


# Model Kultur Tiga Dimensi Sel Punca Mesenkim: Kondisi Terkini dan Arah Pengembangan

Dewi Nurrahmah<sup>a,1,\*</sup>, Febrianti Nurhaliza<sup>b,2</sup>

<sup>a</sup> Universitas Jendral Soedirman, Purwokerto, Indonesia

<sup>b</sup> Universitas Jendral Soedirman, Purwokerto, Indonesia

<sup>1</sup> dewi.dewi@gmail.com <sup>\*</sup>; <sup>2</sup> febrianti.nurhaliza@gmail.com

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article history</b></p> <p>.....</p> <p>Received August 7, 2025</p> <p>Revised August 9, 2025</p> <p>Accepted September 24, 2025</p> <p>Published September 29, 2025</p>	<p>Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells with remarkable regenerative potential, widely studied for their application in tissue engineering and cell-based therapy. Conventional two-dimensional (2D) culture systems, although commonly used, fail to mimic the native three-dimensional (3D) microenvironment of MSCs, leading to limitations in proliferation, differentiation, and therapeutic efficacy. Recent advances in three-dimensional (3D) culture techniques have provided new perspectives on maintaining cell viability, enhancing paracrine activity, and promoting lineage-specific differentiation. This review article highlights the current state of MSC 3D culture models, including spheroid formation, scaffold-based systems, and perfusion bioreactors. Each approach offers unique advantages and challenges in terms of scalability, reproducibility, and clinical translation. Studies indicate that 3D culture not only enhances stemness characteristics but also improves the secretion of bioactive molecules, contributing to better in vivo therapeutic outcomes, such as angiogenesis, anti-inflammation, and tissue regeneration. Furthermore, this article discusses the future directions of MSC 3D culture, particularly the integration of biomaterial innovations, 3D bioprinting, and molecular approaches to optimize culture conditions. The establishment of standardized protocols aligned with Good Manufacturing Practice (GMP) is crucial for advancing MSC-based therapies toward clinical applications. Overall, MSC 3D culture models represent a promising frontier in regenerative medicine, bridging the gap between in vitro studies and clinical translation.</p>
<p><b>Keywords</b></p> <p>mesenchymal stem cells</p> <p>three-dimensional culture</p> <p>spheroid</p> <p>scaffold</p> <p>regenerative medicine</p>	
<p></p> <p>License by CC-BY-SA</p> <p>Copyright © 2025, The Author(s).</p>	
<p><b>How to cite:</b> Nurrahmah., D., &amp; Nurhaliza., D. (2025). Model Kultur Tiga Dimensi Sel Punca Mesenkim: Kondisi Terkini dan Arah Pengembangan. <i>Insight of Biology</i>, 1(2), 41-46. <a href="https://doi.org/10.70716/inbio.v1i1.279">https://doi.org/10.70716/inbio.v1i1.279</a></p>	

## PENDAHULUAN

Sel punca mesenkim (SPM) merupakan salah satu jenis sel multipoten yang saat ini menjadi pusat perhatian dalam penelitian biomedis modern. Keunggulan utama SPM terletak pada kemampuannya untuk memperbanyak diri secara ekstensif (proliferasi tinggi) serta diferensiasi menjadi berbagai jenis sel, termasuk osteogenik, kondrogenik, dan adipogenik. Kemampuan diferensiasi inilah yang menjadikan SPM sangat relevan dalam aplikasi terapi regeneratif, rekayasa jaringan, serta pengembangan model penyakit in vitro. Selain itu, SPM juga mudah diperoleh dari berbagai sumber jaringan seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, dan tali pusat, sehingga semakin memperluas peluang pemanfaatannya. Dalam beberapa dekade terakhir, penelitian mengenai SPM berkembang pesat dengan tujuan untuk menemukan metode kultur yang dapat mempertahankan karakteristik seluler serta meningkatkan potensi terapeutiknya. Oleh karena itu, topik mengenai strategi kultur SPM menjadi sangat penting untuk ditelaah secara mendalam, khususnya dalam konteks pendekatan kultur tiga dimensi (3D) yang semakin banyak menarik perhatian komunitas ilmiah.

