

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-423-432

UDC 576:602

Rogulska O. Yu., Bozhok G. A., Trufanova N. A., Revenko O. B.,

Pakhomov O. V., Cherkashina D. V., Petrenko O. Yu.

FORMATION OF SPHEROIDS FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS BY THE HANGING DROP METHOD

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

bozhokgaru@gmail.com

Spheroids from mesenchymal stromal cells (MSCs) of human adipose tissue are a promising source of autologous stem cells that are easy to obtain, cryopreserve, store, and use as needed. The present study aimed to determine the optimal modes of obtaining spheroids from human adipose tissue MSCs by the hanging drop method.

The study used MSCs from 3-4 passages of human adipose tissue at seeding concentrations of 1, 3, 5, 7 and 10×10^3 cells/drop. MSCs were cultivated in a 30 μ L hanging drop at 37°C and 5% CO₂ for 72 hours. The morphological properties, size, number of spheroids formed, and viability of cells in their composition were evaluated depending on the seeding concentration of cells.

The results showed that at seeding concentrations of 1, 3, 5, and 7×10^3 cells/drop, the process of spheroid formation was completed within 72 hours of cultivation, while at the seeding concentration of 10×10^3 cells/drop – it was completed within 48 hours. The average diameter of the formed spheroid was positively correlated with the initial concentration of MSCs, with about 90% of cells in spheroids formed at concentrations of 1, 3 and 5×10^3 cells/drop remaining viable, while at seeding concentrations of 7 and 10×10^3 cells/drop there was a significant decrease in cell viability.

Based on a comprehensive analysis of the data obtained, the optimal conditions for spheroid formation from human adipose tissue MSCs by the hanging drop method are using a seeding concentration of $3-5 \times 10^3$ cells/drop and a culture period of 72 hours.

Key words: mesenchymal stromal cells, adipose tissue, 3D-culture, spheroids, hanging drop, cell viability.

Connection of the publication with planned research works.

The study was carried out within the framework of the project of the National Research Fund of Ukraine No. 2021.01/0276 "Therapeutic potential and safety of three-dimensional structures based on mesenchymal stem cells for the treatment of non-healing wounds."

Introduction.

The last decades have been characterized by an increased demand of a wide range of researchers for 3D cell cultures. This is due to the fact that 3D cultures mimic the conditions of cell life in the body and, compared to monolayer cultivation, better reflect a number of proliferative, regulatory, and metabolic processes that occur in vivo [1]. This provides a unique opportunity to obtain reliable data on cell proliferation and differentiation patterns, intercellular interactions, and pathophysiological processes underlying hereditary and acquired diseases.

Another advantage of 3D cultures is that they can better predict the efficacy and toxicity of therapeutic agents, especially anticancer drugs, than monolayer cultures [2]. This greatly reduces the cost of developing drugs and treatments for serious diseases [3].

The use of 3D cultures of mesenchymal stromal cells (MSCs) as potential therapeutic agents is a great prospect. However, when maintained in a monolayer, MSCs eventually lose their ability to proliferate and form colonies. In addition, compared to 2D culture, MSCs in spheroids have a wider range of gene expression, including activation of genes related to redox potential,

resistance to hypoxia and stress, angiogenesis, inflammation, etc. [3].

Spheroidal cultures have been shown to improve the efficacy of MSC-based therapeutic agents [4]. Compared to 2D cultures, spheroidal MSC cultures are characterized by enhanced anti-inflammatory, regenerative, and reparative effects and better survival after transplantation. For example, MSC spheroids derived from human adipose tissue produce increased extracellular matrix proteins, exhibit stronger antiapoptotic and antioxidant abilities, increase paracrine cytokine secretion, and stimulate vascularization. Animal experiments show obvious effects in the repair of refractory wounds, ischemic injury repair, and tissue remodeling, so spheroidal MSC cultures have significant clinical prospects [3, 4].

There are various methods for obtaining spheroids: the hanging drop method; cultivation on low-adhesive surfaces or matrices with specified properties (hydrogels, films, nano- and microparticles, beads); magnetic levitation; cultivation in constant rotation bioreactors, etc. Among all these, the hanging drop method allows for the best standardization of the linear dimensions of spheroids and the number of cells in their composition.

One problem that arises when using 3D cultures is the limited diffusion of nutrients, gases, and metabolites in the central part of the spheroid, which results in cell necrosis. Therefore, for using 3D culture methods, it is important to determine the optimal conditions for spheroid formation to produce viable and functionally active spheroids without necrotic inclusions.

The aim of the study.



Figure 1 – Appearance of a Petri dish with hanging drops.

To determine the effect of the seeding concentration of MSCs from human adipose tissue and the term of their cultivation in a hanging drop on the viability and morphological properties of spheroids.

Object and research methods.

Obtaining and using MSCs from human adipose tissue was carried out with the written consent of informed donors in accordance with the recommendations of the Helsinki Declaration of the World Medical Association on conducting biomedical research. Cells were previously cultured for 3-4 passages in adhesive conditions. Cultivation was carried out in α -MEM nutrient medium («Biowest», France or «Thermo Fisher Scientific», USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 μ g/ml streptomycin and 50 units/ml penicillin («Arterium», Ukraine or «Thermo Fisher Scientific», USA) and 10% fetal calf serum (FCS, «Biowest», France or «Thermo Fisher Scientific», USA).

Cells were cultivated in a CO₂ incubator at 37°C and 5% CO₂. The culture medium was completely replaced every 3-4 days. After cell cultures reached a 70% monolayer, they were detached from the surface using a trypsin (0.25%)/EDTA (0.05%) mixture («Biowest», France or «Life Technologies», USA). MSCs were washed in nutrient medium by centrifugation. MSCs were resuspended in the above nutrient medium. The obtained suspension was used in further experiments.

The hanging drop method was used to obtain MSC spheroids [5]. For this purpose, 30 μ l drops of MSC suspension with a concentration of 1, 3, 5, 7, 10 $\times$ 10³ cells/drop were applied to the upper part of a 10 cm diameter Petri dish («SPL Life Sciences», Korea). 10 ml of nutrient medium was placed in the lower part of the Petri dish to maintain humidity during cultivation. After applying the drops, the lid was turned over and the lower part of the Petri dish was covered with it (fig. 1). The Petri dish was returned to the CO₂ incubator and cultured at 37°C and 5% CO₂.

A CETI EpiFluor inverted microscope («CETI», Belgium) equipped with a Nikon CoolPix 4500 digital camera was used to observe the process of spheroid formation. The obtained images were analyzed in Zeiss LSM Image Examiner ver. 4.2.0.121. The morphological properties, size and number of formed spheroids were evaluated depending on the day of cultivation and the seeding concentration of cells.

To assess the viability of the cells in the spheroid after 72 hours of cultivation, it was disintegrated by 15-minute exposure to trypsin (0.25%)/EDTA (0.05%) solution («Biowest», France or «Life Technologies», USA) with constant stirring. The resulting cell suspension was evaluated using the trypan blue vital staining method («Sigma», USA).

