



Современные аспекты наружного применения и перспективы использования секретома мезенхимальных стволовых клеток (обзор)

Е. О. Бахрушина¹, И. В. Гравель¹, О. С. Филиппова¹, В. Н. Тычинин²,
А. А. Попова¹✉, О. Б. Добровольский¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России). 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

✉ Контактное лицо: Попова Анна Александровна. E-mail: popova_a_a_1@staff.sechenov.ru

ORCID: Е. О. Бахрушина – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; И. В. Гравель – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>;

О. С. Филиппова – <https://orcid.org/0009-0007-7660-2090>; В. Н. Тычинин – <https://orcid.org/0009-0001-5464-9337>;

А. А. Попова – <https://orcid.org/0000-0002-3874-8626>; О. Б. Добровольский – <https://orcid.org/0009-0004-3852-0842>.

Статья поступила: 23.01.2024

Статья принята в печать: 19.03.2024

Статья опубликована: 22.03.2024

Резюме

Введение. Секретом мезенхимальных стволовых клеток (СМСК) находят широкое применение в практической медицине. Он используется за счет своих иммуномодулирующих и регенеративных свойств в лечении аутоиммунных, иммуноопосредованных, а также некоторых других заболеваний благодаря противовоспалительному, нейтропротективному и регенерирующему действию. В последние годы возрос интерес к разработке средств для наружного применения, содержащих СМСК. Подобные препараты планируется применять в лечении диабетических ран, для регенерации кожи, лечения воспалительных заболеваний, а также алопеции. Имеются множественные исследования, подтверждающие значительный потенциал для применения СМСК в дерматологии и косметологии. Целью данного обзора являлось изучение потенциала использования кондиционной среды в составе лекарственных средств для наружного применения, подходов к стандартизации СМСК как фармацевтической субстанции и методов увеличения ее чрескожной доставки.

Текст. СМСК как активный фармацевтический ингредиент представляет собой прозрачную жидкость от желтого до оранжевого цвета с характерным запахом. pH готового к введению в композиции СМСК составляет от 7,0 до 7,5, что позволяет использовать его в средствах для местного и наружного применения без добавления стабилизаторов или корректоров pH. Проблемы доставки СМСК через эпидермис чаще всего решают помещением секретома в гидрогели, использованием экзосом или технологии с использованием микроигл. С 2022 года после внесения изменений на законодательном уровне были приняты меры по регистрации и внедрению в клиническую практику отечественных препаратов на основе клеточных продуктов. Однако, как показал анализ, до появления оригинальных лекарственных средств на основе СМСК пройдет еще некоторое время. На сегодняшний день в Российской Федерации производятся продукты, относящиеся к косметическим средствам и ветеринарным препаратам, а также зоокосметическим средствам.

Заключение. СМСК может быть использован в качестве субстанции для потенциального лечения широкого спектра острых и хронических заболеваний. Но несмотря на большое количество положительных результатов применения СМСК в заживлении ран у животных, а также клинических исследований по изучению влияния на регенерацию кожи, отсутствуют исследования его безопасности, эффективности и стандартизации процесса производства фармацевтической субстанции.

Ключевые слова: секретом мезенхимальных стволовых клеток, кондиционная среда, факторы роста, экзосомы, наружное применение, атопический дерматит, космецевтика

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина, И. В. Гравель придумали и разработали дизайн обзора. Е. О. Бахрушина, И. В. Гравель и О. С. Филиппова провели научный поиск. В обработке данных участвовали Е. О. Бахрушина, А. А. Попова и О. С. Филиппова. В написании статьи принимали участие А. А. Попова и О. С. Филиппова. В рецензировании и одобрении статьи участвовали В. Н. Тычинин и О. Б. Добровольский. Все соавторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Гравель И. В., Филиппова О. С., Тычинин В. Н., Попова А. А., Добровольский О. Б. Современные аспекты наружного применения и перспективы использования секретома мезенхимальных стволовых клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):34–47. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1727>

Modern aspects of external application and prospects of using the secretome of mesenchymal stem cells (review)

Elena O. Bakhrushina¹, Irina V. Gravel¹, Olga S. Filippova¹, Valery N. Tychinin²,
Anna A. Popova¹✉, Oleg B. Dobrovolsky¹

¹ I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

² N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov RNRMU). 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

✉ Corresponding author: Anna A. Popova. E-mail: popova_a_a_1@staff.sechenov.ru

© Бахрушина Е. О., Гравель И. В., Филиппова О. С., Тычинин В. Н., Попова А. А., Добровольский О. Б., 2024

© Bakhrushina E. O., Gravel I. V., Filippova O. S., Tychinin V. N., Popova A. A., Dobrovolsky O. B., 2024

ORCID: Elena O. Bakhrushina – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Irina V. Gravel – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>;
Olga S. Filippova – <https://orcid.org/0009-0007-7660-2090>; Valery N. Tychinin – <https://orcid.org/0009-0001-5464-9337>;
Anna A. Popova – <https://orcid.org/0000-0002-3874-8626>; Oleg B. Dobrovolsky – <https://orcid.org/0009-0004-3852-0842>.

Received: 23.01.2024 Accepted: 19.03.2024 Published: 22.03.2024

Abstract

Introduction. The secretome of mesenchymal stem cells (SMSC) is widely used in medicine. It is most often used due to its immune-modulating and regenerative properties in the treatment of autoimmune, immuno-mediated and other diseases due to its anti-inflammatory, neuroprotective and regenerating action. In many studies, exosomes isolated from SMSC are used as a therapeutic agent. In recent years, the interest in the development of products containing SMSC for external use has increased. Similar drugs are planned to be used in the treatment of diabetic wounds, for skin regeneration, the treatment of inflammatory diseases, as well as alopecia. There are multiple studies on increasing collagen secretion and reducing skin photosensitivity in preclinical studies, which confirms the significant potential for the use of SMSC in dermatology and cosmetology. The purpose of this review was to study the potential of using conditioned medium in medicines for external use, approaches to standardization of SMSC as a pharmaceutical substance and methods of increasing percutaneous delivery.

Text. SMSC as an active pharmaceutical ingredient is a transparent liquid from yellow to orange in color with a characteristic odor. The pH of the ready-to-use SMSC composition ranges from 7.0 to 7.5, which allows it to be used in topical and external applications without the addition of stabilizers or pH correctors. Problems of delivery of SMSC through the epidermis are most often solved by placing the secretome in hydrogels, using exosomes or technology using microneedles. Since 2022, after legislative changes, measures have been taken to register and introduce into clinical practice domestic drugs based on cellular products. However, as the analysis showed, it will take some time before the appearance of original medicines based on SMSC, and today in the Russian Federation only products related to cosmetics and veterinary drugs, as well as zoocosmetics, are produced so far.

Conclusion. SMSC may also prove to be a safer and more effective substance for the potential treatment of a wide range of acute and chronic diseases. But despite the large number of positive results of using SMSC for wound healing in animals, as well as clinical studies on skin regeneration, there are no studies of its safety and effectiveness, as well as standardization of the production process.

Keywords: secretome of mesenchymal stem cells, conditioned medium, exosomes, external use, atopic dermatitis, regeneration, cosmeceutics

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina, Irina V. Gravel conceived and developed the design of the review. Elena O. Bakhrushina, Irina V. Gravel and Olga S. Filippova conducted scientific searches. Elena O. Bakhrushina, Anna A. Popova and Olga S. Filippova participated in data processing. Anna A. Popova and Olga S. Filippova participated in writing of the article. Valery N. Tychinin and Oleg B. Dobrovolsky participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Gravel I. V., Filippova O. S., Tychinin V. N., Popova A. A., Dobrovolsky O. B. Modern aspects of external application and prospects of using the secretome of mesenchymal stem cells. *Drug development & registration*. 2024;13(2):34–47. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1727>

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что секретом (кондиционная среда) мезенхимальных стволовых клеток (МССК) представляет собой смесь белковой растворимой фракции (факторов роста (ФР), цитокинов и везикулярной фракции), которая участвует в переносе белков и генетического материала [1]. Мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК) в условиях гипоксии увеличивают выработку факторов роста и противовоспалительных медиаторов [2]. Выработка этих факторов стволовыми клетками позволяет восстанавливать поврежденные ткани и клетки без самой стволовой клетки.

Секретом отдельно от МСК может быть использован для аллогенной трансплантации белков. G. K. Patel et al. показали, что секреторные белки в секретах участвуют в межклеточных связях и оказывают существенное влияние на регуляцию биологических эффектов [3]. Они моделируют поведение клеток (пролиферацию, дифференцировку, выработку

внеклеточного матрикса), обеспечивая противовоспалительный эффект. МСК также секретируют небольшие мембраносвязанные внеклеточные везикулы (экзосомы), которые содержат ряд биомолекул, включая ФР и цитокины, и разные формы РНК [1, 3].

Значительные преимущества применения МСК в качестве активного ингредиента в сравнении с традиционным использованием стволовых клеток в терапии обусловлено соединениями секрета, которые имеют более низкую экспрессию белков клеточной поверхности [4].

