



<https://doi.org/10.15407/cryo35.04.181>

УДК: 57.085.23.083

О.М. Сукач, О.Р. Майорова

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,

м. Харків, Україна

*an_sukach@ukr.net

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН У КРІОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

В огляді систематизовано методи визначення життєздатності клітин, що застосовуються у кріобіологічних дослідженнях, з акцентом на їхню практичну придатність, точність і чутливість. Розглянуто як традиційні методи, що базуються на оцінці цілісності клітинної мембрани та метаболічної активності (зокрема фарбування трипановим синім, МТТ-тест, проби з флуоресцентними барвниками), так і сучасніші підходи, включно з протоковою цитометрією, конфокальною мікроскопією та методами оцінки функціональної активності клітин. Для кожного методу наведено опис механізму дії, протокол виконання, специфічні переваги, недоліки, а також потреби в обладнанні та обмеження щодо типів клітин. Проведено порівняльний аналіз, що виявив відсутність універсального підходу, однак засвідчив ефективність комбінованих методів, які поєднують флуоресцентне фарбування та метаболічну оцінку. Таке поєднання забезпечує високу точність оцінки життєздатності клітин після кріоконсервування. Крім того, в огляді розглянуто перспективи розвитку методів оцінювання життєздатності клітин у кріобіології, включаючи впровадження новітніх технологій візуалізації високої роздільної здатності, мультипараметричного аналізу, а також інтеграції з мікрофлюїдними платформами та штучним інтелектом для автоматизації та покращення точності оцінки. Огляд може слугувати практичним інструментом для дослідників під час вибору оптимального підходу до оцінювання життєздатності клітин залежно від мети експерименту, наявних ресурсів і типу клітин.

Ключові слова: кріобіологія, життєздатність клітин, кріоконсервування, метод виключення барвника, колориметричний метод, флуоресцентні барвники, люмінометричні аналізи, культивування.

Кріобіологія — це міждисциплінарна наука, що вивчає поведінку біологічних систем за умов екстремально низьких температур, зокрема процеси охолодження, заморожування, зберігання та відновлення клітин, тканин і органів. Її практичне значення важко переоцінити: методи кріоконсервування широко застосовуються у репродуктивній медицині [51], трансплантології, клітинній терапії, біотехнології [49].

Одним із головних завдань кріобіології є збереження життєздатності біологічного матеріалу після кріоконсервування. Внаслідок дії

низьких температур клітини зазнають низки таких стресових факторів, як дегідратація, осмотичні коливання, утворення внутрішньоклітинних і позаклітинних кристалів льоду, що призводить до ушкодження мембран і порушення метаболізму [21, 41]. У зв'язку з цим виникає потреба у використанні надійних методів оцінювання життєздатності клітин, які дають змогу об'єктивно визначити ефективність обраної стратегії їх кріоконсервування, рівень постстресової адаптації та придатність до подальшого використання в дослідницьких або клінічних цілях.

Цитування: Сукач ОМ, Майорова ОР. Використання методів визначення життєздатності клітин у кріобіологічних дослідженнях. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(4): 191—207. <https://doi.org/10.15407/cryo35.04.181>

© 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/>)

ISSN 2307-6143. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025. Т. 35, № 4

На сьогодні в арсеналі дослідників є широкий спектр методів оцінювання життєздатності клітин — від класичних фарбувальних технік до високочутливих флуоресцентних чи метаболічних аналізів. Кожен із цих методів має свої переваги, обмеження, специфічність і чутливість, що зумовлює потребу в їх обґрунтованому виборі залежно від типу досліджуваного об'єкта та завдань експерименту. Вибір оптимального методу дає змогу об'єктивно оцінити якість збереження клітин, виявити пошкодження та оптимізувати умови їх кріоконсервування й зберігання.

Наявні методи оцінювання життєздатності клітин можна класифікувати за параметрами, тобто ознаками або критеріями, що відображають фізіологічні, біохімічні чи морфологічні характеристики живих і мертвих клітин. Основними параметрами, які підлягають оцінюванню є: інтактність плазматичної мембрани, метаболічна активність, здатність до проліферації, морфологічні характеристики, зміни мембранного потенціалу/іонний баланс, генетична цілісність (ДНК/РНК). Залежно від характеру впливу на клітини, методи визначення життєздатності поділяють на деструктивні, що призводять до руйнування клітин, та недеструктивні, які дають змогу зберегти їх життєздатними для подальшого використання в експериментах.

За рівнем необхідного технічного забезпечення методи визначення життєздатності поділяють на прості (світлова мікроскопія, фарбувальні методи) та високотехнологічні (цитофлуориметрія, біосенсорні системи на основі живих біочіпів). Окрім класичних підходів, останніми роками зростає роль автоматизованих систем аналізу з використанням штучного інтелекту (ШІ), мікрофлюїдних технологій та нанотехнологій для підвищення точності [4, 22], стандартизації й відтворюваності оцінювання життєздатності клітин. Інтеграція цих підходів у рутинну кріобіологічну практику може значно покращити якість збереження клітин та оптимізувати протоколи їх заморожування.

Мета огляду — систематизація наявних методів оцінки життєздатності клітин, які використовуються у кріобіології, визначення їхніх переваг і обмежень, а також аналіз перспектив впровадження новітніх технологій для підви-

щення точності, інформативності та відтворюваності оцінювання.

ТЕСТИ НА ЦІЛІСНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

Тести на виключення барвника. Характерною ознакою мертвих або апоптотичних клітин є порушення цілісності плазматичної мембрани. Саме на цій особливості ґрунтуються тести на виключення барвника, що застосовують для визначення кількості життєздатних клітин у зразку. Принцип методу полягає в тому, що живі клітини з непошкодженою плазматичною мембраною не пропускають вітальні барвники, такі як трипановий синій (ТС), еозин, конго червоний, еритрозин, пропідій йодид (ПІ), тоді як клітини з порушеною цілісністю плазматичної мембрани ці барвники поглинають [9, 37].

Для проведення таких тестів клітинну суспензію змішують із барвником, після чого візуально підраховують кількість життєздатних (із прозорою цитоплазмою) та нежиттєздатних (із забарвленою цитоплазмою) клітин.

Тести на виключення барвників є відносно простими, потребують великої кількості клітин, виконуються швидко та дають змогу виявляти загибель у популяціях клітин, що не проліферують. Основним обмеженням цих методів є їхня непридатність для аналізу клітин у культурах, оскільки вони були розроблені переважно для клітинних суспензій [37]. Одним із найпоширеніших тестів на виключення барвника є тест із ТС [62]. Трипановий синій — це велика негативно заряджена молекула. Інтактна клітинна мембрана є бар'єром для проходження великих заряджених сполук, тоді як пошкоджена мембрана втрачає бар'єрні властивості, і ТС проникає всередину клітин, забарвлюючи їх у синій колір. Життєздатні клітини з інтактними мембранами, з одного боку, є непроникними для ТС, а з іншого — здатні активно виводити барвник із внутрішньоклітинного середовища, залишаючись незабарвленими.

Зазвичай тест із ТС проводять шляхом змішування однієї частини 0,4%-вого розчину ТС з однією частиною розведеної суспензії клітин. Підрахунок живих і мертвих клітин здійснюють впродовж 3—5 хв після змішування, оскільки довший період інкубації з ТС може спричинити додаткове пошкодження клітин і зниження показників життєздатності. Змішування ви-

конують у лунці планшета або в пластиковій пробірці, використовуючи 10—20 мкл клітинної суспензії та розчину ТС. Оцінювання результатів здійснюють мікроскопічно за допомогою камери Горяєва або автоматизованих систем підрахунку клітин. Виведення ТС також можна оцінювати спектрофотометрично або з використанням проточної цитометрії.

Важливо врахувати, що розчин ТС слід зберігати у темному місці, а після тривалого зберігання — фільтрувати. Оскільки ТС має високу спорідненість до білків сироватки крові, що може спотворювати результати, рекомендовано використовувати безсироваткове середовище. Недоліком трипанового тесту є те, що він визначає життєздатність опосередковано — за цілісністю клітинної мембрани. При цьому можлива втрата функціональних властивостей клітин (принаймні тимчасова) навіть за збереження цілісності мембрани. І навпаки, клітини з порушеною цілісністю мембрани, що фіксуються тестом, можуть відновлювати бар'єрні властивості й залишатися життєздатними. Ще однією потенційною проблемою є суб'єктивність оцінки, оскільки поглинання барвника визначається візуально, і незначні кількості ТС, що свідчать про пошкодження клітин, можуть залишатися непоміченими. Крім того, тест із трипановим синім є аналізом кінцевої точки, адже барвник токсичний для клітин. До недоліків методу також належить його обмеження у використанні: трипановий тест придатний лише для аналізу клітинних суспензій і не підходить для оцінювання життєздатності клітин у складі 2D- та 3D-клітинних структур.

