

DOI: 10.18523/2617-4529.2026.9.80-88

УДК 57.085.23:576.52:616.12

Будаш Г. В., Білько Д. І.

Національний університет «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ФОРМУВАННЯ 3D-АГРЕГАТИВ ДЛЯ ЕКСПАНСІЇ ТА КАРДІОМІОГЕННОГО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ІНДУКОВАНИХ ПЛЮРИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН МИШІ

Контроль фізичних параметрів 3D-агрегатів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК), зокрема їхнього діаметра, є важливим фактором оптимізації процесів експансії та спрямованого диференціювання. У цій роботі досліджено вплив початкової щільності посіву клітин на формування агрегатів, їхній діаметр, морфологію, життєздатність та ефективність диференціювання в кардіоміоцити.

Показано наявність прямої залежності між початковою кількістю клітин та діаметром агрегатів, а також встановлено, що агрегати середнього розміру мають найбільш сприятливі біологічні властивості. Агрегати, сформовані з 500 клітин, мали оптимальний діаметр, високу однорідність та забезпечували найвищу ефективність кардіоміогенної диференціації. Менші агрегати мали недостатню ефективність диференціювання, тоді як більші агрегати демонстрували ознаки зниження життєздатності, що може бути пов'язано з обмеженням дифузії кисню та поживних речовин.

Отримані результати свідчать, що агрегати з діаметром у межах приблизно 150–300 мкм забезпечують оптимальні умови для міжклітинної сигналізації. Отже, контроль діаметра агрегатів є критично важливим параметром для підвищення ефективності диференціювання іПСК у кардіоміоцити та стандартизації 3D-культур.

Ключові слова: іПСК, 3D-культура, клітинні агрегати, діаметр агрегатів, кардіоміоцити, диференціювання.

Вступ

Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) є важливим інструментом сучасної регенеративної медицини, клітинної терапії, моделювання захворювань та фармакологічного скринінгу завдяки їхній здатності до необмеженої проліферації та диференціювання в різні типи клітин [1,2]. Одним із ключових завдань їх практичного застосування є розроблення ефективних методів культивування та масштабування, які забезпечують стабільність плюрипотентності й ефективність спрямованого диференціювання [3].

Традиційні двовимірні культури мають обмежену здатність відтворювати фізіологічні умови тканинного мікрооточення. Натомість тривимірні системи культивування дають змогу краще моделювати міжклітинні взаємодії, градієнти кисню та сигнальних молекул, які відіграють важливу роль у регуляції диференціювання [4-6]. Саме тому 3D-культури іПСК вважаються більш фізіологічно релевантними моделями порівняно з 2D-культурами [7].

Одним із найважливіших параметрів 3D-культивування є розмір клітинних агрегатів, який

безпосередньо впливає на життєздатність клітин, їх проліферацію та напрямок диференціювання [8]. Відомо, що збільшення діаметра агрегатів призводить до формування градієнтів кисню та морфогенів унаслідок дифузійних обмежень [9]. Було показано, що такі обмеження можуть ставати критичними у разі досягнення агрегатами діаметра понад 300 мкм [10]. Водночас агрегати малого розміру можуть мати недостатній рівень міжклітинних взаємодій, необхідних для ефективної паракринної сигналізації, що також може знижувати ефективність диференціювання [11]. Отже, оптимальний діаметр агрегатів є важливим фактором забезпечення балансу параметрами клітини та клітинною сигналізацією [12].

Було показано, що контрольований розмір агрегатів дає змогу значно підвищити відтворюваність диференціювання плюрипотентних клітин [13]. Для диференціювання в кардіоміоцитарному напрямку найбільш ефективними часто є агрегати середнього розміру, які забезпечують оптимальні умови транспорту поживних речовин [14].

Для отримання агрегатів контрольованого розміру широко застосовують мікролункові системи культивування, у яких можна формувати однорідні агрегати із заданої кількості клітин [15,16]. Такі підходи дають змогу досліджувати вплив початкової щільності посіву клітин на діаметр агрегатів та ефективність їх диференціювання. Незважаючи на значну кількість досліджень, оптимальні параметри формування агрегатів можуть відрізнятися залежно від клітинної лінії та протоколу диференціювання, а отже, є потреба в експериментальному вивченні [17].

Метою роботи було дослідити вплив початкової щільності посіву індукованих плюрипотентних стовбурових клітин на формування 3D-агрегатів із контрольованим діаметром та визначити вплив їхнього розміру на ефективність диференціювання в кардіоміоцити.

