

## **Влияние низкомолекулярной фракции секретома мезенхимальных стволовых клеток на функциональное состояние печени**

**А. А. Лаврик**

ООО «НовиСтем»,  
г. Белгород, Российская Федерация

**С. Г. Али**

ООО «НовиСтем»,  
г. Белгород, Российская Федерация  
E-mail: ali.s@novistem.ru

**В. Б. Москалев**

ООО «НовиСтем»,  
г. Белгород, Российская Федерация  
E-mail: vbm@novistem.ru

**Д. А. Золотарева**

ООО «НовиСтем»,  
г. Белгород, Российская Федерация

ail: adz@novistem.ru

### **Аннотация**

**В** исследовании изучено влияние низкомолекулярной фракции секретома мезенхимальных стволовых клеток на функциональное состояние печени у крыс при остром гепатите. Установлено, что фармакологическая композиция на основе секретома способствует нормализации ключевых биохимических показателей состояния печени и восстановлению ее морфологических характеристик. Полученные данные свидетельствуют о выраженных регенеративных свойствах исследуемого препарата и перспективности дальнейших исследований и разработок в данном направлении.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, секретом, регенеративные свойства, острый гепатит, заболевания печени.

## **Influence of a mesenchymal stem cells secretome low molecular fraction on hepatic functional status**

**A. A. Lavrik**

NoviStem LLC,  
Belgorod, Russian Federation

**S. G. Ali**

NoviStem LLC,  
Belgorod, Russian Federation  
E-mail: ali.s@novistem.ru

**V. B. Moskalev**

NoviStem LLC,  
Belgorod, Russian Federation  
E-mail: vbm@novistem.ru

**D. A. Zolotareva**

Novosystem LLC,  
Belgorod, Russian Federation  
e-mail: adz@novistem.ru

**Abstract**

The research studied influence of the mesenchymal stem cells secretome low molecular fraction on the liver functional state in rats with acute hepatitis. It has been established that the pharmacological composition based on secretome contributes to the normalization of basic biochemical parameters of the liver and the recovery of its morphological characteristics. The data obtained indicate the pronounced regenerative properties of the studied drug and the prospects of further research and development in this direction.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, secretome, regenerative properties, acute hepatitis, liver diseases.

**Введение.** Возможности регенеративной медицины при различных патофизиологических состояниях вызывают большой интерес со стороны практикующих врачей и исследователей. В качестве средств, способствующих репарации и оптимизации функций различных тканей, широко применяют препараты, содержащие биологически активные вещества фетоплацентарного происхождения, включая кордовую кровь и экстракты плаценты [2]. Но в последние годы фокус внимания сместился в сторону разработки препаратов с регенеративными свойствами на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и комплекса секретуемых ими веществ – секретома [3, 5, 11, 17]. В настоящее время доказано, что терапевтический эффект МСК обусловлен не только их способностью мигрировать в зону повреждения и посредством дифференцировки компенсировать функциональную недостаточность поврежденных клеток [15], но и их участием в процессе восстановления тканей за счет паракринных функций. В состав секретома МСК входит ряд низко-

молекулярных соединений, в том числе трофические факторы и такие регуляторные молекулы, как факторы роста, хемокины и цитокины, а также различные виды экзосом и микровезикул [6, 7, 12], которые в совокупности способны оказывать выраженное иммуномодулирующее действие, антиоксидантный и антигипоксикантный эффекты, стимулировать регенерацию и влиять на процессы апоптоза [11, 17]. В связи с этим на сегодняшний день актуально исследование возможностей применения фармакологических композиций на основе секретома МСК в качестве терапевтического инструмента, который помимо указанных преимуществ исключает и риски применения цельноклеточных препаратов – иммунное отторжение, нежелательную дифференцировку и онкогенез [7, 13, 16].

Ввиду выраженной регенеративной активности подобных фармакологических композиций последнее время появился интерес к их применению в случаях острых и хронических заболеваний печени, когда собственной способности органа к регенера-

ции недостаточно и скорость повреждения гепатоцитов превышает скорость их восстановления [8, 9]. Предполагается, что биологически активные компоненты секрета МСК обладают высоким терапевтическим потенциалом при печеночной недостаточности и смогут не только предотвратить дальнейшее повреждение печени, но и стимулировать регенерацию гепатоцитов [8]. В ряде исследований описана роль хемокинов и трофических факторов, секретлируемых МСК, в снижении интенсивности апоптоза, воспаления тканей и фиброза печени, что способствовало общему улучшению функции печени [10, 18].

