

УДК 632.938+615.2+611.013+57.085

DOI <https://doi.org/10.32782/2226-2008-2023-4-15>Ф. В. Гладких <https://orcid.org/0000-0001-7924-4048>**БЕЗКЛІТИННІ БІОЛОГІЧНІ ЗАСОБИ: ФОКУС НА КОНДИЦІОНОВАНІ СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна
 Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва
 Національної академії медичних наук України», Харків, Україна
 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

УДК 632.938+615.2+611.013+57.085

Ф. В. Гладких

БЕЗКЛІТИННІ БІОЛОГІЧНІ ЗАСОБИ: ФОКУС НА КОНДИЦІОНОВАНІ СЕРЕДОВИЩА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна
 Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології імені С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук
 України», Харків, Україна

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

Огляд присвячено узагальненню сучасних відомостей про кондиціоновані середовища мезенхімальних стовбурових клітин (КС-МСК), як інноваційний безклітинний біологічний засіб. Термін «кондиціоноване середовище» належить до рідкої фази середовища клітинної культури, збагаченої секретом культивованих клітин. Характеристики КС-МСК різняться залежно від власне джерела вихідних МСК (кістковий мозок, жирова тканина, плацента та ін.), газових умов культивування – нормоксія (O_2 20,0–21,0 %) або гіпоксія (0,5–1,0–1,5–2,0 % O_2), тривалості культивування (від 16–24–48–72 годин до 3–5 днів) та ін. Культуральне середовище в культурі *in vitro* являє собою мікрооточення в умовах *in vivo* та може визначати долю клітин і, таким чином, їхні паракринні властивості. Застосування КС-МСК має переваги над власне МСК за рахунок відсутності імуногенності. Натепер у світі зареєстровано 14 клінічних досліджень щодо ефективності кондиціонованих середовищ.

Ключові слова: безклітинні біологічні засоби, кондиціоноване середовище, позаклітинні везикули, екзосоми, культивацийне середовище.

UDC 632.938+615.2+611.013+57.085

F. V. Hladkykh

CELL-FREE BIOLOGICS: FOCUS ON MESENCHYMAL STEM CELL CONDITIONED MEDIA

V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine
 State Organization "Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine",
 Kharkiv, Ukraine

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Introduction. The term "conditioned medium" refers to the liquid phase of the cell culture medium enriched with the secretome of the cultured tissue. The culture medium enriched with the secretome from mesenchymal stem cells (MSCs) during their growth was named MSC conditioned medium (MSC-CM).

Objective. Summarize the current information on the conditioned medium of mesenchymal stem cells as an innovative cell-free biological tool according to open source data.

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 MSC-CM as innovative cell-free biological agents.

Results. The paradigm shift regarding the mode of action of MSCs contributed to the formation of the concept of cellular secretion, both as a whole concept and as separate fractions, and to a new class of biological therapeutic agents. In recent years, the secret of MSCs has been repeating the path of clinical application of donor cells. MSC secretome is a mixture of biologically active vesicles and individual lipids, proteins and nucleic acids dissolved in the liquid phase. The characteristics of MSC-CM vary depending on the actual source of initial MSCs, gas conditions of cultivation – normoxia or hypoxia, duration of cultivation, etc. The culture medium in *in vitro* culture represents the microenvironment *in vivo* and can determine cell fate and thus paracrine properties.

Conclusions. The use of MSC-CM has advantages over MSC itself due to the lack of immunogenicity, which allows minimizing inter-donor variability and avoiding the need to perform additional procedures in patients for collecting cells.

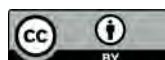
Key words: cell-free biological agents, conditioned medium, extracellular vesicles, exosomes, culture medium.

Вступ. Серед різних популяцій стовбурових клітин мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є найбільш перспективним ресурсом для клітинної терапії, зокрема, запальних та дегенеративних захворювань

через їхній потенціал диференціації за кількома лініями, імуномодуючі властивості та проангіогенні характеристики [1]. Варто зазначити, що термін «мезенхімальні стовбурові клітини» у представленому огляді застосовується синонімічно до номенклатури «мезенхімальні стромальні клітини», хоча Caplan A.I. закликає змінити назву МСК на «medicinal signaling cells», оскільки функція МСК *in vivo* є секреторною

© Ф. В. Гладких, 2023

Стаття поширюється на умовах ліцензії



та переважно функціональною в місцях пошкодження, ураження та/або запалення, тобто *in situ* [2].