Методика

У роботі використано лінію іПСК миші AT25, отриману з фібробластів кінчика хвоста миші під дією індукуючих факторів *c-myc*, *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, *Nanog* у лабораторії Р. Яніша та А. Мейснера (США). Генетично модифікована лінія індукованих плюрипотентних стовбурових клітин експресувала пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та IRES-зв'язаний зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора. Генетичну модифікацію лінії іПСК виконала А. Фатіма в лабораторії Т. Саріча (Німеччина). Здатність кардіоміоцитів експресувати GFP під контролем кардіоспецифічного

α -MHC промотора дала нам змогу застосувати методи проточної цитофлуориметрії та флуоресцентної мікроскопії для перевірки ефективності процесів диференціювання.

Недиференційовані лінії стовбурових клітин підтримували на фідерних клітинах, отриманих із лінії фібробластів миші MEF-Neo у живильному середовищі, що складалось із середовища DMEM (Invitrogen, Німеччина), до якого додавали 15 % фетальної телячої сироватки (ФТС, Invitrogen, Німеччина), 1 % незамінних амінокислот (Invitrogen, Німеччина), 50 μ M 2-меркаптоетанолу (Invitrogen, Німеччина) та 1000 ОД/мл LIF (Millipore, США), а також G418 (Invitrogen, Німеччина). Стовбурові клітини пересаджували з розрахунку $0,5 \times 10^6$ клітин у 5 мл повного живильного середовища на 6 см чашку Петрі з підкладкою з фідерних клітин із додаванням LIF. Пасажування проводили кожні 2 доби.

Для того щоб розпочати процес диференціювання СК, готували одноклітинну суспензію недиференційованих клітин. З цією метою недиференційовані колонії іПСК промивали PBS, додавали 1 мл 0,05 % трипсину, залишали за температури 37 °C у CO₂-інкубаторі на 5 хв та при від'єднанні понад 80 % клітин інгібували дію трипсину середовищем диференціювання з ФТС. Центрифугували 4 хв за 980 g, відбирали надосадову рідину, підраховували кількість клітин і ресуспендували.

Для диференціювання в планшетах AggreWell використовували 6×10^5 клітин у 2 мл середовища диференціювання. Такий об'єм одноклітинної суспензії поміщали в кожну лунку планшета AggreWell (AggreWell, StemCell Technologies), який містив мікролунки. З кожної такої лунки можна отримати до 1200 ЕТ. Клітини культивували в планшетах 48 год у CO₂-інкубаторі за температури 37 °C та 5 % CO₂. Середовище диференціювання складалось із середовища IMDM (IMDM – Iscove's modified Dulbecco's medium, Invitrogen, Німеччина), до якого додавали 20 % ФТС, 1 % незамінних амінокислот, 50 μ M 2-меркаптоетанолу.

Спостерігали формування агрегатів на 2-гу добу культивування та проводили їх підрахунок під світловим мікроскопом. Здійснювали заміну середовища диференціювання, потім обережно перемішували ембріодні тільця в лунці, переносили суспензію агрегатів у неадгерентні чашки Петрі із середовищем диференціювання в CO₂-інкубаторі для подальших експериментів. Середовище культивування замінювали через 7 діб, на 9-ту добу після формування агрегатів.

Щоб оцінити вплив різних експериментальних умов на кінетику росту клітин, відбір проб проводили після кожної повної заміни середовища. Відбирали аліквоту агрегатів отриманих у мікролунках планшетів AggreWell для перевірки життєздатності клітин: на 2-гу, 3-тю, 4-ту, 6-ту, 9-ту, 11-ту, 13-ту, 15-ту добу експерименту. Відібрані ембріодні тільця дисоціювали, використовуючи 0,25 % трипсину, до стану одноклітинної суспензії. Підрахунок кількості живих клітин проводили в гемоцитометрі за стандартною методикою. Як гемоцитометр використовували камери Нойбауера.

Щоб оцінити відновлення клітин, приблизно через 24 год після культивування на нових культуральних планшетах визначали вихід агрегації або ефективність висіву за формулою:

$$\text{Ефективність висіву (\%)} = N_1 / N_0 \times 100,$$

де N_0 – початкова загальна кількість клітин у момент $t = 0$ год (h), а N_1 – загальна кількість клітин через $t = 24$ год після культивування.

Ефективність висіву на рівні 100 % свідчить про те, що всі висіяні клітини повторно прикріпилися до поверхні культуральних планшетів.

Агрегати з диференційованими кардіоміоцитами, які експресували GFP, дисоціювали з використанням 0,25 % трипсину. Одноклітинну суспензію відфільтровували, щоб позбавитись від агрегатів, та промивали рідиною для відмивання клітин (CellWash, BD, Pharmingen). Проточну цитофлуориметрію проводили на проточному цитофлуориметрі FACSscan (BD Pharmingen), при цьому набирали популяцію з 10000 клітин. Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення FSC Express 4 Flow Research Edition (De Novo Software, США). Наявність мертвих клітин визначали з використанням забарвлення пропідієм йодидом (Sigma, Німеччина).

