

УДК 57.086.13:577.352.43:51-76:576.5

A.I. Moisieiev, I.F. Kovalenko, S.Ye. Kovalenko, G.A. Bozhok, O.I. Gordiyenko*

Динаміка проникання диметилсульфоксиду в клітини лінії L929 і сфероїди з них

UDC 57.086.13:577.352.43:51-76:576.5

A.I. Moisieiev, I.F. Kovalenko, S.Ye. Kovalenko, G.A. Bozhok, O.I. Gordiyenko*

Dynamics of Dimethyl Sulfoxide Penetration Into L929 Cells and L929-Based Spheroids

Резюме: У роботі запропоновано алгоритм розрахунку ефективних коефіцієнтів проникності для багатоклітинних об'єктів у криозахисному середовищі на підставі фізико-математичної моделі процесів масопереносу. У проведених дослідженнях отримано значення поверхнево-об'ємного відношення для клітин лінії L929 за різних температур і розраховано коефіцієнт теплового розширення площі поверхні мембран клітин $\beta = 2,7 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$. Визначено величини осмотично неактивного об'єму для клітин лінії L929 і сфероїдів з них. З динамічних кривих зміни відносного об'єму знайдено коефіцієнти фільтрації та проникності для ДМСО клітин лінії L929 та сфероїдів *in toto*. Розраховані показники є найбільшими для поодиноких клітин і значуще ($p < 0,05$) зменшуються для клітин у складі сфероїдів зі збільшенням глибини їх розташування, що може бути наслідком обмеження доступності поверхні клітин у складі сфероїдів для проникання позаклітинних речовин. Отримані в роботі характеристики проникності сфероїдів можуть бути використані для розроблення оптимальних режимів криоконсервування цих об'єктів.

Ключові слова: клітини лінії L929, сфероїди, коефіцієнти фільтрації, коефіцієнти проникності, диметилсульфоксид, осмотично неактивний об'єм, криоконсервування.

Abstract: The study proposes an algorithm for calculating of appreciable permeability coefficients for multicellular structures in a cryoprotectant medium using physical and mathematical model of mass transfer. The values of surface-area-to-volume ratio for L929 cells at different temperatures was determined and the thermal expansion coefficient of the surface area of cell membranes was calculated ($\beta = 2.7 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$). The osmotically inactive volume for L929 cells and their spheroids was determined. Filtration and permeability coefficients to DMSO for L929 cells and *in toto* spheroids were found from the dynamic curves of relative volume change. The calculated parameters are the highest for individual cells and significantly ($p < 0.05$) decrease for cells in the spheroids with increasing depth of their location, this reduction may be stipulated by a decrease in the available surface of cells in the spheroids for the penetration of extracellular substances. Obtained in this research permeability characteristics of spheroids can be used to develop optimal cryopreservation regimens for them.

Key words: L929 cells, spheroids, filtration coefficients, permeability coefficients, dimethylsulfoxide, osmotically inactive volume, cryopreservation.

Клітини в організмі людини взаємодіють між собою та компонентами позаклітинного матриксу, створюючи унікальну 3D-організацію. Ці взаємодії «клітина – клітина» та «клітина – позаклітинний матрикс» утворюють складну комунікаційну мережу біохімічних і механічних сигналів, які є критичними для нормальної фізіології клітин [10, 17, 21, 23]. За умов вирощування клітин у моношарових 2D-культурах втрачаються ці тканинспецифічні властивості. Тому за останні два десятиліття було здійснено численні спроби для розроблення 3D-моделей культури клітин із метою подолання суперечностей між результатами аналізу клітин та експериментальних досліджень на тваринах та усунення експериментальної невизначеності під час використання моношарових культур. Тривимірні

Cells in human body interact with each other and components of the extracellular matrix to create a unique 3D organization. These cell-to-cell and cell-extracellular matrix interactions form a complicated communication network of biochemical and mechanical signals that are critical to normal cell physiology [9, 16, 21, 23]. If the cells are grown in monolayer 2D cultures, these tissue-specific properties are lost. Therefore, over the last two decades, numerous attempts have been made to develop 3D models of cell culture in order to bridge the gap between the results of cell analysis and experimental animal studies to reduce experimental uncertainty when using the monolayer cultures. The three-dimensional culture model is a useful alternative to tissue explants. One of the 3D cultures is spheroids, first obtained by J. Holtfreter [10] and

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: olga.gordiyenko.ipcic@gmail.com

Надійшла 14.04.2021

Прийнята до друку 19.10.2021

Received 14, April, 2021

Accepted 19, October, 2021

© 2021 O.I. Gordiyenko, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

модель культури є корисною альтернативою тканинним експлантатам. Однією з 3D-культур є сфероїди (СФ), вперше отримані J. Holtfreter [11] і A. Moscona та H. Moscona [19] за допомогою самозбірки зі суспендованих клітин. Сфероїди у багатьох аспектах демонструють більшу подібність до реальних тканин, ніж моношарові культури клітин, і тому на сьогодні вони частіше застосовуються в біомедицині. Сфероїдна форма є найбільш підходящою моделлю для дослідження раку [9] та підбору ліків [15], а також для використання в регенеративній медицині [22]. Метод сфероїдних культур покращує потенціал диференціації порівняно з моношаровою культурою [24, 25]. Сфероїди, які виконують функції тканин, можуть служити будівельним матеріалом для реконструкції органів. Попередні дослідження демонструють, що 3D-культура клітин забезпечує сприятливі умови для реконструкції печінки [5, 20], підшлункової залози [18], кровоносних судин [14], м'язів міокарда, гангліїв [12] і кісткової тканини [7, 24].