Класично МСК визначають як прикріплені, негемопоеичні клітини, які експресують поверхневі маркери CD90, CD105 і CD73 та не мають експресії CD14, CD34 і CD45. Здатність відносно швидко генерувати клінічно значущу кількість чітко визначених МСК з невеликих клінічних зразків, можливе введення без необхідності підбору гаплотипів клітин призвели до широкого зацікавлення щодо їх клінічного використання [3]. Станом на 30.09.2023 р., за даними міжнародного реєстру ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>), у світі зафіксовано 263 клінічні дослідження, об'єктом вивчення у яких виступають властивості МСК та їх похідні. Активно накопичуються дані про застосування МСК при різних захворюваннях. Деякі дослідження повідомляли про позитивні ефекти терапії стовбуровими клітинами при дегенеративних захворюваннях та показали, що стовбурові клітини викликають відновлення тканин завдяки своїй здатності виділяти трофічні фактори, а не тільки через їхню здатність диференціюватися в необхідні клітини [4].

Однак існує кілька перешкод для безпечної алогенної трансплантації МСК. По-перше, алогенні МСК експресують молекули МНС I класу (*major histocompatibility complex – головний комплекс гістосумісності*) та не є повністю не поміченими для імунної системи реципієнта. Таким чином, після трансплантації МСК можуть викликати алогенні імунні відповіді та спровокувати загострення поточного захворювання [5]. Крім того, МСК сприятливі для інфекцій, спричинених цитомегаловірусом та вірусом простого герпесу, і, відповідно, алотрансплантації МСК несуть ризик передачі вірусу реципієнтам [1].

Різноманітні дослідження секретованих факторів, отриманих зі стовбурових клітин, показали, що зазначені фактори від МСК самі по собі, без самої стовбурової клітини, можуть спричинити відновлення тканин у різних станах, які передбачають пошкодження тканин/органів [6]. За даними McGuire G. та співав., до 80% регенеративного потенціалу МСК, спочатку віднесеного до трансплантованих клітин, належить паракринним секретованим клітинним факторам [7]. Вищенаведені відомості слугували підґрунтям для розробки нового підходу до біологічної терапії на основі МСК, яка б не містила самі клітини.

До **безклітинних біологічних засобів**, отриманих із клітин, належать екстракти клітин, отримані шляхом руйнування власне клітин, та продукти, які утворюють живі клітини, вивільняючи їх у позаклітинне середовище. Наразі найпоширенішими **методиками отримання екстракту клітин** є: (1) метод ультразвукової обробки, (2) хімічний лізис у поєднанні з методом ультразвукової обробки, (3) осмос у поєднанні з методом ультразвукової обробки, (4) циклічне заморожування та розморожування (температурна обробка) та (5) осмос у поєднанні з методом циклів заморожування/відтавання [8]. Так, для отримання **кріоекстракту клітин** культивовані чи нативні клітини ресуспендують у 0,9 % фізіологічному розчині до концентрації 10^7 клітин/100 мкл та проводять 3 цикли заморожування (-80°C) та відтавання (37°C) для лізису клітин. Після центрифугування при 17000 g протягом 30 хв при 4°C

супернатант (визначений як клітинний екстракт) зберігають при -80°C до використання [9, 10, 11].

Набір паракринних факторів (розчинні білки, нуклеїнові кислоти (ДНК, РНК та мікроРНК), ліпіди та позаклітинні (екстрацелюлярні) везикули), що виділяється живими клітинами у позаклітинний простір, називають **секретомом** [12, 13]. Результати, отримані у низці досліджень, продемонстрували, що секретом, отриманий з МСК, має терапевтичні ефекти, подібні до тих, що спостерігаються після трансплантації МСК [1, 6].

Складники секретому МСК можна розділити на: (1) фактори росту, (2) прозапальні та протизапальні цитокіни та (3) інші цитокіни [6]. Серед **факторів росту** у кондиціонованому середовищі МСК (КС-МСК) ідентифіковано фактор росту ендотелію судин (*vascular endothelial-derived growth factor (GF) – VEGF*), тромбоцитів (*platelet-derived-PGF*), епідермальний (*epidermal-EGF*), інсуліноподібний I та II типів (*insulin like – IGF 1/2*), гепатоцитів (*hepatocyte – HGF*), фібробластів 2 (*fibroblast – FGF 2*), кератиноцитів/фактор росту фібробластів 7 (*keratinocyte – KGF /fibroblast – FGF 7*), тромбоцитарних ендотеліальних клітин (*platelet-derived endothelial cell – PD-ECGF*), гепаринзв'язуючий епідермальний (*heparin-binding epidermal – HB-EGF*), плацентарний (*placenta – PGF*), нейронний (*neural – NGF*), нейротрофічний фактор мозку (*brain-derived neurotrophic factor – BDNF*) та ін.