Морфологічне дослідження, прямий підрахунок кількості агрегатів та підрахунок кількості GFP+ клітин проводили за стандартними методиками світлової та флуоресцентної мікроскопії. Використовували мікроскоп Axiovert 10 (ZEISS, Німеччина), об'єктиви зі збільшенням $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$.

Кожен експеримент проводили тричі у трьох повторях. Цифрові дані аналізували з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2007. Достовірність середніх значень двох сукупностей визначали за допомогою t-критерію Стьюдента, статистичну достовірність визначали на рівні $P < 0,05$.

Результати

У нашій роботі для отримання гомогенних агрегатів застосовано спеціальні планшети AggreWell, які можуть використовуватися для формування та подальшого культивування клітинних агрегатів із різних типів клітин, включно з іПСК. Кожна лунка такого планшета містить визначену кількість мікролунок. Після перенесення суспензії клітин у кожній такій комірці формується агрегат визначених розмірів залежно від заданої кількості клітин у суспензії. Використані планшети дали можливість отримати ембріодні тільця різного розміру – від 250 до 2000 клітин.

Щоб визначити вплив початкової щільності посіву на формування недиференційованих агрегатів іПСК, у планшети AggreWell висівали 250, 500, 750, 1000 або 2000 клітин на мікролунку та культивували без перемішування (рис. 1).

Спостерігали поступове формування компактних сферичних клітинних агрегатів із чіткими межами та тенденцією до збільшення їхніх розмірів із часом. Агрегати мали чіткі контури та відносно гладку поверхню, що свідчить про щільні міжклітинні контакти. На 2-гу добу культивування формувалися невеликі компактні агрегати сферичної форми. Середній діаметр агрегатів становив 177 ± 33 μ . Клітинні структури мали високу щільність та однорідну морфологію.

Морфологія агрегатів на 2-гу добу культивування була компактною з гладкою периферією в усіх умовах, крім тих, де висівали по 2000 клітин на лунку. За цих умов агрегати мали неправильну форму темного кольору без чітких країв (рис. 2). На третю добу культивування багато з цих агрегатів фрагментувались, спостерігали велику кількість мертвих клітин у культуральному середовищі.

Було виявлено кореляцію між початковою кількістю клітин і діаметром агрегатів на 2-гу добу культивування ($r^2 = 0,85$; $p = 0,09$) в агрегатів із щільністю посіву 250, 500, 750 та 1000 клітин. На наступну добу після утворення агрегатів розподіл діаметрів агрегатів був доволі однорідним між агрегатами розміром 500, 750, 1000 клітин (рис. 3). Проте виявлено таке: що більшою була вихідна кількість посіву клітин, то більшими були розбіжності між повторностями на 3-тю добу культивування. Середній діаметр становив: 148 ± 36 μ для агрегатів із початковою щільністю посіву 250 клітин, 186 ± 54 μ для агрегатів із 500 клітин, 200 ± 68 μ для 750 клітин, 210 ± 52 μ для 1000 клітин та 258 ± 69 μ для поодиноких агрегатів із вихідною щільністю посіву 2000 клітин. Вихід агрегації, що відображає відновлення та розмноження клітин приблизно через 24 год, перевищував 100 % від початкової кількості в більшості випадків.