Як альтернативу ТС можна використовувати барвники конго червоний та еритрозин В, які є нетоксичними і не зв'язуються з білками сироватки [34]. При цьому еритрозин В здатний виявляти ранні стадії пошкодження мембрани, коли ТС ще не проникає в клітину, що дає змогу точніше оцінювати сублетальні ушкодження клітин, які можуть виникати під час кріоконсервування. Конго червоний забезпечує інтенсивніше забарвлення мертвих клітин, що полегшує їх підрахунок, особливо під час використання світлової мікроскопії. Обидва барвники, на відміну від ТС, характеризуються вищою сумісністю з флуоресцентними аналізами та ферментативними тестами.

Флуоресцентні маркери життєздатності. Більш чутливими та точними маркерами ви-

значення життєздатності клітин, порівняно з кольоровими, є флуоресцентні барвники [36], наприклад етидіум бромід (ЕБр) та ПІ [5]. Подібно до ТС, вони проникають у клітини лише за наявності пошкодженої мембрани. Візуалізація цих барвників за допомогою флуоресцентної мікроскопії забезпечує більш точну оцінку життєздатності клітин порівняно з нефлуоресцентними барвниками.

Сумісне використання непроникних (ПІ, ЕБр) і проникних (акридиновий помаранчевий (АП), флуоресцеїн діацетат (ФДА)) флуоресцентних барвників дозволяє одночасно визначати кількість живих і мертвих клітин у популяції [59]. Подвійне фарбування зазвичай застосовують на суспензіях клітин, а результати оцінюють за допомогою флуоресцентного мікроскопа або проточної цитометрії.

Фарбування акридиновим помаранчевим/пропідій йодидом. Барвник АП здатний проникати у життєздатні клітини та зв'язуватися з нуклеїновими кислотами. При зв'язуванні з дволанцюговою ДНК (dsDNA) він флуоресцює зеленим, тоді як зв'язування з одноланцюговою ДНК (ssDNA) або РНК викликає червону флуоресценцію [57]. Пропідій йодид проникає лише у клітини з пошкодженими мембранами, де зв'язується з нуклеїновими кислотами [65], що підвищує його флуоресценцію у 20—30 разів і забезпечує червоне забарвлення нежиттєздатних клітин. Завдяки резонансному перенесенню енергії Ферстера (FRET) сигнал ПІ поглинає сигнал АП у нежиттєздатних клітинах, запобігаючи подвійним позитивним результатам. Таким чином, при сумісному фарбуванні клітин АП/ПІ життєздатні клітини флуоресцюють зеленим, а нежиттєздатні — червоним.

Метод фарбування АП/ПІ є швидким та інформативним, проте має певні обмеження, особливо при оцінюванні кріоконсервованих клітин. Зокрема, клітини на ранніх стадіях апоптозу або із сублетальними ушкодженнями мембрани можуть давати хибнопозитивні або хибнонегативні результати: мембрана ще цілісна, але клітина втратила довгострокову життєздатність. Цей метод не дозволяє повною мірою оцінити метаболічну активність, функціональну спроможність і потенціал тривалого виживання клітин після кріоконсервування. Морфологічні особливості деяких типів клітин або наявність позаклітинного матриксу можуть ус-

кладнювати візуалізацію та точний підрахунок показників життєздатності.

У кріобіологічній практиці ці обмеження особливо важливі, оскільки заморожування-відігрівання може спричиняти ушкодження клітин, не завжди пов'язані з безпосереднім руйнуванням плазматичної мембрани. Тому для комплексного визначення життєздатності кріоконсервованих клітин рекомендується застосовувати комбінацію методів, що оцінюють різні аспекти їхнього функціонального стану.

Фарбування флуоресцеїну діацетатом/пропідій йодидом. Нефлуоресцентний барвник флуоресцеїну діацетат (ФДА), подібно до АП, проникає у життєздатні клітини, де під дією естераз перетворюється на зелений флуоресцентний метаболіт — флуоресцеїн. Пропідій йодид після проникнення у мертві клітини зв'язується з ДНК і флуоресціює червоним. Таким чином, подвійне фарбування ФДА/АП дає змогу одночасно оцінювати живі та мертві клітини [30]. Додаткове забарвлення ядер клітин синім флуоресцентним барвником Hoechst підвищує точність визначення життєздатності.

Фарбування ФДА/АП можна застосовувати як до клітин суспензій та моношару, так і до клітин, інтегрованих у позаклітинний матрикс або у сформовані тривимірні кластери, зокрема багатоклітинні сфероїди. Протокол фарбування включає приготування розчинів для фарбування (табл. 1), додавання їх до клітин після видалення середовища, інкубування при кімнатній температурі впродовж 4—5 хв у темряві, видалення розчинів та додавання фосфатного буфера або середовища без білка з подальшим аналізом за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Метод фарбування ФДА/АП має певні недоліки, особливо в контексті кріобіології: клітини з низькою метаболічною активністю або пошкодженими естеразами можуть давати слабе флуоресцентне забарвлення ФДА, навіть якщо

Таблиця 1. Розчин для фарбування ФДА/АП (повинен бути свіжо приготованим)

Компоненти	Об'єм
Середовище культивування без фетальної сироватки корів	5 мл
ФДА (5 мг/мл)	8 мкл
АП (2 мг/мл)	50 мкл

їх мембрана ще інтактна. Клітини на ранніх стадіях апоптозу або з сублетальними пошкодженнями мембрани можуть бути непроникними для АП, що призводить до хибнопозитивних результатів у довгостроковій перспективі. Фарбування ФДА/АП не відображає повною мірою функціональний стан клітин. Клітини, які виглядають «живими» за цим тестом, можуть бути функціонально скомпрометовані після кріоконсервування.

Аналіз активності лактатдегідрогенази. Втрата цілісності клітинної мембрани призводить до вивільнення цитоплазматичних білків у позаклітинний простір, значна частина яких є ферментами. Одним із таких ферментів є лактатдегідрогеназа (ЛДГ), яку використовують як маркер життєздатності *in vitro* та *in vivo* [16].

Лактатдегідрогеназа є стабільним цитоплазматичним ферментом, присутнім у всіх клітинах. При пошкодженні плазматичної мембрани цей фермент швидко вивільняється у позаклітинний простір. Активність ЛДГ можна легко визначити кількісно, за допомогою NADH, що утворюється під час перетворення лактату на піруват (рис. 1), у поєднаній реакції з утворенням продукту, який легко піддається кількісному визначенню.

У ролі другої сполуки часто використовують жовту сіль тетразолію або йоднітротетразолію, які відновлюються до червоного водорозчинного барвника класу формазанів, що поглинає світло при 492 нм. Кількість утвореного формазану прямо пропорційна кількості ЛДГ, вивільненої мертвими або пошкодженими клітинами.

Для аналізу, до супернатанту клітин додають субстрат, який містить жовту сіль тетразолію, молочну кислоту і NAD⁺, й інкубують при 37 °C впродовж 15—30 хв. Після інкубації додають стоп-розчин, який зупиняє реакцію, і впродовж години вимірюють поглинання на спектрофотометрі при 490 нм [31]. Слід враховувати, що сироватка, яка зазвичай використовується при культивуванні клітин, має власну ЛДГ-активність, тому експерименти проводять у її відсутності.

