

УДК: 57.085.23+616.092.003+618.39-06:616-053.32  
<https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.15>

## МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ: ЕКЗОСОМИ ТА КОНДИЦІОНОВАНІ СЕРЕДОВИЩА ЯК ІННОВАЦІЙНІ СТРАТЕГІЇ У ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА АУТОІМУННІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Федір В. Гладких

1 – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, м. Харків, Україна; Кафедра інфекційних хвороб та клінічної імунології

2 – Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна; Відділ променевої патології та паліативної медицини

3 – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, м. Харків, Україна; Відділ експериментальної кріомедицини

### Резюме

**Вступ.** Аутоімунні захворювання являють собою гетерогенний за клінічними проявами клас імунопатологічних станів, що характеризуються порушеннями імунітету, які викликають втрату аутоімунної толерантності організму та як наслідок – аномальну реактивність В-клітин та Т-клітин, що призводить до пошкодження власних тканин. На сьогоднішній день на хвороби зазначеного класу хворіє близько 10 % населення, які клінічно проявляються у вигляді понад 80 форм аутоімунних захворювань.

**Мета дослідження.** Узагальнити сучасні відомості про терапевтичний потенціал кондиціонованих середовищ та екзосом МСК у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання за даними відкритих джерел інформації.

**Матеріали та методи.** Підбір публікацій виконано за базами даних PubMed, Clinical Key Elsevier, Cochrane Library, eBook Business Collection та Google Scholar, у яких висвітлювались відомості про застосування кондиціонованих середовищ та екзосом МСК у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання за ключовими словами: мезенхімальні стовбурові клітини, кондиціоноване середовище, секретом, аутоімунні захворювання.

**Результати.** Технічна складність та високі витрати, пов'язані з виробництвом та процедурами регуляторного схвалення терапії МСК створюють перешкоди для їх клінічного застосування. Дослідження показали, що безклітинний секретом МСК, який складається з широкого спектру факторів росту, цитокінів, хемокінів та позаклітинних везикул, демонструє плюрипотентний ефект. На сьогодні позаклітинні везикули класифікують відповідно до їх діаметра на апоптотичні тіла (>1000 нм), мікровезикули (100-1000 нм) та власне екзосоми (30-150 нм). Активністю екзосом можна легко маніпулювати шляхом попереднього кондиціонування МСК, простим додаванням цитокінів або хімічних речовин у культуральне середовище, введенням генних модифікацій або використанням гіпоксичних умов культивування. У низці досліджень продемонстрована співставна ефективність кондиціонованих середовищ та екзосом МСК у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання.

**Висновки.** Екзосоми та кондиціоновані середовища з МСК мають потенціал замінити клітинну терапію або слугувати співставною за ефективністю клінічною стратегією біологічної терапії. Попереднє кондиціонування МСК дозволить модулювати терапевтичні ефекти екзосом та стануть підґрунтям для встановлення рекомендацій та стандартів ефективної та безпечної безклітинної терапії.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, екзосоми, кондиціоновані середовища, аутоімунні захворювання

## ВСТУП

Аутоімунні захворювання (АІЗ) являють собою гетерогенний за клінічними проявами клас імунопатологічних станів, що характеризуються порушеннями імунітету, які викликають втрату аутоімунної толерантності організму та як наслідок – аномальну реактивність В-клітин та Т-клітин, що призводить до пошкодження власних тканин. На сьогоднішній день на АІЗ хворіє близько 10 % населення, які клінічно проявляються у вигляді понад 80 захворювань, найпоширенішими з яких є ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, розсіяний склероз та ін. [1].

Лікування АІЗ базується на протиревматичних препаратах, таких як нестероїдні протизапальні засоби та гормони, проте тривале застосування цих засобів здатне викликати багато побічних ефектів, тому вкрай важливо знайти безпечні та ефективні альтернативи модуляції самотолерантності, як ключового фундаментального порушення імунної регуляції [2].

Найперспективнішою терапевтичною стратегією на сьогодні виступає застосування мезенхімальних стовбурових (стромальних) клітин (МСК) та їх похідних [3]. МСК є мультипотентними дорослими стовбуровими клітинами, які здатними до самовідновлення та диференціації у тканини мезенхімальної лінії, такі як м'язову, кісткову, жирову та хрящову, а також у клітини немезенхімальних ліній, такі як нейрони та кератиноцити [4]. Варто зазначити, що диференціація МСК та здатність сприяти прямому відновленню тканин не є першочерговим механізмом їх терапевтичної ефективності, оскільки МСК зберігаються в органах не довше кількох годин або днів. Провідними механізмами біологічної дії МСК *in vivo* виступають паракринний та імуномодулюючий шляхи [5]. Варто зазначити що у низці досліджень продемонстровано високу ефективність застосування культуральних середовищ, кондиціонованих МСК [4]. Останнім часом все більше уваги приділяється екзосомам – мембраноз'язаним везикулам, що виробляються практично усіма типами клітин, вивільняються у культуральне середовище та відіграють роль месенджерів міжклітинної комунікації [6, 7].

## МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Узагальнити сучасні відомості про терапевтичний потенціал кондиціонованих середовищ та екзосом МСК хворих на аутоімунні захворювання за даними відкритих джерел інформації.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Підбір публікацій виконано за базами даних PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clinical Key Elsevier (<https://www.clinicalkey.com>), Cochrane

Library (<https://www.cochranelibrary.com/>), eBook Business Collection (<https://www.ebsco.com/>), та Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), у яких висвітлювались відомості про застосування кондиціонованих середовищ та секретомів МСК у лікуванні хворих на аутоімунні захворювання. На першому етапі проводили пошук літературних джерел за ключовими словами: мезенхімальні стовбурові клітини, кондиціоноване середовище, секретом, аутоімунні захворювання. На другому етапі вивчались резюме статей та виключались публікації, які не відповідали критеріям дослідження. На третьому етапі вивчали повні тексти відібраних статей на відповідність критеріям включення до списку літератури та релевантність досліджень.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

МСК викликали величезний інтерес практично у всіх галузях медицини завдяки їхній здатності регулювати Т- і В-клітини шляхом виробництва імуносупресивних молекул, включаючи індолеамін-2,3-діоксигеназу, нітрогену монооксид (NO), простагландин E2 (ПГ-E2), трансформуючий фактор росту (TGF – *transforming growth factor*)- $\beta$ , гемоксигеназу-1 (HO-1), інгібуючий фактор лейкемії, ліганд запрограмованої смерті-1, фактор росту гепатоцитів (HGF – *hepatocyte growth factor*), галектини та ін. [6]. Загалом ключові біомолекули, які продукують МСК можна розділити на три категорії: (1) фактори ангиогенезу, такі як фактор росту ендотелію судин (VEGF – *vascular endothelial growth factor*), інсуліноподібний фактор росту (IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*) і фактор росту гепатоцитів (HGF); (2) антиапоптотичні фактори, такі як основний фактор росту фібробластів (bFGF – *basic fibroblast growth factor*), трансформуючий фактор росту (TGF- $\beta$ ) та гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF – *stimulates stem cells to produce granulocytes*); (3) протизапальні фактори, такі як TNF (*tumor necrosis factor*)- $\alpha$ -стимульований ген/білок (TSG – *TNF- $\alpha$ -stimulated gene 6* (TSG)), інтерлейкін (IL-10) та ін. [8].

Незважаючи на зростаючий рівень експериментально-теоретичних уявлень про механізми біологічної дії МСК, перехід з експериментальних досліджень на їх клінічне впровадження відбувається доволі повільно [8].

Технічна складність та високі витрати, пов'язані з виробництвом (згідно з рекомендаціями належної виробничої практики (GMP – *Good Manufacturing Practice*)) та процедурами регуляторного схвалення терапії МСК створюють додаткові перешкоди для їх клінічного застосування [8]. В останні роки відбувається зміна погляду на МСК як на клітини, які безпосередньо сприяють утворенню нової тканини, на погляд на МСК як на «фабрики лікарських клітин», які виділяють різноманітні біоактивні молекули з трофічною та імуномодулюючою активністю. Ця пара-

дигма спрямувала вектор досліджень з власне МСК на вивчення їх безклітинних похідних – секретому [9]. На сьогодні у науковому співтоваристві активно формується консенсус щодо зміщення терапевтичного потенціалу МСК на їх **паракринний механізм дії**, на що вказує активна розробка рекомендацій щодо отримання секретому з МСК та впровадження стандартизованих протоколів [10].

Дослідження показали, що **безклітинний секретом МСК**, який складається з широкого спектру факторів росту, цитокінів, хемокінів та позаклітин-

них везикул, демонструє плюрипотентний ефект [11]. Секретоми, отримані з МСК, передусім включають позаклітинні везикули, такі як **екзосоми**, які є гетерогенною популяцією нанорозмірних везикул, обмежених ліпідним бішаром, які не містять ядра та власне забезпечують паракринні ефекти МСК [3, 12]. Екзосоми несуть нуклеїнові кислоти, включаючи мікроРНК, і білки, які після секреції в позаклітинний простір зливаються з клітинними мембранами клітин-реципієнтів, здійснюючи транскрипційні та посттрансляційні модифікації (рис. 1) [3, 14].

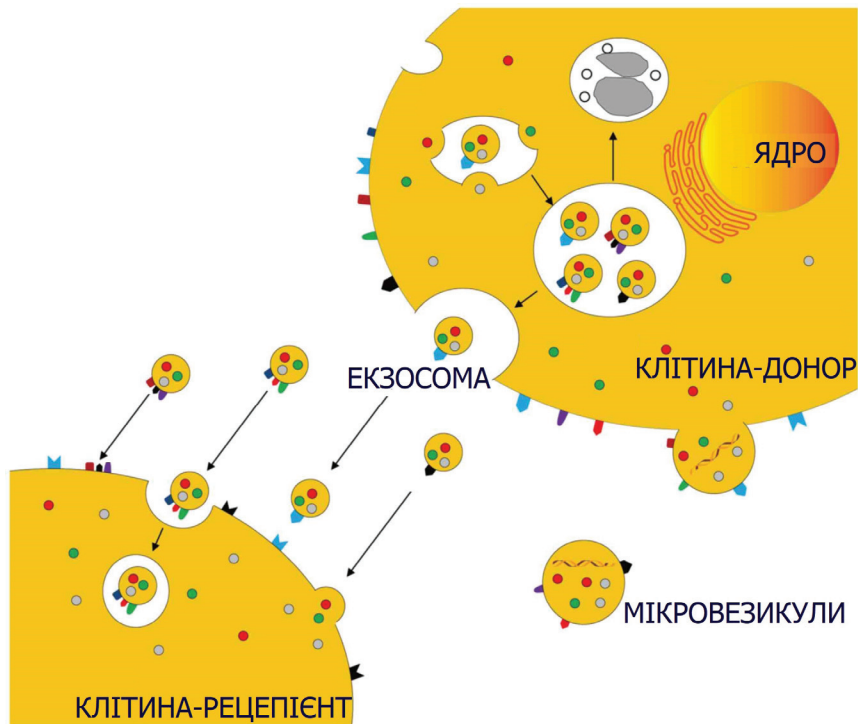


Рис. 1. Екзосоми, як месенджери міжклітинного зв'язку (адаптовано за [5])

