



<https://doi.org/10.15407/cryo35.02.076>

УДК 601.2:611.018.82.088.5:57.086.13

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

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

* an_sukach@ukr.net

Теоретичне визначення біофізичних параметрів тривимірних структур нейральних клітин з метою оптимізації їх кріоконсервування

У роботі з використанням фізико-математичного моделювання процесів масопереносу води і ДМСО визначено величини відносного осмотично неактивного об'єму для агрегатів і сфероїдів нейральних клітин новонароджених щурів. Досліджувані параметри для агрегатів і сфероїдів складають 0,689 і 0,644 відповідно. Також у роботі представлені теоретично розраховані зміни у часі приведення осмотичного тиску ДМСО та концентрації іонів солей всередині агрегатів і сфероїдів. З динамічних кривих зміни відносного об'єму для агрегатів та сфероїдів визначено коефіцієнти фільтрації для води та проникності для ДМСО. Виявлено, що агрегати, які є менш щільно упакованими структурами порівняно зі сфероїдами, мають більші коефіцієнти проникності для води і ДМСО, що особливо проявляється при 5 °С. За цієї температури для 95%-вого насичення кріопротектором клітин під час інкубації агрегатів у 10%-вому розчині ДМСО необхідно 119 с, сфероїдів — 157 с. Тобто при температурі 5 °С тривалість еквілібрації з кріопротектором ДМСО для сфероїдів є на 25 % більшою, ніж для агрегатів. Отримані дані вказують на те, що сфероїди, які є більш цілісними структурами зі щільними зв'язками клітин з матриксом та клітин між собою, більш осмотично активні порівняно з агрегатами. Результати проведеного дослідження можуть бути використані для розробки оптимальних режимів кріоконсервування агрегатів та сфероїдів нейральних клітин.

Ключові слова: нейральні клітини, сфероїди, агрегати, культивування, коефіцієнти фільтрації, коефіцієнти проникності, диметилсульфоксид, осмотично неактивний об'єм.

Попри значні зусилля вчених у вивченні роботи мозку, як здорового, так і хворого, наші знання у цій сфері залишаються обмеженими. Це пояснюється складністю будови та функціонування нервової системи ссавців, а також обмеженим доступом безпосередньо до тканини мозку [4]. З огляду на це тривимірні культури нейральних клітин (НК), які є спрощеною і доступною моделлю мозку, відкривають нові можливості для подальшого вивчення фізіології мозку живих організмів.

Тривимірні культуральні системи (3D) на відміну від двовимірних (2D), дозволяють відтворити складне мікросередовище, що оточує НК, в тому числі міжклітинний матрикс та міжклітинні взаємодії [6].

Широке використання тривимірних структур НК у дослідницькій практиці обмежується відсутністю ефективних протоколів їх кріоконсервування. Створення низькотемпературних банків стандартизованих тривимірних структур НК здатне розширити можливості їх

Цитування: Сукач ОМ, Коваленко ІФ, Всеволодська СВ, Оченашко ОВ, Коваленко СЄ. Теоретичне визначення біофізичних параметрів тривимірних структур нейральних клітин з метою оптимізації їх кріоконсервування. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(2): 78–86. <https://doi.org/10.15407/cryo35.02.076>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

використання в медико-біологічних та фармакологічних дослідженнях, а також буде сприяти зменшенню кількості експериментальних досліджень з використанням лабораторних тварин [5].

Слід зазначити, що тривимірність даних структур ускладнює процес їх кріоконсервування, порівняно з суспензіями поодиноких клітин, вводить додаткові фактори, які слід враховувати під час розробки відповідних протоколів кріоконсервування, включаючи швидкість насичення клітин кріопротектором, рівномірність їх охолодження та однорідність формування кристалів.

Для успішного кріоконсервування клітинної суспензії фіксація змін відносного об'єму НК у часі в процесі їх інкубації у кріозахищеному розчині з використанням фізико-математичної моделі, що описує процеси масопереносу, дозволяє визначити оптимальний час експозиції НК з кріопротектором та оптимальну швидкість їх охолодження [8]. Такий же підхід можна застосовувати і для визначення часу експозиції з кріопротектором та оптимальної швидкості охолодження клітин у складі тривимірних структур. При цьому інтегральні характеристики, що визначають часові параметри масообміну між тривимірними структурами і середовищем, можна розглядати як аналоги коефіцієнтів проникності мембран окремих клітин.

Нейральні клітини здатні формувати різні типи тривимірних структур: нейросфери, агрегати (АГ) та сфероїди (СФ), які дещо відрізняються за своїми морфологічними та фізіологічними характеристиками. Нейросфери формуються нейральними стовбуровими клітинами в процесі їх культивування [10], агрегати — за рахунок самозбирання гетерогенної суспензії свіжеотриманих НК під час їх короткострокового культивування [11, 12]. Поведінка в культурі щільних агрегатів подібна до поведінки нейросфер [12]. Формування СФ відбувається в умовах культивування прекультивованих НК на неадгезивних поверхнях або у краплі (також у процесі самозбирання) [7]. Морфологічно ці структури схожі, але за способом формування, клітинним складом і, можливо, за вмістом позаклітинного матриксу вони відрізняються. Отже, умови насичення цих тривимірних структур кріопротектором та швидкості їх заморожування, скоріше за все,

будуть відрізнятися. Для розробки ефективних протоколів кріоконсервування різних типів тривимірних структур НК доцільно визначити їх біофізичні параметри, зокрема коефіцієнти фільтрації для води та проникності для ДМСО.