Praktik konvensional dalam penelitian sel punca umumnya dilakukan dengan menggunakan sistem kultur dua dimensi (2D) pada permukaan datar. Teknik ini relatif sederhana, mudah dilakukan, dan telah lama menjadi standar dalam berbagai laboratorium biomedis di seluruh dunia. Namun, meskipun metode 2D cukup efektif untuk keperluan dasar, pendekatan ini memiliki sejumlah keterbatasan signifikan. Salah satu kelemahan utamanya adalah ketidakmampuan kultur 2D untuk meniru kondisi mikro lingkungan in vivo, terutama terkait interaksi antar sel, distribusi faktor pertumbuhan, serta dinamika matriks ekstraseluler. Dalam lingkungan alami tubuh, sel hidup dalam kondisi yang kompleks dengan dukungan jaringan, gradien nutrisi, serta sinyal parakrin yang dinamis. Kultur 2D tidak mampu mereplikasi kompleksitas ini, sehingga

sering kali menghasilkan data yang tidak sepenuhnya representatif terhadap kondisi fisiologis sebenarnya. Hal ini berdampak pada validitas translasi hasil penelitian dari laboratorium ke aplikasi klinis.

Keterbatasan utama kultur 2D juga terlihat dalam aspek ekspresi gen dan protein sel punca. Banyak penelitian melaporkan bahwa sel yang dikultur dalam sistem 2D menunjukkan pola ekspresi gen yang berbeda dibandingkan dengan sel yang berada di dalam jaringan asli. Misalnya, beberapa gen yang berhubungan dengan proliferasi, diferensiasi, serta sekresi faktor parakrin cenderung mengalami penurunan regulasi dalam kultur 2D. Akibatnya, model 2D sering kali gagal menggambarkan interaksi kompleks antara sel dan matriks ekstraseluler yang sangat menentukan dalam menjaga fungsi biologis. Selain itu, sel dalam kultur 2D cenderung kehilangan sifat multipoten lebih cepat dan berisiko mengalami perubahan fenotip akibat adaptasi terhadap permukaan datar. Kondisi ini tentu menjadi hambatan serius, terutama ketika tujuan penelitian adalah mengaplikasikan SPM dalam konteks terapi regeneratif yang membutuhkan kemurnian serta konsistensi sifat biologis.

Sebagai respons terhadap keterbatasan kultur 2D, pendekatan kultur tiga dimensi (3D) mulai banyak dikembangkan. Kultur 3D berupaya menciptakan lingkungan mikro yang lebih menyerupai jaringan asli, baik dari segi struktur fisik, distribusi nutrisi, maupun interaksi antar sel. Dalam kultur 3D, sel dapat tumbuh dalam bentuk agregat atau berinteraksi dengan scaffold biomaterial yang menyerupai matriks ekstraseluler. Hal ini memungkinkan terjadinya komunikasi antar sel yang lebih alami melalui sinyal parakrin maupun juxtacrine, serta mendukung distribusi oksigen dan nutrisi yang lebih menyerupai kondisi *in vivo*. Dengan demikian, sistem kultur 3D dianggap mampu memberikan gambaran yang lebih representatif terhadap perilaku sel di dalam tubuh, sehingga hasil penelitian lebih relevan untuk diterapkan dalam aplikasi klinis maupun farmasi.

