



## БИОХИМИЯ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ

УДК: 619:616-001.4

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.1.212

### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОСТНОГО РЕГЕНЕРАТА, СФОРМИРОВАННОГО В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОМА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Кузнецова М.А.\*<sup>1</sup> – асс. каф. анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климова; Борхунова Е.Н.<sup>1</sup> – д-р биол. наук, доц., зав. каф. анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климова; Яковлева О.А.<sup>1</sup> – канд. с.-х. наук, доц., доц. каф. экономики и цифровых технологий в АПК; Довгий А.И.<sup>2</sup> – канд. биол. наук, ген. директор; Гаврюшенко Н.С.<sup>3</sup> – д-р тех. наук, проф., гл. науч. сотр.

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина»

<sup>2</sup> ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии», Москва, Россия

<sup>3</sup> НМИЦ ТО имени Н.Н. Приорова Минздрава РФ

\* kuznetsova\_mva@mail.ru

**Ключевые слова:** секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, костная ткань, трубчатая кость, репаративный остеогенез, морфология, биомеханика.

**Keywords:** secretome of multipotent mesenchymal stromal cells, bone tissue, tubular bone, reparative osteogenesis, morphology, biomechanics.

Поступила: 24.12.2024

Принята к публикации: 06.03.2025

Опубликована онлайн: 26.03.2025



#### РЕФЕРАТ

Современные технологии открывают перспективы использования новых эффективных методов стимуляции репаративного остеогенеза с целью оптимизации результатов лечения пациентов. Цель исследования – представить микроскопическую и биомеханическую характеристику регенерата диафиза и бедренной кости крыс, сформированного на 120-е сутки после операции и применения секретомы ММСК.

Представлены результаты экспериментального исследования структурных и биомеханических характеристик регенерата диафиза бедренной кости крыс на 120-е сутки репаративного остеогенеза после индуцирования костного дефекта в условиях применения инновационного регенеративного препарата – секретомы мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Контролем служили образцы кости, в которых в область остеорепарации вводили физраствор, а также интактные бедренные кости крыс. Материал изучали с помощью методов световой микроскопии, микроскопической морфометрии

и биомеханических испытаний. Установлено, что в опытной группе регенерат компактизирован, имеет черты гистотипии и образован главным образом пластинчатой костной тканью. В контрольной группе регенерат более тонкий, чем в опытной, не имеет признаков гистотипии, в его структуре наблюдается большее, по сравнению с опытной группой, представительство ретикулофиброзной костной ткани. Как в опытной, так и в контрольной группе ремоделирование регенерата не завершено. Очевидно, это влияет на прочностные характеристики кости. Биомеханические испытания показали, что бедренные кости животных опытной и контрольной групп по прочностным характеристикам уступают интактным образцам. При этом опытные образцы превосходят контрольные на 25%, что соответствует результатам морфологических исследований.

#### **ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION**

Современные технологии открывают перспективы использования новых эффективных методов стимуляции репаративного остеогенеза с целью оптимизации результатов лечения пациентов. Одним из таких направлений, несомненно, является регенеративная медицина, которая особенно стремительно развивается на протяжении последних 10-ти лет [1, 6, 11]. При этом наряду с препаратами, полученными с помощью генной инженерии, применением сложных композитных материалов и клеточных продуктов особое внимание уделяется секрету мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Секретом представляет собой кондиционную среду, которая содержит комплекс цитокинов, что и обуславливает высокую эффективность этого препарата [3, 12, 14]. Секретом обладает иммуномодулирующим воздействием, сбалансированным про- и противовоспалительным эффектом, стимулирует неоангиогенез, что в совокупности приводит к нормализации течения всех фаз репаративной регенерации. Эффективность применения секретов показана в ряде исследований [2, 4, 7, 8, 11, 15], однако влияние их на остеорепарацию рассматривается лишь в единичных работах [9, 10, 16]. В этой связи нами проведено исследование, в котором в условиях эксперимента на лабораторных крысах моделировали дефект диафиза бедренной кости и изучали формирование регенерата в условиях применения секрета ММСК отечественного производства.