Фактори регуляції запалення, виявлені у КС-МСК, доцільно поділити на прозапальні – трансформуючий фактор росту (*transforming – TGF-β 1*) та інтерлейкіни (IL): IL-6, IL-10, IL-27, IL-17E, IL-13, IL-12p70, а також антагоніст рецептора IL-1 (IL-1ra). До протизапальних цитокінів варто віднести IL-8/CXCL-8 (*C-X-C motif chemokine ligand 8*), IL-9 та IL-1b. [6, 12]. Крім того, у КС-МСК ідентифіковано наявність й інших цитокінів – це лептин, ангіогенін, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (*granulocyte colony-stimulating factor*), гранулоцитарно-макрофагальний фактор (*granulocyte macrophage-stimulating factor*), макрофагальний фактор (*macrophage-stimulating factor*), фракталкін, хемотаксичний білок моноцитів, серпін Е-1, ендостатин/колаген XVIII, тромбоспондини 1/2, тканинний інгібітор металопротеїнази-1 та ін. Слід зазначити, що КС-МСК можна отримати з різних типів клітин за різних умов культивування, що може регулювати рівень та функцію секреторних факторів. Оцінка КС-МСК з різних джерел продемонструвала відмінності у їхньому складі [12].

Термін **«кондиціоноване середовище»** належить до рідкої фази середовища клітинної культури, збагаченої секретомом культивованих клітин [14]. Культуральне середовище, збагачене секретомом від МСК під час їх росту, отримало назву **кондиціоноване середовище МСК (КС-МСК)** [15].

Мета – узагальнити сучасні відомості про кондиціоновані середовища мезенхімальних стовбурових клітин як інноваційний безклітинний біологічний засіб, спираючись на дані з відкритих джерел інформації.

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 кондиціоновані середовища мезенхімальних стовбурових клітин як інноваційний безклітинний біологічний засіб. На першому етапі проводили пошук літературних джерел за ключовими словами: кондиціоноване середовище, мезенхімальні стовбурові клітини, безклітинні біологічні засоби. На другому етапі вивчалися резюме статей та виключалися 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 їх обговорення. Найпоширеніші джерела стромальних клітин наведені на рис. 1: МСК кісткового мозку (2), МСК синовіальної оболонки (1), МСК жирової тканини (3), МСК плаценти (4), амніону (5), пуповини (6), пуповинної крові (7), *substantia gelatinosa funiculi umbilicalis* (желеподібна речовина, яка оточує пупкові артерії та вену в пуповині; *Wharton's jelly – Вартонові драгли*) (8), стромальні клітини пульпи зуба (9), а також клітини строми молочних зубів людини (10, див. рис. 1).

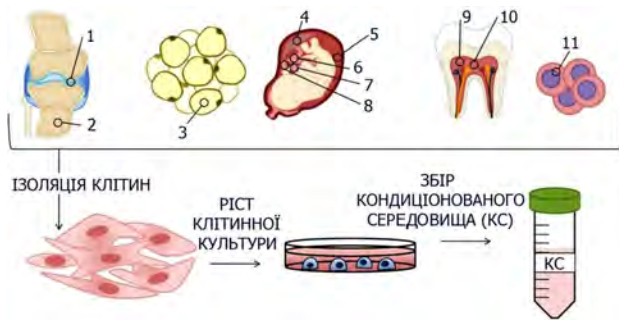


Рис. 1. Найпоширеніші джерела клітин та отримання кондиціонованого середовища (адаптовано за [16])

Тривалий час вважалось постулатом, що міжклітинна комунікація відбувається виключно через прямий контакт між клітинами або через вивільнення розчинних молекул, які передають сигнал шляхом зв'язування з відповідним рецептором на клітині-мішені та/або через поглинання цією клітиною [17, 18]. Останнім часом увага дослідників все більше зосереджується на меха-

нізмі міжклітинного зв'язку, який включає міжклітинне перенесення **екстрацелюлярних везикул (ЕВ)** [19]. ЕВ – це оточені мембраною структури, які вивільняються більшістю типів клітин та характеризуються певним набором білків, ліпідів та нуклеїнових кислот [20].

Нині добре відомо, що клітина здатна вивільняти три підтипи ЕВ, а саме екзосоми, ектосоми (мікроевезикули) та апоптичні тільця, які виділяються клітиною у позаклітинний простір (рис. 1). Екзосоми вивільняються шляхом екзоцитозу, тоді як ектосоми виділяються шляхом брунькування плазматичної мембрани. Апоптичні тільця вивільняються відмираючими клітинами на пізніх стадіях апоптозу та містять ядерний матеріал, клітинні органели і вміст мембрани [18]. Апоптичні тільця, як правило, викликають протизапальну або толерогенну відповідь, коли їх поглинають сусідні клітини [21].

