

BIEŃKO, Karolina, LESZCZ, Monika, BIAŁEK, Justyna, WIĘCKOWSKA-DEROŃ, Marta, ĆWIK-BŁOTNICKA, Dominika & BORCZYK, Joanna. 2D and 3D culture of stem cells. *Journal of Education, Health and Sport*. 2023;16(1):62-67. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2023.16.01.007>
<https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/42985>
<https://zenodo.org/record/7766259>

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 21, 2021. No. 32343. Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences). Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159. Przynależność dyscypliny naukowej: Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu). © The Authors 2023; This article is published with open access at License Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited. The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper. Received: 08.03.2023. Revised: 14.03.2023. Accepted: 22.03.2023. Published: 24.03.2023.

2D and 3D culture of Stem Cells

Karolina Bieńko¹, Monika Leszcz², Justyna Białek³, Marta Więckowska-Deroń⁴, Dominika Ćwik-Błotnicka⁵, Joanna Borczyk⁶

¹ Specjalistyczny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1 w Lublinie

² Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej w Radzynie Podlaskim

³ Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie

⁴ Samodzielny Publiczny szpital Kliniczny nr 4 w Lublinie

⁵ Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej w Lublinie

⁶ Szpital Specjalistyczny im. Ludwika Rydygiera w Krakowie

Corresponding author: Karolina Bieńko, biengkakarolina96@gmail.com

ORCID ID

Karolina Bieńko: <https://orcid.org/0000-0001-7070-9224> biengkakarolina96@gmail.com

Monika Leszcz: <https://orcid.org/0000-0002-2041-5890> monika1leszcz@gmail.com

Justyna Białek: <https://orcid.org/0000-0002-8447-3395> justynabialek111@gmail.com

Marta Więckowska-Deroń: <https://orcid.org/0000-0002-7811-8370> m.wieckowska9513@gmail.com

Dominika Ćwik-Błotnicka: <https://orcid.org/0009-0003-2556-2800> cwikblotnicka@gmail.com

Joanna Borczyk: <https://orcid.org/0009-0003-5757-6668> asiaborczyk1@gmail.com

Abstrakt

Background and Purpose: Stem cells are widely used in many fields of science, especially medicine. Thanks to their proliferative properties and their ability to transform into other cells of the body, they have found application in regenerative medicine, for the treatment of extensive burns, reconstruction of the hematopoietic system. We can obtain them from many tissues including adipose, bone marrow, umbilical cord blood or human milk.

Current state of knowledge: Therefore, it is important to use a culture method through which we can obtain a large number of cells in a short time, and these cells will be viable and able to differentiate into other types. Adequate oxygen, carbon dioxide, nutrients and humidity are required for culture. The most widely used is the 2D method, which is quite cheap and easy to perform. The 3D method, although more expensive and labor-intensive, is more efficient. With the 3D, or spherical, method, we have the opportunity to obtain an environment that provides in vivo conditions, which we will not get with the 2D method. Spherically cultured cells receive stimuli from the environment in three dimensions, at the cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix levels. This allows the free flow of cytokines, nutrients, growth factors and chemokines.

Conclusions: In the future, the 3D method may supplant 2D culture methods. By providing conditions similar to those in the body, we can reduce the number of tests performed on animals. Currently, drugs used in oncology are increasingly being tested in such cultures and their therapeutic effect determined.

Key words: mesenchymal stem cells; culture 3D; culture 2D; extracellular matrix

Wstęp

Komórki macierzyste, SC (ang. stem cells) posiadają zdolność różnicowania się w dowolną komórkę organizmu oraz możliwość samoodnowy. Wyróżniamy komórki totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne oraz oligopotencjalne. W dorosłym organizmie możemy spotkać mezenchymalne komórki macierzyste, MSC (ang. mesenchymal stem cells), które posiadają właściwości proliferacyjne i można różnicować je w określony typ komórek. [1] MSC możemy pozyskiwać z różnych źródeł m. in. tkanki tłuszczowej, szpiku kostnego, sznura pępowinowego oraz krwi pępowinowej. Do hodowli potrzebujemy odpowiednich warunków temperatury, stężenia tlenu i dwutlenku węgla, substancji odżywczych. Optymalne warunki hodowli to mieszanina 5% stężenia CO₂, 21% O₂, wilgotność 95% oraz temperatura 37°C [2,3] Warunki hodowli są bardzo istotne do uzyskania dużego wskaźnika proliferacji i żywotności. Komitet Mezenchymalnych Komórek Macierzystych Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej określił definicję MSC. W czasie hodowli muszą przylegać do plastiku, różnicować się w osteoblasty, posiadać ekspresję CD105, CD73, CD90 i brak ekspresji CD14, CD34, CD45 i HLA-DR. [4,5]