Мета роботи — визначення на основі фізико-математичного моделювання осмотичної активності агрегатів і сфероїдів їх коефіцієнтів фільтрації для води та проникності для ДМСО, а також оптимального часу, необхідного для насичення їх клітин ДМСО.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі використовували суспензію, агрегати і сфероїди НК новонароджених щурів.

Нейральні клітини отримували з тканини головного мозку новонароджених щурів ферментативно-механічним методом. Для цього тканину головного мозку вилучали, промивали стерильним фізіологічним розчином, інкубували 2 хв при 37 °С в 0,25%-вому розчині трипсину (Biowest, Франція), переносили в середовище DMEM/F12 (Biowest, Франція), збагачене 10 % сироватки, і механічно дезагрегували на поодинокі клітини вібрацією [9]. Отриману суспензію клітин фільтрували, після чого відмивали від трипсину центрифугуванням при 100 g. Отриманий осад клітин суспендували в середовищі DMEM/F12, збагаченому 10 % сироватки крові. Життєздатність клітин оцінювали по фарбуванню 0,4%-вим трипановим синім (Sigma, США). Підрахунок кількості клітин проводили в камері Горяєва.

У роботі використовували первинні суспензії НК з життєздатністю вище 70 %. Моношарове та тривимірне культивування проводили в CO₂-інкубаторі при 37 °С в атмосфері 5 % CO₂, 95 % повітря в середовищі DMEM/F12 (Biowest), збагаченому 10% сироватки крові.

Для отримання АГ первинну суспензію НК висівали в концентрації 4×10^6 клітин/мл в 24-лунковий планшет (ТРР, Швейцарія) та культивували протягом 1—3 год [11]. Частину утворених АГ у мінімальному об'ємі пересівали та культивували в тому ж середовищі до формування 70 % моношару. Нейральні клітини моношару знімали розчином трипсину (0,25 %)/версен (0,05 %) (Biowest), промивали центрифугуванням, ресуспендували в середовищі культивування та використовували в подальших експериментах для отримання СФ.

Сфероїди НК отримували методом висячої краплі. Для цього на внутрішню поверхню кришки чашки Петрі діаметром 10 см (SPL Life Sciences, Південна Корея) наносили краплі суспензії прекультивованих НК. Далі цією кришкою накривали нижню частину чашки, яка містила стерильний фізіологічний розчин, для підтримання оптимальної вологості під час подальшого культивування. Об'єм крапель складав 20 мкл. Кожна крапля містила 8×10^3 клітин. Чашки Петрі з краплями культивували в CO_2 -інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO_2 , 95% повітря протягом 3–4 діб. Життєздатність НК у складі СФ оцінювали в процесі їх подальшого культивування на адгезивній поверхні 24-лункових планшетів.

Визначення інтегральних коефіцієнтів проникності (K_s) СФ і АГ для проникного кріопротектора ДМСО та для молекул води (L_p) проводили з використанням волюмометричного методу [1, 2]. Об'єми СФ і АГ до (V_0) та після (V) додавання розчинів визначали за формулою:

$$V = 1/6 \rho D^3,$$

де D — діаметри СФ і АГ.

Об'єм СФ і АГ визначали з використанням мікроскопа «Axio Observer Z1» (Carl Zeiss, Німеччина), обладнаного термостатованим предметним столиком.

Морфометричний аналіз здійснювали за допомогою сертифікованої програми «AxioVision Rel. 4.8» (Carl Zeiss).

Осмотично неактивний об'єм СФ і АГ визначали за методом, описаним у роботі В.В. Огурцової та співавт. [3]. Для цього виявляли залежність їх відносного об'єму від оберненого приведенного осмотичного тиску у розчинах хлориду натрію в концентраціях 0,5; 1; 2,0 моль/л.

З урахуванням об'єму СФ і АГ у серії розчинів непроникної речовини зі зростаючою концентрацією знаходили залежність асимптотичного відносного об'єму від оберненого приведенного осмотичного тиску розчину. Експериментальні дані апроксимували методом найменших квадратів. Значення осмотично неактивного об'єму отримували за перетином апроксимованої прямої з віссю ординат.

Числові значення інтегральних коефіцієнтів фільтрації та проникності ДМСО у СФ і АГ визначали шляхом апроксимації експериментальних даних зміни їх відносного об'єму від трива-

лості експозиції в досліджуваних розчинах теоретичними кривими, розрахованими на підставі фізико-математичної моделі пасивного транспорту води і проникних речовин Кедем-Качальського за умови їх максимального збігу [1, 2].

У безрозмірних величинах класична модель Кедем-Качальського має такий вигляд:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_0} \left[\sigma_1 (\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \frac{1-\alpha}{y-\alpha} - 1 \right], & (1) \\ \frac{d\hat{\pi}_1^{in}}{dt} = \frac{1}{\tau_1} \left[(\hat{\pi}_1^{in} - \hat{\pi}_1^{out}) + \sigma_1 \hat{\pi}_1^{in} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y-\alpha}, & (2) \\ \hat{\pi}_2^{in} = \hat{\pi}_2^{in}(0) \left(\frac{1-\alpha}{y-\alpha} \right), & (3) \end{cases}$$

де $y = \frac{V}{V_0}$ (V і V_0 — поточний і початковий об'єми СФ та АГ відповідно); $\tau_0 = \frac{1}{7,8 L_p y_0}$ (7,8 —