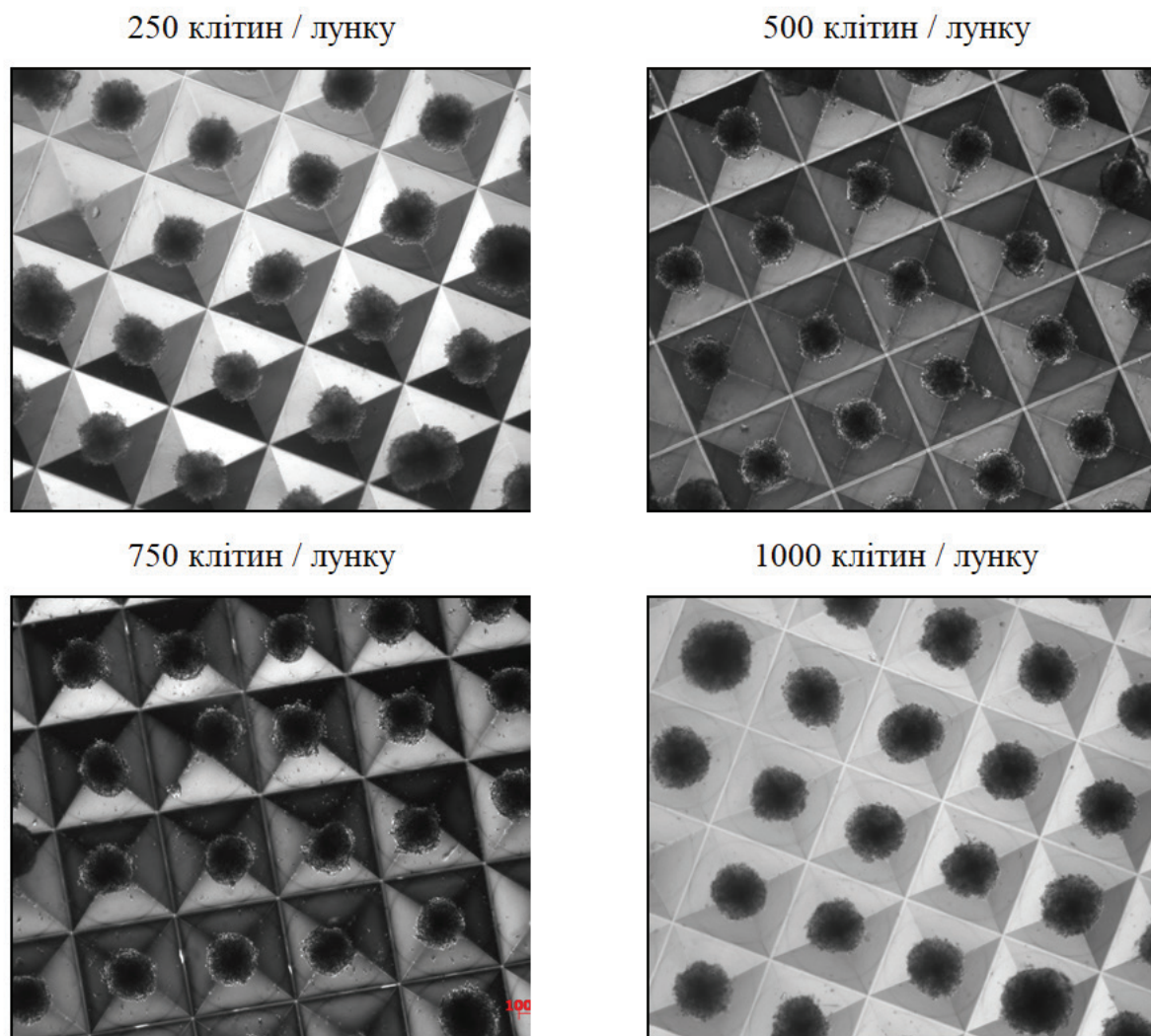


Рис. 1. Морфологія агрегатів іПСК, отриманих на 2-гу добу культивування в планшетах AggreWell

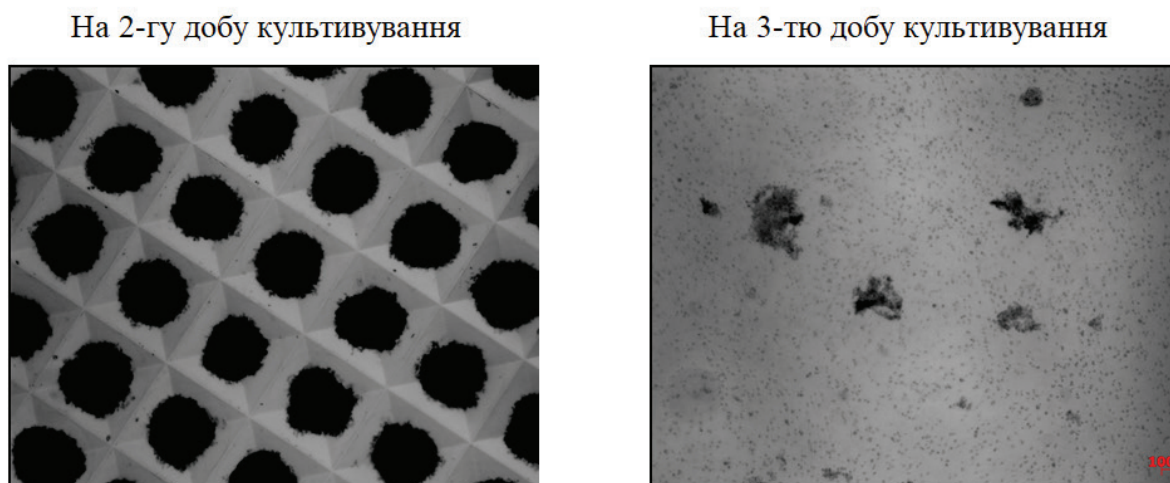


Рис. 2. Морфологія агрегатів іПСК із щільністю посіву 2000 клітин на мікролунку на 2-гу та 3-тю добу культивування

