

FEATURES OF SPHEROID FORMATION BY NEURAL CELLS OF NEWBORN RATS IN DROPS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy

of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

vsevolodskaya1993@gmail.com

The article discusses the development and optimization of a method for forming neural cells in the form of spheroids using the hanging drop method. Neural cells obtained from the brain tissue of newborn rats were cultivated in three-dimensional structures spheroids that can reproduce the complex physiological microenvironment of the brain *in vitro*. The use of the hanging drop method enabled the control of cell aggregation conditions, ensuring the formation of stable spheroids of optimal size, which is crucial for maintaining cell viability and facilitating the effective diffusion of oxygen and nutrients.

Studies have shown that only pre-cultured neural cells that have undergone a recovery phase after enzymatic and mechanical isolation are capable of forming spheroids. Freshly obtained cells did not form stable three-dimensional structures due to damage to the cell membrane and loss of adhesion molecules. It was found that the optimal drop volume is 20 μl , which ensures the stability of the drop shape during cultivation. The size of spheroids directly depends on the initial concentration of neural cells in the drop and reaches optimal values at $2\text{-}8 \times 10^3$ cells/drop. The cultivation time required to achieve a three-dimensional structure is 4-5 days.

Spheroids obtained by the "hanging drop" method consist of viable cells capable of migration, differentiation, and formation of neuronal networks, confirming their functional suitability for modeling nervous tissue. The developed model is of great importance for further research into neurodegenerative diseases, toxicological analysis, and screening of pharmacological drugs.

Thus, the "hanging drop" method for forming spheroids from neural cells is an effective tool for creating 3D models of nervous tissue with high biological relevance.

Key words: neural cells, spheroids, hanging drop method, pre-cultivation, 3D cultivation.

Connection of the publication with planned research works.

This work is part of the SRW "Determining the role of pre-treatment in improving the effectiveness of cryopreservation and hypothermic storage of cell structures at various levels of organization" (state registration number 0121U113329).

Introduction.

Diseases of the human central nervous system (CNS) account for a significant proportion of illnesses and affect up to one billion people worldwide, regardless of gender and age [1]. Despite significant advances in the study of neurodegenerative diseases in recent decades, there are no effective treatments for most of them. Therefore, there is a high demand for *in vitro* CNS models that can be used to study neurological disorders, injuries, and the toxicity and efficacy of drugs.

In vivo studies using animal models have greatly contributed to our knowledge of brain function. However, these methods and models face serious challenges related to the complex interactions between brain cells [2, 3], which are very difficult to analyze *in vivo*. The use of two-dimensional (2D) neural cell cultures as *in vitro* models [4] has expanded our understanding of the processes that occur in the brain, but such models are not capable of fully imitating the processes that occur in brain tissue, as they lack the three-dimensional microenvironment of cells. The absence of three-dimensional intercellular interactions and interactions between cells and the matrix characterizes cells in a monolayer. Therefore, recently, scientists have focused

their attention on three-dimensional model systems of brain tissue, which include spheroids (SPs).

Spheroids are three-dimensional, multicellular structures formed by cell aggregation, a manifestation of their ability to self-organise. They are dense clusters of cells ranging in size from 50 to 500 micrometers, which may include various cell types, including somatic and stem cells. During the formation of spheroids, an intercellular matrix is formed, which becomes an integral part of their structure. This ensures three-dimensional interactions within the spheroid, both between cells and between cells and the extracellular matrix. These properties make spheroids effective *in vitro* models of multicellular systems, capable of reproducing a complex physiological microenvironment similar to the conditions in tissues and organs [5-7].

However, the process of forming spheroids from rat brain cells remains insufficiently standardized. The resulting structures can vary significantly in size, cell composition, and functional characteristics. Therefore, an urgent task is to develop optimized methods that ensure the uniformity of spheroids in terms of structure, composition, and biological properties.

The aim of the study.

To determine the optimal conditions for the formation of spheroids in droplets by brain tissue cells of newborn rats.

Object and research methods.

The experiment involved $n=8$ newborn rats.

The primary suspension of neural cells (NC) was obtained from the brain tissue of newborn rats using an enzymatic-mechanical method. For this purpose,

brain tissue was removed, washed with sterile saline solution, incubated for 2 min at 37°C in a 0.25% trypsin solution (Biowest, France), transferred to DMEM/F12 medium (Biowest, France) enriched with 10% serum, and mechanically disaggregated into single cells using vibration [8]. The resulting cell suspension was filtered through a nylon filter and then washed from trypsin by centrifugation for 3 min at 100 g. The resulting cell pellet was suspended in DMEM/F12 medium containing 10% rat serum [9]. Cell viability was assessed by staining with 0.4% trypan blue (Sigma, USA) and expressed as a percentage. The number of cells was counted in a Goryaev chamber.

A suspension of recently obtained NC cells at a concentration of 2×10^6 cells/well was seeded and cultured in 24-well plates (TPP, Switzerland) in enriched DMEM/F12 medium in the presence of 10% rat serum [9]. Cultivation was carried out in a CO₂ incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ – 95% air. Half of the culture medium was replaced every 3-4 days.

After reaching NC 70-8% confluent growth, the cells were detached from the surface of the culture plates. For this purpose, the NC monolayer was incubated at 37°C in a solution of trypsin (0.25%)/versen (0.05%) (Biowest, France) for 5 min. The process of cell detachment was monitored microscopically. Five times the volume of DMEM/F12 medium containing 10% serum (to inactivate trypsin) was added to the resulting cell suspension and centrifuged for 4 min at 100 g. The cell pellet was dispersed in the culture medium, after which the number of cells and their viability were counted.

Microscopic analysis and microphotography of cultures were performed using an inverted light microscope (AmScope MT3000, USA).

Spheroids were obtained using the “hanging drop” method [10]. For this purpose, drops containing NC suspensions were applied to the inner surface of a 10 cm diameter Petri dish lid (SPL Life Sciences, Korea). The lids with drops were turned over, covered the bottom of the dish containing sterile saline solution with antibiotics, and cultivated in a CO₂ incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, 95% air for 6 days. The medium was not replaced.

The experimental results of the studies were statistically processed using the Origin program (OriginLab Corporation). The experimental data are presented as the arithmetic mean ± standard deviation. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Work with animals was carried out in accordance with the “General Principles of Animal Experiments” approved by the V National Congress on Bioethics (Kyiv, 2013), in accordance with the provisions of the IV European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123, Strasbourg, 1986) and the permission of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Research results and their discussion.

To determine the optimal volume of drops, drops with volumes of 20, 25, and 30 µL were applied to the surface of the Petri dish lid, and their condition and shape were observed during cultivation. The study showed that drops with volumes of 25 and 30 µL ap-

plied to the lid are too large, which contributes to their spreading and merging with neighbouring drops during the process of turning the lid over and subsequent cultivation. At the same time, 20 µL drops consistently retained their shape, did not spread or merge when the lid was turned over or during cultivation. Thus, 20 µL was selected as the optimal drop volume. An average of 33 drops with a volume of 20 µL were applied to the lid of a Petri dish with a diameter of 90 mm (**fig. 1A**).

The next step in the study was to determine the role of the initial state of NC and their optimal concentration in the formation of spheroids in a drop. We studied the ability to form SFs with freshly obtained and pre-cultured NC when cultivated in a drop at concentrations of 1×10^3 ; 2×10^3 ; 4×10^3 ; 8×10^3 ; 10×10^3 ; 12×10^3 ; 20×10^3 and 40×10^3 cells/drop.

