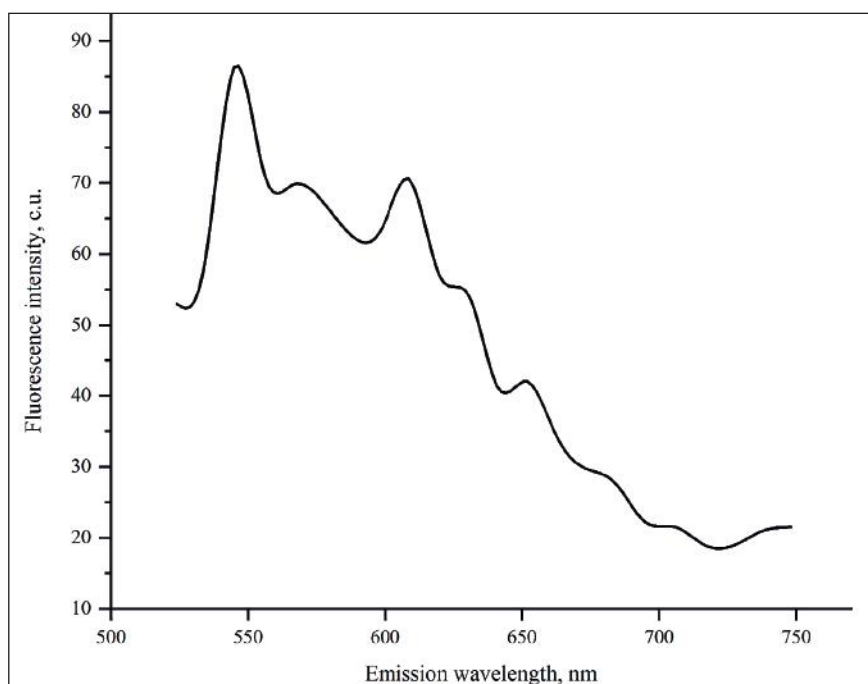


Figure 4 – The autofluorescence spectrum of NCs of three-dimensional structures.

The number of cells was counted in a haemocytometer.

Cells with viability above 70% were seeded at a concentration of 4×10^6 cells/ml in a 24-well plate (TPP, Switzerland) and cultured in DMEM/F12 medium (Biowest, France) supplemented with 10% serum until aggregates were formed [10]. The resulting aggregates were reseeded in a minimal volume of medium and further cultured in the same medium. Cultivation was carried out in a CO₂ incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, 95% air. Half the volume of the culture medium was replaced with fresh medium every 4-5 days.

After 70% monolayer formation, the NCs were removed using trypsin (0.25%)/versene (0.05%) solution (Biowest,

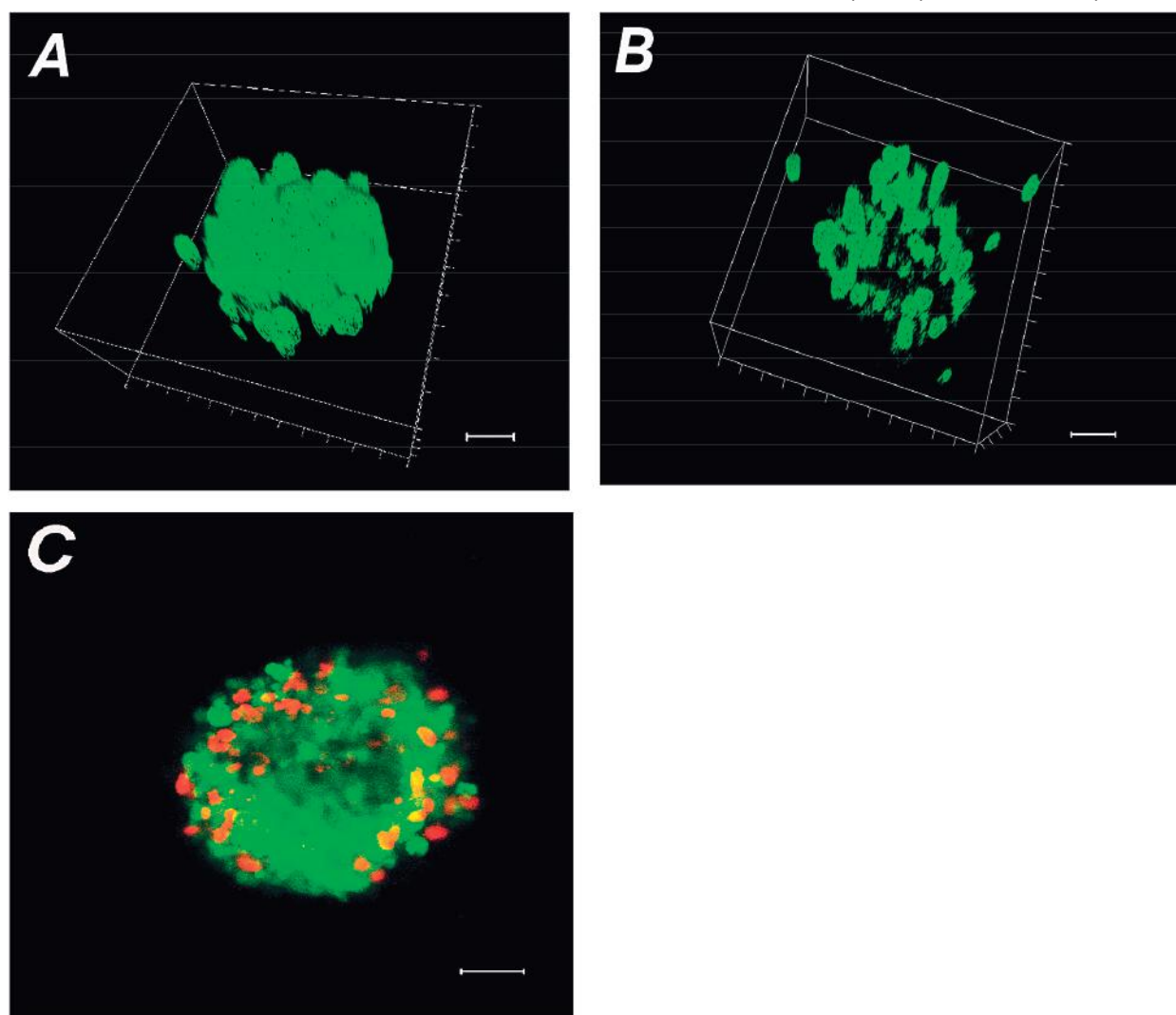


Figure 5 – Three-dimensional image of green AF spheroids (A) and densely packed aggregates (B) of neural cells obtained by layer-by-layer confocal laser microscopy; C – Staining of native spheroid cells with fluorescein diacetate (green) and propidium iodide (red). Scale bar: 50 μ m.