Один из препаратов этой группы состоит из низкомолекулярной фракции (до 50 кДа) секрета МСК собак. Данный препарат содержит комплекс регуляторных веществ (главным образом белково-пептидной природы) и обладает широким спектром действия.

**Цель исследования.** Изучение влияния низкомолекулярной фракции секрета МСК на функциональное состояние печени при остром гепатите.

**Материалы и методы. Животные.** Исследование выполнено на 80 половозрелых нелинейных белых крысах-самцах возрастом 5–7 месяцев массой 250–320 г. Все манипуляции выполнены в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным, регламентированными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986).

**Моделирование патологии.** Модель острого гепатита была выполнена путем однократного введения крысам в желудок через зонд парацетамола (ацетоминофена) в виде суспензии в дозе 1000 мг/кг [4].

**Схема эксперимента.** Животные были разделены на четыре группы, по 20 крыс в каждой:

- интактный контроль – не применялось воздействие;
- положительный контроль – смоделирована патология, не проводилось лечение;
- опытная группа – смоделирована патология, после чего проводилось лечение препаратом на основе низкомолекулярной фракции секрета МСК

ежедневно в течение 5 дней, в/м в дозе 0,08 мг/кг (пересчет по белково-пептидному компоненту);

- группа сравнения – смоделирована патология, после чего проводилось лечение препаратом сравнения «Гамавит» ежедневно в течение 5 дней, в/м в дозе 0,5 мл/кг массы тела крысы.

**Информация об исследуемых веществах.**

Низкомолекулярная фракция секрета МСК производства ООО «NoviStem» является лиофильно высушенным ультрафильтратом (до 50 кДа) кондиционной среды, полученной в процессе культивирования мезенхимальных стволовых клеток собак. В качестве препарата сравнения использовался кислотный гидролизат денатурированной эмульгированной плаценты («Гамавит», ЗАО «Микро-Плюс»). Экстракты плаценты относятся к группе комбинированных биостимуляторов, которые часто применяются самостоятельно или в рамках комплексных схем лечения животных для ускорения восстановления пораженных органов, в том числе и печени [14].

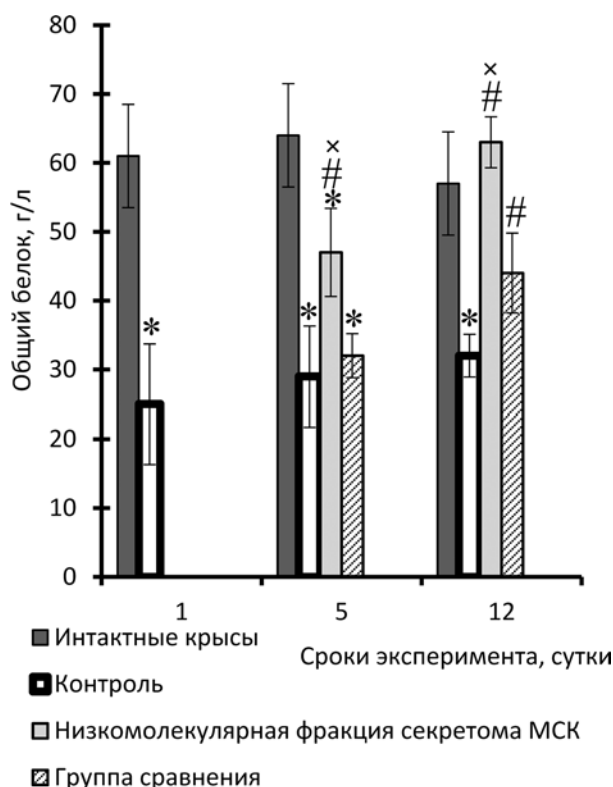
**Исследуемые показатели.** На 1-е, 5-е и 12-е сутки эксперимента часть животных выводили из опыта. Проводилось макроскопическое исследование печени и биохимический анализ сыворотки крови (печеночные пробы: общий белок, аспаратаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза, прямой и общий билирубин). Биохимические исследования проводили согласно инструкциям к наборам реактивов для определения соответствующих показателей функционального состояния печени и оценивали согласно [1].