Formation of SFs from freshly obtained NC. The viability of freshly obtained NC was $55 \pm 12\%$. During cultivation for 6 days in a drop, freshly obtained NC spheroids did not form in any of the concentrations studied, although the formation of small aggregates was observed (**fig. 1B**). This was probably due to microdamage to the plasma membrane of the cells, which formed during their isolation, and the loss of a significant number of adhesion molecules, which prevented the cells from forming stable intercellular bonds. Thus, when cultured in a drop for 6 days, freshly obtained NC spheroids did not form in all studied cell seeding concentrations.

Formation of SFs by pre-cultured NC. Freshly obtained NC, which were previously cultured until they formed a monolayer (**fig. 2A**), were used as pre-cultured cells. The viability of such cells after their separation from the substrate was $90 \pm 5\%$. In all concentrations studied, on the first day of cell cultivation in a drop, the formation of a single three-dimensional structure was typically observed (**fig. 2B**), characterized by an irregular shape and loose cell packing. At concentrations of $1-12 \times 10^3$ cells/drop, the size of these structures ranged from 130 to 290 µm and was directly proportional to the cell concentration (**table**).

During further cultivation, the size of the three-dimensional structures remained virtually unchanged (**table**), but the packing density of cells within them increased, leading to the formation of classic spheroids (**fig. 2B, D**). If there were several structures, they merged. On the fifth day of cultivation, the size of the spheroids, depending on the seeding concentration of cells, ranged from 115 µm (1×10^3 cells/drop) to 270 µm (12×10^3 cells/drop). That is, the size of the spheroids was greater, the higher the concentration of cells in the drop. Further cultivation of NC in the drop did not lead to the formation of new spheroids and had practically no effect on the size of the formed ones.

When the seed concentrations were increased to 20×10^3 and 40×10^3 cells/drop, three-dimensional structures were observed already 3 hours after the start of cultivation. After 1 day of cultivation, irregularly shaped three-dimensional structures with loose (non-dense) cell packing were observed, measuring 350 and 560 µm, respectively (**fig. 3A, B, table**). During further cultivation, the density of cell packing in three-dimensional structures increased with a slight decrease in their size, and they acquired a spherical shape (**fig. 3B, D**).

It should be noted that the size of spheroids formed by cells with a concentration of 40×10^3 cells/drop on the 4th and 5th days of cultivation significantly decreased compared to spheroids on the 2nd and 3rd days of cultivation (table), which the compaction of the degree of cell packing can explain.

Assessment of spheroid cell viability. Transferring spheroids formed in a drop at all concentrations studied to an adhesive surface resulted in their 100% attachment already on the first day of cultivation. After attachment, the cells of these spheroids formed long processes, along which undifferentiated cells migrated, followed by their differentiation (fig. 4A) and the formation of a monolayer of cells with neuronal and glial morphology (fig. 4B). At the same time, cells with neuronal morphology were able to form a “neuronal” network with the help of processes. Such behavior in culture indicates that spheroids consist of viable neural cells.

The results clearly demonstrate that preliminary NC cultivation is a critical step in obtaining high-quality spheroids. The pre-cultivation process likely allows cells to recover from the stress of enzymatic-mechanical isolation, repair damaged membranes, and synthesize adhesion molecules necessary for aggregation. In addition, this stage acts as a selective factor, leaving the most viable and proliferatively active cell population in the culture, as evidenced by an increase in their overall viability from 55% to 90% [11].

The study also showed that the formation of NC spheroids occurred in two stages, which included preliminary rapid cell aggregation followed by compaction and “maturation” of the formed three-dimensional structure. The process was finally completed on the 5th day of cultivation, even at minimum cell concentrations [12]. At the same time, the size of the spheroids was directly proportional to the concentration of cells in the drop, which is an expected result. The higher the cell concentration, the greater the likelihood of physical contact between

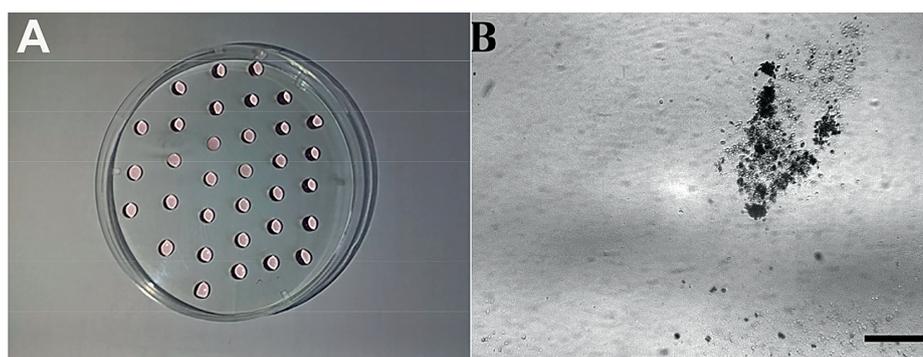


Figure 1 – Features of the formation of neural cell aggregates in a drop on a Petri dish lid: A – drops with NC, volume 20 μ l, applied to the surface of a Petri dish lid; B – clusters of small aggregates formed by freshly isolated NC on the 6th day of cultivation in a drop of NC with a concentration of 4×10^3 cells per drop. Scale: 100 μ m.

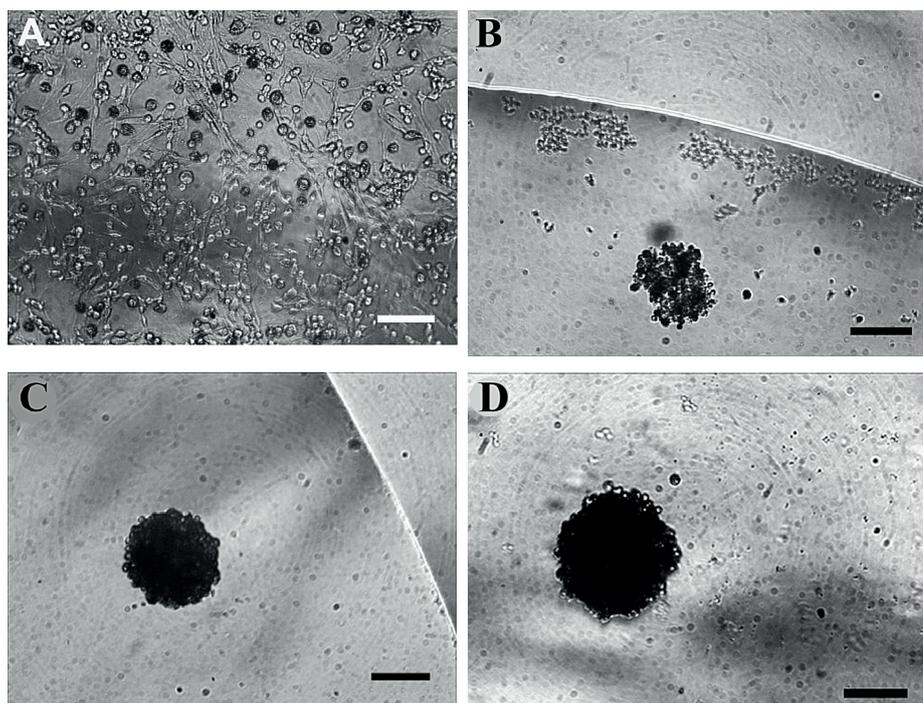


Figure 2 – Cultivation of neural cells: from monolayer to 3D structures: A – formation of a monolayer during the cultivation of freshly obtained neural cells; Formation of three-dimensional structures by pre-cultured NCs at a concentration of 2×10^3 cells/drop after 1 (B), 3 (C), and 5 (D) days of cultivation. Scale: 100 μ m.

