

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России  
Поступила 20.02.2024  
Принята к печати 01.10.2024



EDN: KWWTEE

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-4-78-83

# Определение оптимальных условий экспансии мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека с помощью оборудования для прижизненного мониторинга состояния культур клеток

А.А. Дудорова, М.В. Ефименко, Р.Д. Хисматуллина, М.А. Масчан, И.Н. Казьмина, М.А. Илюшина, Е.Ю. Осипова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

По результатам проведенного исследования выработаны рекомендации по составу среды для экспансии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека для доклинических исследований и возможного клинического применения – наиболее эффективной является среда ALPHA-MEM с добавлением 10% лизата тромбоцитов. Варианты сред на основе DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки оказались менее эффективны – доля конфлюэнтности достигала максимального значения 0,8 через 80 ч культивирования, тогда как конфлюэнтность культур МСК в средах StemMACS и ALPHA-MEM с добавлением лизата тромбоцитов продолжала возрастать и через 100 ч после начала экспансии. Среда на основе RPMI-1640 достоверно хуже других использованных сред поддерживала рост МСК. При культивировании МСК в средах с содержанием глюкозы 4,5 г/л доля клеток с жировой трансформацией через 5 сут выше, чем при культивировании в условиях содержания глюкозы 1,0 г/л – DMEM low gl, StemMacs, ALPHA-MEM. Использование для экспансии МСК сред, не индуцирующих спонтанную адипогенную дифференцировку, предпочтительнее для потенциального применения МСК в клинических целях, поскольку клетки остаются некоммутированными и их дифференцировочный потенциал может быть реализован в зависимости от задач дальнейшего исследования и/или клинических потребностей при их применении. Настоящее исследование поддержано локальным этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие по утвержденной форме с возможностью использования части материала для исследовательских целей.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, экспансия клеток, среда культивирования, адипогенная дифференцировка, лизат тромбоцитов, конфлюэнтность

Дудорова А.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (4): 78–83. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-4-78-83

## Identification of optimal conditions for the expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells using tools for live-cell culture monitoring

A.A. Dudorova, M.V. Efimenko, R.D. Khismatullina, M.A. Maschan, I.N. Kazmina, M.A. Ilyushina, E.Yu. Osipova

The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Based on the results of our study, we have developed recommendations regarding cell culture media composition for the expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) for preclinical studies and potential clinical applications. ALPHA-MEM supplemented with 10% platelet lysate proved to be the most effective culture medium. Different DMEM media supplemented with fetal bovine serum turned out to be less effective: a maximum of 80% confluence was reached after 80 hours of culture, while MSC confluence in StemMACS and ALPHA-MEM media supplemented with platelet lysate kept increasing even after 100 hours of expansion. The growth rate of MSCs in RPMI-1640 medium was significantly lower than in the other culture media. When culturing MSCs in media with high glucose concentration (4.5 g/L), the percentage of cells with fat transformation after 5 days of culture was higher than in low-glucose (1.0 g/L) media such as DMEM low gl, StemMacs, ALPHA-MEM. It is preferable to use MSC expansion media that do not induce spontaneous adipogenic differentiation for culturing MSCs for clinical purposes because the cells remain uncommitted and all their differentiation potential can be used in accordance with the objectives of further research and/or clinical needs. This study was supported by the local Ethics Committee and approved by the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation. All the participants signed the standard informed consent form and agreed to the use of some of their biological materials for research purposes.

**Key words:** mesenchymal stem cells, cell expansion, culture media, adipogenic differentiation, platelet lysate, confluence

Dudorova A.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (4): 78–83. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-4-78-83

### Контактная информация:

Осипова Елена Юрьевна,  
заведующая лабораторией физиологии и  
патологии стволовых клеток  
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России  
Адрес: 117997, Москва,  
ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: e\_ossipova@mail.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 20.02.2024  
Accepted 01.10.2024

### Correspondence:

Elena Yu. Osipova,  
Head of the Laboratory of Physiology  
and Pathology of Stem Cells at the Dmitry  
Rogachev National Medical Research Center  
of Pediatric Hematology, Oncology  
and Immunology of Ministry of Healthcare  
of the Russian Federation  
Address: 1 Samory Mashela St.,  
Moscow 117997, Russia  
E-mail: e\_ossipova@mail.ru

