

УДК 615.361.014.41

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

## Гіпотермічне зберігання сфероїдів на основі мезенхімальних стромальних клітин за температури 22°C

UDC K 615.361.014.41

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

## Hypothermic Storage of Mesenchymal Stromal Cell-based Spheroids at a Temperature of 22°C

**Реферат:** Сфероїди, утворені з мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин (МСК), забезпечують оптимальне мікросередовище для клітинного потенціалу та підтримки стовбуровості, а також є перспективними структурами для розробки релевантних дослідних моделей і клітинних терапій. Практичне застосування потребує розробки ефективних методів зберігання сфероїдів. Зберігання за температури 22°C може бути безпечним і зручним для короткочасного транспортування сфероїдів на основі МСК. У роботі визначено, що сфероїди з МСК жирової тканини людини можуть зберігатися за температури 22°C до 7 діб з ефективним збереженням життєздатності, метаболічної активності, здатності до прикріплення та диференціювання. Доведено, що формування сфероїдів супроводжується реорганізацією цитоскелета клітин, зменшенням розміру і метаболічної активності МСК, це є вкрай важливим для розвитку стійкості сфероїдів до умов зберігання за температури навколишнього середовища.

**Ключові слова:** сфероїди, мезенхімальні стромальні клітини, гіпотермічне зберігання, актинові філаменти, життєздатність, метаболічна активність.

**Abstract:** Spheroids formed from mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) provide optimal microenvironment for cell potential and stemness support being also promising structures for relevant research models as well as cell therapies development. Practical application requires the development of effective methods for storing spheroids. Storage at ambient temperature (22°C) can be safer and more convenient for short term transportation of MSC-based spheroids. Herein we report that the spheroids formed by human adipose tissue-derived MSCs can be stored at ambient temperature (22°C) for up to 7 days with efficient preservation of viability, metabolic activity, ability to attach, and differentiation capacity. Cytoskeleton reorganization, cell size reduction, and metabolic activity decrease were shown to result from spheroidal formation, and were extremely important for the development of spheroid resistance to the subsequent ambient storage.

**Key words:** spheroids, mesenchymal stromal cells, hypothermic storage, actin filaments, viability, metabolic activity.

Мезенхімальні стромальні/стовбурові клітини (МСК) мають низку привабливих для біомедичних цілей властивостей, таких як диференціювальний потенціал [28], пластичність, здатність до нарощування в умовах культивування, хоумінг та міграція до місць пошкодження після системного введення [14, 32], низька імуногенність [21], унікальна секреторна активність [13, 23] з продукуванням імуномодулюючих, протизапальних, антиапоптотичних, проангіогенних факторів, а також факторів ремодельовання клітинної поведінки. В організмі МСК перебувають у так званих «нішах», які підтримують їх стовбуровість. За культивування в моношарі (стандартне двовимірне (2D) культивування) природне мікрооточення МСК не відтворюється, що призводить до поступової втрати унікальних властивостей [3] і ста-

Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) possess a set of attractive for biomedical purposes properties such as multilineage differentiation potential [28], plasticity, expandability under culture conditions, homing and migration to the sites of injury after systemic administration [14, 32], low immunogenicity [21], unique secretory activity [13, 23] with production of immune modulatory, anti-inflammatory, anti-apoptotic, proangiogenic, and cell behavior remodeling factors. In the body, MSCs are located in so-called 'niches' that support their stemness. Cultivation in monolayer (standard two-dimensional (2D) culture) does not replicate natural microenvironment of MSCs, that leads to a gradual loss of unique properties [3] and cell aging during subsequent passages. Spheroids are three-dimensional (3D) multicellular aggregates

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

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

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

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

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: n.a.trufan@gmail.com

Надійшла 25.08.2024

Прийнята до друку 12.09.2024

Received August, 25, 2024

Accepted September, 12, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

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

ріння клітин під час наступних пасажів. Сфероїди — це тривимірні (3D) багатоклітинні агрегати, у яких клітини утворюють зв'язки клітина-клітина та клітина-позаклітинний матрикс, а також живуть в умовах градієнтів постачання кисню/поживних речовин та видалення відходів, подібних до таких, що існують *in vivo*. Наразі сфероїди розглядають як перспективні структури для створення оптимального мікросередовища, реалізації потенціалу МСК та підтримки їх стовбуровості. Так, культивовані в сфероїдах МСК демонструють підвищену стовбуровість із посиленою експресією таких маркерів плюрипотентності, як *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* і *Rex1* [7], а також змінений епігенетичний статус генів, залучених до регуляції потентності стовбурових клітин [19]. Було також показано, що 3D-культивування МСК у сфероїдах збільшує їх здатність до диференціювання та трансдиференціювання [16], а також покращує секреторну активність [29] порівняно зі стандартною 2D-культурою. Такий зсув функціональності клітин до природного стану в сфероїдах на основі МСК робить їх унікальною релевантною модельною системою для доклінічних досліджень і потенційно дієвим терапевтичним засобом [31, 32].

Ефективна технологія зберігання є важливою передумовою для використання сфероїдів на основі МСК у біомедичних дослідженнях і клінічній медицині. Для тривалого зберігання біологічних об'єктів широко використовують методи кріоконсервування, які мають певні обмеження: вартісне обладнання, наявність рідкого азоту для транспортування, а у випадку консервування сфероїдів — можливість ризиків механічного пошкодження 3D-структури та зниження життєздатності клітин [18]. Разом з цим, все більше доказів свідчить про те, що токсичні ефекти кріопротекторів і процедури заморожування-відігрівання можуть спричинити пошкодження цитоскелета [8], зміни диференціовального потенціалу МСК [2], відхилення ступеня експресії генів [12] та епігенетичного статусу [5] у деконсервованих клітин. Гіпотермічне зберігання за температур нижче фізіологічних може вирішити основні проблеми, які виникають під час низькотемпературного зберігання, бути більш безпечним через відсутність кріопротекторів та ефектів кріоушкодження і стати прийнятною альтернативою для короткочасного зберігання сфероїдів. При цьому зберігання за температури 22°C також дозволить спростити транспортування між дослідницькими та клінічними центрами. Процес формування сфероїдів потенційно може впливати на чутливість клітин до зовнішніх

where cells are involved in cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix interactions, as well as exist at *in vivo*-like gradients in oxygen / nutrients supply, and waste removal. Spheroids are currently considered as promising structures for optimal microenvironment, realization of MSCs potential and stemness support. Thus, MSCs cultured in spheroids show an enhanced stemness with increased expression of such pluripotency markers as *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, and *Rex1* [7], and changed epigenetic status of genes involved in stem cell potency [19]. It has been also shown that 3D-culture of MSCs in spheroids increases their differentiation and transdifferentiation capacities [16], and also enhances secretory activity [29] compared to standard 2D-culture. Such shift of cell functionality towards natural-like state in MSC-based spheroids makes them a unique relevant model system for preclinical studies and potentially highly efficient therapeutic agent [31, 32].

Effective preservation technology is an essential prerequisite for MSC-based spheroids use in biomedical studies and clinical medicine. Cryopreservation methods widely used for a long-term preservation of biological objects have some limitations: expensive equipment, liquid nitrogen for transportation, and in the case of spheroids preservation – risks of mechanical damage to the 3D-structure and decrease in cell viability [18]. Along with this, increasing evidence suggests that toxic effects of cryoprotectants and freeze-thawing procedure may be associated with cytoskeleton damage [8], alteration of MSC differentiation potential [2], deviations in the rates of gene expression [12] and epigenetic marks [5] in post-thawed cells. Hypothermic storage below physiological temperatures may solve the main problems which occur during low-temperature storage, be safer due to the absence of cryoprotectants and cryoinjury effects, as well as be more acceptable alternative for short-term storage of spheroids. At the same time, storage at a temperature of 22°C can facilitate transportation between research and clinical centers. The spheroid formation can potentially affect the sensitivity of cells to external adverse factors, including physical, chemical damage factors to which the objects are subjected during hypothermic storage at a temperature of 22°C. At the same time, the possibility of storage and the state of MSCs within spheroids after storage at a temperature of 22°C have not been thoroughly investigated.

Herein we aimed to study viability and functional properties of MSCs before and after hypothermic storage within spheroids at a temperature of 22°C.



несприятливих факторів, зокрема фізичних і хімічних чинників пошкодження, дії яких об'єкти піддаються при гіпотермічному зберіганні за температури 22°C. У той же час можливість зберігання і стан МСК у складі сфероїдів після зберігання за температури 22°C ретельно не досліджені.

Мета роботи — дослідження життєздатності та функціональних властивостей МСК до та після гіпотермічного зберігання в складі сфероїдів за температури 22°C.

### Матеріали та методи

*Виділення та культивування клітин.* МСК жирової тканини людини виділяли з ліпоаспірата дорослих пацієнтів після отримання письмової згоди поінформованих здорових донорів-добровольців у суворій відповідності до рекомендацій Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації та вимог Біоетичного комітету Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (м. Харків). МСК отримували за методом розщеплення колагеназою [37]. Ізольовані МСК культивували за температури 37°C, 5% CO<sub>2</sub> і 95% вологості в повному культуральному середовищі, що складалось з середовища Minimal Essential Medium  $\alpha$ -модифікації ( $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich, США) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (Biowest, Франція), 50 мкг/мл пеніциліну (Biowest), 50 мкг/мл стрептоміцину (Biowest) і 0,2 мМ L-глутаміну (Sigma-Aldrich). Повну заміну середовища проводили кожні 3–4 доби. При досягненні 80% конфлюєнта клітини трипсинізували та пересівали. МСК 4–6 пасажів використовували в наступних експериментах.