Цель исследования – представить микроскопическую и биомеханическую

характеристику регенерата диафиза и бедренной кости крыс, сформированного на 120-е сутки после операции и применения секрета ММСК.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS**

Работа проведена на базе кафедры анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климова ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина. Объектом исследования служили белые беспородные крысы (самцы, 200±20 г), подобранные по методу аналогов, которых подразделяли на контрольную (n=16), опытную (n=16) и интактную (n=6) группы. В контрольной и опытной группах под наркозом (Изофлуран) с помощью фрезы моделировали монокортикальный дефект в середине диафиза бедренной кости. В опытной группе дефект орошали секретом ММСК (производство ООО Т-Хелпер Клеточные Технологии, Москва, Россия [5]), в контрольной - физиологическим раствором (по 0,2 мл, 1 мин.). Повторное введение препаратов проводили через 7 суток, инъекционно, параоссально. В интактной группе операцию не проводили. Животных выводили из эксперимента путем передозирования наркотика (Изофлуран) на 120-е сутки. Для гистологических исследований материал фиксировали в 10% растворе нейтрализованного формалина и после деминерализации и промывки заливали в парафин по общепринятой методике и готовили срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим и по Ван-Гизон. Микропрепараты изучали с помощью микроскопа Microscreen, совмещенного с цифровой си-

стемой визуализации и микрофотосъемки объектов.

Определение силы разрушения при биомеханических испытаниях образцов бедренных костей крыс по методу 3-х точечного изгиба осуществляли с помощью электромеханической испытательной машины LFM-50 фирмы Walter and Bai (Швейцария), соблюдая параметры (0 - 50 кН, скорость нагружения 0-500 мм/мин., вращение 60 об./мин., точность измерения 0,34 %). Значения перемещения (прогиба образца) и значения силы регистрировали автоматически, статистическая обработка данных проводилась в IBM SPSS Statistics 27. Работа проведена в НМИЦ ТО имени Н.Н. Приорова Минздрава РФ.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

##### Результаты микроскопических исследований

При оценке результата остеорепарации в первую очередь обращали внимание на признаки гистотипического восстановления, сравнивая структуру регенерата и интактного диафиза бедренной кости крысы. Последний представлен пластинчатой костной тканью с типичной структурной компоновкой, за счет которой формируются наружная и внутренняя общие системы костных пластин (представлены костными пластинами, расположенными взаимопараллельно и тангенциально) и расположенный между ними остеонный слой, представленный остеонами небольшого диаметра и вставочными костными пластинами (рис. 1). Толщина кортикального слоя кости в интактных образцах составляет  $585,62 \pm 109,97$  мкм.

В опытной группе через 120 суток после операции в области репарации наблюдается регенерат, в структуре которого видны компактизированная и спонгизированные части (рис. 2). Компактизированная часть хорошо консолидирована с краями дефекта и имеет толщину  $539,63 \pm 181,51$  мкм.

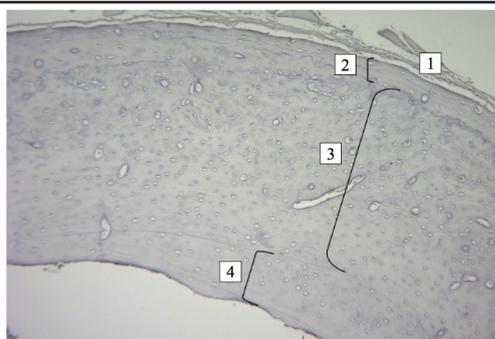


Рисунок 1 – Микроструктура диафиза бедренной кости крысы. Интактный образец. А – гистологическая картина: 1 – надкостница, 2 – наружная общая система костных пластин, 3 – остеонный слой, 4 – внутренняя общая система костных пластин. Альциановый синий,  $\times 40$ .