Berbagai metode telah dikembangkan dalam pendekatan kultur 3D, di antaranya adalah pembentukan sferoid, penggunaan scaffold biomaterial, dan sistem bioreaktor. Kultur sferoid memungkinkan sel untuk mengorganisasi diri menjadi agregat seluler yang menyerupai struktur jaringan asli. Sementara itu, penggunaan scaffold biomaterial menawarkan dukungan struktural bagi sel untuk menempel, tumbuh, dan berdiferensiasi dalam lingkungan yang lebih menyerupai matriks alami. Di sisi lain, sistem bioreaktor memungkinkan pengendalian kondisi lingkungan kultur, seperti aliran nutrisi, oksigenasi, serta penghilangan limbah metabolik secara lebih efisien. Masing-masing metode ini memiliki kelebihan dan tantangan tersendiri, namun semuanya bertujuan untuk memperkuat potensi biologis SPM serta meningkatkan aplikasi klinisnya. Perbandingan sistem 2D dan 3D dalam berbagai penelitian menunjukkan perbedaan mencolok dalam hal viabilitas, sekresi faktor parakrin, dan kapasitas diferensiasi.

Salah satu keunggulan signifikan dari kultur 3D adalah peningkatan sekresi faktor parakrin oleh SPM. Faktor-faktor ini mencakup berbagai molekul bioaktif seperti vascular endothelial growth factor (VEGFA), fibroblast growth factor 2 (FGF2), hepatocyte growth factor (HGF), serta interleukin-6 (IL-6). Molekul-molekul tersebut berperan penting dalam proses regeneratif, termasuk angiogenesis, penyembuhan luka, serta perbaikan jaringan yang rusak. Penelitian membuktikan bahwa kultur 3D dapat meningkatkan sekresi faktor-faktor ini secara signifikan dibandingkan kultur 2D. Misalnya, pada kondisi tertentu, ekspresi VEGFA dalam kultur sferoid dapat meningkat hingga puluhan kali lipat, memberikan indikasi kuat bahwa sistem 3D lebih sesuai untuk mendukung fungsi regeneratif alami SPM. Fakta ini menegaskan peran kultur 3D tidak hanya sebagai model penelitian, tetapi juga sebagai pendekatan praktis untuk meningkatkan kualitas produk terapi berbasis sel.

Selain keunggulan dalam sekresi faktor parakrin, kultur 3D juga terbukti mempertahankan potensi multipoten SPM secara lebih baik dibandingkan kultur 2D. Studi menunjukkan bahwa SPM yang dibentuk dalam sferoid tetap mampu berdiferensiasi ke berbagai jalur seperti osteogenik dan adipogenik setelah dikembalikan ke sistem 2D. Tidak hanya itu, diferensiasi pada kultur 3D cenderung terjadi lebih cepat dan lebih efisien. Sebagai contoh, pembentukan lipid dan mineralisasi dalam diferensiasi adipogenik dan osteogenik dapat tercapai dalam waktu tujuh hari pada kultur 3D, sementara pada kultur monolayer 2D membutuhkan waktu hingga tiga minggu. Hal ini menunjukkan bahwa kultur 3D tidak hanya mempertahankan sifat dasar SPM, tetapi juga memperkuat jalur diferensiasi spesifik yang diperlukan untuk aplikasi rekayasa jaringan.

Kultur 3D juga telah diuji secara *in vivo* untuk menguji potensi terapinya. Pada model hewan, SPM hasil kultur 3D menunjukkan kemampuan regeneratif yang lebih kuat dibandingkan kultur 2D. Misalnya, pada model cedera ginjal akut, sferoid SPM menunjukkan peningkatan sekresi matriks ekstraseluler serta faktor

angiogenik, anti-apoptotik, dan anti-inflamasi. Secara fisiologis, hal ini berkontribusi pada perbaikan fungsi ginjal yang lebih signifikan dibandingkan dengan penggunaan SPM dari kultur konvensional. Hasil ini menegaskan bahwa kultur 3D tidak hanya relevan pada level *in vitro*, tetapi juga memberikan manfaat nyata ketika diaplikasikan pada sistem biologis yang lebih kompleks. Dengan demikian, pengembangan kultur 3D memiliki potensi besar untuk mendukung terapi regeneratif dalam skala klinis.