**Модель исследования.** Рандомизированное испытание в параллельных группах с контролем патологии и активным контролем. Для проверки вида распределения был применен W-критерий Шапиро-Уилка. Во всех случаях распределение признаков соответствовало закону нормального распределения. Статистический анализ экспериментальных данных проведен с использованием программного пакета «StatGraphics Plus 2.1» при помощи параметрического t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследований и их обсуждение.** На первом этапе исследования

была подтверждена успешность моделирования патологии печени. Все исследуемые показатели, указывающие на функциональное состояние печени, в группе контроля патологии статистически значимо ( $p \leq 0,01$ ) отличались от показателей в группе интактных животных и значительно выходили за пределы нормы (рис. 1–3).

Так, содержание общего белка в первые сутки снизилось более чем в 2,4 раза по сравнению с показателем интактных крыс и сохранялось на этом уровне вплоть до 12 суток (рис. 1). Вместе с тем в группе животных, которые в качестве терапии получали низкомолекулярную фракцию секрета МСК, уже на 5-е сутки наблюдалось повышение содержания белка в сыворотке крови на 62% по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ).



**Рис. 1.** Влияние низкомолекулярной фракции секрета МСК и препарата сравнения «Гамавит» на содержание общего белка в сыворотке крови крыс с острым гепатитом

*Примечание:* \* – отличия статистически значимы по сравнению с показателем интактных крыс в соответствующий срок эксперимента,  $p \leq 0,01$ ; # – отличия статистически значимы по сравнению с контролем в соответствующий срок эксперимента,  $p \leq 0,05$ ; x – отличия статистически значимы по сравнению с показателем группы сравнения,  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  среднеквадратическое отклонение

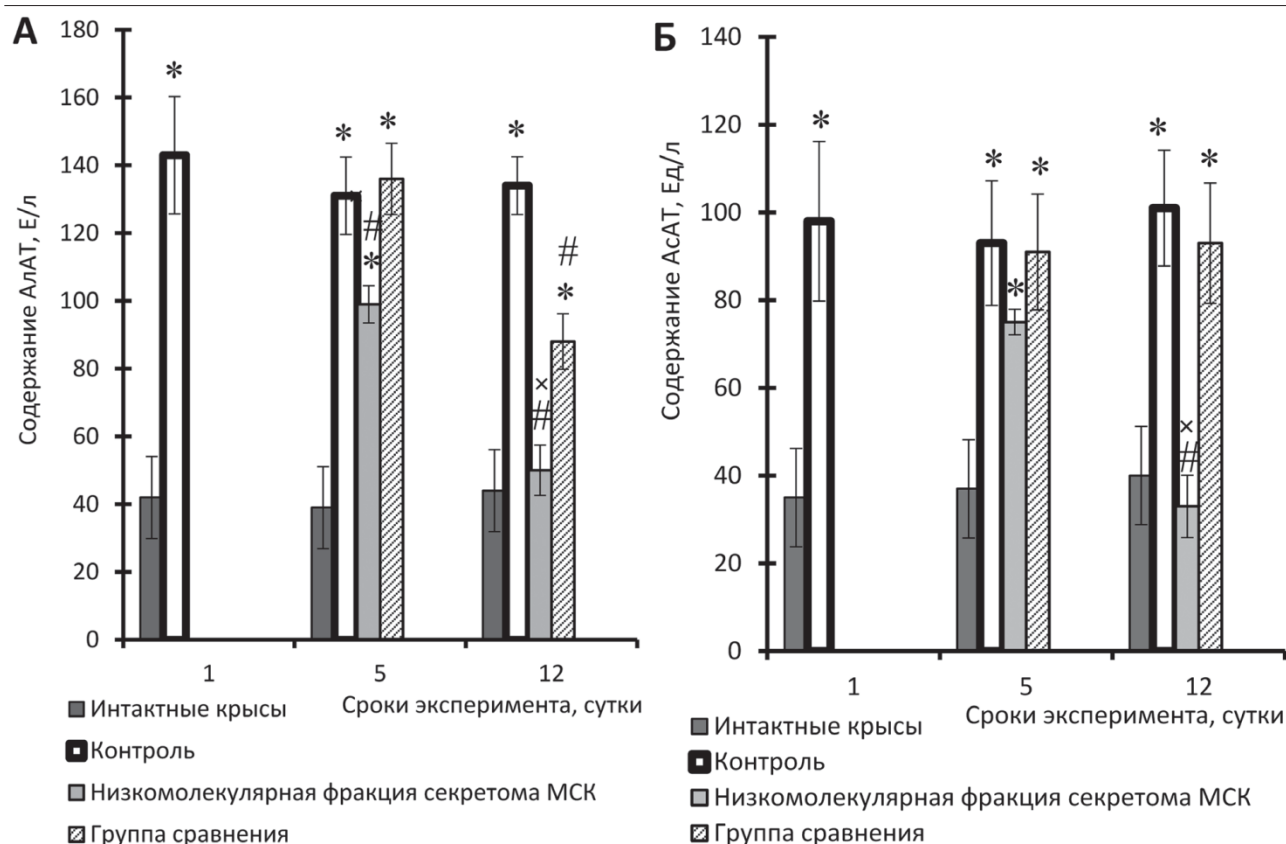
В группе сравнения на данном сроке такого эффекта не наблюдалось, но к 12-м суткам происходило статистически значимое повышение показателя на 37,5% по отношению к контролю. Как видно из рисунка 1, в группе терапии низкомолекулярной фракцией секрета МСК на 12-е сутки эксперимента происходило полное восстановление содержания общего белка, сопоставимое с таковым у интактных животных, при этом показатель был на 43% выше, чем в группе сравнения ( $p \leq 0,05$ ).