Недоліком методу, особливо в контексті кріоконсервування, є те, що рівень ЛДГ у позаклітинному середовищі не є прямим показником життєздатності клітин. Клітини можуть мати пошкоджену мембрану та вивільняти ЛДГ, залишаючись метаболічно активними або здат-

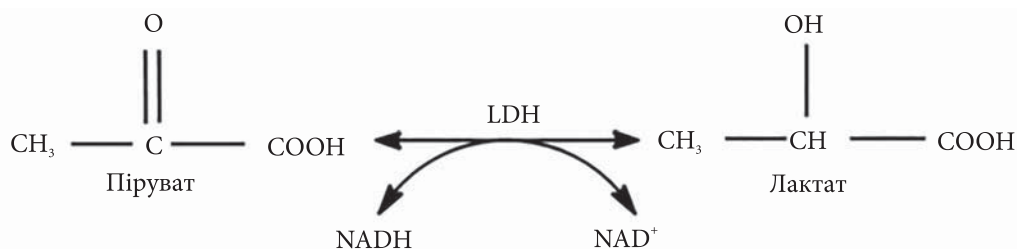


Рис. 1. Перетворення лактату на піруват, що каталізується ЛДГ

ними до відновлення. Крім того, різні типи клітин можуть мати різний рівень внутрішньоклітинної ЛДГ, що впливає на чутливість методу. Аналіз ЛДГ зазвичай проводять у кінцевій точці експерименту, тому він відображає лише стан клітин на момент вимірювання і не показує динаміку загибелі або відновлення впродовж часу. Метод дає середню оцінку по всій популяції і не дозволяє виявити субпопуляції з різним рівнем пошкодження або життєздатності.

Тому для більш повної та точної оцінки життєздатності та функціонального стану кріоконсервованих клітин аналіз ЛДГ рекомендується використовувати в поєднанні з іншими методами, такими як фарбування живих/мертвих клітин, оцінка метаболічної активності або клоногенний аналіз.

МЕТАБОЛІЧНІ ТЕСТИ

Метаболічні тести застосовують для оцінки життєздатності клітин шляхом кількісного визначення активності ферментів, задіяних у процесах обміну речовин. Ці методи можуть відображати й проліферативну активність, оскільки клітини, які активно діляться, характеризуються підвищеною інтенсивністю метаболізму. Тому отримані результати можуть свідчити не лише про життєздатність, а й про ступінь проліферації клітин.

Тести на основі тетразолію. Існує низка тестів, які базуються на метаболізмі клітинами солей тетразолію [61]. До них належать: Methyl Thiazolyl Tetrazolium (МТТ), Xenon-derived Tetrazolium (ХТТ), Methoxy Thiazolyl Sulphophenyl Tetrazolium (МТС), Water-Soluble Tetrazolium (WST) чи його комерційна реалізація — Cell Counting Kit 8 (ССК-8). Ці тести характеризуються високою чутливістю і дозволяють оцінювати метаболічну активність мітохондрій, що притаманна лише життєздатним клітинам. Зазначені тести ґрунтуються на здатності солей

тетразолію проникати через плазматичну мембрану живих клітин і потім відновлюватися за участю NADH або оксидоредуктаз і дегідрогеназ у метаболічно активних клітинах, утворюючи різні похідні формазану, забарвлені від червоного до фіолетового кольору [61]. Мертві клітини втрачають здатність до цього відновлення. Деякі похідні формазану є розчинними, інші — ні. Для кількісної оцінки нерозчинний формазан екстрагують органічними розчинниками (метанол, етанол, ацетон, диметилсульфоксид, диметилформамід, додецилсульфату натрію) або комбінації детергенту з органічними розчинниками. Вибір розчинника визначається конкретним тестом і типом клітинної культури. Після цього кількість утвореного формазану визначають спектрофотометрично.

МТТ-тест. Найбільш поширеним тестом на основі тетразолію є МТТ-тест. Він вважається досить простим і водночас високочутливим і ефективним для різних типів клітин. Метод ґрунтується на здатності життєздатних клітин, на відміну від нежиттєздатних, перетворювати розчинний жовтий 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразолій бромід у нерозчинні пурпурово-сині внутрішньоклітинні кристали формазану з максимумом поглинання біля 570 нм (рис. 2). Зміна кольору й інтенсивність забарвлення реагенту залежать від активності мітохондріальних систем і відображають кількість життєздатних клітин [8, 69]. Утворений формазан розчиняють за допомогою диметилсульфоксиду, диметилформаміду або додецилсульфату натрію [17, 27, 46, 64], після чого забарвлений розчин кількісно оцінюють спектрофотометрично при 570 нм. Величина абсорбції пропорційна кількості життєздатних клітин. Слід враховувати, що кількість утвореного формазану залежить не лише від числа життєздатних клітин, а й від їх метаболічної активності, концентрації МТТ та тривалості інкубації.

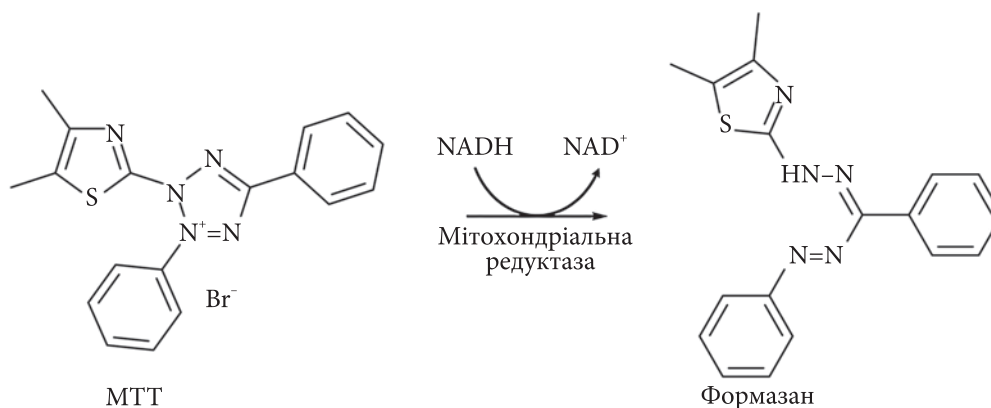


Рис. 2. Відновлення МТТ до кристалів формаза́ну

Зазвичай для проведення МТТ-тесту до 100 мкл суспензії або культури клітин в кожну лунку 96-лункового планшета додають 10 мкл розчину МТТ, щоб досягти кінцевої концентрації 0,45 мг/мл, та інкубують при 37 °С впродовж 1—4 годин. Утворені кристали формаза́ну розчиняють у 100 мкл солюбілізаційного розчину, після чого абсорбцію вимірюють при 570 нм за допомогою планшетного рідера.

До недоліків МТТ-тесту належать його токсичність, чутливість до присутності у середовищі культивування сироваткового альбуміну, іонів металів та вітамінів, а також необхідність етапу розчинення утворених кристалів формаза́ну.

Окрім МТТ, існують також тетразолієві реагенти, які відновлюються життєздатними клітинами до розчинних у культуральному середовищі формаза́нових продуктів. До них належать МТS, ХТТ і WST [14, 25, 48]. Завдяки розчинності утворених продуктів, етап розчинення преципітатів формаза́ну у цих тестах не потрібний, що спрощує протоколи. Вважається, що МТS, ХТТ і WST мають обмежену проникність у клітини [58]. Тому їх зазвичай застосовують разом із проміжними електроноакцепторними реагентами, такими як феназин метилсульфат (PMS) або феназин етилсульфат (PES), які можуть проникати в життєздатні клітини, відновлюватися в цитоплазмі або на поверхні клітини та виходити з неї, де перетворюють тетразолій на розчинний формаза́н (рис. 3) [7].

Ці тести, порівняно з МТТ, є більш чутливими та менш токсичними.

Основними недоліками тестів, заснованих на визначенні метаболічної активності клітин за відновленням солей тетразолію, є часткова не-

стабільність розчинів і виражена цитотоксичність, особливо у МТТ-реагенту [54].

Alamar Blue test. Ще одним прикладом метаболічного тесту для визначення життєздатності клітин є тест на резазурин, або Alamar Blue чи PrestoBlue [50, 54]. Тест базується на тому ж принципі, що й тетразолієві аналізи і використовує перенесення електронів для перетворення нетоксичного водорозчинного резазурину у флуоресцентну речовину резорурфін (рис. 4).

Нефлуоресціюючий резазурин має синє забарвлення і проникає через клітинні мембрани, перетворюючись під дією редуказ життєздатних клітин у резорурфін, який характеризується яскравою червоною флуоресценцією. Перетворення резазурину на резорурфін у життєздатних клітинах відбувається безперервно та не викликає загибелі клітин, що дозволяє формувати сигнал, який можна реєструвати як кількісно (спектрометрично або флуориметрично), так і якісно за зміною синього забарвлення на рожеве [2, 54]. Кількість утвореного резорурфіну, яка пропорційна кількості життєздатних клітин, зазвичай визначають за допомогою мікропланшетного флуориметра з використанням довжини хвилі збудження 560 нм та довжини хвилі випромінювання 590 нм. Час інкубації, необхідний для отримання адекватного флуоресцентного сигналу, становить від 1 до 4 годин і залежить від метаболічної активності конкретного типу клітин, їх щільності на лунку та інших умов аналізу, включно з типом середовища культивування. Інкубаційний період оптимізують так, щоб уникнути токсичності реагенту та забезпечити достатню чутливість вимірювання.