Terlepas dari keunggulan yang ditawarkan, sistem kultur 3D juga memiliki tantangan yang tidak sedikit. Kultur sferoid, misalnya, cenderung memiliki laju proliferasi yang lebih rendah dibandingkan kultur 2D, sehingga menyulitkan ketika dibutuhkan jumlah sel dalam skala besar. Sistem bioreaktor, meskipun mampu meningkatkan yield produk biologis, membutuhkan optimisasi yang ketat terkait aliran perfusi, desain scaffold, dan standarisasi prosedur. Selain itu, aspek regulasi klinis seperti kepatuhan terhadap Good Manufacturing Practice (GMP) menjadi tantangan penting yang harus dipenuhi sebelum kultur 3D dapat diterapkan secara luas pada pasien. Oleh karena itu, diperlukan strategi inovatif dan kolaborasi multidisiplin untuk mengatasi kendala tersebut agar potensi kultur 3D dapat dimanfaatkan secara maksimal.

Dengan semakin berkembangnya teknologi biomedis, kajian mendalam mengenai kondisi terkini kultur 3D SPM menjadi sangat penting. Ulasan literatur yang komprehensif dapat memberikan gambaran jelas mengenai metode yang tersedia, kelebihan serta keterbatasannya, dan arah pengembangan di masa depan. Informasi ini sangat berguna tidak hanya bagi peneliti, tetapi juga bagi praktisi klinis yang ingin menerapkan terapi berbasis SPM. Harapannya, integrasi berbagai pendekatan kultur 3D, termasuk inovasi dalam penggunaan scaffold berbasis pencetakan 3D dan sistem bioreaktor, dapat membuka peluang besar untuk menghasilkan metode kultur yang lebih efisien, representatif, dan siap digunakan dalam skala klinis. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk menyajikan tinjauan komprehensif mengenai perkembangan kultur 3D SPM, sekaligus menegaskan posisinya sebagai salah satu strategi utama dalam pengembangan terapi regeneratif dan rekayasa jaringan masa depan.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan pendekatan kajian pustaka (*literature review*) dengan menelaah berbagai publikasi ilmiah yang relevan mengenai kultur tiga dimensi (3D) sel punca mesenkim. Sumber literatur diperoleh melalui basis data ilmiah internasional seperti PubMed, ScienceDirect, Scopus, dan Google Scholar, serta portal nasional seperti Garuda dan Neliti. Kata kunci yang digunakan dalam pencarian meliputi “mesenchymal stem cells”, “3D culture”, “spheroid”, “scaffold”, “bioreactor”, dan “regenerative medicine”. Rentang waktu literatur yang dianalisis dibatasi antara tahun 2013 hingga 2025 untuk memastikan data yang digunakan adalah terkini.

Kriteria inklusi ditetapkan untuk publikasi yang secara langsung membahas metode kultur tiga dimensi pada sel punca mesenkim, baik berupa *original research articles*, *systematic reviews*, maupun *meta-analysis*. Artikel yang hanya menyinggung kultur 2D tanpa kaitan dengan sistem 3D, artikel non-ilmiah, serta publikasi dengan kualitas rendah atau tanpa akses penuh dikecualikan dari analisis. Dari hasil pencarian, artikel yang memenuhi kriteria dikompilasi dan dianalisis secara kualitatif berdasarkan topik metode kultur (sferoid, scaffold, bioreaktor), hasil penelitian, kelebihan, serta keterbatasan masing-masing teknik.