коефіцієнт осмотичного тиску ізотонічного розчину в атмосферах, L_p — інтегральний коефіцієнт фільтрації СФ та АГ, y_0 — поверхнево-об'ємне відношення клітини, $y_0 = S_0/V_0$, S_0 — початкова площа поверхні клітинної мембрани); t — час; σ_1 — коефіцієнт відбиття плазматичної мембрани для проникної крізь мембрану речовини; $\hat{\pi}_{1,2}^{in, out} = \pi_{1,2}^{in, out} / \pi_0$ — приведені осмотичний тиск проникного (1) і непроникного (2) компонентів всередині та поза клітиною; π_1^{out} і π_1^{in} — осмотичний тиск проникної крізь плазматичну мембрану речовини поза та всередині клітини відповідно; π_2^{out} і π_2^{in} — сумарний осмотичний тиск непроникної крізь плазматичну мембрану речовини поза та всередині клітини відповідно; π_0 — початкове значення осмотичного тиску ізотонічного фізіологічного розчину; $\tau_1 = \frac{1}{K_s y_0}$ (де K_s — коефіцієнт проникності плазматичної мембрани для проникної крізь мембрану речовини); α — об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин.

Коефіцієнт відбиття клітинної мембрани (σ_1) в усіх розрахунках приймали рівним 0,95. Коефіцієнти проникності мембран клітин визначали розв'язуючи систему диференціальних рівнянь (1)–(3).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за непараметричним критерієм Манна-Уїтні, використовуючи програми «Statgraphics plus for Windows 2.1» (Manugistics Inc., США). Експериментальні дані приведені як середнє арифметичне \pm середнє квадратичне відхилення. Значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

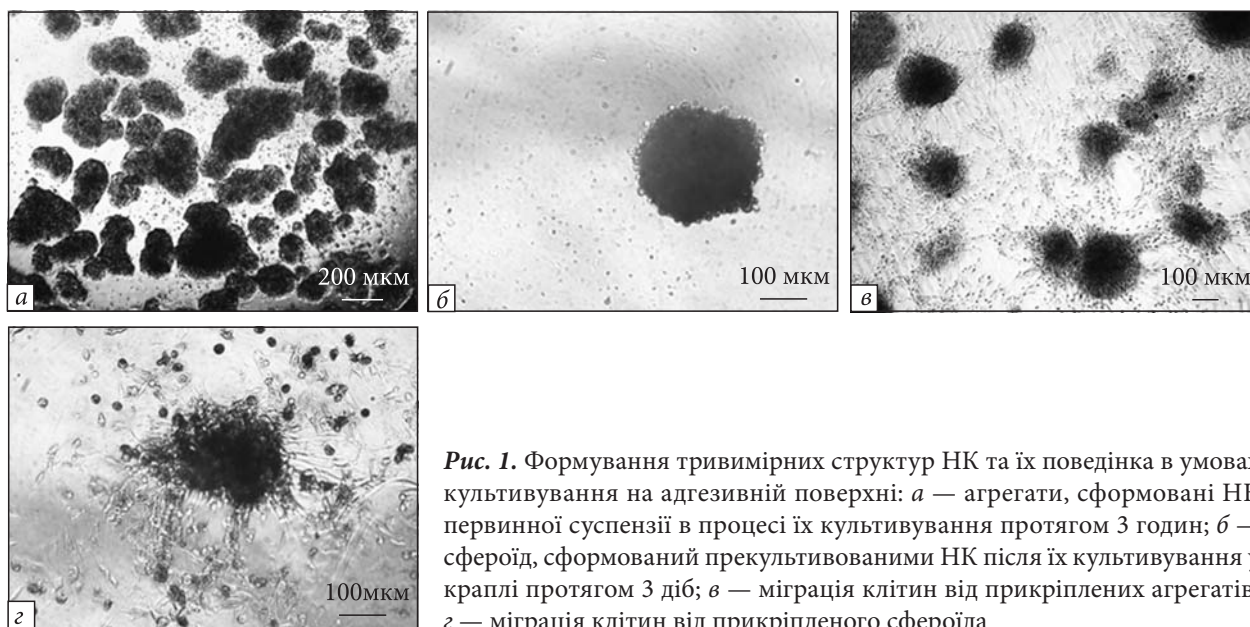


Рис. 1. Формування тривимірних структур НК та їх поведінка в умовах культивування на адгезивній поверхні: *a* — агрегати, сформовані НК первинної суспензії в процесі їх культивування протягом 3 годин; *б* — сфероїд, сформований прекультивованими НК після їх культивування у краплі протягом 3 діб; *в* — міграція клітин від прикріплених агрегатів; *г* — міграція клітин від прикріпленого сфероїда