Експерименти демонструють, що безклітинне кондиціоноване середовище або власне екзосоми, отримані з МСК, мають таку ж терапевтичну ефективність, як і самі МСК [3]. Застосування секретому/екзосом зводить до мінімуму проблеми з безпекою введення живих МСК [13] та надає переваги, пов'язані з виробництвом, зберіганням і можливістю надання готових фармацевтичних препаратів [3, 15, 16]. Дослідження терапевтичних засобів, створених на основі екзосом, демонструють їх конкретні переваги над клітинними препаратами. По-перше, везикули мають менший ризик утворення пухлин, аутоімунних реакцій і токсичних ефектів порівняно з клітинною терапією. По-друге, виробництво, стерилізація та зберігання менш складні, ніж для клітинних продуктів. По-третє, везикули є біологічно інертними, і на їхні біологічні властивості не впливатиме середовище *in vivo* [17].

Вперш екзосоми виявив Wolf P. у 1967 р., назвавши їх «тромбоцитарним пилом» [18]. На сьогодні

позаклітинні везикули класифікують (табл. 1) відповідно до їх діаметру на апоптотичні тіла (>1000 нм), мікровезикули (100-1000 нм) та власне екзосоми (30-150 нм) [19].

Секретовані екзосоми взаємодіють з клітинами-реципієнтами шляхом зв'язування «ліганд-рецептор» або прямого зв'язування і можуть поглинатись клітинами-реципієнтами шляхом ендоцитозу [21]. Біогенез і номенклатура екзосом були детально розглянуті у низці фундаментальних праць [21, 22, 23].

Загальноприйнятим методом виділення екзосом є диференціальне ультрацентрифугування, яке розділяє екзосоми за щільністю та розміром [6, 24]. Проте цьому методу бракує специфічності, тому виділені екзосоми можуть містити й інші позаклітинні везикули подібного діаметру. Екзосоми також можна виділити шляхом фільтрації [25]. Подібно до методу фільтрації, ексклюзійна хроматографія виділяє екзосоми за розміром [25].

Характеристика показаклітинних везикул [20]

| Тип везикули<br>Характеристики | Екзосома   | Ектосома або<br>мікроевезикула або<br>мікрочастинка   | Апоптичне тіло  |
|--------------------------------|--|---|---|
| Біомаркери                     | CD9, CD63, CD81, Alix,<br>Tsg101   | Немає загального маркера  | Анексин V,<br>фосфатидилсерин,<br>тромбоспондин, C3b                              |
| Розмір (нм)                    | 30-150   | 100-1000  | 500-4000  |
| Походження                     | Внутрішньопорожнинні<br>мікроевезикули, які<br>утворюються ендосомальним<br>шляхом, проходять через<br>плазматичну мембрану<br>шляхом екзоцитозу | Випинання плазматичної<br>мембрани клітин (у тому<br>числі нейтрофіли людини,<br>пухлинні клітини, еритроцити<br>та поліморфноядерні<br>лейкоцити | Плазматична<br>мембрана<br>апоптичних клітин,<br>що містить клітинні<br>фрагменти |

Привертає увагу, що активністю екзосом можна легко маніпулювати шляхом попереднього кондиціонування МСК, простим додаванням цитокінів або хімічних речовин у культуральне середовище, введенням генних модифікацій або використанням гіпоксичних умов культивування [13]. Гострою досі незадоволеною медичною потребою є збільшення обсягу виробництва екзосом з МСК. Тому підходить попереднього кондиціонування, які збільшують виробництво екзосом, є важливими. Показано, що методи 3-D культури мали бажаний ефект. МСК зазвичай культивують на 2-D поверхнях, у яких відсутні умови, які існують у фізіологічній ніші МСК. Використання 3-D структури каркасу, натомість, збільшує виробництво екзосом з МСК [10, 13]. Залежно від факторів попереднього кондиціонування, які використовуються в культурі МСК, активуються різні сигнальні шляхи. Розуміння того, як кожен окремий стимул впливає на поведінку МСК, має вирішальне значення для застосування попереднього кондиціонування МСК як інструменту для підвищення як безпеки, так і специфічного для захворювання терапевтичного потенціалу МСК для успішного їх клінічного використання [10].

У якості самостійного терапевтичного агента на сьогоднішній день розглядається власне **кондиціоноване середовище з МСК (КС-МСК) (mesenchymal stromal cell-conditioned media)**, яке містить біологічно активні речовини, які виділяють МСК у процесі свого росту, але **не включає екзосом та нуклеїнові кислоти**. Хоча використання секретому МСК може бути більш комплексним, оскільки включає більш широкий спектр біологічно активних речовин, проте кондиціоновані середовища можуть бути більш стандартизованими та простими для використання [27].