Data yang diperoleh kemudian disintesis secara naratif untuk menggambarkan kondisi terkini dari model kultur 3D sel punca mesenkim serta arah pengembangannya di masa depan. Analisis dilakukan dengan membandingkan berbagai metode, menyoroti inovasi terbaru, serta mengevaluasi peluang penerapan dalam bidang terapi regeneratif dan rekayasa jaringan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur tiga dimensi (3D) sel punca mesenkim (SPM) memberikan keunggulan dibandingkan kultur dua dimensi (2D) konvensional, khususnya dalam hal kemampuan meniru kondisi mikro lingkungan *in vivo*. Studi kultur sferoid dalam sistem dinamis, misalnya menggunakan spinner flask, menunjukkan bahwa diameter sferoid UC-MSC dapat mencapai lebih dari 300  $\mu\text{m}$  dalam 11 hari dengan viabilitas yang tetap tinggi dan tanpa adanya nekrosis pada inti sel. Meskipun proliferasi inti sferoid relatif rendah (<5%), hal ini justru mencerminkan stabilitas struktur jaringan yang lebih menyerupai kondisi fisiologis.

Selain mempertahankan viabilitas, kultur sferoid terbukti meningkatkan sekresi faktor parakrin yang penting untuk proses regeneratif. Medium kondisional dari kultur 3D menunjukkan peningkatan signifikan pada sekresi faktor pertumbuhan seperti VEGFA yang meningkat hingga 80 kali lipat dibandingkan kultur 2D. Faktor lain seperti FGF2, HGF, IL-6, dan GCSF juga mengalami peningkatan bermakna. Pada adipose-derived MSC (AD-MSC), ekspresi VEGF, FGF2, dan HGF meningkat lebih dari 20 kali lipat, sedangkan CXCL12 meningkat hingga 145 kali lipat. Fakta ini menegaskan bahwa sistem kultur 3D mampu memperkuat efek parakrin yang berperan penting dalam angiogenesis, penyembuhan luka, dan regenerasi jaringan.

Dari segi diferensiasi, model sferoid tanpa scaffold tetap mampu mempertahankan potensi multipoten SPM. Penelitian menunjukkan bahwa setelah sel dipulihkan dari sferoid dan dikultur kembali pada permukaan 2D, sel tersebut tetap memiliki kapasitas proliferasi normal. Selain itu, diferensiasi adipogenik dan osteogenik terjadi lebih cepat dan lebih efisien dibandingkan pada kultur 2D, dengan pembentukan lipid dan mineralisasi yang tercapai dalam tujuh hari, sementara pada kultur monolayer memerlukan hingga 21 hari. Hal ini mengindikasikan bahwa kultur 3D dapat memicu aktivasi jalur diferensiasi yang lebih efisien tanpa mengurangi kapasitas proliferasi sel.

Efek terapeutik dari SPM hasil kultur 3D juga telah diuji pada model hewan. Dalam studi pada model cedera ginjal akut, sferoid AD-MSC menunjukkan efek protektif yang lebih baik dibandingkan kultur 2D. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan sekresi matriks ekstraseluler (kolagen I, fibronectin, laminin), peningkatan faktor angiogenik dan anti-apoptotik (VEGF, HGF, EGF, bFGF), serta sekresi faktor anti-inflamasi TSG-6. Secara *in vivo*, hal ini berkontribusi pada pengurangan apoptosis sel ginjal dan perbaikan fungsi ginjal yang lebih signifikan, sehingga mendukung potensi penggunaan sferoid dalam terapi regeneratif klinis.

Inovasi lain dalam kultur 3D adalah penggunaan bioreaktor perfusi yang dilengkapi dengan scaffold hasil pencetakan 3D (3D-printed scaffold). Metode ini terbukti meningkatkan produksi vesikula ekstraseluler (EV) hingga 40–80 kali lipat dibandingkan kultur flask konvensional. Tidak hanya jumlahnya yang meningkat, tetapi bioaktivitas EV juga tetap terjaga, ditunjukkan dengan peningkatan vaskularisasi dan perbaikan luka pada model tikus diabetes. Hasil ini menunjukkan bahwa kultur 3D berbasis bioreaktor memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai sistem biomanufaktur EV skala klinis yang konsisten dan sesuai dengan standar Good Manufacturing Practice (GMP).