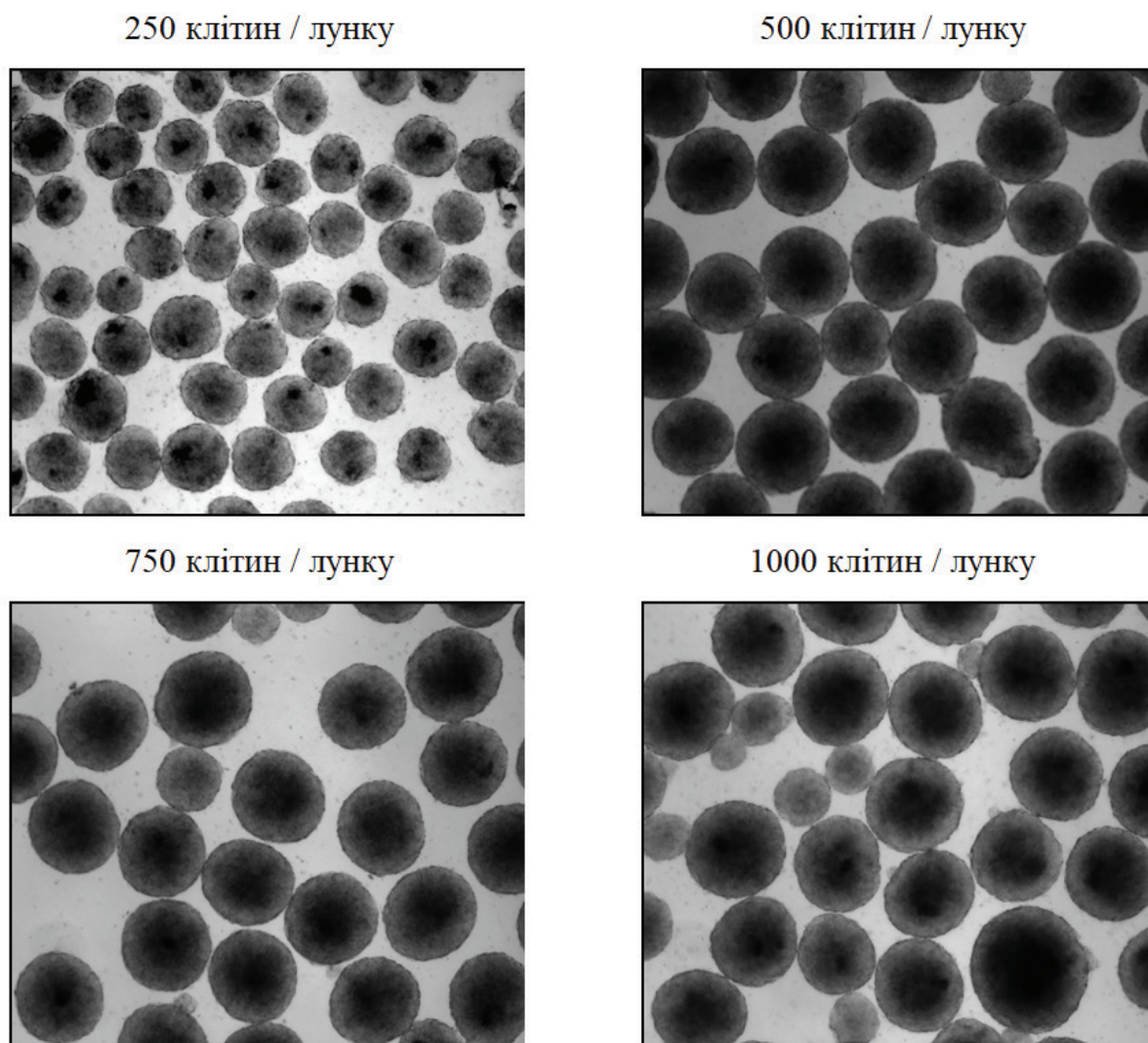


Рис. 3. Морфологія агрегатів іПСК, отриманих на 3-тю добу культивування

Було досліджено життєздатність клітин агрегатів та поодиноких клітин у середовищі культивування після зміни культурального середовища. Життєздатність агрегатів була високою у всіх умовах (крім 2000 клітин), тоді як поодинокі клітини в надосадовій рідині були нежиттєздатними.

Зі збільшенням тривалості культивування збільшувався діаметр агрегатів та підвищувалася структурна складність (рис. 4). У деяких агрегатах спостерігалася тенденція до формування менш щільних ділянок, зміна форми, що може свідчити про початкові процеси просторової організації клітин. Починаючи з 4-ї доби культивування спостерігалася статистично значуще збільшення діаметра агрегатів. Агрегати зберігали сферичну форму, однак ставали більш структурно організованими. Згодом відбувалося подальше збільшення середнього діаметра. При цьому морфологія агрегатів ставала більш гетерогенною.

За всіх експериментальних умов діаметр агрегатів збільшувався до 4-ї доби культивування. Середній діаметр агрегатів зростав у 1,1–1,4 раза і становив: $209 \pm 48 \mu$ (250 клітин), $210 \pm 57 \mu$ (500 клітин), $257 \pm 81 \mu$ (750 клітин), $193 \pm 42 \mu$ (100 клітин) та $273 \pm 37 \mu$ (2000 клітин).