cells, which increases the probability of intercellular contacts and contributes to an increase in the size of the final structure. Therefore, if the goal is to obtain three-dimensional structures as quickly as possible, high seeding concentrations are the obvious choice. At the same time, the high rate of spheroid formation is accompanied by their large size. The problem with large three-dimensional structures is the insufficient supply of oxygen and nutrients to the cells of the central lay-

Table – Dependence of spheroid diameter (μ m) on cell concentration and cultivation time in a drop (n=12)

Cultivation time, days	Seeding concentration of cells, $\times 10^3$ /drop							
	1	2	4	8	10	12	20	40
1	130 \pm 10	206 \pm 10	209 \pm 10	262 \pm 12	297 \pm 35	256 \pm 17	347 \pm 27	567 \pm 46
2	120 \pm 10	184 \pm 19	200 \pm 30	235 \pm 26	275 \pm 30	282 \pm 30	358 \pm 25	550 \pm 50
3	125 \pm 11	167 \pm 20	190 \pm 17	220 \pm 16	272 \pm 40	270 \pm 28	342 \pm 50	562 \pm 16
4	118 \pm 11	188 \pm 17	187 \pm 13	267 \pm 24	299 \pm 16	322 \pm 23	335 \pm 29	483 \pm 23*#
5	115 \pm 8	191 \pm 20	186 \pm 30	203 \pm 18	236 \pm 25	270 \pm 21	332 \pm 32	444 \pm 30*#

Notes: * – $p < 0.05$ compared to SFs formed on the 2nd day of cultivation; # – $p < 0.05$ compared to SFs formed on the 3rd day of cultivation.

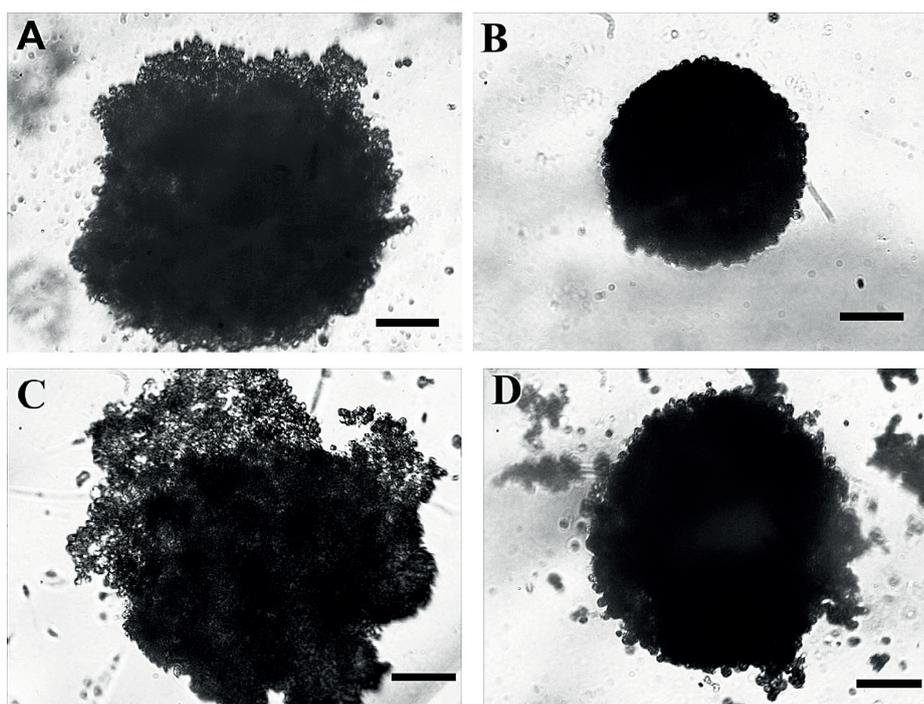


Figure 3 – Formation of three-dimensional structures by precultured NCs at a concentration of 20×10^3 cells/drop after 1 (A) and 4 (B) days and at a concentration of 40×10^3 cells/drop after 1 (C) and 4 (D) days of cultivation. Scale: 100 μm .

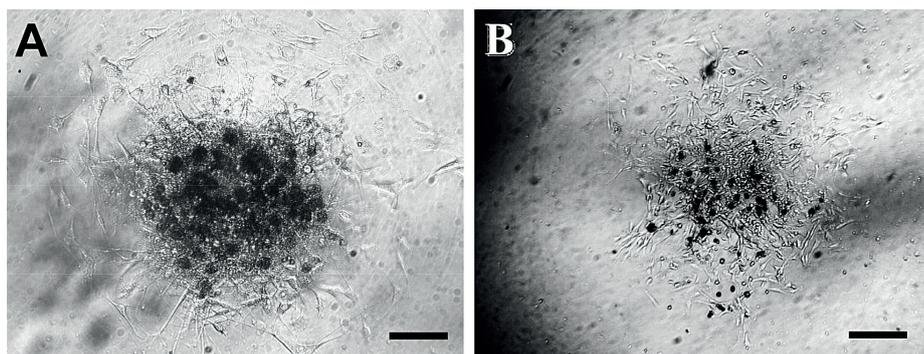


Figure 4 – Transfer of spheroids to an adhesive surface: A – Migration and differentiation of spheroid cells after attachment; B – Formation of a monolayer by cells of neural and glial morphology. Scale: 100 μm .

ers of the 3D structure, which occurs through passive diffusion from the culture medium. When a spheroid becomes too large (usually 300-500 μm in diameter), diffusion to its central part becomes significantly more difficult. This leads to hypoxia with the subsequent development of apoptosis and necrosis due to a lack of oxygen and nutrients [13]. The observation that the size of spheroids formed with the highest concentration (40×10^3 cells/drop) significantly decreased on the 4th and 5th days of cultivation may indicate that the initially formed large aggregate (560 μm) begins to suffer from necrosis in the center. The death of these cells and the subsequent compaction of the structure lead to a decrease in its overall diameter [14].

Thus, the optimal conditions for obtaining high-quality spheroids with a size of 150-200 μm (which is the optimal size in terms of diffusion) are $2-8 \times 10^3$ cells/drop.

concentration of neural cells and the duration of cultivation.

4. The optimal time for obtaining mature spheroids when cultivated in a drop is 4-5 days, and the optimal NC concentration is $2-8 \times 10^3$ cells/drop

5. Spheroids formed during NC cultivation in a drop consist of viable cells capable of migration, differentiation, and formation of neuronal networks.

Prospects for further research.

Further research may focus on detailed immunocytochemical characterization of the cellular composition of spheroids, analysis of gene expression at different stages of their maturation, and application of the developed model to solve specific pharmacological and toxicological problems.

The results obtained are of considerable practical importance. The creation of standardized neural spheroids is key to the development of 3D models of nervous tissue *in vitro*. Such models mimic native tissue much better than traditional 2D monolayer cultures and are indispensable for studying the processes of neurogenesis, synaptogenesis, and myelination, screening neuroactive pharmaceuticals, modeling neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, Parkinson's disease), and studying the mechanisms of neurotoxicity.