Рисунок 2 – Микроструктура регенерата кости. Опытная группа, 120 суток. Общ. вид: 1 – край дефекта, 2 – регенерат с признаками компактизации и ремоделирования, 3 – часть регенерата с явлениями спонгизации, 4 – полости резорбции, 5 – медуллярный канал. А – гематоксилин и эозин,  $\times 40$ .

Регенерат сформирован главным образом пластинчатой костной тканью, однако в данный срок ремоделирование еще не завершено, о чем свидетельствуют небольшие фрагменты ретикулофиброзной костной ткани с признаками резорбции, визуализируемые в структуре регенерата при гистологических исследованиях. Следует отметить, что часть регенера-

та, обращенная в медуллярный канал, спонгизирована, что может быть связано с постепенной остеокластической резорбцией внутренней части регенерата, не испытывающей существенную биомеханическую нагрузку при статолокомоциях.

Граница между регенератом и краем бывшего дефекта определяется за счет линий склеивания. В регенерате отчетливо видны признаки гистотипии (рис. 3): так, наблюдается хорошо развитая наружная общая система костных пластин, остеонный слой имеет четкое оформление, представлен мелкими остеонами и вставочными костными пластинами. Вместе с

тем, среди пластинчатой костной ткани здесь встречается матрикс ретикулофиброзной костной ткани, который отличается от матрикса пластинчатой костной ткани бесструктурностью, а тинкториально умеренной базофилией и альцианофилией. Внутренняя общая система костных пластин представлена хорошо развитым слоем, который имеет равномерную толщину. Данная морфологическая картина может свидетельствовать о включении регенерата в процесс обеспечения функциональной нагрузки, характерной для диафиза бедренной кости.

