

УДК: 576.362:611.018.26:636.1

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.402

## СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ IN VITRO СЕКРЕТОМОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЛОШАДИ

**Трифонова А.В.**<sup>1\*</sup> – канд. биол. наук, директор по науке (ORCID 0009-0008-0181-2197); **Али С.Г.**<sup>1</sup> – канд. биол. наук, начальник НПЛ клеточных технологий (ORCID 0000-0002-0528-671X); **Нечаев А.Ю.**<sup>2,3</sup> – д-р ветеринар. наук, проф., зав. каф. общей, частной и оперативной хирургии, интерн (ORCID 0000-0001-9035-0036); **Лаврик А.А.**<sup>1</sup> – ген. директор (ORCID 0000-0002-7732-4420); **Минина А. О.**<sup>2</sup> – канд. ветеринар. наук, доц., доц. каф. общей, частной и оперативной хирургии (ORCID 0000-0002-4176-4053).

<sup>1</sup> ООО «Стэм реновацио»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет»

\* trifonova@ns-rabies.ru

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, культивирование, кондиционированная среда, экстракт, секретом, модель «раны».

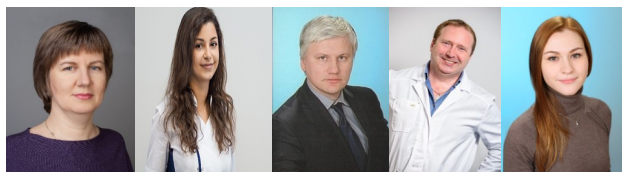
**Key words:** mesenchymal stem cells, cultivation, conditioned medium, extract, secretome, «wound healing assay».

**Финансирование:** Материалы подготовлены в рамках Российского научного фонда 2025 года «Использование продуктов секреции мезенхимальных стволовых клеток для стимуляции физиологической и репаративной регенерации кардиореспираторной системы у лошадей» (соглашение №25-16-00265 от 29.05.2025).

Поступила: 31.08.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



### РЕФЕРАТ

Сегодня в регенеративной медицине, традиционно опирающейся на терапию стволовыми клетками, происходит переход к новому типу биологической регуляции, основанному на межклеточном взаимодействии через секретируемые вещества, известные как секретом. Применение секретом мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в регенеративной терапии обладает рядом преимуществ по сравнению с использованием живых клеток, включая возможность модификации состава секретом для достижения определенных терапевтических целей. В настоящем исследовании впервые описана процедура получения секретом мезенхимальных стволовых клеток лошади с использованием двух отличных методов и проведено сравнительное изучение их биологической активности на модели «раны» *in vitro*. С помощью программы TopView 3.7. на фотографиях измеряли ширину «раны» в каждой из 6 точек для каждой лунки через 0 часов ин-

кубирования (сразу после нанесения «царапины») и 24 ч инкубирования. Рассчитывали среднее значение ширины просвета «царапины» в 0ч и 24 ч. Затем рассчитывали отношение средней ширины «царапины» через 24 часа инкубирования к среднему значению ширины «царапины» через 0 часов инкубирования, после чего рассчитывали для каждого образца «степень зарастания раны по отношению к «К». Результат выражали в % по отношению к контролю. Впервые проведена оценка стабильности биологической активности секрета МСК при хранении в температурном диапазоне от +4 до +8 °С на протяжении двух месяцев. На основании результатов проведенных исследований будет выбран секретом МСК, являющийся перспективным кандидатом для дальнейших испытаний: сначала на лабораторных животных с целью оценки безопасности при различных путях введения, а затем на лошадях для анализа его влияния на показатели сердечно-сосудистой и дыхательной систем при патологических состояниях как в покое, так и после физической нагрузки.

#### ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Регенеративная медицина, представляющая собой междисциплинарную область знаний, активно развивается как в гуманной, так и в ветеринарной практике. Основная цель регенеративных методов лечения – активация процессов репаративной регенерации, направленных на восстановление не только структуры, но и функциональности пораженных тканей и органов. Такой подход имеет значительные преимущества перед традиционными терапевтическими стратегиями [1, 2].