Każda komórka wydziela swój sekretom, składają się na niego cytokiny, chemokiny, cząstki macierzy pozakomórkowej oraz czynniki wzrostu. Wpływają one na wydajność prowadzonej hodowli, poprzez wzajemny wpływ na siebie. W pewnym stopniu zachowane są warunki jakie stwarza żywy organizm dla komórek. [2,3] Obecnie najczęściej stosowana metoda hodowlana to warunki hodowli 2D. Jest to tradycyjny i łatwy model hodowlany, stosowany na bardzo dużą skalę, jednak nie odzwierciedlający warunków *in vivo*, ponieważ komórki ludzkiego organizmu mają trzy wymiary, a nie dwa, które uzyskujemy w hodowli 2D. Hodowla polega na wytworzeniu monowarstwy z komórek na plastikowych płytkach. MSC posiadają naturalne właściwości adhezyjne, dlatego nie wymagają użycia ksenogennych substancji, które umożliwiają przyłączenie do płytki, zaś pluripotencjalne komórki macierzyste wymagają pokrycia kolagenem lub fibroblastami myszy w celu adhezji do podłoża. Hodowla komórek 3D jest nowoczesną metodą i zapewnia bardziej fizjologiczne środowisko. Nazywana jest hodowlą sferoidalną, umożliwia wzajemne interakcje między poszczególnymi komórkami. Pozwala na swobodny gradient substancji odżywczych, tlenu i substancji krążących w macierzy pozakomórkowej, ECM (ang. extracellular matrix). [6,7,8]

Badania dowodzą nad przewagą hodowli 2D nad 3D. Naukowcy porównują hodowle pod względem starzenia się komórek, zdolności do tworzenia kolonii, szybkości proliferacji, żywotności oraz ekspresji genów. Coraz częściej wykorzystuje się sferoidy do określania działania leków, co pozwala zmniejszyć wykorzystanie modeli zwierzęcych. [8]

Cel pracy

Celem pracy jest przegląd artykułów dotyczących hodowli komórek macierzystych w warunkach 2D i 3D. Porównanie obu tych metod, i ocena, która z nich stwarza lepsze warunki dla proliferacji i żywotności komórek.

Material i metody

Dokonano przeglądu piśmiennictwa zgromadzonego w bazie PubMed dotyczących aktualnych badań na temat warunków i sposobu hodowli komórek macierzystych oraz wykorzystania metod w praktyce.

Hodowla komórek macierzystych metodą 2D i 3D

Komórki macierzyste pobrane z odpowiedniej tkanki izolujemy za pomocą wirowania, próbę rozcieńczamy w stosunku 1:1 roztworem zbuforowanej soli fizjologicznej (PBS) bez jonów Ca i Mg, a następnie wirujemy przez 20 minut w temperaturze 20°C. Po odwirowaniu warstwę tłuszczową oraz supernatant odrzucamy, a osad komórek przemywamy trzykrotnie roztworem PBS. Następnie potwierdza się macierzysty charakter wyizolowanych komórek, za pomocą badania cytometrycznego. Należy wykazać obecność antygenów powierzchniowych CD 73, CD90, CD105 oraz brak ekspresji i CD14, CD34, CD45 i HLA-DR. Hodowlę komórek przeprowadza się w warunkach adherentnych, dzięki czemu uzyskujemy fibroblastopodobny kształt komórek oraz zdolność adhezji komórek do ścian plastiku. [9,10]