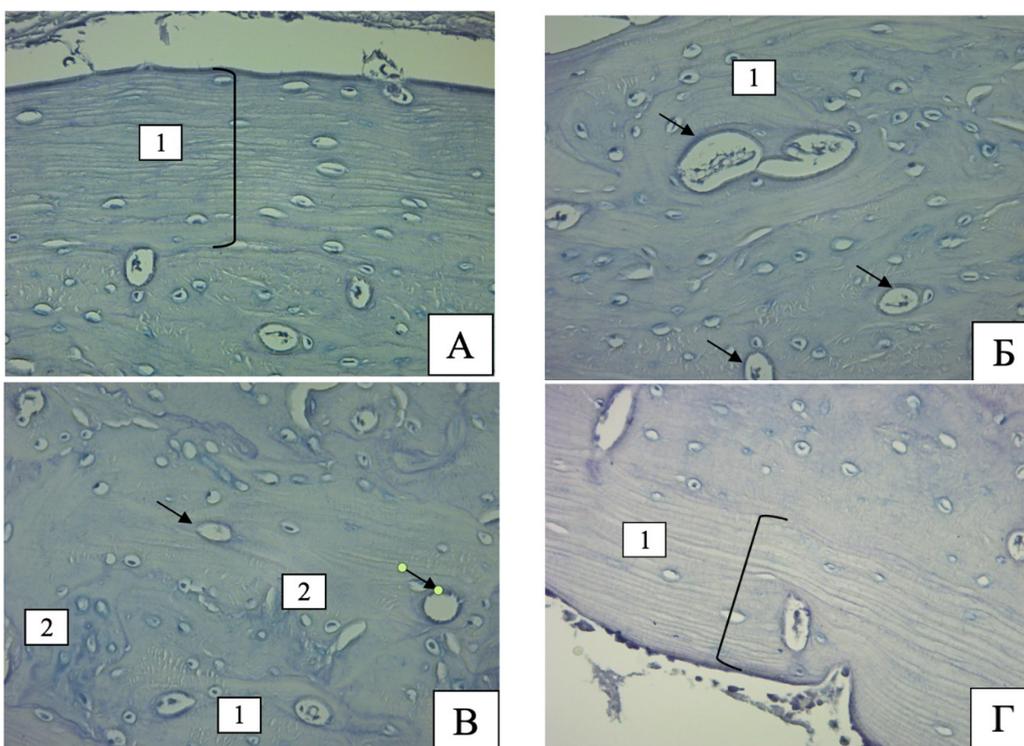


Рисунок 3 – Микроструктура регенерата кости. Опытная группа. 120 суток.  
А: периостальная поверхность кости ровная, 1 – наружная общая система костных пластин хорошо развита. Альциановый синий, х400. Б: остеонный слой содержит остеоны (1) и вставочные костные пластины; гаверсовы каналы показаны стрелками. Альциановый синий, х400. В: остеонный слой с явлениями ремоделирования: среди пластинчатой костной ткани (1) видна ретикулофиброзная костная ткань (2). Стрелками показаны гаверсовы каналы. Альциановый синий, х400. Г – внутренняя общая система костных пластин (1) хорошо развита, имеет равномерную толщину. Альциановый синий, х400.

В контрольной группе (рис. 4) визуализировали регенерат, компактизированная часть которого тоньше, чем в опытной группе –  $406,33 \pm 74,99$ . В то же время признаки спонгизации выражены в нем в большей степени. Обращает на себя внимание, что регенерат неплотно консолидирован с краями дефекта, на границе с краями бывшего дефекта гистологически наблюдаются узкие полости. В структуре регенерата определяются пластинчатая и ретикулофиброзная костные ткани, что указывает на продолжение ремоделирования.

Следует отметить, что в регенерате не выявлены признаки гистотипии: так, наружная общая система костных пластин не имеет отчетливого оформления и

на большем протяжении регенерата не визуализируется. Остеоны и костные пластины в структуре регенерата сочетаются с ретикулофиброзной костной тканью, представительство которой значительно. При этом видны обширные полости резорбции, за счет которых структура регенерата рарефицирована. Внутренняя общая система костных пластин оформлена, но имеет неравномерную толщину и локально не визуализируется (рис. 5). Такая картина может свидетельствовать о замедленном, по сравнению с опытной группой, течением процесса ремоделирования, а также о перераспределении биомеханической нагрузки между микроструктурами регенерата.

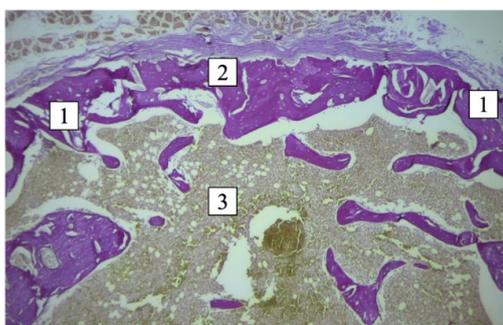


Рисунок 4 – Микроструктура регенерата кости. Контрольная группа, 120 суток. Общій вид: 1 – край дефекта, 2 – регенерат рарефицирован, содержит многочисленные полости, 3 – медулярный канал. Ван-Гизон, x40.

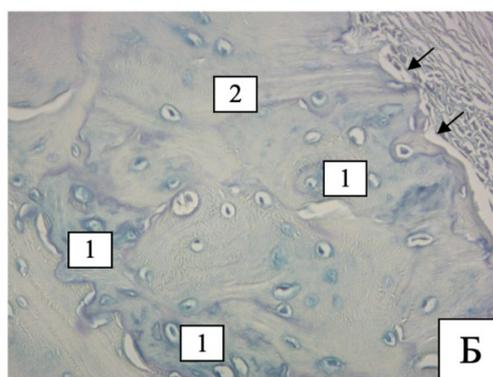
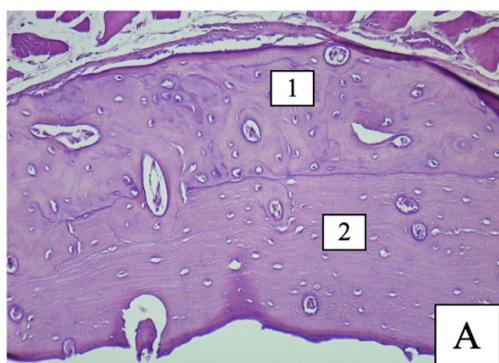