Основной постулат регенеративной медицины заключается в наличии региональных стволовых клеток во всех тканях и органах взрослого организма. Именно эти клетки отвечают за возобновление клеточного состава, а также первыми активируются при повреждениях, обеспечивая восстановление. Под воздействием определенных стимулов эти клетки выходят из состояния покоя, начинают делиться и дифференцироваться в специализированные клетки, замещая поврежденные ткани. Это уникальный механизм, способствующий регенерации и обновлению тканей, присущий каждому организму [3].

В течение длительного времени регенеративная медицина опиралась на использование различных типов стволовых клеток, однако сегодня предпочтение отдается мезенхимным стволовым клеткам (МСК), присутствующим в тканях взрослого организма [1,4]. Огромный терапевтический потенциал МСК обусловлен тремя основными механизмами действия:

миграцией в очаг повреждения, дифференцировкой в другие типы клеток и секрецией биоактивных факторов [2]. При этом современные данные указывают на то, что именно третий механизм является ключевым для реализации эффектов МСК.

В настоящее время наблюдается появление нового типа биологической регуляции, основанного на межклеточной коммуникации посредством секреторируемых веществ, то есть секрета. Использование секрета МСК в регенеративной терапии имеет ряд преимуществ по сравнению с применением живых клеток: решение вопросов безопасности, дозировки и эффективности, длительное хранение без потери активности, экономичность и практичность, возможность массового производства, сокращение времени до начала лечения, а также возможность корректировки состава секрета для достижения желаемых эффектов [2, 5].

Целью нашей работы было сравнение биологической активности секреторов МСК из жировой ткани лошади, полученных разными способами, на разных сроках культивирования, а также после хранения.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Жировую ткань (ЖТ) получали у лошади в Ленинградской области с согласия владельцев. Ветеринарный врач осуществлял надрез бедра лошади в области хвоста и вырезал кусочек подкожной жировой ткани размером 1 см<sup>2</sup>. Рана лошади обрабатывалась антисептиками и зашива-

лась. Образцы жировой ткани доставляли в лабораторию в стерильной пробирке в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, phosphate-buffered saline), содержащем пенициллин и стрептомицин (Gibco, США). В условиях ламинарного бокса жировую ткань тщательно промывали стерильным PBS с добавлением 200 мкг/мл цефтриаксона (Синтез, Россия) и 3 мкг/мл амфотерицина В (Biowest, Франция), измельчали при помощи глазных ножниц, добавляли к ней раствор коллагеназы (тип 2) (ПанЭко, Россия) из расчета 500 ед/мл и инкубировали 45 мин при 37°C при постоянном помешивании. По окончании инкубации, клетки осаждали центрифугированием. Жидкую фазу с крупными кусками ткани и зрелыми жировыми клетками удаляли серологической пипеткой, осадок ресуспендировали в среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия). Полученную суспензию фильтровали через сетчатый фильтр с размером пор 100 мкм, фильтрат вновь центрифугировали, полученный осадок разводили средой ДМЕМ:ФБС (фетальная бычья сыворотка, Biowest, Франция) (9:1) с добавлением 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина и высевали в культуральные флаконы (SPL LifeSciences, Корея). Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и содержании 5%CO<sub>2</sub>. Через 24 ч ростовую среду с неприкрепившимися клетками удаляли, флаконы несколько раз тщательно промывали PBS с добавлением антибиотиков и снова добавляли аналогичную ростовую среду. Смену среды производили каждые 72–96 ч. Конфлюэнтный монослой формировался к 8 суткам после выделения. Культуру МСК ЖТ лошади накапливали в течение двух пассажей, производя пересев каждые 72–96 ч. Затем клетки были криоконсервированы в среде содержащей 10% диметилсульфоксид (ДМСО, Биолот, Россия) по стандартному трех этапному протоколу: I этап – со скоростью 0,5 град/мин до минус 20°C; II этап – со скоростью 1 град/мин до минус 80°C, с последующим погружением в жидкий азот.