Podstawowa metoda hodowli 2D polega na adhezji do płaskiej powierzchni, najczęściej wykorzystuje się szlaki Petriego z polistyrenu. Dzięki równomiernemu dostępowi do składników odżywczych, tlenu, dwutlenku węgla, użytych hormonów komórki charakteryzują się jednakowym wzrostem i proliferacją. Dzięki temu, metoda jest używana na szeroką skalę przez naukowców na całym świecie. Nie możemy w tej metodzie kontrolować kształtu komórki oraz wpływu ECM na hodowlę. [11,12]

Proces powstawania sferoid jest kilkietapowy, na początku pojedyncze komórki tworzą luźno przylegające sferoidy komórkowe. W procesie bierze udział integryna, E-kadheryna oraz kompleks Beta-kateniny. Dzięki tym substancjom i wytwarzanym przez nich połączeniom międzykomórkowym możliwe jest wytworzenie silnie adhezyjnej wielokomórkowej sferoidy. W metodach wyróżniamy metodę wiszącej kropli, kulturę peletek, płynną nakładkę, obracające się naczynie ścienne, lewitację magnetyczną i kulturę przedzarki. Do hodowli wykorzystujemy hydrożele, biomateriały i czynniki cząsteczkowe. [13,14,15]

Porównanie właściwości SC w zależności od hodowli

W standardowych warunkach hodowla 2D jest łatwym sposobem do pozyskania komórek macierzystych. MSC w zawieszynie opadają na dno butelek hodowlanych i ulegają adhezji do plastikowej powierzchni. Środowisko jest jednak mniej fizjologiczne, niż w hodowli 3D. Aby uzyskać sferoid *in vitro* musimy hodować je w warunkach, które uniemożliwią przyleganie do stałych powierzchni. Na początku stosowano metodę kolby obrotowej, później wprowadzono 96-dołkowe płytki, metodę wiszącej kropli oraz stosowanie membran chitozanowych. Agregaty sferoidalne początkowo tworzone są przez luźne agregaty komórek z pomocą wiązań ECM z integrzynami, następnie są zagęszczane przez wiązanie homofilnej kadheryny. [16]

Wolff i wsp. w swoich badaniach oceniali wpływ hodowli 3D na właściwości adipogenne i uwalnianie adipokin adMSC w porównaniu do hodowli 2D. Do sferoidalnego systemu 3D użyto namagnesowanych nanocząsteczek. Zaobserwowano, że średnica komórek różniła się w zależności od hodowli. W 2D mediana średnic była większa o około 5 mikrometrów, od mediany komórek w hodowli 3D. Pod względem uwalniania hormonów adiponektyny i leptyny, zwiększone możliwości wykazywały komórki hodowli 3D. [17]

Kusuma i wsp. w badaniach określali pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, EV (ang. extracellular vesicles) wytworzone w kulturach 2D i 3D i ich wpływ na leczenie zwłóknienia płuc u myszy. Ponieważ nie tylko same komórki, ale macierz pozakomórkowa może mieć duży wpływ na wartość terapeutyczną i wykorzystanie komórek macierzystych. W badaniach wykazano, że EV w obu hodowlach wykazywały morfologię sferyczną i porównywalną całkowitą liczbę cząsteczek, średnica ich wynosiła średnio <100 nm. Uzyskano klasyczne markery powierzchniowe dla EV CD81+ CD63+ oraz CD9+ . Użycie komórek z hodowli 3D pozwoliło uzyskać większe ilości odkładania kolagenu, w porównaniu z użyciem hodowli komórek 2D. EV 3D pozwoliły na osiągnięcie większej ilości limfocytów T w tkance płucnej. Istnieją kluczowe różnice w odpowiedzi zapalnej, migracji leukocytów i różnicowaniu komórek, w zależności od wykorzystanego typu hodowli. [8] Ciardulli i wsp. badali MSC pobrane ze szpiku kostnego, które hodowano dwiema metodami 2D oraz 3D w 12-studzienkowych płytkach. Do hodowli sferoidalnej użyto nośniki kwasu polimlekowo-glikolowego. Dowiedziono, że komórki z hodowli trójwymiarowej wykazywały ekspresję kolagenu typu I (COL1A1), aktywację cytokin prozapalnych. [18,19]