*Отримання сфероїдів.* Для отримання сфероїдів МСК використовували метод «висячої краплі» [15]. Суспензію клітин у культуральному середовищі наносили у вигляді крапель об'ємом 25 мкл на верхню частину чашки Петрі діаметром 10 см (SPL Life Science, Корея). Посівна концентрація МСК становила  $3 \times 10^3$  клітин у кожній краплі. Після нанесення крапель верхню частину чашки Петрі перевертали і розміщували над нижньою частиною, яка містила 10 мл стерильного 0,9%-го розчину натрію хлориду («Юрія-Фарм», Україна) для підтримання оптимальної вологості при подальшому культивуванні. Заміну середовища не проводили. Строк культивування становив 3 доби, після чого сфероїди збирали і використовували для експериментів.

*Забарвлення на актинові філаменти цитоскелета.* Моношар та сфероїди, утворені з МСК, два рази промивали фосфатним буфером (PAA, Австрія), фіксували в 4%-му розчині формаль-

### Materials and methods

*Cell Isolation and Culture.* Human adipose tissue MSCs were isolated from the lipoaspirate of adult patients after receiving the written informed consent of healthy volunteer donors in a strict accordance with the recommendations of the World Medical Association Declaration of Helsinki and the requirements of Bioethical Committee of the IPC&C. MSCs were obtained by collagenase digestion [37]. Isolated MSCs were cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% humidity in complete culture medium, consisting from Minimal Essential Medium- $\alpha$  modification ( $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, France), 50  $\mu$ g/ml penicillin (Biowest), 50  $\mu$ g/ml streptomycin (Biowest), and 0.2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich). The media were completely changed every 3–4 days. At 80% of confluence the cells were trypsinized and subcultured. MSCs at passages 4–6 were used in further experiments.

*Spheroids generation.* The 'hanging drop' method [15] was used to obtain MSC spheroids. The suspension of cells in the culture medium was placed as the 25  $\mu$ l drops to the upper part of a Petri dish with a diameter of 10 cm (SPL Life Sciences, Korea). The seeding concentration of MSCs was  $3 \times 10^3$  cells per each drop. After seeding of drops, the upper part of the Petri dish was turned over and placed over the lower part, which contained 10 ml of sterile 0.9% sodium chloride solution (Yuria-Pharm, Ukraine) to maintain optimal humidity during subsequent cultivation. The medium was not replaced. The cultivation period was 3 days, after which the spheroids were collected and used for experiments.

*Staining for actin filaments of the cytoskeleton.* Monolayer and spheroids formed from MSCs were washed twice with phosphate buffer saline (PBS, PAA, Austria), fixed in 4% formaldehyde solution for 10 min at room temperature, then washed with PBS. The samples were then treated with a 0.5% solution of Triton X-100 for membrane permeabilization, after which they were PBS-washed. Next, actin filaments of the cytoskeleton (F-actin) were selectively stained using the fluorescent dye phalloidin-FITC (Phalloidin FITC Reagent, Abcam, Great Britain). Stained samples were analyzed with a confocal laser scanning microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany).

Storage at ambient temperature. MSC-based 3D spheroids were stored in sealed cryotubes at 22°C in culture medium in a cooling thermostat 'LAUDA' (LAUDA, Germany). Viability and functional state parameters were assessed just before storage and



дегіду протягом 10 хв за кімнатної температури і після промивали фосфатним буфером. Потім зразки обробляли 0,5%-им розчином Triton X-100 для пермеабілізації мембран і після промивали фосфатним буфером. Далі проводили селективне забарвлення актинових філаментів цитоскелета (F-актин) за допомогою флуоресцентного барвника фалоїдін-FITC (Phalloidin FITC Reagent, Abscam, Велика Британія). Забарвлені зразки аналізували на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі «LSM 510 META» (Carl Zeiss, Німеччина).

*Зберігання за кімнатної температури.* Сфероїди на основі МСК зберігали в герметично закритих кріопробірках за температури 22°C у культуральному середовищі в охолоджуючому термостаті «LAUDA» (LAUDA, Німеччина). Параметри життєздатності та функціонального стану оцінювали безпосередньо перед зберіганням і на 1, 3, 7 і 10 добу зберігання ( $n = 3$  у трьох повторях для кожної групи).

*Життєздатність.* Життєздатність оцінювали за допомогою подвійного забарвлення флуоресцеїндіацетатом (ФДА) і бромідом етидію (ЕБ) [11]. Забарвлення ФДА/ЕБ аналізували за допомогою конфокального мікроскопа «Zeiss LSM 510 META» (Carl Zeiss) та програмного забезпечення до нього. Конфокальні зображення були отримані вздовж осі  $z$  з інтервалами 20 мкм при довжині хвилі збудження 488 нм для ФДА та 543 нм для ЕБ.

*Метаболічна активність.* Метаболічну активність оцінювали за допомогою тесту Alamar Blue (AB, Serotec Ltd, США), як описано раніше [27]. Досліджувані зразки (МСК у моношарі або сфероїди на основі МСК) інкубували протягом 3 годин у повному культуральному середовищі, що додатково містило 10% АВ. Рівень флуоресценції відновленого АВ вимірювали на планшетному спектрофлуориметрі «TECAN GENios» (Tecan Genios, Австрія) з довжиною хвилі збудження 550 нм і довжиною хвилі випромінювання 590 нм. В якості показника метаболічної активності використовували різницю інтенсивності флуоресценції дослідного та холостого зразків (без клітин) і виражали в умовних одиницях флуоресценції (УОФ).

*Оцінка ефективності прикріплення сфероїдів і міграції клітин на адгезивній поверхні.* Сфероїди вносили в лунки 96-лункового планшета в повному культуральному середовищі й культивували в стандартних умовах 24 години. Після чого за допомогою прижиттєвої світлової мікроскопії проводили підрахунок прикріплених ( $a$ ) та неприкріплених сфероїдів ( $b$ ) і розраховували

at the storage days 1, 3, 7, and 10 ( $n = 3$  in triplicate for each group).

*Viability.* Viability was measured using double fluorescent staining with fluorescein diacetate (FDA) and ethidium bromide (EB) [11]. FDA/EB staining was analyzed with confocal microscope 'Zeiss LSM 510 META' (Carl Zeiss) with provided software. Confocal images were obtained along the  $z$ -axis with 20  $\mu\text{m}$  intervals at an excitation wavelength of 488 nm for FDA and 543 nm for EB.

*Metabolic Activity.* Metabolic activity was assessed with the Alamar Blue test (AB, Serotec Ltd, USA) as previously described [27]. Briefly, samples (MSC in monolayer or MSC-based spheroids) were incubated for 3 h with the complete culture medium, containing 10 % AB. The fluorescence level of reduced AB was measured by a 'TECAN GENios' microplate reader (Tecan Genios, Austria) with an excitation wavelength of 550 nm and an emission wavelength of 590 nm. The ratio of the fluorescence intensity of experimental and blank samples (without spheroids) was used as metabolic activity value and expressed in relative fluorescence units (RFU).

*Evaluation of the efficiency of spheroid attachment and cell migration on the adhesive surface.* Spheroids were placed in the wells of a 96-well plate (manufacturer) in complete culture medium and then cultured under standard conditions for 24 hours. After that, the attached ( $a$ ) and unattached spheroids ( $b$ ) were counted with lifetime light microscopy and the attachment efficiency was calculated according to the following formula:

$$\text{Attachment efficiency (\%)} = \frac{a}{a+b} \times 100.$$

Migration and cell spreading were analyzed during subsequent cultivation of the attached spheroids.

*Differentiation potential of MSCs within spheroids.* The ability of stromal cells in the composition of spheroids for directed differentiation was assessed as follows: spheroids were placed in culture plates with adhesive plastic in complete culture medium. After 24 hours of cultivation, after the attachment of spheroids, the medium was replaced with the appropriate induction medium. The osteogenic medium consisted of  $\alpha$ -MEM containing 10% fetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics and inducers of osteogenesis (100 nM dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.2 mM L-ascorbic acid 2-phosphate – all inducers of production Sigma-Aldrich) [4]. Adipogenic medium consisted of  $\alpha$ -MEM containing 10% fetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics and inducers of

ефективність прикріплення за наступною формулою:

$$\text{Ефективність прикріплення} = \frac{a}{a+b} \times 100 \%$$

При подальшому культивуванні прикріплених сфероїдів спостерігали, чи відбувається міграція і розселення клітин.

*Диференціювальний потенціал МСК у складі сфероїдів.* Визначення здатності стромальних клітин у складі сфероїдів до спрямованого диференціювання здійснювали наступним чином: сфероїди поміщали в культуральні планшети з адгезивним пластиком в повному культуральному середовищі. Через 24 години культивування після прикріплення сфероїдів замінювали середовище на відповідне індукційне. Остеогенне середовище складалось з  $\alpha$ -МЕМ, що містило 10% фетальної бичачої сироватки, L-глутамін, антибіотики та індуктори остеогенезу (100 нМ дексаметазону, 10 мМ  $\beta$ -гліцерофосфату, 0,2 мМ 2-фосфату L-аскорбінової кислоти — всі індуктори виробництва Sigma-Aldrich) [4]. Адипогенне середовище складалось з  $\alpha$ -МЕМ, що містило 10% фетальної бичачої сироватки, L-глутамін, антибіотики та індуктори адипогенезу (0,5 мМ 3-ізобутил-1-метил-ксантину, 1 мкМ дексаметазону, 10 мкг/мл інсуліну, 100 мкМ індометацину — всі індуктори виробництва Sigma-Aldrich) [37].