**М**езенхимальные стволовые клетки (МСК) впервые были обнаружены в 1968 г. А. J. Friedenstein и соавт. [1] в костном мозге (КМ) как популяция адгезирующих фибробластов, способная дифференцироваться в костную ткань. Далее было показано, что МСК можно выделить из жировой ткани, плаценты, ткани пупочного канатика, пульпы зуба [2]. МСК обладают способностью к экспансии *in vitro*, которая позволяет им быстро достигать достаточного количества для клинического применения *in vivo* [3]. МСК имеют большой терапевтический потенциал из-за их способности к самообновлению и дифференцировке в различные ткани, включая остеобласты, адипоциты, хондроциты, миоциты, нейроны, глиальные клетки и гепатоциты при определенных условиях [3–7]. В ряде исследований было продемонстрировано, что МСК способны подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro* и угнетать дифференцировку дендритных клеток и таким образом оказывать иммуносупрессивное действие [8–10]. Это свойство МСК используется в трансплантологии для подавления реакции «трансплантат против хозяина». На сегодняшний день база данных клинических исследований ClinicalTrials.gov содержит 12 107 исследований с использованием МСК в качестве терапевтической опции при многих клинических проблемах. Большинство исследований с использованием МСК относится к I фазе (исследование безопасности), II фазе (доказательство эффективности у человека) или их комбинации. Пока выполнено очень небольшое количество исследований III фазы с применением МСК (сравнение нового метода терапии со стандартными подходами) [9, 11]. В настоящее время в Российской Федерации имеются большой научный потенциал и потребность в разработке биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и высокотехнологичных лекарственных препаратов на основе соматических клеток. Одним из перспективных направлений в гематологии, онкологии и регенеративной медицине является создание БМКП и высокотехнологичных лекарственных препаратов на основе МСК [3, 4, 8–12].

Несмотря на многолетний опыт в области культивирования МСК в целях последующего клинического применения, существует ряд нерешенных принципиальных вопросов, касающихся стандартизации процессов экспансии:

- использование сред для культивирования, позволяющих достичь эффективной экспансии МСК за возможно более короткие сроки;
- отказ от применения при культивировании МСК ксеногенных сывороток и добавок к средам;
- сохранение дифференцировочного потенциала МСК в процессе культивирования.

**Целью настоящего исследования** являлось определение оптимальных условий культивирования МСК из образцов КМ человека в зависимости от состава инкубационных сред.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование поддержано локальным этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие по утвержденной форме с возможностью использования части материала для исследовательских целей.

Образцы КМ были получены от 5 здоровых взрослых доноров в рамках стандартной процедуры забора КМ в соответствии с рекомендациями и критериями, представленными в Приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации от 12 декабря 2018 г. №875н, в количестве, необходимом для трансплантации, которое составляет 20–30 мл/кг массы тела пациента, но не более 20 мл/кг массы тела донора. Для настоящего исследования использовали 50–100 мл КМ, но не более 10% от общего количества забранного материала.

Из образцов КМ были получены культуры МСК в соответствии с принятой в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева технологией [13] – клетки культивировали в среде AlphaMEM с добавлением 10% лизата тромбоцитов в течение 4 пассажей, затем аликвоты клеток по 1 млн были помещены в криохранилище. Все полученные в результате экспансии культуры соответствовали критериям, предъявляемым к МСК [14, 15]. После извлечения из криохранилища образцы МСК культивировали в различных средах, оценивали долю конфлюэнтности монослоя клеток, время удвоения количества клеток, способность МСК к спонтанной адипогенной дифференцировке.

Для определения оптимального состава среды для эффективной экспансии МСК КМ использовали следующие культуральные среды:

- ALPHA-MEM (HiMedia, Индия) + 10% лизата тромбоцитов;
- StemMACS MSC Expansion Media (Miltenyi Biotec, Германия);
- DMEM low Glucose (Servicebio, Китай) + 10% эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (StemCell, Канада);
- DMEM high Glucose (Servicebio, Китай) + 10% ЭТС (StemCell, Канада);
- RPMI1640 (Capricorn, Германия) + 10% ЭТС (StemCell, Канада).