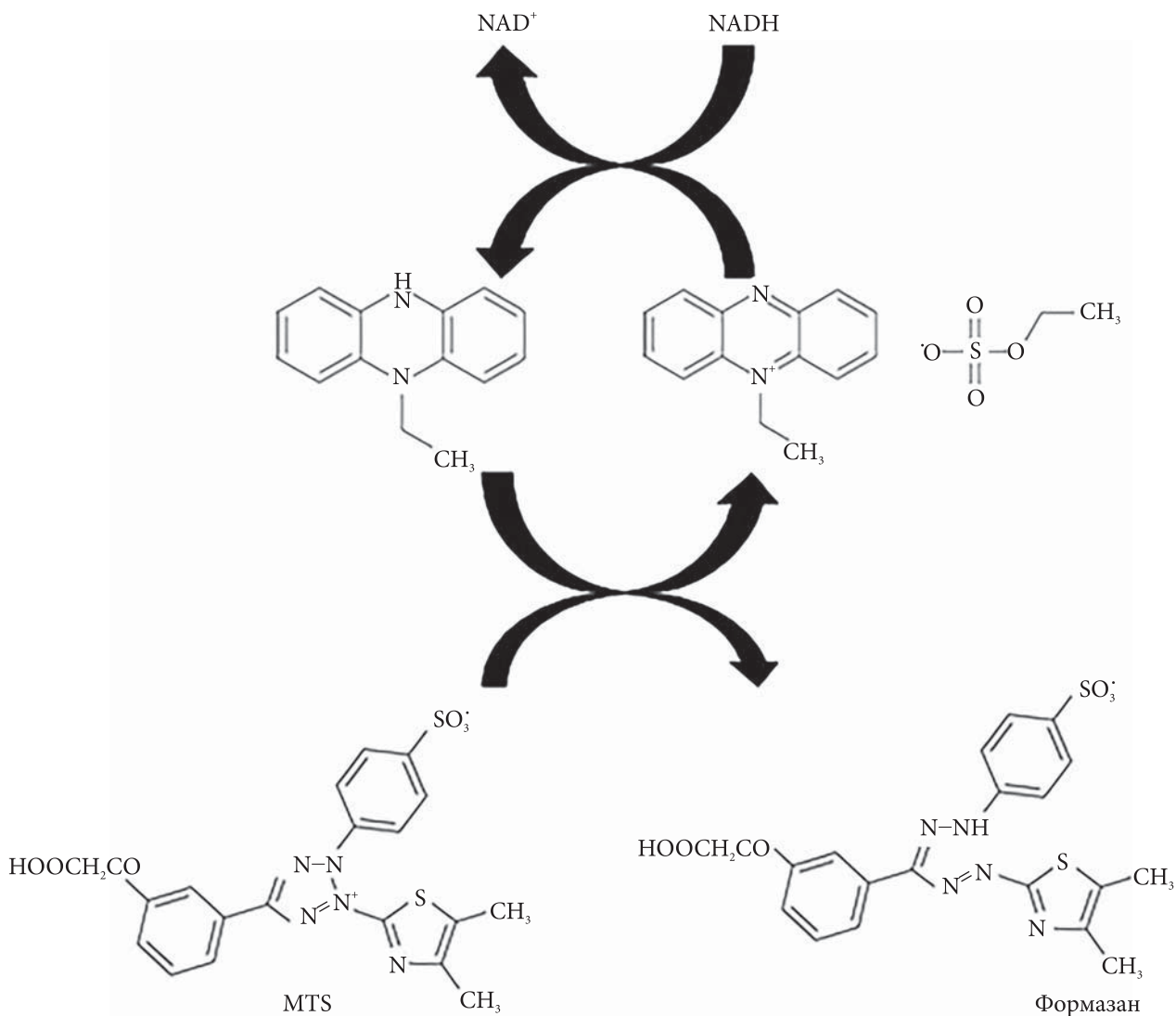


Рис. 3. Проміжний акцептор електронів феназин етилсульфат переносить електрон від NADH у цитоплазмі, щоб відновити MTS у культуральному середовищі у водорозчинний формазан

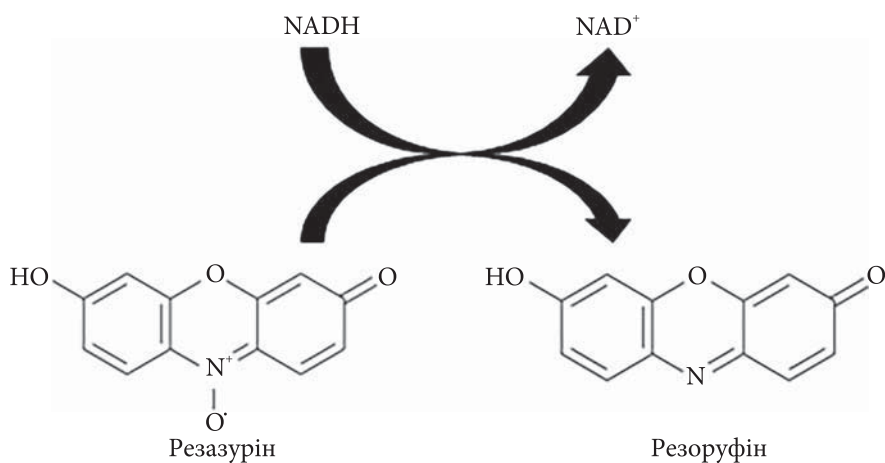


Рис. 4. Відновлення субстрату резазурину до рожевого флуоресцентного резорufіну

Основні переваги аналізу на основі відновлення резазурину включають доступність реагенту, високу чутливість та можливість подальшого використання клітин для інших досліджень.

жень [75]. Недоліки включають можливість флуоресцентної інтерференції від досліджуваних сполук.

Слабкою стороною всіх тестів на основі відновлення тетразолію або резазурину є залежність сигналу від накопичення кольорових або флуоресцентних продуктів з часом. Поступове посилення сигналу ускладнює точну оцінку життєздатності клітин при тривалій інкубації.

Крім того, колориметричні аналізи з використанням солей тетразолію та резазурину не є оптимальними для щільних тривимірних клітинних структур, оскільки реагенти мають обмежену здатність проникати через кілька шарів клітин.

Аналіз життєздатності клітин на основі визначення кількості АТФ. Широко визнаним маркером життєздатності клітин є АТФ, який слугує джерелом енергії та утворюється виключно у живих клітинах. Тому його кількість прямо пропорційна кількості живих клітин [38]. Для визначення АТФ використовують різні методи, зокрема спектрофотометричний, флуоресцентний, біolumінесцентний та інші [38]. Найбільш поширеним є біolumінесцентний аналіз кількості АТФ завдяки високій чутливості, простоті протоколу та швидкому отриманню результатів [39].

Цей аналіз ґрунтується на ферментативній реакції люциферази світляків, яка використовує АТФ із життєздатних клітин для генерації фотонів світла [26]. Для проведення аналізу життєздатні клітини попередньо лізують, щоб вивільнити АТФ, після чого додають реагенти, що містять фермент люциферазу світляка та субстрат люциферину. У реакції люциферин перетворюється на оксилуциферин із генерацією люмінесцентного світла довжиною хвилі 550—570 нм (від зеленого до жовтого) (рис. 5).

Інтенсивність люмінесцентного сигналу визначають за допомогою люмінометра. Коли АТФ є лімітуючим компонентом у люциферазній реакції, інтенсивність люмінесценції прямо пропорційна концентрації АТФ.

Протокол визначення АТФ передбачає додавання до клітин реагенту, який містить: детергент для їх лізису, інгібітор АТФ-ази для стабілізації вивільненого АТФ, люциферин як субстрат і стабільну форму люциферази для каталізу реакції, що генерує фотони світла [56]. Люмінесцентний сигнал стабілізується впро-

довж 10 хв після додавання реагенту та зазвичай зберігається з періодом напіврозпаду понад 5 годин.

Перевагою біolumінесцентного аналізу АТФ є: відсутність необхідності інкубації клітин для перетворення субстрату на забарвлену сполуку (як у тестах на основі тетразолію або резазурину), висока чутливість — можливе виявлення менше 10 клітин на лунку, сумісність із 96- та 384-лунковими форматами [56]. Недоліком є необхідність лізису клітин.