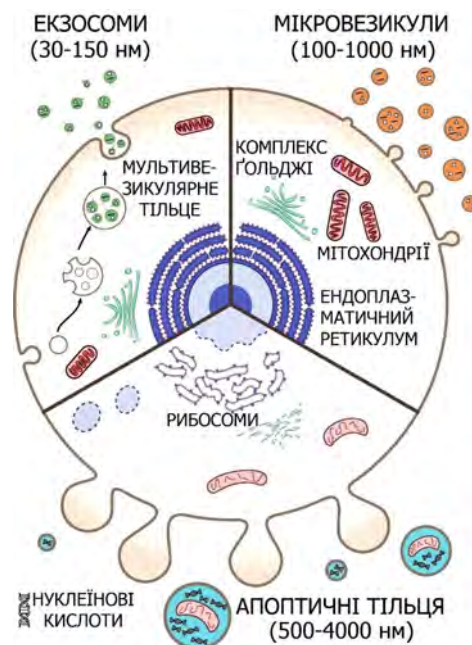


Рис. 2. Біогенез різних форм екстрацелюлярних везикул з еукаріотичної клітини (адаптовано за [22])

Термін «екзосома» спочатку використовувався для везикул розміром від 40 до 1000 нм, які вивільняються різними культивованими клітинами [23], проте піз-

Таблиця 1

Характеристика складу екстрацелюлярних везикул [25]

Компоненти	Екстрацелюлярні (позаклітинні) везикули (ЕВ)		
	Екзосоми	Ектосоми (мікроевезикули)	Апоптичні тільця
Білки	CD63, CD81, CD9, анексини, білки теплового шоку, Alix, Tsg101, клатрин, кавеоліни, інтегрини, TfRs	Інтегрини, флотилліни, селектини, CD40, металопротеїнази	Гістони
Ліпіди	Лізобісфосфатидна кислота, холестерин, церамід, сфінгомієлін і низька концентрація фосфатидилсерину	Висока кількість холестерину, сфінгомієліну, церамиду, висока концентрація фосфатидилсерину	Висока концентрація фосфатидилсерину
Нуклеїнові кислоти	мРНК і мікроРНК	мРНК і мікроРНК	мРНК, мікроРНК, фрагменти ДНК

ніше цій термін було прийнято для везикул розміром 30–150 нм, що вивільняються під час диференціювання ретикулоцитів як наслідок злиття мультивезикулярної ендосоми з плазматичною мембраною [24].

ЕВ складаються з різних молекул, включаючи білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти (табл. 1). Секретовані білки беруть участь у міжклітинній комунікації та відіграють роль у клітинній сигналізації, диференціації, клітинній адгезії, ангиогенезі та апоптозі.

Зміна парадигми щодо способу дії МСК сприяла становленню уявлення про клітинний секретом, як у вигляді цілісного поняття, так і у вигляді окремих його фракцій (розчинних та везикулярних субкомпонентів), як нового класу біологічних терапевтичних засобів. Справді, останні кілька років відмічається входження секретом МСК до низки клінічних випробувань переважно в галузі регенеративної медицини, що повторює шлях клінічного застосування донорських клітин [26].

КС-МСК продемонстрував співставну з ефектом власне МСК терапевтичну дію на різні захворювання [12], включаючи інфаркт міокарда [27], інсульт [28], травми спинного мозку [29], травми головного мозку [30], гострі та хронічні рани [31], ураження печінки [32], ураження нирок [33], ураження пародонта [34], дефекти кісток [35], пошкодження опорно-рухового апарату [36], захворювання шкіри [37], чоловіче безпліддя [38], артрит [39] та розсіяний склероз [40]. Станом на 30.09.2023 р., за даними міжнародного реєстру ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>), у світі зареєстровано 14 клінічних досліджень, присвячених КС (табл. 2).

Багатообіцяючий потенціал КС-МСК як інноваційного безклітинного терапевтичного засобу підкріплено низкою переваг порівняно з використанням стовбурових клітин: зокрема, КС-МСК має більший термін придатності та не вимагає складновідтворюваних умов зберігання (табл. 3) [12, 41].

Нині існують різні методи отримання КС, які можуть впливати на типи та рівні факторів росту, зібрані цими методами. Характеристики КС-МСК різнитимуться залежно від власне джерела вихідних МСК (кістковий мозок, жирова тканина, плацента та ін.), газових умов культивування – нормоксія (O_2 20,0–21,0 %) або гіпоксія (0,5–1,0–1,5–2,0 % O_2) [45, 46], тривалості культивування (від 16–24–48–72 годин до 3–5 днів [47, 48] та ін.). У разі використання базового середовища коротка тривалість культивування може залишити певні сироваткові фактори росту, які не споживаються клітинами та можуть підвищити рівень фактора росту або, навпаки, пригнічувати секрецію фактора росту клітинами. Можливість присутності залишкового фактора росту в середовищі можна побачити в дослідженні, яке показало, що середовище без клітин містило рівень TGF- β 1 $2,49 \pm 2,39$ пг/мл [49].