Лизат тромбоцитов был изготовлен в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в лаборатории физиологии

и патологии стволовых клеток совместно с отделением трансфузиологии в соответствии с протоколом компании MacoPharma [16, 17].

Исследование динамики экспансии образцов МСК проводили с помощью следующих приборов:

- RTCA xCelligence (Agilent, США). Данный прибор в режиме реального времени детектирует электрическое сопротивление в лунке специального многолуночного планшета со встроенными электродами, что позволяет получить график зависимости индекса прироста клеток от времени;

- Image ExFluorer компании LCI (Live Cell Instruments, Южная Корея). Этот прибор позволяет оценить не только динамику роста, но и направление дифференцировки образцов МСК в зависимости от состава среды. Культивирование проводили в 24-луночном планшете NEST для адгезивных культур в инкубационной камере прибора в течение 5 сут с интервалом съемки 10 ч, в фазовом контрасте либо во флуоресцентном режиме (для оценки адипогенной дифференцировки).

Плотность эксплантации клеток для проведения исследований с помощью обоих приборов соответствовала плотности, используемой в процессе экспансии продукта МСК и составляла 6600 клеток/см<sup>2</sup>.

После завершения экспериментов данные обрабатывали с использованием программного обеспечения к приборам.

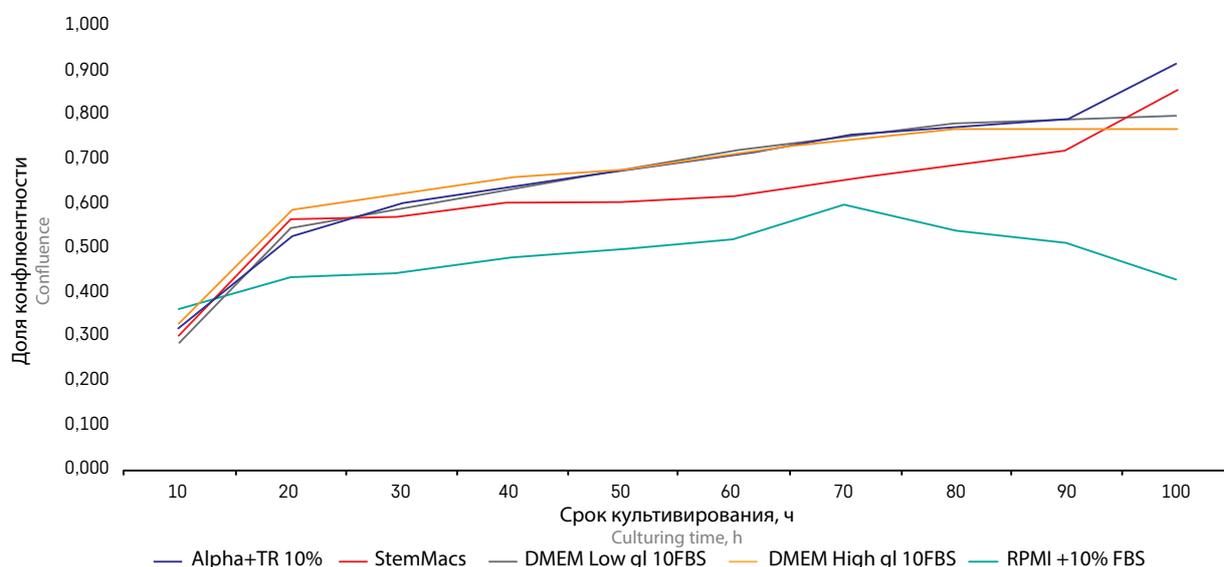
Анализ проводился с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни с уровнем статистической значимости  $p < 0,05$ . Для всех расчетов была использована программа Statistica 10.0.

#### Рисунок 2

Динамика роста образцов МСК в зависимости от состава среды культивирования (медиана;  $n = 5$ )

Figure 2

Growth kinetics of mesenchymal stem cell (MSC) samples in different culture media (median;  $n = 5$ )



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы МСК КМ после извлечения из криохранилища культивировали в различных средах и оценивали долю конfluenceности монослоя клеток.