Conclusions.

1. To form spheroids using the hanging drop method, pre-cultured neural cells must be used, as freshly obtained cells are not capable of aggregation.

2. The optimal drop volume that ensures its stability is 20 μl .

3. The size and rate of spheroid formation in the drop depend on the initial

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ СФЕРОЇДІВ У КРАПЛІ НЕЙРАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ

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

vsevolodskaya1993@gmail.com

У статті розглядається розробка та оптимізація методу формування нейральних клітин у вигляді сфероїдів із застосуванням методу висячої краплі. Нейральні клітини, отримані з тканини головного мозку новонароджених щурів, культивувалися у тривимірних структурах – сфероїдах, що мають здатність відтворювати складне фізіологічне мікрооточення мозку *in vitro*. Застосування методу «висячої краплі» дозволило контролювати умови агрегації клітин, забезпечуючи формування стабільних сфероїдів оптимального розміру, що є важливим для підтримки життєздатності клітин та ефективної дифузії кисню і поживних речовин.

Дослідження показали, що тільки прекультивовані нейральні клітини, які пройшли етап відновлення після ферментативно-механічного виділення, здатні утворювати сфероїди. Свіже отримані клітини не формували стабільних тривимірних структур через пошкодження клітинної мембрани та втрату молекул адгезії. Виявлено, що оптимальним об'ємом краплі є 20 мкл, що забезпечує стабільність форми краплі під час культивування. Розмір сфероїдів напряму залежить від початкової концентрації нейральних клітин у краплі і досягає оптимальних показників при $2\text{-}8 \times 10^3$ клітин/краплю. Тривалість культивування для досягнення тривимірної структури становить 4-5 діб.

Сфероїди, отримані методом «висячої краплі», складаються з життєздатних клітин, які здатні до міграції, диференціації та формування нейрональних мереж, що підтверджує їх функціональну придатність для моделювання нервової тканини. Розроблена модель має велике значення для подальших досліджень нейродегенеративних захворювань, токсикологічного аналізу та скринінгу фармакологічних препаратів.

Таким чином, метод «висячої краплі» для формування сфероїдів із нейральних клітин є ефективним інструментом для створення 3D-моделей нервової тканини з високою біологічною релевантністю.

Ключові слова: нейральні клітини, сфероїди, метод висячої краплі, прекультивування, 3D-культивування.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом НДР «Визначення ролі попередньої обробки для підвищення ефективності кріоконсервування і гіпотермічного зберігання клітинних структур різного рівня організації» (номер державної реєстрації 0121U113329).

Вступ.

Захворювання центральної нервової системи (ЦНС) людини становлять значну частину хвороб та зачіпають до одного мільярда людей в усьому світі незалежно від статі та віку [1]. Незважаючи на значні успіхи, досягнуті в останні десятиліття у вивченні нейродегенеративних захворювань, для більшості з них ефективні способи лікування відсутні. Тому існує високий попит на моделі ЦНС *in vitro*, які можна використовувати для вивчення неврологічних розладів, травм, дослідження токсичності та ефективності ліків.

Дослідження *in vivo*, на тваринних моделях, зробили великий внесок у наші знання щодо функціонування мозку. Однак ці методи і моделі стикаються з серйозними проблемами пов'язаними зі складними взаємодіями між клітинами мозку [2, 3], які дуже складно аналізувати *in vivo*. Використання в якості *in vitro* моделей двовимірних (2D) культур нейральних клітин [4] розширило наше розуміння процесів, які відбуваються в мозку, але такі моделі не здатні повністю імітувати процеси, які відбуваються в тканині мозку, так як у них відсутнє тривимірне мікрооточення клітин. Клітини у складі моношару характеризуються відсутністю тривимірних міжклітинних взаємодій, та взаємодій клітин з матриксом. Тому, останнім часом

увага вчених зосередилась на тривимірних модельних системах тканини мозку, якими, зокрема, є сфероїди (СФ).

Сфероїди – це тривимірні багатоклітинні структури, що формуються шляхом агрегації клітин, яка є проявом їхньої здатності до самоорганізації. Вони являють собою щільні скупчення клітин розміром від 50 до 500 мкм, до складу яких можуть входити різні типи клітин, зокрема соматичні та стовбурові. У процесі формування сфероїдів утворюється міжклітинний матрикс, який стає невід'ємною частиною їхньої структури. Завдяки цьому у сфероїді забезпечуються тривимірні взаємодії як між клітинами, так і клітин з позаклітинним матриксом. Ці властивості роблять сфероїди ефективними *in vitro* моделями багатоклітинних систем, здатними відтворювати складне фізіологічне мікрооточення, подібне до умов у тканинах і органах [5-7].

Однак, процес формування сфероїдів із клітин головного мозку щурів залишається недостатньо стандартизованим. Отримані структури можуть значно відрізнятися за розміром, клітинним складом і функціональними характеристиками. Тому актуальним завданням є розробка оптимізованих методик, що забезпечують однорідність сфероїдів за структурою, складом і біологічними властивостями.

Мета дослідження.

Визначення оптимальних умов формування сфероїдів у краплі клітинами тканини головного мозку новонароджених щурів.

Об'єкт і методи дослідження.

В експерименті було використано $n=8$ новонароджених щурів.

Первинну суспензію нейральних клітин (НК) отримували з тканини головного мозку новонароджених щурів ферментативно-механічним методом. Для цього тканину головного мозку вилучали, промивали стерильним фізіологічним розчином, інкубували 2 хв при 37°C в 0,25% розчині трипсину («Biowest», Франція), переносили в середовище DMEM/F12 («Biowest», Франція), збагачене 10% сироватки і механічно дезагрегували на поодинокі клітини за допомогою вібрації [8]. Отриману суспензію клітин фільтрували через нейлоновий фільтр після чого відмивали від трипсину центрифугуванням на протязі 3 хв. при 100 g. Отриманий осад клітин суспендували в середовищі DMEM/F12, яке містило 10% сироватки крові щурів [9]. Життєздатність клітин оцінювали по фарбуванню 0,4% трипановим синім (Sigma, США) і виражали у відсотках. Підрахунок кількості клітин проводили в камері Горяєва.

Суспензію свіже отриманих НК у концентрації 2×10^6 клітин/лунку висівали і культивували в 24-лункових планшетах (TPP, Швейцарія) у збагаченому середовищі DMEM/F12 у присутності 10% сироватки крові щурів [9]. Культивування проводили в CO_2 інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO_2 – 95% повітря. Половину обсягу середовища культивування замінювали кожні 3-4 доби.

Після досягнення НК 70-8-% злитого росту, клітини відокремлювали від поверхні культуральних планшетів. Для цього моно шар НК інкубували при 37° С у розчині трипсин (0,25%)/версен (0,05%) («Biowest», Франція) протягом 5 хв. Процес відкріплення клітин контролювали мікроскопічно. До отриманої суспензії клітин додавали 5-кратний об'єм середовища DMEM/F12, яке містило 10% сироватки (для інактивації трипсину) і центрифугували 4 хв при 100 g. Осад клітин диспергували в середовищі культивування, після чого підраховували кількість клітин і їх життєздатність.

Мікроскопічний аналіз та мікрофотозйомку культур проводили на світловому інвертованому мікроскопі (AmScope MT3000, USA).