Statistica 10 software («StatSoft», USA) was used for statistical data analysis. The results were presented as Me (Q1; Q3) (Me – median, Q1 – 1st quartile; Q3 – 3rd quartile) or as Me $\pm$ IP (Me – median, IP – interquartile range, which was equal to the difference between the 3rd and 1st order quartiles). The statistical significance of differences between groups was assessed using the nonparametric Mann-Whitney test with the Bonferroni correction. Differences were considered statistically significant at p<0.05.

Research results and their discussion.

To determine the optimal conditions for the formation of spheroids by the hanging drop method, a number of seed concentrations of MSCs were tested. After 24 hours of cultivation at a

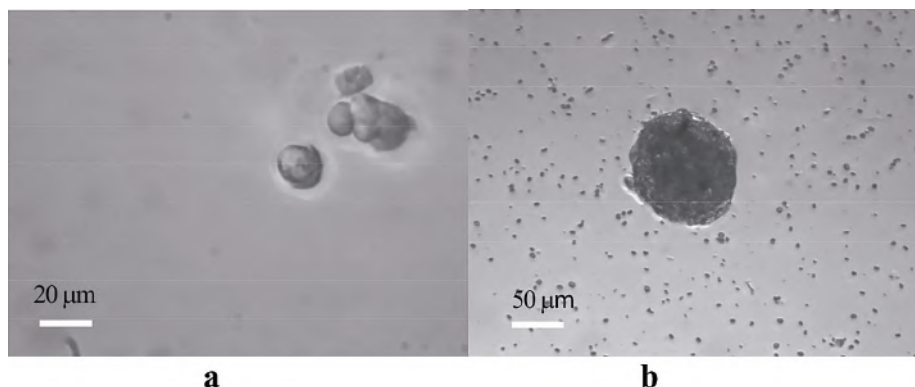


Figure 2 – Formation of a spheroid in a hanging drop during 24 (a) and 72 (b) hours of cultivation at a MSC concentration of 1 $\times$ 10³ cells/drop.

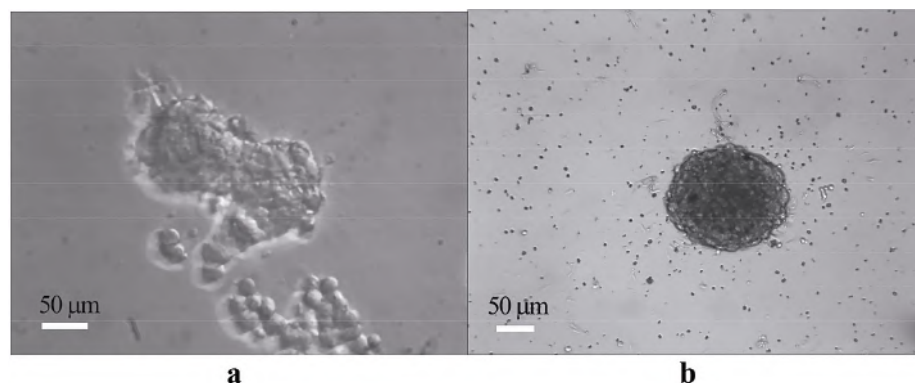


Figure 3 – Spheroid formation in a hanging drop during 24 (a) and 72 (b) hours of cultivation at the concentration of MSCs 3 $\times$ 10³ cells/drop.

concentration of 1×10^3 cells/drop, single cells and small loose aggregates consisting of 5-20 cells were observed (**fig. 2a**). At the next time of cultivation, one spheroid was formed for 72 hours (**fig. 2b**), but the process of its compaction was incomplete. It should also be noted that a small number of single cells remained suspended in the drop.

At seeding concentrations of 3, 5, and 7×10^3 cells/drop, many aggregates of different sizes and densities were formed after 24 hours; single cells were also present. Large aggregates began to take on a compact appearance at this cultivation time and merge (**fig. 3-5, a**). In the next 48 hours, the aggregates continued to merge. This process was more active in samples with 5 and 7×10^3 cells/drop concentrations. At the 72nd hour, merging and compacting the aggregates ended with forming one spheroid (**fig. 3-5, b**). Damaged cells were usually not included in the aggregates.

In the case of using the maximum seeding concentration (10×10^3 cells/drop), the stages of spheroid formation were similar, but a large compacted spheroid was formed after 48 hours of cultivation (**fig. 6**).

The results of determining the diameter of aggregates/spheroids during cultivation are shown in **figure 7**. At seeding concentrations of 1, 3, 5 and 7×10^3 cells/drop, the spheroid formation process was completed within 72 hours of cultivation, while at the seeding concentration of 10×10^3 cells/drop – it was completed within 48 hours. The average diameter of the formed spheroid was positively correlated with the initial concentration of MSCs (**table**). At the minimum concentration, the average diameter of the spheroid was about 65 μm , while at the maximum concentration (7 and 10×10^3 cells/drop) it was 277-290 μm . In the samples with seeding concentrations of 3 and 5×10^3 cells/drop, the average diameter of the spheroid was about 143-195 μm .

Trypan blue staining showed that after 72 hours of cultivation, about 90% of the cells in the spheroids formed at concentrations of 1, 3, and 5×10^3 cells/drop remained viable (**table**). However, at the seeding concentration of 7 and 10×10^3 cells/drop, there was a significant decrease in the viability of cells in the spheroid, which is explained by a decrease in the diffusion of nutrients in a large spheroid and the accumulation of end products of metabolism in a small volume of the hanging drop due to the large number of seeded cells.

The approach presented in the work uses the so-called scaffold-free technology for obtaining cellular

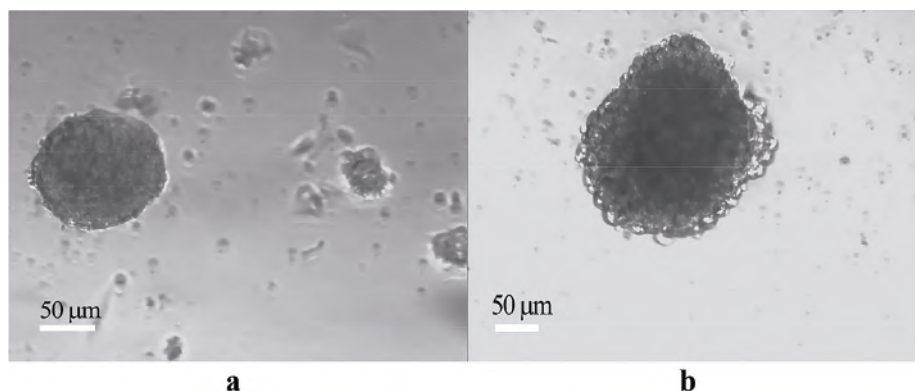


Figure 4 – Spheroid formation in a hanging drop during 24 (a) and 72 (b) hours of cultivation at the concentration of MSCs 5×10^3 cells/drop.