На *рисунке 1* представлен пример обработки изображения монослоя МСК на приборе Image ExFluorer через 48 ч после эксплантации клеток.

Результаты определения доли конfluenceности монослоя МСК в зависимости от использованных сред представлены на *рисунке 2*.

Из приведенных данных видно, что среды StemMACS и ALPHA-MEM с добавлением лизата тромбоцитов наиболее эффективны для культивирования МСК. Достоверных различий в эффективности роста между этими средами получено не было ( $p = 0,43$ ). Варианты сред на основе DMEM оказались незначительно менее эффективны для экспансии МСК ( $p > 0,05$ ). Доля конfluenceности в культурах со средами на основе DMEM достигала максимального значения 0,8 к 80 ч культивирования (3–4 сут), тогда как в средах StemMACS и ALPHA-MEM с добавлением лизата тромбоцитов продолжала возрастать и

Рисунок 1

Пример оценки доли конfluenceности при помощи программного обеспечения к прибору Image ExFluorer. Объектив  $\times 10$

Figure 1

An example of cell confluence analysis using the Image ExFluorer software. Objective lens  $\times 10$



через 100 ч после начала экспансии. Среда на основе RPMI плохо поддерживала рост МСК. После культивирования в течение 70 ч в среде RPMI наблюдалась гибель клеток. Достоверность различий эффективности роста МСК составила:

- RPMI – ALPHA-MEM:  $p = 0,017$ ;
- RPMI – StemMACS:  $p = 0,019$ .

Помимо анализа динамики культур МСК в фазовом контрасте были поставлены эксперименты по оценке морфологии культур с использованием флуоресцентной микроскопии, для этого МСК окрашивали зеленым трекером CSFE (канал флуоресценции 488 nm). Окраска проводилась в соответствии с инструкциями производителя (MERCK). В связи с тем, что при мониторинге флуоресцентного сигнала от культур МСК с частотой 1 раз/10 ч в течение 4 сут жизнеспособность клеток резко снижается из-за регулярного воздействия лазерного излучения, в данной серии экспериментов анализ проводился в конечной точке через 90–96 ч культивирования.

Примеры морфологии культур МСК на 4-е сутки после пассажа при окраске CSFE представлены на *рисунке 3* и подтверждают приведенные выше данные о большей эффективности сред StemMACS и ALPHA-MEM для экспансии МСК.

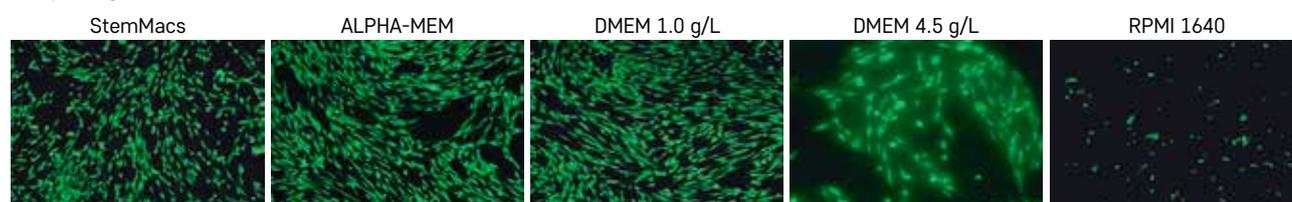
Лучшая эффективность сред StemMACS и ALPHA-MEM для экспансии МСК была также подтверждена в экспериментах по определению кинетики роста культур клеток импедансным методом с помощью прибора RTCA xCelligence. Самое быстрое удвоение количества клеток происходило при культивировании МСК в указанных средах. Было подтверждено, что использование среды RPMI для экспансии МСК неэффективно, процессы дегенерации клеток преобладают над пролиферацией и удвоения клеток в этих культурах достигнуто не было. Данные представлены на *рисунке 4*.

В отличие от клеточного имиджера Image ExFluorer, RTCA xCelligence не позволяет получать прижизненные изображения исследуемых культур, но эффективен в изучении кинетики адгезивных клеток в зависимости от условий культивирования, позволяя одновременно исследовать до 30 вариантов культур с минимальным расходом сред.