Чи не найважливіше значення має власне культуральне середовище. Культуральне середовище в культурі *in vitro* являє собою мікрооточення в умовах *in vivo* та може визначати долю клітин і, таким чином,

клітинну секрецію. Деякі дослідження використовували фетальну сироватку великої рогатої худоби, тоді як інші дослідження використовували середовище без сироватки. Таким чином, той самий тип клітин може секретувати різний рівень факторів росту, коли їх культивували в різному середовищі, наприклад, середовище Ігла модифіковане Дульбекко (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM*) та його модифікації (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 – DMEM/F12*), α модифіковане поживне середовище Ігла (*Minimum Essential Medium Eagle – α MEM*), середовище 199 (*Medium 199*), базальне середовище ендотелію (*Endothelial Basal Medium – EBM2*), середовище для росту ендотеліальних клітин (*Endothelial Cell Growth Medium-2 – EGM-2*) та ін. [6].

Найчастіше КС-МСК отримують у моношаровій культурі, але в деяких дослідженнях використовувалися сфероїдні культури. Культури сфероїдів потребують спеціального поводження та обладнання, але дають більше клітин порівняно зі звичайними моношаровими культурами, а отже, більше секретованих факторів [49, 50]. Крім того, клітини, розташовані в центрі сфероїда, можуть перебувати у відносно гіпоксичному стані порівняно з клітинами на поверхні, таким чином додатково збільшуючи вихід певного фактора росту [6].

Натепер дослідниками запропоновано цілу низку протоколів отримання КС-МСК, які варіюють за використаним культуральним середовищем та умовами культивування. Не менш важливим є подальша стандартизація отриманого КС-МСК для подальших доклінічних та клінічних досліджень. Прикладом стандартизації КС-МСК є кількісне визначення білків (наприклад, галектин-1 (умовно 6 пг/мл) та ін.) шляхом імуноферментного аналізу [51]. Галектини-1/9 являють собою сімейство білків, які поділяють характерні амінокислотні послідовності та спорідненість до β -галактозидних цукрів [3]. Gieseke F. та співав. [52] показали, що галектин-1 відіграє важливу роль в імуномодулюючій здатності МСК.

Зважаючи на широкий терапевтичний потенціал КС-МСК, Giannasi C. та співав. рекомендують не зосереджуватися на окремих компонентах, а скоріше націлитися на отримання загального уявлення про велику складність зазначеного багатообіцяючого безклітинного терапевтичного засобу, ефективність якого залежить саме від наявності безлічі біологічно активних факторів різної природи [26].

Висновки. Секретом мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин являє собою розчинену у рідкій фазі суміш біологічно активних везикул та окремих ліпідів, білків та нуклеїнових кислот. Застосування КС-МСК має переваги над власне МСК за рахунок відсутності імуногенності, що дозволяє мінімізувати міждонорську варіабельність та уникнути необхідності виконання додаткових процедур у пацієнтів для збору клітин. Натепер у світі зареєстровано 14 клінічних досліджень щодо ефективності КС.

Таблиця 2

Характеристика клінічних досліджень ефективності кондиціонованих середовищ (за даними ClinicalTrials.gov станом на 30.09.2023 р.)