Для оценки потенциала к дифференцировке полученных МСК лошади на четвертом пассаже проводилась направленная дифференцировка в остеогенном и адипогенном направлениях. Индукция адипогенеза проводилась в течение 14 суток при помощи 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина, 1 мкМ дексаметазона, 1 мкМ инсулина, 0,2 мМ индометацина, выявление липидных капель при помощи окраски OilRed O (Sigma, Германия). Индукция остеогенеза происходила в течение 21 суток при помощи 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10 мкМ дексаметазона и 10 мМ β-глицерофосфата, а выявление солей кальция при помощи окрашивания Alizarin red S.

Была проведена оценка пролиферативных свойств МСК лошади. Для этого на 4 и 10 пассажах была проведена оценка индекса пролиферации культуры, рассчитано время удвоения популяции, проведена оценка морфологии монослоя культуры и морфологии клеток. Индекс пролиферации (ИП) рассчитывался как отношение количества выросших клеток (N<sub>t</sub>) к количеству посеянных (N<sub>0</sub>), время удвоения популяции – рассчитывалось по формуле  $t_d = t / \log_2 (N_t / N_0)$ , где t – время роста культуры, ч. Визуальная прижизненная оценка и фотографирование производилась при помощи инвертированного микроскопа Микромед 3И с фотонасадкой.

Получение секрета (продуктов секреции) МСК осуществляли на 4 и 10 пассажах культуры двумя способами. В первом способе после формирования культурой МСК монослоя производилась замена среды на свежую: ростовая среда ДМЕМ без фенолового красного (ПанЭко, Россия) с добавлением ФБС в соотношении 9:1. Накопление продуктов секреции МСК производилось в течение 96 часов. После чего кондиционированная среда из всех культуральных матрасов собиралась в стерильные флаконы. Затем из всех культуральных матрасов снимали клетки, двукратно отмывали их раствором PBS и готовили суспензию клеток в 5 мл PBS.

Из суспензии клеток готовили экстракт МСК путем нескольких циклов замораживания-оттаивания, который добавляли к собранной ранее кондиционированной среде [6]. Для второго варианта собирали описанным ранее способом кондиционированную среду МСК, экстракт МСК не добавляли.

В обоих вариантах дальнейшая очистка и стабилизация секрета проводилась одинаково. Для этого вначале весь объем полученной кондиционной среды фильтровали через глубинный фильтр, необходимый для очистки от клеточного дебриса, а затем проводили ультрафильтрацию через мембрану с селективностью 50 кДа. Для стабилизации к полученному фильтрату добавляли 20 мг/мл глицина, раствор фильтровали через стерилизующий фильтр с размером пор 0,22 мкм в условиях ламинарного бокса. Хранили полученные секретомы МСК в жидком состоянии при температуре +4 - +8°C.

Оценку биологической активности полученных вариантов секрета МСК лошади проводили на модели «раны» *in vitro* [7] в собственной модификации. Для этого МСК высевали в 24-ти луночный планшет и инкубировали до достижения конфлюэнтного монослоя при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Затем в каждой лунке на сформированном монослое нанесли по 2 вертикальные «царапины» при помощи наконечника дозатора 100 мкл, удаляли питательную среду из всех лунок при помощи дозатора, и еще дважды промывали монослой раствором PBS.

Исследуемые образцы секрета предварительно разводили в пробирках до концентрации 1% в питательной среде ДМЕМ, тщательно перемешивая для обеспечения однородности раствора. Полученные разведения вносили в лунки планшета для постановки образцов. В качестве контроля (К) использовали только питательную среду ДМЕМ. При помощи светового инвертированного микроскопа и камеры при увеличении микроскопа 40х фотографировали клеточный монослой в 6 точках вдоль каждой