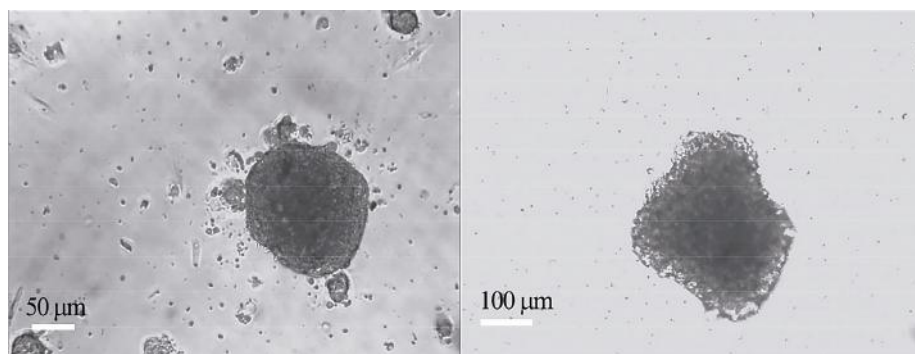


Figure 5 – Spheroid formation in a hanging drop during 24 (a) and 72 (b) hours of cultivation at the concentration of MSCs 7×10^3 cells/drop.

spheroids. It should be noted that not all types of cells form compact spheroids using this method [6]. While in a hanging drop, cells sink to the bottom of the drop due to gravity and join together to form an aggregate. At the same time, the rounded lower part of the hanging drop provides conditions for the formation of an aggregate in which the cells do not have the opportunity to attach to the substrate, so they react with each other [7]. In the works of Bartosh T. et al. [5, 8] it was shown that in a hanging drop during the first 1–2 hours, bone marrow MSCs were concentrated at the bottom of the drop. Then, numerous small aggregates were formed, gradually merging into a single central spheroid along the lower surface of the drop. After formation, the spheroid did not increase in size but gradually compacted between 48 and 96 hours [5, 8]. The results of our research on

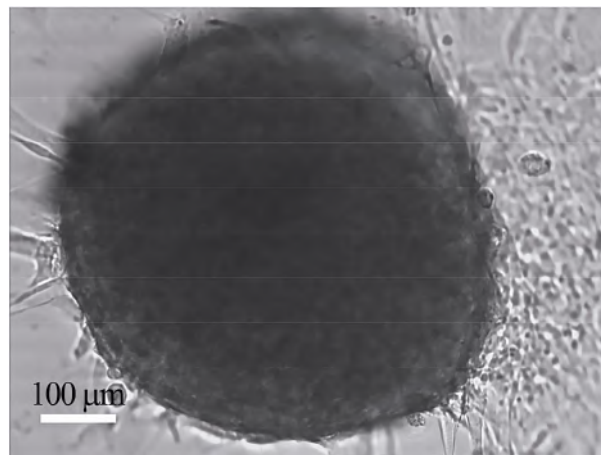


Figure 6 – Spheroid formation in a hanging drop during 48 hours of cultivation at the concentration of MSCs 10×10^3 cells/drop.

Table – Morphofunctional properties of spheroids formed in 72 hours in a hanging drop at different seeding concentrations of MSCs (Me (Q1; Q3))

MSC concentration, cells/drop	1×10 ³	3×10 ³	5×10 ³	7×10 ³	10×10 ³
Average diameter, μm	65 (60; 69)	143 (135; 153)*	195 (188; 198)*	277 (270; 289)*	290 (285; 298)*
Cell viability, %	91 (83; 95)	88 (83; 93)	87 (81; 93)	66 (62; 70)*	60 (55; 65)*

Note: * – differences are significant compared to 1×10³ cell/drop.

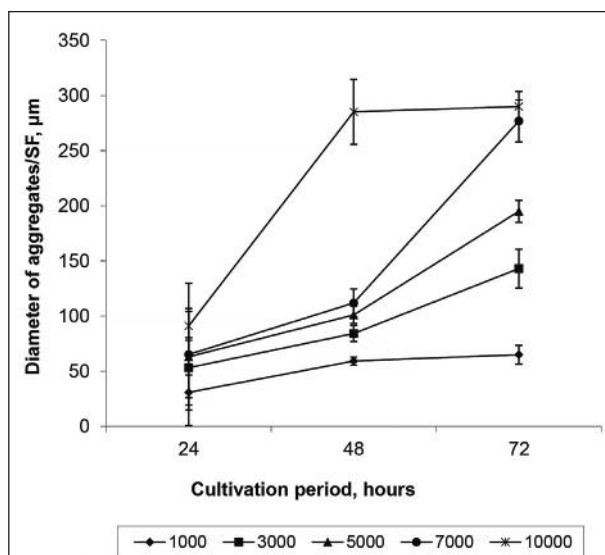


Figure 7 – Change in the average size of the aggregates during cultivation for 72 hours depending on the seed concentration of MSCs.

the stages of spheroid formation from MSCs of adipose tissue confirm the data of Bartosh T. et al. [5, 8].

Despite the great popularity of 3D cultures, few works in modern scientific literature consider the influence of the initial concentration of cells on the morphofunctional properties of spheroids from MSCs of human adipose tissue. In the work of Hashemibeni B. et al. [9], spheroids were obtained by the hanging drop method from MSCs of human adipose tissue, using a cell concentration of 1.5×10³ cells per drop with a volume of 20

μl. However, the authors did not detail the influence of the initial cell concentration on the cells' viability in the formed spheroid's composition. In a study by Kapur S.K. et al. [10] to obtain spheroids, MSCs of human adipose tissue of the 5th passage were used in seeding concentrations of 1, 2, 3 and 5×10⁴ cell/drop, while after 24–48 hours, the formed aggregates were transferred to a tablet with low surface adhesion. It is interesting that the authors observed the merging of aggregates already after transfer to the tablet. Shen F.H. et al. [11] also used the transfer of the aggregate formed in a drop to a low-adhesive tablet, while the seeding concentration of cells was 5×10⁴ cells per drop with a volume of 40 μl. Obviously, the high initial concentration of cells used in these works accelerated the formation of spheroids (24–48 hours), however, the transfer of spheroids to a low-adhesive plate is an additional step that complicates their preparation.

Our experiments showed that the size of the spheroids depended on the number of MSCs suspended in the hanging drop. At the same time, seeding concentrations of 3 and 5×10³ cells/drop turned out to be optimal for obtaining after 72 hours spheroids with a diameter of about 143–195 μm with high cell viability in their composition.

Conclusions.

Thus, optimal conditions for forming spheroids in a hanging drop from MSCs obtained from human adipose tissue were established, including the use of a seeding concentration of 3–5×10³ cells/drop and a cultivation period of 72 hours.