Сфероїди отримували методом «висячої краплі» [10]. Для цього на внутрішню поверхню кришки чашки Петрі діаметром 10 см («SPL Life Sciences», Корея) наносили краплі, які містили суспензії НК. Кришки з краплями перевертали, накривали ними нижню частину чашки, яка містила стерильний фізіологічний розчин з антибіотиками й культивували в CO_2 інкубаторі при 37°C в атмосфері 5% CO_2 , 95% повітря на протязі 6 діб. Заміну середовища не проводили.

Отримані експериментальні результати досліджень обробляли статистично за допомогою програми «Origin» (OriginLab Corporation). Експериментальні дані приведені як середнє арифметичне \pm середнє квадратичне відхилення. Значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Робота з тваринами проводилася відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (м. Київ, 2013), узгоджених із положенням «IV Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (ETS 123, Страсбург, 1986) та дозволом Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

Результати дослідження та їх обговорення.

Для визначення оптимального об'єму крапель на поверхню кришки чашки Петрі наносили краплі об'ємом 20, 25 та 30 мкл й спостерігали за їх станом і формою в процесі культивування. Дослідження показали, що краплі об'ємом 25 та 30 мкл при нанесенні їх на кришку є завеликими, що сприяє їх розтіканню та злиттю з сусідніми в процесі перевертання кришки та наступного культивування. При цьому краплі об'ємом 20 мкл стабільно зберігали свою форму, не розтікалися та не зливалися як при перекиданні кришки, так і в процесі культивування. Таким чином, оптимальним об'ємом краплі було обрано 20 мкл. На кришку чашки Петрі діаметром 90 мм наносили в середньому 33 краплі об'ємом 20 мкл (рис. 1А).

Наступним кроком дослідження було визначення ролі вихідного стану НК та оптимальної їх концентрації при формуванні сфероїдів у краплі. Вивчали здатність формувати СФ свіже отриманими та пре культивованими НК при їх культивуванні у краплі в концентраціях 1×10^3 ; 2×10^3 ; 4×10^3 ; 8×10^3 ; 10×10^3 ; 12×10^3 ; 20×10^3 і 40×10^3 клітин/краплю.

Формування СФ свіже отриманими НК. Життєздатність свіже отриманих НК складала $55 \pm 12\%$. В процесі культивування на протязі 6 діб у краплі свіже отримані НК сфероїдів в жодній з досліджених концентрацій не формували, хоча утворення невеликих агрегатів спостерігалось (рис. 1Б). Ймовірно, причиною цього були мікропошкодження плазматичної мембрани клітин, які утворилися в процесі їх виділення, та втрати значної кількості молекул адгезії, що не дозволяло клітинам формувати стійкі міжклітинні зв'язки. Таким чином, при культивуванні у краплі на протязі 6 діб свіжеотримані НК сфероїдів не утворювали у всіх досліджених посівних концентраціях клітин.

Формування СФ прекультивованими НК. В якості пре культивованих використовували свіже отримані НК, які попередньо культивували до формування ними моношару (рис. 2А). Життєздатність таких клітин після їх відокремлення від підкладки складала $90 \pm 5\%$. У всіх досліджених концентраціях вже на першу добу культивування клітин у краплі зазвичай спостерігалось формування однієї тривимірної структури (рис. 2Б), яка характеризувалась неправильною формою та пухким пакуванням клітин в ній. При концентраціях $1-12 \times 10^3$ клітин/краплю розмір цих структур знаходився в межах 130-290 мкм, і прямо пропорційно залежав від концентрації клітин (табл.).

В процесі подальшого культивування розмір тривимірних структур практично не змінювався (табл.), але при цьому відбувалося ущільнення пакування клітин в них з наступним формуванням класичних сфероїдів (рис. 2В, Г). Якщо структур було декілька, вони зливалися. На 5 добу культивування розмір сфероїдів в залежності від посівної концентрації клітин складав 115 мкм (1×10^3 клітин/краплю) - 270 мкм (12×10^3 клітин/краплю). Тобто розмір сфероїдів був тим більшим, чим більша була концентрація клітин у краплі. Подальше культивування НК у краплі до утворення нових сфероїдів не призводило і на зміну розмірів утворених практично не впливало.

При збільшенні посівних концентрацій до 20×10^3 і 40×10^3 клітин/краплю спостерігалось утворення тривимірних структур вже через 3 години після початку культивування. Через 1 добу культивування спосте-

рігалося формування тривимірних структур неправильної форми з пухким (нешільним) пакуванням клітин в них, розміром 350 і 560 мкм відповідно (рис. 3А, В, табл.). В процесі подальшого культивування щільність пакування клітин в тривимірних структурах збільшувалась при деякому зменшенні їх розмірів й вони набували сферичної форми (рис. 3Б, Г). Слід відмітити, що розмір сфероїдів, сформованих клітинами з концентрацією 40×10^3 клітин/краплю на 4 і 5 добу культивування достовірно зменшувався, порівняно з сфероїдами 2-3 діб культивування (табл.), що можна пояснити ущільненням ступеню пакування клітин.

Оцінка життєздатності клітин сфероїдів. Перенесення сфероїдів, утворених в краплі при всіх досліджуваних концентраціях, на адгезивну поверхню призводило до їх 100% прикріплення вже на першу добу культивування. Після прикріплення клітини цих сфероїдів формували довгі відростки, якими мігрували недиференційовані клітини з наступною їх диференціацією (рис. 4А) й формуванням моношару клітинами нейрональної і гліальної морфології (рис. 4Б). При цьому клітини з нейрональною морфологією були здатні за допомогою відростків формувати "нейрональну" мережу. Така поведінка в культурі свідчить про те, що сфероїди складаються з життєздатних нейральних клітин.

Отримані результати чітко демонструють, що попереднє культивування НК є критично важливим етапом для отримання якісних сфероїдів. Процес прекультивування, ймовірно, дозволяє клітинам відновитися після стресу ферментативно-механічного виділення, відновити пошкоджені мембрани та синтезувати необхідні для агрегації молекули адгезії. Крім того, цей етап відіграє роль селективного фактора, залишаючи в культурі найбільш життєздатну та проліферативно активну популяцію клітин, що підтверджується зростанням їхньої загальної життєздатності з 55% до 90% [11].

Проведене дослідження також показало, що формування сфероїдів НК відбувався у два етапи, які включали

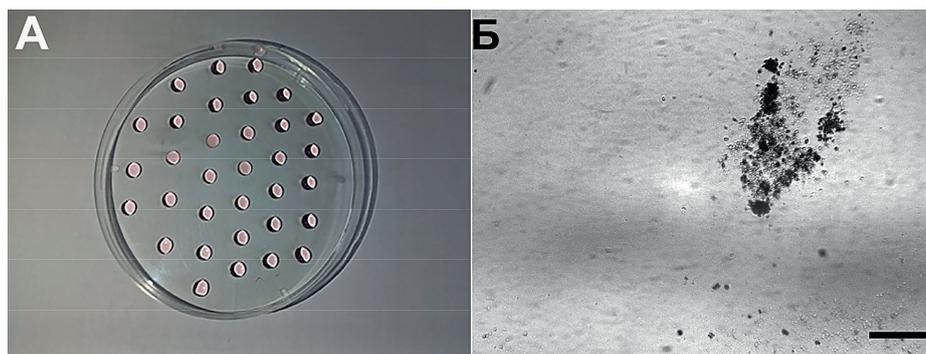


Рисунок 1 – Особливості формування клітинних агрегатів нейральних клітин у краплі на кришці чашки Петрі: А – краплі з НК, об'ємом 20 мкл, нанесені на поверхню кришки чашки Петрі; Б – скупчення невеликих агрегатів, утворених свіже ізолюваними НК на 6 добу культивування у краплі НК з концентрацією 4×10^3 клітин на краплю. Масштаб: 100 мкм.

