БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 11, с. 1701 – 1717

УДК 57.083.138

КОНДИЦИОННАЯ СРЕДА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК: НОВЫЙ КЛАСС ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Обзор

© 2019 Н.В. Богачева[1*,], М.Э. Колман[2]**

[1] *Division of Pulmonary and Critical Care, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, IUPUI, Indianapolis, IN 46202, USA; E-mail: nbogatch@iu.edu*

[2] *Theratome Bio, Inc., Indianapolis, IN 46202, USA; E-mail: mcoleman@theratomebio.com*

Поступила в редакцию 02.06.2019
После доработки 17.07.2019
Принята к публикации 17.07.2019

Мезенхимальные стромальные клетки (MSC – mesenchymal stromal cell) активно разрабатываются как класс биологических препаратов с перспективой применения в качестве иммуномодулирующих, заживляющих и регенерационных терапевтических средств. Наряду с клеточной терапией также активно развивается бесклеточная терапия, в основе которой лежат секретируемые MSC биоактивные факторы. MSC секретируют различные белки и пептиды, РНК и липиды, которые могут быть сконцентрированы, заморожены или даже лиофилизированы без потери активности, что дает определенное преимущество перед клетками, требующими хранения в жидком азоте и специальной инфраструктуры для размораживания. В настоящем обзоре: 1) описаны недавно проведенные клинические испытания бесклеточных продуктов, содержащих секретом MSC; 2) обобщены основные подходы, используемые для получения и характеризации концентратов кондиционной среды и препаратов внеклеточных везикул (EV); 3) проведен анализ доклинических исследований, в которых показана эффективность применения секретомных продуктов и 4) суммированы данные о биоактивных компонентах секретома, полученные с помощью анализа моделей *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: MSC, секретом, кондиционная среда, внеклеточные везикулы, экзосомы.

DOI: 10.1134/S0320972519110125

Мезенхимальные стволовые (не эмбриональные) клетки взрослых (MSC) впервые были выделены из костного мозга (BM-MSC). В настоящее время их легко получают из других источников, таких как жировая ткань (ASC), пуповина (UC-MSC), амнион, плацента и пульпа зуба (DP-MSC). Было обнаружено, что MSC способны модулировать иммунный ответ, поддерживать строму гематопоэтических клеток и их трансдифференцировку в различные типы клеток. В результате были проведены многочисленные доклинические исследования и в конечном итоге клинические испытания препаратов MSC для лечения больных с синдромом «трансплантат против хозяина», гематологических заболеваний и поражений костей и хряща [1]. В настоящее время сфера клинических испытаний MSC включает в себя болезни легких, почек и печени, сердечно-сосудистые и неврологические заболевания. Наибольший клинический прогресс, обусловивший одобрение коммерческих продуктов на основе MSC, был достигнут в применении BM-MSC при синдроме «трансплантат против хозяина» (продукт одобрен в Канаде и Японии) и при остром инфаркте миокарда (продукт одобрен в Южной Корее), в применении ASC при лечении подкожных свищей при болезни Крона (продукт одобрен в ЕС) и в применении UC-MSC для лечения поражения коленного хряща у больных с остеоартритом (продукт одобрен в Южной Корее) [2, 3]. В России развитие клеточной терапии было затруднено отсутствием законодательной базы: поправки, регулирующие использование био-

Принятые сокращения: MSC – мезенхимальные стволовые клетки, BM – костный мозг, ASC – адипозные мезенхимальные стволовые клетки, UC – пуповина, EV – внеклеточные везикулы, CM – кондиционная среда.

* Адресат для корреспонденции.

** Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

медицинских клеточных продуктов, были внесены в законы только в 2018 году. Эти изменения должны облегчить проведение в России клинических испытаний клеточных продуктов и, в частности, продуктов на основе MSC. Среди клинических испытаний, уже проведенных в России, можно отметить применение BM-MSC для профилактики острых проявлений синдрома «трансплантат против хозяина» [4, 5] и для продления жизнеспособности трансплантата гематопоэтических клеток [6, 7].