При исследовании содержания в сыворотке крови ферментов, которые являются одними из самых показательных маркеров функционального состояния печени, выявлено, что у крыс при моделировании острого гепатита происходит резкое 3-кратное увеличение содержания АлАТ (рис. 2А) и АсАТ (рис. 2Б).

На 5-е сутки эксперимента в опытной группе наблюдалась тенденция к нормализации содержания АлАТ, зафиксировано статистически значимое его снижение по отношению к контролю ( $p \leq 0,01$ ) и к группе сравнения ( $p \leq 0,01$ ). К окончанию срока наблюдения низкомолекулярная фракция секрета МСК способствовала нормализации содержания АлАТ в полной мере, тогда как данный показатель в группе сравнения еще не достигал значений нормы. Похожая динамика изменений наблюдалась и для АсАТ (рис. 2Б).

Анализ содержания общего билирубина показало, что в вариантах с исследуемым препаратом отмечались статистически значимые различия показателя по сравнению с группой контроля, при этом уже на 5-е сутки эксперимента значения возвращались в диапазон нормы (рис. 3А). В группе препарата сравнения также зафиксировано статистически значимое снижение содержания общего билирубина по отношению к контролю, при этом восстановления до уровня показателя интактных животных не наблюдалось ни на 5-е, ни на 12-е сутки, что может быть связано с необходимостью применения данного препарата в комплексной схеме лечения.

На рис. 3Б представлены результаты изучения содержания прямого билирубина. В данном случае в опытной группе



**Рис. 2.** Изменение содержания АлАТ (А) и АсАТ (Б) в сыворотке крови крыс с острым гепатитом при терапии низкомолекулярной фракцией секретома МСК и препаратом сравнения «Гамавит»