Важливим і актуальним питанням щодо багатоклітинних об'єктів є пошук методів їхнього кріоконсервування [8, 16], що дозволить більше ефективно використати СФ у регенеративній медицині та тканинній інженерії. Тривалий період збереження СФ може застосовуватися як в альтернативній терапії для трансплантації, так і під час розроблення нових препаратів. Однак на сьогодні існує вкрай мало робіт із кріоконсервування СФ. Численні протоколи кріоконсервування для клітинних суспензій, тобто поодиноких клітин, не вирішують питання кріочутливості клітин у складі багатоклітинних сфероїдів, які мають тривимірну структурну організацію і складні міжклітинні взаємодії. Тому для розроблення оптимальних методів кріоконсервування СФ потрібний ґрунтовний кріобіологічний підхід, а саме: дослідження процесів зневоднення та насичення кріопротектором багатоклітинних об'єктів на етапах кріоконсервування.

Мета роботи – проведення порівняльного дослідження динаміки проникання молекул води та кріопротектора диметилсульфоксиду в сфероїди *in toto*, клітини у зовнішньому та внутрішньому шарах сфероїда та в поодинокі клітини лінії L 929.

Матеріали і методи

Дослідження виконували на клітинах лінії L929 та СФ діаметром 80–100 мкм, оскільки на 10-у добу культивування кількість багатоклітинних об'єктів із таким розміром складала 70%. Клітинну лінію протягом 10-добового культивування підтримували живильним середовищем DMEM/

A. Moscona and H. Moscona [18] by self-assembly of suspended cells. Spheroids in many respects show higher similarity to real tissues than monolayer cell cultures, and therefore today they are more commonly used in biomedicine. The spheroidal form is the most suitable model for cancer research [5] and drug selection [14], as well as in regenerative medicine [22]. The spheroid culture method improves the potential for differentiation compared to monolayer culture [24, 25]. Spheroids, which perform the functions of tissues, can serve as a building material for the reconstruction of organs. Previous studies have shown that 3D cell culture provides favorable conditions for the reconstruction of liver [1, 19], pancreas [17], blood vessels [13], myocardial muscle, ganglia [11] and bone tissue [3, 24].

An important and topical issue for multicellular objects is the search for methods of their cryopreservation [4, 15], which will allow more efficient use of spheroids in regenerative medicine and tissue engineering. Long-term preservation of spheroids can be used both in alternative therapies for transplantation and in development of new drugs. However, today there is very little number of papers on cryopreservation of spheroids. Numerous cryopreservation protocols for cell suspensions, *i. e.* individual cells, do not solve the problem of cryosensitivity of cells in multicellular spheroids, which have a three-dimensional structural organization and complicated cell-to-cell interactions. Therefore, the development of optimal methods of cryopreservation of spheroids requires a thorough cryobiological approach, namely: the study of dehydration and cryoprotection saturation of multicellular objects at the stages of cryopreservation.

The research was aimed to comparative study of the dynamics of penetration of water molecules and cryoprotectant dimethyl sulfoxide into spheroids *in toto*, cells in the outer and inner layers of the spheroid and in individual L929 cells.

Materials and methods

The studies were performed in L929 and spheroid cells with a diameter of 80–100 μm , as on day 10 of cultivation, the number of multicellular objects with this size was 70%. The cell line was maintained for 10 days in DMEM/F12 (Biowest, France) containing 200 U/ml benzylpenicillin (Arterium, Ukraine), 200 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Arterium) and 10% fetal bovine serum (Biowest, France) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in plastic vials for cultivation (SPL Life Sciences, Korea). Every 3rd day of cultivation, the medium was chan-



F12 («Biowest», Франція), яке містило 200 Од/мл бензилпеніциліну («Arterium», Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium») та 10% фетальної телячої сироватки («Biowest») при 37°C в атмосфері з 5% CO₂ в пластикових флаконах для культивування («SPL Life Sciences», Корея). Кожну 3-ю добу культивування здійснювали заміну середовища. Клітинну суспензію отримували з моношару клітин лінії L929 на 10-у добу культивування шляхом його оброблення протягом 5 хв сумішшю 0,5% трипсину («Sigma», США) та розчину Версена («PAA», США) у співвідношенні 1:1. Після відкріплення клітини відмивали від ферментного розчину середовищем DMEM/F12 («Biowest»).

Для отримання СФ використовували низькоадгезивну поверхню, чашки Петрі обробляли 2%-м розчином агару («Ferak», Німеччина). Посівна концентрація фібробластів становила 2×10^5 кл/мл. Сфероїди культивували протягом 10 діб.

Коефіцієнти проникності визначали на поодиноких клітинах та СФ із діаметром 80–100 мкм після їхнього прикріплення в адгезивних умовах протягом доби. Для визначення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин лінії L929 для молекул води (L_p) і ДМСО (k_p) та ефективних значень подібних параметрів для СФ із цих клітин використовували волюмометричний метод [1, 2]. Форму клітин апроксимували сферою.

Для визначення об'єму клітин чашку Петрі з поодинокими клітинами або СФ установлювали на термостатований столик конфокального мікроскопа «LSM 510 META» («Carl Zeiss», Німеччина). До зразків додавали розчин 1М ДМСО у фізіологічному розчині за температури 15°C. Для визначення параметрів проникності для клітин у зовнішньому і внутрішньому шарах СФ використовували Z-сканування сфероїдів із кроком 4,2 мкм. Досліджували зміни у часі об'єму СФ *in toto*, клітин у різних шарах СФ або прикріплених на культуральну поверхню в процесі їх зневоднення в 1М розчині кріопротектора і відновлення на етапі проникнення кріопротектора в клітини. Морфометричний аналіз здійснювали з використанням комп'ютерної програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss»).