МССК удобен для использования в терапии и введения в состав лекарственных препаратов. Субстанция МСК может быть стандартизирована, а процесс ее получения – масштабирован. В отличие от стволовых клеток, для которых требуется использование криопротекторов, МСК не нуждается в специальных условиях хранения. Клиническое применение МСК более экономично и практично, так как позволяет избежать инвазивных процедур сбора клеток. В

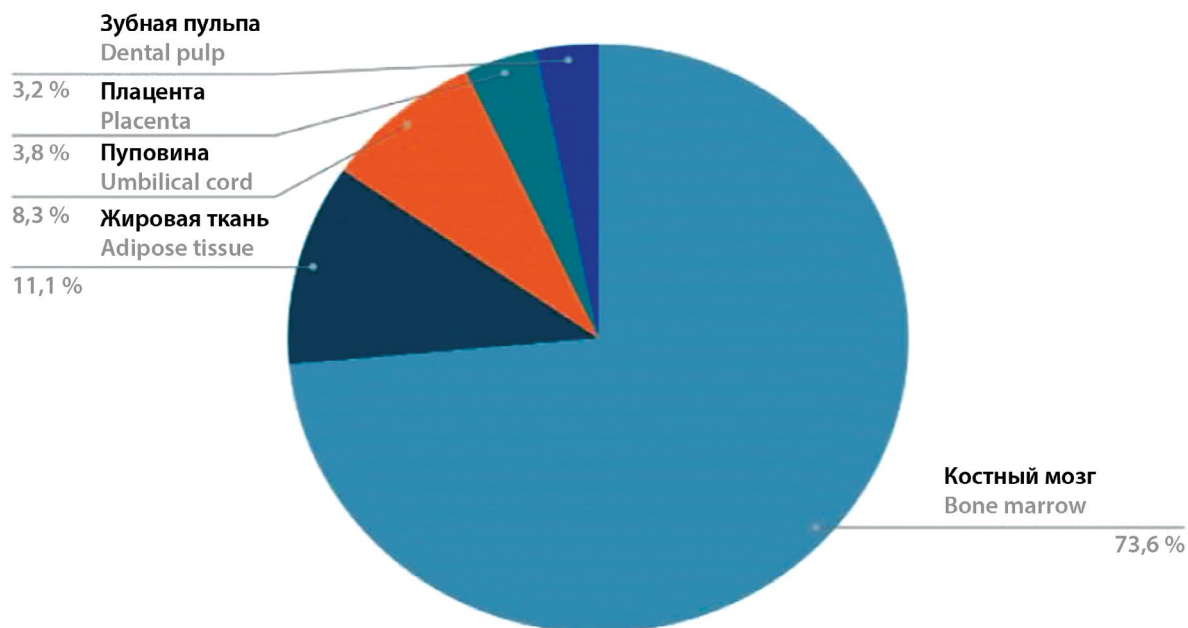


Рисунок 1. Источники секретомы мезенхимальных стволовых клеток для применения в медицине (по данным публикаций PubMed)

Figure 1. Mesenchymal stem cells secretome sources for use in medicine (according to analysis of the PubMed database of scientific publications)

рамках дизайна терапии СМСК может быть модифицирован для достижения желаемых клеточно-специфических эффектов [1, 5].

Цель настоящего исследования: изучение возможного использования кондиционной среды в составе лекарственных средств для наружного применения, а также подходов к стандартизации СМСК в качестве фармацевтической субстанции и методов увеличения его чрескожной доставки.

СМСК активно изучается в последние 10 лет. За эти годы было опубликовано 559 научных работ в базе данных Pubmed (ключевые слова: «conditioned medium», «secretome stem cells»), при этом 378 публикаций – за последние 5 лет. Становится очевидным, что выделение и изучение СМСК для медицинского применения в настоящее время динамично развивается. Проводится около 40 клинических исследований, в которых кондиционная среда используется для лечения COVID-19, остеоартрита, ишемического инсульта (поиск по ключевым словам: «conditioned medium» и «secretome stem cells»¹).

Особый интерес представляет наружное применение СМСК как одно из самых молодых и динамично развивающихся медицинских направлений применения стволовых клеток. Первая публикация на Pubmed приходится на 1993 год, а начиная с 2020 года исследовательская активность растет на 6–15 % еже-

годно. На сегодняшний день опубликовано 129 работ, что составляет 20 % от общего числа публикаций по теме (по данным Pubmed).

Получение СМСК

Мезенхимальные стволовые клетки впервые были идентифицированы и выделены из костного мозга А. Фриденштейном в 1968 году. Это были мультипотентные стволовые клетки взрослых мышей и человека, которые способны к пролиферации, саморегенерации и дифференцировке во множественные клеточные линии [6]. В настоящее время чаще всего используются МСК костного мозга, на втором месте – жировой ткани, далее – пуповины, плаценты и зубной пульпы [7] (рисунок 1). Возможно выделение стволовых клеток из кожи, легких, синовиальной мембраны, слизистой оболочки носа, грудного молока, ткани кожи головы и роговицы, мышц, надкостницы, эндометрия и менструальной крови, шейки матки.

Мониторинг комитета по мезенхимальным и тканевым стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии в 2006 году установил минимальные характеристики для человеческих МСК [6]:

- ✓ адгезивность к пластику в стандартных условиях культивирования;
- ✓ экспрессия CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, поверхностные молекулы CD14 или CD11b, CD79a или CD19 и HLA-DR;
- ✓ способность дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*.

¹ ClinicalTrials.gov. Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed: 23.01.2024.

К недостаткам использования МСК можно отнести необходимость значительных количеств этих клеток и продолжительность их производства *in vitro* (около 10 недель перед имплантацией).

Выращивание МСК *in vitro* обычно проводится в культуральных колбах, где клетки растут прикрепленными к пластиковой поверхности за счет адсорбции молекул внеклеточного матрикса. При этом образуется плоский двумерный монослой (*двумерная культура*). Другая конформация (*трехмерная культура*) в большей степени воспроизводит условия физиологической среды, где преобладают межклеточные соединения, образование комплексов «клетка – матрикс» и существование молекулярных градиентов к центру агрегата [9]. Для культивирования МСК в качестве питательной среды используют эмбриональную бычью сыворотку как стандарт либо лизат тромбоцитов человека.

Известны два способа получения многоклеточных агрегатов: формирование на подложке, которое включает методы иммобилизации с использованием микроносителей, гидрогелей и систем инкапсуляции для образования и стабилизации мультиагрегатов [10]; образование клеточных мультиагрегатов без подложки, которое основано на способности МСК к самопроизвольному группированию и выработке многоклеточных агрегатов в определенных условиях культивирования без необходимости внешней поддержки [11–13].

Увеличение выработки секреции кондиционной среды можно обеспечить с помощью биофизических сигналов (трехмерные культуры, механическое напряжение, электрическая пульсация), биохимических сигналов (гипоксия, цитокины, ФР) и клеточно-го перепрограммирования (сверхэкспрессия бел-

ка или микроРНК) [14–16]. Растворимые компоненты секретома отделяют от фракции микровезикул центрифугированием, ультрафильтрацией, полимерным осаждением, ионообменной и эксклюзионной хроматографией [17, 18].

В 2022 году было проведено пилотное исследование, предлагающее протокол GMP для преобразования СМСК в активный фармацевтический ингредиент (АФИ) путем комплексного сочетания методов ультрафильтрации и сублимационной сушки [17, 18]. Ключевым аспектом в получении стандартизированных продуктов для клинического применения являются валидация процессов выделения, биообработки и очистки секретома из супернатантов культуры мезенхимальных стволовых клеток.

Стандартизация СМСК как АФИ

МСК и СМСК состоят из плейотропных биологически активных ингредиентов, что является серьезной проблемой для производства воспроизводимых лекарственных препаратов со стабильно высокой эффективностью и безопасностью, в отличие от отдельных АФИ. На состав кондиционной среды влияет гетерогенность донорских МСК. Фенотип и биологическая активность МСК, в свою очередь, зависят от их происхождения (биологической ниши) или состояния потенциальных доноров (возраст, заболевания, ожирение или неизвестные факторы) [19].

При рассмотрении СМСК в качестве АФИ на различных этапах его жизненного цикла необходимо определять показатели качества, как максимально полно характеризующие выделяемые секретомы, так и подходящие для рутинного контроля в процессе производства, стандартизации конечного продукта (таблица 1).