Останнім часом розроблено високочутливі методи визначення рівня АТФ за допомогою нано- або мікросенсорів, що дозволяють оцінювати життєздатність клітин у режимі реального часу [32, 60]. Основними обмеженнями їх широкого застосування є висока вартість та складність використання через потребу у точному калібруванні.

Аналіз життєздатності клітин за допомогою потенціал-залежних барвників. Здатність клітин продукувати АТФ тісно пов'язана з потенціалом мітохондріальної мембрани, який також може слугувати показником життєздатності клітин [20, 78]. Для його оцінки широко використовують барвники JC-1 і JC-10 [55, 79]. При високому потенціалі мітохондріальної мембрани JC-1 і JC-10 утворюють агрегати у матриці мітохондрій, що випромінюють яскраво-червону флуоресценцію. Коли потенціал знижується, агрегати переходять у мономери, які світяться зеленим. Відносне співвідношення червоної та зеленої флуоресценції дозволяє визначити зміни потенціалу мітохондріальної мембрани, що корелюють з життєздатністю клітин. JC-10 відрізняється від JC-1 кращою розчинністю у воді та вищою чутливістю [79].

Протоколи фарбування JC-1 і JC-10 зазвичай швидкі та не потребують складних маніпуляцій. Однак, метод має певні недоліки, особливо в контексті кріобіології: після кріоконсервування клітини можуть зазнавати пошкоджень, які не завжди проявляються у зміні мітохондріального мембранного потенціалу на ранніх етапах після відігрівання. Тому оцінка життєздатності лише за допомогою JC-1 і JC-10 може не відображати повний спектр ушкоджень клітин та їх довгострокову здатність до відновлення та функціонування. Для більш комплексної оцінки рекомендується застосовувати JC-1 і JC-10 у поєднанні з іншими методами, що оцінюють ці-

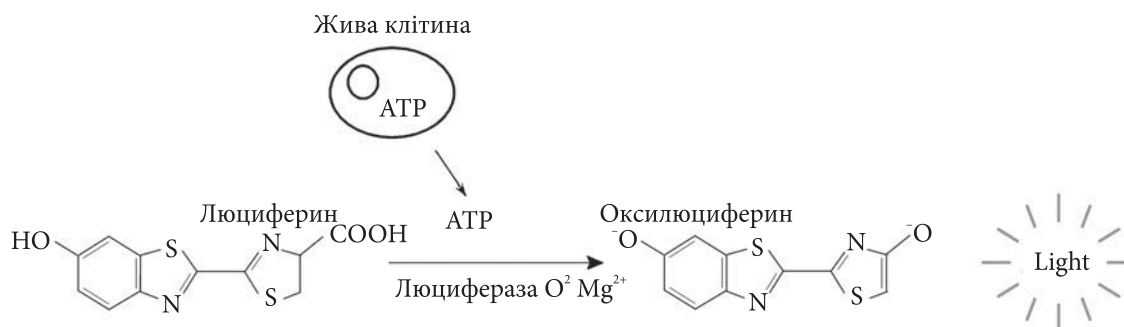


Рис. 5. Спрощена схема реакції, яка показує АТФ і люциферин як субстрати для люциферази для генерування світла

лісність мембрани, метаболічну активність та функціональну здатність клітин.

Аутофлуоресцентні сигнали клітин як маркери життєздатності. Більшість традиційних методів визначення життєздатності є за своєю суттю деструктивними. Проте живі клітини експресують низку внутрішніх флуорофорів, які відіграють ключову роль у клітинному метаболізмі та можуть бути використаними для неруйнівного визначення життєздатності [15]. До таких флуорофорів належать кофактори NADH, NADPH і FAD. Аутофлуоресцентна візуалізація цих молекул дозволяє без додаткових міток відстежувати клітинний метаболізм [24, 35]. NADH і NADPH, які неможливо розрізнити за допомогою флуоресцентної візуалізації, зазвичай збуджуються світлом з довжиною хвилі приблизно 370 нм для однофотонної флуоресценції та 750 нм для двофотонної [29]. FAD зазвичай збуджується світлом з довжиною хвилі ~405 нм для однофотонної флуоресценції та ~890—900 нм для двофотонної [29]. Пік флуоресценції NAD(P)H спостерігається при довжині хвилі 400—500 нм, а FAD — при 500—600 нм [29]. Таким чином, використовуючи для збудження аутофлуоресценції NAD(P)H і FAD ультрафіолетове світло в діапазоні 370—400 нм, можна спостерігати флуоресценцію живих клітин у зеленій частині спектра [63].

Для реєстрації авто флуоресценції NAD(P)H і FAD зазвичай застосовують флуоресцентну мікроскопію з високою роздільною здатністю з лазерами в якості джерел збуджуючого світла. Це може стати причиною фототоксичності. Використання дво- або трифотонного збудження дозволяє зменшити пошкоджувальну дію світла, хоча деякий рівень фототоксичності залишається неминучим.

ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТЕСТИ

Культивування як тест на життєздатність клітин. Показовою ознакою життєздатних адгезивних клітин є їх здатність у культурі прикріплюватися до підкладки, розпластуватися, мігрувати та проліферувати. Прикріплення клітин із подальшим розпластуванням — це складні процеси, притаманні життєздатним клітинам, які включають взаємодію рецепторів з лігандами, активацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів та перебудову цитоскелета. Для свіжоотриманих або кріоконсервованих клітин важливим є тривалість культивування, впродовж якої нелетальні пошкодження плазматичної мембрани, отримані під час дезагрегації тканини або заморожування-відтавання клітин, можуть відновитися. Тривалість такої лаг-фази може залежати від ступеня пошкодження клітин, щільності їх посіву, типу поверхні культивування та складу середовища культивування. Для кріоконсервованих клітин тривалість лаг-фази може складати від 24 до 72 годин. Таким чином, прикріплення адгезивних клітин до підкладки можна спостерігати впродовж 3 діб після їх отримання з тканини чи розморожування. Прикріплені клітини зазвичай розпластуються, набуваючи фібробластичної епітелієподібної форми. Розпластування вказує на те, що життєздатні клітини відновилися та готові до активного поділу, за винятком клітин, які природно не діляться, наприклад нейронів.

Тест на прикріплення клітин зазвичай проводять шляхом посіву відомої кількості вихідних чи розморожених клітин у культуральну ємність. Після 24 годин культивування підраховують кількість неприкріплених (плаваючих) клітин, переносять їх у чисту культуральну єм-

ність і продовжують культивувати ще три доби. Це дозволяє визначити максимальну кількість клітин, здатних відновлювати життєздатність після виділення або кріоконсервування [52]. Метод застосовується лише для адгезивних клітин.

Життєздатні неадгезивні клітини повинні вільно плавати у суспензії поодинокі або у невеликих скупченнях, мати кулясту чи лімфобластоподібну форму з прозорою цитоплазмою та чітко окресленою плазматичною мембраною.

Ознаками загибелі клітин є: їх злипання (пов'язане з вивільненням ДНК під час лізису), темне забарвлення цитоплазми, нечітка плазматична мембрана, утворення пухирців плазматичною мембраною.

ОСОБЛИВОСТІ ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН У СКЛАДІ ТРИВИМІРНИХ СТРУКТУР

На сьогодні в фармацевтичних та медико-біологічних дослідженнях все частіше використовують тривимірні (3D) клітинні структури, які більш точно імітують інтактні тканини живого організму: органоїди, сфероїди та інженерні конструкції, створені на основі клітин та різноманітних каркасів (скафолдів). Ці структури характеризуються високою щільністю клітин, досить великими розмірами та часто неоднорідністю складу, що ускладнює оцінювання життєздатності їх клітин як у нативному стані, так і після кріоконсервування.

Більшість дослідників для аналізу життєздатності клітин 3D-структур використовують протоколи, розроблені для двовимірних структур, з деякими модифікаціями [71, 81]. Зазвичай модифікації направлені на врахування розміру та щільності пакування клітин 3D-структур, що виражається в більш тривалому часі їх інкубації з реагентами для забезпечення належного проникнення.

Існує декілька комерційних протоколів, розроблених для аналізу життєздатності клітин у складі 3D-структур, зокрема це колориметричний Cultrex® 3D-аналіз і люмінесцентний аналіз CellTiter-Glo® 3D. Власне, як уже було згадано вище, ці аналізи є модифіковані до 3D-умов класичними МТТ-тестом та люмінесцентним тестом визначення концентрації АТФ.