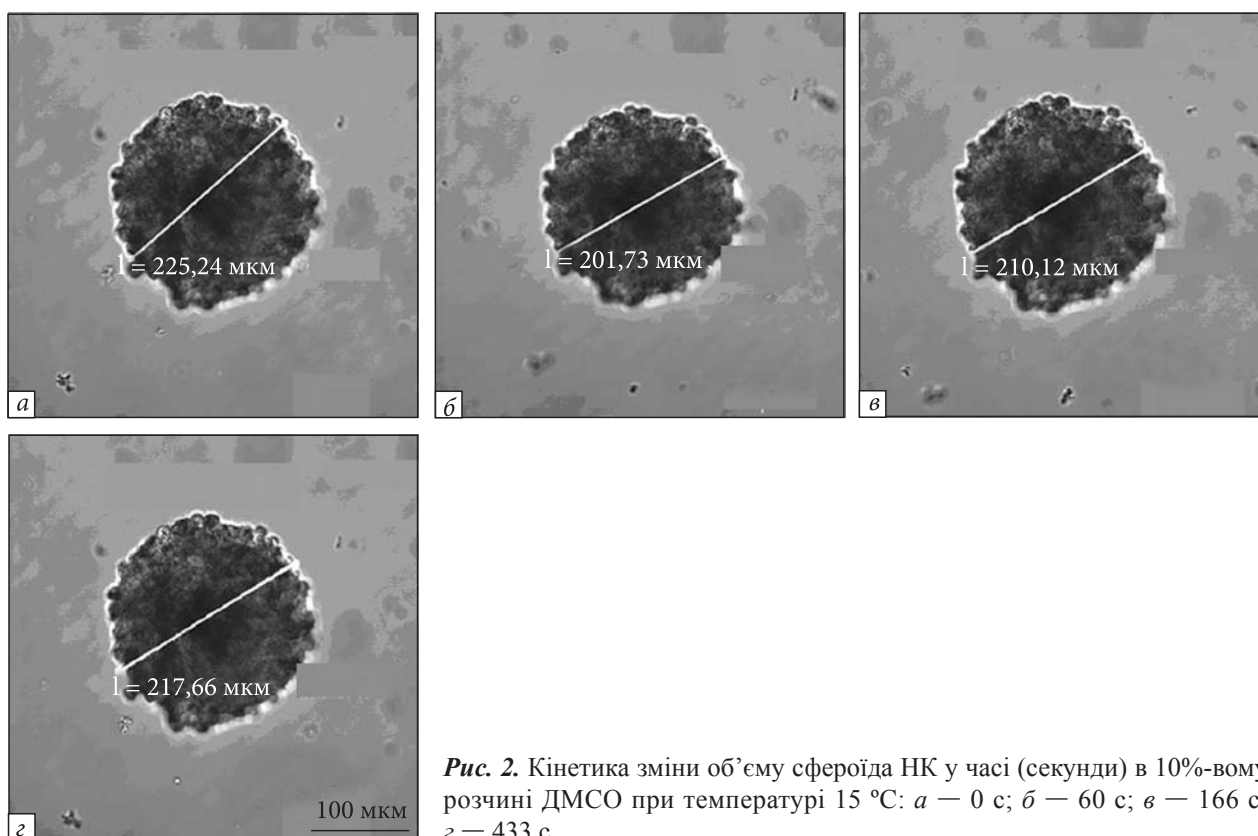


Рис. 2. Кінетика зміни об'єму сфероїда НК у часі (секунди) в 10%-вому розчині ДМСО при температурі 15 °С: *a* — 0 с; *б* — 60 с; *в* — 166 с; *г* — 433 с

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Параметри проникності визначали на тривимірних структурах НК — агрегатах (рис. 1, *a*) та сфероїдах (рис. 1, *б*), які склались з життєздатних клітин. На цей факт вказує їх прикріплення до підкладки в процесі культивування на адгезивній поверхні, після чого клі-

тини структур мігрують і розпластуються (рис. 1 *в, г*).

Визначення параметрів проникності проводили для СФ і АГ діаметром 200—300 мкм. Зміни у часі об'ємів СФ і АГ під час еквілібрації в 10%-вому ДМСО у фізіологічному розчині при температурах 5, 15, 25 та 3 °С визначали