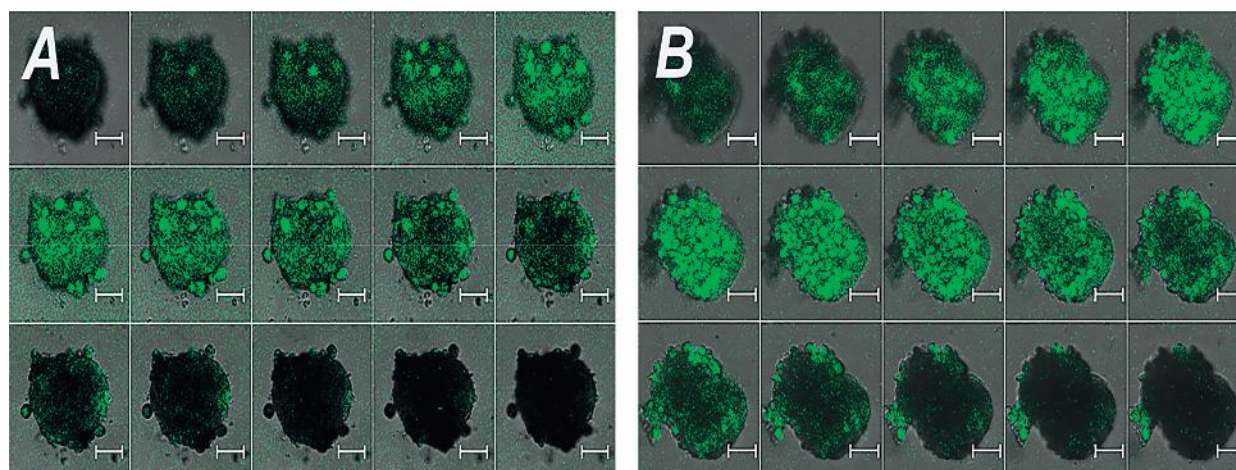


Figure 6 – Confocal z-stacks (scans) of green fluorescence of spheroid cells with a scanning step of 7.2 μm :
A – spheroids, B – aggregates. Scale bar: 50 μm .

France), washed by centrifugation and resuspended in culture medium.

NC spheroids were obtained using the hanging drop method. For this purpose, drops of the suspension of precultured NCs were applied to the inner surface of the Petri dish lid, followed by turning and covering the bottom of the dish, which contained sterile saline, to prevent the drops from drying out. The volume of drops was 20 μL . Each drop contained 2.5×10^3 cells. Petri dishes with drops were cultured in a CO_2 incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% air for four days. The resulting spheroids were transferred to 24-well plates for further cultivation.

Autofluorescence was recorded using a laser scanning microscope LSM 510 META manufactured by Carl Zeiss (Germany).

Cell viability in spheroids was determined by combined staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) [11]. The fluorescence of FDA and PI was recorded using a laser scanning microscope LSM 510 META.

The destruction of spheroids was performed by a triple cycle of freezing (by immersion in liquid nitrogen) – heating (at $+38^\circ\text{C}$) in the culture medium without cryoprotectors.

The experiments were conducted in accordance with the “General Principles for Experiments on Animals” approved by the III Congress on Bioethics (Kyiv, 20.09.07) and the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1985).

Research results and their discussion.

The AF was evaluated on three-dimensional structures (spheroids and aggregates) formed by the NCs of newborn rats.

During cultivation for 2-4 hours in the serum-enriched medium [10], some of the freshly obtained NCs were combined into aggregates that could be divided into two types: loose, irregularly shaped, with loose packing of cells in them (fig. 1A), and spherical, with densely packed cells (fig. 1B).

During reseeding, loose aggregates usually did not attach to the substrate, and their cells died during further cultivation. Almost 100% of the densely packed aggregates were attached to the substrate, after which their cells migrated, differentiated, and formed areas of

the monolayer consisting of cells with neuronal and glia morphology (fig. 2A). At the same time, the migrating neurons were able to create a network (fig. 2B).

Thus, it can be concluded that loose aggregates consist mainly of non-viable cells, while densely packed aggregates are formed by viable cells.

All spheroids formed by culturing NCs in drops (fig. 3A) were attached to the substrate during seeding (fig. 3B). Their cells migrated, forming areas of the monolayer consisting of cells with neuronal and glial morphology (fig. 3B), indicating the high viability of NCs in the spheroids.

Spheroids exposed to a triple freeze-thaw cycle lost their cell packing density (fig. 3C). During cultivation, such spheroids did not attach to the substrate and eventually disintegrated into single cells, which subsequently died.

To excite AF of biological objects, an ultraviolet laser with a wavelength of 366 nm is usually used [12]. The LSM 510 Meta confocal microscope does not have a laser with this wavelength. To determine the most optimal excitation wavelength for AF of spheroid cells and aggregates, we tested all the lasers equipped with the microscope (405, 458, 477, 488, 514, 543, and 633 nm). At the same time, we were interested in the AF of cells of three-dimensional structures in the green region of the spectrum (508-550 nm). The highest intensity of such fluorescence was recorded when using a laser with a wavelength of 405 nm.

Fig. 4 shows the AF spectrum obtained using the Lambda mod program of the LSM 510 Meta confocal microscope.

Using a 405 nm laser with a power of 15 mW to excite AF demonstrated that most cells of native spheroids and densely packed aggregates could AF in the spectrum's green region (fig. 5A, B). Comparative viability determination by FDA and PI staining also demonstrated a high degree of NC viability (green fluorescence) in the spheroid. At the same time, the cells of loose aggregates and spheroids subjected to the triple freeze-thaw cycle did not have the ability to AF.

Layer-by-layer AF scanning of three-dimensional structures with followed their 3D (z-stack) image construction (fig. 6A, B) allowed us to visualise AF cells as part of spheroids and aggregates. The depth of cell visualisation depended on their packing density in three-di-

mensional structures. On average, it did not exceed 100 μm since the laser power decreased with increasing depth of cells' location and at a depth greater than 100 μm , AF cells were usually no longer recorded.