Использование прибора прижизненного наблюдения за состоянием культур клеток Image

**Рисунок 3**  
Морфология культур МСК КМ при окрашивании CSFE (90 ч культивирования). Объектив  $\times 10$

**Figure 3**  
Morphology of bone marrow-derived MSC cultures stained with CSFE (90 hours of culture). Objective lens  $\times 10$



ExFluorer позволяет оценить способность МСК спонтанно дифференцироваться в адипогенном направлении. Для этого были поставлены эксперименты с флуоресцентным окрашиванием МСК зеленым трекером CSFE (канал флуоресценции 488 nm), а жировых включений – красителем NILE RED (канал флуоресценции 553 nm). Культивирование проводили в отсутствие в среде дополнительных индукторов адипогенной дифференцировки в течение 100 ч, оценивали результаты в конечной точке с помощью программного обеспечения к прибору.

Результаты исследования позволяют сделать вывод, что при культивировании МСК в среде с содержанием глюкозы 4,5 г/л (среды DMEM high gl, RPMI1640) медиана доли клеток с жировой трансформацией через 5 сут культивирования выше, чем при культивировании в условиях содержания глюкозы 1,0 г/л (DMEM low gl, StemMacs, ALPHA-MEM). Результаты представлены на *рисунке 5* и в *таблице*. При культивировании МСК в среде RPMI в отсутствие значимой экспансии клеток происходят их адипогенная трансформация и накопление жировых включений.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническое применение МСК развивается быстрыми темпами как в трансплантологии – для улучшения приживления гемопоэтических клеток, снижения степени реакции «трансплантат против хозяина», так и при лечении болезней обмена. В связи с этим появляется потребность в производстве БМКП МСК, культивированных с соблюдением стандартных протоколов с применением максимально безопасных реагентов для экспансии клеток [18–20].

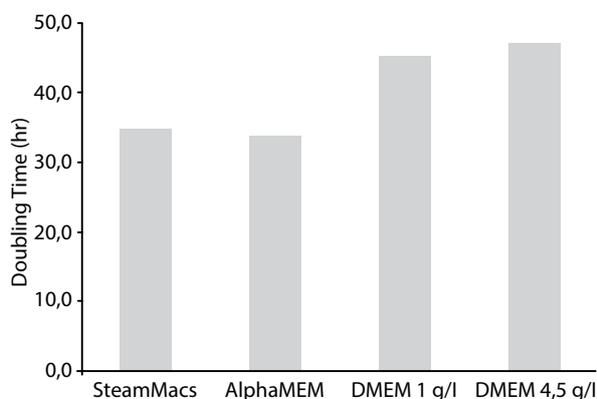
В последние годы ассортимент реагентов для экспансии БМКП значительно изменился в связи с выходом на рынок огромного количества биотехнологических компаний из Юго-Восточной Азии. Это делает актуальным проведение скрининга предлагаемых реагентов для разработки эффективных протоколов производства БМКП МСК. Использование приборов прижизненного мониторинга состояния клеточных культур позволяет в короткие сроки при

**Рисунок 4**

Результаты определения времени удвоения (Doubling Time) клеток в культурах МСК в зависимости от использованных сред (медиана;  $n = 5$ )

**Figure 4**

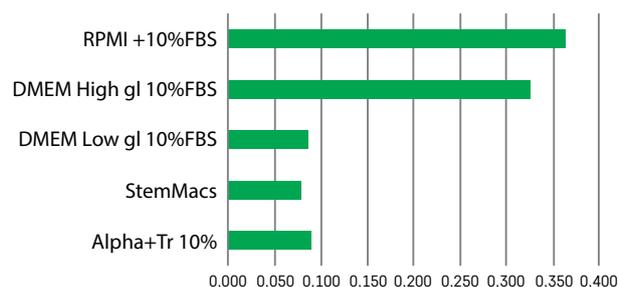
The doubling time of MSCs according to the culture media (the median;  $n = 5$ )

**Рисунок 5**

Доля МСК с жировыми включениями через 100 ч культивирования в зависимости от среды (медиана;  $n = 5$ )

**Figure 5**

The proportion of MSCs with fatty inclusions after 100 hours of culture according to the media (the median;  $n = 5$ )

**Таблица**

Достоверность различий содержания жировых включений в МСК в условиях культивирования в средах с различным содержанием глюкозы

**Table**

The significance of differences between the proportions of fatty inclusions in MSCs cultured in the media with different glucose concentration

Среда культивирования Culture medium	DMEM high gl	RPMI1640
ALPHA-MEM	$p = 0,021$	$p = 0,022$
StemMacs	$p = 0,014$	$p = 0,016$
DMEM low gl	$p = 0,011$	$p = 0,013$

небольшом расходе реагентов провести отбор наиболее эффективных сред для экспансии МСК в зависимости от целей проводимых исследований [21, 22].