Культивування у середовищах з індукторами диференціювання здійснювали протягом 21 доби, заміну середовища на відповідне свіже проводили двічі на тиждень. Після цього культури фіксували у 10%-му формаліні, який готували на фосфатному буфері (рН 7,2).

Ефективність остеогенного диференціювання оцінювали за забарвленням культур Alizarin Red. Ефективність адипогенного диференціювання оцінювали шляхом забарвлення Oil Red O (Sigma-Aldrich) на нейтральні ліпіди.

Отримані результати були статистично оброблені. Нормальність розподілу даних визначали за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Значущість відмінностей між групами перевіряли за t-критерієм Стьюдента для незалежних груп. Дані представлені як  $M \pm m$ ; відмінності вважалися значущими при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

Сфероїди, сформовані на 3-тю добу культивування у «вісячій краплі», мали округлу форму і склалися з щільно упакованих клітин. Життєздатність МСК, оцінена за забарвленням ФДА/ЕБ, у сфероїдах була високою, практично всі клітини як у зовнішньому шарі, так і в більш

адипогенезу (0.5 мМ 3-ізобутил-1-метил-ксантину, 1 мкМ дексаметазону, 10 мкг/мл інсуліну, 100 мкМ індометацину — всі індуктори виробництва Sigma-Aldrich) [37].

Культивування в медіах з індукторами диференціювання проводили протягом 21 днів; медіа замінювали на відповідну свіжу медіа двічі на тиждень. Після цього культури фіксували у 10% формаліні, який готували на фосфатному буфері (рН 7,2).

Ефективність остеогенного диференціювання оцінювали за забарвленням Alizarin Red. Ефективність адипогенного диференціювання оцінювали шляхом забарвлення Oil Red O (Sigma-Aldrich) на нейтральні ліпіди.

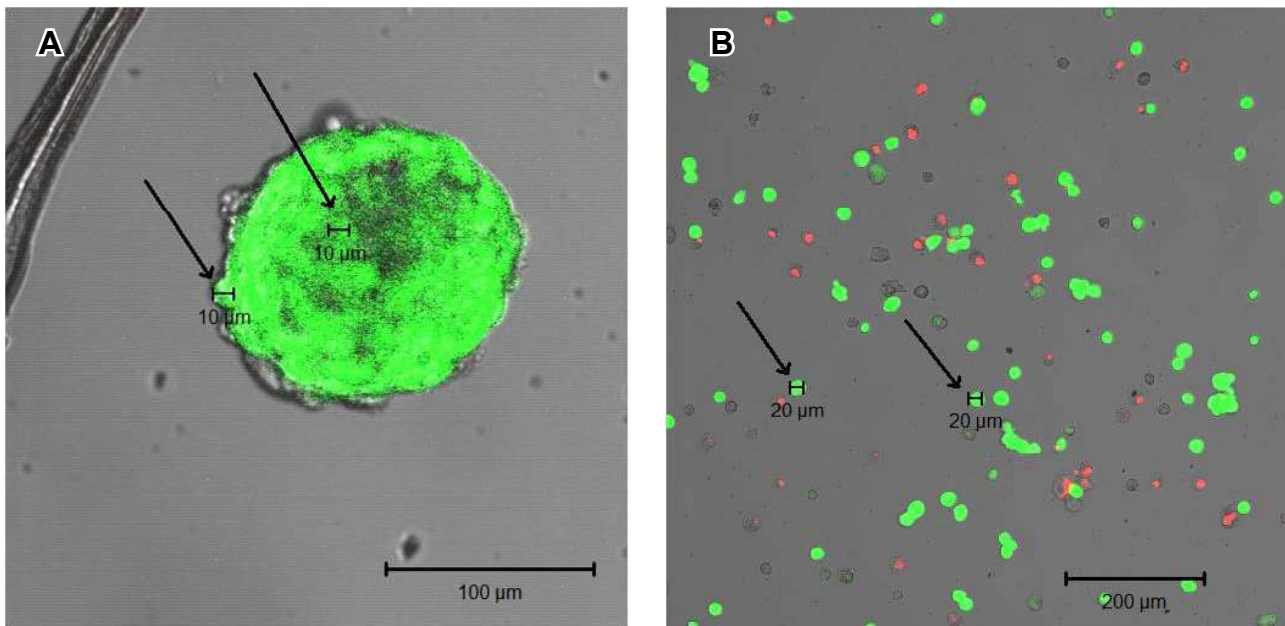
Отримані результати були статистично оброблені. Дані розподілу визначали за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Значущість відмінностей між групами перевіряли за t-критерієм Стьюдента для незалежних груп. Дані представлені як  $M \pm m$ ; відмінності вважалися значущими при  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

The spheroids formed on the 3rd day of cultivation in the 'hanging drop' were of a rounded shape and consisted of densely packed cells. MSC viability, assessed by FDA/EB staining, in spheroids was high, almost all cells both in the outer layer and in deeper layers were stained green (Fig. 1, A). Single red dead cells were equally detected in spheroids and in the suspension of cells obtained by trypsinization of the monolayer (Fig. 1, B). It was found that 3D-cultivation led to a reduced size of the cells by approximately 50% compared to the diameter of the cells in the suspension. Thus, the diameter of MSCs grown under 2D-monolayer culture was about 20  $\mu\text{m}$ , and the diameter of cells in the composition of spheroids (in the outer layer and in deeper ones) did not exceed 10  $\mu\text{m}$  (Fig. 1). The effect of reduction of the cytoplasmic and nuclear volume in MSCs within spheroids has also been shown in the reports of other researchers [17, 30], it allows reducing the pulmonary uptake of cells administered by intravenous infusion and increases the effectiveness of cell therapies [22].

The size of cells and their shape is determined by the cytoskeleton structure. During the formation of spheroids, cell aggregation and increase of cell-cell interactions occur, which causes reorganization of the cytoskeleton. Analysis of the structure and arrangement of actin filaments of the cytoskeleton (F-actin) by staining with fluorescent dye phalloidin-FITC revealed that under the condition of being in a spread state in a monolayer,





**Рис. 1.** Життєздатність МСК за забарвленням ФДА/ЕБ: **А** — сфероїд на 3-тю добу культивування у «висячій краплі» за концентрації МСК  $3 \times 10^3$  клітин/краплю, зображення шару сфероїда на глибині 51,58 мкм; **В** — суспензія клітин, отриманих шляхом трипсинізації моношару. Стрілками позначені типові клітини.

**Fig. 1.** Viability of MSCs assessed by FDA/EB staining: **A** – spheroid on the 3rd day of cultivation in a 'hanging drop' at a MSC concentration of  $3 \times 10^3$  cells/drop, image of the spheroid layer at a depth of 51.58  $\mu\text{m}$ ; **B** – a suspension of MSCs obtained by monolayer trypsinization. Arrows indicate typical cells.

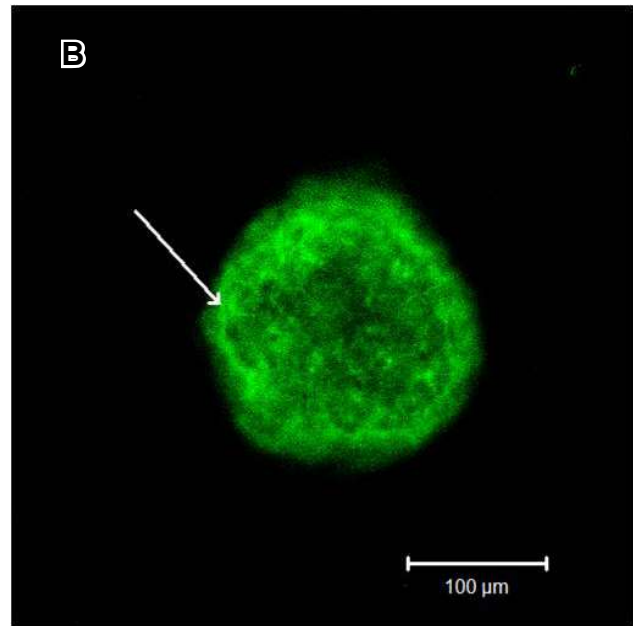
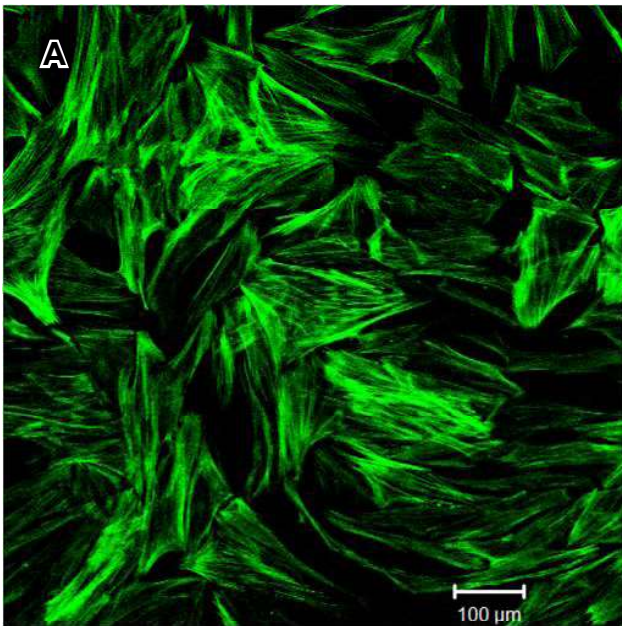
глибоких шарах, забарвлювались у зелений колір (рис. 1, А). Поодинокі червоні мертві клітини виявляли в рівній мірі в сфероїдах і суспензії клітин, отриманих шляхом трипсинізації моношару (рис. 1, В). Було виявлено, що 3D-культивування призводить до зменшення розміру клітин приблизно на 50% порівняно з діаметром клітин у вихідній суспензії. Так, діаметр МСК, що росли в умовах моношарового 2D-культивування складав близько 20 мкм, а діаметр клітин у складі сфероїдів (у зовнішньому шарі і більш глибоких шарах) не перевищував 10 мкм (рис. 1). Ефект зменшення цитоплазматичного та ядерного об'єму МСК у сфероїдах, показаний також у роботах інших дослідників [17, 30], дозволяє зменшити легеневе захоплення введених шляхом внутрішньовенної інфузії клітин і підвищує ефективність клітинних терапій [22].