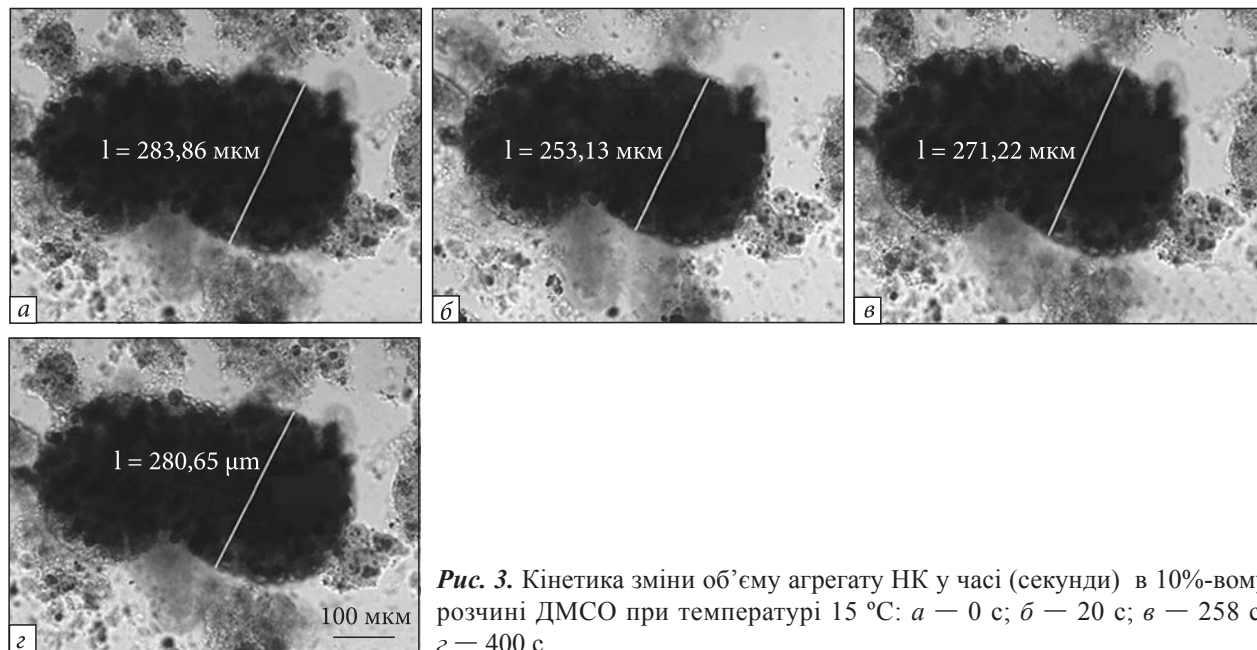


Рис. 3. Кінетика зміни об'єму агрегату НК у часі (секунди) в 10%-вому розчині ДМСО при температурі 15 °С: *а* — 0 с; *б* — 20 с; *в* — 258 с; *з* — 400 с

шляхом морфометричного аналізу мікрознімків (рис. 2, 3).

На основі даних, отриманих методом В.В. Огурцової та співавт. [3], був побудований графік зміни відносного об'єму СФ і АГ в залежності від зворотного приведенного осмотичного тиску розчину NaCl (рис. 4).

З графіку видно, що відносний осмотично неактивний об'єм (α) СФ і АГ відрізняється. Для СФ він складає 0,644, а для АГ — 0,689. Тобто реакція СФ і АГ на однакову гіпертонічну дію є неоднаковою, що може вказувати на різну об'ємну долю осмотично неактивної речовини всередині цих структур [2]. Причинами такої різниці також можуть бути походження і структура осмотично неактивної позаклітинної речовини (матриксу), клітинний склад, різна тривалість культивування АГ і СФ.

Агрегати є більш пухкими структурами порівняно з СФ. Як видно з рис. 1, а та 3, у складі АГ присутня досить велика кількість позаклітинної речовини, яка, очевидно, походить з вихідної тканини. Сфероїди, на відміну від АГ — структури з більш щільним пакуванням клітин (рис. 1, б, 2) і більш щільним міжклітинним матриксом, який є продуктом метаболізму клітин СФ. Він досить щільно пов'язаний з клітинами на відміну від позаклітинного ендогенного матриксу АГ, зв'язок якого з клітинами, скоріше за все, взагалі відсутній через короткий строк культивування. Отже, СФ — більш цілісна структура порівняно з АГ,

у яких клітини і позаклітинний матрикс не є єдиною структурою, і тому вони реагують на осмотичні зміни окремо одна від одної. Оскільки позаклітинний матрикс осмотично неактивний, то він нівелює осмотичні зміни НК у складі АГ, і ми не маємо можливості у повній мірі спостерігати зміни об'єму клітин АГ. Сфероїди, які є щільними об'єднаннями клітин з позаклітинним матриксом, реагують на осмотичні зміни як єдина система, що дозволяє більш точно відслідковувати реакцію клітин на дію непроникної позаклітинної рідини.

Важливо підкреслити, що дифузія молекул води і кріопротектора в тривимірних структурах є не лише функцією проникності клітинних мембран, але й значною мірою залежить від

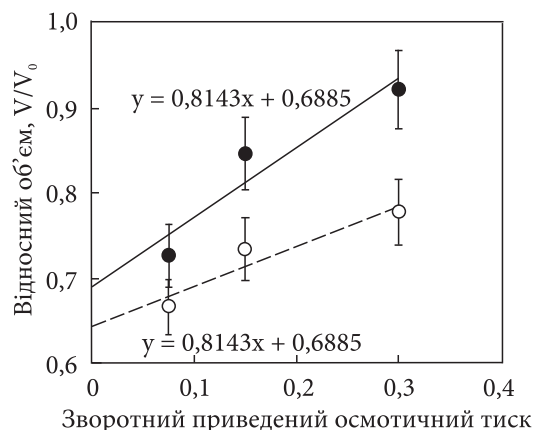


Рис. 4. Зміна відносного об'єму агрегатів (●) і сфероїдів (○) залежно від зворотного приведенного осмотичного тиску розчину NaCl

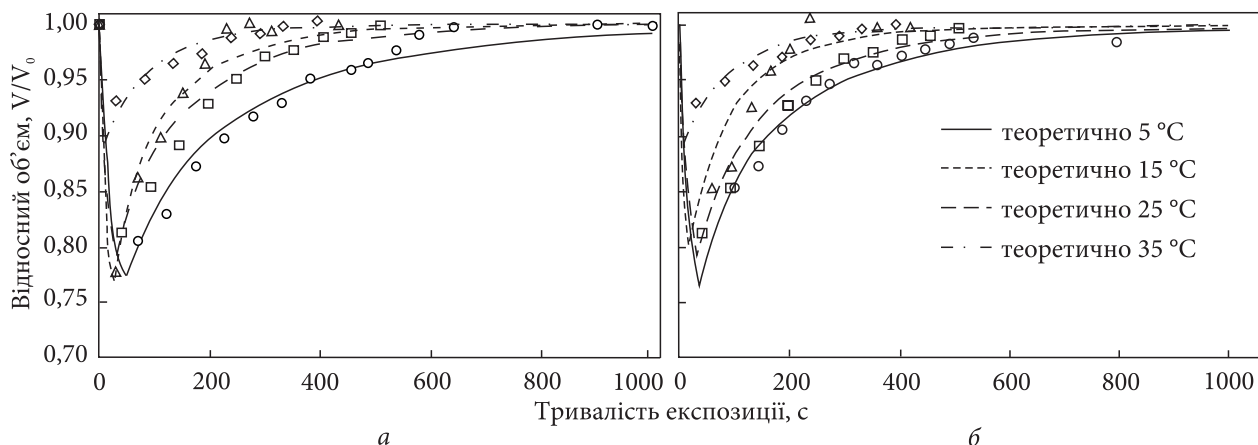


Рис. 5. Зміна відносного об'єму сфероїдів (а) і агрегатів (б) залежно від тривалості еквілібрації в 10%-вому розчині ДМСО при температурах: \circ — 5 °С; \square — 15 °С; Δ — 25 °С; \diamond — 35 °С