Использование различных реагентов в протоколах экспансии МСК приводит к различиям в характеристиках конечного продукта [23, 24]. В последние годы достигнут значительный прогресс в производстве эффективных сред для культивирования МСК, которые не содержат потенциально опасных ксеногенных продуктов [23]. По мнению большинства исследователей, использование для экспансии МСК сред для культивирования с меньшей способностью к индукции спонтанной адипогенной дифференцировки предпочтительнее при производстве БМКП, поскольку клетки остаются некоммитированными и их дифференцировочный потенциал может быть реализован в зависимости от задач дальнейшего исследования и/или клинических потребностей при их применении [23, 25, 26].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования подтверждают такой подход к производству БМКП. Так, ALPHA-MEM с добавлением 10% лизата тромбоцитов позволяет в кратчайшие сроки достичь значительной экспансии МСК, не содержит ксеногенных продуктов, не вызывает спонтанной жировой трансформации культивируемых клеток и может быть рекомендована для экспансии МСК в возможных клинических целях.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ORCID

**Dudorova A.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9444-4689>

**Efimenko M.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3001-4820>

**Khismatullina R.D.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5618-7159>

**Maschan M.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

**Kazmina I.N.** ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-0448-504X>

**Ilyushina M.A.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7652-7704>

**Osipova E.Yu.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1873-3486>

## Литература / References

1. Frieedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6 (2): 230–47.
2. Kulus M., Sibiak R., Stefanska K., Zdun M., Wieczorkiewicz M., Piotrowska-Kempisty H., et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human and Animal Perinatal Tissues – Origins, Characteristics, Signaling Pathways, and Clinical Trials. *Cells* 2021; 10 (12): 3278.
3. Lazarus H.M., Haynesworth S.E., Gerson S.L., Rosenthal N.S., Caplan A.I. *Ex vivo* expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16 (4): 557–64.
4. Golpanian S., Wolf A., Hatzistergos K., Hare J.M. Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem

- cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue. *Physiol Rev* 2016; 96 (3): 1127–68.
5. Hoang D.M., Pham P.T., Bach T.Q., Ngo A.T., Nguyen Q.T., Phan T.T., et al. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7 (1): 1–41.
  6. Zhou L., Zhu H., Bai X., Huang J., Chen Y., Wen J., et al. Potential mechanisms and therapeutic targets of mesenchymal stem cell transplantation for ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13 (1): 195–210.
  7. Han H.T., Jin W.L., Li X. Mesenchymal stem cells-based therapy in liver diseases. *Mol Biomed* 2022; 3 (1): 23–74.
  8. Gavin C., Boberg E., Von Bahr L., Bottai M., Andr n A.T., Wernerson A., et al. Tissue immune profiles supporting response to mesenchymal stromal cell therapy in acute graft-versus-host disease – a gut feeling. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10: 334–40.
  9. Dabrowska S., Andrzejewska A., Janowski M., Lukomska B. Immunomodulatory and regenerative effects of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles: therapeutic outlook for inflammatory and degenerative diseases. *Front Immunol* 2021; 11: 1–26.
  10. Ciervo Y., Ning K., Jun X., Shaw P.J., Mead R.J. Advances, challenges and future directions for stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener* 2017; 12 (1): 85–107.
  11. Leyendecker J.A., Gomes Pinheiro C.C., Amano M.T., Franco Bueno D. The use of human mesenchymal stem cells as therapeutic agents for the *in vivo* treatment of immune-related diseases: a systematic review. *Front Immunol* 2018; 9: 1–51.
  12. Re F., Borsani E., Rezzani R., Sartore L., Russo D. Bone regeneration using mesenchymal stromal cells and biocompatible scaffolds: A concise review of the current clinical trials. *Gels* 2023; 9 (5): 389–404.
  13. Николаева Ю.А., Скоробогатова Е.В., Киргизов К.И., Пристанскова Е.А., Благонравова О.Л., Осипова Е.Ю. и др. Внутрикостное введение мезенхимальных стволовых клеток в терапии рефрактерной реакции «трансплантат против хозяина» с гипофункцией трансплантата. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского* 2019; 98 (4): 8–14. [Nikolaeva Yu.A., Skorobogatova E.V., Kirgizov K.I., Pristanskova E.A., Blagonravova O.L., Osipova E.U., et al. Intraosseous infusion of mesenchymal stem cells in treatment of graft-versus-host refractory response with graft hypofunction. *Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky* 2019; 98 (4): 8–14. (In Russ.)].
  14. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8 (4): 315–7.
  15. Mushahary D., Spittler A., Kasper C., Weber V., Charwat V. Isolation, cultivation and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A* 2018; 93 (1): 19–31.
  16. Viau S., Lagrange A., Chabrand L., Lorant J., Charrier M., Rouger K., et al. A highly standardized and characterized human platelet lysate for efficient and reproducible expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2019; 21 (7): 738–54.
  17. Шаманская Т.В., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А. Технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток *ex vivo* для клинического применения. *Онкогематология* 2009; (3): 69–77. DOI: 10.17650/1818-8346-2009-0-3-69-76 [Shamanskaya T.V., Osipova E.Yu., Roumiantsev S.A. Mesenchymal stem cells *ex vivo* cultivation technologies for clinical use. *Oncohematology* 2009; (3): 69–76. (In Russ.)].
  18. Астахова Н.М., Корель А.В., Кирилова И.А. Разработка протоколов выделения, культивирования и типирования мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга человека. *Гены и клетки* 2017; 12 (3): 128. [Astakhova N.M., Korel A.V., Kirilova I.A. The development of protocols for isolation, culture and differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Genes and Cells* 2017; 12 (3): 128. (In Russ.)].
  19. Wong C.W., Han H.W., Hsu S.H. Changes of cell membrane fluidity for mesenchymal stem cell spheroid on biomaterial surfaces. *World J Stem Cells* 2022; 14 (8): 616–32.
  20. Jakl V., Popp T., Haupt J., Port M., Roesler R., Wiese S. Effect of expansion Media on functional characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cells* 2023; 12 (16): 2105–36.
  21. Toth G., Szollosi J., Vereb G. Quantitating ADCC against adherent cells: impedance based detection is superior to release, membrane permeability, or caspase activation assays in resolving antibody dose response. *Cytometry A* 2017; 91 (10): 1021–9.
  22. He L., Li M., Wang X., Wu X., Yue G., Wang T., et al. Morphology-based deep learning enables accurate detection of senescence in mesenchymal stem cell cultures. *BMC Biol* 2024; 22 (1): 1–17.
  23. Parvin Nejad S., Lecce M., Mirani B., Machado Siqueira N., Mirzaei Z., Santerre J.P., et al. Serum- and xeno-free culture of human umbilical cord perivascular cells for pediatric heart valve tissue engineering. *Stem Cell Res Ther* 2023; 14 (1): 96–111.
  24. Even K.M., Gaesser A.M., Ciamillo S.A., Linardi R.L., Ortved K.F. Comparing the immunomodulatory properties of equine BM-MSC culture expanded in autologous platelet lysate, pooled platelet lysate, equine serum and fetal bovine serum supplemented culture media. *Front Vet Sci* 2022; 25 (9): 1–14.
  25. Fitzgerald J.C., Shaw G., Murphy J.M., Barry F. Media matters: culture medium-dependent hypervariable phenotype of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2023; 14 (1): 363–78.
  26. Altrock E., Sens-Albert C., Hofmann F., Riabov V., Schmitt N., Xu Q., et al. Significant improvements of bone marrow-derived MSC expansion from MDS patients by defined xeno-free medium. *Stem Cell Res Ther* 2023; 14 (1): 156–64.