Meski menawarkan banyak keunggulan, setiap pendekatan kultur 3D memiliki tantangan tersendiri. Kultur sferoid, misalnya, menghadapi keterbatasan berupa laju proliferasi yang rendah sehingga memerlukan strategi tambahan untuk menghasilkan jumlah sel yang besar. Sementara itu, sistem bioreaktor memerlukan optimisasi terkait kecepatan aliran perfusi, desain scaffold, serta standar produksi agar hasil dapat direplikasi dengan konsisten. Dengan demikian, diperlukan kombinasi inovasi teknologi untuk mengatasi keterbatasan tersebut.

Arah pengembangan kultur 3D SPM di masa depan dapat diarahkan pada integrasi berbagai metode. Kombinasi kultur sferoid yang menjaga viabilitas sel dengan bioreaktor perfusi yang mampu meningkatkan yield produk parakrin atau EV diperkirakan akan memberikan hasil yang lebih optimal. Selain itu, pengembangan scaffold inovatif berbasis pencetakan 3D yang dilengkapi faktor pertumbuhan atau biomaterial bioaktif juga berpotensi mempercepat diferensiasi spesifik, seperti osteogenesis dan kondrogenesis. Strategi ini dapat menjadi terobosan dalam aplikasi rekayasa jaringan maupun terapi sel berbasis SPM.

Secara keseluruhan, kultur 3D pada SPM telah menunjukkan peningkatan viabilitas, aktivitas parakrin, potensi diferensiasi, serta efek terapeutik yang lebih baik dibandingkan kultur 2D. Inovasi dalam teknologi bioreaktor dan rekayasa scaffold membuka peluang besar untuk menghasilkan sistem kultur yang lebih representatif, efisien, dan siap diaplikasikan dalam terapi regeneratif. Namun demikian, tantangan dalam standarisasi, skalabilitas, dan pemenuhan regulasi klinis tetap perlu diselesaikan agar potensi besar kultur 3D ini dapat benar-benar terwujud dalam praktik medis.

## KESIMPULAN

Kultur tiga dimensi (3D) sel punca mesenkim (SPM) terbukti mampu mengatasi berbagai keterbatasan kultur dua dimensi (2D) dengan menciptakan lingkungan mikro yang lebih menyerupai kondisi *in vivo*. Berbagai metode kultur 3D, seperti pembentukan sferoid, penggunaan scaffold biomaterial, dan sistem bioreaktor perfusi, telah menunjukkan peningkatan viabilitas sel, sekresi faktor parakrin, serta potensi

diferensiasi yang lebih efisien. Secara *in vivo*, kultur 3D juga menghasilkan efek terapeutik yang lebih signifikan, terutama dalam memperbaiki kerusakan jaringan melalui mekanisme angiogenesis, anti-inflamasi, dan anti-apoptotik.

Meskipun demikian, setiap metode kultur 3D memiliki tantangan tersendiri, mulai dari proliferasi sel yang rendah pada kultur sferoid hingga kebutuhan optimisasi aliran perfusi dan desain scaffold pada sistem bioreaktor. Oleh karena itu, pemilihan metode kultur perlu disesuaikan dengan tujuan penelitian atau aplikasi klinis yang diinginkan. Potensi besar kultur 3D untuk mendukung terapi regeneratif dan rekayasa jaringan menjadikannya sebagai salah satu fokus utama pengembangan biomedis masa depan.