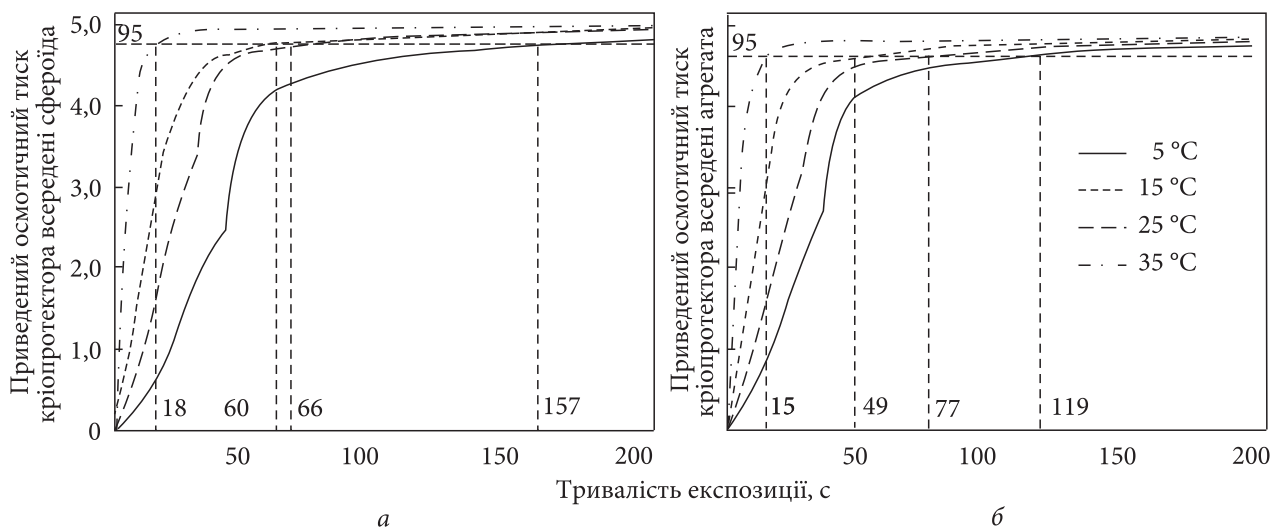


Рис. 6. Зміна у часі приведеної концентрації ДМСО всередині сфероїдів (а) і агрегатів (б) при різних температурах еквілібрації

зовнішньо клітинної дифузії, яка, у свою чергу, визначається щільністю пакування клітин, об'ємом і структурою позаклітинного матриксу. Зокрема, в сфероїдах щільне клітинне пакування та присутність зв'язаного матриксу можуть створювати дифузійні бар'єри, які уповільнюють транспорт молекул ДМСО у глибину структури. В результаті тривалість еквілібрації в таких системах визначається не лише мембранною проникністю, а й ефективним коефіцієнтом зовнішньо клітинної дифузії. Як наслідок, відносно збільшення об'єму АГ у процесі еквілібрації є вищим, ніж у СФ, і об'ємна стабілізація АГ настає швидше. Цей факт також корелює з більш швидким насиченням клітин АГ кріопротектором, що може мати значення для оптимізації режимів кріозахисту

залежно від морфологічних особливостей 3D-структур.

Таким чином, встановлені відмінності в часі насичення структур ДМСО, які були інтерпретовані на основі параметрів моделі Кедем–Качальського, можуть частково зумовлюватися не лише трансмембранною проникністю, але й градієнтами концентрації в міжклітинному просторі. Особливо в таких щільних структурах як сфероїди, варто враховувати, що позаклітинна дифузія є обмежуючим етапом, і адсорбційні ефекти або зміна локального хімічного потенціалу можуть впливати на загальну кінетику масопереносу.

На різну осмотичну активність СФ і АГ також вказують їхні діаграми залежності змін у часі відносного об'єму в процесі інкубації