После того, как было показано, что вживление в ткань и трансдифференцировка MSC играют незначительную роль в эффектах клеточной терапии, установилось мнение, что полезные свойства MSC обусловлены краткосрочной секрецией биологически активных факторов, способствующих тканевой регенерации и обладающих иммуномодулирующими свойствами [8–10]. Были предприняты попытки проанализировать полезные свойства секретируемых факторов в различных моделях болезней. Бесклеточные препараты обладают определенными очевидными преимуществами перед клеточными препаратами. Известно, что интравенное введение клеток может привести к образованию тромбов; менее очевидные побочные эффекты MSC могут быть связаны с индукцией аритмии [11], окостенением и кальцификацией [12]. Следует также принять во внимание, что некоторые способы криоконсервации клеток могут приводить к снижению выживаемости и активности MSC в условиях *in vivo* [13]. Использование бесклеточных препаратов не будет сопряжено с этими потенциальными эффектами и последствиями. Особенно важно то, что бесклеточные препараты не требуют наличия дорогого оборудования, необходимого для экстракции аутологичных клеток и/или *ex vivo* экспансии аутологичных и аллогенных клеток. По этой причине бесклеточные препараты могут обладать преимуществом, если лечение в острых случаях должно осуществляться в сельских больницах или в полевых условиях, таких как, например, при ведении боевых действий. Вероятно, противопоказания для бесклеточной терапии будут аналогичны таковым для клеточной терапии, приводя к необходимости исключить пациентов с активно развивающимся раком. Известно, что внеклеточные везикулы (EV – extracellular vesicles), секретируемые MSC, могут быть целенаправленно захвачены опухолевыми клетками. В то время как эффекты MSC EV на раковые клетки варьируют от подавляющих опухоль [14, 15] до опухоль-индуцирующих [16, 17], сама способность этих везикул проникать в опухолевые клетки [18] привела к разработке модификаций EV для специфической доставки лекарств в опухолевые клетки [19]. Поскольку влияние MSC EV на развитие опухолей и стратегии по модификации EV с целью их направленного действия на опухолевые клетки были недавно подробно рассмотрены [20], мы предпочли не затрагивать эту тему в настоящем обзоре.

Бесклеточные препараты продуктов на основе MSC получают путем сбора среды, кондиционированной этими клетками. Препараты кондиционной среды (CM – conditioned media) отличаются от других биологических продуктов, так как они представляют собой смесь различных факторов, секретируемых клетками. В число этих факторов входят факторы роста и цитокины, ферменты, нуклеиновые кислоты и биоактивные липиды [21]. Основной проблемой для организации промышленного производства препаратов, приемлемых для последующего применения в клинике, является их стандартизация. В принципе получение препаратов CM является относительно простой процедурой. Она подразумевает приготовление «супа» из секретируемых факторов, его концентрирование или фракционирование и характеризация продукта с использованием ограниченного набора параметров. В целом, на основе CM разрабатываются два типа продуктов с целью их применения в медицине и косметологии, а именно концентраты CM и изоляты EV. Препараты первого типа содержат как EV, так и растворимые факторы, в то время как в препаратах второго типа отсутствуют факторы, не ассоциированные с EV напрямую. Препараты, произведенные для клинических испытаний, должны быть тщательно охарактеризованы; однако из-за относительной новизны бесклеточных препаратов общепринятые стандарты еще не разработаны, и маркеры потенциала однозначно не определены и варьируют от исследования к исследованию. Обзор данных литературы показывает, что в препаратах часто оцениваются уровни специфических цитопротекторных и иммуномодулирующих факторов в контексте их доказанной или предполагаемой значимости для конкретного клинического применения. В отдельных случаях препараты CM проверяют на присутствие провоспалительных факторов [22, 23]. Препараты EV обычно характеризуют по размеру и количеству частиц, наличию EV-специфичных поверхностных маркеров и по общей концентрации белка [23, 24]. В настоящее время информация о многофакторном анализе состава клинического продукта и корреляции с его безопасностью и терапевтическим потенциалом крайне ограничена. Препараты, произведенные для доклинических испытаний, охарактеризова-