Таблица 1. Параметры стандартизации СМСК

Table 1. MSC-CM standardization parameters

Группа признаков Assessment Category	Испытания Assessment Items	Метод определения Method	Ссылка Reference
Физико-химические свойства Physicochemical Properties	Внешний вид (цветность, прозрачность) Physical appearance (color, transparency)	Визуально Physical appearance examination	
	pH	Потенциометрически Potentiometer	
	Видимые механические частицы Presence of visible mechanic particles	Визуально, машинное зрение Physical appearance examination	
Подлинность Identity	30 факторов роста, цитокины и хемокины 30 growthfactors cytokines and chemokines	ИФА, ВЭЖХ, рамановская спектроскопия, проточная цитометрия, вестерн-блоттинг ELISA, HPLC, Raman spectroscopy, flow cytometry, Western blot	20–22
Морфология Morphology	Наличие типичного бислоя Appearance of typical bilayer	Трансмиссионная электронная микроскопия Transmission electron microscopy	23, 24
Примеси Impurities	Количественное содержание примесей Quantitative content of impurities	ВЭЖХ HPLC	20, 25
Стерильность Sterility	Стерильность, бактериальный эндотоксин, посторонние микроорганизмы Sterility, Endotoxin, Bacteria	Мембранная фильтрация, прямой посев Membrane filtration, direct inoculation	26

СМСК как активный фармацевтический ингредиент представляет собой прозрачную жидкость от желтого до оранжевого цвета с характерным запахом. рН готового к введению в композиции СМСК составляет от 7,0 до 7,5, что позволяет использовать его в средствах для местного и наружного применения без добавления стабилизаторов или корректоров рН.

Условия хранения и восстановления выделенных СМСК могут влиять на такие характеристики, как стабильность, количество частиц, агрегация и фармакологический эффект.

Стабильность биологических препаратов снижается со временем при хранении. Необходимо определять физико-химические и биологические свойства каждого СМСК при хранении в течение различного времени (например, 1, 3, 6 месяцев) в условиях ускоренного старения и стресс-тестах (температуры, относительной влажности, рН), чтобы понять закономерности разложения и определить пределы стабильности. СМСК чувствительны к изменениям рН: присутствие в растворах электролитов может вызвать агрегацию экзосомных везикул и потерю функции [18]. Для хранения СМСК рекомендуется использовать изотонические буферы, чтобы предотвратить изменение рН во время хранения, замораживания и оттаивания.

СМСК рекомендуется хранить в условиях глубокой заморозки – при температуре до -80°C . Некоторые авторы [27] описывают условия хранения при -20°C и при $+4^{\circ}\text{C}$, что, по их данным, не влияло на активность СМСК. Ингибиторы протеазы были добавлены к секретомам лишь в нескольких исследованиях [24, 28].

Питательные среды для культивирования клеток могут оказывать влияние на способность МСК к адгезии и росту и быть положительно селективными по отношению к специфическим субпопуляциям МСК [29, 30].

Г. Сагарадзе и соавт. заметили, что концентрация факторов различается между СМСК с двумя разными питательными средами [31]. В отличие от них J. Czarla и соавт. обнаружили, что МСК, которые культивировались в трех различных средах, наоборот, демонстрируют сходные профили секреции [32]. Наиболее распространенной альтернативой фетальной бычьей сыворотке для культивирования является человеческая сыворотка и ее производные (например, лизат тромбоцитов человека) [33, 34], однако их влияние на иммуномодулирующую способность МСК и его воспроизводимость по-прежнему остаются спорными [35]. Все эти вопросы затрудняют валидацию процессов, соответствующих требованиям GMP, для получения продуктов на основе секрета МСК.

Наиболее приемлемыми являются бессывороточные или химически определенные среды, которые не содержат ни сывороток, ни каких-либо гидролизатов и добавок неизвестного состава [34]. Интересно, что бессывороточные культуры МСК выделяют больше ангиогенных факторов [36, 37]. Кроме того, в исследовании [38] СМСК, полученные на сывороточных средах, были токсичны для клеток при использовании в неразбавленном виде (100 % концентрация) [38].

Характеристика секрета необходима для обеспечения воспроизводимости метода производства и выполнения нормативных требований, связанных с качеством, безопасностью и эффективностью. Основным методом, используемым для изучения экспрессии секрета МСК *in vitro*, является разделение с последующей идентификацией белка с помощью масс-спектрометрии, а также других иммунологических анализов [39]. Определение характеристик СМСК с использованием методов, основанных на антителах, предоставляет к изучению лишь узкий спектр факторов, секретируемых МСК [40]. Глобальные протеомные подходы позволили бы лучше понять потенциальную сложность СМСК с финальной целью получения четкого и определенного профиля для надлежащего использования каждой МСК [40].

Все эти методы могут быть применимы в стандартизации производства СМСК и его производных, несмотря на различия в источнике МСК, донорах, росте клеток, количестве пассажей клеток, периоде кондиционирования, среде культивирования клеток, условиях микроокружения и очистке продуктов, полученных из секретомных клеток (рисунок 2).

Проблемы усиления проницаемости кожного покрова при трансдермальной доставке СМСК

Эффективный транспорт активных молекул через неповрежденную кожу до сих пор является сложной задачей для исследователей. Защитные функции кожного покрова не позволяют достигать желаемой биодоступности при наружном применении, что ограничивает исследователей в использовании этого удобного и простого способа введения.

Классическим технологическим подходом к усилению проницаемости является использование активаторов всасывания (пенетраторов, энхансеров) в составе трансдермальных препаратов [41]. Эти вспомогательные вещества зачастую действуют по механизму растворения кожных липидов, увеличения гидратации и гидрофильности рогового слоя, что позволяет растворенным АФИ проникать в более глубокие слои кожи. К эффективным активаторам всасывания относятся спирты, амиды, амины, эфирные масла и др.

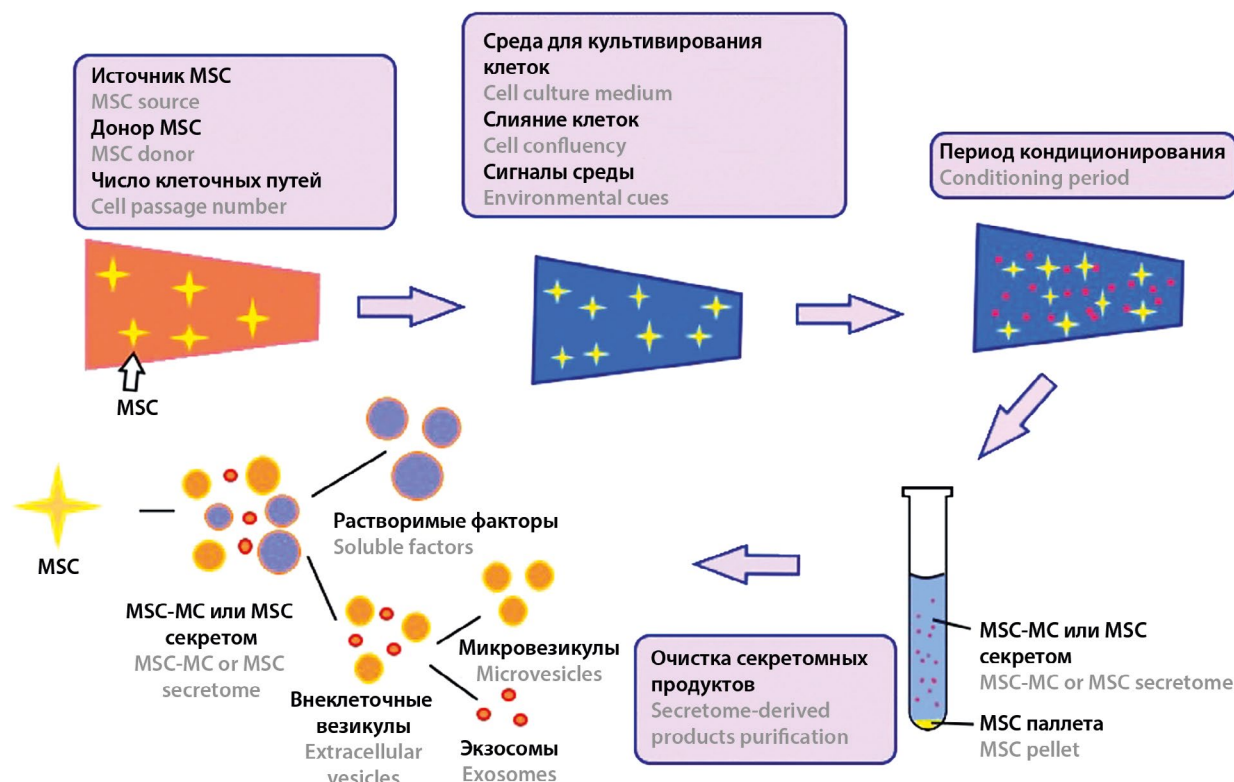


Рисунок 2. Схема процедуры получения секретомы мезенхимальных стволовых клеток (MSC-CM)

Figure 2. Schematic representation of the procedure for obtaining the secretome from mesenchymal stem cells (MSC-CM)

Многочисленными исследованиями продемонстрировано отсутствие значимых различий в глубине пенетрации АФИ через кожу после механического на нее воздействия – с помощью роллеров или массажа [42].

Решением проблемы подкожного транспорта является использование технологии микроигл [43]. В исследовании 2023 года для заживления диабетических ран использовали микроиглы, состоящие из экзосом МСК, инкапсулированных в наколеники микроигл с гидрогелевым поливиниловым спиртом [44]. Еще одно современное направление в трансдермальной доставке – это развивающаяся технология биоразлагаемых микроигл. Подобные системы трансдермальной доставки, разработанные на основе природных полимеров, таких как альгинаты, хитозан, хондроитин сульфат, ксантановая камедь, коллаген и гиалуроновая кислота, помогают достигать контролируемого высвобождения и повышенной биодоступности при трансдермальном применении [45].