Окрім врахування розміру та щільності пакування, визначення життєздатності клітин

часто супроводжується дисоціацією тривимірної структури чи руйнуванням каркаса 3D-структури з метою отримання поодиноких клітин. Це подовжує тривалість експерименту та спричиняє морфологічні зміни 3D-структури, що, у свою чергу, знижує точність оцінки життєздатності клітин і робить такі 3D-структури непридатними для подальших досліджень.

Уникнути цих недоліків дозволяє прижиттєва візуалізація аутофлуоресценції NADH та FAD клітин у складі 3D-структур [19, 63, 81], яка є неінвазивною і не використовує ендогенних барвників. Найбільш поширеними методами візуалізації флуоресценції клітин є конфокальна та багатофотонна мікроскопія. Ці методи дозволяють отримати оптичні зрізи тривимірної клітинної структури.

Обмежуючи виявлення сигналу однією геометричною площиною в тривимірній структурі, ми отримуємо зображення клітин у цій площині, яке схоже на зображення, отримане стандартними методами гістопатології. Однак, на відміну від гістологічних методів, отримання оптичних зображень не потребує жодної підготовки [11, 12], тобто є неінвазивним. Також ці методи характеризуються швидкістю та інформативністю. Далі, шляхом об'єднання зображень зі стеку, можна отримати тривимірну реконструкцію 3D-структури [66].

Слід відмітити, що порівняно з конфокальною, багатофотонна мікроскопія забезпечує більшу глибину проникнення світла, більш надійне та стабільне оптичне вирівнювання та підвищену чутливість до слабких флуорофорів [82]. Використання багатофотонної мікроскопії дозволяє приблизно в п'ять разів збільшити глибину зображення, порівняно з конфокальною [74].

Таким чином, використання аутофлуоресценції є перспективним методом неінвазивної оцінки життєздатності клітин у складних тривимірних структурах.

ОСОБЛИВОСТІ ВИБОРУ МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Кріоконсервування, яке є методом довготривалого зберігання клітин, водночас може спричинити суттєві структурні та функціональні пошкодження, зокрема мембранні, метаболічні й генетичні.

Тому оцінка життєздатності після відтавання є критично важливою як для визначення ефективності самого процесу кріоконсервування, так і для подальшого прогнозування функціональної активності клітин та їх придатності до використання. Різні методи оцінки життєздатності відображають різні аспекти стану клітин (мембранна цілісність, метаболічна активність, проліферативний потенціал тощо). Невірно обраний метод може призвести до отримання неточних або неповних результатів, що ускладнить інтерпретацію даних.

Вибір оптимального методу оцінки життєздатності клітин після кріоконсервування залежить від кількох ключових факторів, які визначають як специфічність методу, так і його відповідність поставленим цілям: наявних ресурсів (світлова або флуоресцентна мікроскопія, проточна цитометрія, спектрофотометрія тощо), типу клітин (нейральні, імунні, стовбурові, фібробласти) та специфічних особливостей, які потрібно враховувати під час вибору тесту.

Через високий рівень біологічної варіабельності різних типів клітин, універсального підходу для оцінки життєздатності не існує. Вибір відповідного методу оцінювання має бути обґрунтованим з урахуванням морфофункціональних властивостей клітин, чутливості до гіпотермічного та осмотичного стресу, вимог до збереження їхньої специфічної активності (проліферація, диференціація, здатність до імплантації або колонієутворення) та кінцевої мети дослідження.

Зазвичай при виборі методу оцінки життєздатності застосовується комбінований підхід, який включає щонайменше два комплементарні методи: оцінку цілісності мембрани (наприклад,

за допомогою Trypan Blue або PI) та оцінку метаболічної активності (МТТ, ХТТ, Alamar Blue). У випадках, коли життєздатність пов'язана з функціональною активністю (наприклад, у стовбурових клітин чи нейронів), необхідне додаткове проведення аналізу функціональної компетентності: здатності до диференціації, електрофізіологічної активності або колонієутворення. Такий підхід забезпечує не лише якісну, а й кількісну оцінку життєздатності, що особливо важливо у контексті біобанкінгу, регенеративної медицини та репродуктивних технологій.

Рекомендації щодо вибору методів оцінки життєздатності для різних типів клітин після кріоконсервування наведені в табл. 2.

Таким чином, вибір оптимального методу визначення життєздатності кріоконсервованих клітин є багатофакторним процесом, що враховує тип клітин, цілі дослідження, доступні ресурси та характер пошкоджень. Комбінація методів (наприклад, оцінка мембранної цілісності разом із тестами метаболічної або функціональної активності) дозволяє отримати найповнішу інформацію про стан кріоконсервованих клітин і забезпечити їх ефективне використання після розморожування.

ВИКОРИСТАННЯ НОВІТНІХ ТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ОЦІНКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН У КРІОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

У контексті стрімкого розвитку біомедичних технологій та зростання вимог до якості клітинного матеріалу проблема об'єктивної та відтворюваної оцінки життєздатності клітин після кріоконсервування набула нового значення. Традиційні методи, хоч і залишаються основою лабораторної діагностики, дедалі більше посту-

Таблиця 2. Рекомендовані показники для оцінки життєздатності різних типів клітин після кріоконсервування

Тип клітин	Мембранна цілісність	Метаболізм	Функціональність	Посилання
Стовбурові	+	+	++	6, 72, 80
Гемопоетичні	+	+	++	28, 45
Карциногенні	+	++	++	68, 73
Нейрони	+	++	++	43, 76
Статеві	++	+	++	13, 18, 77
Ембріони	+	+	++	33, 67

Примітка: + — помірний рівень прояву показника; ++ — високий рівень прояву показника.

паються місцем високоточним, мультипараметричним та автоматизованим технологіям, які дозволяють отримувати комплексну характеристику стану клітин. При цьому найбільш перспективним є використання проточної цитометрії, мікрофлюїдних технологій, гіперспектральної візуалізації та неінвазивної спектроскопії, а також інтеграція алгоритмів штучного інтелекту (ШІ) у методи визначення життєздатності клітин.

Сучасні проточні цитометри здатні оцінювати десятки параметрів одночасно на рівні окремих клітин [10]. У контексті кріобіології це особливо цінно, оскільки дозволяє диференціювати живі, апоптотичні та некротичні клітини з високою точністю. Крім класичного маркування FDA/PI, у практику активно впроваджуються маркери метаболічної активності (наприклад, Calcein-AM), мембранного потенціалу мітохондрій (JC-1), оксидативного стресу (CellROX) тощо. Використання кількох барвників одночасно дозволяє не лише фіксувати стан клітини на момент аналізу, а й оцінювати її потенціал для подальшого відновлення після розморожування.

Перевагами проточної цитометрії є висока точність, статистична достовірність та можливість аналізу великих популяцій клітин. Недоліками є висока вартість обладнання та потреба у кваліфікованому персоналі.

Мікрофлюїдні платформи («Lab-on-a-Chip»), які базуються на технології контролю та маніпулювання малими об'ємами рідин через інтегровані на чипі мікроканали, дозволяють моделювати мікрооточення клітини, точно контролюючи параметри середовища під час кріоконсервування і розморожування [23, 40, 44]. Завдяки можливості інтеграції сенсорів ці системи можуть безперервно відстежувати зміни рН, осмолярності, температури та безпосередньо фіксувати реакції клітин на ці зміни. Після розморожування клітини можна аналізувати *in situ*, не порушуючи їх просторову організацію.

Мікрофлюїдні платформи з гідрогелевими мікрокамерами дозволяють аналізувати поведінку поодиноких клітин, виявляти їх здатність до адгезії, проліферації та диференціації. Перевагами мікрофлюїдних технологій є висока чутливість, мінімізація стресу для клітин та можливість моделювання фізіологічних умов. Недоліками є технологічна складність, висока вартість та складнощі стандартизації методів.

Методи гіперспектральної візуалізації та неінвазивної спектроскопії дозволяють аналізувати клітини без застосування барвників, ґрунтуючись на природних характеристиках клітинного спектра [1, 42, 70]. Використовуючи гіперспектральну камеру або раманівську спектроскопію, можна визначити хімічний склад, рівень ліпідів, білків, нуклеїнових кислот та інших компонентів у реальному часі. У кріобіології це надзвичайно перспективно, оскільки дозволяє здійснювати багаторазовий контроль стану клітин без їх пошкодження. Перевагами є неінвазивність, висока інформативність і можливість довготривалого моніторингу; недоліками — висока вартість та потреба в складному програмному забезпеченні для обробки даних.