The studies have shown that using the LSM 510 Meta confocal microscope and a 405 nm laser allows the AF of cells of three-dimensional structures to be recorded in the green region of the spectrum. The experiments indicate that green fluorescence is characteristic of living cells only. This statement is supported by the data that AF in the green region of the spectrum (508-530 nm) is the sum of the contributions of endogenous fluorophores, the main ones being NAD(F)H and flavins [13], the formation of which is inherent in viable cells.

Thus, using green AF allows the visualisation of viable NCs in three-dimensional structures (aggregates and spheroids) without time-consuming and costly immunofluorescent staining. At the same time, the

analysis of the three-dimensional green fluorescence image (fig. 5 A, B; fig. 6) of spheroids and aggregates gives us an idea of the number of viable cells and their packing density, as well as the size and shape of three-dimensional structures.

Conclusions.

The use of a laser with a wavelength of 405 nm leads to the excitation of NCs autofluorescence in the green region of the spectrum, which allows noninvasive, in vivo visualisation of living cells as part of three-dimensional structures, and estimation of their number and packing density.

Prospects for further research.

In future studies, it is planned to establish the relationship between the intensity of autofluorescence of neural cells in three-dimensional structures and their membrane potential.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-2-173-154-164

УДК 535.37:611.018.82.085.2:576.7

^{1,2,3}Сукач О. М., ¹Коваленко І. Ф., ¹Всеволодська С. О., ¹Коваленко С. Є., ¹Оченашко О. В.

ВИКОРИСТАННЯ АУТОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ЖИТТЄЗДАТНИХ НЕЙРАЛЬНИХ КЛІТИН У СКЛАДІ ТРИВИМІРНИХ СТРУКТУР

¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

²Харківський національний педагогічний університет імені Г. С. Сковороди (м. Харків, Україна)

³Державний біотехнологічний університет (м. Харків, Україна)

alexsukach587@gmail.com

Пошук простих, неінвазивних та нетоксичних методів візуалізації нейральних клітин у складі тривимірних структур є актуальною проблемою клітинної біології і біотехнології. В якості такого методу може бути використана прижиттєва ауто флуоресценція, яка може надати інформацію про життєздатність, морфологічний і фізіологічний стан нейральних клітин у складі тривимірних структур.

Мета – дослідити можливість використання ауто флуоресценції NAD(P)H і флавінів для візуалізації і оцінки життєздатності нейральних клітин у складі агрегатів і сфероїдів.

В експериментах на тривимірних агрегатах і сфероїдах нейральних клітин, отриманих з тканини головного мозку новонароджених щурів, вивчали ауто флуоресценцію клітин в залежності від їх життєздатності.

Було встановлено, що використання лазера з хвилею 405 нм призводить до збудження ауто флуоресценції нейральних клітин в зеленій області спектру, що дозволяє проводити неінвазивну, прижиттєву візуалізацію живих клітин у складі тривимірних структур, оцінювати їх кількість і щільність пакування. Аналіз інтенсивності зеленої ауто флуоресценції нейральних клітин тривимірних структур відкриває можливості для проведення моніторингу їх метаболічного стану в режимі реального часу.

Ключові слова: агрегати, сфероїди, нейральні клітини, аутофлуоресценція, візуалізація.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом НДР «Кріоконсервування тривимірних клітинних структур різного ступеню гетерогенності на основі фізико-математичного моделювання» (державний реєстраційний номер 0123U102365).

Вступ.

Самозбірні тривимірні клітинні структури (сфероїди та органоїди) останнім часом все ширше використовуються в медико-біологічних, фармакологічних та біотехнологічних дослідженнях [1-5]. Це пояснюється їх більшою подібністю з тканинами за фактичними їх характеристиками (фізіологічними, бі-

охімічними, генетичними) *in vivo* [6, 7], порівняно з одношаровими клітинними моделями.

В процесі роботи з тривимірними структурами дослідникам важливо візуалізувати клітини у їх складі та провести оцінку їх життєздатності і метаболічної активності. Для цього, зазвичай, використовують імуно-флуоресцентне фарбування фіксованих тривимірних структур. Однак такий метод є трудомістким, часовитратним і вартісним процесом.

До того ж як імуно-флуоресцентне фарбування тривимірних структур, так і використання традиційних методів визначення життєздатності клітин, таких як МТТ тест, аналіз поглинання нейтрального червоного або аналіз біolumінесценції АТФ не дозволяють

оцінити стан клітин по всьому об'єму тривимірної структури без її руйнування (деагрегації на поодинокі клітини, або приготування зрізів). Тому існує потреба у методах, які неінвазивно дозволять як візуалізувати клітини у складі тривимірних структур, так і провести оцінку їх життєздатності та метаболічної активності. Водночас, відомо, що велику кількість інформації щодо морфологічного і фізіологічного стану клітин може надати їх ауто флуоресценція (АФ), яка є прижиттєвою, а її реєстрація є простою процедурою, яка не потребує введення вартісних міток. При цьому, практично єдиними відповідальними за сигнал АФ клітин є NAD(P)H і флавіни [8].

Мета дослідження.

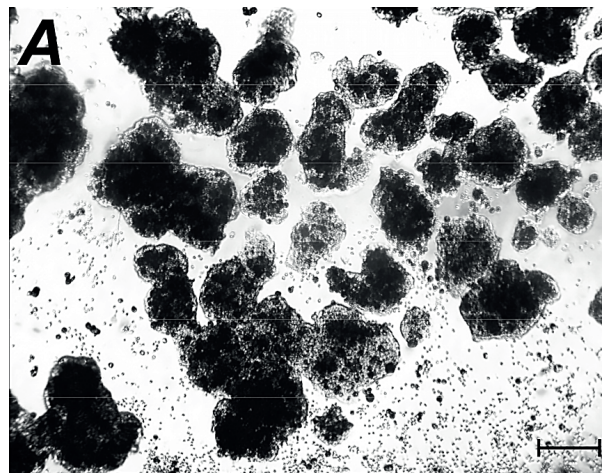
Визначення можливості використання ауто флуоресценції NAD(P)H і флавінів для візуалізації і оцінки життєздатності клітин у складі тривимірних структур.