Prospects for further research.

MSC spheroids from human adipose tissue are a promising source of autologous stem cells that are easy to obtain, cryopreserve, store, and use as needed. The established cultivation parameters are essential for the further development and standardization of protocols for obtaining spheroids from MSCs of human adipose tissue for experimental and clinical use.

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-423-432

УДК 576:602

Розульська О. Ю., Божок Г. А., Труфанова Н. А., Ревенко О. Б.,

Пахомов О. В., Черкашина Д. В., Петренко О. Ю.

ФОРМУВАННЯ СФЕРОЇДІВ З МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЛЮДИНИ МЕТОДОМ ВИСЯЧОЇ КРАПЛІ

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

bozhokgaru@gmail.com

Сфероїди з мезенхімальних стромальних клітин (МСК) жирової тканини людини є перспективним джерелом аутологічних стовбурових клітин, які легко отримати, кріоконсервувати, зберігати та використовувати за потребою. Представлене дослідження було спрямоване на визначення оптимальних режимів отримання сфероїдів з МСК жирової тканини людини методом висячої краплі.

У роботі були використані МСК з жирової тканини людини 3-4 пасажу в посівних концентраціях 1, 3, 5, 7 та 10×10³ кл./краплю. Культивування МСК проводили у висячій краплі об'ємом 30 мкл при 37°C та 5% CO₂ протягом 72 годин. Оцінювали морфологічні властивості, розмір, кількість сформованих сфероїдів та життєздатність клітин у їхньому складі в залежності від посівної концентрації клітин.

Результати досліджень показали, що за посівних концентрацій 1, 3, 5 та 7×10³ кл./краплю процес сфероїдоутворення завершувався протягом 72 годин культивування, тоді як за посівної концентрації

10×10³ кл/краплю – за 48 годин. Середній діаметр сформованого сфероїду позитивно корелював з вихідною концентрацією МСК, при цьому близько 90% клітин у складі сфероїдів, утворених за концентрацій 1, 3 та 5×10³ кл/краплю, залишались життєздатними, тоді як за посівних концентрацій 7 та 10×10³ кл/краплю відбувалося значне падіння життєздатності клітин.

Зважаючи на комплексний аналіз отриманих даних, оптимальними умовами сфероїдоутворення з МСК жирової тканини людини методом висячої краплі є використання посівної концентрації 3–5×10³ клітин/краплю та термін культивування 72 години.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, жирова тканина, 3D-культивування, сфероїди, висяча крапля, життєздатність клітин.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконано в рамках проєкту Національного фонду досліджень України № 2021.01/0276 «Терапевтичний потенціал і безпечність тривимірних конструкцій на основі мезенхімальних стовбурових клітин для лікування ран, що не загоюються».

Вступ.

Останні десятиріччя характеризуються підвищеним попитом широкого кола дослідників у 3D-культурах клітин. Це пов'язане з тим, що 3D-культури імітують умови життя клітин в організмі та, порівняно з моношаровим культивуванням, краще відображають низку проліферативних, регуляторних та метаболічних процесів, які відбуваються *in vivo* [1]. Це дає унікальну можливість отримувати достовірні дані про закономірності проліферації та диференціювання клітин, міжклітинні взаємодії, патофізіологічні процеси, що лежать в основі спадкових та набутих захворювань.

Ще одна з переваг 3D-культур полягає у тому, що вони можуть краще, ніж моношарові культури, передбачати ефективність та токсичність терапевтичних засобів, особливо протипухлинних препаратів [2]. Це значною мірою сприяє скороченню витрат на розробку препаратів та методів лікування тяжких захворювань [3].

Велика перспектива полягає у використанні 3D-культур мезенхімальних стромальних клітин (МСК) у якості потенційних терапевтичних засобів. Однак за умов підтримки у моношарі у МСК з часом знижуються здатність до проліферації та формування колоній. Крім того, порівняно з 2D-культурою, МСК у сфероїдах мають більш широкий спектр експресії генів, включаючи активацію генів, пов'язаних із окисно-відновним потенціалом, стійкістю до гіпоксії та стресу, ангіогенезом, запаленням тощо [3].

Встановлено, що сфероїдні культури покращують ефективність терапевтичних засобів на основі МСК [4]. У порівнянні з 2D-культурами сфероїдні культури МСК характеризуються посиленням протизапального, регенеративного та репаративного ефектів, а також кращою виживаністю після трансплантації. Наприклад, сфероїди МСК, отримані з жирової тканини людини, продукують підвищену кількість білків екстраклітинного матриксу, виявляють сильніші антиапоптотичні та антиоксидантні здібності та збільшують паракринну секрецію цитокінів, стимулюють васкуляризацію. Експерименти на тваринах показують очевидні ефекти у відновленні рефрактерних ран, відновленні ішемічного пошкодження та ремоделюванні тканин, тому сфероїдні культури МСК мають значну клінічну перспективу [3, 4].

Існують різні методи отримання сфероїдів: метод висячої краплі; культивування на низькоадгезивних поверхнях або матрицях із заданими властивостями (гідрогелі, плівки, нано- та мікрочастинки, кульки); магнітна левітація; культивування у біореакторах із постійним обертанням тощо [4]. Серед усіх перелічених, метод висячої краплі дозволяє найкращим чином стандартизувати лінійні розміри сфероїдів та кількість клітин у їхньому складі.

Однією з проблем, які постають при застосуванні 3D-культур, є обмежена дифузія поживних речовин, газів та метаболітів у центральній частині сфероїда, внаслідок чого розвивається некроз її клітин. Отже, для використання методів тривимірного культивування є важливим визначення оптимальних умов сфероїдоутворення, які дозволять отримати життєздатні та функціонально-активні сфероїди без некротичних включень.

Мета дослідження.

Визначення впливу посівної концентрації МСК з жирової тканини людини та терміну їх культивування у висячої краплі на життєздатність та морфологічні властивості сфероїдів.

Об'єкт і методи дослідження.

Отримання та використання МСК з жирової тканини людини проводилося з письмової згоди проінформованих донорів згідно з рекомендаціями Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з проведення біомедичних досліджень. Клітини попередньо культивували протягом 3–4 пасажів у адгезивних умовах. Культивування проводили у живильному середовищі α -MEM («Biowest», Франція або «Thermo Fisher Scientific», США), доповненому 2 мМ L-глутаміну, 50 мкг/мл стрептоміцину та 50 од/мл пеніциліну («Arterium», Україна або «Thermo Fisher Scientific», США) та 10% фетальної телячої сироватки (ФТС, «Biowest», Франція чи «Thermo Fisher Scientific», США). Клітини культивували у CO₂-інкубаторі при 37°C та 5% CO₂. Повну заміну середовища культивування проводили кожні 3–4 дні. Після досягнення клітинними культурами 70%-ого моношару їх відкріпляли від поверхні за допомогою суміші трипсин (0,25%)/ЕДТА (0,05%) («Biowest», Франція або «Life Technologies», США). МСК відмивали у живильному середовищі шляхом центрифугування. Ресуспендували МСК у вищезазначеному живильному середовищі. Отриману суспензію використовували у подальших експериментах.