Числові значення коефіцієнтів фільтрації та проникності ДМСО у клітини лінії L929 і СФ, які вони утворювали, визначали шляхом апроксимації експериментальних даних зміни відносного об'єму клітин або СФ під час експозиції в досліджуваних розчинах теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і про-

ged. The cell suspension was obtained from a L929 cell monolayer on day 10 of cultivation by treating it for 5 min with a mixture of 0.5% trypsin (Sigma, USA) and Versene solution (PAA, USA) in a ratio of 1:1. After detachment, the cells were washed from the enzyme solution with DMEM/F12 Biowest).

To obtain spheroids there was used a low-adhesion surface, Petri dishes were treated with 2% agar solution (Ferak, Germany). The inoculation concentration of fibroblasts was 2×10^5 cells/ml. Spheroids were cultured for 10 days.

Permeability coefficients were determined in single cells and spheroids with a diameter of 80–100 μm after their attachment under adhesive conditions during the day. The volumetric method was used to determine the permeability coefficients of plasma membranes of L929 cells to water molecules (L_p) and DMSO (CPA) and the effective values of similar parameters for spheroids from these cells [7, 8]. A sphere approximated the shape of the cells.

To determine the cell volume, Petri dish with individual cells or spheroids was thermostated using LSM 510 META confocal microscope table (Carl Zeiss, Germany). A solution of 1M DMSO in physiological saline at a temperature of 15°C was added to the samples. Spheroids were Z-scanned with a step of 4.2 μm to determine the permeability parameters for cells in the spheroid outer and inner layers. Changes in time of the volume of spheroids *in toto*, cells in different layers of spheroids or attached to the culture surface during their dehydration in 1M cryoprotectant solution and recovery at the stage of penetration of cryoprotectant into cells were studied. Morphometric analysis was performed using the 'AxioVision Rel. 4.6' software (Carl Zeiss).

Numerical values of DMSO filtration and permeability coefficients in L929 and spheroid cells were formed by approximating experimental data on changes in relative cell volume or spheroid during exposure in test solutions to theoretical curves calculated by means of a physico-mathematical model of passive water transport and permeable substances in case of their maximum coincidence [7, 8].

The osmotically inactive volume of L929 and SF cells was determined by the method described in V.V. Ogurtsova *et al.* [20]. To do this, we obtained the dependence of the relative cell / spheroid volume on the inverse reduced osmotic pressure in solutions of sodium chloride with concentrations of 0.5; 1; 2.0 mol/l. In the case of a two-component solution of an impermeable substance (k), the equation describing the change in cell volume over time (t) has the form,



никальних речовин за умови їх максимального збігу [1, 2].

Осмотично неактивний об'єм клітин лінії L929 та СФ визначали за методом, описаним у роботі В.В. Огурцової та співавт. [4]. Для цього отримували залежність відносного об'єму клітин/СФ від оберненого приведенного осмотичного тиску у розчинах хлориду натрію з концентраціями 0,5; 1; 2,0 моль/л. У випадку двокомпонентного розчину непроникальної речовини (k) рівняння, яке описує зміну клітинного об'єму у часі (t), має вигляд

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

де τ_w – характерний час проникання молекул води в клітини; α – осмотично неактивний об'єм клітини; n_k^{out} – мольна частка розчиненої у позаклітинному розчині непроникальної речовини k; n_{ko}^{in} – початкове значення мольної частки розчиненої у внутрішньоклітинному розчині речовини.

За умови $t \rightarrow \infty$ (тобто $t \gg \tau_w$) зміна відносного об'єму клітини в розчині непроникальної речовини дорівнює $\frac{dy}{dt} \rightarrow 0$, отже, отримуємо наступне рівняння:

$$\frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{(y-\alpha)} - \frac{n_k^{out}}{n_{ko}^{in}} \right] = 0,$$

$$(1-\alpha) = (y_\infty - \alpha) \frac{n_k^{out}}{n_{ko}^{in}} = (y_\infty - \alpha) \frac{\pi_k^{out}}{\pi_{ko}^{in}}, \quad (2)$$

$$\text{або } y_\infty = \alpha + (1-\alpha) \frac{\pi_k^{out}}{\pi_{ko}^{in}} = \alpha + (1-\alpha)\chi, \quad (3)$$

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

У результаті визначення об'єму клітин або СФ за $t \gg \tau_w$ у серії розчинів непроникальної речовини з концентрацією, яка зростає, отримали залежність асимптотичного відносного об'єму від оберненого приведенного осмотичного тиску розчину. Експериментальні дані апроксимували рівнянням (3), яке описує зміну об'єму клітини/СФ у розчинах непроникальної речовини методом найменших квадратів. Значення осмотично неактивного об'єму отримували за перетином апроксимованої прямої з віссю ординат.

Поверхнево-об'ємне відношення ($\gamma_0 = S_0/V_0 = 6/D$, де D – діаметр клітини або СФ) визначали перед додаванням кріопротектора за температур 5, 15 та 25°C.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми «Statgraphics» («Manugistics Inc.», США) за непараметрич-

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

where τ_w is the characteristic time of penetration of water molecules into cells; α – osmotically inactive cell volume; n_k^{out} – molar fraction of impermeable substance dissolved in the extracellular solution k; n_{ko}^{in} – initial value of the molar fraction of the substance dissolved in intracellular solution.

Under the condition $t \rightarrow \infty$ (i. e. $t \gg \tau_w$) the change in relative volume of the cell in impermeable

substance solution is equal to $\frac{dy}{dt} \rightarrow 0$, therefore,

we obtain the following equation:

$$\frac{1}{\tau_w} \left[\frac{(1-\alpha)}{(y-\alpha)} - \frac{n_k^{out}}{n_{ko}^{in}} \right] = 0,$$

$$(1-\alpha) = (y_\infty - \alpha) \frac{n_k^{out}}{n_{ko}^{in}} = (y_\infty - \alpha) \frac{\pi_k^{out}}{\pi_{ko}^{in}}, \quad (2)$$

$$\text{or } y_\infty = \alpha + (1-\alpha) \frac{\pi_k^{out}}{\pi_{ko}^{in}} = \alpha + (1-\alpha)\chi, \quad (3)$$

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

When determining the cell or spheroid volume by $t \gg \tau_w$ in a series of solutions of impermeable substance with increasing concentration, the dependence of the asymptotic relative volume on the reciprocal normalized osmotic pressure of the solution was found. The experimental data were approximated by equation (3), which describes the change in cell/spheroid volume in solutions of impermeable substance by the least squares method. The values of the osmotically inactive volume were obtained from the intersection of the approximate line with the y-axis.