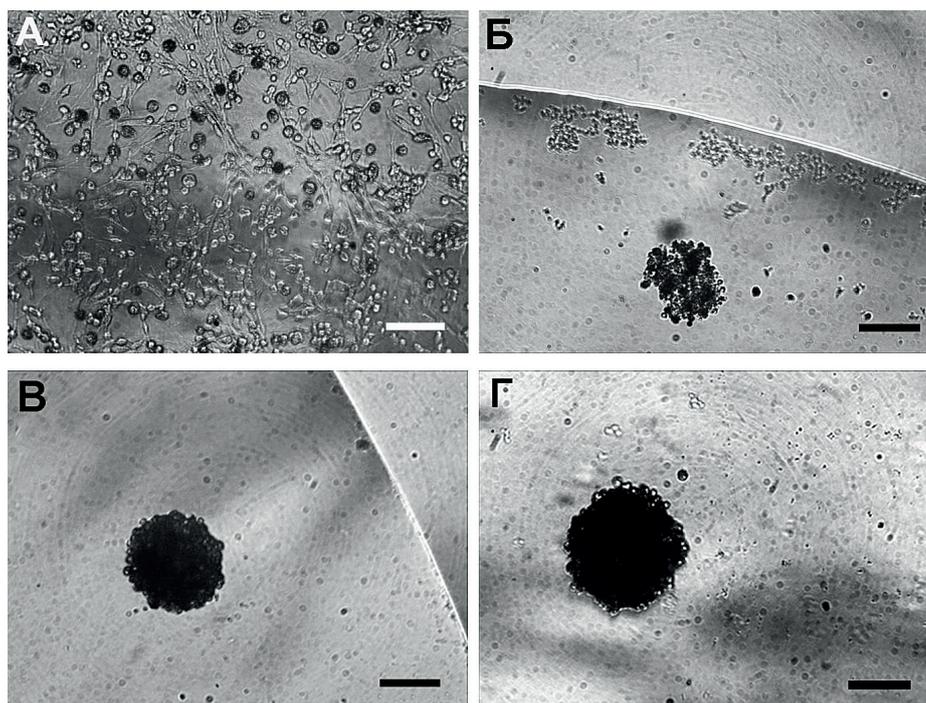


Рисунок 2 – Культивування нейральних клітин: від моношару до 3D-структур: А – формування моношару в процесі культивування свіже отриманих нейральних клітин; Утворення тривимірних структур прекультивованими НК в концентрації 2×10^3 клітин/краплю через 1 (Б), 3 (В) та 5 (Г) діб культивування. Масштаб: 100 мкм.

попередню швидко агрегацію клітин з наступною компактизацією та «дозріванням» утвореної тривимірної структури. Процес остаточно завершувався на 5-ту добу культивування навіть за мінімальних концентрацій клітин [12]. При цьому розмір сфероїдів прямо пропорційно залежав від концентрації клітин у краплі, що є очікуваним результатом. Чим вища концентрація клітин, тим більшою є вірогідність їх фізичного контакту, що збільшує ймовірність утворення міжклі-

Таблиця – Залежність діаметра сфероїдів (мкм) від концентрації клітин та часу їх культивування у краплі (n=12)

Час культивування, доба	Посівна концентрація клітин, $\times 10^3$ /краплю							
	1	2	4	8	10	12	20	40
1	130±10	206±10	209±10	262±12	297±35	256±17	347±27	567±46
2	120±10	184±19	200±30	235±26	275±30	282±30	358±25	550±50
3	125±11	167±20	190±17	220±16	272±40	270±28	342±50	562±16
4	118±11	188±17	187±13	267±24	299±16	322±23	335±29	483±23*#
5	115±8	191±20	186±30	203±18	236±25	270±21	332±32	444±30*#

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з СФ, утвореними на 2 добу культивування; # – $p < 0,05$ порівняно з СФ, утвореними на 3 добу культивування.

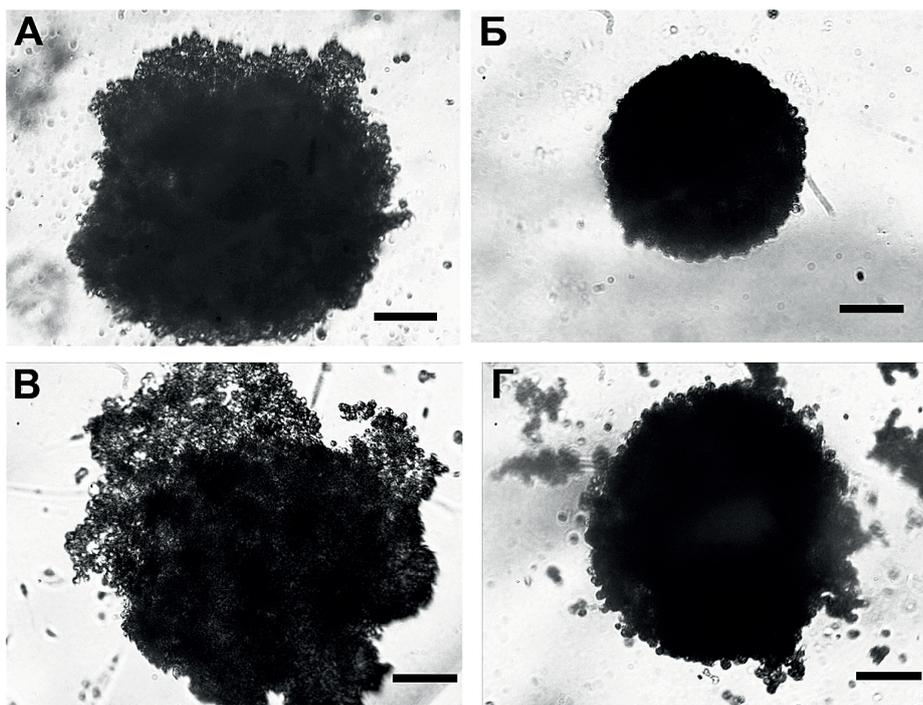


Рисунок 3 – Утворення тривимірних структур прекультивованими НК в концентрації 20×10^3 клітин/краплю через 1 (А) і 4 (Б) та в концентрації 40×10^3 клітин/краплю через 1 (В) і 4 (Г) доби культивування. Масштаб: 100 мкм.