Для отримання сфероїдів МСК використовували метод висячої краплі [5]. Для цього на верхню частину чашки Петрі діаметром 10 см («SPL Life Sciences», Корея) наносили краплі об'ємом 30 мкл із суспензією МСК з концентрацією 1, 3, 5, 7, 10×10³ кл/краплю. У нижню частину чашки Петрі приміщали 10 мл жи-



Рисунки 1 – Зовнішній вигляд чашки Петрі з висячими краплями.

вільного середовища для підтримання вологості при культивуванні. Після нанесення крапель кришку перевертали та закривали нею нижню частину чашки Петрі (рис. 1). Повертали чашку Петрі у CO_2 -інкубатор та культивували при 37°C та $5\% \text{CO}_2$.

Для спостереження за процесом сфероїдоутворення використовували інвертований мікроскоп CETI EpiFluor («CETI», Бельгія), обладнаний цифровою камерою Nikon CoolPix 4500. Отримані зображення аналізували в програмі Zeiss LSM Image Examiner ver. 4.2.0.121. Оцінювали морфологічні властивості, розмір і кількість сформованих сфероїдів в залежності від доби культивування і посівної концентрації клітин.

Для оцінки життєздатності клітин у складі сфероїда після 72 годин культивування його дезінтегрували

шляхом 15-хвилинної експозиції в розчині трипсин ($0,25\%$)/ЕДТА ($0,05\%$) («Biowest», Франція або «Life Technologies», США) із постійним помішуванням. Отриману суспензію клітин оцінювали за допомогою методу вітального забарвлення трипановим синім («Sigma», США).

Для статистичного аналізу даних використовували програму Statistica 10 («StatSoft», США). Результати представляли у вигляді Me (Q1; Q3) (Me – медіана, Q1 – 1-й квантиль; Q3 – 3-й квантиль) або у вигляді $\text{Me} \pm \text{IP}$ (Me – медіана, IP – інтерквартильний розмах, який дорівнював різниці між квантилями 3 і 1 порядку). Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

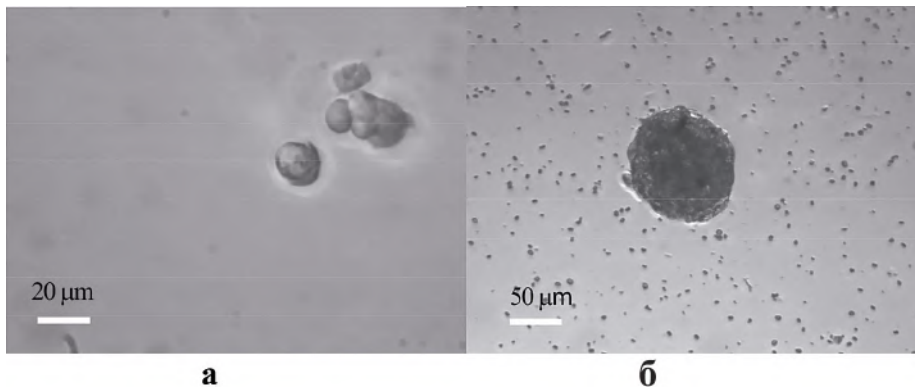
Для визначення оптимальних умов формування сфероїдів методом висячої краплі було апробовано ряд посівних концентрацій МСК. Після 24 годин культивування за концентрації 1×10^3 кл/краплю спостерігалися поодинокі клітини та невеликі пухкі агрегати, які складалися з 5-20 клітин (рис. 2а). На наступному терміні культивування впродовж 72 годин формувалася один сфероїд (рис. 2б), однак процес його компактизації був незавершеним. Також потрібно відзначити, що поодинокі клітини у невеликій кількості залишалися зваженими у краплі.

За посівних концентрацій 3, 5 та 7×10^3 кл/краплю через 24 години формувалося багато агрегатів різного розміру та щільності; поодинокі клітини теж були присутні. Крупні агрегати починали набувати ущільнений вигляд на цьому терміні культивування

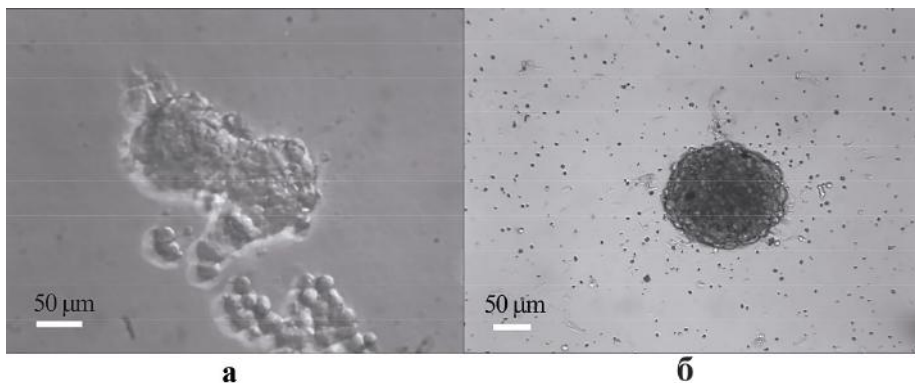
та зливатися один з одним (рис. 3-5, а). У наступні 48 годин агрегати продовжували злиття. Активніше цей процес протікав у зразках із концентрацією 5 та 7×10^3 кл/краплю. На 72 годину процес злиття та ущільнення агрегатів закінчувався формуванням одного сфероїда (рис. 3-5, б). Пошкоджені клітини зазвичай не включалися у агрегати.

У разі використання максимальної посівної концентрації (10×10^3 кл/краплю) етапи сфероїдоутворення були подібними, але великий ущільнений сфероїд формувалася вже після 48 годин культивування (рис. 6).

Результати визначення діаметру агрегатів/сфероїдів протягом культивування представлено на рисунку 7. За посівних концентрацій 1, 3, 5 та 7×10^3 кл/краплю процес сфероїдоутворення завершувався протягом 72 годин культивування, тоді як за посівної



Рисунки 2 – Формування сфероїду у висячій краплі протягом 24 (а) та 72 (б) години культивування за концентрації МСК 1×10^3 кл/краплю.



Рисунки 3 – Формування сфероїду у висячій краплі протягом 24 (а) та 72 (б) години культивування за концентрації МСК 3×10^3 кл/краплю.

концентрації 10×10^3 кл/краплю – за 48 годин. Середній діаметр сформованого сфероїду позитивно корелював з вихідною концентрацією МСК (таблиця). За мінімальної концентрації середній діаметр сфероїду складав близько 65 мкм, тоді як за максимальних (7 та 10×10^3 кл/краплю) – 277–290 мкм. У зразках з посівними концентраціями 3 та 5×10^3 кл/краплю середній діаметр сфероїду дорівнював близько 143–195 мкм.