Рисунок 5 – Микроструктура регенерата кости. Контрольная группа. 120 суток. А – регенерат не имеет признаков гистотипии, общій вид: наружная общая система костных пластин не выражена, 1 – остеонный слой, 2 – внутренняя общая система костных пластин формирует толстый слой. Гематоксилин и эозин, x200. Б – ретикулофиброзная костная ткань (1) и пластинчатая костная ткань (2) в поверхностных слоях регенерата. Периостальная поверхность неровная (стрелки). Альциановый синий, x400.

**Результаты биомеханических испытаний**

Изучение статической прочности образцов бедренных костей крыс опытной, контрольной и интактной групп по методу 3-х точечного изгиба было позволило установить, что для них характерно хрупкое мгновенное разрушение (рис. 6).

В начальный момент нагружения в образцах костей наблюдаются начальные неустойчивые процессы деформирования, далее происходит повторный устойчивый рост нагрузки вплоть до момента разрушения. Этим событиям соответствует прямолинейный участок кривой, характеризующий упругое поведение бедренной кости при ее нагружении. Хрупкое разрушение характеризуется мгновенным падением нагрузки на диаграммах испытания с фрагментацией образца бедренной кости животного за счет образования макротрещины при достижении максимума силы (F разрушения). Нагрузка при этом мгновенно падает до нуля. Согласно полученным данным, сила разрушения для

образцов опытной, контрольной и интактной групп была неодинаковой (табл. 1).

Из таблицы 1 следует, что опытные образцы превосходят контрольные по прочности на 25%. Вместе с тем, обе группы уступают интактным образцам: опытные образцы на 32%, контрольные - на 46%. Это может быть связано, в частности, с незавершенным ремоделированием регенерата, выявленном при гистологических исследованиях.

Анализ результатов, полученных в трех изучаемых группах образцов, проводился с применением непараметрического критерия Краскела-Уоллеса. Была проверена гипотеза об отсутствии статистически значимых различий по показателям силы разрушения (F разр.) в опытной, контрольной и интактной группах (табл. 2). Анализ данных показал, что выборки достоверно отличаются друг от друга.

Полученная оценка была подтверждена попарным сравнением групп с помощью теста Тьюки (табл. 3).

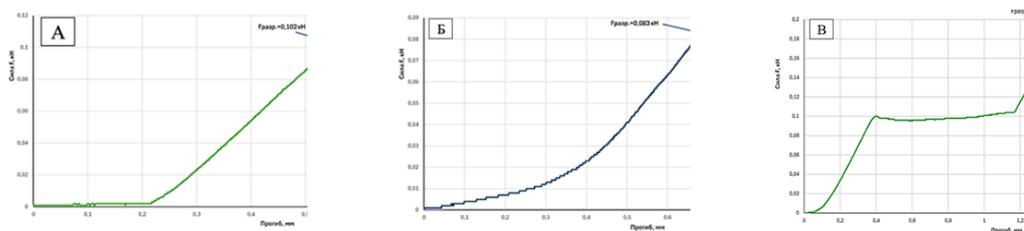


Рисунок 6 – Результаты испытаний образцов бедренных костей крыс А – опытной группы, Б – контрольной группы, В – интактной группы.

**Таблица 1 – Показатели силы разрушения (F разр.) бедренных костей крыс опытной, контрольной и интактной групп, кН**

Группы	Кол-во измерений	Сила разрушения, кН
Опыт	6	0,120±0,007
Контроль	6	0,096±0,004
Интактные образцы	6	0,177±0,004

Примечание:  $p \leq 0,05$ .