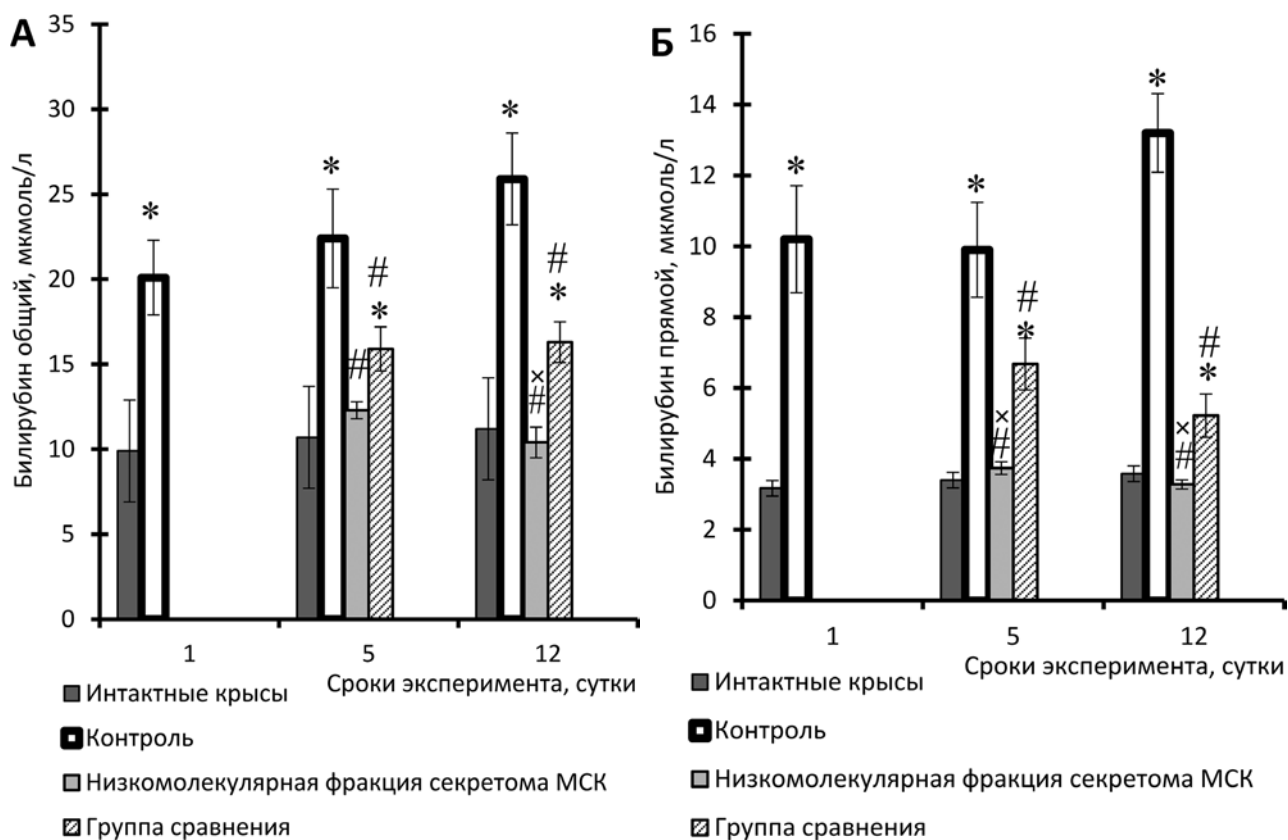
*Примечание:* \* – отличия статистически значимы по сравнению с показателем интактных крыс в соответствующий срок эксперимента,  $p \leq 0,01$ ; # – отличия статистически значимы по сравнению с контролем в соответствующий срок эксперимента,  $p \leq 0,05$ ; x – отличия статистически значимы по сравнению с показателем группы сравнения,  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  среднеквадратическое отклонение.

(низкомолекулярная фракция секретома МСК) также наблюдалось восстановление показателя до значений нормы, тогда как в группе сравнения на этом сроке еще отсутствовали статистически значимые различия с положительным контролем, т.е. группой интактных крыс.

Данные биохимического анализа были подтверждены патоморфологическими исследованиями. Макроскопический осмотр печени интактных крыс на 5-е и 12-е сутки, а также крыс, получавших терапию низкомолекулярной фракцией секретома МСК, на 12-е сутки показал нормализацию ее состояния: форма и величина печени не были изменены относительно нормальных; поверхность печени была гладкой, однородной темно-красной окраски; ткань печени на разрезе была темно-красной. Капсула печени была тонкой, прозрачной; консистенция печени имела обычную плотность.

Крысы группы контроля патологии на 5-е и 12-е сутки, а также крысы группы сравнения на 5-е сутки (на 12-е в гораздо меньшей степени) и опытной группы крысы на 5-е сутки (но не на 12-е) имели признаки очагов колликвационного некроза, белковой и жировой дистрофии гепатоцитов, локализованных преимущественно в центральной зоне печеночной доли, где максимальна активность зависимых от цитохрома Р-450 монооксигеназ и преобладает продукция повреждающих метаболитов примененного гепатотоксина.

**Заключение.** Результаты биохимических и макроскопического анализов указывают на то, что применение низкомолекулярной фракции секретома МСК способствует восстановлению функциональных показателей при модели острого гепатита у крыс *in vivo*. Следовательно, проведенное исследование подтверждает



**Рис. 3.** Динамика изменения содержания общего (А) и прямого билирубина (Б) в сыворотке крови крыс с острым гепатитом при терапии низкомолекулярной фракцией секретома МСК и препаратом сравнения «Гамавит»

*Примечание:* \* – отличия статистически значимы по сравнению с показателем интактных крыс в соответствующий срок эксперимента,  $p \leq 0,01$ ; # – отличия статистически значимы по сравнению с контролем в соответствующий срок эксперимента,  $p \leq 0,05$ ; x – отличия статистически значимы по сравнению с показателем группы сравнения,  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как среднее арифметическое  $\pm$  среднеквадратическое отклонение.