Об'єкт і методи дослідження.

Нейральні клітини (НК) виділяли з тканини головного мозку новонароджених щурів. Для цього тканину інкубували 2 хв. в 0,5% розчині трипсину при 37°C, після чого механічно дезагрегували на поодинокі клітини з використанням вібрації [9]. Отриману суспензію фільтрували через нейлоновий фільтр, після чого відмивали від трипсину центрифугуванням при 100g упродовж 2 хв. Життєздатність клітин оцінювали по фарбуванню 0,4% трипановим синім (Sigma, США). Підрахунок кількості клітин проводили в камері Горяєва.

Клітини з життєздатністю вищою за 70% висівали в концентрації 4×10^6 клітин/мл в 24 лунковий планшет (TPP, Швейцарія) й культивували в середовищі DMEM/F12 («Biowest», Франція), збагаченому 10% сироватки крові до утворення агрегатів [10]. Утворені агрегати в мінімальному об'ємі середовища пересівали та далі культивували в тому ж середовищі. Культивування проводили в CO₂ інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO₂, 95% повітря. Половину об'єму середовища культивування замінювали на свіже кожні 4-5 діб.

Після формування 70% моношару НК знімали, використовуючи розчин трипсин (0,25%)/версен (0,05%) («Biowest», Франція), промивали центрифугуванням й ресуспендували в середовищі культивування.



Сфероїди НК отримували методом висячої краплі. Для цього на внутрішню поверхню кришки чашки Петрі наносили краплі суспензії прекультивованих НК з наступним перевертанням і накриванням нижньої частини чашки, яка містила стерильний фізіологічний розчин для запобігання висихання крапель. Об'єм крапель складав 20 мкл. Кожна крапля містила $2,5 \times 10^3$ клітин. Чашки Петрі з краплями культивували в CO₂ інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO₂, 95% повітря на протязі 4 діб. Отримані сфероїди переносили в 24-лункові планшети для подальшого культивування.

Ауто флуоресценцію реєстрували за допомогою лазерного скануючого мікроскопу LSM 510 META виробництва фірми Carl Zeiss (Німеччина).

Життєздатність клітин в складі сфероїдів визначали по комбінованому забарвленню флуоресцеїндіацетатом (FDA) та пропідіум йодидом (PI) [11]. Флуоресценцію FDA і PI реєстрували за допомогою лазерного скануючого мікроскопу LSM 510 META.

Руйнування сфероїдів проводили шляхом потрійного циклу заморожування (шляхом занурення в рідкий азот) – відігріву (при +38°C) в середовищі культивування без кріопротекторів.

Експерименти були проведені відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених III конгресом з біоетики (Київ, 20.09.07) і погоджених з положенням «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Результати дослідження та їх обговорення.

Оцінку АФ проводили на тривимірних структурах (сфероїдах і агрегатах), утворених НК новонароджених щурів.

В процесі культивування протягом 2-4 годин в середовищі, збагаченому сироваткою крові [10] частина свіже отриманих НК об'єднувалася в агрегати, які можна було розділити на 2 типи: пухкі, неправильної форми, з нещільним пакуванням клітин в них (рис. 1А), і сферичні, з щільно упакованими клітинами (рис. 1В).

При пересіві пухкі агрегати, зазвичай, до підкладки не прикріплювалися і в процесі подальшого культивування їх клітини гинули. Майже 100% щільно упакованих агрегатів прикріплювалися до підклад-

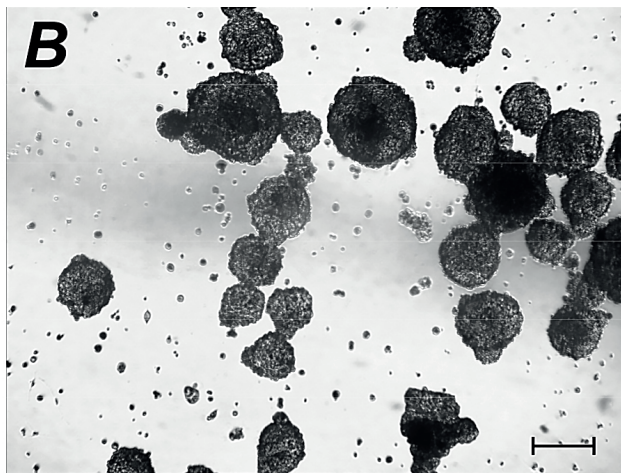


Рисунок 1 – Агрегати, сформовані в процесі культивування свіже отриманих нейральних клітин новонароджених щурів протягом 6 годин: А – пухкі, неправильної форми агрегати; В – сферичні агрегати з щільно упакованими клітинами. Масштаб: 200 мкм.

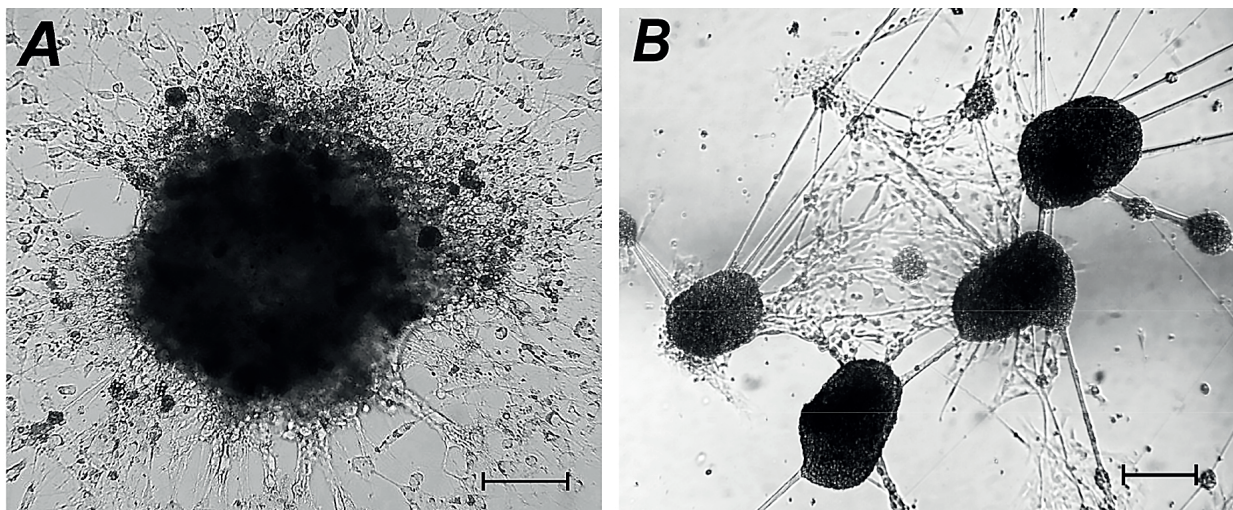


Рисунок 2 – А – Міграція і диференціація клітин прикріпленого агрегата;
В – Формування мігруючими клітинами сітки. Масштаб: А – 100 мкм, В – 200 мкм.