**Таблица 2 – Итоги проверки гипотезы об отсутствии отличий по показателю силы разрушения (F разр.) в опытной, контрольной и интактной группах**

Нулевая гипотеза	Критерий	знач. <sup>a,b</sup>	Решение
Распределение результатов является одинаковым для категорий «группа»	Критерий Краскелат-Уоллеса для независимых выборок	0,001	Нулевая гипотеза отклоняется
а. Уровень значимости равен 0,05.			
б. Выводится асимптотическая значимость.			

**Таблица 3 – Результаты проведения теста Тьюки для выявления отличий в показателе силы разрушения (F разр.) бедренных костей крыс опытной, контрольной и интактной групп**

Группы сравнения (попарно)		Асимптотическая значимость*
Опыт	Контроль	0,012
Опыт	Интактные образцы	0,000
Контроль	Интактные образцы	0,000

\*Уровень значимости равен 0,05.

Значение асимптотической значимости менее 0,05 указывает на то, что значения силы разрушения (F разр.) для каждой группы статистически значимо отличаются от других групп.

#### **ВЫВОДЫ / CONCLUSIONS**

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что через 120 суток после индуцирования монокортикального дефекта в условиях применения секрета ММСК формируется регенерат, образованный преимущественно пластинчатой костной тканью, хорошо консолидированный с краями дефекта и имеющий признаки гистотипии, о чем свидетельствует наличие наружной и внутренней общих систем костных пластин и остеонного слоя в его структуре. Это отличает его от контрольных образцов, в которых регенерат имеет меньшую толщину, большее представительство ретикулофиброзной костной ткани и не имеет гистотипического строения. Следует отметить, что в обеих группах ремоделирование регенерата на 120-е сутки еще не завершено.

Гистотипическое строение регенерата в опытной группе указывает на включение

его в реализацию биомеханических функций кости и предполагает повышение прочности по сравнению с контрольной группой. Это подтверждается биомеханическими испытаниями образцов костей, согласно которым прочностные характеристики бедренной кости в опытной группе на 25% превышали таковые в контрольной. Полученные данные позволяют заключить, что применение секрета ММСК оказывает положительное влияние на течение репаративного остеогенеза.

#### **MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS BONE REGENERATE FORMED UNDER THE CONDITIONS OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS SECRETOME APPLICATION**

**Kuznetsova M.A.**\*<sup>1</sup> - ass. kaf. anatomy and histology of animals named after Professor A.F. Klimov; **Borkhunova E.N.**<sup>1</sup> – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department anatomy and histology of animals named after Professor A.F. Klimov; **Yakovleva O.A.**<sup>1</sup> – Cand. Agricult. sciences,

Associate Professor, Associate Professor of the Department of Economics and Digital Technologies in Agroindustrial Complex; **Dovgii A.I.**<sup>2</sup> – Cand. Biol. sciences, General Director of T-Helper Cell Technologies, **Gavryushenko N.S.**<sup>3</sup> – Doctor of Technical Sciences, Professor, Chief Researcher.

<sup>1</sup> Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K. I. Scriabin

<sup>2</sup> T-Helper Cell Technologies, LLC

<sup>3</sup> National Medical Research Center for Traumatology and Orthopedics named after N.N. Priorov, Ministry of Health of the Russian Federation

\* kuznetsova\_mva@mail.ru

#### ABSTRACT

Modern technologies open up prospects for using new effective methods of stimulating reparative osteogenesis in order to optimize patient treatment outcomes. The aim of the study was to present microscopic and biomechanical characteristics of rat diaphysis and femoral bone regeneration formed on the 120th day after surgery and the use of MMSC secretome. The results of experimental study of structural and biomechanical characteristics of rat femoral diaphysis regenerate on the 120th day of reparative osteogenesis after induction of bone defect under the conditions of application of an innovative regenerative preparation - secretome of multipotent mesenchymal stromal cells - are presented. Bone samples in which saline solution was injected into the area of osteorepair, as well as intact rat femurs served as control. The material was studied by light microscopy, microscopic morphometry and biomechanical tests. It was found that in the experimental group the regenerate is compacted, has histotypic features and is formed mainly by lamellar bone tissue. In the control group, the regenerate is thinner than in the experimental group, has no histotypic features, and in its structure, there is a greater representation of reticulofibrous bone tissue compared to the experimental group. Both in the experimental and control groups the remodeling of the regenerate is not com-