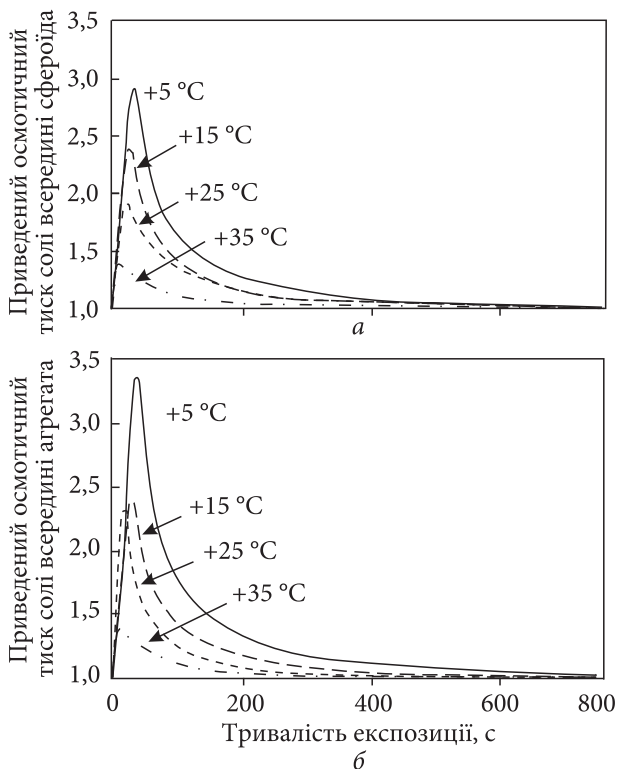


Рис. 7. Зміна у часі приведеної концентрації іонів солі всередині сфероїдів (а) і агрегатів (б) при температурах еквілібрації: 5, 15, 25 і 35 °С

у 10%-вому розчині ДМСО (рис. 5). З графіку видно, що клітини СФ дещо повільніше, ніж клітини АГ зневоднюються і відновлюють свій об'єм під час еквілібрації в 10%-вому розчині ДМСО при різних температурах.

На рис. 6 і 7 та в таблиці представлені теоретично розраховані за допомогою рівнянь (1)–(3) зміни у часі приведеного осмотичного тиску ДМСО та концентрації іонів солей всередині СФ та АГ.

Як видно з рис. 6, теоретичні розрахунки показують, що для 95%-вого насичення клітин СФ кріопротектором у процесі їх еквілібрації в 10%-вому розчині ДМСО при 5, 15, 25 і 35 °С достатньо (157 ± 20), (66 ± 9), (60 ± 6) і (18 ± 5) с

відповідно, а для клітин АГ — (119 ± 16), (77 ± 7), (49 ± 6) і (15 ± 6) с відповідно. Тобто для насичення клітин АГ кріопротектором потрібний менший час еквілібрації в 10%-вому розчині ДМСО, ніж для клітин СФ. Ця залежність тим вища, чим нижча температура інкубації. Зокрема, для насичення ДМСО клітин АГ при 5 °С необхідно на 25 % менше часу, ніж для клітин СФ. Даний факт потрібно враховувати під час кріоконсервування АГ і СФ.

Як видно з рис. 7, теоретично розрахована концентрація іонів солей всередині клітин АГ є дещо більшою, ніж у клітин СФ. Особливо ця різниця проявляється при 5 °С. Тобто швидкість дегідратації клітин АГ у цьому випадку більша, порівняно з дегідратацією клітин СФ, що також можна пояснити різною щільністю пакування СФ і АГ, а також більшими коефіцієнтами проникності води і ДМСО для клітин АГ.

У таблиці представлено розраховані інтегральні коефіцієнти фільтрації (L_p) для води і проникності (K_s) для молекул ДМСО мембран клітини у складі СФ і АГ.

Як видно з даних таблиці, величина коефіцієнтів фільтрації для води та проникності для ДМСО для СФ і АГ прямо пропорційно залежить від температури. Слід зазначити, що при всіх досліджених температурах ці коефіцієнти для АГ є вищими, ніж для СФ.

Коефіцієнти проникності ДМСО вищі для АГ порівняно з СФ в 1,1–5,8 раза (таблиця). Максимальну різницю цього параметра для АГ і СФ фіксували при 35 °С. Ймовірно, це пов'язано зі щільністю пакування клітин у тривимірних структурах, яка у СФ значно вища, ніж у АГ, а також з присутністю в міжклітинному просторі СФ щільного позаклітинного матриксу, який формується в процесі їх утворення. Як щільні міжклітинні контакти, так і позаклітинний матрикс сприяють зменшенню швидкості дифузії для молекул як води, так

Коефіцієнти фільтрації для води і проникності для ДМСО мембран клітин сфероїдів і агрегатів в залежності від температури, $n = 5$

Об'єкт дослідження	Коефіцієнт	Температура, °С			
		5	15	25	35
Сфероїди	Фільтрації $L_p \times 10^{14}, \text{м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$	0,91 ± 0,25	1,25 ± 0,07	1,91 ± 0,19	2,14 ± 0,18
	Проникності $K_s \times 10^6, \text{м}/\text{с}$	0,29 ± 0,11	1,06 ± 0,11	1,24 ± 0,29	1,43 ± 0,18
Агрегати	Фільтрації $L_p \times 10^{14}, \text{м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$	3,52 ± 0,62 #	4,14 ± 0,78 #	4,72 ± 0,28 #	5,01 ± 0,62 #
	Проникності $K_s \times 10^6, \text{м}/\text{с}$	0,32 ± 0,03	2,06 ± 0,54 *	4,62 ± 0,78 *	8,33 ± 0,87 *

Примітка: # — зміни значущі порівняно з L_p СФ, $p \leq 0,05$; * — зміни значущі порівняно з K_s СФ, $p \leq 0,05$.

і ДМСО в клітини внутрішніх шарів СФ, порівняно з такими ж клітинами АГ.

З таблиці видно, що значення коефіцієнтів фільтрації води для АГ також значно вищі (у 2,3—3,9 раза), ніж для СФ. Причому це збільшення є тим вищим, чим нижча температура (таблиця). Цей факт досить важко пояснити, але можливою причиною цього є умови експериментів, які не дозволяють фіксувати біологічні об'єкти з перших секунд дослідження. Пояснення такої залежності потребує додаткового вивчення.