За визначенням Ivanisova D. та співав. [27]. КС-МСК – це тип клітинного культурального середовища, яке було кондиціоноване або модифіковане паракринною дією МСК. Це середовище містить різні фактори росту, цитокіни та інші молекули, що виділяються МСК, і може використовуватися для різних

цілей, таких як стимулювання росту та диференціації клітин, вивчення сигнальних шляхів клітини та оцінка терапевтичного потенціалу МСК [28]. Найпоширенішими джерелами стовбурових клітин, які використовуються для «виробництва» кондиціонованих середовищ, є МСК кісткового мозку, жирової тканини, пульпи зуба та ін. [29, 30].

Технологію отримання КС-МСК детально описано у роботах [27, 31]. Першим етапом виробництва кондиціонованого середовища з МСК є власне ізоляція *in vitro* МСК у статичних або динамічних умовах для отримання відповідної кількості клітин перед початком процесу кондиціонування. Після точної характеристики МСК культуральні середовища замінюють безсироватковими базальними середовищами. На цьому етапі МСК починають виділяти різні біоактивні молекули та позаклітинні везикули. Після 24-48 год кондиціоноване середовище збирають та фільтрують, щоб видалити будь-які залишки клітин. Кондиціоноване середовище можна концентрувати за допомогою центрифугування або ультрафільтрації. Після виконання контролю якості є можливим пряме використання отриманого кондиціонованого середовища або його зберігання шляхом криоконсервування [32, 33].

Використання безклітинного продукту, а саме КС-МСК, як терапевтичного засобу підтверджено дев'ятьма нещодавно зареєстрованими клінічними випробуваннями (згідно <https://clinicaltrials.gov/>). Активно досліджується клінічна ефективність КС-МСК при опіках (NCT04235296), при трансплантації шкіри (NCT04234750), у лікування остеоартриту (NCT04314661, NCT05579665), при гострому інфаркті та інсульті (NCT05008588) та келоїді (NCT04326959). Дослідження (NCT04889963) присвячено ефективності гіпоксично-кондиціонованих алогенних жирових МСК та кондиціонованого середовища при регенерації пошкодженої задньої хрестоподібної зв'язки. Дослідження (NCT04315025) сфокусоване на вивченні доцільності перибульбарного застосування КС-МСК у пацієнтів із пігментним ретинітом. У дослідженні (NCT04314687) вивчається ефективність алогенних



МСК пуповини та кондиціонованого середовища для лікування дитячого церебрального паралічу.

Прикладами безклітинних біотехнологічних препаратів, які вже успішно впроваджені у клінічну практику виступають кріоконсервовані екстракти тканин фетоплацентарного комплексу людини, які вперше отримано науковцями Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України. На сьогодні розроблено та впроваджено в практику унікальні методики тривалого зберігання у низькотемпературному середовищі екстракту плаценти, кордової крові та ін. [34, 35, 36, 37, 38].

У метааналізі 29 досліджень впливу МСК та КС-МСК на показники структури та функції легень у хворих на бронхолегеневу дисплазію, астму, легеневу гіпертензію, гострий респіраторний дистрес-синдром, хронічне обструктивне захворювання легень і легеневий фіброз не спостерігалось жодної статистичної різниці у ефективності за будь-яким з показників легень між клітинними препаратами

та безклітинними кондиціонованими середовищами [39, 40].

Привертає увагу, що МСК та відповідно їх безклітинні похідні (екзосомі, КС-МСК), отримані від дорослих донорів та від новонароджених різняться за своїми терапевтичними можливостями. Вік донора впливає на фенотип клітин, наприклад неонатальні МСК мають більшу **протизапальну здатність** [41]. За даними [42] екзосомі з МСК пуповини недоношених новонароджених краще здатні відновлювати **ішемічне пошкодження головного мозку** порівняно з екзосомі з МСК пуповини доношених [3].

Поточні стратегії лікування хворих на аутоімунні захворювання, включно з препаратами, спрямованими на один шлях, призвели до невеликих і лише поступових покращень. В свою чергу дослідження та впровадження у клінічне застосування інноваційних клітинних (зокрема МСК) та безклітинних (зокрема екзосомі МСК та КС-МСК) вочевидь змінять парадигми в лікуванні цих захворювань (рис. 2).

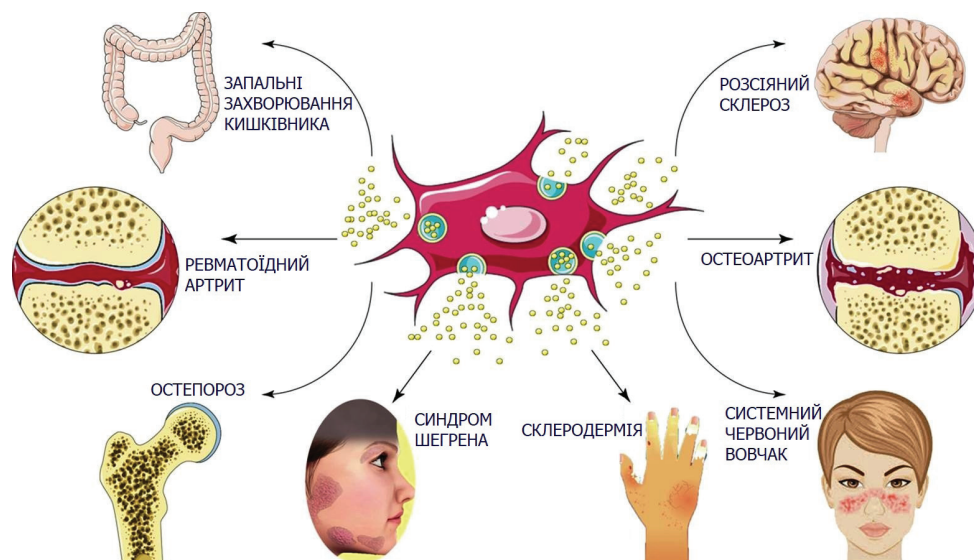


Рис. 2. Ефекти екзосом з МСК у лікуванні аутоімунних та ревматичних захворювань (адаптовано за [43])