№ з/п	Номер дослідження	Назва клінічного дослідження	Назва установи (регіон, країна)	Термін дослідження	Кількість залучених пацієнтів	Вік, років	Стать
1	NCT04889963	Регенерація травмованої задньої хрестоподібної зв'язки з використанням гіпоксічно-кондиціонованих алогенних жирових мезенхімальних стовбурових клітин та кондиціонованого середовища	Sholahuddin Rhatomy, Sleman, Yogyakarta, Indonesia	01.01.2021–30.06.2021	16	2 міс. – 6 міс.	чол.
2	NCT04314687	Стовбурові клітини та кондиціоноване середовище для лікування церебрального паралічу	Indonesian National Brain Center, Jakarta, Indonesia	13.10.2021–25.12.2021	78	6 міс. – 3 роки	чол./жін.
3	NCT04134676	Терапевтичний потенціал кондиціонованого середовища стовбуровими клітинами на хронічних виразкових ранах	1. Mayarada Hospital, Tangerang, Banten, Indonesia 2. Indra Clinic, Tangerang, Banten, Indonesia 3. Sukma Clinic, Tangerang, Banten, Indonesia	01.06.2019–10.06.2020	38	18–80 років	чол./жін.
4	NCT04314661	Терапія мезенхімальними стовбуровими клітинами та терапія кондиціонованим середовищем для лікування остеоартриту	Gatot Soebroto Hospital, Jakarta Pusat, DKI Jakarta, Indonesia	30.08.2020–08.12.2024	20	55–70 років	чол./жін.
5	NCT04326959	Імплантація мезенхімальних стовбурових клітин, кондиціонованого середовища або триамцинолону ацетоніду для келоїду	не вказано	01.09.2020–01.12.2020	24	18–55 років	чол./жін.
6	NCT04234750	Плейотропні ефекти похідних мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні донорських ділянок	People's Liberation Army Central Air Force Hospital, Datong, Shanxi, China	17.10.2019–30.06.2021	20	6–60 років	чол./жін.
7	NCT04235296	Плейотропні ефекти кондиціонованого середовища з мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні опікової рани	PLA Central Theater Air Force Hospital, Datong, Shanxi, China	17.11.2019–30.06.2021	30	6–60 років	чол./жін.
8	NCT05008588	Комбінована терапія кондиціонованим середовищем та мезенхімальними стовбуровими клітинами пуповини при гострому інфаркті та інсулеті	1. Gatot Soebroto Hospital, Jakarta Pusat, DKI Jakarta, Indonesia 2. PT Prodia StemCell Indonesia, Jakarta, Indonesia	30.05.2022–12.2023	15	25–60 років	чол./жін.
9	NCT05296863	Кондиціоноване середовище з жирових стовбурових клітин як новий підхід до відновлення росту волосся при чоловічій андрогенетичній alopecii	Universitas Indonesia, Jakarta Pusat, Jakarta, Indonesia	11.10.2021–03.12.2021	37	25–58 років	чол.
10	NCT05579665	Ефективність плазми, збагаченої тромбоцитами, кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин пуповини та галуронові кислоти для лікування остеоартриту колінного суглоба	Mohammad Hoessin Central General HospitalPalembang, Palembang, South Sumatera, Indonesia	02.10.2022–31.05.2023	45	30–60 років	чол./жін.
11	NCT05909488	Роль кондиціонованого середовища мезенхімальних стовбурових клітин пуповини та стовбурових клітин пуповини в інгібуванні втрати зору при пігментному ретиніті фази I/II	RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta, DI Yogyakarta, Indonesia	01.09.2023–01.12.2025	30	18–65 років	чол./жін.
12	NCT05887804	Порівняння об'єму келоїду та зменшення симптомів при застосуванні мезенхімальних стовбурових клітин пуповини, їх кондиціонованого середовища та триамцинолону ацетоніду у лікуванні келоїду: рандомізоване контрольоване дослідження	RSPAD Gatot Soebroto, Jakarta Pusat, DKI Jakarta, Indonesia	01.10.2021–09.06.2022	24	18–55 років	чол./жін.
13	NCT05939817	Вплив ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин пуповини, їх кондиціонованого середовища та триамцинолону ацетоніду на співвідношення колагену типу I/3 та рівень інтерлейкіну-10 у келоїді: рандомізоване контрольоване дослідження	RSPAD Gatot Soebroto, Jakarta Pusat, DKI Jakarta, Indonesia	01.10.2021–09.06.2022	24	18–55 років	чол./жін.
14	NCT04223622	Вплив секретому стромальних клітин жирового походження на остеохондральні експланти людини	IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano, MI, Italy	12.04.2021–12.2022	24	18+ років	чол./жін.

Переваги та недоліки КС порівняно з трансплантацією клітин [16, 41, 42, 43, 44]

Переваги	Недоліки
1. зниження ризику реакції «трансплантат проти господаря»; 2. швидке та дешеве виробництво: обсяг КС з однієї культури; 3. зручне зберігання та транспортування: не потребує застосування кріопротекторів; 4. процедура введення не вимагає стерильних умов: підвищення зручності використання; 5. менш інвазивне введення: не вимагає хірургічного втручання; 6. подовжений термін зберігання за рахунок відсутності клітин; 7. готові біопрепарати як лікарські засоби для регенеративної медицини; 8. менший ризик пухлиноутворення завдяки безклітинному складу.	1. недостатня вичерпність відомостей щодо складу та механізму дії факторів; 2. необхідність оптимізації виробництва з метою стандартизації складу КС; 3. висока мінливість залежно від культури клітин, типу, пасажу, стану культури та методів обробки КС; 4. недостатність клінічних досліджень; 5. алергічні реакції на композиції культурального середовища.