The surface-to-volume ratio ($\gamma_0 = S_0/V_0 = 6/D$, where D is the cell or spheroid diameter) was determined before adding the cryoprotectant at temperatures of 5, 15 and 25°C.

The results were statistically processed using the 'Statgraphics' software (Manugistics Inc., USA) by non-parametric Mann-Whitney test. Experimental data are presented as the arithmetic mean \pm standard deviation. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

Results and discussion

Permeability parameters were determined in spheroids with a diameter of 80–100 μm , as on day 10 of cultivation the number of multicellular structures with this size was 70%. Numerical values of osmotically inactive volume α and surface-



ним критерієм Манна-Вітні. Експериментальні дані приведені як середнє арифметичне \pm середнє квадратичне відхилення. Значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Визначення параметрів проникності здійснювали на СФ із діаметром 80–100 мкм, оскільки на 10-у добу культивування кількість багатоклітинних об'єктів із таким розміром складала 70%. Для розрахунку коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин лінії L929 та СФ із них за даними волюмометрії з використанням фізико-математичного моделювання процесів масопереносу було визначено числові значення осмотично неактивного об'єму α та поверхнево-об'ємного відношення γ . Залежність відносного об'єму клітин/СФ від оберненого приведенного осмотичного тиску у розчинах непроникальної речовини (NaCl) представлено на рис. 1. Згідно з графіками осмотично неактивний об'єм клітин лінії L929 ($\alpha_{кл}$) становить 0,32. Для СФ після культивування протягом 10 діб показник $\alpha_{сф}$ дорівнював 0,41. Відомо, що формування СФ відбувається на основі міжклітинної адгезії, яка призводить до підвищення експресії її білків (кадгерину, конексину та панексину) і ущільнення клітин у складі СФ протягом культивування [6], наслідком чого, зокрема, може бути збільшення осмотично неактивного об'єму.

Поверхнево-об'ємне відношення (γ_0) для СФ із діаметром 80 мкм становить $0,75 \times 10^5 \text{ м}^{-1}$. Середні значення γ_0 з вимірювання діаметрів 50–75 клітин L929 за температур 25, 15 та 5°C складають $(4,64 \pm 0,01) \times 10^5$; $(4,51 \pm 0,07) \times 10^5$ та $(4,39 \pm 0,06) \times 10^5 \text{ м}^{-1}$ відповідно.

З отриманих значень поверхнево-об'ємного відношення для клітин лінії L929 за різних температур можна легко розрахувати значення коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани клітин [3]. Згідно з визначенням $\Delta S = \beta S_0 \Delta T$ отримуємо $\beta = \Delta S / \Delta T S_0$ або $\beta = (\gamma - \gamma_0) / \Delta T \gamma_0$. З цими значеннями для поверхнево-об'ємного відношення γ для коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани клітин лінії L929 маємо величину $\beta_{ep} = 2,7 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$. Ця величина є трохи більшою за значення коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита $\beta_{ep} = 2,4 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$, отриманого в роботі О.І. Гордієнко [3]. На величину коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани можуть впливати ліпідний і білковий склад мембрани, а також зовнішні чинники. Ця характеристика може бути використана для моніторингу стану мембран

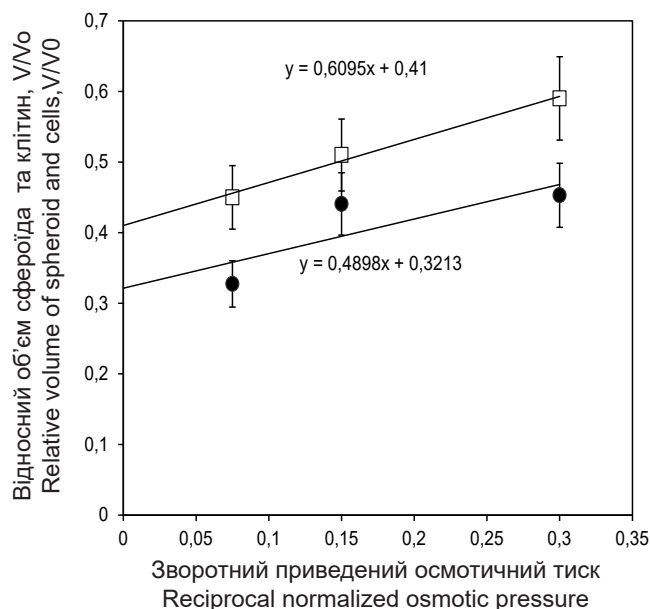


Рис. 1. Зміна відносного об'єму клітин L929 (●) та сфероїдів (□) залежно від зворотного приведенного осмотичного тиску розчину.

Fig. 1. Change in relative volume of L929 cells (●) and spheroids (□) depending on reciprocal normalized osmotic pressure of solution.

volume ratio γ were determined to calculate the permeability coefficients of plasma membranes of L929 and spheroid cells from them according to volumetric data using physico-mathematical modeling of mass transfer processes. The dependence of the relative volume of cells/spheroids on the reciprocal normalized osmotic pressure in solutions of impermeable substance (NaCl) is presented in Fig. 1. According to the graphs, the osmotically inactive volume of L929 cells is $\alpha_{cl} = 0.32$. For spheroids after cultivation for 10 days, this value was equal to $\alpha_{sf} = 0.41$. It is known that the spheroids are formed by means of intercellular adhesion, that leads to an increased expression of its proteins (cadherin, connexin and panexin) and compaction of cells in the composition of spheroids during cultivation [2], which may result in increased osmotically inactive volume.