ки, після чого їх клітини мігрували, диференціювалися і формували ділянки моношару, які склалися з клітин з морфологією нейронів і глії (рис. 2А). При цьому, мігруючі нейрони були здатні формувати сітку (рис. 2В).

Таким чином, можна зробити висновок, що пухкі агрегати складаються в основному з нежиттєздатних

клітин, а щільно упаковані агрегати сформовані клітинами життєздатними.

Всі сфероїди, утворені шляхом культивування НК у краплі, (рис. 3А) при пересіві прикріплювалися до підкладки (рис. 3В). Їх клітини мігрували, формуючи ділянки моношару, які склалися з клітин з нейрональною і гліальною морфологією (рис. 3В), що вказує на високу життєздатність НК у складі сфероїдів.

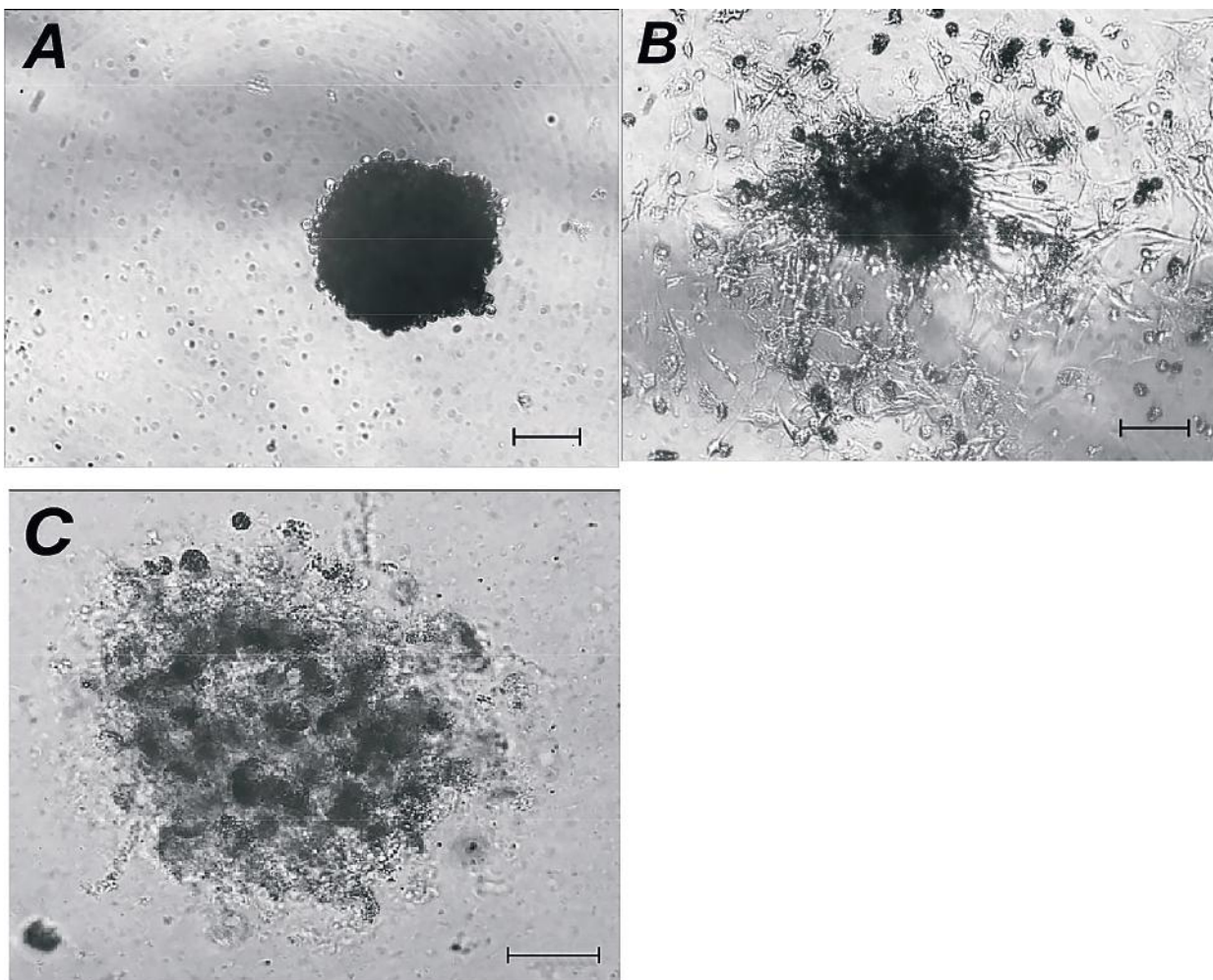


Рисунок 3 – А – Сфероїд, утворений шляхом культивування НК у краплі; В – Міграція клітин прикріпленого сфероїда, утвореного в краплі; С – Порушення щільності пакування сфероїда, підданого потрібному заморожуванню-відігріву. Масштаб: 100 мкм.

Сфероїди, піддані дії потрійного циклу заморожування-відігріву втрачали щільність пакування клітин (рис. 3С). В процесі культивування такі сфероїди до підкладки не прикріплювалися і з часом розпадалися на поодинокі клітини, які в подальшому гинули.