У дослідженні Wu F. та співав. (2022 р.) проведено всебічний аналіз 312 публікацій (157 оригінальних робіт та 155 оглядів літератури), присвячених ролі екзосом у розвитку та лікуванні АІЗ (рис. 3). Серед країн країною з найбільшою кількістю публікацій є Китай ( $n=97$ , 23,3 %), за ним йдуть США ( $n=89$ , 21,4 %), Італія ( $n=34$ , 8,2 %), та Іран ( $n=23$ , 5,5 %) [44].

Результати аналізу досліджень [44] показав, що екзогенні екзосомі можуть чинити імуномодулюючу дію на інші клітини [45]. Відповідні дослідження показали, що екзосомі з МСК можуть сприяти утворенню макрофагів M2 [46] та регуляторних дендритних клітин [47], що забезпечує протизапальну дію. Крім того, екзосомі з МСК можуть пригнічувати проліферацію та диференціацію Т-клітин [48], В-клітин

[49] та NK-клітин [50]. Цікаво, що біологічні ефекти екзосом з МСК на імунні клітини можуть залежати від мікрооточення та в кінцевому підсумку призвести до різних результатів [51]. Окрім МСК, екзосомі, отримані з інших клітин, також можуть спричиняти імуномодулюючі ефекти. Наприклад, екзосомі з генномодифікованих дендритних клітин можуть пригнічувати диференціацію клітин Th1 та Th17 і сприяти утворенню клітин Treg шляхом доставки TGF- $\beta$ 1. Екзосомі, отримані з В-клітин [52] та Treg-клітин [53], можуть проявляти протизапальну дію.

Особливу увагу привертає увагу дослідження Ivanisova D. та співав. (2023 р.) [54], у якому продемонстровано ефективність застосування КС-МСК для поліпшення регенерації остеохондральних дефектів.

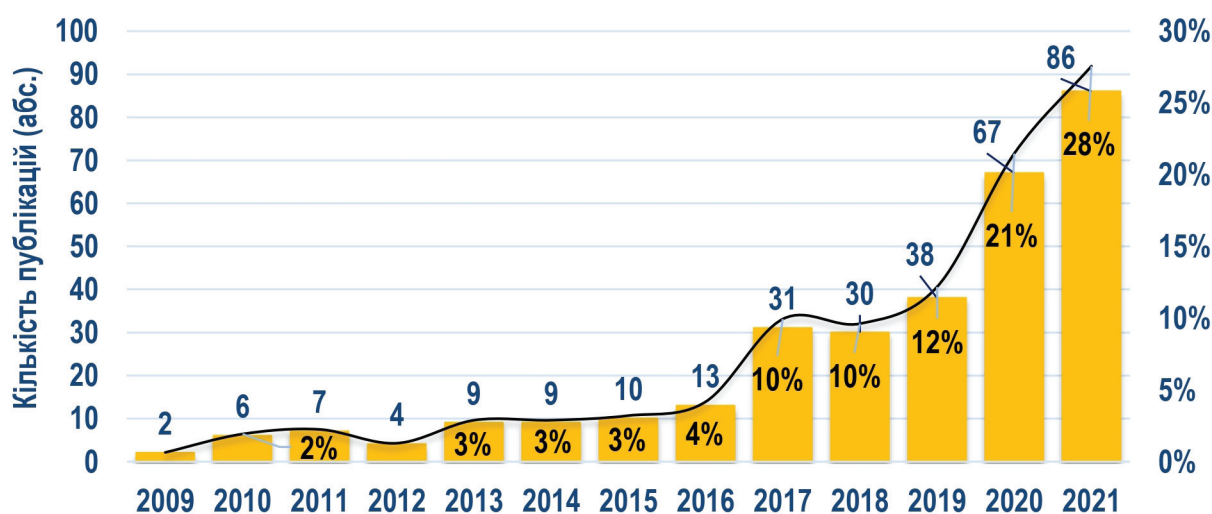


Рис. 3. Бібліометричний аналіз публікацій, які висвітлюють терапевтичну та діагностичну роль екзосом при АІЗ (адаптовано за [44])

## ВИСНОВКИ

У сукупності результати великої кількості досліджень показують, що МСК та безклітинні похідні, такі як екзосоми та кондиціоновані середовища мають великий потенціал як терапевтичні агенти для лікування хворих на аутоімунні захворювання. Екзосоми та кондиціоновані середовища з МСК мають потенціал замінити клітинну терапію або слугувати співставною за ефективністю клінічною стратегією біологічної терапії. Попереднє кондиціонування МСК дозволить модулювати терапевтичні ефекти екзосом та стане підґрунтям для розробки рекомендацій та стандартів щодо питань ефективності та безпеки безклітинної терапії.

## ПРИКІНЦЕВІ ТВЕРДЖЕННЯ

**Перспективи подальших досліджень.** Результати проведеного патентно-інформаційного пошуку вказують на перспективність дослідження МСК та

безклітинних похідних, як терапевтичних агентів для лікування хворих на аутоімунні захворювання.