Местное применение секретомы требует носителя, такого как разлагаемые частицы, или может быть выполнено с использованием гидрогеля. Гидрогели представляют собой коллоидные структуры, которые имеют сходство с внеклеточными матрицами и

полностью биосовместимы. Они являются отличными носителями для применения СМСК в регенеративной медицине [40].

Липосомы, экзосомы и прочие микро- и наносистемы доставки, характеризующиеся, как и биологические мембраны, двойным фосфолипидным слоем, обеспечивающим их сродство к тканям и улучшенные характеристики доставки АФИ, тем не менее при наружном нанесении не проникают глубже рогового слоя (рисунок 3).

В исследовании группы ученых из Сингапура [46] экзосомы СМСК были помечены флуоресцентным красителем и местно нанесены на поверхность неповрежденной кожи человека в эксплантных культурах в формах водного раствора и крема типа «масло в воде». В течение 2 ч флуоресценция локализовалась в основном в роговом слое и не касалась зернистого слоя эпидермиса. При криосекциях флуоресценция снова была в значительной степени ограничена роговым слоем и была максимальной через 12 ч, в зернистом слое флуоресценция не наблюдалась через 12 и 24 ч.

Таким образом, экзосомы, как и липосомы, не могут быть рассмотрены в качестве единственного эффективного чрескожного транспорта для СМСК, из чего следует перспектива использования их комбинаций с другими методами пенетрации.

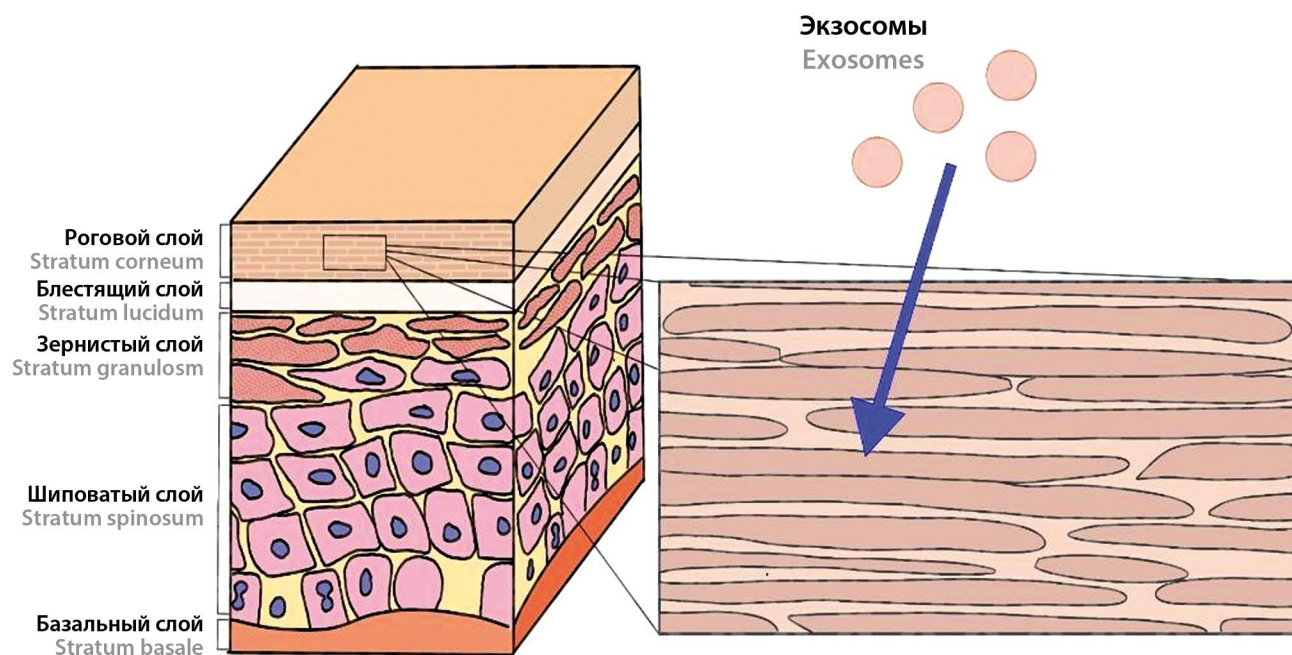


Рисунок 3. Проникновение экзосом в роговой слой кожи

Figure 3. Penetration of exosomes into the stratum corneum of the skin

Перспективы применения СМСК в регенеративной медицине

Наиболее изученным на сегодняшний день способом применения СМСК в медицине является наружное применение для лечения дерматологических проблем и применения в регенеративной медицине.

СМСК выделяет различные типы ФР, которые стимулируют регенерацию кожи человека (рисунок 4), а также способствует синтезу проколлагена и коллагена, что подтверждалось с помощью ПЦР [47–49].

Стволовые клетки и их секретомы уже несколько десятилетий изучают в качестве перспективного инструмента для регенеративной медицины. Показан их потенциал как ранозаживляющих агентов. Во многих исследованиях на обычных и диабетических ранах, а также ранах от ожогов СМСК показал лучшие результаты с точки зрения закрытия раны, реэпителизации и формирования сосудов [50–54].

В клиническом исследовании (2018 г.) для лечения хронических подошвенных язв при лепре был использован СМСК из амниотической мембраны человека в комбинации с витамином Е, что стало наиболее эффективным средством лечения [55].

СМСК имеет перспективы в лечении и предотвращении появления келоидных и гипертрофических рубцов [56]. Большинство исследований касалось использования мышей в качестве биологической модели, известно также исследование на кроликах: подопытным животным секретом вводился

подкожно, внутривенно или внутриочагово [57]. Во всех проведенных экспериментах было показано, что кондиционная среда имела лучшие результаты по сравнению с другими видами лечения с точки зрения объемов рубцовой ткани, отложения коллагеновых волокон и фиброза кожи [56, 57]. Также проводились клинические исследования эффективности комплексной терапии СМСК в комбинации с лазерной терапией на рубцах от угревой сыпи, в результате чего были показаны преимущества использования СМСК [58].

В ряде публикаций [59, 60] исследовалось влияние на ишемические раны на биологической модели мышей. После терапии СМСК было отмечено улучшенное восстановление кожного покрова, уменьшение площади некроза, увеличение роста волос и стимуляция ангиогенеза по сравнению с контрольным исследованием.

Изучены экзосомы, полученные из МСК жировой ткани человека, которые были выделены ультрацентрифугированием. Для инкапсуляции использовали инъекционный, биосовместимый и термочувствительный гидрогель Pluronic F-127, полученный комплекс местно наносили на рану мышинной модели. В разные дни после трансплантации мышей умерщвляли, а кожную ткань иссекали для гистологического и иммуногистохимического анализа. В результате было показано, что комплексы улучшают заживление кожных ран, способствуют реэпителизации, способствуют синтезу коллагена, повышают экспрессию белков кожного барьера и уменьшают воспаление [61].

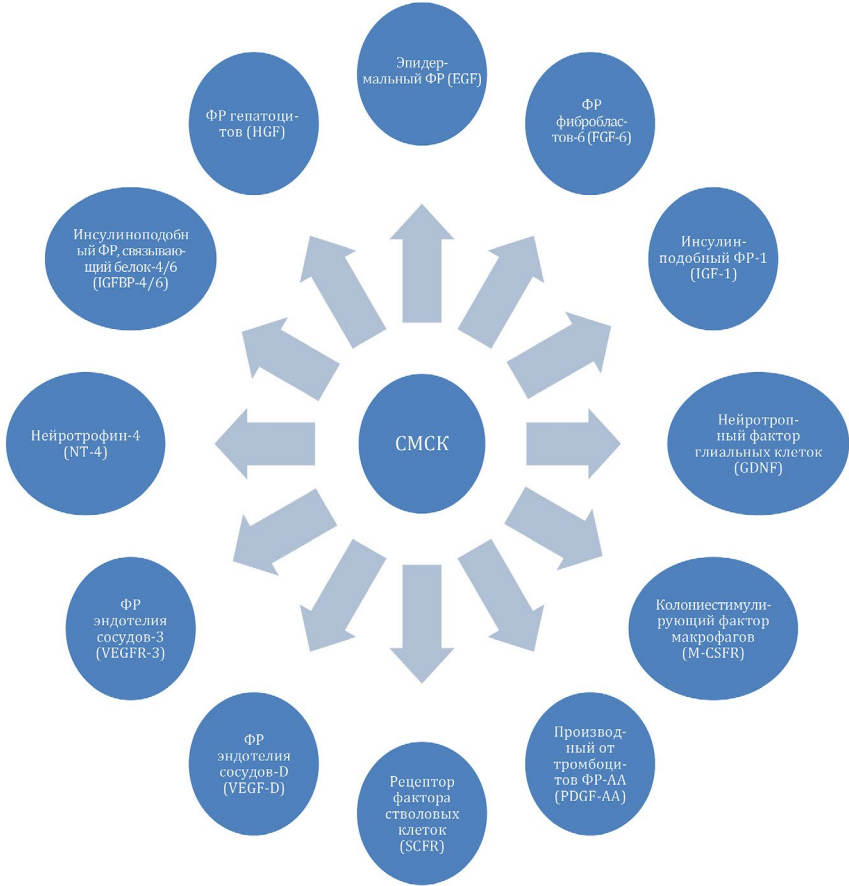


Рисунок 4. Влияние секрета мезенхимальных стволовых клеток на процессы регенерации кожи человека