ЛІТЕРАТУРА

- Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019;8(5):467. <https://doi.org/10.3390/cells8050467>
- Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1445-1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*. 2014;12:260. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>
- Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, Guo Y, Xia X, Wang Y, et al. The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS One*. 2013;8(3):e59020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059020>
- Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(2):280-7. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9583-3>
- Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2014;2014:965849. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>
- Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol*. 2013;6(6):e26631. <https://doi.org/10.4161/cib.26631>
- Su X, Upadhyay A, Tran SD, Lin Z. Cell-Free Therapies: The Use of Cell Extracts to Mitigate Irradiation-Injured Salivary Glands. *Biology (Basel)*. 2023;12(2):305. <https://doi.org/10.3390/biology12020305>
- Su X, Liu Y, ElKashty O, Seuntjens J, Yamada KM, Tran SD. Human Bone Marrow Cell Extracts Mitigate Radiation Injury to Salivary Gland. *J Dent Res*. 2022;101(13):1645-1653. <https://doi.org/10.1177/00220345221112332>
- Su X, Liu Y, ElKashty O, Seuntjens J, Yamada KM, Tran SD. Human Bone Marrow Cell Extracts Mitigate Radiation Injury to Salivary Gland. *J Dent Res*. 2022;101(13):1645-1653. <https://doi.org/10.1177/00220345221112332>
- Tran SD, Liu Y, Xia D, Maria OM, Khalili S, Wang RW, Quan VH, Hu S, et al. Paracrine effects of bone marrow soup restore organ function, regeneration, and repair in salivary glands damaged by irradiation. *PLoS One*. 2013;8(4):e61632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061632>
- Ra K, Park SC, Lee BC. Female Reproductive Aging and Oxidative Stress: Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium as a Promising Antioxidant. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5):5053. <https://doi.org/10.3390/ijms24055053>
- Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. 2019;37(7):855-864. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Solursh M, Meier S. A conditioned medium (CM) factor produced by chondrocytes that promotes their own differentiation. *Dev Biol*. 1973;30(2):279-89. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(73\)90089-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(73)90089-4)
- Kim H.O., Choi S.-M., Kim H.-S. Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Eng. Regen. Med*. 2013;10:93-101. <https://doi.org/10.1007/s13770-013-0010-7>
- Rosochowicz MA, Lach MS, Richter M, Suchorska WM, Trzeciak T. Conditioned Medium - Is it an Undervalued Lab Waste with the Potential for Osteoarthritis Management? *Stem Cell Rev Rep*. 2023;19(5):1185-1213. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10517-1>
- Gunawardena TNA, Rahman MT, Abdullah BJJ, Kasim NHA. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019;13(4):569-586. <https://doi.org/10.1002/TERM.2806>
- Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, Srivastava AK, Janowski M, Lukomska B. 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. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:109. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00109>

21. Lai FW, Lichty BD, Bowdish DM. Microvesicles: ubiquitous contributors to infection and immunity. *J Leukoc Biol.* 2015;97(2):237-45. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0513-292RR>
22. Mohan A, Agarwal S, Clauss M, Britt NS, Dhillon NK. Extracellular vesicles: novel communicators in lung diseases. *Respir Res.* 2020;21(1):175. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01423-y>
23. Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981;645(1):63-70. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5)
24. Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol.* 1984;35(2):256-63
25. Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, Srivastava AK, Janowski M, Lukomska B. 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. *Front Cell Neurosci.* 2016;10:109. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00109>
26. Giannasi C, Niada S, Della Morte E, Casati S, Orioli M, Gualerzi A, Brini AT. Towards Secretome Standardization: Identifying Key Ingredients of MSC-Derived Therapeutic Cocktail. *Stem Cells Int.* 2021;2021:3086122. <https://doi.org/10.1155/2021/3086122>
27. Yang D., Wang W., Li L., Peng Y., Chen P., Huang H., Guo Y., Xia X., et al. The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS ONE.* 2013;8:e59020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059020>
28. Bakondi B., Shimada I.S., Perry A., Munoz J.R., Ylostalo J., Howard A.B., Gregory C.A., Spees J.L. CD133 identifies a human bone marrow stem/progenitor cell sub-population with a repertoire of secreted factors that protect against stroke. *Mol. Ther.* 2009;17:1938-1947. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.185>
29. Cantinieaux D., Quertainmont R., Blacher S., Rossi L., Wanet T., Noel A., Brook G., Schoenen J., Franzen R. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: An original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS ONE.* 2013;8:e69515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069515>
30. Chang C.P., Chio C.C., Cheong C.U., Chao C.M., Cheng B.C., Lin M.T. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clin. Sci.* 2013;124:165-176. <https://doi.org/10.1042/CS20120226>
31. Mishra P.J., Mishra P.J., Banerjee D. Cell-free derivatives from mesenchymal stem cells are effective in wound therapy. *World J. Stem Cells.* 2012;4:35-43. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v4.i5.35>
32. Du Z., Wei C., Cheng K., Han B., Yan J., Zhang M., Peng C., Liu Y. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J. Surg. Res.* 2013;183:907-915. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.009>
33. Koppen A., Joles J.A., van Balkom B.W., Lim S.K., de Kleijn D., Giles R.H., Verhaar M.C. Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS ONE.* 2012;7:e38746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038746>
34. Kawai T., Katagiri W., Osugi M., Sugimura Y., Hibi H., Ueda M. Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration. *Cytherapy.* 2015;17:369-381. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.11.009>
35. Osugi M., Katagiri W., Yoshimi R., Inukai T., Hibi H., Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng. Part A.* 2012;18:1479-1489. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0325>
36. Veronesi F., Borsari V., Sartori M., Orciani M., Mattioli-Belmonte M., Fini M. The use of cell conditioned medium for musculoskeletal tissue regeneration. *J. Cell. Physiol.* 2018;233:4423-4442. <https://doi.org/10.1002/jcp.26291>
37. Montero-Vilchez T., Sierra-Sanchez A., Sanchez-Diaz M., Quinones-Vico M.I., Sanabria-de-la-Torre R., Martinez-Lopez A., Arias-Santiago S. Mesenchymal Stromal Cell-Conditioned Medium for Skin Diseases: A Systematic Review. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:654210. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654210>
38. Sagaradze G.D., Basalova N.A., Kirpatovsky V.I., Ohobotov D.A., Grigorieva O.A., Balabanyan V.Y., Kamalov A.A., Efimenko A.Y. Application of rat cryptorchidism model for the evaluation of mesenchymal stromal cell secretome regenerative potential. *Biomed. Pharmacother.* 2019;109:1428-1436. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.174>
39. Kay A.G., Long G., Tyler G., Stefan A., Broadfoot S.J., Piccinini A.M., Middleton J., Kehoe O. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Sci. Rep.* 2017;7:18019. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18144-w>
40. Dahbour S., Jamali F., Alhattab D., Al-Radaideh A., Ababneh O., Al-Ryalat N., Al-Bdour M., Hourani B., Msallam M., Rasheed M., et al. Mesenchymal stem cells and conditioned media in the treatment of multiple sclerosis patients: Clinical, ophthalmological and radiological assessments of safety and efficacy. *CNS Neurosci. Ther.* 2017;23:866-874. <https://doi.org/10.1111/cns.12759>
41. Gunawardena TNA, Rahman MT, Abdullah BJJ, Abu Kasim NH. Conditioned media derived from mesenchymal stem cell cultures: The next generation for regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(4):569-586. <https://doi.org/10.1002/term.2806>
42. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol.* 2013;6(6):e26631. <https://doi.org/10.4161/cib.26631>
43. Chuang TJ, Lin KC, Chio CC, Wang CC, Chang CP, Kuo JR. Effects of secretome obtained from normoxia-preconditioned human mesenchymal stem cells in traumatic brain injury rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery.* 2012;73(5):1161-1167. <https://doi.org/10.1097/TA.0B013E318265D128>
44. Marlina, M., Armenia, A., Rahmadian, R., Aviani, J. K., Sholihah, I. A., Kusuma, H. S. W., Widowati, W. Conditioned Medium of IGF1-Induced Synovial Membrane Mesenchymal Stem Cells Increases Chondrogenic and Chondroprotective Markers in Chondrocyte Inflammation. *Bioscience Reports,* 2021;41(7),BSR20202038. <https://doi.org/10.1042/BSR20202038>