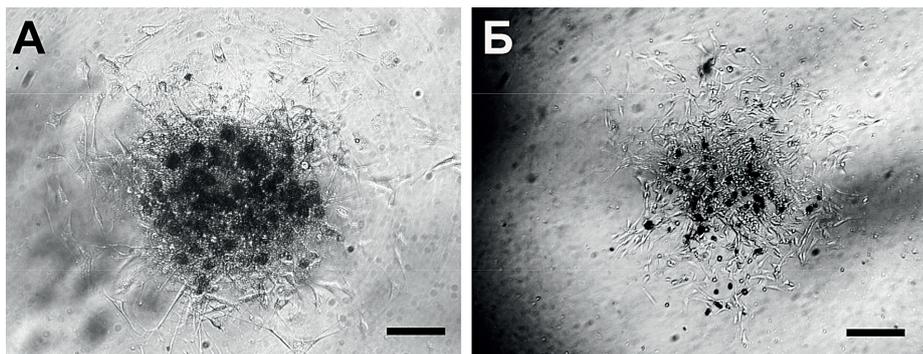


Рисунок 4 – Перенесення сфероїдів до адгезивної поверхні: А – Міграція і диференціація клітин сфероїда після прикріплення; Б – Формування моношару клітинами нейральної і гліальної морфології. Масштаб: 100 мкм.

тинних контактів та сприяє збільшенню розмірів кінцевої структури. Отже, якщо метою є якнайшвидше отримання тривимірних структур, високі посівні концентрації є очевидним вибором. Водночас, при цьому висока швидкість утворення сфероїдів супроводжується їх великим розміром. Проблемою тривимірних структур великих розмірів є недостатнє забезпечення клітин центральних шарів 3D-структури киснем та поживними речовинами, що відбувається шляхом пасивної дифузії з культурального середовища. Коли сфероїд стає занадто великим (зазвичай 300-500 мкм в діаметрі), дифузія до його центральної частини значно ускладнюється. Це призводить до гіпоксії з наступним розвитком апоптозу і некрозу через брак кисню та поживних речовин [13]. Спостереження, що розмір сфероїдів, сформованих з найвищою концентрацією (40×10^3 клітин/краплю), достовірно зменшувався на 4 і 5 добу культивування, може вказувати на те, що початково сформований агрегат великого розміру (560 мкм) починає страждати від некрозу в центрі. Загибель цих клітин та подальше ущільнення структури призводять до зменшення її загального діаметра [14].

Таким чином, оптимальними умовами для отримання якісних сфероїдів розміром 150-200 мкм (що є оптимальним розміром з точки зору дифузії) є $2-8 \times 10^3$ клітин/краплю.

Отримані результати мають значне практичне значення. Створення стандартизованих нейральних сфероїдів є ключовим для розвитку 3D-моделей нервової тканини *in vitro*. Такі моделі значно краще імітують нативну тканину порівняно з традиційними 2D-моношаровими культурами і є незамінними для дослідження процесів нейрогенезу, синаптогенезу та мієлінізації, скринінгу нейроактивних фармацевтичних препаратів, моделювання нейродегенеративних захворювань (хвороба Альцгеймера, Паркінсона) та вивчення механізмів нейротоксичності.

Висновки.

1. Для формування сфероїдів методом «висячої краплі» необхідно використовувати прекультивовані нейральні клітини, оскільки свіжоотримані клітини не здатні до агрегації.

2. Оптимальний об'єм краплі, що забезпечує її стабільність, становить 20 мкл.

3. Розмір та швидкість формування сфероїдів у краплі залежать від початкової концентрації нейральних клітин та тривалості культивування.

4. Оптимальний час для отримання зрілих сфероїдів при культивуванні у краплі становить 4-5 діб, оптимальна концентрація НК становить $2-8 \times 10^3$ клітин/краплю

5. Сфероїди, сформовані в процесі культивування НК у краплі складаються з життєздатних клітин, здатних до міграції, диференціації та формування нейрональних мереж.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на детальну імуноцитохімічну характеристику клітинного складу сфероїдів, аналіз експресії генів на різних етапах їх дозрівання та застосування розробленої моделі для вирішення конкретних фармакологічних та токсикологічних завдань.

References / Література

1. Fetah K, Tebon P, Goudie MJ, Eichenbaum J, Ren L, Barros N, et al. The emergence of 3D bioprinting in organ-on-chip systems. *Prog Biomed Eng.* 2019;1(1):0120011. DOI: [10.1088/2516-1091/ab23df](https://doi.org/10.1088/2516-1091/ab23df).
2. Wang Y, Li W, Gu Y, Zhu Y, Qi J. Engineering stem cell-derived 3D brain organoids in a perfusable organ-on-a-chip system. *RSC Adv.* 2018;3:1677-1685. DOI: [10.1039/C7RA11714K](https://doi.org/10.1039/C7RA11714K).
3. Hasan MF, Ghiasvand S, Wang H, Miwa JM, Berdichevsky Y. Neural layer self-assembly in geometrically confined rat and human 3D cultures. *Biofabrication.* 2019;11(4):045011. DOI: [10.1088/1758-5090/ab2d3f](https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab2d3f).
4. Zbigniew B, Česnaitis V, Šušnjev N, Stankevičius G, Dambrauskaitė K, Inčiūra H, et al. Cerebellar cells self-assemble into functional organoids on synthetic, chemically crosslinked ECM mimicking peptide hydrogels. *Biomolecules.* 2020;10(5):754. DOI: [10.3390/biom10050754](https://doi.org/10.3390/biom10050754).
5. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* 2012;10:29. DOI: [10.1186/1741-7007-10-29](https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29).
6. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839-45. DOI: [10.1038/nrm2236](https://doi.org/10.1038/nrm2236).
7. Kim Y, Kang K, Yoon S, Kim JS, Park SA, Kim WD, et al. Prolongation of liver-specific function for primary hepatocytes maintenance in 3D printed architectures. *Organogenesis.* 2018;14(1):1-12. DOI: [10.1080/15476278.2018.1423931](https://doi.org/10.1080/15476278.2018.1423931).
8. Petrenko AY, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Anal Biochem.* 1991;194(2):326-9. DOI: [10.1016/0003-2697\(91\)90236-m](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90236-m).
9. Sukach AN, Liashenko TD, Shevchenko MV. Properties of isolated neural cells from newborn rat in tissue in vitro. *Biotechnol Acta.* 2013;6(3):63-8. Available from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2013_6_3_8.
10. Sukach AN, Shevchenko MV, Liashenko TD. Comparative study on influence of fetal bovine serum and serum of adult rat on cultivation of newborn rat neural cells. *Biopolym Cell.* 2014;30(5):394-9. DOI: [10.7124/bc.0008B7](https://doi.org/10.7124/bc.0008B7).
11. Harley-Troxell ME, Dhar M. Assembling spheroids of rat primary neurons using a stress-free 3D culture system. *Int J Mol Sci.* 2023;24(17):13506. DOI: [10.3390/ijms241713506](https://doi.org/10.3390/ijms241713506).
12. Zhou QZ, Feng XL, Jia XF, Mohd Nor NHB, Harun MH, Feng DX. Culture and identification of neonatal rat brain-derived neural stem cells. *World J Stem Cells.* 2023;15(6):607-616. DOI: [10.4252/wjsc.v15.i6.607](https://doi.org/10.4252/wjsc.v15.i6.607).
13. Gonmanee T, Arayapisit T, Vongsavan K, Phruksaniyom C, Sritanaudomchai H. Optimal culture conditions for neurosphere formation and neuronal differentiation from human dental pulp stem cells. *J Appl Oral Sci.* 2021;29:e20210296. DOI: [10.1590/1678-7757-2021-0296](https://doi.org/10.1590/1678-7757-2021-0296).
14. Vilinski-Mazur K, Kirillov B, Rogozin O, Kolomenskiy D. Numerical modeling of oxygen diffusion in tissue spheroids undergoing fusion using functional representation and finite volumes. *Sci Rep.* 2025;15:5054. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-86805-2>.