«царапины», инкубировали планшет с культурой клеток в течение 24 ч при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>, через 24 ч снова фотографировали клеточный монослой в 6 точках вдоль каждой «царапины». С помощью программы TopView 3.7. на фотографиях измеряли ширину «раны» в каждой из 6 точек для каждой лунки через 0 часов инкубирования (сразу после нанесения «царапины») и 24 ч инкубирования. Рассчитывали среднее значение ширины просвета «царапины» в 0ч и 24 ч. Затем рассчитывали отношение средней ширины «царапины» через 24 часа инкубирования к среднему значению ширины «царапины» через 0 часов инкубирования, после чего рассчитывали для каждого образца «степень зарастания раны по отношению к «К». Результат выражали в % по отношению к контролю.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате описанного протокола выделения МСК из жировой ткани лошади была получена стабильная культура с характерным видом монослоя и морфологией клеток. Уже на 3-4 сутки после выделения в культуральных флаконах наблюдался рост клеток в виде отдельных колоний (Рис.1А), что является типичным признаком мезенхимальных стволовых клеток при культивировании. На нулевом – первом пассажах культура демонстрировала незначительную морфологическую неоднородность клеточного состава: присутствовали веретенообразные клетки с фибробластоподобной морфологией, мелкие округлые клетки, единичные колонии полигональных клеток и отдельные крупные плоские клетки. Ко второму пассажу посторонние клеточные типы элиминировались, и монослой был представлен преимущественно клетками фибробластоподобной морфологии, характерной для МСК (Рис.1Б).

Индекс пролиферации культуры МСК ЖТ лошади на четвертом пассаже равнялся 7,1 (ИП<sub>4п</sub> = 7,1), а время удвоения популяции составило 25,5 ч. На десятом – 6,78 (ИП<sub>10п</sub> = 6,78), время удвоения популяции 26 ч. Таким образом скорость про-

лиферации на четвертом-десятом пассажах была высокой и практически не изменялась. Аналогично, морфология культуры была в течение этого периода без изменений (Рис. 2). Полученные данные

говорят о хорошем физиологическом состоянии культуры без признаков старения в течение наблюдаемого периода с четвертого по десятый пассажи.

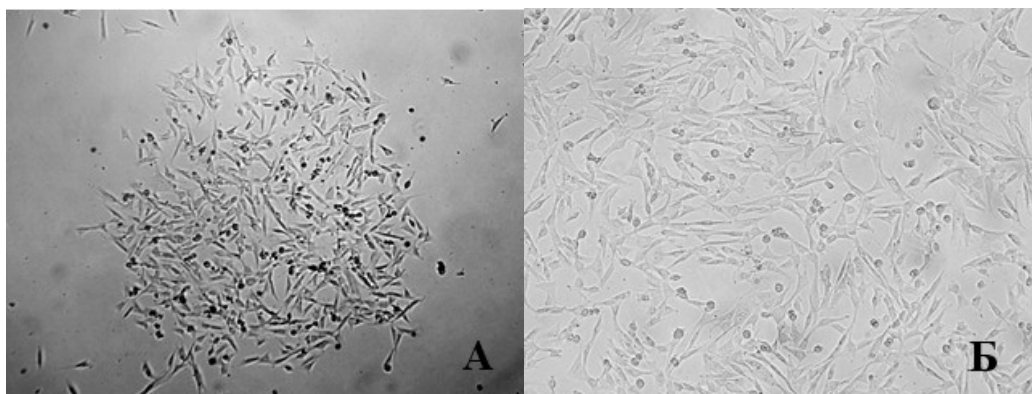


Рисунок 1 – Морфология культуры МСК ЖТ лошади: А – колония, образованная МСК на 3-и сутки после выделения, ув. x40; Б – монослой, формирующийся из МСК на втором пассаже культивирования (1-е сутки роста), ув. x100.