ны еще более скудно; концентраты CM иногда охарактеризованы только как сконцентрированные в *n* раз; изоляты EV охарактеризованы по концентрации белка и/или числу частиц (табл. 1, 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАННИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В связи с тем, что бесклеточная терапия была протестирована лишь в ограниченном количестве клинических испытаний, данные литературы по этой теме немногочисленны. Аналогично клеточным препаратам бесклеточные препараты тестируются для многопрофильного применения. Так, ASC-CM оказалась перспективной терапией для заживления кожных ран после лазерной шлифовки кожи [25] и для лечения алопеции [26, 27]. Препараты BM-MSC-CM способствовали увеличению объема кости при синуслифтинге в зубной имплантологии [28]. Комбинация препаратов BM-MSC и кондиционной среды показала свою безопасность и возможную эффективность при лечении рассеянного склероза [22]. EV из UC-MSC показали обнадеживающий результат при лечении синдрома «трансплантат против хозяина» [23] и хронического заболевания почек [24]. В настоящее время препараты EV из MSC тестируются для лечения диабета 1-го типа, макулярной дистрофии сетчатки глаза и острого ишемического инсульта [29]. Ранние исследования, необходимые для доказательства концепции терапевтического эффекта, требуют тестирования препаратов от нескольких доноров. В будущем проблема гетерогенности донорских препаратов может быть решена путем иммортализации секретирующей линии клеток [30] или альтернативно, путем селекции донорских клеток, отобранных по стандартизованным критериям. Линию секретирующих клеток также можно будет подвергнуть генетической модификации с целью повышения продукции определенных факторов [31] или чтобы сделать возможной экспрессию мембранных белков, обеспечивающих захват EV определенными тканями [32].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНДИЦИОННОЙ СРЕДЫ MSC В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В связи с ограниченностью данных о клинических испытаниях бесклеточных препаратов анализ доклинических испытаний может дать более полное представление о разнообразии подходов, применяемых в настоящее время в этой области. Данный обзор не ставил задачи описать всю полноту доклинических результатов. Мы хотели дать читателю представление об основных подходах к производству и применению бесклеточных препаратов. Нами также была предпринята попытка обобщить данные, касающиеся биоактивных компонентов, с которыми связаны наблюдаемые *in vivo* эффекты.

Для доклинических исследований препараты кондиционной среды получаются на основе культивирования нестимулированных, неконфлуентных MSC, инкубированных в течение 0,5–5 дней; собранная среда очищается от клеточных остатков с помощью центрифугирования и/или фильтрации через фильтры с порами диаметром 0,22 мкм. В некоторых работах MSC во время кондиционирования подвергали гипоксии [31] или длительному голоданию. В других случаях клетки выращивали в трехмерных структурах, называемых сфероидами, чтобы достичь более высокой плотности клеточных культур [33, 34]. Более продвинутые подходы заключаются в генетической модификации MSC с целью увеличения секреции клетками определенных факторов [31, 35, 36] или чтобы позволить секретировать факторы, индуцированные гипоксией, в культуре с нормальным уровнем кислорода [37]. Аналогичные подходы могут использоваться для включения тканенаправляющих пептидов в мембраны секретируемых внеклеточных везикул [32].

Препараты кондиционной среды могут затем быть протестированы *in vivo* в исходном виде или же после их концентрирования с помощью низкомолекулярных фильтров, или, в редких случаях, после их лиофилизации и последующего разведения. В табл. 1 приведены примеры доклинических тестов неконцентрированных или сконцентрированных CM в различных моделях болезней и описаны наблюдавшиеся при этом эффекты.

Альтернативно из кондиционной среды можно выделить внеклеточные везикулы, используя ультрацентрифугирование, осаждение полиэтиленгликолем, реагент Exo-Quick TC или HPLC гель-фильтрацию (табл. 2). Так как различные методы приводят к получению препаратов, обогащенных либо более мелкими экзосомами, либо более крупными микровезикулами, производители должны иметь виду, что биологическая активность этих фракций может отличаться друг от друга [38, 39]. В недавнем обзоре Fujita et al. было обобщено применение MSC EV в доклинических моделях заболеваний легких, включая пневмонию/острое поражение легких, фиброз легких, силикоз, COPD, астму, легочную

Таблица 1. Примеры доклинических испытаний с использованием обычных концентратов СМ