## ФІНАНСУВАННЯ ТА КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автор рукопису свідомо засвідчує відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чії продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведені дослідження.

Робота не отримувала фінансування видатками Державного бюджету України.

## ВНЕСОК АВТОРІВ

*Гладких Ф. В.* – ідея роботи, розробка концепції дослідження, формулювання мети роботи, проведення патентно-інформаційного пошуку, аналіз та узагальнення даних, написання тексту рукопису.

## REFERENCES

1. Pisetsky D. S. (2023). Pathogenesis of autoimmune disease. *Nature reviews. Nephrology*, 19(8), 509-524. <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00720-1>
2. Wu, F., Gao, J., Kang, J., Wang, X., Niu, Q., Liu, J., & Zhang, L. (2022). Knowledge Mapping of Exosomes in Autoimmune Diseases: A Bibliometric Analysis (2002-2021). *Frontiers in immunology*, 13, 939433. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.939433>
3. Nitkin, C. R., Rajasingh, J., Pisano, C., Besner, G. E., Thébaud, B., & Sampath, V. (2020). Stem cell therapy for preventing neonatal diseases in the 21st century: Current understanding and challenges. *Pediatric research*, 87(2), 265-276. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0425-5>
4. Kourembanas S. (2015). Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell

- therapy. *Annual review of physiology*, 77, 13-27. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071641>
5. Li, Y., Cheng, Q., Hu, G., Deng, T., Wang, Q., Zhou, J., & Su, X. (2018). Extracellular vesicles in mesenchymal stromal cells: A novel therapeutic strategy for stroke. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(5), 4067-4079. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5993>
  6. Joo, H. S., Suh, J. H., Lee, H. J., Bang, E. S., & Lee, J. M. (2020). Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 727. <https://doi.org/10.3390/ijms21030727>
  7. Pan, W., Chen, H., Wang, A., Wang, F., & Zhang, X. (2023). Challenges and strategies: Scalable and efficient production of mesenchymal stem cell-derived exosomes for cell-free therapy. *Life sciences*, 319, 121524. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121524>
  8. Marolt Presen, D., Traweger, A., Gimona, M., & Redl, H. (2019). Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 352. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00352>
  9. Caplan A. I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *Stem cells translational medicine*, 6(6), 1445-1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
  10. Ferreira, J. R., Teixeira, G. Q., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Almeida-Porada, G., & Gonçalves, R. M. (2018). Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Preconditioning. *Frontiers in immunology*, 9, 2837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
  11. Cunningham, C. J., Redondo-Castro, E., & Allan, S. M. (2018). The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(8), 1276-1292. <https://doi.org/10.1177/0271678X18776802>
  12. Villatoro, A. J., Alcoholado, C., Martín-Astorga, M. C., Fernández, V., Cifuentes, M., & Becerra, J. (2019). Comparative analysis and characterization of soluble factors and exosomes from cultured adipose tissue and bone marrow mesenchymal stem cells in canine species. *Veterinary immunology and immunopathology*, 208, 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.12.003>
  13. Phan, J., Kumar, P., Hao, D., Gao, K., Farmer, D., & Wang, A. (2018). Engineering mesenchymal stem cells to improve their exosome efficacy and yield for cell-free therapy. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1522236. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1522236>
  14. Stoorvogel W. (2012). Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*, 119(3), 646-648. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-389478>
  15. Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1852. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
  16. Park, S. J., Kim, H. J., Kim, W., Kim, O. S., Lee, S., Han, S. Y., Jeong, E. J., Park, H. S., Kim, H. W., & Moon, K. S. (2016). Tumorigenicity Evaluation of Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells. *Toxicological research*, 32(3), 251-258. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.3.251>
  17. Lesage, F., & Thébaud, B. (2022). Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles for Neonatal Lung Disease: Tiny Particles, Major Promise, Rigorous Requirements for Clinical Translation. *Cells*, 11(7), 1176. <https://doi.org/10.3390/cells11071176>
  18. Wolf P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, 13(3), 269-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
  19. Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*, 8(4), 307. <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
  20. Baharloo, H., Azimi, M., Salehi, Z., & Izad, M. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: A Promising Therapeutic Ace Card to Address Autoimmune Diseases. *International journal of stem cells*, 13(1), 13-23. <https://doi.org/10.15283/ijsc19108>
  21. Kahroba, H., Hejazi, M. S., & Samadi, N. (2019). Exosomes: from carcinogenesis and metastasis to diagnosis and treatment of gastric cancer. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(9), 1747-1758. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03035-2>
  22. van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological reviews*, 64(3), 676-705. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>
  23. Gould, S. J., & Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 2, 10.3402/jev.v2i0.20389. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>
  24. Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V., & Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific reports*, 5, 17319. <https://doi.org/10.1038/srep17319>
  25. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789-804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>