Для збудження АФ біологічних об'єктів зазвичай використовують ультрафіолетовий лазер з довжиною хвилі 366 нм [12]. В комплектації конфокального мікроскопа LSM 510 Meta, лазер з такою довжиною хвилі відсутній. Для визначення найбільш оптимальної довжини хвилі збудження АФ клітин сфероїдів і агрегатів ми провели перевірку всіх лазерів, яким укомплектований мікроскоп (405, 458, 477, 488, 514, 543 и 633нм). При цьому нас цікавила АФ клітин три-

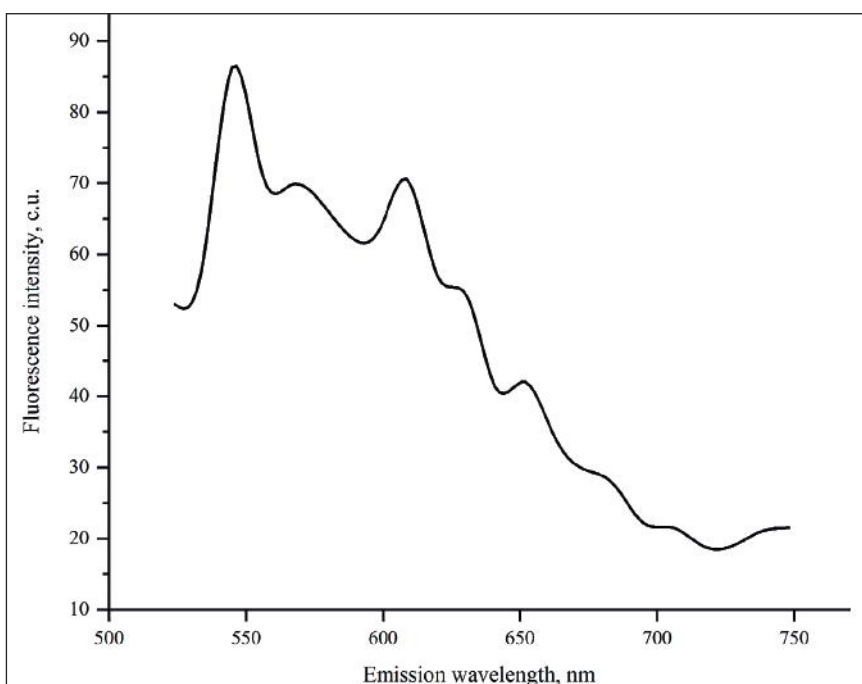


Рисунок 4 – Спектр ауто флуоресценції НК тривимірних структур.

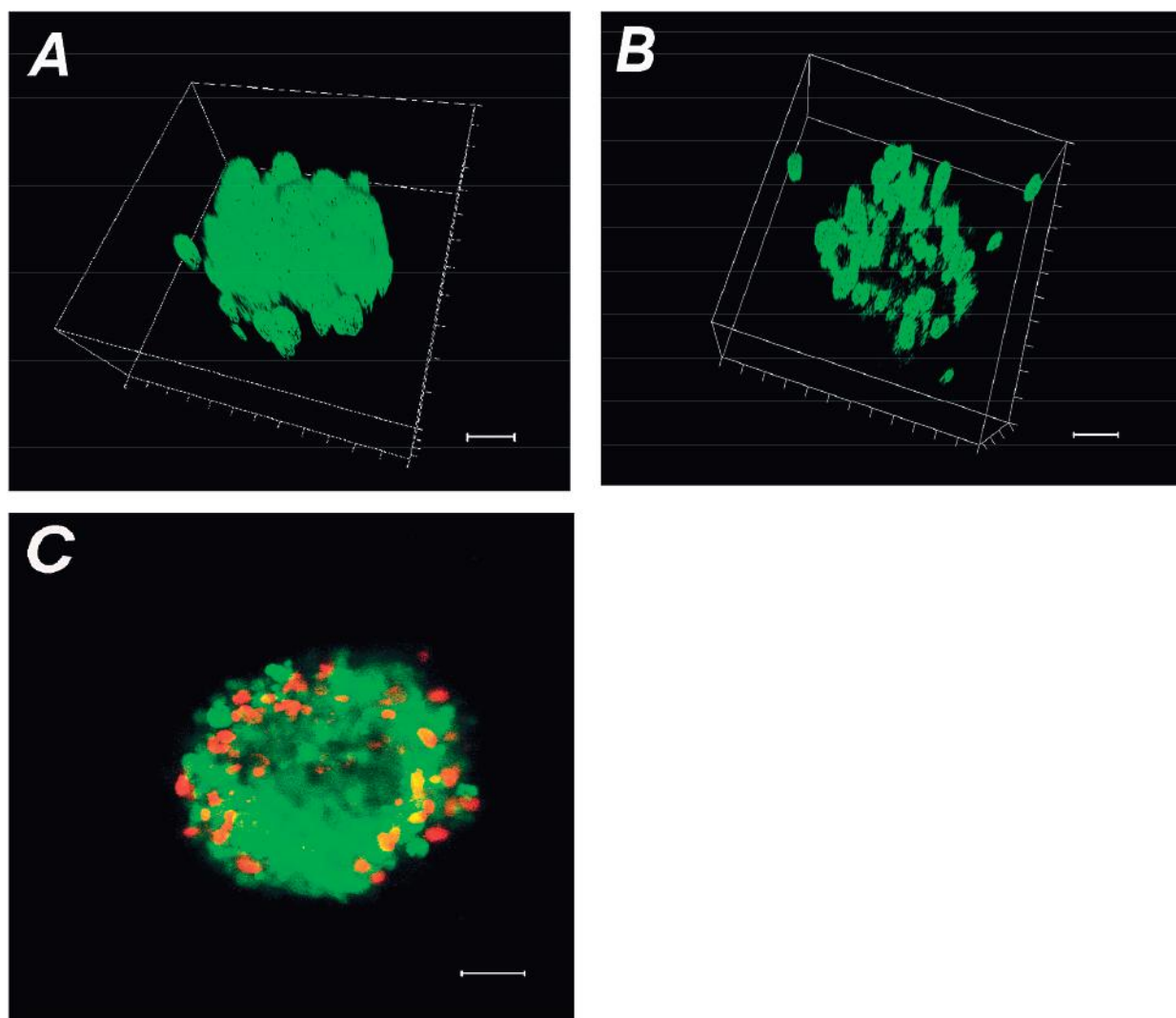


Рисунок 5 – Тривимірне зображення зеленої АФ сфероїдів (А) та щільно упакованих агрегатів (В) нейральних клітин, отримане в результаті пошарової конфокальної лазерної мікроскопії; С – Фарбування клітин нативного сфероїда флуоресцеїн діацетатом (зелений колір) та пропідіум йодидом (червоний колір). Масштаб: 50 мкм.