Забарвлення трипановим синім показало, що після 72 годин культивування близько 90% клітин у складі сфероїдів, утворених за концентрацій 1, 3 та 5×10^3 кл/краплю залишалася життєздатною (таблиця). Однак за посівної концентрації 7 та 10×10^3 кл/краплю відбувалося значне падіння життєздатності клітин у складі сфероїду, що пояснюється зниженням дифузії поживних речовин у великому за розміром сфероїді та накопиченням кінцевих продуктів обміну в умовах невеликого об'єму висячої краплі внаслідок великої кількості посівних клітин.

Представлений у роботі підхід використовує так звану безкаркасну (scaffold-free) технологію отримання клітинних сфероїдів. Потрібно відзначити, що не всі типи клітин утворюють компактні сфероїди за допомогою цього методу [6]. Під час перебування у висячій краплі клітини опускаються на дно краплі завдяки гравітації та з'єднуються разом, утворюючи агрегат. При цьому заокруглена нижня частина висячої краплі забезпечує умови для утворення агрегату, в яких клітини не мають можливості прикріплюватися до субстрату, тому вони реагують між собою [7]. У роботах Bartosh T. та співавт. [5, 8] було показано, що у висячій краплі протягом перших 1–2 годин МСК кісткового мозку концентрувалися на дні краплі. Потім утворювалися численні дрібні агрегати, які поступово об'єднувалися в єдиний центральний сфероїд уздовж нижньої поверхні краплі. Після формування сфероїд не збільшувався в розмірах, а поступово ущільнювався між 48 і 96 годинами [5, 8]. Результати наших досліджень щодо етапів сфероїдоутворення з МСК жирової тканини підтверджують дані Bartosh T. та співавт. [5, 8].

Незважаючи на велику популярність 3D-культур, у сучасній науковій літературі є небагато робіт, в яких розглянуто вплив вихідної концентрації клітин на морфофункціональні властивості сфероїдів з МСК жирової тканини людини. У роботі Hashemibeni B. та співавт. [9] було отримано сфероїди методом висячої краплі з МСК жирової тканини людини, вико-

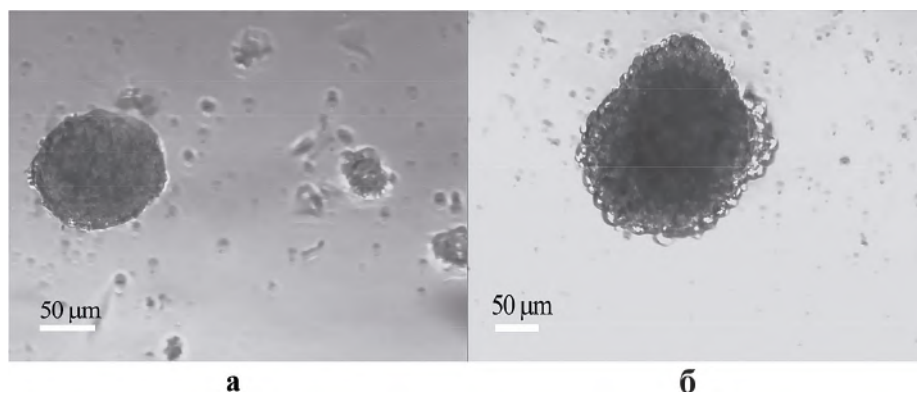


Рисунок 4 – Формування сфероїду у висячій краплі протягом 24 (а) та 72 (б) години культивування за концентрації МСК 5×10^3 кл/краплю.

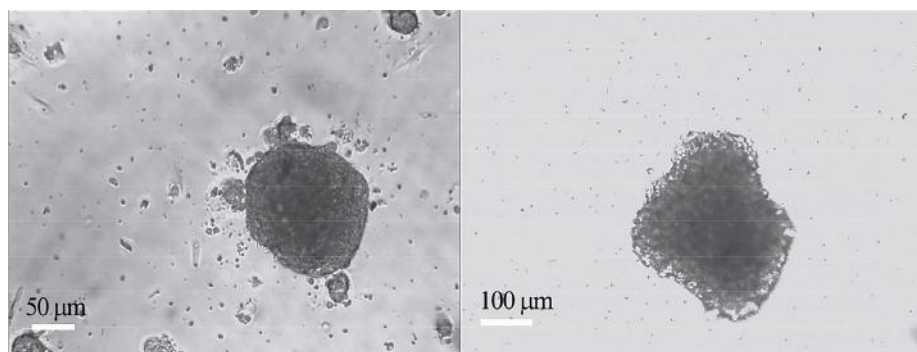


Рисунок 5 – Формування сфероїду у висячій краплі протягом 24 (а) та 72 (б) години культивування за концентрації МСК 7×10^3 кл/краплю.

ристовуючи концентрацію клітин $1,5 \times 10^3$ клітин на краплю об'ємом 20 мкл. Однак автори детально не вивчали вплив вихідної клітинної концентрації на життєздатність клітин у складі утвореного сфероїду. У дослідженні Karur S.K. та співавт. [10] для отримання сфероїдів використовували МСК жирової тканини людини 5-го пасажу у посівних концентраціях 1, 2, 3 та 5×10^4 кл/краплю, при цьому після 24–48 годин утворені агрегати переносили у планшет з низькою адгезією поверхні. Цікаво, що злиття агрегатів автори спостерігали вже після перенесення у планшет. Shen F.H. та співавт. [11] теж використовували перенесення агрегата, сформованого у краплі, до низькоадгезивного планшета, при цьому посівна концентрація клітин була 5×10^4 клітин на краплю об'ємом 40 мкл. Вочевидь, велика вихідна концентрація клітин, ви-

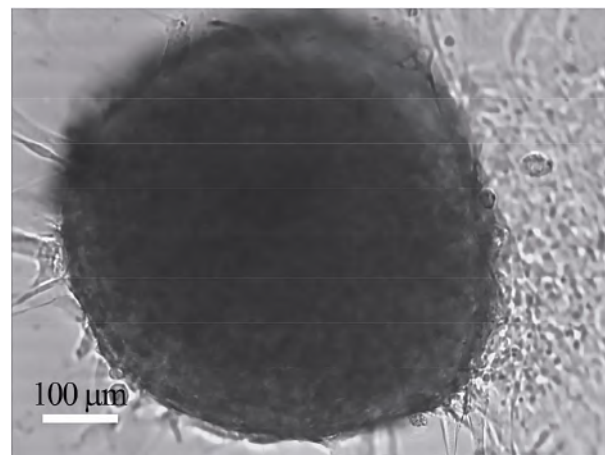


Рисунок 6 – Формування сфероїду у висячій краплі протягом 48 години культивування за концентрації МСК 10×10^3 кл/краплю.