*Розмір клітин та їхню форму визначає структура цитоскелета.* У ході утворення сфероїдів відбуваються агрегація клітин і посилення взаємодій клітина-клітина, що спричиняє реорганізацію цитоскелета. Аналіз структури і розташування актинових філаментів цитоскелета (F-актину) за допомогою флуоресцентного барвника фаллоїдін-FITC виявив, що за умови перебування в розпластанному стані в моношарі МСК мали добре розвинені актинові філаменти, розташовані пучками по всьому об'єму клітини (рис. 2, А). Аналіз МСК у складі сфероїда показав, що ак-

MSCs had well-developed actin filaments arranged in bundles throughout the cell volume (Fig. 2, A). The analysis of MSCs within spheroids showed that actin filaments were developed in the cells of the outer layer, the density of actin filaments in the cells of deeper layers was much lower and the filaments themselves were thinner (Fig. 2, B). Thus, it was found that spheroidal formation was accompanied by a reduction of the actin component of the cytoskeleton, as well as the cytoskeleton reorganization. At the same time, cell polarization occurs in the spheroid structure, i.e. cells in the outer layer have more developed actin filaments than in deeper layers.

Reduced cell size and reorganization of the cytoskeleton are the signs of the MSC transition to a quiescent state [30, 31], which is extremely important for the development of resistance to storage conditions at ambient temperature. In this regard, it was important to investigate the metabolic activity of MSCs during spheroidal formation in dynamics. To do this, we analyzed the reduction of Alamar Blue, an integral indicator of metabolic activity, during the cultivation of MSCs in a monolayer and in a 'hanging drop'. The results are presented in Fig. 3, which demonstrates that during monolayer 2D-cultivation during 3 days' period there was a rise in the fluorescence intensity of the indicator reduced form. Fluorescence intensity during cultivation in the 'hanging drop', on the





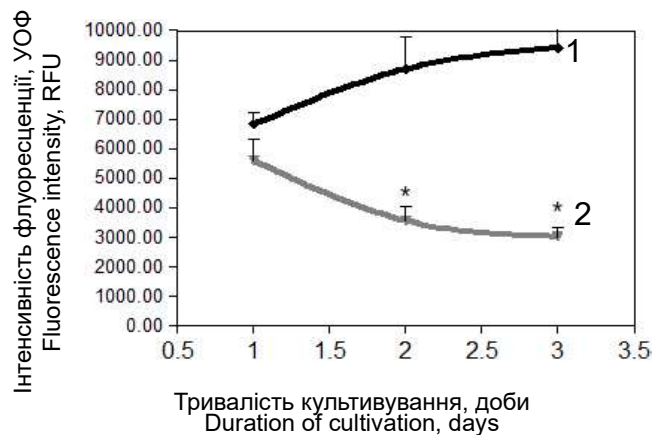
**Рис. 2.** Актинові філаменти цитоскелета МСК за забарвленням фалоїдин-FITC: **A** — моношарове культивування; **B** — сфероїд на 3-тю добу культивування у «вісячій краплі» за концентрації МСК  $3 \times 10^3$  клітин/краплю, зображення шару сфероїда на глибині 50,10 мкм. Стрілкою позначено розвинені актинові філаменти в зовнішньому шарі.

**Fig. 2.** Actin filaments of the MSC cytoskeleton by phalloidin-FITC staining: **A** – monolayer culture; **B** – a spheroid on the 3rd day of cultivation in a «hanging drop» at a MSC concentration of  $3 \times 10^3$  cells/drop, image of the spheroid layer at a depth of 50.10  $\mu\text{m}$ . The arrow indicates the developed actin filaments in the outer layer.

тинові філаменти були розвинені в клітинах зовнішнього шару, щільність актинових філаментів в більш глибоких шарах була значно меншою і самі філаменти були тоншими (рис. 2, B). Таким чином, виявлено, що формування сфероїдів супроводжується редукцією актинового компонента цитоскелета МСК, а також його реорганізацією. При цьому відбувається поляризація клітин у структурі сфероїда, тобто клітини зовнішнього шару мають більш розвинені актинові філаменти, ніж в глибших шарах.

Зменшення розміру клітин і реорганізація цитоскелета є ознаками переходу МСК у стан спокою [30, 31], що є вкрай важливим для розвитку стійкості до умов зберігання за температури навколишнього середовища. У зв'язку з цим було важливо дослідити активність метаболізму МСК у динаміці під час сфероїдоутворення. Для цього проводили аналіз відновлення Alamar Blue, інтегрального індикатора метаболічної активності в ході культивування МСК у моношарі та «вісячій краплі». Результати наведено на рис. 3, з якого видно, що за моношарового 2D-культивування протягом 3 діб відбувалось зростання інтенсивності флуоресценції відновленої форми індикатора. Інтенсивність флуоресценції за культивування у «вісячій краплі», навпаки, на 1-шу добу зменшувалась на 15%, на 2-гу — на 35%, на 3-тю — на 42% порівняно з вихідним рівнем (на нульову добу). Отримані

contrary, decreased by 15% on the 1st day, on the 2<sup>nd</sup> day by 35%, and on the 3rd day by 42% compared to the initial level (on day 0). The obtained data demonstrate that different processes took place with



**Рис. 3.** Метаболічна активність МСК за культивування в моношарі та «вісячій краплі» оцінена за відновленням Alamar Blue (резазурину): 1 — моношар; 2 — сфероїди; \* — відмінності статистично значущі ( $p < 0,05$ ) порівняно з показником у моношарі у відповідний термін культивування.

**Fig. 3.** Metabolic activity of MSCs cultured in a monolayer and in a «hanging drop» assessed by the Alamar Blue (resazurin) reduction: 1 – monolayer, 2 – spheroids; \* – differences are statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared to the data in the monolayer in the corresponding period of cultivation.