З розвитком ШІ логічним кроком стало його застосування для вдосконалення аналізу стану клітин. Впровадження ШІ відкриває нові горизонти для автоматизації, підвищення точності та розширення інформативності аналізу життєздатності клітин після кріоконсервування. Алгоритми глибинного навчання, зокрема, згорткові нейронні мережі (CNN), застосовуються для автоматичної ідентифікації життєздатних і нежиттєздатних клітин на основі мікроскопічних або флуоресцентних зображень. Завдяки сегментаційним моделям, таким як U-Net, Mask R-CNN, ШІ може точно і швидко ідентифікувати окремі клітини на зображеннях та підраховувати частку життєздатних [47].

Штучний інтелект ефективно використовується при обробці складних багатоканальних флуоресцентних зображень, аналізі великих масивів даних, виявленні тенденцій і закономірностей, що неможливо зробити шляхом ручного аналізу [3].

Останнім часом також з'явилась можливість використовувати ШІ для створення цифрових аватарів клітин [53], які імітують їх поведінку при кріоконсервуванні. Це дозволяє моделювати наслідки заморожування, передбачити виживання клітин за різних умов, мінімізувати кількість лабораторних експериментів.

Слід зазначити, що попри успіхи, широке впровадження ШІ для оцінки життєздатності клітин у кріобіології стикається з такими проблемами: необхідністю великих обсягів якісно анотованих даних для відпрацювання алгоритмів, забезпеченням інтерпретованості мо-

делей III, а також валідацією та стандартизацією розроблених підходів. Однак зі збільшенням кількості доступних біоінформатичних інструментів, розвитком відкритих баз даних і вдосконаленням моделей машинного навчання, у майбутньому III має потенціал стати стандартним інструментом оцінки життєздатності клітин у кріобіології, трансплантології, репродуктивній медицині та біобанкінгу.

Таким чином, впровадження інноваційних технологій у аналіз життєздатності клітин відкриває новий рівень точності, чутливості та функціонального розуміння клітинного стану після кріоконсервування.

ВИСНОВКИ

Оцінка життєздатності клітин є ключовим етапом у кріобіологічних дослідженнях, оскільки дозволяє об'єктивно визначити ефективність процедур кріоконсервування та придатність клітин до подальшого використання. Найвні методи оцінки базуються на аналізі різних фізіологічних параметрів — мембранної цілісності, метаболічної активності, функціонального стану — і мають як переваги, так і обмеження. Універсального методу для визначення життєздатності клітин не існує, оскільки жоден

із підходів не охоплює одночасно всі аспекти структурного й функціонального стану клітин. Тому найбільш інформативним вважається поєднання щонайменше двох взаємодоповнюючих методів, що забезпечує комплексну оцінку морфологічної цілісності, метаболічної активності та функціональної спроможності клітин. Особливі труднощі виникають під час аналізу тривимірних клітинних структур (сфероїдів, органоїдів, тканинних конструктів), у яких обмежена дифузія барвників, реагентів або кисню може спотворювати результати стандартних тестів. У таких випадках традиційні методи слід адаптувати або комбінувати з сучасними підходами, що базуються на флуоресцентній мікроскопії, метаболічному профілюванні або неінвазивних біофізичних вимірюваннях.

Інтеграція новітніх технологій — проточної цитометрії, мікрофлюїдних платформ, гіперспектральної візуалізації та алгоритмів штучного інтелекту — відкриває нові можливості для автоматизованої, точної та стандартизованої оцінки життєздатності клітин, що має вирішальне значення для розвитку кріобіології, біобанкінгу, регенеративної медицини та клітинної терапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Akbari S, Anderson P, Zang H, et al. Non-invasive real-time monitoring of cell concentration and viability using Doppler ultrasound. *SLAS Technol.* 2022; 27: 368—75.
2. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 2007; 22(5): 1304—9.
3. Ali M, Benfante V, Basirinia G, et al. Applications of artificial intelligence, deep learning, and machine learning to support the analysis of microscopic images of cells and tissues. *J Imaging.* [Internet]. 2025 Feb 15 [cited 2025 Oct 10]; 11(2): 59. Available from: <https://www.mdpi.com/2313-433X/11/2/59>
4. Asadian E, Bahramian F, Siavashy S, et al. A review on recent advances of AI-integrated microfluidics for analytical and bioanalytical applications. *TRAC-Trend Anal Chem.* [Internet]. 2024 Oct 9 [cited 2025 Oct 10]; 181 (Part B): 118004. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993624004874>
5. Atale N, Gupta S, Yadav UC, Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc.* 2014; 255(1): 7—19.
6. Baust JM, Van Buskirk, Baust JG. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36(4):262—70.
7. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11: 127—52.
8. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303(2): 474—82.
9. Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ. Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res.* 1976; 97(2): 275—80.
10. Cai Y, Prochazkova M, Kim YS, et al. Assessment and comparison of viability assays for cellular products. *Cytotherapy.* 2024; 26(2): 201—9.

11. Chandler DE, Roberson RW. Bioimaging: Current concepts in light and electron microscopy. Sudbury (MA): Jones & Bartlett Publishers; 2009.
12. Chatterjee S. Artefacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014; 18: S111—S116.
13. Clark NA, Swain JE. Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30(7):865—75.
14. Cory A, Owen T, Barltrop J, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991; 3(7): 207—12.
15. Datta R, Heaster TM, Sharick JT, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J Biomed Opt.* 2020; 25(7): 1—43.
16. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods.* 1988; 115: 61—9.
17. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986; 89(2): 271—7.
18. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol.* [Internet]. 2012 Dec 13 [cited 2025 Oct 10]; 2012: 854837. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/854837>
19. Dittmar R, Potier E, van Zandvoort M, Ito K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular auto-fluorescence. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012; 18(3): 198—204.
20. Fischer F, Hamann A, Osiewicz HD. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci.* 2012; 37(7): 284—92.
21. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2000; 41(4): 187—96.
22. Gao Z, Li Y. Enhancing single-cell biology through advanced AI-powered microfluidics. *Biomicrofluidics.* [Internet]. 2023 Oct 3 [cited 2025 Oct 10]; 17(5):051301. Available from: <https://pubs.aip.org/aip/bmf/article/17/5/051301/2914114/Enhancing-single-cell-biology-through-advanced-AI>
23. Gebreyesus ST, Muneer G, Huang C, et al. Recent advances in microfluidics for single-cell functional proteomics. *Lab Chip.* [Internet]. 2023 Feb 22 [cited 2025 October 10]; 23: 1726. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2023/lc/d2lc01096h>
24. Georgakoudi I, Quinn KP. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012; 14: 351—67.
25. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods.* 1995; 179(1): 95—103.
26. Green A, McElroy WD. Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. *Arch Biochem Biophys.* 1956; 64: 257—71.
27. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989; 119(2): 203—10.
28. Hornberger K, Yu G, McKenna D, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic stem cells: emerging assays, cryoprotectant agents, and technology to improve outcomes. *Transfus Med Hemother.* 2019;46(3):188—96.
29. Huang SA, Heikal AA, Webb WW. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J.* 2002; 82(5): 2811—25.
30. 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—9.
31. Kaja S, Payne AJ, Singh T, et al. An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015; 73: 1—6.
32. Karimi E, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Label-free and bioluminescence-based nano-biosensor for ATP detection. *Biosensors (Basel).* [Internet]. 2022 Oct 24 [cited 2025 Oct 10]; 2022; 12(11):918. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/11/918>
33. Keshavarzi S, Dokht Eftekhari A, Vahabzadeh H, et al. Post-warming survival rates and clinical outcomes of human cleavage stage embryos vitrified/warmed using CryoTouch and Cryotop methods. *Middle East Fertil Soc J.* [Internet]. 2021 Aug 13 [cited 2025 Oct 10]; 26: 24. Available from: <https://mefj.springeropen.com/articles/10.1186/s43043-021-00068-1>
34. Kim SI, Kim HJ, Lee HJ, et al. Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters. *Anal Biochem.* 2016; 492: 8—12.
35. Kolenc OI, Quinn KP. Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid Redox Signal.* 2019; 30(6): 875—89.
36. Kramer DN, Guilbault GG. A substrate for the fluorometric determination of lipase activity. *Anal Chem.* 1963; 35: 588—9.