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

45. Chuang T. J., Lin K. C., Chio C. C., Wang C. C., Chang C. P., Kuo J. R. Effects of secretome obtained from normoxia-preconditioned human mesenchymal stem cells in traumatic brain injury rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012;73(5):1161–1167. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318265d128>
46. Chang C., Chio C., Cheong C., Chao C., Cheng B., Lin M. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clinical Science*. 2013;124(3):165–176. <https://doi.org/10.1042/CS20120226>
47. Inoue T., Sugiyama M., Hattori H., Wakita H., Wakabayashi T., Ueda M. Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Engineering A*. 2013;19(1-2):24–29. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0385>
48. Ho J. C. Y., Lai W., Li M., Au K., Yip M., Wong N. L. Y., Ng E. S. K., Lam F. F. Y., et al. Reversal of endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2012;28(5):462–473. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2304>
49. Cho Y. J., Song H. S., Bhang S., Lee S., Kang B. G., Lee J. C., An J., Cha C. I., et al. Therapeutic effects of human adipose stem cell-conditioned medium on stroke. *Journal of Neuroscience Research*. 2012;90(9):1794–1802. <https://doi.org/10.1002/jnr.23063>
50. Bhang S. H., Lee S., Shin J. Y., Lee T. J., Jang H. K., Kim B. S. Efficacious and clinically relevant conditioned-medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Molecular Therapy*. 2014;22(4):862.
51. Golubinskaya P.A., Sarycheva M.V., Dolzhikov A.A., Bondarev V.P., Stefanova M.S., Soldatov V.O., Nadezhdin S.V., Korokin M.V., et al. Application of multipotent mesenchymal stem cell secretome in the treatment of adjuvant arthritis and contact-allergic dermatitis in animal models. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(6):416-425. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-6-416-425>
52. Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*. 2010;116(19):3770–3779. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270777>

Надійшла до редакції 30.10.2023 р.

Прийнята до друку 20.12.2023 р.

Електронна адреса для листування fedir.hladkykh@gmail.com