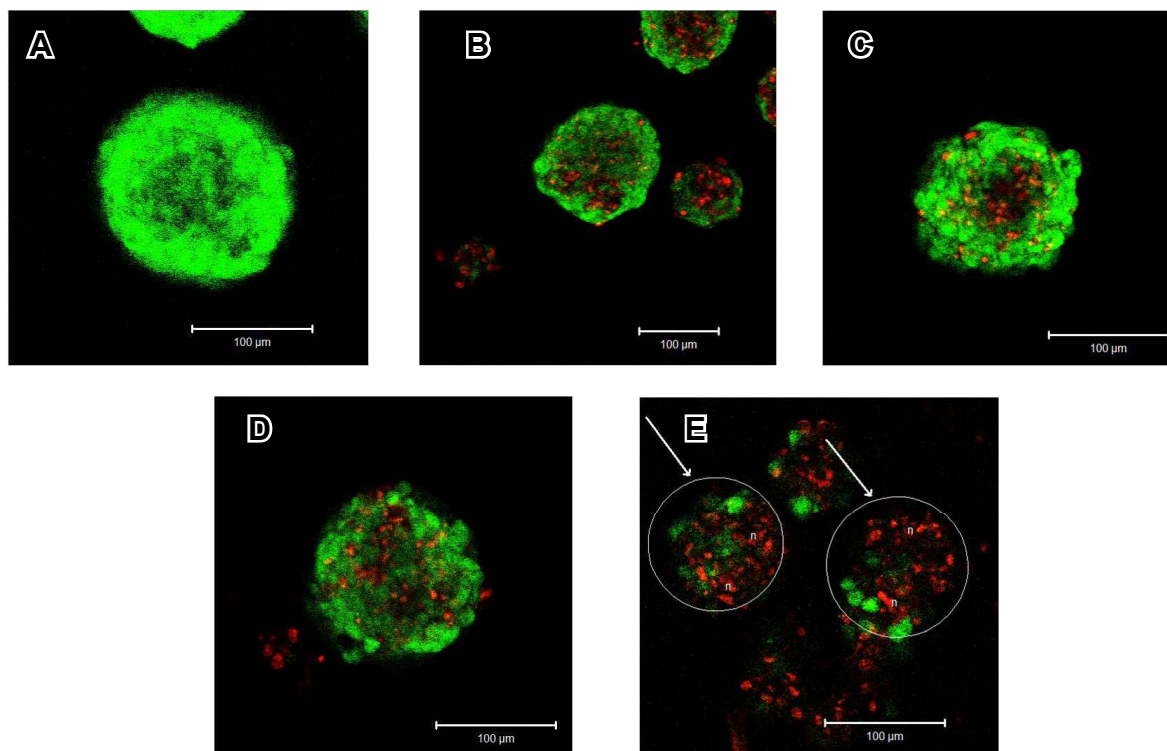
дані демонструють, що з МСК за різних способів культивування відбувалися різні процеси, які потребували відповідного «налаштування» клітинного метаболізму. Так, за 2D-культивування МСК прикріплювались до поверхні пластику, розпластувались і проліферували, прижиттєва мікроскопія виявляла клітини в процесі мітозу. За культивування у «вісячій краплі» відбувалися агрегація та взаємодія клітин, які під час сфероїдоутворення значно зменшували метаболічну активність і переходили в стан спокою, як вже було визначено вище, при цьому залишались життєздатними. Перехід клітин всередині сфероїда в стан спокою з мінімальною метаболічною активністю виявлено в дослідженнях сфероїдів з ракових клітин [1], гепатоцитів [10], та МСК [24]. Більше того, було виявлено, що формування сфероїдів викликає стабілізацію транскрипційного фактора HIF-1, який, за припущеннями авторів, може бути залучений до регуляції метаболічної активності, збільшення стійкості клітин, підвищення стовбуровості та секреторної активності [24]. Відомо, що зберігання МСК за умов гіпотермії без втрати життєздатності можливе лише протягом кількох годин у моношарі [9] або суспензії [6, 33], тобто без попереднього переходу в стан спокою. Тому в цій роботі було важливим перевірити, як зменшення розміру клітин, реорганізація цитоскелета і зниження їх метаболічної активності (що вказують на перехід в стан спокою в результаті утворення сфероїдів) впливають на ефективність їх наступного зберігання в закритих контейнерах за температури 22°C. Було виявлено, що в ході зберігання агрегація сфероїдів не відбувалась, їх діаметр не змінювався і дорівнював 100–150 мкм (рис. 4). Життєздатність сфероїдів до зберігання складала (95 ± 5,4)% (рис. 4, А) і підтримувалась у ході зберігання на високому рівні до 7-ї доби (рис. 4, В–Д). Так, на 1-шу добу зберігання життєздатність складала (74,3 ± 4,4)%, на 3-тю — (71,5 ± 3,6)%, на 7-му — (72 ± 4,5)%. Значне зниження життєздатності (до значення 34,6 ± 4,3 %) й появу зон некрозу в структурі сфероїдів спостерігали після 10 діб зберігання (рис. 4, Е). Метаболічна активність, яка знижувалась у процесі сфероїдоутворення, під час подальшого зберігання добре підтримувалась у період до 7 діб (рис. 5), що підтверджує гіпотезу щодо важливості переходу в стан спокою для розвитку стійкості до пошкоджуючих факторів зберігання. Ефективність прикріплення сфероїдів на адгезивний пластик у контрольній групі (до зберігання) складала 100%, при подальшому культивуванні спостерігали міграцію і роз-

MSCs cultured by different methods, which required appropriate adjustment of cellular metabolism. Thus, during 2D-cultivation, MSCs have been attached to the surface of the plastic, spread and proliferated, microscopy revealed cells in the process of mitosis. During cultivation in the ‘hanging drop’, the spheroidal formation was accompanied by cell aggregation and interaction took place, cells significantly reduced metabolic activity and reached a state of quiescence, as it has been already mentioned above, while remaining viable. The transition of cells inside the spheroid to a state of quiescence with minimal metabolic activity was found in the studies of spheroids from cancer cells [1], hepatocytes [10], and MSCs [24]. Moreover, it has been revealed that the formation of spheroids causes the stabilization of the transcription factor HIF-1, which, according to the authors, may be involved in the regulation of metabolic activity, increasing cell stability, stemness and secretory activity [24]. The storage of MSCs under hypothermia conditions without viability loss is known to be possible only for a few hours in a monolayer [9], or suspension [6, 33], *i. e.* without a preliminary transition to a state of quiescence. Therefore in these studies it was important to check how the decreased size of cells, cytoskeletal reorganization and their reduced metabolic activity (indicating a transition into a state of quiescence resulted from spheroidal formation) affect the efficiency of spheroids subsequent storage in sealed containers at a temperature of 22°C.

It was found that during storage, no aggregation of spheroids occurred, their diameter did not change and was equal to 100–150 μm (Fig. 4). The viability of spheroids before storage was 95 ± 5.4% (Fig. 4, A) and was maintained at a high level during storage until the 7<sup>th</sup> day (Fig. 4, B–D). Thus, on the 1<sup>st</sup> day of storage, the viability was 74.3 ± 4.4%, on the 3<sup>rd</sup> – 71.5 ± 3.6%, on the 7<sup>th</sup> – 72 ± 4.5%. A significant decrease in viability (to a value of 34.6 ± 4.3 %) and the appearance of necrosis zones in the spheroids structure was observed after 10 days of the storage (Fig. 4, E). Metabolic activity, which decreased in the process of spheroidal formation, was well supported during subsequent storage for up to 7 days (Fig. 5), which confirms hypothesis regarding the importance of the transition to a state of quiescence for the development of resistance to damaging storage factors. The attachment efficiency in the control group (spheroids before storage) was 100%, during further cultivation, cell migration and spreading around the attached spheroids were observed (Fig. 6, A). After storage for 1, 3, and 7 days, the attachment efficiency re-







**Рис. 4.** Життєздатність МСК до та після зберігання в складі сфероїдів в закритих контейнерах за температури 22°C: **А** — контроль (до зберігання), **В** — 1 доба зберігання, **С** — 3 доби зберігання, **Д** — 7 діб зберігання, **Е** — 10 діб зберігання. Забарвлення FDA/EB. Стрілкою і кружечком позначено границі типового сфероїда в групі 10 діб зберігання, *n* — зона некрозу.

**Fig. 4.** Viability of MSCs before and after storage within spheroids in sealed containers at a temperature of 22°C: **A** – control (before storage), **B** – 1 day of storage, **C** – 3 days of storage, **D** – 7 days of storage, **E** – 10 days of storage. FDA/EB staining. An arrow and a circle mark the borders of a typical spheroid in the 10 days storage group, *n* – zone of necrosis.

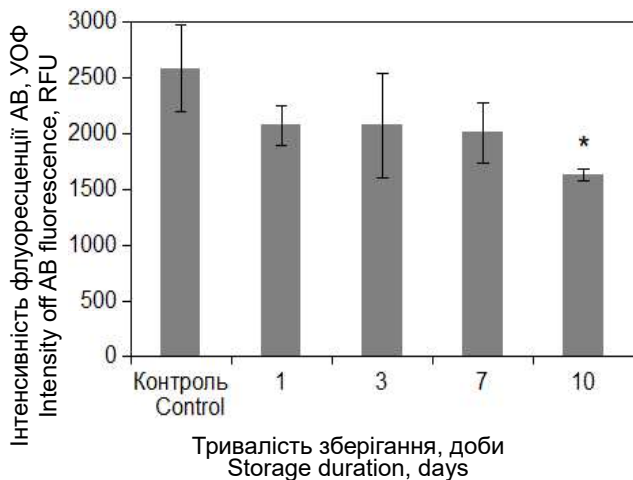
селення клітин навколо прикріплених сфероїдів (рис. 6, А). Після зберігання протягом 1, 3, та 7 діб ефективність прикріплення була на рівні 100%, клітини добре мігрували з прикріплених сфероїдів і мали фібробластоподібну морфологічну структуру (рис. 6, В–Д). Ефективність прикріплення сфероїдів, які зберігали протягом 10 діб, складала ( $85,2 \pm 4,4$ ) %, але при подальшому культивуванні сфероїди залишалися щільними, мали темні зони некрозу, на поверхні були місця з рихлими відлущеними округлими клітинами, з сфероїдів виселялася незначна кількість клітин, спостерігали появу клітинного детриту (рис. 6, Е).

Оцінку здатності МСК до спрямованого диференціювання здійснювали за культивування в середовищах з індукторами. Було виявлено здатність до адипогенного диференціювання в МСК до і після зберігання в складі сфероїдів протягом 7 діб, що демонструвала поява клітин з ліпідними включеннями, позитивно забарвлених Oil Red O (рис. 7, А, С). У ході остеогенної індукції сфероїдів до та після збері-

mained at 100%, the cells migrated well from the attached spheroids and had a fibroblast-like morphology (Fig. 6, B–D). The attachment efficiency of spheroids, which were stored for 10 days, was  $85.2 \pm 4.4\%$ , but during cultivation, this spheroids remained dense, had dark zones of necrosis, there were places on the surface with loose exfoliated rounded cells, a small number of cells spread from the spheroids, the appearance of cellular detritus was observed (Fig. 6, E).

The ability of MSCs for directed differentiation was assessed during cultivation in media with inducers. The ability for adipogenic differentiation in MSCs in the composition of spheroids before and after storage for 7 days was revealed, which was demonstrated by the appearance of cells with lipid vacuoles, positively stained with Oil Red O (Fig. 7, A, C). During osteogenic induction of spheroids before and after storage, secretion and accumulation of calcium-binding matrix in the form of deposits was observed in all fields of view. Positive staining with Alizarin red for calcium confirmed the osteogenic differentiation realization (Fig. 7, B, D).