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ СФЕРОЇДІВ У КРАПЛІ НЕЙРАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ

Всеволодська С. О.

Резюме. У сучасній експериментальній нейробиології тривимірні культури клітин, зокрема нейральні сфероїди, дедалі частіше розглядають як фізіологічно релевантні моделі для вивчення міжклітинних взаємодій, диференціації та нейрогенезу. Представлена стаття присвячена дослідженню ключових параметрів формування сфероїдів із нейральних клітин новонароджених щурів методом «висячої краплі» з метою оптимізації умов отримання життєздатних тривимірних структур, що відкриває нові можливості для вивчення фізіології та патологій нервової системи. Мета дослідження полягала у визначенні та оптимізації умов для формування життєздатних нейральних сфероїдів (СФ) з клітин новонароджених щурів методом «висячої краплі».

У роботі оцінювали вплив об'єму краплі (20, 25, 30 мкл), вихідного стану клітин (свіжо отримані та прекультивовані) та їхньої посівної концентрації (від 1×10^3 до 40×10^3 клітин/краплю) на процес формування сфероїдів. Життєздатність отриманих структур перевіряли шляхом їх культивування на адгезивній поверхні.

Встановлено, що оптимальним об'ємом краплі є 20 мкл, оскільки краплі більшого об'єму розтікалися та зливалися. Показано, що ключовим фактором успіху є попереднє культивування нейральних клітин (НК), оскільки свіжоотримані клітини з низькою життєздатністю ($55 \pm 12\%$) сфероїдів не формували. Натомість прекультивовані НК з життєздатністю $90 \pm 5\%$ успішно утворювали тривимірні структури у всіх досліджених концентраціях. Розмір та швидкість формування СФ прямо залежали від посівної концентрації клітин: вищі концентрації прискорювали процес агрегації та призводили до утворення більших сфероїдів. Сформовані сфероїди продемонстрували високу життєздатність, що підтверджувалося їх здатністю до 100% прикріплення, подальшої міграції клітин та диференціації у клітини нейрональної й гліальної морфології з формуванням нейронної мережі.

Прекультивування нейральних клітин є обов'язковою умовою для формування сфероїдів методом «висячої краплі». Оптимальними умовами для отримання стабільних та життєздатних сфероїдів розміром 150-200 мкм є використання прекультивованих НК у концентраціях від 2×10^3 до 8×10^3 клітин на краплю об'ємом 20 мкл протягом 3-4 діб культивування.

Ключові слова: нейральні клітини, сфероїди, метод висячої краплі, прекультивування, 3D-культивування.

FEATURES OF SPHEROID FORMATION BY NEURAL CELLS OF NEWBORN RATS IN DROPS

Sevolodska S. O.

Abstract. In modern neurobiology, three-dimensional cell cultures – particularly neural spheroids – are increasingly used as physiologically relevant models for studying intercellular interactions, differentiation, and neurogenesis. This study focused on optimizing the formation of viable neural spheroids (SPs) from newborn rat cells using the “hanging drop” method. The aim of the study is to determine optimal conditions for creating viable neural spheroids using this method.

The study examined the effects of droplet volume (20, 25, 30 μ l), cell condition (fresh vs. pre-cultured), and seeding concentrations (1×10^3 to 40×10^3 cells/drop) on SP formation. Spheroid viability was assessed by subsequent culturing on adhesive surfaces.

The optimal drop volume was 20 μ l; larger volumes caused drops to spread and merge. Freshly isolated neural cells (viability $55 \pm 12\%$) failed to form spheroids. In contrast, pre-cultured cells (viability $90 \pm 5\%$) successfully formed

spheroids at all concentrations tested. Higher cell concentrations accelerated aggregation and resulted in larger spheroids. Viable spheroids showed 100% attachment, active migration, and differentiation into neuronal and glial cells, forming neural networks.

Pre-culturing neural cells is essential for successful spheroid formation via the hanging drop method. Optimal conditions include using pre-cultured cells at 2×10^3 to 8×10^3 cells per 20 μ l drop, with cultivation over 3-4 days. This approach yields stable, viable spheroids of 150-200 μ m, offering valuable models for studying nervous system physiology and pathology.

Key words: neural cells, spheroids, hanging drop method, pre-cultivation, 3D cultivation.

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

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

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Vsevolodskaya Svitlana Oleksandrivna / Всеволодська Світлана Олександрівна
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.: +380668443370 / Тел.: +380668443370
E-mail: vsevolodskaya1993@gmail.com

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

Received 08.04.2025 / Стаття надійшла 08.04.2025 року
Accepted 13.08.2025 / Стаття прийнята до друку 13.08.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-3-178-106-112

UDC 616.711-007.55:612.766.1-053.6

¹Dychko D. V., ¹Dychko O. A., ¹Kurylchenko I. Yu., ¹Dychko V. V., ²Markova O. V., ³Chernenko S. O.

ANALYSIS OF THE RESULTS AND ASSESSMENT OF PHYSICAL PERFORMANCE OF ADOLESCENTS WITH SCOLIOSIS

¹State Higher Educational Institution “Donbas State Pedagogical University”
(Sloviansk / Dnipro, Ukraine)

²Volodymyr Vynnychenko Central Ukrainian State University (Kropyvnytskyi, Ukraine)

³Donbass State Engineering Academy (Kramatorsk, Ukraine)

v.v.dichko@ukr.net

The aim of the study is to analyze the results of the assessment of physical performance of adolescents with scoliosis compared to practically healthy peers at the age range of 11 to 14 years. There are 43 examined adolescents: 19 with scoliosis and 24 healthy adolescents. To assess physical performance and adaptive capabilities of the body, the type of blood circulation, parameters of the cardiovascular and autonomic nervous systems, as well as maximum oxygen consumption in response to physical exertion are studied. It is found that adolescents with scoliosis have a predominant hypokinetic type of blood circulation (88.9% in boys and 90.0% in girls) and sympathicotonia (77.8% and 90.0%, respectively), while healthy peers have a predominant eukinetic type of blood circulation. Despite the compensatory increase in minute blood volume during exercise, the general working capacity and maximum oxygen consumption in children with scoliosis are significantly lower than in the control group. Thus, the identified functional changes indicate a decrease in the adaptive and compensatory capabilities of the body of adolescents with scoliosis, which emphasizes the need to develop specialized rehabilitation programs.

Key words: scoliosis, adolescents, physical performance, cardiovascular system, autonomic nervous system, physical activity, rehabilitation.

Connection of the publication with planned research works.

The study is a fragment of the research project “Study of adaptive reactions of the organism, formed under the influence of various factors of nature and society”, state registration number 0115U003314.

Introduction.

A person’s ability to physically and socially adaptation is complex and diverse. It is determined by many factors, including somatic condition, ability to tolerate physical and psycho-emotional stress, level of fitness,

etc. In maintaining homeostasis and its regulation, the most important role belongs to the interactions of the cardiovascular, nervous, muscular, respiratory and immune systems, endocrine glands, sensory organs, as well as the hypothalamic-pituitary and limbic systems of the brain [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

One of the severe types of adaptation disorders that lead to social defects and social inadequacies is musculoskeletal disorders [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. Taking into account the specifics of the development of children with scoliosis, as well as the causes of their pathol-