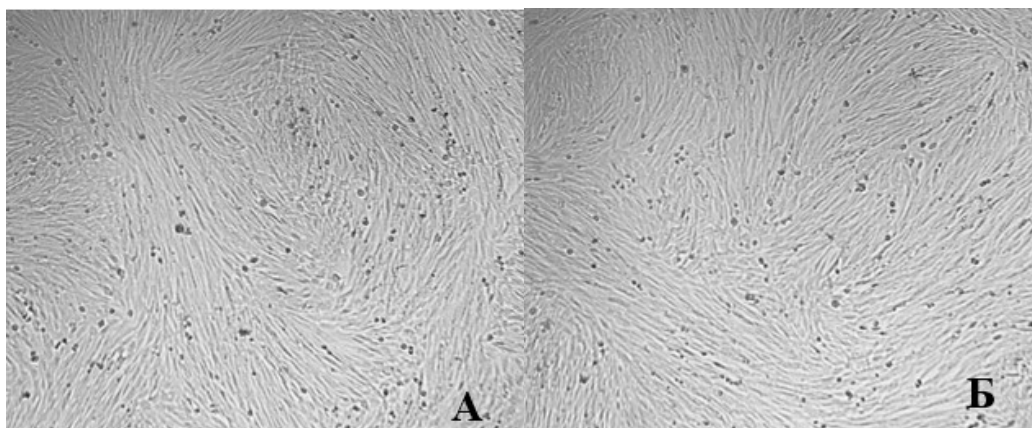


Рисунок 2 – Монослой культуры МСК ЖТ лошади на четвертом (А) и десятом (Б) пассажах на 4-е сутки роста, ув. x40.

При культивировании МСК ЖТ лошади в среде, содержащей индукторы, которые направляют дифференцировку в клетки жировой ткани, на 14 сутки выявляли формирование клеток с липидными везикулами, которые окрашивались Oil-Red O (Рис. 3А). Проведение направленной остеогенной дифференцировки по описанному выше протоколу к 21 суткам

также приводило к выпадению солей кальция и окрашиванию красителем Alizarin red S (Рис. 3Б). Реакция основана на образовании оранжево-красных хелатных комплексов с ионами кальция.

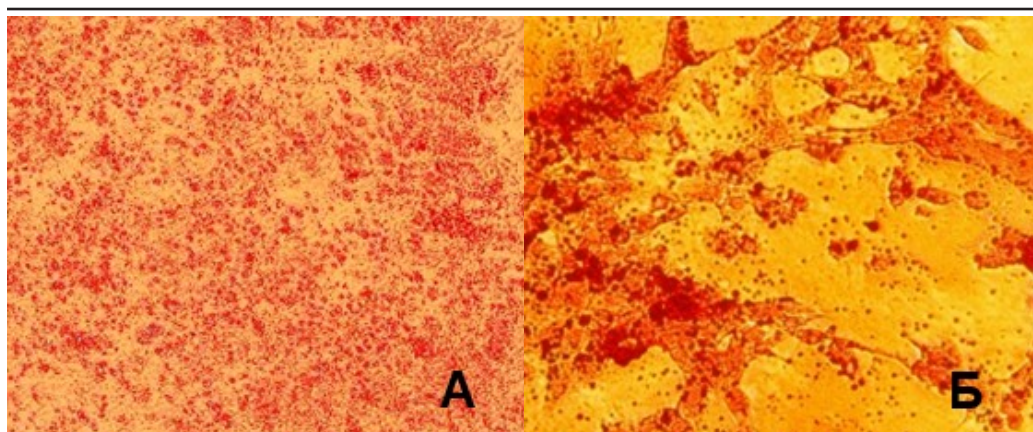


Рисунок 3 – Микрофотографии МСК ЖТ лошади после проведения дифференцировки в адипогенном (А) и остеогенном (Б) направлениях, окрашенных OilRed O и Alizarin red S соответственно, ув. x40.

Секретом МСК ЖТ лошади получали двумя разными способами на четвертом и десятом пассажах:

Вариант №1. Кондиционированная среда с добавлением экстракта клеток, очищенная фильтрованием, затем ультрафильтрованная через фильтр 50 кДа для удаления альбуминовой фракции сыворотки крови и стабилизированная добавлением глицина.

Вариант № 2. Кондиционированная среда без добавления экстракта клеток, очищенная фильтрованием, затем ультрафильтрованная через фильтр 50 кДа для удаления альбуминовой фракции сыво-

ротки крови и стабилизированная добавлением глицина.