Концентрація клітин загалом зростала протягом періоду культивування, хоча спостерігалася варіабельність між повторностями. Життєздатність після початкового зниження залишалася $>81\%$. Найбільше зниження було за 2000 клітин/мікролунку.

Найбільше зростання діаметра агрегатів було на 6-ту добу культивування. Агрегати розміром 250 клітин/мікролунку збільшилися в 1,4 раза, 500 клітин/лунку – у 2,1 раза, 750 клітин/лунку – в 1,7 раза, 1000 клітин/лунку – у 2,2 раза. Після 10-ї доби культивування спостерігалось поступове уповільнення збільшення

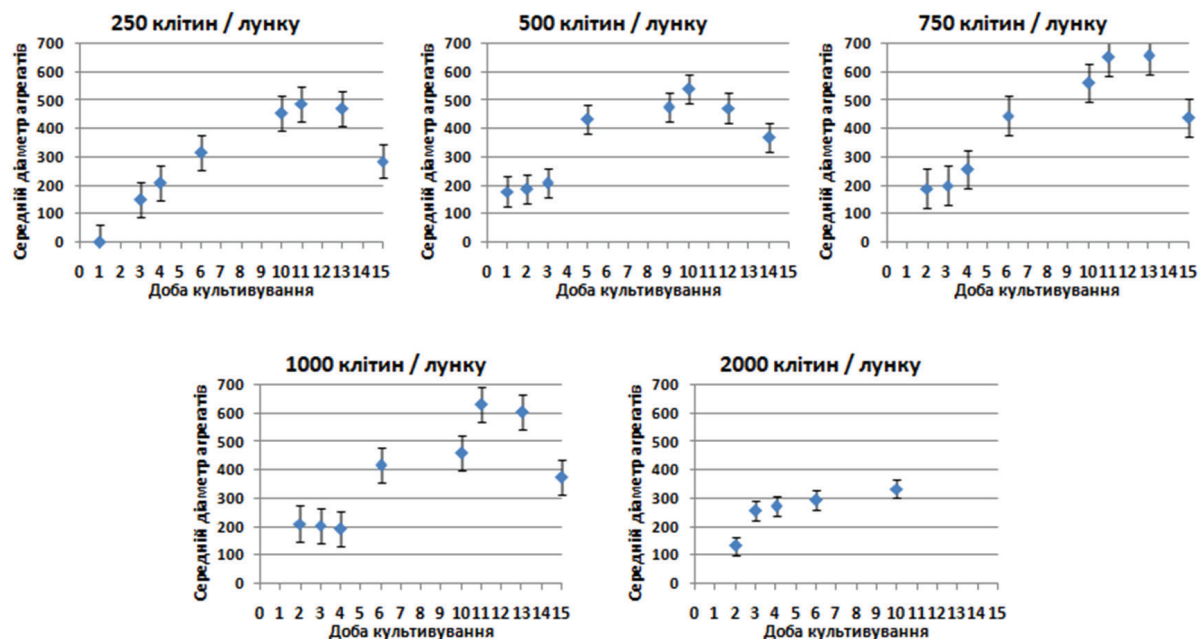


Рис. 4. Розмір агрегатів у різну добу культивування, представлено як діаметр окремих агрегатів

діаметра агрегатів, а після 13-ї доби культивування – зменшення діаметра агрегатів.

Морфологію агрегатів досліджували також у процесі диференціювання іПСК у кардіоміоцити. Більшість агрегатів зберігали сферичну форму, проте були менш компактні. Проведений аналіз показав, що ефективність диференціювання кардіоміоцитів суттєво залежить від початкового розміру агрегатів. Найвищі показники диференціювання мали агрегати, сформовані із 500 клітин, тоді як агрегати розміром 750 клітин демонстрували дещо нижчу, але також відносно високу ефективність. Водночас агрегати розміром 250 та 1000 клітин мали значно нижчу ефективність кардіоміогенної диференціації. На 13-ту добу диференціювання, коли спостерігався максимальний вихід GFP⁺ кардіоміоцитів, ефективність диференціювання агрегатів розміром 500 клітин становила $2,86 \pm 0,3 \%$, що у 8,5 раза більше порівняно з агрегатами розміром 250 клітин ($0,34 \pm 0,02 \%$) та у 4,7 раза більше порівняно з агрегатами розміром 1000 клітин ($0,6 \pm 0,03 \%$). Агрегати розміром 750 клітин також демонстрували відносно високу ефективність, що перевищувало відповідні показники агрегатів розміром 250 клітин у 6,4 раза та розміром 1000 клітин у 3,6 раза.

Пряме порівняння показало, що агрегати розміром 500 клітин демонстрували стабільно вищу ефективність диференціювання порівняно з агрегатами розміром 750 клітин, причому різниця становила від 1,3 раза на 13-ту добу

до 1,8 раза на 15-ту добу. Загалом отримані результати свідчать, що формування агрегатів приблизно з 500 клітин створює найбільш сприятливі умови для ефективного диференціювання в кардіоміоцити в умовах використаного протоколу.