Таблиця – Морфофункціональні властивості сфероїдів, сформованих за 72 години у висячій краплі за різних посівних концентрацій МСК (Me (Q1; Q3))

Концентрація МСК, кл/краплю	1×10 ³	3×10 ³	5×10 ³	7×10 ³	10×10 ³
Середній діаметр, мкм	65 (60; 69)	143 (135; 153)*	195 (188; 198)*	277 (270; 289)*	290 (285; 298)*
Життєздатність клітин, %	91 (83; 95)	88 (83; 93)	87 (81; 93)	66 (62; 70)*	60 (55; 65)*

Примітка: * – відмінності значущі у порівнянні з 1×10³ кл/краплю.

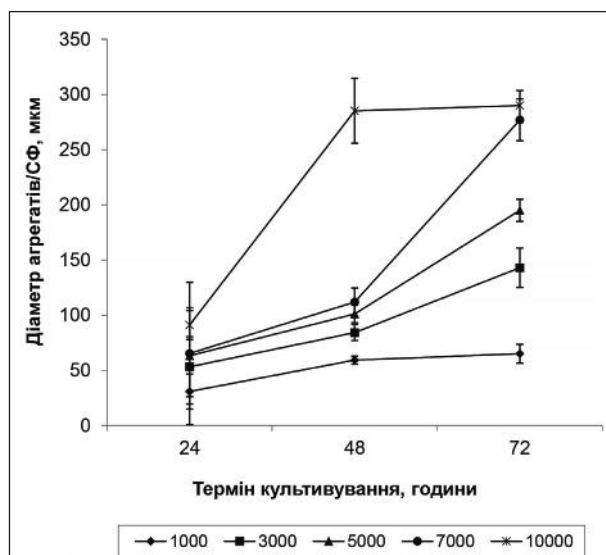


Рисунок 7 – Зміна середнього розміру агрегатів протягом культивування 72 години в залежності від посівної концентрації МСК.

користана у цих роботах, прискорювала утворення сфероїдів (24–48 годин), однак перенесення сфероїдів у низькоадгезивний планшет є додатковим етапом, який ускладнює їх отримання.

Проведені нами експерименти показали, що розміри сфероїдів залежали від кількості МСК, зважених у висячій краплі. При цьому, посівні концентрації 3 та 5×10³ кл/краплю виявились оптимальними для отримання через 72 години сфероїдів діаметром близько 143–195 мкм із високою життєздатністю клітин у їхньому складі.

Висновки.

Таким чином, було встановлено оптимальні умови для формування сфероїдів у висячій краплі з МСК, отриманих з жирової тканини людини, які включають використання посівної концентрації 3–5×10³ кл/краплю та термін культивування 72 години.

Перспективи подальших досліджень.

Сфероїди МСК з жирової тканини людини є перспективним джерелом аутологічних стовбурових клітин, які легко отримати, кріоконсервувати, зберігати та використовувати за потребою. Встановлені параметри культивування є важливими для подальшої розробки та стандартизації протоколів отримання сфероїдів з МСК жирової тканини людини для експериментального та клінічного застосування.

References / Література

- Temple J, Vellou E, Shehata M, Lévy R. Current strategies with implementation of three-dimensional cell culture: the challenge of quantification. *Interface Focus*. 2022 Aug 12;12(5):20220019. DOI: [10.1098/rsfs.2022.0019](https://doi.org/10.1098/rsfs.2022.0019).
- Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2019 Dec 12;8(12):1620. DOI: [10.3390/cells8121620](https://doi.org/10.3390/cells8121620).
- Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov*. 2017 Jun;22(5):456–472. DOI: [10.1177/1087057117696795](https://doi.org/10.1177/1087057117696795).
- Petrenko Y, Syková E, Kubinová Š. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Apr 26;8(1):94. DOI: [10.1186/s13287-017-0558-6](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0558-6).
- Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Aug 3;107(31):13724–9. DOI: [10.1073/pnas.1008117107](https://doi.org/10.1073/pnas.1008117107).
- Ong SM, Zhao Z, Arooz T, Zhao D, Zhang S, Du T, et al. Engineering a scaffold-free 3D tumor model for *in vitro* drug penetration studies. *Biomaterials*. 2010;31:1180–1190. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2009.10.049](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.049).
- Imani R, Hojjati Emami S, Fakhrazadeh H, Baheiraei N, Sharifi AM. Optimization and comparison of two different 3D culture methods to prepare cell aggregates as a bioink for organ printing. *Biocell*. 2012 Apr;36(1):37–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23173303/>.
- Bartosh TJ, Ylostalo JH. Preparation of anti-inflammatory mesenchymal stem/precursor cells (MSCs) through sphere formation using hanging-drop culture technique. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2014 Feb 6;28:2B.6.1–2B.6.23. DOI: [10.1002/9780470151808.sc02b06s28](https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc02b06s28).
- Hashemibeni B, Kazemi M, Salehi H. Hanging drop culture enhances differentiation of human adipose-derived stem cells into anterior neuroectodermal cells using small molecules. *Int J Dev Neurosci*. 2017 Jun;59:21–30. DOI: [10.1016/j.ijdevneu.2017.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.03.002).
- Kapur SK, Wang X, Shang H, Yun S, Li X, Feng G, et al. Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. *Biofabrication*. 2012 Jun;4(2):025004. DOI: [10.1088/1758-5082/4/2/025004](https://doi.org/10.1088/1758-5082/4/2/025004).
- Shen FH, Werner BC, Liang H, Shang H, Yang N, Li X, et al. Implications of adipose-derived stromal cells in a 3D culture system for osteogenic differentiation: an *in vitro* and *in vivo* investigation. *Spine J*. 2013 Jan;13(1):32–43. DOI: [10.1016/j.spinee.2013.01.002](https://doi.org/10.1016/j.spinee.2013.01.002).

ФОРМУВАННЯ СФЕРОЇДІВ З МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЛЮДИНИ МЕТОДОМ ВИСЯЧОЇ КРАПЛІ

Рогульська О. Ю., Божок Г. А., Труфанова Н. А., Ревенко О. Б., Пахомов О. В., Черкашина Д. В., Петренко О. Ю.

Резюме. В останні часи багатоклітинні біологічні об'єкти, до яких належать сфероїди та органоїди, знаходяться в центрі особливої уваги дослідників. Ці 3D-культури більшою мірою відповідають умовам існування клітин в організмі, ніж 2D-моношарові, тому вони мають велику популярність у фундаментальних та клінічних дослідженнях, тестуванні фармакологічних препаратів, клітинної терапії, трансплантації тощо. Протоколи отримання сфероїдів з різних органів людини та тварин, а також багатьох клітинних ліній, вже опробовані, але пошук нових підходів не переривається, тоді як вже існуючі методи зазнають оптимізації.