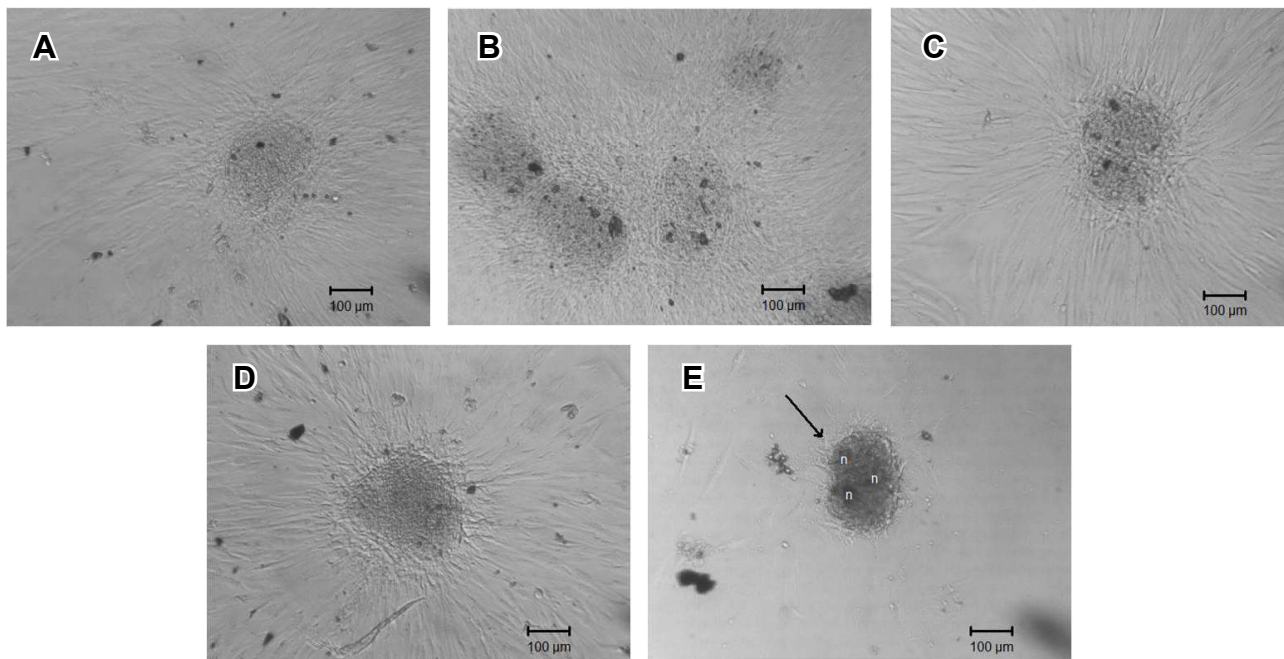


**Рис. 5.** Метаболічна активність МСК до (контроль) та після зберігання в складі сфероїдів в закритих контейнерах за температури 22°C. \* — відмінності статистично значущі ( $p < 0,05$ ) порівняно з показником у контролі (до зберігання).

**Fig. 5.** Metabolic activity of MSCs before (control) and after storage within spheroids in sealed containers at a temperature of 22°C. \* – differences are statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared to the control (before storage).

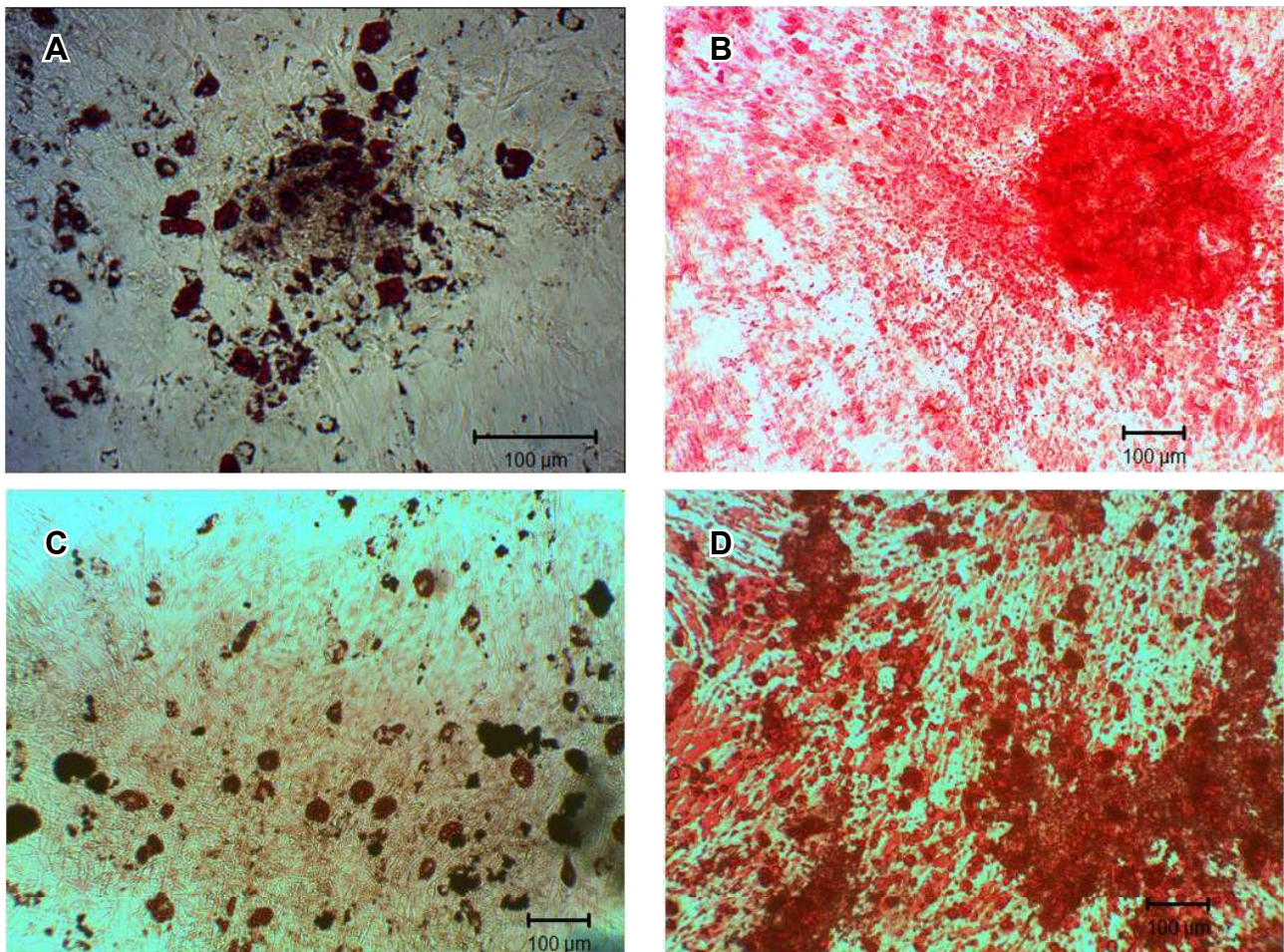
гання спостерігали секрецію і накопичення кальцій-зв'язуючого матриксу у вигляді відкладень у всіх полях зору. Позитивне забарвлення алізариним червоним на кальцій підтвердило

The choice of preservation method for short-term storage and transportation of MSC-based spheroids is crucial for their research and therapeutic practical use but still remains an open question. Delivery of cryopreserved samples in liquid nitrogen is inconvenient, expensive, and should be performed in restricted time window. Spheroids are considered as a complex object for cryopreservation being the 3D constructs formed by cells involved in cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. Cryopreservation can affect both properties of MSCs and spheroids integrity therefore being not preferential for short-term periods. Storage of spheroids under ambient temperature can overcome limitations of low temperature preservation, but this was not properly studied by the present moment. Results obtained in the work revealed that MSC-based spheroids stored for 7 days at a temperature of 22°C show high post-storage viability and preserved metabolic activity, which is consistent with the results of another study [20], which reported the preservation of >90% viability of MSC in spheroids after 7 days of ambient storage. Herein, we also performed an analysis of 7-day stored spheroids behavior during post-storage re-cultivation under standard 2D-culture with return to normal oxygen/carbon monoxide contents and nutrients supply



**Рис. 6.** Прикріплення та міграція клітин зі сфероїдів на адгезивній культуральній поверхні до та після зберігання за температури 22°C: **A** — контроль (до зберігання), **B** — 1 доба зберігання, **C** — 3 доби зберігання, **D** — 7 днів зберігання, **E** — 10 днів зберігання. Прижиттєва мікроскопія — 3 доби культивування. Стрілкою позначено незначну кількість клітин, що виселяються, *n* — зона некрозу.

**Fig. 6.** Spheroids attachment and cell spreading on adhesive cultural surface before and after storage at temperature 22 °C: **A** – control (before storage), **B** – 1 day of storage, **C** – 3 days of storage, **D** – 7 days of storage, **E** – 10 days of storage. Intravital microscopy, 3 days of culture. The arrow indicates a small number of migrating cells, *n* – a zone of necrosis.



**Рис. 7.** Спрямоване адипогенне (А, С) і остеогенне (В, D) диференціювання МСК до (А, В) та після (С, D) зберігання в складі сфероїдів за температури 22°C. Забарвлення для візуалізації: А, С – Oil Red O; В, D – алізаріновий червоний. Культивування у середовищах з індукторами, 21 доба.

**Fig. 7.** Induced adipogenic (A, C) and osteogenic (B, D) differentiation of MSCs before (A, B) and after (C, D) storage within spheroids at a temperature of 22°C. Staining for visualization: A, C – Oil Red O; B, D – alizarin red. Culture in media with inducers, 21 days.