37. Krause AW, Carley WW, Webb WW. Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. *J Histochem Cytochem.* 1984; 12(10): 1081—90.
38. Ley-Ngardigal S, Bertolin G. Approaches to monitor ATP levels in living cells: where do we stand? *FEBS J.* 2022; 289(24): 7940—69.
39. Lundin A. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods Enzymol.* 2000; 305: 346—70.
40. Luo T, Fan L, Zhu R, Sun D. Microfluidic single-cell manipulation and analysis: methods and applications. *Micromachines (Basel).* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2025 Oct 10]; 10(2):104. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-666X/10/2/104>
41. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science.* 1970; 168: 939—49.
42. Mehta N, Shaik S, Devireddy R, Gartia MR. Single-cell analysis using hyper spectral imaging modalities. *J Biomech Eng.* 2018; 140(2):0208021—02080216.
43. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells.* 2005;23(5):681—8.
44. Mingji W, Rongbiao Z, Fei Z, et al. An evaluation approach of cell viability based on cell detachment assay in a single-channel integrated microfluidic chip. *ACS Sensors.* 2019; 4(10):2654—61.
45. Morgenstern DA, Ahsan G, Brocklesby M, et al. Post-thaw viability of cryopreserved peripheral blood stem cells (PBSC) does not guarantee functional activity: important implications for quality assurance of stem cell transplant programmes. *Br J Haematol.* 2016;174(6):942—51.
46. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1—2): 55—63.
47. Park S, Veluvolu V, Martin WS, et al. Label-free, non-invasive, and repeatable cell viability bioassay using dynamic full-field optical coherence microscopy and supervised machine learning. *Biomed Opt Express.* 2022; 13(6):3187—94.
48. Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, et al. The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. *J Heterocycl Chem.* 1988; 25: 911—4.
49. Petrenko AY. [The current state and prospects for the development of cryobiology and cryomedicine]. *Visn Nac Acad Nauk Ukr.* 2023; (2): 75—8. Ukrainian.
50. Petrenko YA, Gorokhova NA, Tkachova EN, Petrenko AY. [The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria]. *Ukr Biokhim Zh.* 2005;77(5):100-5. Ukrainian.
51. Petrushko M, Piniayev V, Yurchuk T. The history of cryotechnologies in reproductive medicine: From randomness to stability. *Hist Sci Technol.* 2024; 14(2): 401—18.
52. Priest JH, Baxter LK, Priest RE. Cell attachment assay as a measure of thawed cell viability. *Cryobiology.* 1965; 1(5): 345—7.
53. Qian L, Dong Z, Guo T. Grow AI virtual cells: three data pillars and closed-loop learning. *Cell Res.* 2025; 35: 319—21.
54. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 2012; 12(9): 12347—60.
55. Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, et al. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 1995; 260: 406—14.
56. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell viability assays. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. [Cited 2025 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
57. Robbins E, Marcus PI. Dynamics of acridine orange-cell interaction: I. Interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. *J Cell Biol.* 1963; 18(2): 237—50.
58. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48(17): 4827—33.
59. Sengbusch GV, Couwenbergs C, Kuhner J, Muller U. Fluorogenic substrate turnover in single living cells. *Histochem J.* 1976; 8: 341—50.
60. Sivagnanam S, Mahato P, Das P. An overview on the development of different optical sensing platforms for adenosine triphosphate (ATP) recognition. *Org Biomol Chem.* 2023; 21(19):3942—83.
61. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* 2018; 120(3): 159—67.
62. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015; 111: A3.B.1—A3.B.3.
63. Sukach OM, Kovalenko IF, Vsevolodskaya SO, et al. Use of autofluorescence for visualization of viable neural cells in three-dimensional structures. *Bull Problems Biol Med.* 2024; (2): 154—8.

64. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 1986; 93(2): 157—65.
65. Taylor DL, Wang YL, editors. Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part B. Quantitative fluorescence microscopy—imaging and spectroscopy. *Methods in cell biology*. Vol. 30. San Diego: Academic Press; 1989. 502 p.
66. Trusk TC. 3D Reconstruction of confocal image data. In: Gray JW, Price RL, editors. *Basic Confocal Microscopy*. 2nd ed. Cham: Springer Nature; 2018. p. 279—307.
67. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006; 65(1): 236—44.
68. Valyi-Nagy K, Betsou F, Susma A, Valyi-Nagy T. Optimization of viable glioblastoma cryopreservation for establishment of primary tumor cell cultures. *Biopreserv biobank*. 2021; 19(1): 60—6.
69. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011; 731: 237—45.
70. Verrier S, Zoladek A, Notingher I. Raman micro-spectroscopy as a non-invasive cell viability test. *Methods Mol Biol*. 2011; 740: 179—89.
71. Vinci M, Gowan S, Boxall F, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*. [Internet]. 2012 March 22 [cited 2025 Oct 10]; 10(1): 29. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/1741-7007-10-29>
72. Wragg NM, Tampakis D, Stolzing A. Cryopreservation of mesenchymal stem cells using medical grade ice nucleation inducer. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 2020 Nov 13 [cited 2025 Oct 10]; 21(22):8579. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8579>
73. Wu SZ, Roden DL, Al-Eryani G, et al. Cryopreservation of human cancers conserves tumour heterogeneity for single-cell multi-omics analysis. *Genome Med*. [Internet]. 2021 May 10 [cited 2025 Oct 10]; 13:81. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13073-021-00885-z>
74. Wyckoff J, Gligorijevic B, Entenberg D, et al. High-resolution multiphoton imaging of tumors *in vivo*. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011; 2011(10): 1167—84.
75. Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2015; 71: 1—7.
76. Yamatoya K, Nagai Y, Teramoto N, et al. Cryopreservation of undifferentiated and differentiated human neuronal cells. *Reg Ther*. 2022; 19: 58—68.
77. Yurchuk T, Likso P, Witek K, et al. New approach to the cryopreservation of GV oocytes and cumulus cells through the lens of preserving the intercellular gap junctions based on the bovine model. *Int J Mol Sci*. [Internet]. 2024 May 31 [cited 2025 Oct 10]; 25(11):6074. <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/11/6074>
78. Yao N, Eisfelder BJ, Marvin J, Greenberg JT. The mitochondrion — An organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2004; 40: 596—610.
79. Younes N, Alsahan BS, Al-Mesaifri AJ, et al. JC-10 probe as a novel method for analyzing the mitochondrial membrane potential and cell stress in whole zebrafish embryos. *Toxicol Res (Camb)*. 2021; 11(1): 77—87.
80. Zaikov VS, Tarusin DN, Petrenko AY. Effect of Encapsulation into alginate microspheres on viability of mesenchymal stromal cells after exposure with penetrating cryoprotectants. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2016; 26(3): 213—20.
81. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, et al. 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*. [Internet]. 2024 Oct 9 [cited 2025 Oct 10]; 6: 19103. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep19103>
82. Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*. 2003; 21: 1369—77.

Отримано 03.01.2025

Прийнято до друку 20.11.2025

О.М. Сукач *, О.Р. Майорова

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

* an_sukach@ukr.net

USE OF METHODS FOR DETERMINING CELL VIABILITY IN CRYOBIOLOGICAL RESEARCH

Assessment of cell viability is critically important in the context of cryobiological research, as it allows determining the effectiveness of freeze-thawing procedures and low-temperature storage of isolated cells. The review systematizes the methods for determining cell viability used in cryobiological research, with an emphasis on their practical applicability, accuracy, and sensitivity. Both traditional methods based on the assessment of cell membrane integrity and metabolic

activity, such as trypan blue staining, MTT assay, fluorescent dye assays, and more modern approaches, including flow cytometry, confocal microscopy, and methods for assessing cell functional activity, are reviewed. For each method, a description of the mechanism of action, a protocol, specific advantages, disadvantages, as well as equipment requirements and limitations for cell types are provided. A comparative analysis was conducted, which revealed the lack of a universal approach, but demonstrated the effectiveness of combined methods that combine fluorescent staining and metabolic assessment. Such combinations allow for high accuracy in assessing cell viability after cryopreservation. In addition, the review discusses the prospects for the development of methods for determining cell viability in cryobiology, including the introduction of the latest high-resolution imaging technologies, multiparametric analysis, as well as integration with microfluidic platforms and artificial intelligence to automate and improve the accuracy of the assessment. The review can serve as a practical tool for researchers in choosing the most optimal approach for assessing cell viability depending on the purpose of the experiment, available resources and cell type.

Key words: cryobiology, cell viability, cryopreservation, dye exclusion method, colorimetric method, fluorescent dyes, luminometric assays, cultivation.