The surface-volume ratio for spheroids with a diameter of 80 μm is $0 = 0.75 \times 10^5 \text{ м}^{-1}$. The average values of γ_0 from the measurement of the diameters of 50–75 L929 cells at temperatures of 25, 15 and 5°C are $(4.64 \pm 0.01) \times 10^5$; $(4.51 \pm 0.07) \times 10^5$ and $(4.39 \pm 0.06) \times 10^5 \text{ м}^{-1}$, respectively. From the obtained values of the surface-volume ratio for L929 cells at different temperatures, it is easy to calculate the value of the coefficient of thermal expansion of the surface area of the cell membrane [6]. By definition $\Delta S = \beta S_0 \Delta T$, we obtain $\beta = \Delta S / \Delta T S_0$ or $\beta = (\gamma - \gamma_0) / \Delta T \gamma_0$. With these values for the surface-volume ratio γ for



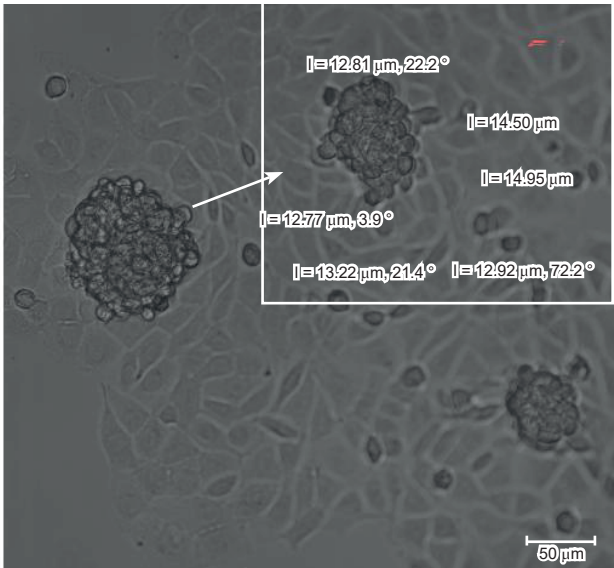


Рис. 2. Оцінка діаметрів клітин зовнішнього і внутрішнього шарів сфероїда ($Z = 30 \mu\text{m}$) під час еквілібрації в 1М ДМСО при 15°C .

Fig. 2. Estimation of cell diameters of spheroid outer and inner layers ($Z = 30 \mu\text{m}$) during equilibration in 1M DMSO at 15°C .

клітин за різних умов і строків культивування.

Зміни у часі об'єму клітин і СФ під час еквілібрації у 1М ДМСО визначали за допомогою морфометричного аналізу мікрознімків. Для визна-

the coefficient of thermal expansion of the surface area of the cell membrane of the L929 line, we have the value $\beta_{er} = 2.7 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$. This value is slightly larger than the value of the coefficient of thermal expansion of the surface area of the erythrocyte membrane $\beta_{er} = 2.4 \times 10^{-3}/^\circ\text{C}$, published by O.I. Gordienko [6]. The coefficient of thermal expansion of the membrane surface area can be influenced by its lipid and protein composition, as well as external factors. This characteristic can be used to monitor the state of cell membranes under different conditions and terms of cultivation.

Changes in cell and spheroid volume over time during equilibration in 1M DMSO were determined by morphometric analysis of micrographs. Z-scanning of spheroids with a step of $4.2 \mu\text{m}$ was used to determine the volume of cells in different layers of spheroids (Fig. 2). The change in the volume of spheroids *in toto* in 1M DMSO is presented in Fig. 3. Graphs of change in time of the relative volume of spheroids, individual and located in the outer and inner layers of spheroid L929 cells, are presented in Fig. 4. The table shows the calculated filtration (L_p) and permeability (k_p) coefficients for DMSO molecules of plasma membranes of individual L929 cells and those in spheroid outer and inner layers, as well as the effective values of these parameters for spheroids

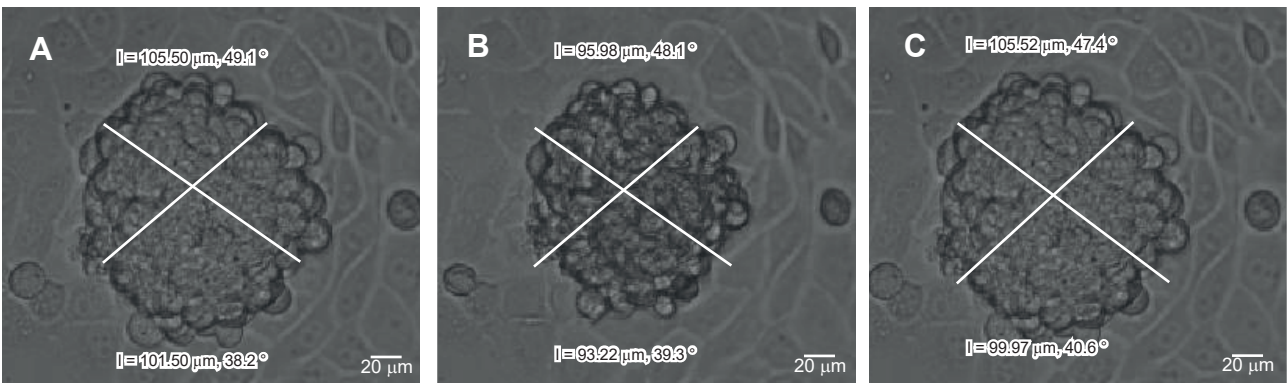


Рис. 3. Динаміка зміни об'єму сфероїда під час еквілібрації в 1М ДМСО за температури 15°C : експозиція 0 с (А), 75 с (В), 300 с (С).