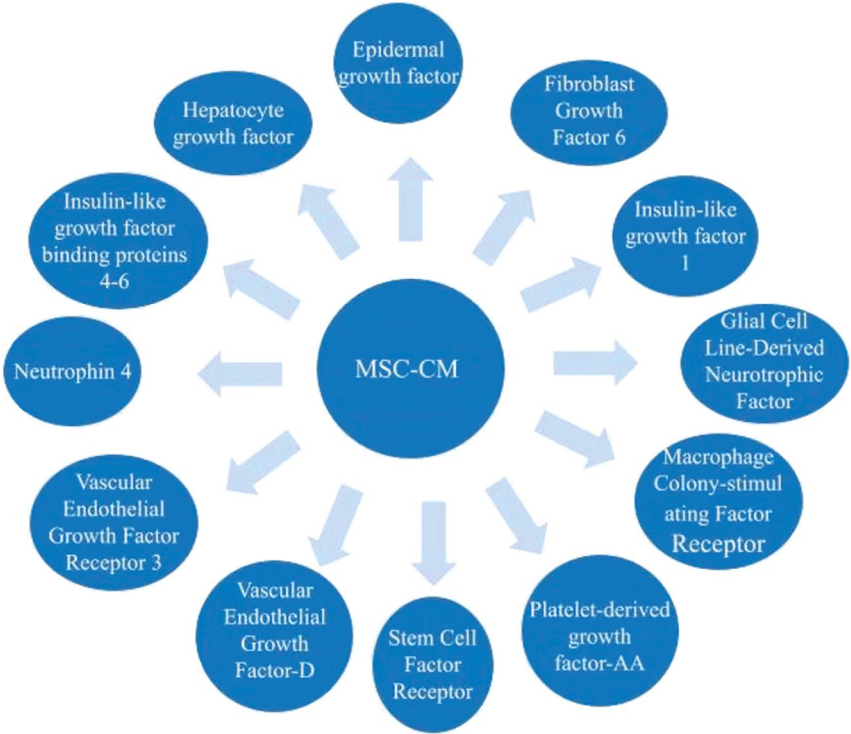


Figure 4. The effect of mesenchymal stem cells secretome on human skin regeneration process

Группа ученых из университета Гуанджоу (Китай) проводила похожее исследование: они местно наносили экзосомы, полученные из МСК пуповины человека, инкапсулированные в термочувствительный гидрогель Pluronic F-127, на кожную рану на модели крыс с диабетом, индуцированным стрептоптоцином [62]. По сравнению с экзосомами МСК, плацебо-гидрогелем или контрольным лечением комбинация Pluronic F-127 и экзосом МСК приводила к значительному ускорению заживления ран, повышению экспрессии, усиленной регенерации грануляционной ткани и усилению регуляции экспрессии фактора роста эндотелия сосудов и трансформирующего фактора роста бета-1 [62].

Обнаружено, что МСК, полученные из жировой ткани крысы, секретируют ангиогенные факторы (фактор роста эндотелия сосудов), фактор роста гепатоцитов и основной фактор роста фибробластов *in vitro* и *in vivo*, что приводит к повышенной неоваскуляризации и улучшенному закрытию раны на модели диабетических крыс за счет секреции хемокинов, воспалительных цитокинов и иммунных факторов [63]. Также D. Shanshan и соавт. отметили, что улучшенная доставка МСК может быть достигнута с использованием каркасов и трансплантатов, которые имитируют или сохраняют архитектуру естественных тканей человека. После нанесения дермального микротрансплантата – коллагенового каркасного биокомплекса – на место язв в образцах кожи наблюдается повышение уровня инсулиноподобного фактора роста по сравнению с образцами здоровой кожи. Лечение язв данным биокомплексом привело к улучшению заживления ран и улучшению качества жизни пациентов [63].

Известно исследование ученых из Индонезии по изучению влияния комплекса МСК и фактора некроза опухоли α в составе геля для местного применения на ускорение оптимального заживления раны. Было выявлено, что гель для местного применения с содержанием комплекса МСК и фактора некроза опухоли α более эффективен в ускорении заживления раны за счет увеличения уровней фактора роста тромбоцитов и процента закрытия раны, а также плотности фибробластов [64].

Применение СМСК в терапии дерматологических воспалительных заболеваний

В дерматологии СМСК применяется в составе экспериментальной терапии пациентов с псориазом и атопическим дерматитом. Необходимо отметить, что в отличие от регенеративной медицины накоплен еще недостаточный опыт использования СМСК в лечении дерматологических заболеваний: во всем мире продолжают как клинические исследования, так и исследования на животных моделях.

Bin Zhang и соавт. исследовали, может ли местное применение экзосом МСК облегчить воспаление, связанное с псориазом [65]. Местное нанесение флуоресцентных экзосом на эксплантаты кожи человека ограничивалось главным образом роговым слоем, при этом входящая флуоресценция составляла менее 1 %, выходя из эксплантата в течение 24-часового периода. Авторы исследования предполагают, что экзосомы МСК, применяемые местно, ингибируют активацию комплемента в роговом слое и это уменьшает высвобождение IL-17 внеклеточных ловушек нейтрофильных клеток из нейтрофилов, которые накапливаются в роговом слое и под ним [65].

В клиническом исследовании R. Seetharaman и соавт. МСК были получены из жировой ткани, извлечены и концентрированы. При нанесении кондиционной среды один раз в день в течение месяца на пораженные участки выраженность покраснений значительно уменьшилась. Положительные эффекты наблюдались в течение 6 месяцев после окончания лечения [66]. Вместе с тем в исследовании 2022 года было показано, что подкожная инъекция СМСК из пуповины человека значительно подавляла пролиферацию эпидермиса и уменьшала площадь псориаза и показатели индекса тяжести у мышей, индуцированных имиквимодом [67].

Известны исследования эффективности использования СМСК в терапии атопического дерматита. В экспериментах в качестве активного ингредиента использовали секретом и выделенные из него экзосомы.

В работе H. S. Park и соавт. изучали воздействие кондиционной среды на мышинных моделях с атопическим дерматитом [68]. Лечение состояло в подкожных инъекциях каждые три дня физиологическим раствором, МСК, секретом МСК и 2,5 % лосьоном кортизона. В результате обнаружено, что индекс тяжести (оцененный SCORAD) был ниже в группах, получавших терапию МСК, СМСК или лосьоном кортизона. Уменьшение толщины кожи отмечено одинаковым между этими группами, но больше, чем в группе контроля, получавшей физиологический раствор. Аналогичным образом инфильтрация тучных клеток была снижена в группах лечения МСК, секретом МСК или лосьоном кортизона.

В 2020 году проводилось клиническое исследование, в котором участвовало 28 пациентов с атопическим дерматитом. Они получали СМСК в составе кремов на протяжении 4 недель и должны были наносить на поврежденные участки кожи, а также на неповрежденные дважды в день. После лечения увлажнение рогового слоя увеличилось на 15,67 условных единиц (AU). Более того, трансэпидермальная потеря воды снизилась на 15,09 г/м²/ч⁻¹ AU на экзематозных поражениях и на 3,08 г/м²/ч⁻¹ на неповрежденной коже [69].

В исследованиях В. S. Cho и соавт. на мышинной модели атопического дерматита подкожное и внутривенное введение экзосом СМСК из жировой ткани смягчало симптомы и снижало уровни IgE в сыворотке крови дозозависимым образом. При поражениях, подобных атопическому дерматиту, экзосомы СМСК уменьшали количество клеток CD86+, тучных клеток и клеток CD206+ [70].

Влияние СМСК на восстановление волос изучалось в ряде других работ [71–73]. При использовании СМСК из волосяных фолликул человека, жировой ткани, а также амниотической жидкости, молочных зубов человека и мышинного костного мозга у подопытных животных наблюдался рост волос. Авторы исследований полагали, что СМСК воздействовал на процессы, стимулируя пролиферацию клеток кожных сосочков, ускоряя переход от телогена к анагену и способствуя неоваскуляризации.

Для определения потенциала использования СМСК в лечении алопеции было проведено четыре клинических исследования [74]. Для получения кондиционной среды использованы МСК жировой ткани и пуповинной крови человека. В исследованиях было задействовано 100 человек, как мужчин, так и женщин, с диагнозом андрогенная алопеция. В двух observational исследованиях использовались внутрикожные инъекции человеческого СМСК жировой ткани и было отмечено, что плотность волос увеличилась на 17,3 волоска/см² а толщина волос увеличилась на 6,5 мкм по сравнению с исходным уровнем [74, 75]. В этих исследованиях не сообщалось о каких-либо серьезных побочных явлениях.