Первичную оценку биологической активности полученных секретомов МСК ЖТ лошади проводили *in vitro* на модели «раны» («wound healing assay») как описано выше. Данная модель является широко применяемой методикой для оценки подвижности и скорости миграции клеток. При «заживлении» экспериментальной раны различные типы клеток реагируют сходным образом: клетки поляризуются, формируют протрузии в сторону «раны» и мигрируют (Рис. 4).

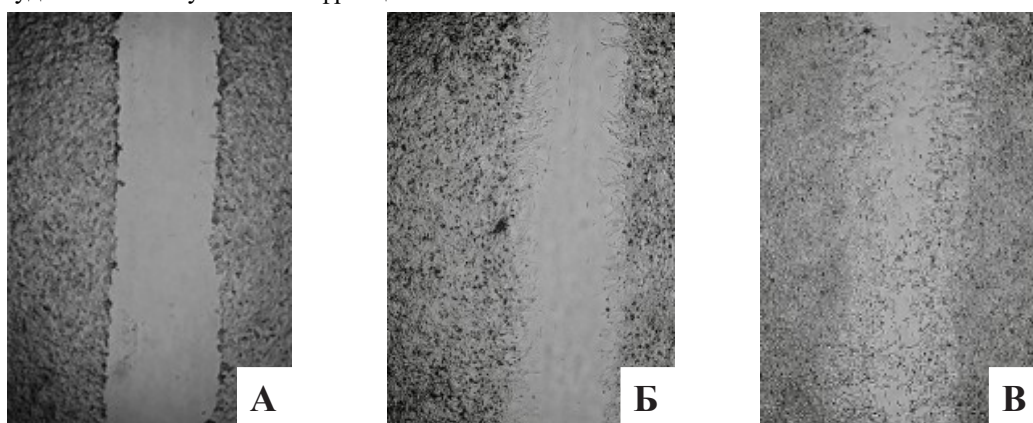


Рисунок 4 – Микрофотографии модели «раны» *in vitro* при проверке биологической активности секретомов МСК ЖТ лошади. А. – «рана» 0 ч, Б. – «рана» через 24 ч – Контроль-, В. – «рана» через 24 ч – секретом МСК, ув. x40.

**Таблица 1 – Сокращение просвета «раны» опытных вариантов по сравнению с контролем, выраженное в %**

Варианты	A, % (по отношению к контролю)
Четвертый пассаж, Вариант №1	41 ± 8
Четвертый пассаж, Вариант №2	44 ± 5
Десятый пассаж, Вариант №1	43 ± 7
Десятый пассаж, Вариант №2	39 ± 7
Четвертый пассаж, Вариант №1, хранение при +8°C, 2 месяца	19 ± 12*
Четвертый пассаж, Вариант №2, хранение при +8°C, 2 месяца	39 ± 6

Отличий в биологической активности обоих вариантов секретома (№1 и №2) сразу после получения как на четвертом пассаже, так и на десятом пассаже обнаружено не было (Таблица 1).

Были отобраны пробы каждого варианта на четвертом пассаже по 10 мл в стерильные пробирки (3п) и заложены на хранение при температуре +4 - +8 °С.

Через два месяца хранения варианты №1 (четвертый пассаж) и №2 (четвертый пассаж) снова были проверены на активность на модели «раны» *in vitro*. Было обнаружено падение активности в Варианте №1 после хранения. Биологическая активность Варианта №2 за два месяца не изменилась.

#### **ВЫВОДЫ / CONCLUSION**

Использованные в нашей работе методы культивирования МСК и сбора кондиционированной среды для получения секретома являются наиболее распространенными и обеспечивают получение комплекса регуляторных молекул, оказывающих выраженное стимулирующее воздействие на клетки-мишени. Однако, мы впервые провели сравнение биологической активности секретомов МСК лошади, содержащих экстракт МСК и без его добавления, для понимания целесообразности использования данного источника регуляторных веществ. Было показано, что добавление экстракта МСК к кондиционированной среде не оказывает влияния на миграцию и пролиферацию клеток на модели *in vitro*. Стимуляция данных процессов в обоих вариантах оказалась на