Fig. 3. Dynamics of spheroid volume change during equilibration in 1M DMSO at 15°C : exposure 0 s (A), 75 s (B), 300 s (C).

чення об'єму клітин у різних шарах СФ використовували Z-сканування сфероїдів із кроком $4,2 \mu\text{m}$ (рис. 2). Зміну об'єму СФ *in toto* в 1М ДМСО представлено на рис. 3. Графіки зміни у часі відносного об'єму СФ, поодиноких та розташованих у зовнішньому і внутрішньому шарах СФ клітин L929, представлено на рис. 4. У таблиці подано розраховані коефіцієнти фільтрації (L_p) і проникності (k_p) для молекул ДМСО плазматичних мембран поодиноких клітин лінії

in toto. As the table shows, the filtration and permeability coefficients decrease significantly ($p < 0.05$) with increasing depth of location in the spheroids, which is consistent with the published data [12]. It is known that during the formation of spheroids there are three cell layers (peripheral, middle and inner), which are determined in this way through the diffusion of nutrients and oxygen into the cells depending on their location depth in the spheroids. It has been proven that with increasing

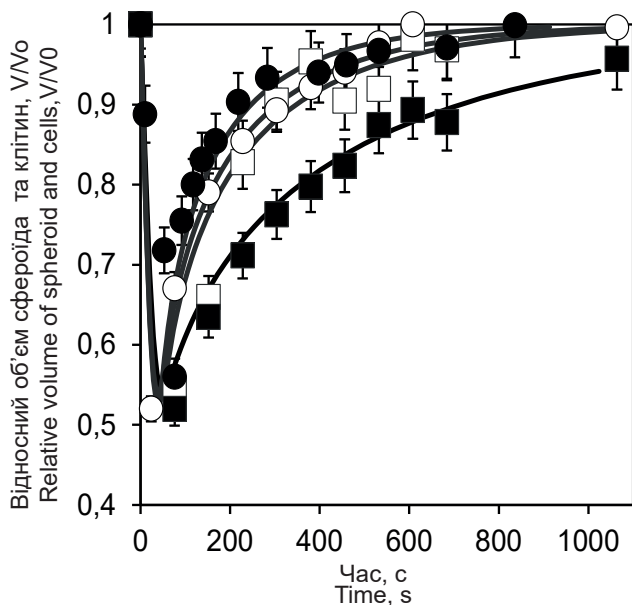


Рис. 4. Зміна відносного об'єму сфероїдів (●), окремих клітин L929 (■), клітин у зовнішньому (○) та внутрішньому шарах сфероїда (□) в 1M DMSO на фізіологічному розчині.

Fig. 4. Change in relative volume of spheroids (●), individual L929 cells (■), cells in outer (○) and inner layers of spheroid (□) in 1M DMSO in saline.

L929 та клітин у зовнішньому і внутрішньому шарах СФ, а також ефективні значення цих параметрів для СФ *in toto*. Як видно з таблиці, коефіцієнти фільтрації та проникності значуще ($p < 0,05$) зменшуються зі збільшенням глибини розташування у СФ, що узгоджується з даними літератури [13]. Відомо, що під час формування СФ виділяють три клітинні шари (периферичний, середній і внутрішній), які визначаються таким чином через дифузію поживних речовин і кисню в клітини залежно від глибини їхнього розташування в СФ. Доведено, що при збільшенні глибини розташування у СФ контакти клітин ущільнюються, а дифузія поживних речовин зменшується [13]. Отже, менші розраховані значення коефіцієнтів проникності для клітин у внутрішніх шарах СФ можуть бути наслідком зменшення доступної поверхні клітин для проникання позаклітинних речовин. Такий результат, очевидно, пов'язаний із міжклітинними взаємодіями, які суттєво відрізняються для клітин у складі СФ. Утворення міжклітинних взаємодій забезпечується синтезом міжклітинного матриксу, що може суттєво впливати на дифузію молекул води і ДМСО у СФ. Також необхідно враховувати,

depth of location in spheroid the cell contacts are compacted, and nutrient diffusion decreases [12]. Therefore, the lower calculated values of the permeability coefficients for cells in the inner layers of the spheroids may be due to the reduction of the available cell surface for the penetration of extracellular substances. This result is apparently related to cell-to-cell interactions, which differ significantly for cells in the spheroids. The formation of intercellular interactions is ensured by the synthesis of the intercellular matrix, which can significantly affect the diffusion of water molecules and DMSO in spheroids. It should also be borne in mind that the effective values of spheroid permeability coefficients for water molecules and cryoprotectants are determined, in particular, by a much smaller surface-volume ratio compared to cells.

Based on the findings on permeability coefficients, the exposure time of spheroid and individual cells in a cryoprotective medium at a temperature of 15°C was determined. Thus, the dynamic curves of the osmotic behavior of spheroids (10 days of cultivation) with a diameter of 80 μm indicate that 90% of the saturation of the cryoprotectant at exposure to 1M DMSO solution at 15°C occurs within (241 ± 30.0) s (Fig. 4). The obtained permeability characteristics of single L929 and spheroid cells can be used to develop optimal cryopreservation regimens of these objects, in particular to determine the optimal cooling rate during freezing and time parameters of spheroid equilibration procedure in cryopreservation medium under different

Коефіцієнти фільтрації та проникності для поодиноких клітин L929 та у складі сфероїдів, а також сфероїдів *in toto* за температури 15°C

Filtration and permeability coefficients for single L929 cells and in spheroids as well as *in toto* spheroids at 15°C