26. Böing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of extracellular vesicles*, 3, 10.3402/jev.v3.23430. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
27. Ivanisova, D., Bohac, M., Culenova, M., Smolinska, V., & Danisovic, L. (2023). Mesenchymal-Stromal-Cell-Conditioned Media and Their Implication for Osteochondral Regeneration. *International journal of molecular sciences*, 24(10), 9054. <https://doi.org/10.3390/ijms24109054>
28. Sagaradze, G., Grigorieva, O., Nimiritsky, P., Basalova, N., Kalinina, N., Akopyan, Z., & Efimenko, A. (2019). Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1656. <https://doi.org/10.3390/ijms20071656>
29. Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, 8(8), 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>
30. Li, L., Ngo, H. T. T., Hwang, E., Wei, X., Liu, Y., Liu, J., & Yi, T. H. (2019). Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 49. <https://doi.org/10.3390/ijms21010049>
31. Bazoobandi, S., Tanideh, N., Rahmanifar, F., Zare, S., Koochi-Hosseiniabadi, O., Razeghian-Jahromi, I., Dianatpour, M., Ahmadi, M., Khoradmehr, A., Nabipour, I., Khodabandeh, Z., & Tamadon, A. (2020). Preventive Effects of Intrauterine Injection of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell-Conditioned Media on Uterine Fibrosis Immediately after Endometrial Curettage in Rabbit. *Stem cells international*, 2020, 8849537. <https://doi.org/10.1155/2020/8849537>
32. Joseph, A., Baiju, I., Bhat, I. A., Pandey, S., Bharti, M., Verma, M., Pratap Singh, A., Ansari, M. M., Chandra, V., Saikumar, G., Amarpal, & Taru Sharma, G. (2020). Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. *Journal of cellular physiology*, 235(7-8), 5555-5569. <https://doi.org/10.1002/jcp.29486>
33. Thalakiriyawa, D. S., Jayasooriya, P. R., & Dissanayaka, W. L. (2022). Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Current molecular medicine*, 22(2), 98-119. <https://doi.org/10.2174/1566524021666210211114453>
34. Pogozhykh, O., Prokopyuk, V., Figueiredo, C., & Pogozhykh, D. (2018). Placenta and Placental Derivatives in Regenerative Therapies: Experimental Studies, History, and Prospects. *Stem cells international*, 2018, 4837930. <https://doi.org/10.1155/2018/4837930>
35. Pogozhykh, D., Prokopyuk, V., Pogozhykh, O., Mueller, T., & Prokopyuk, O. (2015). Influence of Factors of Cryopreservation and Hypothermic Storage on Survival and Functional Parameters of Multipotent Stromal Cells of Placental Origin. *PLoS one*, 10(10), e0139834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139834>
36. Hladkykh, FV. (2021). Anti-inflammatory properties of diclofenac sodium on background of its combined use with cryopreserved placenta extract in experiment. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 31 (4), 364–7. doi: <https://doi.org/10.15407/cryo31.04.364>
37. Hladkykh FV. (2022). Gastrocytoprotective properties of cryopreserved placenta extract in combined action of low temperatures and inhibition of cyclooxygenase. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 39 (1), 48-56. doi: <https://doi.org/10.5937/afmnai39-33036>.
38. Hladkykh FV. (2021). Experimental study of the antiulcer effect of cryopreserved placenta extract on a model of acetylsalicylic acid-induced ulcerogenesis. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 35 (2), 89-94. doi: <https://doi.org/10.2478/cipms-2022-0017>.
39. PMC7493362. Moreira, A., Naqvi, R., Hall, K., Emukah, C., Martinez, J., Moreira, A., Dittmar, E., Zoretic, S., Evans, M., Moses, D., & Mustafa, S. (2020). Effects of mesenchymal stromal cell-conditioned media on measures of lung structure and function: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 399. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01900-7>
40. Tung, S., Delavoglia, E., Fernandez-Gonzalez, A., Mitsialis, S. A., & Kourembanas, S. (2023). Harnessing the therapeutic potential of the stem cell secretome in neonatal diseases. *Seminars in perinatology*, 47(3), 151730. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2023.151730>
41. Hamidian Jahromi, S., Li, Y., & Davies, J. E. (2018). Effect of Tumor Necrosis Factor Alpha Dose and Exposure Time on Tumor Necrosis Factor-Induced Gene-6 Activation by Neonatal and Adult Mesenchymal Stromal Cells. *Stem cells and development*, 27(1), 44-54. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0179>
42. Panfoli, I., Ravera, S., Podestà, M., Cossu, C., Santucci, L., Bartolucci, M., Bruschi, M., Calzia, D., Sabatini, F., Bruschetti, M., Ramenghi, L. A., Romantsik, O., Marimpietri, D., Pistoia, V., Ghiggeri, G., Frassoni, F., & Candiano, G. (2016). Exosomes from human mesenchymal stem cells conduct aerobic metabolism in term and preterm newborn infants. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(4), 1416-1424. <https://doi.org/10.1096/fj.15-279679>