Мета роботи – визначення впливу посівної концентрації мезенхімальних стромальних клітин (МСК) з жирової тканини людини та терміну їх культивування у висячій краплі на життєздатність та морфологічні властивості сфероїдів.

У роботі були використані МСК з жирової тканини людини 3-4 пасажу в посівних концентраціях 1, 3, 5, 7 та 10×10^3 кл/краплю. Для формування сфероїдів методом висячої краплі на верхню частину чашки Петрі діаметром 10 см наносили краплі об'ємом 30 мкл, тоді як у нижню частину чашки приміщали 10 мл живильного середовища для підтримання вологості при культивуванні. Культивування зразків проводили при 37°C та 5% CO_2 протягом 72 годин. За допомогою інвертованого мікроскопа та програми обробки зображень оцінювали морфологічні властивості, розмір і кількість сформованих сфероїдів в залежності від доби культивування і посівної концентрації клітин. Для оцінки життєздатності клітин сфероїди дезінтегрували шляхом 15-хвилинної експозиції в розчині трипсин/ЕДТА та забарвлювали трипановим синім.

Результати досліджень показали, що спочатку МСК жирової тканини людини концентрувалися на дні висячої краплі, після чого утворювалися численні дрібні агрегати. Агрегати поступово зливалися в єдиний центральний сфероїд, який ущільнювався на 48-72 годину в залежності від вихідної концентрації клітин. За посівних концентрацій 1, 3, 5 та 7×10^3 кл/краплю процес сфероїдоутворення завершувався протягом 72 годин культивування, тоді як за посівної концентрації 10×10^3 кл/краплю – за 48 годин. Середній діаметр сформованого сфероїду позитивно корелював з вихідною концентрацією МСК. За мінімальної концентрації середній діаметр сфероїду складав близько 65 мкм, тоді як за максимальних (7 та 10×10^3 кл/краплю) – 277–290 мкм. У зразках з посівними концентраціями 3 та 5×10^3 кл/краплю середній діаметр сфероїду дорівнював близько 143–195 мкм.

Близько 90% клітин у складі сфероїдів, утворених за концентрацій 1, 3 та 5×10^3 кл/краплю, залишалися життєздатними, тоді як за посівних концентрацій 7 та 10×10^3 кл/краплю відбувалося значне падіння життєздатності клітин.

Таким чином, оптимальні умови для формування сфероїдів у висячій краплі з МСК, отриманих з жирової тканини людини, включають використання посівної концентрації $3\text{--}5 \times 10^3$ кл/краплю та термін культивування 72 години.

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, жирова тканина, 3D-культивування, сфероїди, висяча крапля, життєздатність клітин.

FORMATION OF SPHEROIDS FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS BY THE HANGING DROP METHOD

Rogulska O. Yu., Bozhok G. A., Trufanova N. A., Revenko O. B., Pakhomov O. V., Cherkashina D. V., Petrenko O. Yu.

Abstract. Special attention of researchers is recently focused on multicellular biological objects, which include spheroids and organoids. These 3D-cultures more closely correspond to the cell existence conditions in the body than 2D-monolayers, so they are very popular in basic and clinical research, testing of pharmacological preparations, cell therapy, transplantation, etc. Protocols for obtaining spheroids from various human and animal organs as well as many cell lines have already been applied, but the search for new approaches doesn't stop, while existing methods undergo optimization.

The goal is to study the influence of seeding concentration of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and the term of their cultivation in a hanging drop on the viability and morphological properties of spheroids.

Human adipose tissue-derived MSCs of 3rd-4th passage were used in the study in seeding concentrations of 1, 3, 5, 7 and 10×10^3 cells/drop. To form spheroids by the hanging drop method, drops of 30 μl were applied to the upper part of a Petri dish with a diameter of 10 cm, while 10 ml of culture medium was placed in the lower part of the dish to maintain humidity during cultivation. Samples were cultivated at 37°C and 5% CO_2 for 72 hours. Using an inverted microscope and an image processing software, the morphological properties, size, and number of formed spheroids were evaluated depending on the cultivation day and cell seeding concentration. To assess cell viability, spheroids were disintegrated by 15-minute exposure in a trypsin/EDTA solution and stained with trypan blue.

The results showed human adipose tissue-derived MSCs were initially concentrated at the bottom of the hanging drop, and then numerous small aggregates were formed. The aggregates gradually merged into a single central spheroid, which was compacted for 48-72 hours, depending on the initial concentration of cells. At seeding concentrations of 1, 3, 5, and 7×10^3 cells/drop, the process of spheroid formation was completed within 72 hours of cultivation, while at a seeding concentration of 10×10^3 cells/drop – within 48 hours. The average diameter of the formed spheroid was positively correlated with the initial MSCs concentration. At the minimum concentration, the average diameter of the spheroid was about 65 μm , while at the maximum (7 and 10×10^3 cells/drop) it was 277–290 μm . In the samples with seeding concentrations of 3 and 5×10^3 cells/drop, the average diameter of the spheroid was about 143–195 μm .

About 90% of cells in the composition of spheroids formed at concentrations of 1, 3, and 5×10^3 cells/drop remained viable, while at seeding concentrations of 7 and 10×10^3 cells/drop there was a significant decrease cell viability.

Thus, optimal conditions for human adipose tissue-derived MSCs spheroids formation in a hanging drop include the use of a seeding concentration of $3\text{--}5 \times 10^3$ cells/drop and a cultivation period of 72 hours.

Key words: mesenchymal stromal cells, adipose tissue, 3D-culture, spheroids, hanging drop, cell viability.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Rogulska O. Yu.: [0000-0002-4757-0241](https://orcid.org/0000-0002-4757-0241)^{ABC}

Bozhok G. A.: [0000-0002-4188-9286](https://orcid.org/0000-0002-4188-9286)^{BCD}

Trufanova N. A.: [0000-0002-8718-7490](https://orcid.org/0000-0002-8718-7490)^{BC}

Revenko O. B.: [0000-0002-1275-1376](https://orcid.org/0000-0002-1275-1376)^{BC}

Pakhomov O. V.: [0000-0002-7494-654X](https://orcid.org/0000-0002-7494-654X)^{BE}

Cherkashina D. V.: [0000-0002-0834-2203](https://orcid.org/0000-0002-0834-2203)^{BE}

Petrenko O. Yu.: [0000-0002-9554-8639](https://orcid.org/0000-0002-9554-8639)^{AEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The Authors declare no conflict of interest. / Автори статті заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Bozhok Halyna Anatoliyivna / Божок Галина Анатоліївна

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine / Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Ukraine, 61016, Kharkiv, 23 Pereyaslavska str. / Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська 23

Tel.: +380679911072 / Тел.: +380679911072

E-mail: bozhokgaru@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 24.03.2023 / Стаття надійшла 24.03.2023 року
Accepted 28.08.2023 / Стаття прийнята до друку 28.08.2023 року