Источник СМ	Модель	Препарат	Доза/Способ введения	Ссылка	Эффект
1	2	3	4	5	6
Внутренние органы					
BM-MSC	индуцированное липополисахаридом повреждение легких	25× концентрат, низкомолекулярный фильтр (cut-off) 3 кДа	30 мкл/мышь; в трахею	[80]	снижение воспаления и отека легких
ASC	индуцированная монокроталином легочная гипертензия	60× концентрат, cut-off = 3 кДа	100 мкл/крыса; внутривенно, в яремную вену	[81]	улучшение кровотока в легких; подавление преобразований в сердечной мышце
ASC	индуцированный блеомицином фиброз легких	60× концентрат, cut-off = 3 кДа	100 мкл/крыса; внутривенно, в яремную вену	[81]	снижение уровня коллагена в легких
BM-MSC	индуцированная овальбумином астма	50× концентрат, cut-off = 4 кДа	50 мкл/крыса; в трахею	[82]	снижение уровня гистопатологических изменений; уменьшение количества лейкоцитов в смывах
BM-MSC	фулминантная печеночная недостаточность	25× концентрат, cut-off = 3 кДа	900 мкл/крыса; внутривенно, в половой член	[83]	пониженный уровень инфильтрации лейкоцитов и некроза клеток печени, редукция дупликации желчных протоков
BM-MSC ASC	повреждения почек, вызванные цисплатином	неконцентрированный препарат	1 мл/мышь; 2 раза в день внутрибрюшинно	[84]	снижение патологических процессов в почке, повышение выживаемости
Сосудистая/сердечно-сосудистая система					
BM-MSC	сердце после инфаркта	концентрированный препарат от MSC, экспрессирующих Akt1 в условиях гипоксии	600 мкл/крыса; в 5 точек на границе зоны инфаркта	[31]	уменьшение площади инфаркта, улучшение функционирования желудочков
ASC	критическая ишемия конечностей	получен из клеток, растущих в сфероидных культурах высокой плотности	40 мкл/мышь; ежедневно в мышцы бедра	[33]	повышение плотности кровеносных сосудов, предотвращение некроза конечностей и восстановление кровообращения
Кости и суставы					
BM-MSC	индуцированный антигеном артрит	концентрат, cut-off = 3 кДа	15 мкл/мышь; в коленный сустав	[85]	снижение отечности суставов и утраты хрящевой ткани, понижение секреции TNFα
ASC	хирургические повреждения костей	неконцентрированный препарат из ASC, кондиционированых в условиях гипоксии	17 мкл/кролик; в гидрогель, нанесенный на поврежденную челюсть	[86]	индукция регенерации костей

Окончание таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Мозг/нервная система					
ASC	амиотрофный латеральный склероз у мышей $SOD1^{G93A}$	концентрированный	200 мкл/мышь; ежедневно внутрибрюшинно	[87]	повышение выживаемости с момента проявления симптомов и увеличение продолжительности жизни
DP-MSC	неонатальное повреждение мозга	неконцентрированный	2 мкл/мышь; P5 в ипсилатеральное полушарие	[88]	подавление патологических изменений после гипоксии/ишемии
BM-MSC	экспериментальный аллергический энцефалит	10× концентрат, cut-off = 3кДа	0,5 мг/мышь; внутривенно 3 раза	[89]	снижение функционального дефицита; поддержка развития олигодендроцитов и нейронов
BM-MSC	спиноцеребеллярная атаксия у мышей, нокаутированных по *sca1*	неконцентрированный	25–100 мкл/мышь; >4 раз внутривенно в орбитальную вену или 10 мкл/мышь интратекальная инъекция	[90]	подавление дегенерации аксонов и миелина в моторных нейронах спинного мозга
Кожа					
UC-MSC	дерматит в результате действия радиации	лиофилизированная/разведенная	200 мкл гидрогеля CM 5 мкг/мл на рану	[91]	ускоренное заживление раны

артериальную гипертензию и бронхолегочную дисплазию [29]. В табл. 2 мы приводим дополнительные данные о разнообразных доклинических испытаниях MSC EV.