pleted. Obviously, this affects the strength characteristics of the bone. Biomechanical tests have shown that the femur bones of animals of the experimental and control groups are inferior to intact samples in terms of strength characteristics. At the same time, experimental samples exceed control samples by 25%, which corresponds to the results of morphological studies.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Богачева, Н. В. Кондиционная среда мезенхимальных стромальных клеток: новый класс терапевтических средств / Н. В. Богачева, М. Э. Колман // Биохимия. – 2019. – Т. 84, № 11. – С. 1701-1717. – DOI 10.1134/S0320972519110125.
2. Борхунова, Е. Н. Особенности проявления клеточных взаимодействий на ранних этапах заживления раны кожи под влиянием секретомы мезенхимальных стволовых клеток / Е. Н. Борхунова, А. И. Довгий, А. Халил // Морфология в XXI веке: теория, методология, практика: Сборник трудов всероссийской (национальной) научно-практической конференции, Москва, 01–04 июня 2021 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина», 2021. – С. 24-28.
3. Макаревич, П.И. Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины / П. И. Макаревич, А. Ю. Ефименко, В. А. Ткачук // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 1. – С. 15-33. – DOI 10.31857/S0320972520010029.
4. Особенности репаративной регенерации роговицы в условиях применения секретомы стволовых клеток / Е. Н. Борхунова, С. В. Позябин, С. В. Сароян, А. И. Довгий // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 45-55. – DOI 10.31088/SEM2022.11.3.45-55.
5. Патент № 2708329 С2 Российская Федерация, МПК С12N 5/077. Материал ство-

- ловых клеток, композиции и способы применения: № 2016121458: заявл. 31.05.2016; опубл. 05.12.2019 / А. А. Соколов, А. И. Колесникова, А. И. Довгий [и др.]; заявитель ООО "Т-Хелпер Клеточные Технологии"
- 6.Регенеративная медицина - будущее ветеринарии / А. А. Лаврик, Г. В. Анненкова, С. Г. Дресвянникова [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2021. – № 1. – С. 33-36. – DOI 10.33861/2071-8020-2021-1-33-36.
- 7.Репаративная регенерация сухожилия под влиянием секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: экспериментальное исследование / М. Д. Качалин, Е. Н. Борхунова, С. В. Полябин [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 77-88. – DOI 10.31088/СЕМ2023.12.2.77-88.
- 8.Сароян С. В., Комаров С. В. Оценка эффективности применения секрета мезенхимальных стволовых клеток в послеоперационной терапии корнеального секвестра. Систематизация клинического опыта // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2021. №4.
- 9.Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Dec;5(12):685-97. doi: 10.1038/nrrheum.2009.228. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19901916
- 10.Kangari P, Talaei-Khozani T, Razeghian-Jahromi I, Razmkhah M. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Nov 23;11(1):492. doi: 10.1186/s13287-020-02001-1. PMID: 33225992; PMCID: PMC7681994.
- 11.L PK, Kandoi S, Misra R, S V, K R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Apr;46:1-9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30954374.
- 12.Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One*. 2014 Sep 8;9(9):e107001. doi: 10.1371/journal.pone.0107001. Erratum in: *PLoS One*. 2015 Mar 04;10(3):e0119262. doi: 10.1371/journal.pone.0119262. PMID: 25198551; PMCID: PMC4157844.
- 13.Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res*. 2021 Jan;52(1):93-101. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32977984.
- 14.Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res*. 2021 Jan;52(1):93-101. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32977984.
- 15.Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852. PMID: 28841158; PMCID: PMC5618501.
- 16.Wang X, Thomsen P. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles and bone regeneration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2021 Jan;128(1):18-36. doi: 10.1111/bcpt.13478. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32780530; PMCID: PMC7820981.