Madrigal i wsp. w swojej pracy wykazali, większą ilość wydzielania czynników troficzných przez sferoidy, niż w kulturze jednowarstwowej. Do takich czynników zaliczamy TSG-6, STC-1, CXCR4 które są czynnikami przeciwzapalnymi oraz TRAIL, IL-24, CD82, które zaliczamy do białek przeciwnowotworowych. Komórki hodowane sferycznie wykazały silniejsze właściwości przeciwzapalne, co prawdopodobnie było związane z większą produkcją wyżej wymienionych czynników. Lepsza była również właściwość różnicowania się w komórki adipogenne i osteogenne. [20]

Podsumowując, zaletami hodowli 3D jest wzrost żywotności i proliferacji, łatwiejsza interakcja na poziomie komórka-komórka i komórka-macierz, środowisko fizykochemiczne podobne do *in vivo*, utrzymanie wewnętrznych właściwości fenotypowych oraz efektywniejsze wydzielanie cytokin, chemokin i czynników angiogenicznych. Wady tego typu hodowli to ograniczone docieranie składników odżywczych do komórek w rdzeniu sferoidy oraz obniżony gradient dyfuzji, ze względu na trójwymiarowość hodowli. [11,21,22]

PORÓWNYWANA CECHA	HODOWLA 2D	HODOWLA 3D
1. Kształt komórek	Płaski, wydłużony, komórki rosną i wydłużają się w dwóch wymiarach. Komórki tworzą jedną warstwę.	Komórki zachowują swój naturalny kształt, jak w warunkach <i>in vivo</i> . Komórki tworzą wiele warstw
2. Dostęp do substancji odżywczych i tlenu	Każda komórka otrzymuje identyczną ilość składników odżywczych i tlenu.	Komórki obecne w rdzeniu często pozbawione są odpowiedniej ilości substancji odżywczych i tlenu.
3. Różnicowanie komórek	Słabe	Dobre
4. Proliferacja i żywotność	Słaba	Dobra
5. Koszt	Tańsza od kultury 3D, stosowana na bardziej szeroką skalę	Droższe od kultury 2D, dlatego rzadziej stosowane
6. Apoptoza	Zachodzi łatwo	Większa oporność komórek na apoptozę
7. Połączenia komórkowe	Komórki oddziałują na siebie jedynie w dwóch wymiarach	Komórki oddziałują na siebie w trzech wymiarach, oraz za pomocą macierzy zewnątrzkomórkowej.

Tabela 1. Porównanie metod hodowli 2D i 3D [11,21]

Wykorzystanie metod hodowli 3D w praktyce

Obecnie nowe modele hodowli 3D stosowane są do oceny bezpieczeństwa i skuteczności leków. Wykorzystuje się zarówno proste sferoidy jak i statyczne modele 3D. Systemy takie są opracowywane tak, aby naśladować fizjologiczną pracę narządów w organizmie, podczas wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania leku. Wang i wsp. opisali kilka modeli m. in. na hepatocytach. Ich rola jest kluczowa, ponieważ wątroba to pierwszy narząd przejścia, jest odpowiedzialna za produkcję większości metabolitów. [23]

Również opracowywanie leków na choroby autoimmunologiczne, np. RZS (reumatoidalne zapalenie stawów) jest przeprowadzane na hodowlach komórkowych. Szczególnie przydatna metoda 3D, pozwala ograniczyć użycie modeli zwierzęcych, a jednocześnie zapewnia odpowiednie warunki działania leków. Zwrócono również uwagę na wykorzystanie wytworzonych komórek macierzystych do odbudowy uszkodzeń chrząstki stawowej. Sferoidy potrafią wbudować się w ubytki chrząstki. Wykorzystywane są chondrocyty uzyskane na błonach kolagenowych typu I i III. Badania dowodzą że ich użycie zmniejsza stan zapalny i powoduje szybszą regenerację chrząstki. [24]

Pod uwagę brane są również komórki układu nerwowego. Hoduje się komórki mikrogleju w tym astrocyty na hydrożelach kolagenowych, co pozwala na określenie działania leków używanych w chorobach ośrodkowych. Obecnie możemy otrzymać proste i efektywne modele trójwymiarowe, które będą podatne na bodźce ze środowiska zewnętrznego. Ograniczeniem jest tu wielkość hodowli, które zazwyczaj są mniejszych rozmiarów, niż standardowo używane modele zwierzęce. [25,26]