Об'єкт Structure	Коефіцієнт Coefficient	
	фільтрації $L_p \times 10^{14}, \text{ м}^3/\text{Н с}$ filtration $L_p \times 10^{14}, \text{ м}^3/\text{Н s}$	проникності $k_p \times 10^8, \text{ м/с}$ permeability $k_p \times 10^8, \text{ м/s}$
Поодинокі клітини L929 L929 single cells	$2,32 \pm 0,28$	$6,47 \pm 0,28$
Зовнішній шар СФ Spheroid outer layer	$1,38 \pm 0,26^*$	$5,44 \pm 0,22$
Внутрішній шар СФ Spheroid inter layer	$1,21 \pm 0,22^*$	$1,71 \pm 0,14^{**}$
Сфероїд Spheroid	$5,64 \pm 0,35$	$33,3 \pm 0,14$

Примітка: різниця значуща порівняно з поодинокими клітинами (*) та клітинами у зовнішньому шарі (#), $p < 0,05$.

Note: differences are significant compared to single L929 cells (*) and the ones in the outer layer (#), $p < 0.05$.



що ефективні значення коефіцієнтів проникності СФ для молекул води і кріопротектора визначаються, зокрема, значно меншим поверхнево-об'ємним відношенням порівняно з клітинами.

На основі отриманих даних щодо коефіцієнтів проникності було визначено час експозиції СФ і поодиноких клітин у кріозахисному середовищі за температури 15°C. Так, динамічні криві осмотичної поведінки СФ (10 діб культивування) з діаметром 80 мкм свідчать про те, що 90% насичення кріопротектором за експозиції в 1М розчині ДМСО при 15°C відбувається протягом (241 ± 30,0) с (рис. 4).

Отримані характеристики проникності поодиноких клітин лінії L929 та СФ із них можуть бути використані для розроблення оптимальних режимів кріоконсервування цих об'єктів, зокрема визначення оптимальної швидкості охолодження під час заморожування і часових параметрів процедури еквілібрації СФ у середовищі кріоконсервування за різних умов культивування. Для з'ясування механізмів проникності клітин у складі СФ для молекул води і ДМСО залежно від глибини їхнього розташування порівняно з ізольованими клітинами необхідно проводити подальші дослідження.

Висновки

У проведених дослідженнях визначено параметри поодиноких клітин лінії L929, клітин, розташованих у зовнішньому та внутрішньому шарах сфероїдів, та сфероїдах *in toto*, необхідні для оцінки часу експозиції в кріопротекторному розчині та оптимальних швидкостей охолодження цих об'єктів під час кріоконсервування.

1. Отримано значення поверхнево-об'ємного відношення для поодиноких клітин лінії L929 за різних температур і розраховано коефіцієнт теплового розширення площі поверхні мембрани клітин $\beta = 2,7 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$. Ця характеристика може бути використана для моніторингу стану мембран клітин за різних умов і строків культивування.

2. Визначено осмотично неактивний об'єм клітин лінії L929 $\alpha_{\text{кл}}$ та сфероїдів $\alpha_{\text{сф}}$, який становить 0,32 та 0,41 відповідно.

3. З динамічних кривих зміни відносного об'єму знайдено коефіцієнти фільтрації та коефіцієнти проникності для ДМСО поодиноких клітин лінії L929 та у складі сфероїдів. Указані характеристики клітин є найбільшими для поодиноких клітин і значуще ($p < 0,05$) зменшуються зі збільшенням глибини розташування у сфероїдах, що може бути наслідком зменшення доступної поверхні клітин у сфероїдах для проникання позаклітинних речовин.

culture conditions. Further research is needed to elucidate the mechanisms of cell permeability in the spheroid composition to water molecules and DMSO, depending on the depth of their location relative to isolated cells.

Conclusions

In this research we determined the parameters of individual L929 cells, spheroids *in toto*, the ones located in their outer and inner layers, needed to estimate the exposure time in cryoprotective solution and the optimal cooling rates of these objects during cryopreservation.

1. The values of the surface-volume ratio for single L929 cells at different temperatures were obtained and the coefficient of thermal expansion of the cell membrane surface area $\beta = 2.7 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$ was calculated. This characteristic can be used to monitor the state of cell membranes under different conditions and terms of cultivation.

2. The osmotically inactive volume of L929 cells and their spheroids, which are $\alpha_{\text{cl}} = 0.32$ and $\alpha_{\text{cf}} = 0.41$, was determined.

3. The filtration and permeability coefficients to DMSO of individual L929 cells and as a part of spheroids have been found from dynamic curves of relative volume change. These cell parameters are the highest for individual cells and significantly ($p < 0.05$) decrease with increasing depth of location in spheroids, which may be due to a decrease in the available cell surface in spheroids for the penetration of extracellular substances.

4. Effective filtration coefficients $(5.64 \pm 0.35) \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N s}$ and permeability coefficients for DMSO molecules $(33.3 \pm 0.14) \times 10^{-8} \text{ m/s}$ for *in toto* spheroids were determined.

References

1. Abu-Absi SF, Friend JR, Hansen LK, HuW-S. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res.* 2002; 274: 56–67.
2. 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.
3. Akiyama M, Nonomura H, Kamil SH, Ignatz RA. Periosteal cell pellet culture system: a new technique for bone engineering. *Cell Transplant.* 2006; 15: 521–32.
4. Arai K, Murata D, Takao S, et al. Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs. *PLoS ONE* [Internet]. 2020 Apr 02 [cited 2021 May 15]; 15(4):e0230428. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0230428>
5. Frese KK; Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 645–58.



4. Визначено ефективні коефіцієнти фільтрації $(5,64 \pm 0,35) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}$ та коефіцієнти проникності для молекул ДМСО $(33,3 \pm 0,14) \times 10^{-8} \text{ м/с}$ для сфероїдів *in toto*.