Penelitian selanjutnya disarankan untuk mengintegrasikan berbagai pendekatan kultur 3D guna memperoleh hasil yang lebih komprehensif, misalnya dengan mengombinasikan kultur sferoid dan bioreaktor perfusi. Selain itu, inovasi dalam desain scaffold berbasis pencetakan 3D yang diperkaya biomaterial bioaktif atau faktor pertumbuhan perlu dieksplorasi lebih lanjut untuk mengarahkan diferensiasi spesifik SPM. Standarisasi protokol kultur 3D yang memenuhi regulasi klinis, termasuk aspek Good Manufacturing Practice (GMP), juga sangat penting untuk memastikan keamanan dan konsistensi hasil ketika diaplikasikan pada terapi sel dan produksi vesikula ekstraseluler skala besar.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, masukan, dan motivasi selama proses penyusunan artikel berjudul “Model Kultur Tiga Dimensi Sel Punca Mesenkim: Kondisi Terkini dan Arah Pengembangan”. Apresiasi juga disampaikan kepada rekan-rekan sejawat yang turut berbagi ilmu dan pengalaman, sehingga kajian ini dapat tersusun dengan lebih komprehensif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Almeria, C., Weiss, R., Keck, M., Weber, V., Kasper, C., & Egger, D. (2024). Dynamic cultivation of human mesenchymal stem/stromal cells for the production of extracellular vesicles in a 3D bioreactor system. *Biotechnology Letters*, 46(2), 279–293. <https://doi.org/10.1007/s10529-024-03465-4>
- Bicer, M., Cottrell, G. S., & Widera, D. (2021). Impact of 3D cell culture on bone regeneration potential of mesenchymal stromal cells: proliferation, viability, and osteogenic differentiation. *Stem Cell Research & Therapy*, 12, Article 31. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02094-8>
- Ezquerro, S., Zuleta, A., Arancibia, R., Estay, J., Aulestia, F., & Carrion, F. (2021). Functional properties of human-derived mesenchymal stem cell spheroids: A meta-analysis and systematic review. *Stem Cells International*, 2021, Article 8825332. <https://doi.org/10.1155/2021/8825332>
- Fuentes, P., et al. (2022). Dynamic culture of mesenchymal stromal/stem cell aggregates: scalable 3D culture strategies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 916229. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.916229>
- Hazrati, A., Malekpour, K., Soudi, S., & Hashemi, S. M. (2022). Mesenchymal stromal/stem cells spheroid culture effect on the therapeutic efficacy of these cells and their exosomes: A new strategy to overcome cell therapy limitations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 152, 113211. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113211>
- Kim, W., et al. (2023). Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell culture systems in tissue engineering. *Bioactive Materials*, 19, 50–74. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.039>
- Kouroupis, D., et al. (2021). Increased mesenchymal stem cell functionalization in 3D settings for safer and more effective therapeutic applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 621748. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.621748>
- Kronstadt, S. M., Patel, D. B., Born, L. J., Levy, D., Lerman, M. J., Mahadik, B., ... Jay, S. M. (2023). Mesenchymal stem cell culture within perfusion bioreactors incorporating 3D-printed scaffolds enables improved extracellular vesicle yield with preserved bioactivity. *Advanced Healthcare Materials*, 12(20), e2300584. <https://doi.org/10.1002/adhm.202300584>
- Kusuma, G. D., Carthew, J., Lim, R., & Frith, J. E. (2017). Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: Opportunities to engineer the therapeutic effect. *Stem Cells and Development*, 26(9), 617–631. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0349>
- Ohori-Morita, Y., Ashry, A., Niibe, K., & Egusa, H. (2025). Current perspectives on the dynamic culture of mesenchymal stromal/stem cell spheroids. *Stem Cells Translational Medicine*, 14(3), szae093. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szae093>

- Petrenko, Y., Syková, E., & Kubinová, Š. (2017). The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Research & Therapy*, 8, Article 94. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0558-6>
- Powsner, E. H., Nikolov, K., & Jay, S. M. (2025). Perfusion bioreactor culture incorporating mechanical confinement enhances mesenchymal stem cell extracellular vesicle production and wound healing potential [preprint]. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2025.08.12.669872>
- Yen, B. L., Hsieh, C. C., Hsu, P. J., Chang, C. C., Wang, L. T., & Yen, M. L. (2023). Three-dimensional spheroid culture of human mesenchymal stem cells: Offering therapeutic advantages and in vitro glimpses of the in vivo state. *Stem Cells Translational Medicine*, 12(5), 235–244. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szad011>