предположение о том, что препараты, полученные на основе секретома МСК, обладают терапевтическим эффектом в отношении процесса регенерации и функционального восстановления тканей печени. В целом полученные данные являются предпосылкой для разработки фармацевтических композиций на основе секретома МСК и протоколов их использования при печеночной недостаточности различной этиологии.

**Литература**

1. Абрашова Т. В., Гуцин Я. А., Ковалева М. А. и др. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: ЛЕМА, 2013.
2. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение / под ред. А. Н. Гольцева, Т. Н. Юрченко. Харьков: ХНМУ, 2013.
3. Ратушняк М. Г., Северин С. Е. Роль цитокинов, секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками, в стимуляции процессов регенерации мозга // Молекулярная медицина. 2017. Т. 15. № 1. С. 10–14.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / под ред. А. Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. С. 710–719.
5. Ястребов А. П., Гребнев Д. Ю., Маклакова И. Ю. Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной медицине. Екатеринбург: УГМУ, 2016.
6. Chen H. X., Liang F. C., Gu P., et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy // Cell Death Dis. 2020. Vol. 11. No. 4. P. 288.
7. Cunningham C. J., Wong R., Barrington J., et al. Systemic conditioned medium

- treatment from interleukin-1 primed mesenchymal stem cells promotes recovery after stroke // *Stem Cell Research & Therapy*. 2020. Vol. 11. No. 1. P. 32.
8. *Damania A., Jaiman D., Teotia A. K., et al.* Mesenchymal stromal cell-derived exosome-rich fractionated secretome confers a hepatoprotective effect in liver injury // *Stem Cell Res Ther*. 2018. Vol. 9. No. 1. P. 31.
  9. *De Miguel M. P., Prieto I., Moratilla A., et al.* Mesenchymal stem cells for liver regeneration in liver failure: from experimental models to clinical trials // *Stem Cells Int*. 2019. Article ID: 3945672.
  10. *Ezquer F., Bruna F., Calligaris S., et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells: a promising strategy to manage alcoholic liver disease // *World J Gastroenterol*. 2016. Vol. 22. No. 1. P. 24.
  11. *Fahy N., Alini M., Stoddart M. J.* Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: implications for cartilage tissue engineering // *J. Orthop Res*. 2018. Vol. 36. No. 1. Pp. 52–63.
  12. *Ferreira J. R., Teixeira G. Q., Santos S. G., et al.* Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning // *Front Immunol*. 2018. No. 9. P. 2837.
  13. *Harrell C. R., Fellabaum C., Jovicic N., et al.* Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome // *Cells*. 2019. Vol. 8. No. 5. P. 467.
  14. *Jung J., Lee H. J., Lee J. M., et al.* Placenta extract promote liver regeneration in CCl4-injured liver rat model // *Int. Immunopharmacol*. 2011. No. 11. Pp. 976–984.
  15. *Keshtkar S., Azarpira N., Ghahremani M. H.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine // *Stem Cell Research and Therapy*. 2018. No. 1 (9). Pp. 1–9.
  16. *Kumar L. P., Kandoi S., Misra R., et al.* The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019. No. 46. Pp. 1–9.
  17. *Teixeira F. G., Carvalho M. M., Sousa N., et al.* Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? // *Cell Mol Life Sci*. 2013. Vol. 70. No. 20. Pp. 3871–3882.
  18. *Volarevic V., Nurkovic J., Arsenijevic N., et al.* Concise review: therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis // *Stem Cells*. 2014. Vol. 32. No. 11. Pp. 2818–2823.

### References

1. Abrashova T. V., Gushchin Y. A., Kovalova M. A., et al. (2013) Physiological, biochemical and biometric parameters of the norm of experimental animals. Saint-Petersburg, LEMA.
2. (2013) Placenta: cryopreservation, clinical use / ed. by A. N. Goltsev, T. N. Yurchenko. Kharkiv: KhNMU.
3. Ratushnyak M. G., Severin S. E. (2017) The role of mesenchymal stem cells secreting cytokines in the stimulation of the regeneration processes in the brain. *Molecular medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 10–14.
4. (2012) Guidelines for preclinical trials of medicines. Part 1 / ed. by A. N. Mironov. Moscow, Grif and K. Pp. 710–719.
5. Yastrebov A. P., Grebnev D. Yu., Maklakova I. Yu. (2016) Stem cells, their properties, sources of production and role in regenerative medicine. Ekaterinburg: USMU.