Література

1. Гордієнко ЄО, Гордієнко ОІ, Марущенко ВВ, Сакун ОВ. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини. Біофізичний вісник. 2008; 21 (2): 75–80.
2. Гордієнко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наукова думка; 1994. 140 с.
3. Гордієнко ОІ. Оцінка коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів за зсувом кривої розподілу еритроцитів за індексом сферичності. Біофізичний вісник. 2003; 13 (2): 78–81.
4. Огурцова ВВ, Коваленко СЄ, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ. Визначення осмотично неактивного об'єму еритроцитів миші. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2016; 26(1): 93–7.
5. Abu-Absi SF, Friend JR, Hansen LK, Hu W-S. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. Exp Cell Res. 2002; 274: 56–67.
6. 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.
7. Akiyama M, Nonomura H, Kamil SH, Ignatz RA. Periosteal cell pellet culture system: a new technique for bone engineering. Cell Transplant. 2006; 15: 521–32.
8. Arai K, Murata D, Takao S, et al. Cryopreservation method for spheroids and fabrication of scaffold-free tubular constructs. PLoS ONE [Internet]. 2020 Apr 02 [cited 2021 May 15]; 15(4): e0230428. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0230428>
9. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. Nat Rev Cancer. 2007; 7: 645–58.
10. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7: 211–24.
11. Holtfreter J. A study of the mechanisms of gastrulation. J Exp Zool. 1944; 95: 171–212.
12. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnol Bioeng. 2003; 83: 173–80.
13. Kosheleva NV, Efremov YM, Shavkuta BS. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. Sci Rep [Internet]. 2020 Jul 28 [cited 2021 May 15]; 10:12614. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-69540-8>
14. Kunz-Schughart LA, Schroeder JA, Wondrak M, et al. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells *in vitro*. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 290(5): 1385–98.
15. Langhans SA. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. Front Pharmacol [Internet]. 2018 Jan 23 [cited 2021 May 15]; 9:6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00006/full>.
16. Lee JH, Jung DH, Lee DH, et al. Effect of spheroid aggregation on susceptibility of primary pig hepatocytes to cryopreservation. Transplant Proc. 2012; 44: 1015–7.
17. Gordiyenko OI. [Estimation of the thermal expansion coefficient of erythrocyte membrane surface by shift of erythrocyte distribution curve by spherical index]. Biophysical Bulletin. 2003; 13 (2): 78–81. Ukrainian.
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. Ukrainian.
19. Gordiyenko YeO, Pushkar NS. [Physical basis for low temperature preservation of cell suspensions]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 140 p. Russian.
20. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7: 211–24.
21. Holtfreter J. A study of the mechanisms of gastrulation. J Exp Zool. 1944; 95: 171–212.
22. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, et al. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnol Bioeng. 2003; 83: 173–80.
23. Kosheleva NV, Efremov YM, Shavkuta BS. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. Sci Rep [Internet]. 2020 Jul 28 [cited 2021 May 15]; 10:12614. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-69540-8>
24. Kunz-Schughart LA, Schroeder JA, Wondrak M, et al. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells *in vitro*. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 290(5): 1385–98.
25. Langhans SA. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. Front Pharmacol [Internet]. 2018 Jan 23 [cited 2021 May 15]; 9:6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00006/full>.
26. Lee JH, Jung DH, Lee DH, et al. Effect of spheroid aggregation on susceptibility of primary pig hepatocytes to cryopreservation. Transplant Proc. 2012; 44: 1015–7.
27. Lin R-Z, Chang H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnology J. 2008; 3: 1172–84.
28. Matta SG, Wobken JD, Williams FG, Bauer GE. Pancreatic islet cell reaggregation systems: Efficiency of cell reassociation and endocrine cell topography of rat islet-like aggregates. Pancreas 1994; 9: 439–49.
29. Moscona A, Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. J Anat. 1952; 86: 287–301.
30. Nyberg SL, Hardin J, Amiot B, et al. Rapid large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. Liver Transpl. 2005; 11: 901–10.
31. Ogurtsova VV, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, Gordiyenko OI. Determination of osmotically inactive volume of murine enterocytes. Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(1): 93–7.
32. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8: 839–45.
33. Pinto B, Henriques AC, Silva PM, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as *in vitro* preclinical models for cancer research. Pharmaceuticals [Internet]. 2020 Dec 6 [cited 2021 May 15]; 12(12):1186. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0383-5>
34. Ryu N-E, Lee S-H, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. Cells [Internet]. 2019 Dec 12 [cited 2021 May 15]; 8:1620. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6953111/>
35. Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y, et al. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell



17. Lin R-Z, Chang H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology J*. 2008; 3: 1172–84.
18. Matta SG, Wobken JD, Williams FG, Bauer G.E. Pancreatic islet cell reaggregation systems: Efficiency of cell reassociation and endocrine cell topography of rat islet-like aggregates. *Pancreas*. 1994; 9: 439–49.
19. Moscona A, Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J Anat*. 1952; 86: 287–301.
20. Nyberg SL, Hardin J, Amiot B, et al. Rapid large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. *Liver Transpl*. 2005; 11: 901–10.
21. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 839–45.
22. Pinto B, Henriques AC, Silva PM, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as *in vitro* preclinical models for cancer research. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Dec 6 [cited 2021 May 15]; 12(12):1186. Available from: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0383-5>
23. Ryu N-E, Lee S-H, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells* [Internet]. 2019 Dec 12 [cited 2021 May 15]; 8:1620. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6953111/>
24. Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y, et al. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2015 Oct 08 [cited 2021 May 15]; 26:254. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10856-015-5591-3>
25. Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, et al. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnol* [Internet]. 2014 Dec 06 [cited 2021 May 15]; 14:105. Available from: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-014-0105-9>