одном уровне. Следующим этапом мы установили, что в диапазоне с четвертого по десятый пассажи культуры МСК биологическая активность полученных секретомов не изменяется, оставаясь выше на ~40%, чем в контроле. Это говорит об отсутствии физиологического старения культуры МСК на этих сроках культивирования и возможности использования культур для получения биологически активных регуляторных веществ. Показано, что при хранении секретома МСК в жидком состоянии в температурном диапазоне от +4 до +8 °С на протяжении двух месяцев снижения биологической активности варианта №2, полученного на основе только кондиционированной среды МСК, не происходит. В отличие от варианта №1, содержащего также экстракт МСК, где наблюдается снижение биологической активности почти в два раза. Вероятно, это связано с активностью лизосомальных ферментов – протеаз и нуклеаз, высвобождающихся при разрушении клеток. Установленное снижение при хранении активности секретома, полученного с добавлением экстракта МСК, дало нам основание для выбора секретома – кандидата для проведения дальнейших испытаний на животных.

В современной ветеринарной практике лекарственные препараты на основе секреторных продуктов МСК нашли широкое применение в ортопедии и травматологии, способствуя сокращению сроков заживления и улучшению качества регенерации тканей, при этом предотвращая

образование рубцовой ткани. В настоящее время наблюдается расширение спектра показаний к применению секрета МСК, обусловленное его уникальными иммуномодулирующими и регенеративными свойствами, а также ведется разработка терапевтических протоколов для лечения различных заболеваний. В частности, наша исследовательская группа изучает влияние секрета МСК на кардио-респираторную систему лошадей с целью достижения устойчивой ремиссии заболеваний, восстановления их работоспособности, а также повышения толерантности к физическим нагрузкам у здоровых лошадей в процессе интенсивной подготовки.

#### COMPARE THE IN VITRO BIOLOGICAL ACTIVITY OF MESENCHYMAL STEM CELL SECRETIONS ISOLATED FROM HORSE ADIPOSE TISSUE

**Trifonova A. V.**<sup>1\*</sup> – PhD, Director of Science (ORCID 0009-0008-0181-2197); **Ali S.G.**<sup>1</sup> – PhD, Head of NPL of Cellular Technologies (ORCID 0000-0002-0528-671X); **Nechaev A.Y.**<sup>2,3</sup> – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of General, Private and Operative Surgery, intern (ORCID 0000-0001-9035-0036); **Lavrik A. A.**<sup>1</sup> – CEO of Stem Renovation LLC (orcid 0000-0002-7732-4420); **Minina A. O.**<sup>2</sup> – PhD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of General, Private and Operative Surgery (ORCID 0000-0002-4176-4053).

<sup>1</sup> Stem Renovation LLC;

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine

<sup>3</sup> Don State Technical University

\* trifonova@ns-rabies.ru

**Funding:** *The materials were prepared within the framework of the Russian Science Foundation 2025 "The use of mesenchymal stem cell secretion products to stimulate the physiological and reparative regeneration of the cardiorespiratory system in horses" (Agreement No. 25-16-00265 dated 05/29/2025).*

#### ABSTRACT

Today, regenerative medicine, traditionally reliant on stem cell therapy, is shifting toward a new type of biological regulation based on intercellular interactions via secreted substances known as the secretome. The use of mesenchymal stem cell (MSC) secretomes in regenerative therapy offers several advantages over living cells, including the ability to modify the secretome composition to achieve specific therapeutic goals. This study describes for the first time a procedure for obtaining equine mesenchymal stem cell secretomes using two distinct methods and conducts a comparative study of their biological activity in an in vitro wound model. Using ToupView 3.7 software, the wound width was measured in photographs at each of six points for each well after 0 hours of incubation (immediately after the scratch) and 24 hours of incubation. The average "scratch" width was calculated at 0:00 and 24:00. The ratio of the average "scratch" width after 24 hours of incubation to the average "scratch" width after 0:00 was then calculated. The wound closure rate relative to "K" was then calculated for each sample. The result was expressed as a percentage relative to the control. For the first time, the stability of the biological activity of the MSC secretome was assessed during storage at temperatures ranging from +4 to +8°C for two months. Based on the results of these studies, a promising candidate MSC secretome will be selected for further testing: first in laboratory animals to assess safety using various routes of administration, and then in horses to analyze its effects on cardiovascular and respiratory parameters in pathological conditions both at rest and after exercise.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей/ Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, К.А. Рубина, [и др.] // Acta Naturae. - 2011. - Т.3. - №4. - С. 32-39.
2. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine / Vizoso F.J., Eiro N., Cid S. [et al.]. // Int J Mol Sci. - 2017. - 18(9). -