Wnioski

Obecnie wiedza na temat mechanizmów powodujących różnice między cechami komórek a rodzajem hodowli są niewielkie. Potrzeba więcej badań na ten temat. Trójwymiarowa hodowla zwiększa wydajność hodowli, przywraca interakcję na poziomie komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, ponieważ uzyskujemy środowisko zbliżone do *in vivo*. Dzięki tej metodzie wzrasta żywotność i możliwości proliferacyjne komórek. Przymuszczalnie w przyszłości większą część hodowli będą stanowiły modele 3D, które cały czas są unowocześniane. Umożliwi to ograniczenie prowadzenia badań na zwierzętach. Coraz więcej leków testowanych jest na hodowlach komórkowych, chociażby z dziedziny onkologii czy hematologii.

Bibliografia

1. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z.; Stem Cells Past Present and Future; Stem Cell Res Ther. 2019 Feb 26;10(1):68. doi: 10.1186/s13287-019-1165-5. PMID: 30808416; PMCID: PMC6390367.
2. McKee C, Chaudhry GR. Advances and challenges in stem cell culture. Colloids Surf B Biointerfaces. 2017 Nov 1;159:62-77. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.051. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28780462.
3. Raghuram AC, Yu RP, Lo AY, Sung CJ, Bircan M, Thompson HJ, Wong AK. Role of stem cell therapies in treating chronic wounds: A systematic review. World J Stem Cells. 2020 Jul 26;12(7):659-675. doi: 10.4252/wjsc.v12.i7.659. PMID: 32843920; PMCID: PMC7415243.
4. Rein ID, Notø HØ, Bostad M, Huse K, Stokke T. Cell Cycle Analysis and Relevance for Single-Cell Gating in Mass Cytometry. Cytometry A. 2020 Aug;97(8):832-844. doi: 10.1002/cyto.a.23960. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31943748.
5. Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. Cytometry A. 2013 Jan;83(1):48-61. doi: 10.1002/cyto.a.22205. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23027703.
6. Carter K, Lee HJ, Na KS, Fernandes-Cunha GM, Blanco IJ, Djalilian A, Myung D. Characterizing the impact of 2D and 3D culture conditions on the therapeutic effects of human mesenchymal stem cell secretome on corneal wound healing in vitro and ex vivo. Acta Biomater. 2019 Nov;99:247-257. doi: 10.1016/j.actbio.2019.09.022. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31539656; PMCID: PMC7101245.
7. Kaminska A, Wedzinska A, Kot M, Sarnowska A. Effect of Long-Term 3D Spheroid Culture on WJ-MSC. Cells. 2021 Mar 24;10(4):719. doi: 10.3390/cells10040719. PMID: 33804895; PMCID: PMC8063822.
8. Kusuma GD, Li A, Zhu D, McDonald H, Inocencio IM, Chambers DC, Sinclair K, Fang H, Greening DW, Frith JE, Lim R. Effect of 2D and 3D Culture Microenvironments on Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Potencies. Front Cell Dev Biol. 2022 Feb 14;10:819726. doi: 10.3389/fcell.2022.819726. PMID: 35237601; PMCID: PMC8882622.
9. Hassiotou, F., Beltran, A., Chetwynd, E., Stuebe, A.M., Twigger, A.J., Metzger, P., Trengove, N., Lai, C.T., Filgueira, L., Blancafort, P., Hartmann, P.E. (2012). Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells.*, (10):2164-74. doi: 10.1002/stem.1188.
10. Walecka I, Gil-Kulik P, Krzyżanowski A, Czop M, Galkowski D, Karwat J, Chomik P, Świstowska M, Kwaśniewska A, Bogucka-Kocka A, Kocki J. Phenotypic Characterization of Adherent Cells Population CD34+ CD90+ CD105+ Derived from Wharton's Jelly. Med Sci Monit. 2017 Apr 19;23:1886-1895. doi: 10.12659/msm.902186. PMID: 28422936; PMCID: PMC5405783.
11. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? Front Mol Biosci. 2020 Mar 6;7:33. doi: 10.3389/fmolb.2020.00033. PMID: 32211418; PMCID: PMC7067892.
12. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. Physiology (Bethesda). 2017 Jul;32(4):266-277. doi: 10.1152/physiol.00036.2016. PMID: 28615311; PMCID: PMC5545611.
13. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. Int J Mol Sci. 2021 Nov 11;22(22):12200. doi: 10.3390/ijms222212200. PMID: 34830082; PMCID: PMC8618305.