43. Huldani, H., Abdalkareem Jasim, S., Olegovich Bokov, D., Abdelbasset, W. K., Nader Shalaby, M., Thangavelu, L., Margiana, R., & Qasim, M. T. (2022). Application of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as potential therapeutic tools in autoimmune and rheumatic diseases. *International immunopharmacology*, 106, 108634. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108634>
44. Shen, Z., Huang, W., Liu, J., Tian, J., Wang, S., & Rui, K. (2021). Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*, 12, 749192. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.749192>
45. Song, J. Y., Kang, H. J., Hong, J. S., Kim, C. J., Shim, J. Y., Lee, C. W., & Choi, J. (2017). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell extracts reduce colitis in mice by re-polarizing intestinal macrophages. *Scientific reports*, 7(1), 9412. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09827-5>
46. Favaro, E., Carpanetto, A., Caorsi, C., Giovarelli, M., Angelini, C., Cavallo-Perin, P., Tetta, C., Camussi, G., & Zanone, M. M. (2016). Human mesenchymal stem cells and derived extracellular vesicles induce regulatory dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*, 59(2), 325-333. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3808-0>
47. Lee, S., Kim, S., Chung, H., Moon, J. H., Kang, S. J., & Park, C. G. (2020). Mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress proliferation of T cells by inducing cell cycle arrest through p27kip1/Cdk2 signaling. *Immunology letters*, 225, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.06.006>
48. Cosenza, S., Toupet, K., Maumus, M., Luz-Crawford, P., Blanc-Brude, O., Jorgensen, C., & Noël, D. (2018). Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics*, 8(5), 1399-1410. <https://doi.org/10.7150/thno.21072>
49. Fan, Y., Herr, F., Vernochet, A., Mennesson, B., Oberlin, E., & Durrbach, A. (2019). Human Fetal Liver Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Impair Natural Killer Cell Function. *Stem cells and development*, 28(1), 44-55. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0015>
50. Lai, P., Weng, J., Guo, L., Chen, X., & Du, X. (2019). Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases. *Biomarker research*, 7, 6. <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0156-0>
51. Momen-Heravi, F., Bala, S., Bukong, T., & Szabo, G. (2014). Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-155 inhibitor to macrophages. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 10(7), 1517-1527. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.03.014>
52. Okoye, I. S., Coomes, S. M., Pelly, V. S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M. C., & Wilson, M. S. (2014). MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity*, 41(1), 89-103. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.019>
53. Koniusz, S., Andrzejewska, A., Muraca, M., Srivastava, A. K., Janowski, M., & Lukomska, B. (2016). Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 109. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00109>
54. Bhatnagar, S., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. *The Journal of biological chemistry*, 282(35), 25779-25789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702277200>
55. Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., Newman, G. R., & Jasani, B. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 247(1-2), 163-174. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00321-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00321-5)
56. Pêche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., & Cuturi, M. C. (2003). Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation*, 76(10), 1503-1510. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000092494.75313.38>
57. Kim, S. H., Lechman, E. R., Bianco, N., Menon, R., Keravala, A., Nash, J., Mi, Z., Watkins, S. C., Gambotto, A., & Robbins, P. D. (2005). Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(10), 6440-6448. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6440>
58. Yang, X., Meng, S., Jiang, H., Chen, T., & Wu, W. (2010). Exosomes derived from interleukin-10-treated dendritic cells can inhibit trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 45(10), 1168-1177. <https://doi.org/10.3109/00365521.2010.490596>
59. Miksa, M., Wu, R., Dong, W., Das, P., Yang, D., & Wang, P. (2006). Dendritic cell-derived exosomes containing milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII attenuate proinflammatory responses in sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 25(6), 586-593. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000209533.22941.d0>
60. Mokarizadeh, A., Delirez, N., Morshedi, A., Mosayebi, G., Farshid, A. A., & Mardani, K. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunology letters*, 147(1-2), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.06.001>

## Summary

### MESENCHYMAL STEM CELLS: EXOSOMES AND CONDITIONED MEDIA AS INNOVATIVE STRATEGIES IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Fedir V. Hladkykh

1 – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine; Department of Infectious Diseases and Clinical Immunology

2 – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine; Department of Experimental Cryomedicine

3 – State of Organization “Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kharkiv, Ukraine; Department of Radiation Pathology and Palliative Medicine

**Introduction.** Autoimmune diseases are a class of immunopathological conditions heterogeneous in clinical manifestations, characterized by immune disorders that cause the loss of the body's autoimmune tolerance and, as a result, abnormal reactivity of B-cells and T-cells, which leads to damage to own tissues. Today, about 10 % of the population suffers from diseases of this class, which are clinically manifested in the form of more than 80 forms of autoimmune diseases.

**The aim of the study.** Summarize current ideas about the therapeutic potential of conditioned media and exosomes of MSCs in the treatment of patients with autoimmune diseases based on data from open sources of information.

**Materials and methods.** Publications were selected based on PubMed, Clinical Key Elsevier, Cochrane Library, eBook Business Collection and Google Scholar databases, which covered information on the use of conditioned media and MSC exosomes in the treatment of diseases of premature newborns using the keywords: mesenchymal stem cells, conditioned media, secretion, autoimmune diseases.

**Results.** The technical complexity and high costs associated with the production and regulatory approval procedures of MSC therapy create barriers to their clinical use. Studies have shown that the cell-free secretome of MSCs, which consists of a wide range of growth factors, cytokines, chemokines and extracellular vesicles, exhibits a pluripotent effect. Today, extracellular vesicles are classified according to their diameter into apoptotic bodies (>1000 nm), microvesicles (100-1000 nm) and exosomes (30-150 nm). Exosome activity can be easily manipulated by preconditioning MSCs, by simply adding cytokines or chemicals to the culture medium, by introducing gene modifications, or by using hypoxic culture conditions. A number of studies have demonstrated the comparable effectiveness of conditioned media and MSC exosomes in the treatment of patients with autoimmune diseases.

**Conclusions.** Exosomes and conditioned media with MSCs have the potential to replace cell therapy or serve as a comparable clinical strategy to biological therapy. MSC preconditioning will allow modulating the therapeutic effects of exosomes and will become the basis for establishing recommendations and standards for effective and safe cell-free therapy.

**Key words:** mesenchymal stem cells, exosomes, conditioned media, newborns, prematurity, autoimmune diseases