## REFERENCES

1. Bogacheva, N. V. Conditioned environment of mesenchymal stromal cells: a new class of therapeutic agents / N. V. Bogacheva, M. E. Kolman // *Biochemistry*. – 2019. – Vol. 84, No. 11. – pp. 1701-1717. – DOI 10.1134/S0320972519110125.
2. Borkhunova, E. N. Features of cellular interactions in the early stages of skin wound healing under the influence of the secretome of mesenchymal stem cells / E. N. Borkhunova, A. I. Dovgiy, A. Khalil // *Morphology in the XXI century: theory, methodology, practice: Proceedings of the All-Russian (national) scientific and practical conference, Moscow, June 01-04, 2021*. Moscow: Federal State Budgetary Educational Institution

- of Higher Education "Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MBA named after K.I. Scriabin", 2021, pp. 24-28.
3. Makarevich, P.I. Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: basic mechanisms and significance for regenerative medicine / P. I. Makarevich, A. Yu. Efimenko, V. A. Tkachuk // *Biochemistry*. – 2020. – Vol. 85, No. 1. – pp. 15-33. – DOI 10.31857/S0320972520010029.
4. Features of reparative corneal regeneration under the conditions of using stem cell secretome / E. N. Borkhunova, S. V. Pozyabin, S. V. Saroyan, A. I. Dovgiy // *Clinical and experimental morphology*. – 2022. – Vol. 11, No. 3. – pp. 45-55. – DOI 10.31088/CEM2022.11.3.45-55.
5. Patent No. 2708329 C2 Russian Federation, IPC C12N 5/077. Stem cell material, compositions and methods of application: No. 2016121458: application 31.05.2016: published 05.12.2019 / A. A. Sokolov, A. I. Kolesnikova, A. I. Dovgiy [et al.]; applicant LLC "T-Helper Cellular Technologies"
6. Regenerative medicine - the future of veterinary medicine / A. A. Lavrik, G. V. Anenkov, S. G. Dresvyannikova [et al.] // *Veterinary Medicine of Kuban*. – 2021. – No. 1. – pp. 33-36. – DOI 10.33861/2071-8020-2021-1-33-36.
7. Reparative tendon regeneration under the influence of secretome of multipotent mesenchymal stromal cells: an experimental study / M. D. Kachalin, E. N. Borkhunova, S. V. Pozyabin [et al.] // *Clinical and experimental morphology*. – 2023. – Vol. 12, No. 2. – pp. 77-88. – DOI 10.31088/CEM2023.12.2.77-88.
8. Saroyan S. V., Komarov S. V. Evaluation of the effectiveness of the mesenchymal stem cell secretome in postoperative corneal sequester therapy. Systematization of clinical experience // *Scientific notes of the KGAVM named after N.E. Bauman*. 2021. №4.
9. Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Dec;5(12):685-97. doi: 10.1038/nrrheum.2009.228. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19901916
10. Kangari P, Talaei-Khozani T, Razeghian-Jahromi I, Razmkhah M. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Nov 23;11(1):492. doi: 10.1186/s13287-020-02001-1. PMID: 33225992; PMCID: PMC7681994.
11. L PK, Kandoi S, Misra R, S V, K R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Apr;46:1-9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30954374.
12. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One*. 2014 Sep 8;9(9):e107001. doi: 10.1371/journal.pone.0107001. Erratum in: *PLoS One*. 2015 Mar 04;10(3):e0119262. doi: 10.1371/journal.pone.0119262. PMID: 25198551; PMCID: PMC4157844.
13. Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res*. 2021 Jan;52(1):93-101. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32977984.
14. Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, Caplan AI, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Arch Med Res*. 2021 Jan;52(1):93-101. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006. Epub 2020 Sep 22. PMID: 32977984.
15. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852. PMID: 28841158; PMCID: PMC5618501.
16. Wang X, Thomsen P. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles and bone regeneration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2021 Jan;128(1):18-36.