14. Baruffaldi D, Palmara G, Pirri C, Frascella F. 3D Cell Culture: Recent Development in Materials with Tunable Stiffness. *ACS Appl Bio Mater.* 2021 Mar 15;4(3):2233-2250. doi: 10.1021/acsabm.0c01472. Epub 2021 Feb 26. PMID: 35014348.
15. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2019 Dec 12;8(12):1620. doi: 10.3390/cells8121620. PMID: 31842346; PMCID: PMC6953111.
16. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9176357. doi: 10.1155/2016/9176357. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26649054; PMCID: PMC4663368.
17. Wolff A, Frank M, Stachlke S, Peters K. A Comparative Study on the Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in 2D and 3D Culture. *Cells.* 2022 Apr 13;11(8):1313. doi: 10.3390/cells11081313. PMID: 35455993; PMCID: PMC9029885.
18. Ylostalo JH. 3D Stem Cell Culture. *Cells.* 2020 Sep 27;9(10):2178. doi: 10.3390/cells9102178. PMID: 32992579; PMCID: PMC7600463.
19. Ciardulli MC, Marino L, Lovecchio J, Giordano E, Forsyth NR, Selleri C, Maffulli N, Porta GD. Tendon and Cytokine Marker Expression by Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Hyaluronate/Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA)/Fibrin Three-Dimensional (3D) Scaffold. *Cells.* 2020 May 20;9(5):1268. doi: 10.3390/cells9051268. PMID: 32443833; PMCID: PMC7291129.
20. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014 Oct 11;12:260. doi: 10.1186/s12967-014-0260-8. PMID: 25304688; PMCID: PMC4197270.
21. Marques IA, Fernandes C, Tavares NT, Pires AS, Abrantes AM, Botelho MF. Magnetic-Based Human Tissue 3D Cell Culture: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 21;23(20):12681. doi: 10.3390/ijms232012681. PMID: 36293537; PMCID: PMC9603906.
22. Park Y, Huh KM, Kang SW. Applications of Biomaterials in 3D Cell Culture and Contributions of 3D Cell Culture to Drug Development and Basic Biomedical Research. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 2;22(5):2491. doi: 10.3390/ijms22052491. PMID: 33801273; PMCID: PMC7958286.
23. Wang H, Brown PC, Chow ECY, Ewart L, Ferguson SS, Fitzpatrick S, Freedman BS, Guo GL, Hedrich W, Heyward S, Hickman J, Isoherranen N, Li AP, Liu Q, Mumenthaler SM, Polli J, Proctor WR, Ribeiro A, Wang JY, Wange RL, Huang SM. 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. *Clin Transl Sci.* 2021 Sep;14(5):1659-1680. doi: 10.1111/cts.13066. Epub 2021 Jun 16. PMID: 33982436; PMCID: PMC8504835.
24. Badillo-Mata JA, Camacho-Villegas TA, Lugo-Fabres PH. 3D Cell Culture as Tools to Characterize Rheumatoid Arthritis Signaling and Development of New Treatments. *Cells.* 2022 Oct 28;11(21):3410. doi: 10.3390/cells11213410. PMID: 36359806; PMCID: PMC9656230.
25. Carroll JA, Foliaki ST, Haigh CL. A 3D cell culture approach for studying neuroinflammation. *J Neurosci Methods.* 2021 Jul 1;358:109201. doi: 10.1016/j.jneumeth.2021.109201. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33932455; PMCID: PMC8217318
26. Watson PMD, Kavanagh E, Allenby G, Vassey M. Bioengineered 3D Glial Cell Culture Systems and Applications for Neurodegeneration and Neuroinflammation. *SLAS Discov.* 2017 Jun;22(5):583-601. doi: 10.1177/2472555217691450. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28346104.