P. 1852.

3. MacDonald, E.S. The Potential of Mesenchymal Stem Cells to Treat Systemic Inflammation in Horses / E.S. MacDonald, J. G. Barrett // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – V. 6. – P. 507.

4. Лаврик, А. А. Иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток: актуальные исследования / А. А. Лаврик, А. В. Трифонова, П. И. Токарь // *Наука и инновации - современные концепции: сборник научных статей по итогам работы Международного научного форума, Москва, 21 сентября 2023 года*. – Москва: Инфинити, 2023. – С. 83-88.

5. Регенеративная медицина для лечения лошадей с респираторными заболеваниями / А. В. Травкина, С. Ю. Концевая, А. А. Лаврик, С. Г. Али // *Инновационные решения актуальных проблем в области ветеринарии : материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции, Курск, 25–26 февраля 2021 года*. – Курск: Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И.И. Иванова, 2021. – С. 259-263.

6. Патент № 2662172 С2 Российская Федерация, МПК А61К 35/28. Способ получения регенеративного ветеринарного препарата на основе экстракта мезенхимальных стволовых клеток и кондиционной среды : № 2016148715 : заявл. 13.12.2016 : опубл. 24.07.2018 / А. А. Лаврик, Н. Э. Искендерова, С. Г. Али.

7. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods / J.C.Yarrow, Z.E.Perlman, N.J. Westwood, T.J. Mitchison // *BMC Biotechnol.* - 2004. - V 9. - № 4. – P 21.

#### REFERENCES

1. Mesenchymal stem cells in the processes of tissue growth and repair/ N.I. Kalinina, V.Y. Sysoeva, K.A. Rubina, [et al.] // *Acta*

*Naturae*. - 2011. - Vol.3. - No. 4. - pp. 32-39.

2. Mesenchymal stem cell secretome: towards cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine / Vizoso F.J., Eiro N., Cid S. [et al.]. // *Int J Mol Sci*. - 2017. - 18 (9). - P. 1852.

3. MacDonald, E.S. The Potential of Mesenchymal Stem Cells to Treat Systemic Inflammation in Horses / E.S. MacDonald, J. G. Barrett // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – V. 6. – P. 507.

4. Lavrik, A. A. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: current research / A. A. Lavrik, A.V. Trifonova, P. I. Tokar // *Science and innovation - modern concepts: a collection of scientific articles based on the results of the International Scientific Forum, Moscow, September 21, 2023*. Moscow: Infiniti Publ., 2023, pp. 83-88.

5. Regenerative medicine for the treatment of horses with respiratory diseases / A.V. Travkina, S. Y. Kontseva, A. A. Lavrik, S. G. Ali // *Innovative solutions to current problems in the field of veterinary medicine: proceedings of the All-Russian (national) scientific and practical Conference, Kursk, February 25-26, 2021*. Kursk: Kursk State Agricultural Academy named after I.I. Ivanov, 2021, pp. 259-263.

6. Patent No. 2662172 C2 Russian Federation, IPC A61K 35/28. Method for obtaining a regenerative veterinary drug based on an extract of mesenchymal stem cells and a conditioned medium: No. 2016148715 : application 13.12.2016 : published 24.07.2018 / A. A. Lavrik, N. E. Iskenдерова, S. G. Ali.

7. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods / J.C.Yarrow, Z.E.Perlman, N.J. Westwood, T.J. Mitchison // *BMC Biotechnol.* - 2004. - V 9. - № 4. – P 21.