реалізацію остеогенного диференціювання (рис. 7, В, D).

Вибір методу консервування сфероїдів на основі МСК для короткострокового зберігання та транспортування має вирішальне значення для їх наукового та терапевтичного використання, але все ще залишається відкритим питанням. Перевезення кріоконсервованих зразків у рідкому азоті є незручним, вартісним, до того ж має здійснюватися в обмеженому проміжку часу. Сфероїди розглядають як складний для кріоконсервування об'єкт, який є тривимірною конструкцією з клітин, залучених до взаємодії клітина-клітина та клітина-матрикс. Кріоконсервування може впливати як на властивості МСК, так і на цілісність сфероїдів, тому не є привабливим для зберігання протягом короткострокового періоду. Зберігання сфероїдів за температури навколишнього середовища може подолати обмеження низькотемпературного збе-

and showed restoration of attachment capacity, spreading and migration of cells with typical fibroblast-like morphology from attached spheroids, and resuming of differentiation abilities, which is of great importance for verifying viability indicators, which can potentially be overestimated in immediate post-storage assessment. Thus, we demonstrated that 3D-spheroids formed by human adipose tissue-derived MSCs at concentration of  $3 \times 10^3$  /spheroid can be effectively preserved at a temperature below physiological (22°C) for up to 7 days. Our work provides a cheap, versatile, and safe hypothermic storage method for time frame which is sufficient for long-distance delivery of MSC-based spheroids opening perspectives for their more wide practical application. Obtained in this research results are also valuable for understanding the fundamental question about possible mechanisms of the development of cell resistance to damaging factors. Our data as to cell size decrease, actin components



рігання, але на даний момент це не досліджено належним чином. Результати, отримані у роботі, показали, що сфероїди на основі МСК, які зберігали протягом 7 діб за температури 22°C, демонструють високу життєздатність та метаболічну активність, що узгоджується з результатами іншого дослідження [20], у якому йдеться про збереження >90% життєздатності МСК у сфероїдах після 7 діб зберігання за температури навколишнього середовища. Ми провели аналіз поведінки сфероїдів, що зберігалися протягом 7 діб, під час рекультивування після зберігання у стандартній 2D-культурі з поверненням до нормального вмісту кисню/окису вуглецю та постачання поживними речовинами, та показали відновлення здатності до прикріплення, розселення та міграцію клітин із типовою фібробластоподібною морфологічною структурою з прикріплених сфероїдів, а також відновлення здатності до спрямованого диференціювання. Це має велике значення для верифікації показників життєздатності, які потенційно можуть бути переоцінені за вимірювання безпосередньо після зберігання. Таким чином, автори продемонстрували, що тривимірні сфероїди, утворені МСК жирової тканини людини, у концентрації  $3 \times 10^3$  клітин/сфероїд можуть ефективно зберігатися за температури нижче фізіологічної (22°C) до 7 діб. Дане дослідження забезпечує дешевий, універсальний і безпечний спосіб гіпотермічного зберігання протягом часу, достатнього для доставки сфероїдів на основі МСК на великі відстані, що відкриває перспективи для їх більш широкого практичного застосування. Отримані в роботі результати також є цінними для розуміння фундаментального питання про можливі механізми розвитку резистентності клітин до факторів пошкодження. Дані щодо зменшення розміру клітин, реорганізації актинових компонентів цитоскелета та зниження метаболічної активності в сфероїдах порівняно з моношаром підтверджують гіпотезу про те, що перехід клітин у стан спокою в процесі формування сфероїдів є ключовим механізмом підтримки виживання під час подальшого зберігання за температури навколишнього середовища. Раніше було показано, що редукція компонентів актину в МСК підвищує експресію плюрипотентних генів [36]. Було продемонстровано, що зменшення розміру МСК в сфероїдах тісно пов'язане з реорганізацією актину і впливає на активацію каспаз та посилення функціонального потенціалу [31]. Просторове мікрооточення, створене під час формування сфероїда з посиленням опосередкованих кадгеринами міжклітинних контактів [34] та взаємо-

реорганізація, and metabolic activity reduction in spheroids compared to monolayer appear to support the hypothesis that cell transition to a quiescent state during spheroidal formation is a key mechanism of survival support in subsequent ambient storage. It was previously shown that actin components reduction in MSCs up-regulates pluripotent genes expression [36]. Cell size reduction closely linked to actin reorganization was demonstrated to influence caspase activation and wide functional enhancement in MSCs within spheroids [31]. Spatial microenvironment created during spheroidal formation with increased cell-to-cell contacts mediated by cadherins [34] and cell-to-extracellular matrix interactions provides natural niches-like signaling and structural support for cell morphology reorganization, and, therefore, is one of the most possible basics for MSC functional reprogramming within spheroids. It should be noted that similar to our observation regarding the decrease in metabolic activity and significant increase in resistance to damage factors was described by Tsai A.C. *et al.* [31], examining the survival under ischemic stress of MSC spheroids of comparable size (500, 2000, 5000 cells/spheroid) to the size of the spheroids in this work (3000 cells/spheroid). Stabilization of the factor HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) due to the development of hypoxia in MSC spheroids is considered as a potential pathway of metabolic rearrangements and increased cell survival [24, 35]. At the same time, in the research [25] there was directly measured the oxygen tension spatial distribution within MSC spheroids detected slight (less than 10%) variation in oxygen tension gradient between internal and outer layers in a range 15 000 – 60 000 cells per spheroid. Considering together this finding and the fact of MSC metabolic plasticity with high ability to change metabolic mode in accordance with culture conditions [26] we can assume that even mild hypoxia inside spheroids can mimic the conditions in physiological niches where MSCs reside and can be additionally involved in metabolic reconfiguration. However further studies are required to elucidate more completely the mechanisms behind the effect of spheroidal formation on MSC resistance to adverse factors of ambient storage.

## Conclusions

To sum up, in this investigation has shown that spheroidal formation causes a number of interrelated changes in the morphology and metabolism of MSCs, which as a result increases the resistance of cells and provides the possibility

дій клітина-позаклітинний матрикс, забезпечує сигналінг, подібний до наявного в природних нішах організму, і структурну підтримку реорганізації клітинної морфологічної структури, отже, є однією з найбільш вірогідних основ функціонального репрограмування МСК у сфероїдах. Слід зазначити, що подібне до спостереження авторів зниження метаболічної активності та значне збільшення стійкості до факторів пошкодження описали А. Tsai та співавт. [31], досліджуючи виживання за умов ішемічного стресу МСК-сфероїдів порівнянного розміру (500, 2000, 5000 клітин/сфероїд) з розміром сфероїдів у цій роботі (3000 клітин/сфероїд). Стабілізацію фактора HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) внаслідок розвитку гіпоксії в сфероїдах з МСК розглядають як потенційний регуляторний шлях метаболічних перебудов і посилення виживаності клітин [24, 35]. У той же час робота К. Murphy та співавт. [25] з вимірювання просторового розподілу тиску кисню всередині сфероїдів із МСК виявила незначну (менше 10%) зміну градієнта тиску кисню між внутрішнім і зовнішнім шарами в діапазоні 15 000–60 000 клітин на сфероїд. Враховуючи результати цих спостережень і метаболічну пластичність МСК з їхньою високою здатністю змінювати метаболічний режим відповідно до умов культивування [26], можемо припустити, що навіть легка гіпоксія всередині сфероїдів може імітувати умови у фізіологічних нішах, у яких знаходяться МСК, і додатково чинити вплив на реконфігурацію метаболізму. Однак проведення подальших досліджень є необхідним для більш повного з'ясування механізмів впливу формування сфероїдів на стійкість МСК до несприятливих факторів навколишнього середовища.

### Висновки

Таким чином, у цій роботі автори показали, що формування сфероїдів викликає низку взаємопов'язаних змін у морфологічній структурі та метаболізмі МСК, що в результаті підвищує резистентність клітин і робить можливим ефективне гіпотермічне зберігання сфероїдів на основі МСК до 7 діб за температури 22°C.

*Робота виконана за підтримки Національного фонду досліджень України (проект № 2021.01/0276).*

### Література

1. Alvarez-Pérez J, Ballesteros P, Cerdán S. Microscopic images of intraspheroidal pH by 1H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *MAGMA*. 2005; 18(6): 293–301.

of efficient hypothermic storage of MSC-based spheroids for up to 7 days at a temperature of 22°C.