Обговорення

Отримані результати показали, що початкова щільність посіву клітин визначає діаметр агрегатів та впливає на ефективність диференціювання. Агрегати, сформовані з 500 клітин, демонстрували найвищу ефективність кардіоміогенної диференціації, що узгоджується з даними інших досліджень [14,18].

Встановлену залежність можна пояснити формуванням оптимального клітинного мікросередовища. Агрегати середнього розміру забезпечують ефективну клітинну сигналізацію та достатню дифузію кисню [6,19]. Менші агрегати, ймовірно, мали недостатній рівень клітинної сигналізації, що могло обмежувати ефективність диференціювання [11]. Подібні результати було описано раніше для ембріодних тілець різного розміру [18]. Зниження ефективності диференціювання у великих агрегатах можна пояснити формуванням гіпоксичних зон і накопиченням метаболітів [9,20]. Відомо, що збільшення діаметра агрегатів може призводити до погіршення транспорту кисню та поживних речовин [10]. Отримані результати також підтверджують, що агрегати в діапазоні приблизно 150–300 мкм можуть забезпечувати оптимальні умови для

диференціювання [14,20]. Це відбувається завдяки сприятливому співвідношенню площі поверхні до об'єму [12].

Використання мікролунккових систем дало змогу отримати агрегати з контрольованим діаметром та високою відтворюваністю результатів, що відповідає сучасним підходам біоінженерії [15,21].

Обмеженнями дослідження є використання однієї клітинної лінії та відсутність молекулярного аналізу сигнальних шляхів. Подальші дослідження можуть бути спрямовані на аналіз експресії маркерів диференціювання та метаболічних параметрів агрегатів.

Отримані результати мають практичне значення для оптимізації протоколів отримання кардіоміоцитів та масштабування технологій виробництва клітинних продуктів [3,21]. Отже, контроль діаметра агрегатів можна розглядати як критичний параметр підвищення ефективності диференціювання іПСК.

Висновки

У цьому дослідженні показано, що початкова щільність посіву індукованих плюрипотентних стовбурових клітин є важливим фактором, який визначає формування 3D-агрегатів із різним діаметром та впливає на ефективність їх диференціювання в кардіоміоцити. Отримані результати демонструють, що агрегати, сформовані з 500 клітин,

мали найбільш сприятливі морфологічні параметри та забезпечували найвищу ефективність диференціювання в кардіоміоцити.

Встановлено, що агрегати середнього діаметра забезпечують оптимальний баланс між ефективною дифузійною кисню та поживних речовин і достатнім рівнем міжклітинних взаємодій, необхідних для індукції диференціювання. Менші агрегати можуть мати недостатню клітинну масу для формування ефективного сигнального мікрооточення, тоді як більші агрегати можуть мати дифузійні обмеження.

Отримані результати підкреслюють важливість контролю діаметра клітинних агрегатів як критичного параметра для підвищення відтворюваності та ефективності диференціювання іПСК. Практичне значення роботи полягає в можливості використання оптимізованих параметрів формування агрегатів для стандартизації протоколів отримання кардіоміоцитів, масштабування клітинних технологій та їх застосування в регенеративній медицині, моделюванні захворювань і тестуванні лікарських препаратів.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на аналіз молекулярних механізмів впливу розміру агрегатів на ефективність диференціювання, а також оптимізацію біореакторних систем для масштабованого отримання функціональних кардіоміоцитів.

Список літератури

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
2. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20. doi: 10.1126/science.1151526
3. Aijaz A, Li M, Smith D, Khong D, LeBlon C, Fenton OS, et al. Bioprocessing strategies for stem cell-based therapeutics. *Curr Opin Biomed Eng*. 2018;10:74-81. doi: 10.1016/j.cobme.2018.11.001
4. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18. doi: 10.1089/adt.2014.573
5. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26. doi: 10.1002/jcp.24683
6. Zupping C. 3D cardiac cell culture: a critical review of current technologies and applications. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:87. doi: 10.3389/fcvm.2019.00087
7. Sart S, Tomasi RF, Amselem G, Baroud CN. Multiscale cytometry and regulation of 3D cell cultures. *Biotechnol Adv*. 2017;35(1):47-62. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.006
8. Kinney MA, Hookway TA, Wang Y, McDevitt TC. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Stem Cell Res*. 2016;16(2):341-52. doi: 10.1016/j.scr.2016.01.013
9. Correia C, Serra M, Espinha N, Sousa M, Brito C, Burkert K, et al. Combining hypoxia and 3D culture improves the therapeutic potential of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(6):847-59. doi: 10.1007/s12015-018-9845-z
10. Van Winkle AP, Gates ID, Kallos MS. Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(7-8):807-16. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0397
11. Bauwens CL, Peerani R, Niebruegge S, Woodhouse KA, Kumacheva E, Husain M, et al. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells*. 2008;26(9):2300-2310. doi: 10.1634/stemcells.2008-0293
12. Branco MC, Poch CM, Figueiredo LM. Impact of embryoid body size on pluripotent stem cell differentiation. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117(4):1212-22. doi: 10.1002/bit.27279
13. Ungrin MD, Joshi C, Nica A, Bauwens C, Zandstra PW. Reproducible ultra-high throughput formation of multicellular aggregates from human pluripotent stem cells. *Methods*. 2018;101:11-20. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.11.010
14. Jiang X, Lian X, Wei K, et al. Maturation of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: challenges and strategies. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15:354. doi: 10.1186/s13287-024-03961-4
15. Nguyen DHT, Stapleton SC, Yang MT, Cha SS, Choi CK, Galie PA, et al. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis *in vitro*. *J Vis Exp*. 2016;(115):54308. doi: 10.3791/54308