СМСК в препаратах, космецевтических продуктах и средствах для медицинского применения

Регенерация соединительной ткани как одно из основных направлений использования СМСК находит применение в лекарственных и космецевтических средствах для обновления эпидермиса, регенерации кожного покрова, как поврежденного внешним воздействием (ультрафиолет, активные формы кислорода, температура, механические повреждения, загрязнения), так и подверженного процессам естественного старения. ФР и цитокины, присутствующие в кондиционной среде, играют роль в клеточном делении, росте новых клеток и усиливают синтез коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты. Синтез коллагена помогает поддерживать эластичность кожи [76].

В нескольких исследованиях оценивалось влияние кондиционной среды на регенерацию кожи на мышинных моделях с кожным покровом, поврежденным ультрафиолетовым излучением [77]. СМСК был получен из пуповинной крови человека, костного мозга, зубной пульпы. Применение кондиционной среды привело к сокращению уровня морщин, улуч-

шению показателей трансэпидермальной потери воды и гидратации рогового слоя и увеличило количество коллагеновых волокон по сравнению с физиологическим раствором фосфатного буфера.

Y. J. Kim и соавт. проводили клинические исследования на пациентах с морщинами или рубцами от акне [78]. У части пациентов, получивших наружную терапию СМСК, возросла удовлетворенность и улучшились клинические показатели трансэпидермальной потери воды, гидратации рогового слоя, эластичности, шероховатости и плотности коллагена по сравнению с контрольной группой, получавшей только лазерную терапию.

В долгосрочных исследованиях на здоровых добровольцах при применении СМСК в форме крема в течение года отмечались улучшения состояния кожи: среднее содержание влаги увеличилось, трансэпидермальная потеря воды и кожные покраснения снизились, морщины и шероховатость стали менее заметны [79].

Кроме того, проводилось исследование, в котором ученые пытались выяснить, могут ли спиккулы морской губки *Haliclona* sp. эффективно усиливать доставку в кожу экзосом МСК, полученных из пуповины человека, и дополнительно оценить местное применение экзосом МСК в сочетании со спиккулами для омоложения кожи мышей, подвергшейся фотостарению [80]. Результаты *in vitro* показали, что экзосомы МСК сами по себе не могут легко проникать через кожу свиньи, но они увеличивали поглощение экзосом кожей в 5,87 раза за счет создания микроканалов, что было показано на модели мышей [80]. Таким образом, комбинированное применение продемонстрировало значительные эффекты против фотостарения у мышей, включая уменьшение микроморщинок, смягчение гистопатологических изменений и стимулирование экспрессии компонентов внеклеточного матрикса [80].

До 2017 года использование СМСК, как и других клеточных продуктов в препаратах для медицинского применения в Российской Федерации, было ограничено отсутствием надлежащей нормативно-правовой базы. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (с изменениями и дополнениями) установил и разъяснил правила производства, контроля качества, транспортировки, дистрибьюции и утилизации биомедицинских клеточных продуктов на территории РФ. В 2022 году Федеральным законом «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 08.03.2022 № 46-ФЗ (последняя редакция) были также установлены особенности обращения биомедицинских клеточных продуктов, в том числе особенности их государственной регистрации, в случае применения в отношении РФ мер ограничительного характера.

Все эти меры призваны способствовать регистрации и внедрению в клиническую практику собственных отечественных препаратов на основе клеточных

Таблица 2. Использование СМСК в препаратах, космецевтических продуктах и средствах для медицинского применения
Table 2. Use of MSC-CM in drugs, cosmeceutical products and products for medical use

Название, производитель Product, company	Характеристика Specification	Вид СМСК Conditioned Medium Source
«Лаксавитар» (ООО НПО «Инновационные клеточные технологии», Россия) "Laksavitar" (LLC Scientific and Production Association "Innovation Cell Technologies", Russia)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК костного мозга BM-MSC-CM
«Репарин-Хелпер» (ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии», Россия) "Reparin-helper" (LLC "T-Helper Cell Technologies", Russia)	Препарат для ветеринарного применения Veterinary drug	СМСКD-SCR05 D-SCR05 MSC-CM
«Stem Cells Collection» (Компания «Крымская натуральная коллекция», Россия) "Stem Cells Collection" (Company "Crimea Natural collection", Russia)	Косметическое средство Cosmetic product	СК растений Plant derived MSC-CM
«Zooskin» (ООО «Новистем», Россия) "Zooskin" (LLC "NoviStem", Russia)	Средство зоокосметическое по уходу за животными Cosmetic product for veterinary use	СМСК коров Bovine MSC-CM
«Bovistem» (ООО «Новистем», Россия) "Bovistem" (LLC "NoviStem", Russia)	Препарат ветеринарного применения Veterinary drug	СМСК крупного рогатого скота Cattle MSC-CM
"Jawan: Cellular Rejuvenation Serum" (Celprogen, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК жировой ткани AD-MSC-CM
"ADIOStem" (Celprogen, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК жировой ткани AD-MSC-CM
"LUMINESCE™ cellular rejuvenation serum" (Jeunesse, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК жировой ткани AD-MSC-CM
"Osmosis stem factor serum" (Osmosis Pur medical Skincare, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК человеческих фибробластов HFB-MSC-CM
"AQ Active Serum" (AQ skin solutions, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК человеческих фибробластов HFB-MSC-CM
"Dr. Mary Stem cell wrinkle serum" (Medon Co. Ltd, South Korea)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК человеческого костного мозга BM-MSC-CM

продуктов. Однако ввиду сложной стандартизации и валидации производственных процессов в отношении подобных препаратов их появления на фармацевтическом рынке Российской Федерации можно ожидать лишь через некоторое время.

На сегодняшний день в Российской Федерации производятся продукты, относящиеся к косметическим средствам, ветеринарным и зоокосметическим препаратам (таблица 2).

Специалистами в области правового регулирования биотехнологической и фармацевтической отраслей отмечается, что менее жесткие требования и меры в отношении клеточных продуктов (например, в Южной Корее и Австралии) приводят к быстрому появлению на рынке этих стран новых препаратов и изделий со стволовыми клетками, что, безусловно, обеспечивает создание там прорывных технологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно данным, рассмотренным в этом обзоре, применение секрета мезенхимальных стволовых клеток является перспективным вариантом лечения благодаря характеру действия и относительной безопасности и может использоваться медицинскими работниками для лечения широкого спектра заболеваний. Терапия СМСК имеет много-

обещающие перспективы, поскольку позволяет учесть все ограничения терапии живыми стволовыми клетками.

Применение СМСК также может оказаться более безопасным и эффективным методом для потенциального лечения широкого спектра острых и хронических заболеваний. Но при этом трудности в стандартизации и серийном производстве осложняют масштабное использование кондиционной среды в терапии.

Несмотря на большое количество положительных результатов использования СМСК в заживлении ран на животных, а также клинических исследованиях по изучению влияния на регенерацию кожи, необходимы дальнейшие исследования, чтобы подтвердить безопасность и эффективность, а также стандартизировать производство.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Teixeira F. G., Salgado A. J. Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges. *Neural Regeneration Research*. 2020;15(1):75–77. DOI: 10.4103/1673-5374.264455.
2. Madrigal M., Rao K. S., Riordan N. H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12(1):260. DOI: 10.1186/s12967-014-0260-8.
3. Patel G. K., Khan M. A., Zubair H., Srivastava S. K., Khushman M., Singh S., Singh A. P. Comparative analysis of exosome isolation

- methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5335. DOI: 10.1038/s41598-019-41800-2.
4. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., Schneider J., Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1852. DOI: 10.3390/ijms18091852.
5. Yang C.-Y., Chang P.-Y., Chen J.-Y., Wu B.-S., Yang A.-H., Lee O. K.-S. Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate dialysis-induced peritoneal fibrosis by modulating macrophage polarization via interleukin-6. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;12(1):193. DOI: 10.1186/s13287-021-02270-4.
6. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
7. Bogatcheva N.V., Coleman M.E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. *Biochemistry*. 2019;84(11):1701–1717. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0006297919110129.
8. Chimenti I., Smith R.R., Li T.-S., Gerstenblith G., Messina E., Giacomello A., Marbán E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circulation Research*. 2010;106(5):971–980. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210682.
9. Achilli T.-M., Meyer J., Morgan J.R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012;12(10):1347–1360. DOI: 10.1517/14712598.2012.707181.
10. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):5517–5527. DOI: 10.3390/ijms16035517.
11. Egger D., Tripisciano C., Weber V., Dominici M., Kasper C. Dynamic cultivation of mesenchymal stem cell aggregates. *Bioengineering (Basel)*. 2018;5(2):48. DOI: 10.3390/bioengineering5020048.
12. Huang S.-W., Tzeng S.-C., Chen J.-K., Sun J.-S., Lin F.-H. A dynamic hanging-drop system for mesenchymal stem cell culture. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(12):4298. DOI: 10.3390/ijms21124298.
13. Fuentes P., Torres M.J., Arancibia R., Aulestia F., Vergara M., Carrión F., Osses N., Altamirano C. Dynamic culture of mesenchymal stromal/stem cell spheroids and secretion of paracrine factors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:916229. DOI: 10.3389/fbioe.2022.916229.
14. Lee B.-C., Kang K.-S. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. *Stem Cell Research & Therapy* 2020;11(1):397. DOI: 10.1186/s13287-020-01920-3.
15. Park K.-S., Bandeira E., Shelke G.V., Lässer C., Lötvall J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):288. DOI: 10.1186/s13287-019-1398-3.
16. Han H.-W., Asano S., Hsu S.-H. Cellular spheroids of mesenchymal stem cells and their perspectives in future healthcare. *Applied Sciences*. 2019;9(4):627. DOI: 10.3390/app9040627.
17. Bari E., Perteghella S., Di Silvestre D., Sorlini M., Catenacci L., Sorrenti M., Marrubini G., Rossi R., Tripodo G., Mauri P., Marazzi M., Torre M.L. Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-Compliant process. *Cells*. 2018;7(11):190. DOI: 10.3390/cells7110190.
18. Lui P.P.Y., Leung Y.T. Practical considerations for translating mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles from bench to bed. *Pharmaceutics*. 2022;14(8):1684. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081684.
19. Costa L.A., Eiro N., Fraile M., Gonzalez L.O., Saá J., Garcia-Portabella P., Vega B., Schneider J., Vizoso F.J. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021;78(2):447–467. DOI: 10.1007/s00018-020-03600-0.
20. Kim K.H., Kim Y.-S., Lee S., An S. The effect of three-dimensional cultured adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium and the antiaging effect of cosmetic products containing the medium. *Biomedical Dermatology*. 2019;4(1):1. DOI: 10.1186/s41702-019-0053-z.
21. Carlomagno C., Giannasi C., Niada S., Bedoni M., Gualerzi A., Brini A.T. Raman fingerprint of extracellular vesicles and conditioned media for the reproducibility assessment of cell-free therapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:640617. DOI: 10.3389/fbioe.2021.640617.
22. Wei X., Liu F., Zhang S., Xu X., Li J., Wang Q., Cai J., Wang S. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived conditioned medium promotes human endometrial cell proliferation through wnt/ β -catenin signaling. *BioMed Research International*. 2022;2022:8796093. DOI: 10.1155/2022/8796093.
23. Habibian A., Soleimanjahi H., Hashemi S.M., Babashah S. Characterization and comparison of mesenchymal stem cell-derived exosome isolation methods using culture supernatant. *Archives of Razi Institute*. 2022;77(4):1383–1388. DOI: 10.22092/ARI.2021.356141.1790.
24. Wright A., Snyder O.L., Christenson L.K., He H., Weiss M.L. Effect of pre-processing storage condition of cell culture-conditioned medium on extracellular vesicles derived from human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(14):7716. DOI: 10.3390/ijms23147716.
25. Casati S., Giannasi C., Minoli M., Niada S., Ravelli A., Angeli I., Mergenthaler V., Ottria R., Ciuffreda P., Orioli M., Brini A.T. Quantitative lipidomic analysis of osteosarcoma cell-derived products by UHPLC-MS/MS. *Biomolecules*. 2020;10(9):1302. DOI: 10.3390/biom10091302.
26. Bhat S., Amirthalingam M., Ballambat S.P., Bhupasandra Vasudev M., Gupta P.K., Singh Padya B., Mutalik S., Seetharam R.N. Novel bioactive formulation derived from the conditioned medium of mesenchymal stromal cells reduces under-eye dark circles in human volunteers. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2021;21(2):814–826. DOI: 10.1111/jocd.14145.
27. Tsuruta T., Sakai K., Watanabe J., Katagiri W., Hibi H. Dental pulp-derived stem cell conditioned medium to regenerate peripheral nerves in a novel animal model of dysphagia. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208938. DOI: 10.1371/journal.pone.0208938.
28. Chouaib B., Cuisinier F., Collart-Dutilleul P.-Y. Dental stem cell-conditioned medium for tissue regeneration: optimization of production and storage. *World Journal of Stem Cells*. 2022;14(4):287–302. DOI: 10.4252/wjsc.v14.i4.287.
29. Riis S., Nielsen F.M., Pennisi C.P., Zachar V., Fink T. Comparative analysis of media and supplements on initiation and expansion of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016;5(3):314–324. DOI: 10.5966/sctm.2015-0148.
30. Hagmann S., Moradi B., Frank S., Dreher T., Kämmerer P.W., Richter W., Gotterbarm T. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2013;14:223. DOI: 10.1186/1471-2474-14-223.
31. Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., Efimenko A. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7):1656. DOI: 10.3390/ijms20071656.
32. Czapla J., Matuszczak S., Kulik K., Wisniewska E., Pilny E., Jarosz-Biej M., Smolarczyk R., Sirek T., Zembala M.O., Zembala M., Szala S., Cichoń T. The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10:235. DOI: 10.1186/s13287-019-1331-9.
33. Mendicino M., Bailey A.M., Wonnacott K., Puri R.K., Bauer S.R. MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. *Cell Stem Cell*. 2014;14:141–145. DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.013.
34. Barezkai J., Petry F., Zitzmann J., Czermak P., Salz D. Bioprocess development for human mesenchymal stem cell therapy products. In: Martínez-Espinosa R.M., editor. *New Advances on Fermentation Processes*. London: IntechOpen; 2019. DOI: 10.5772/intechopen.90029.