Отже, проведені дослідження продемонстрували, що вміст позаклітинного матриксу, взаємодія клітин між собою та з позаклітинним матриксом (щільність пакування клітин), які у СФ і АГ значною мірою відрізняються, суттєво впливають на дифузію молекул води і ДМСО у клітини цих тривимірних структур.

Отримані дані стосовно проникності НК у складі СФ та АГ можуть бути використані для розробки оптимальних режимів їх кріоконсервування, зокрема визначення оптимальної тривалості еквілібрації СФ і АГ у середовищі кріоконсервування за різних температур.

Для більш детального з'ясування механізмів проникності НК у складі СФ і АГ для молекул води і ДМСО необхідно проведення подальших досліджень.

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. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. *Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий*. Київ: Наукова думка; 1994. 140 с.
3. Огурцова ВВ, Коваленко СЕ, Коваленко ІФ, Гордієнко ОІ. Визначення осмотично неактивного об'єму еритроцитів миші. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2016; 26(1): 93–7.
4. Andrews MG, Kriegstein AR. Challenges of organoid research. *Annu Rev Neurosci*. 2022; 45: 23–39.
5. Bédard P, Gauvin S, Ferland K, et al. Innovative human three-dimensional tissue-engineered models as an alternative to animal testing. *Bioengineering (Basel)* [Internet]. 2020 Sep 17 [cited 2025 May 20]; 7(3): 115. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-5354/7/3/115>
6. Cho AN, Jin Y, An Y, et al. Microfluidic device with brain extracellular matrix promotes structural and functional maturation of human brain organoids. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Aug 05 [cited 2025 May 20]; 12(1): 4730. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24775-5>
7. Dingle YT, Boutin ME, Chirila AM, et al. Three-dimensional neural spheroid culture: An in vitro model for cortical studies. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21(12): 1274–83.
8. Gordiyenko OI, Kovalenko SYe, Kovalenko IF, et al. Theoretical estimation of the optimum cooling rate of a cell suspension at linear freezing modes based on a two-factor theory of cryodamage. *Cryo Letters*. 2018; 39(6): 380–5.
9. Petrenko AYU, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Analytical Biochem*. 1991; 194(2): 326–9.
10. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres – reevaluating the relationship. *Nat Methods*. 2005; 2: 333–6.
11. Sukach AN, Liashenko TD, Shevchenko MV. Properties of isolated neural cells from newborn rat in tissue in vitro. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(3):63–8.

ВИСНОВКИ

1. Сфероїди нейральних клітин, будучи ціліснішою тривимірною структурою зі щільними зв'язками між клітинами та з матриксом, виявляють вищу осмотичну активність порівняно з АГ, що підтверджується меншим відносним осмотично неактивним об'ємом (0,644) сфероїдів проти 0,689 для АГ НК.

2. Агрегати нейральних клітин, які є менш щільно упакованими структурами порівняно з СФ, характеризуються більшими коефіцієнтами проникності для води і ДМСО, що особливо проявляється при 5 °С. При цій температурі для 95%-вого насичення клітин АГ розчином 10%-вого ДМСО необхідно на 25 % менше часу, ніж для клітин СФ (119 с проти 157с).

3. На осмотичні та дифузійні процеси в агрегатах і сфероїдах впливають не лише властивості мембран клітин, а й щільність клітинного пакування, структурна організація позаклітинного матриксу та ефективність зовнішньоклітинної дифузії. Ці чинники повинні враховуватись під час моделювання кріоконсервування об'ємних клітинних структур. Для кращого розмежування впливу мембранної проникності й зовнішньоклітинної дифузії доцільним є введення нормованих коефіцієнтів за щільністю або об'ємною фракцією матриксу.

12. Sukach OM, Vsevolodska SO, Ochenashko OV, Shevchenko MV. Obtaining and characterization of rat fetuses neural cells aggregates/spheroids. *Biopolym Cell*. 2022; 38(2): 93—102.

Отримано 20.11.2024

Прийнято до друку 19.06.2025

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

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National

Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

* an_sukach@ukr.net

THEORETICAL DETERMINATION OF BIOPHYSICAL PARAMETERS FOR OPTIMISING NEURAL CELLS' THREE-DIMENSIONAL STRUCTURES CRYOPRESERVATION

Using physical and mathematical modelling of the mass transfer processes of water and Me₂SO, the values of the relative osmotically inactive volume for aggregates and spheroids of neural cells from newborn rats were determined. The evaluated parameters for aggregates and spheroids are 0.689 and 0.644, respectively. The study also presents theoretically calculated changes over time in the normalized osmotic pressure of Me₂SO and the concentration of salt ions within spheroids and aggregates. From the dynamic curves of change in relative volume for aggregates and spheroids, the filtration coefficients for water and permeability for Me₂SO were determined. It was found that aggregates, as less densely packed structures than spheroids, were characterised by higher permeability coefficients for water and Me₂SO, particularly at 5 °C. At this temperature, 119 s is required for 95% saturation of aggregate cells with 10% Me₂SO and 157 s for spheroid. This means that at a temperature of 5 °C, the equilibration time with the cryoprotectant Me₂SO is 25% longer for spheroids than for aggregates. The obtained results indicate that spheroids as a more integral structure characterised by dense cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, are more osmotically active compared to aggregates. These findings can be used to develop the optimal methods for cryopreservation of neural cell aggregates and spheroids.

Key words: neural cells, spheroids, aggregates, cultivation, filtration coefficients, permeability coefficients, dimethyl sulfoxide, osmotically inactive volume.