16. STEMCELL Technologies. AggreWell™400/800 microwell plates for standardized spheroid formation. Vancouver: STEMCELL Technologies; 2021.
17. Kempf H, Andree B, Zweigerdt R. Scalable suspension culture of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2015;14(3):353-61. doi: 10.1016/j.scr.2015.02.001
18. Hookway TA, Butts JC, Lee E, Tang H, McDevitt TC. Aggregate formation and suspension culture of human pluripotent stem cells and differentiated progeny. *Stem Cell Res.* 2016;17(3):581-9. doi: 10.1016/j.scr.2016.09.010
19. Serra M, Brito C, Correia C, Alves PM. Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends Biotechnol.* 2012;30(6):350-9. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.03.003
20. Hwang YS, Chung BG, Ortman D, Hattori N, Moeller HC, Khademhosseini A. Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate. *Biomaterials.* 2009;30(27):499-507. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.026
21. Kropp C, Kempf H, Halloin C, Robles-Diaz D, Franke A, Scheper T, et al. Impact of feeding strategies on scalable expansion of human pluripotent stem cells. *Trends Biotechnol.* 2017;35(6):514-27. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.01.001

G. Budash, D. Bilko

National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

CONDITION OPTIMIZATION FOR THE FORMATION OF 3D AGGREGATES FOR EXPANSION AND CARDIOMYOGENIC DIFFERENTIATION OF MOUSE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

Abstract

Control of the physical parameters of three-dimensional (3D) aggregates of induced pluripotent stem cells (iPSCs), particularly their diameter, is a critical factor for optimizing cell expansion and directed differentiation. In this study, we investigated the effect of initial cell seeding density on aggregate formation, size distribution, morphology, viability, and efficiency of cardiomyogenic differentiation.

A direct relationship between the initial number of seeded cells and aggregate diameter was demonstrated. Aggregates of intermediate size exhibited the most favorable biological characteristics. In particular, aggregates formed from 500 cells showed an optimal diameter, high structural uniformity, and the highest efficiency of cardiomyocyte differentiation. Smaller aggregates demonstrated reduced differentiation efficiency, whereas larger aggregates showed decreased viability, which may be associated with limitations in oxygen and nutrient diffusion.

Our results indicate that aggregates with diameters in the range of approximately 150–300 μm provide optimal conditions for cell–cell interactions and paracrine signaling. These conditions are likely to promote a balance between sufficient intercellular communication and effective mass transfer. In contrast, insufficient cell numbers in smaller aggregates may limit signaling interactions, while excessive size may lead to the formation of hypoxic regions and metabolic stress.

Overall, the findings demonstrate that precise control of aggregate diameter is an important parameter for improving the efficiency and reproducibility of cardiomyogenic differentiation of mouse iPSCs and for standardizing 3D culture systems. The use of microwell-based culture platforms enabled the generation of homogeneous aggregates with controlled dimensions, supporting reproducible differentiation outcomes.

These results may contribute to the optimization of protocols for cardiomyocyte production, scalable stem cell cultivation, and the development of cell-based technologies for regenerative medicine, disease modeling, and drug screening

Keywords: iPSCs, 3D culture, cell aggregates, aggregate diameter, cardiomyocytes, differentiation.

Submitted 20.03.2026

Accepted 09.04.2026

Published 28.05.2026

Відомості про авторів**Authors Information**

Будаш Галина Володимирівна – кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

Galyna Budash – Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer at the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems of the National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0003-4717-3470>

Galyna.Budash@ukma.edu.ua

Білько Денис Іванович – кандидат біологічних наук, доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія» (НаУКМА), Київ, Україна

Denys Bilko – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Laboratory Diagnostics of Biological Systems of the National University of Kyiv-Mohyla Academy (NaUKMA), Kyiv, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0001-6801-401X>

denys.bilko@ukma.edu.ua



Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)