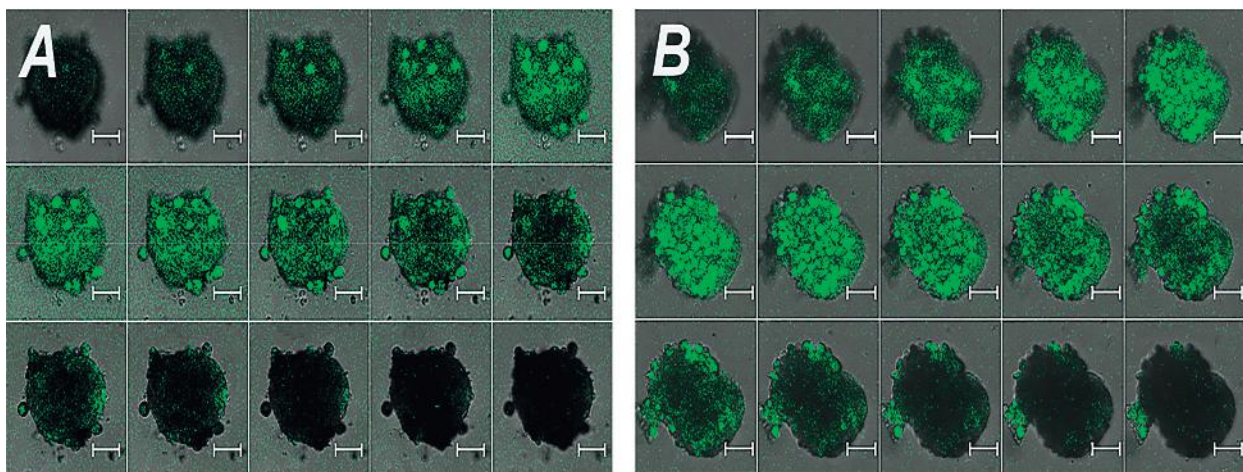


Рисунок 6 – Конфокальні z-stacks (скани) зеленої флуоресценції клітин сфероїдів з кроком сканування 7,2 мкм: А – сфероїди, В – агрегати. Масштаб: 50 мкм.

вимірних структур в зеленій області спектру (508-550 нм). Найвища інтенсивність такої флуоресценції реєструвалась при використанні лазера з довжиною хвилі 405 нм.

Спектр АФ, який був отриманий нами за допомогою програми Lambda mod конфокального мікроскопа LSM 510 Meta, наведено на **рис. 4**.

Використання для збудження АФ лазера з довжиною хвилі 405 нм потужністю 15 мВт продемонструвало, що більшість клітин нативних сфероїдів та щільно упакованих агрегатів володіли здатністю до АФ в зеленій області спектру (**рис. 5А, В**). Порівняльне визначення життєздатності фарбуванням FDA і PI також продемонструвало високу ступінь життєздатності НК (зелена флуоресценція) у складі сфероїда. При цьому клітини пухких агрегатів та сфероїдів, підданих потрійному циклу заморожування-відігріву здатністю до АФ не володіли.

Попарове сканування АФ тривимірних структур з наступною побудовою їх 3D (z-stack) зображення (**рис. 6А, В**) дозволило візуалізувати АФ клітини у складі сфероїдів і агрегатів. При цьому глибина візуалізації клітин залежала від щільності їх пакування в тривимірних структурах і в середньому не перевищувала 100 мкм, так як потужність лазера зменшувалась зі збільшенням глибини розташування клітин і на глибині, більшій за 100 мкм АФ клітин, як правило, вже не реєструвалась.

Проведені дослідження продемонстрували, що використання конфокального мікроскопа LSM 510

Meta і лазера з довжиною хвилі 405 нм дозволяє реєструвати АФ клітин тривимірних структур в зеленій області спектру. При цьому проведені експерименти вказують на те, що зелена флуоресценція властива лише живим клітинам. Це твердження підкріплюється даними про те, що АФ в зеленій області спектру (508-530 нм) є сумою вкладів ендogenous флуорофорів, основними з яких є НАД(Ф)Н та флавіни [13], утворення яких притаманне життєздатним клітинам.

Таким чином, використання зеленої АФ дозволяє проводити візуалізацію життєздатних НК тривимірних структур (агрегатів та сфероїдів) без проведення трудомісткого та вартісного імуно-флуоресцентного фарбування. При цьому аналіз тривимірного зображення зеленої флуоресценції (**рис. 5А,В; рис. 6**) сфероїдів і агрегатів дає нам уявлення про кількість життєздатних клітин та щільність їх пакування, а також про розміри і форму тривимірних структур.

Висновки.

Використання лазера з хвилею 405 нм призводить до збудження аутофлуоресценції НК в зеленій області спектру, що дозволяє проводити неінвазивну, прижиттєву візуалізацію живих клітин у складі тривимірних структур, оцінювати їх кількість і щільність пакування.

Перспективи подальших досліджень.

В подальших дослідженнях планується встановити взаємозв'язок інтенсивності ауто флуоресценції нейральних клітин у складі тривимірних структур з їх мембранним потенціалом.

References / Література

1. Han SJ, Kwon S, Kim KS. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int.* 2021;21:152. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>.
2. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am. J. Physiol.* 1997;273:C1109-C1123. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1109>.
3. Boutin ME, Voss TC, Titus SA, Cruz-Gutierrez K, Michael S, Ferrer M. A high-throughput imaging and nuclear segmentation analysis protocol for cleared 3D culture models. *Scientific reports.* 2018;8(1):11135. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29169-0>.
4. Frappart PO, Walter K, Gout J, Beutel AK, Morawe M, Arnold F, et al. Pancreatic cancer-derived organoids—a disease modeling tool to predict drug response. *United European Gastroenterology Journal.* 2020;8(5):594-606. DOI: <https://doi.org/10.1177/2050640620905183>.
5. Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. *Nat Rev Mater.* 2021;6:402-420. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y>.
6. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1987;113:101-122. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00391431>.
7. Gunti S, Hoke ATK, Vu KP, London NR. Organoid and spheroid tumor models: techniques and applications. *cancers.* 2021;13:874. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13040874>.
8. Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem.* 1979;27(1):36-43. DOI: <https://doi.org/10.1177/27.1.220325>.
9. Petrenko AY, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Analytical Biochem.* 1991;194(2):326-329. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90236-m](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90236-m).
10. Sukach AN, Liashenko TD, Shevchenko MV. Properties of isolated neural cells from newborn rat in tissue in vitro. *Biotechnologia Acta.* 2013;6(3):63-68. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2013_6_3_8.

11. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. J Histochem Cytochem. 1985;33(1):77-79. DOI: <https://doi.org/10.1177/33.1.2578146>.
12. Croce A, Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. European Journal of Histochemistry. 2014;58(4):2461. DOI: <https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2461>.
13. Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. J Histochem Cytochem. 1979;27(1):36-43. DOI: <https://doi.org/10.1177/27.1.220325>.

ВИКОРИСТАННЯ АУТОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ЖИТТЄЗДАТНИХ НЕЙРАЛЬНИХ КЛІТИН У СКЛАДІ ТРИВИМІРНИХ СТРУКТУР

Сукач О. М., Коваленко І. Ф., Всеволодська С. О., Коваленко С. Е., Оченашко О. В.

Резюме. Вступ. В процесі роботи з тривимірними структурами нейральних клітин (НК), які все частіше використовуються в медико-біологічних, фармакологічних та біотехнологічних дослідженнях, важливо проводити оцінку їх життєздатності та метаболічної активності. Для цього, зазвичай, використовують імунно-флуоресцентне фарбування. Однак такий метод є інвазивним, часом трудомістким і вартісним. Мітки можуть бути токсичними. Неінвазивною та нетоксичною альтернативою є візуалізація без міток, для якої можна використовувати аутофлуоресценцію NAD(P)H і флавінів. Аутофлуоресценція, яка є прижиттєвою, може надати велику кількість інформації про морфологічний і фізіологічний стан клітин у складі тривимірних структур.

Мета – визначення можливості використання аутофлуоресценції NAD(P)H і флавінів для візуалізації і оцінки життєздатності НК у складі агрегатів і сфероїдів.

Об'єкт і методи дослідження. Нейральні клітини виділяли з тканини головного мозку новонароджених щурів. Тривимірні агрегати отримували в процесі короткострокового культивування свіже отриманих нейральних клітин в концентрації 4×10^6 клітин/мл в середовищі, збагаченому 10% сироватки крові. Сфероїди отримували методом висячої краплі з прекультивованих нейральних клітин. Аутофлуоресценцію реєстрували за допомогою лазерного скануючого мікроскопу LSM 510 META.

Результати. Проведені дослідження продемонстрували, що використання конфокального мікроскопа і лазера з довжиною хвилі 405 нм призводить до збудження аутофлуоресценції НК у складі тривимірних структур в зеленій області спектру. При цьому проведені експерименти вказують на те, що зелена флуоресценція властива лише живим клітинам.

Висновки. Використання лазера з хвилею 405 нм призводить до збудження аутофлуоресценції НК в зеленій області спектру, що дозволяє проводити неінвазивну, прижиттєву візуалізацію живих клітин у складі тривимірних структур, оцінювати їх кількість і щільність пакування. Аналіз інтенсивності зеленої аутофлуоресценції НК тривимірних структур відкриває можливості для проведення моніторингу їх метаболічного стану в режимі реального часу.

Ключові слова: агрегати, сфероїди, нейральні клітини, аутофлуоресценція, візуалізація.

USE OF AUTOFLUORESCENCE FOR VISUALIZATION OF VIABLE NEURAL CELLS IN THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES

Sukach O. M., Kovalenko I. F., Vsevolodskaya S. O., Kovalenko S. E., Ochenashko O. V.

Abstract. *Introduction.* When working with three-dimensional neural cells (NCs) structures, which are increasingly used in biomedical, pharmacological and biotechnological research, it is important to assess their viability and metabolic activity. For this purpose, immunofluorescence staining is usually used. However, this method is invasive, sometimes time-consuming and expensive. Labels can be toxic. A non-invasive and non-toxic alternative is label-free imaging, which can be performed using NAD(P)H and flavin autofluorescence. Autofluorescence, which is intravital, can provide substantial data on the morphological and physiological state of cells in three-dimensional structures.

Aim was to study the feasibility of using NAD(P)H and flavins autofluorescence for visualization of neural cells in aggregates and spheroids and their viability assessment.

Object and methods. Neural cells were isolated from the brain tissue of newborn rats. Three-dimensional aggregates were obtained in the process of short-term cultivation of freshly obtained neural cells at a concentration of 4×10^6 cells/ml in medium enriched with 10% serum. Spheroids were generated using the hanging drop method from precultured neural cells. Autofluorescence was measured by a laser scanning microscope LSM 510 META.

Results. Our studies have demonstrated that the use of a confocal microscope and a laser operating at a wavelength of 405 nm leads to the excitation of the autofluorescence of NCs in three-dimensional structures in the green region of the spectrum. The results obtained indicate that green fluorescence is characteristic only of viable cells.

Conclusions. The use of a laser with a wavelength of 405 nm leads to the excitation of NCs autofluorescence in the green region of the spectrum, which allows for non-invasive, intravital visualization of viable cells in three-dimensional structures, to estimate their number and packing density. Analysis of the intensity of green autofluorescence of NCs in three-dimensional structures opens up opportunities for real-time monitoring of their metabolic status.

Key words: aggregates, spheroids, neural cells, autofluorescence, visualization.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Sukach O. M.: <https://orcid.org/0000-0002-7838-7319>^{ADF}

Kovalenko I. F.: <https://orcid.org/0000-0002-7063-6712>^{BEF}

Vsevolodskaya S. O.: <https://orcid.org/0000-0003-0617-7694>^{BEF}

Kovalenko S. E.: <https://orcid.org/0000-0001-7351-5767>^{BEF}

Ochenashko O. V.: <https://orcid.org/0000-0001-8365-6715> ^{CEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors report that there is no conflict of interest. / Автори повідомляють, що конфлікт інтересів відсутній.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Sukach Oleksandr Mykolayovych / Сукач Олександр Миколайович
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine / Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України
Ukraine, 61016, Pereyaslavska Street, 23, Kharkiv / Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23
Tel.: +380957714239 / Тел.: +380957714239
E-mail: alexsukach587@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. / **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.

Received 19.12.2023 / Стаття надійшла 19.12.2023 року
Accepted 25.04.2024 / Стаття прийнята до друку 25.04.2024 року