35. Panchalingam K.M., Jung S., Rosenberg L., Behie L.A. Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:225. DOI: 10.1186/s13287-015-0228-5.
36. Qu C., Brohlin M., Kingham, P.J., Kelk P. Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. *Cell and Tissue Research*. 2020;380:93–105. DOI: 10.1007/s00441-019-03160-1.
37. Oskowitz A., McFerrin H., Gutschow M., Carter M.L., Pochampally R. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Research*. 2011;6(3):215–225. DOI: 10.1016/j.scr.2011.01.004.
38. Paschalidis T., Bakopoulou A., Papa P., Leyhausen G., Geurtsen W., Koidis P. Dental pulp stem cells' secretome enhances pulp repair processes and compensates TEGDMA-induced cytotoxicity. *Dental Materials*. 2014;30(12):e405–e418. DOI: 10.1016/j.dental.2014.08.377.
39. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterization of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*. 2013;95:2196–2211. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.015.
40. Chouaib B., Haack-Sørensen M., Chaubron F., Cuisinier F., Colart-Dutilleul P.-Y. Towards the Standardization of Mesenchymal Stem Cell Secretome-Derived Product Manufacturing for Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(16):12594. DOI: 10.3390/ijms241612594.
41. Kováčik A., Kopečná M., Vávrová K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2020;17(2):145–155. DOI: 10.1080/17425247.2020.1713087.
42. Zhang K., Yu L., Li F.-R., Li X., Wang Z., Zou X., Zhang C., Lv K., Zhou B., Mitragotri S., Chen M. Topical application of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells in combination with sponge spicules for treatment of photoaging. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:2859–2872. DOI: 10.2147/IJN.S249751.
43. Yang D., Chen M., Sun Y., Jin Y., Lu C., Pan X., Quan G., Wu C. Microneedle-mediated transdermal drug delivery for treating diverse skin diseases. *Acta Biomaterialia*. 2021;121:119–133. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.12.004.
44. Zhang X., Gan J., Fan L., Luo Z., Zhao Y. Bioinspired adaptable indwelling microneedles for treatment of diabetic ulcers. *Advanced Materials*. 2023;35(23):e2210903. DOI: 10.1002/adma.202210903.
45. Dabholkar N., Gorantla S., Waghule T., Rapalli V.K., Kothuru A., Goel S., Singhvi G. Biodegradable microneedles fabricated with carbohydrates and proteins: Revolutionary approach for transdermal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;170:602–621. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.177.
46. Zhang B., Lai R.C., Sim W.K., Choo A.B.H., Lane E.B., Lim S.K. Topical application of mesenchymal stem cell exosomes alleviates the imiquimod induced psoriasis-like inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):720. DOI: 10.3390/ijms22020720.
47. Kim K.H., Kim Y.-S., Lee S., An S. The effect of three-dimensional cultured adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium and the antiaging effect of cosmetic products containing the medium. *Biomedical Dermatology*. 2019;4:1. DOI: 10.1186/s41702-019-0053-z.
48. Kim Y.-J., Seo D.H., Lee S.H., Lee S.-H., An G.-H., Ahn H.-J., Kwon D., Seo K.-W., Kang K.-S. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2018;16:96–102. DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.10.007.
49. Park Y.M., Lee M., Jeon S., Hřůzová D. In vitro effects of conditioned medium from bioreactor cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on skin-derived cell lines. *Regenerative Therapy*. 2021;18:281–291. DOI: 10.1016/j.reth.2021.08.003.
50. Zhang S., Chen L., Zhang G., Zhang B. Umbilical cord-matrix stem cells induce the functional restoration of vascular endothelial cells and enhance skin wound healing in diabetic mice via the polarized macrophages. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):39. DOI: 10.1186/s13287-020-1561-x.
51. De Gregorio C., Contador D., Díaz D., Cárcamo C., Santapau D., Lobos-Gonzalez L., Acosta C., Campero M., Carpio D., Gabriele C., Gaspari M., Aliaga-Tobar V., Maracaja-Coutinho V., Ezquer M., Ezquer F. Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium ameliorates polyneuropathy and foot ulceration in diabetic BKS db/db mice. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):168. DOI: 10.1186/s13287-020-01680-0.
52. Chen L., Cheng L., Wang Z., Zhang J., Mao X., Liu Z., Zhang Y., Cui W., Sun X. Conditioned medium-electrospun fiber biomaterials for skin regeneration. *Bioactive Materials*. 2021;6(2):361–374. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.08.022.
53. He D., Zhao F., Jiang H., Kang Y., Song Y., Lin X., Shi P., Zhang T., Pang X. LOXL2 from human amniotic mesenchymal stem cells accelerates wound epithelialization by promoting differentiation and migration of keratinocytes. *Aging*. 2020;12(13):12960–12986. DOI: 10.18632/aging.103384.
54. Zhou H., Li X., Yin Y., He X.-T., An Y., Tian B.-M., Hong Y.-L., Wu L.-A., Chen F.-M. The proangiogenic effects of extracellular vesicles secreted by dental pulp stem cells derived from periodontally compromised teeth. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):110. DOI: 10.1186/s13287-020-01614-w.
55. Prakoeswa C.R.S., Natallya F.R., Harnindya D., Thohiroh A., Oktavianti R.N., Pratiwi K.D., Rubianti M.A., Yogatri B., Primasari P.I., Herwanto N., Alinda M.D., Kusumaputra B.H., Astari L., Listiawan M.Y., Agusni I., Rantam F.A. The efficacy of topical human amniotic membrane-mesenchymal stem cell-conditioned medium (hAMMSC-CM) and a mixture of topical hAMMSC-CM + vitamin C and hAMMSC-CM + vitamin E on chronic plantar ulcers in leprosy: a randomized control trial. *Journal of Dermatological Treatment*. 2018;29(8):835–840. DOI: 10.1080/09546634.2018.1467541.
56. Arjunan S., Gan S.U., Choolani M., Raj V., Lim J., Biswas A., Bongso A., Fong C.Y. Inhibition of growth of Asian keloid cells with human umbilical cord Wharton's jelly stem cell-conditioned medium. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):78. DOI: 10.1186/s13287-020-01609-7.
57. Zhang Q., Liu L.-N., Yong Q., Deng J.-C., Cao W.-G. Intraleisional injection of adipose-derived stem cells reduces hypertrophic scarring in a rabbit ear model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6(1):145. DOI: 10.1186/s13287-015-0133-y.
58. Zhou B.-R., Zhang T., Bin Jameel A.A., Xu Y., Xu Y., Guo S.-I., Wang Y., Permatasari F., Luo D. The efficacy of conditioned media of adipose-derived stem cells combined with ablative carbon dioxide fractional resurfacing for atrophic acne scars and skin rejuvenation. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2016;18(3):138–148. DOI: 10.3109/14764172.2015.1114638.
59. Cooper D.R., Wang C., Patel R., Trujillo A., Patel N.A., Prather J., Gould L.J., Wu M.H. Human adipose-derived stem cell conditioned media and exosomes containing MALAT1 promote human dermal fibroblast migration and ischemic wound healing. *Advances in Wound Care*. 2018;7(9):299–308. DOI: 10.1089/wound.2017.0775.
60. Pu C.-M., Chen Ya.-C., Chen Yu.-C., Lee T.-L., Peng Y.-S., Chen S.-H., Yen Y.-H., Chien C.-L., Hsieh J.-H., Chen Y.-L. Interleukin-6 from adipose-derived stem cells promotes tissue repair by the increase of cell proliferation and hair follicles in ischemia/reperfusion-treated skin flaps. *Mediators of Inflammation*. 2019;2019:2343867. DOI: 10.1155/2019/2343867.
61. Zhou Y., Zhang X.-L., Lu S.-T., Zhang N.-Y., Zhang H.-J., Zhang J., Zhang Ju. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):407. DOI: 10.1186/s13287-022-02980-3.
62. Yang J., Chen Z., Pan D., Li H., Shen J. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes combined pluronic F127 hydrogel promote chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:5911–5926. DOI: 10.2147/IJN.S249129.
63. Du S., Zeugolis D.I., O'Brien T. Scaffold-based delivery of mesenchymal stromal cells to diabetic wounds. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):426. DOI: 10.1186/s13287-022-03115-4.
64. Putra A., Ibrahim S., Muhar A.M., Kuntardjo N., Dirja B.T., Pasongka Z., Tunru I.S. Topical gel of mesenchymal stem cells-conditioned medium under TNF- α precondition accelerates wound closure healing in full-thickness skin defect animal model. *Journal of Medicine and Life*. 2022;15(2):214–221. DOI: 10.25122/jml-2019-0103.
65. Zhang B., Lai R.C., Sim W.K., Choo A.B.H., Lane E.B., Lim S.K. Topical application of mesenchymal stem cell exosomes alleviates the imiquimod induced psoriasis-like inflammation. *In-*

- ternational Journal of Molecular Sciences. 2021;22(2):720. DOI: 10.3390/ijms22020720.
66. Seetharaman R., Mahmood A., Kshatriya P., Patel D., Srivastava A. Mesenchymal stem cell conditioned media ameliorate psoriasis vulgaris: a case study. *Case Reports in Dermatological Medicine*. 2019;2019:8309103. DOI: 10.1155/2019/8309103.
67. Zhang Y., Yan J., Li Z., Zheng J., Sun Q. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate psoriasis-like skin inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2022;42(1):8–18. DOI: 10.1089/jir.2021.0146.
68. Park H.-S., Son H.-Y., Choi M.-H., Son Y., Kim S., Hong H.-S., Park J.-U. Adipose-derived stem cells attenuate atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Experimental Dermatology*. 2019;28(3):300–307. DOI: 10.1111/exd.13895.
69. Kim Y.-J., Ahn H.-J., Lee S.-H., Lee M.-H., Kang K.-S. Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110789. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110789.
70. Wang W.-M., Wu C., Jin H.-Z. Exosomes in chronic inflammatory skin diseases and skin tumors. *Experimental Dermatology*. 2019;28(3):213–218. DOI: 10.1111/exd.13857.
71. Choi N., Kim W.-S., Oh S. H., Sung J.-H. HB-EGF Improves the hair regenerative potential of adipose-derived stem cells via ROS generation and hck phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;21(1):122. DOI: 10.3390/ijms21010122.
72. Park J., Jun E. K., Son D., Hong W., Jang J., Yun W., Yoon B. S., Song G., Kim I. Y., You S. Overexpression of nanog in amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates dermal papilla cell activity and promotes hair follicle regeneration. *Experimental & Molecular Medicine*. 2019;51(7):1–15. DOI: 10.1038/s12276-019-0266-7.
73. Gunawardena T. N. A., Masoudian Z., Rahman M. T., Ramasamy T. S., Ramanathan A., Abu Kasim N. H. Dental derived stem cell conditioned media for hair growth stimulation. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216003. DOI: 10.1371/journal.pone.0216003.
74. Oh H. A., Kwak J., Kim B. J., Jin H. J., Park W. S., Choi S. J., Oh W., Um S. Migration inhibitory factor in conditioned medium from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells stimulates hair growth. *Cells*. 2020;9(6):1344. DOI: 10.3390/cells9061344.
75. Narita K., Fukuoka H., Sekiyama T., Suga H., Harii K. Sequential scalp assessment in hair regeneration therapy using an adipose-derived stem cell-conditioned medium. *Dermatologic Surgery*. 2020;46(6):819–825. DOI: 10.1097/DSS.0000000000002128.
76. Noverina R., Widowati W., Ayuningtyas W., Kurniawan D., Afifah E., Laksmiawati D. R., Rinendyaputri R., Rilianawati R., Faried A., Bachtar I., Wirakusumah F. F. Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). *Clinical Nutrition Experimental*. 2019;24:34–44. DOI: 10.1016/j.jcline.2019.01.002.
77. Zhang K., Yu L., Li F.-R., Li X., Wang Z., Zou X., Zhang C., Lv K., Zhou B., Mitragotri S., Chen M. Topical application of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells in combination with sponge spicules for treatment of photoaging. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:2859–2872. DOI: 10.2147/IJN.S249751.
78. Kim Y.-J., Seo D. H., Lee S. H., Lee Su.-H., An G.-H., Ahn H.-J., Kwon D., Seo K.-W., Kang K.-S. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2018;16:96–102. DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.10.007.
79. Kim H. J., Jung M. S., Hur Y. K., Jung A. H. A study on clinical effectiveness of cosmetics containing human stem cell conditioned media. *Biomedical Dermatology*. 2020;4(1):9. DOI: 10.1186/s41702-020-0056-9.
80. Zhang K., Yu L., Li F.-R., Li X., Wang Z., Zou X., Zhang C., Lv K., Zhou B., Mitragotri S., Chen M. Topical Application of Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Combination with Sponge Spicules for Treatment of Photoaging. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:2859–2872. DOI: 10.2147/IJN.S249751.