*This study was supported by the National Research Foundation of Ukraine (project № 2021.01/0276).*

### References

1. Alvarez-Pérez J, Ballesteros P, Cerdán S. Microscopic images of intraspheroidal pH by 1H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *MAGMA*. 2005; 18(6): 293–301.
2. Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020 Dec 14 [cited 2024 Sep 10]; 11(1): 540. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-020-02054-2>
3. Bara JJ, Richards RG, Alini M, et al. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells*. 2014; 32(7): 1713–23.
4. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98(8): 2396–402.
5. Chatterjee A, Saha D, Niemann H, et al. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology*. 2017; 74: 1–7.
6. Chen Y, Yu B, Xue G, et al. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation. *Cell Transplant*. 2013; 22(6): 1075–86.
7. Cheng NC, Chen SY, Li JR, et al. Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2(8): 584–94.
8. Chinnadurai R, Garcia MA, Sakurai Y, et al. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem Cell Reports*. 2014; 3(1): 60–72.
9. Corwin WL, Baust JM, Baust JG, et al. Characterization and modulation of human mesenchymal stem cell stress pathway response following hypothermic storage. *Cryobiology*. 2014; 68(2): 215–26.
10. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, et al. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*. 2007; 28(36): 5487–97.
11. Dankberg, F, Persidsky, MD. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function. *Cryobiology*. 1976; 13 (4): 430–2.
12. Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, et al. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*. 2014; 69(2): 342–7.
13. Eleuteri S, Fierabracci A. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 17 [cited 2024 Sep 2]; 20(18): 4597. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4597>
14. Erices AA, Allers CI, Conget PA, et al. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant*. 2003; 12(6): 555–61.
15. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp* [Internet]. 2011 May 6 [cited 2024 Sep 21]; (51): 2720. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197119/>
16. García-Sánchez D, Fernández D, Rodríguez-Rey JC, et al. Enhancing survival, engraftment, and osteogenic potential of



2. Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. Quantitative assessment of the impact of cryopreservation on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: up to 24 h post-thaw and beyond. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020 Dec 14 [cited 2024 Sep 10]; 11(1): 540. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-020-02054-2>
3. Bara JJ, Richards RG, Alini M, et al. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells*. 2014; 32(7): 1713–23.
4. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98(8): 2396–402.
5. Chatterjee A, Saha D, Niemann H, et al. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology*. 2017; 74: 1–7.
6. Chen Y, Yu B, Xue G, et al. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation. *Cell Transplant*. 2013; 22(6): 1075–86.
7. Cheng NC, Chen SY, Li JR, et al. Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2(8): 584–94.
8. Chinnadurai R, Garcia MA, Sakurai Y, et al. Actin cytoskeletal disruption following cryopreservation alters the biodistribution of human mesenchymal stromal cells in vivo. *Stem Cell Reports*. 2014; 3(1): 60–72.
9. Corwin WL, Baust JM, Baust JG, et al. Characterization and modulation of human mesenchymal stem cell stress pathway response following hypothermic storage. *Cryobiology*. 2014; 68(2): 215–26.
10. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, et al. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*. 2007; 28(36): 5487–97.
11. Dankberg, F, Persidsky, MD. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function. *Cryobiology*. 1976; 13 (4): 430–2.
12. Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, et al. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology*. 2014; 69(2): 342–7.
13. Eleuteri S, Fierabracci A. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 17 [cited 2024 Sep 2]; 20(18): 4597. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4597>
14. Erices AA, Allers CI, Conget PA, et al. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant*. 2003; 12(6): 555–61.
15. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp* [Internet]. 2011 May 6 [cited 2024 Sep 21]; (51): 2720. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197119/>
16. García-Sánchez D, Fernández D, Rodríguez-Rey JC, et al. Enhancing survival, engraftment, and osteogenic potential of mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2019; 11(10): 748–63.
17. Ge J, Guo L, Wang S, et al. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev Rep*. 2014; 10(2): 295–303.
18. Gordiyenko OI, Kovalenko IF, Rogulska OY, et al. Theory-based cryopreservation mode of mesenchymal stromal cell spheroids. *Cryobiology* [Internet]. 2024 Jun [cited 2024 Oct 9]; 115:104906. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224024000610>
19. Guo L, Zhou Y, Wang S, et al. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J Cell Mol Med*. 2014; 18(10): 2009–19.
20. Jiang B; Yan L; Miao Z; et al. Spheroidal formation preserves human stem cells for prolonged time under ambient conditions mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2019; 11(10): 748–63.
21. Ge J, Guo L, Wang S, et al. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev Rep*. 2014; 10(2): 295–303.
22. Gordiyenko OI, Kovalenko IF, Rogulska OY, et al. Theory-based cryopreservation mode of mesenchymal stromal cell spheroids. *Cryobiology* [Internet]. 2024 Jun [cited 2024 Oct 9]; 115:104906. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224024000610>
23. Guo L, Zhou Y, Wang S, et al. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *J Cell Mol Med*. 2014; 18(10): 2009–19.
24. Jiang B; Yan L; Miao Z; et al. Spheroidal formation preserves human stem cells for prolonged time under ambient conditions for facile storage and transportation. *Biomaterials* 2017; 133: 275–86.
25. Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11(5): 321–34.
26. Li Y, Dong Y, Ran Y, et al. Three-dimensional cultured mesenchymal stem cells enhance repair of ischemic stroke through inhibition of microglia. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2021 Jun 21 [cited 2024 Sep 22]; 12(1): 358 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8218508/>
27. Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant*. 2014; 23(9): 1045–59.
28. Liu Y, Muñoz N, Tsai AC, et al. Metabolic Reconfiguration Supports Reacquisition of Primitive Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Stem Cells*. 2017; 35(2): 398–410.
29. Murphy KC, Hung BP, Browne-Bourne S, et al. Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids. *J R Soc Interface* [Internet]. 2017 Feb [cited 2024 Sep 12]; 14(127): 20160851. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5332570/>
30. Pattappa G, Heywood HK, de Bruijn JD, et al. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol*. 2011. 226(10): 2562–70.
31. Petrenko YA, Gorokhova NA, Tkachova EN, et al. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2005; 77(5): 100–5.
32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143–7.
33. Rovere M, Reverberi D, Arnaldi P, et al. Spheroid size influences cellular senescence and angiogenic potential of mesenchymal stromal cell-derived soluble factors and extracellular vesicles. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2023 Dec 12 [cited 2024 Sep 18]; 11: 1297644. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2023.1297644/full>
34. Sotirov R, Kostadinova M, Pashova S, et al. Morphology of Mesenchymal Stem Cells in 3D spheroids. *Acta morphologica et anthropologica*. 2018; 25: 90–6.
35. Tsai AC, Liu Y, Yuan X, et al. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. *Tissue Eng Part A*. 2015; 21(9–10): 1705–19.
36. Wiehe JM, Kaya Z, Homann JM, et al. GMP-adapted over-expression of CXCR4 in human mesenchymal stem cells for cardiac repair. *Int J Cardiol*. 2013; 167(5): 2073–81.
37. Wu YD, Li M, Liao X, et al. Effects of storage culture media, temperature and duration on human adipose-derived stem cell viability for clinical use. *Mol Med Rep*. 2019; 19(3): 2189–201.
38. Yoshino M, Kajiji M, Yoshii H, et al. Distinctive biological properties between mesenchymal stem cell spheroids and clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complexes in 3D culture systems. *Appl Sci* [Internet]. 2023 Nov



- for facile storage and transportation. *Biomaterials* 2017; 133: 275–86.
21. Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11(5): 321–34.
  22. Li Y, Dong Y, Ran Y, et al. Three-dimensional cultured mesenchymal stem cells enhance repair of ischemic stroke through inhibition of microglia. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2021 Jun 21 [cited 2024 Sep 22]; 12(1): 358 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8218508/>
  23. Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant.* 2014; 23(9): 1045–59.
  24. Liu Y, Muñoz N, Tsai AC, et al. Metabolic Reconfiguration Supports Reacquisition of Primitive Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Stem Cells.* 2017; 35(2): 398–410.
  25. Murphy KC, Hung BP, Browne-Bourne S, et al. Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids. *J R Soc Interface* [Internet]. 2017 Feb [cited 2024 Sep 12]; 14(127): 20160851. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5332570/>
  26. Pattappa G, Heywood HK, de Bruijn JD, et al. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol.* 2011; 226(10): 2562–70.
  27. Petrenko YA, Gorokhova NA, Tkachova EN, et al. The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria. *Ukr Biokhim Zh (1999).* 2005; 77(5): 100–5.
  28. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411): 143–7.
  29. Rovere M, Reverberi D, Arnaldi P, et al. Spheroid size influences cellular senescence and angiogenic potential of mesenchymal stromal cell-derived soluble factors and extracellular vesicles. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2023 Dec 12 [cited 2024 Sep 18]; 11: 1297644. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2023.1297644/full>
  30. Sotirov R, Kostadinova M, Pashova S, et al. Morphology of Mesenchymal Stem Cells in 3D spheroids. *Acta morphologica et anthropologica.* 2018; 25: 90–6.
  31. Tsai AC, Liu Y, Yuan X, et al. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. *Tissue Eng Part A.* 2015; 21(9-10): 1705–19.
  32. Wiehe JM, Kaya Z, Homann JM, et al. GMP-adapted over-expression of CXCR4 in human mesenchymal stem cells for cardiac repair. *Int J Cardiol.* 2013; 167(5): 2073–81.
  33. Wu YD, Li M, Liao X, et al. Effects of storage culture media, temperature and duration on human adipose-derived stem cell viability for clinical use. *Mol Med Rep.* 2019; 19(3): 2189–201.
  34. Yoshino M, Kajiya M, Yoshii H, et al. Distinctive biological properties between mesenchymal stem cell spheroids and clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complexes in 3D culture systems. *Appl Sci* [Internet]. 2023 Nov 29 [cited 2024 Sep 20]; 13(23): 12790. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/13/23/12790>
  35. Zhang Q, Nguyen AL, Shi S, et al. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(6): 937–47.
  36. Zhou Y, Chen H, Li H, et al. 3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(6): 1073–84.
  37. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12): 4279–95.
  - 29 [cited 2024 Sep 20]; 13(23): 12790. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/13/23/12790>
  35. Zhang Q, Nguyen AL, Shi S, et al. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(6): 937–47.
  36. Zhou Y, Chen H, Li H, et al. 3D culture increases pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells through relaxation of cytoskeleton tension. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(6): 1073–84.
  37. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12): 4279–95.