Сравнение таблиц 1 и 2 позволяет понять, что как препараты CM, так и изоляты EV эффективны в различных моделях болезней внутренних органов, а также в моделях сосудистых, скелетных и неврологических заболеваний. В доклинических исследованиях было показано, что как EV [39, 40], так и CM [41] могут подвергаться криоконсервации без критической потери биологической активности. Итак, являются ли изоляты EV CM более мощными терапевтически, чем концентраты CM? В табл. 3 мы попытались сравнить концентрированные препараты CM и препараты EV. Так как сравнивать результаты различных исследований затруднительно, мы приводим исследования сходных моделей болезней, в которых пересчет был сделан на количество клеток, генерирующих терапевтический продукт, в тех случаях, когда такого рода информация предоставлялась. При широкомасштабном производстве, которое необходимо для генерации препаратов клинической чистоты, экспансия клеток будет вносить значительный вклад в стоимость процесса, и это обстоятельство должно учитываться с практической точки зрения.

В связи с тем, что детали производства тестируемого продукта, касающиеся количества генерирующих клеток, часто отсутствуют в описании, табл. 3 содержит лишь ограниченное количество исследований. Однако их достаточно, чтобы дать читателю понять, что сходные эффекты наблюдались с EV, выделенными из количества клеток превышающего в ~10 раз количество, используемое для получения обычного концентрированного препарата CM. Даже если предположить, что ксеногенные EV обладают меньшей силой, чем видоспецифичные препараты CM, сравнение работ с использованием препаратов, полученных из клеток человека, в сходных моделях грызунов с повреждением легких бактерией *Escherichia coli* [42, 43] подтверждает это первоначальное наблюдение. Учитывая, что определенные биоактивные факторы, такие как VEGF, могут быть как растворимыми,

Таблица 2. Примеры доклинических испытаний препаратов MSC EV

Источник	Модель	Приготовление	Доза/Способ введения	Ссылка	Эффект
1	2	3	4	5	6
Внутренние органы					
Разные	легочные заболевания	разное	разные	описано в [29]	различные
BM-MSC	фульминантная недостаточность печени	2× ультрацентрифугирование	2×10^8 до 2×10^{10} частиц/мышь; внутрь трахеи, внутривенно	[40]	уменьшение повреждений печени; модуляция экспрессии цитокинов
BM-MSC	вызванное гентамицином повреждение почек	2× ультрацентрифугирование	500 мкл препарата в концентрации 100 мкг/мл белка/крыса; внутривенно	[48]	улучшение состояния почек после повреждений
Сосудистая/сердечно-сосудистая система					
BM-MSC	ишемия/реперфузия миокарда	экзосомы, очищенные с помощью HPLC	0,4 мкг белка в 200 мкл/мышь; внутривенно, в хвостовую вену	[92]	снижение площади инфаркта
BM-MSC	критическая ишемия конечностей		инъекция без или с матригелем в конечность, подверженную ишемии	[93]	усиление ангиогенеза в конечностях, подвергшихся ишемии
Кости и суставы					
BM-MSC	индуцированный коллагеном остеоартрит	2× ультрацентрифугирование	250 нг в 5 мкл/мышь; в коленный сустав	[94]	снижение уровня повреждений суставов
BM-MSC, экспрессирующие стабильный HIF-1α (мутант)	индуцированный стероидами аваскулярный некроз кости	набор для выделения экзосом (Invitrogen, США)	40 мкг белка в 500 мкл/кролик; в головку бедренной кости	[37]	ускоренная регенерация кости и ангиогенез
Мозг/нервная система					
BM-MSC	фокальная церебральная ишемия	EVs, осажденные полиэтиленгликолем	EVs из 2×10^6 MSC в 250 мкл/мышь; внутривенно/в бедренную кость	[95]	уменьшение повреждения головного мозга
BM-MSC	болезнь Альцгеймера у мышей APP/PS1	EVs, осажденные полиэтиленгликолем	100 мкг EV в 5 мкл/мышь; в внутричерепной желудочек	[96]	улучшение когнитивного поведения, предотвращение нарушения CA1 синаптической передачи

Окончание таблицы 2

1	2	3	4	5	6
BM-MSC	травматические повреждения головного мозга	ExoQuick-TC	100 мкг в 0,5 мл/крыса; внутривенно, IV в хвостовую вену	[97]	улучшение пространственного обучения, восстановление сенсорной и моторной функции
BM-MSC	расстройства аутистического характера у мышей BTBR	2× ультрацентрифугирование	$3{,}81 \times 10^8$ частиц/мкл; 5 мкл в день/мышь; 6X через день интраназально	[98]	повышение социальной активности; снижение повторяемости действий; улучшение материнского поведения
BM-MSC	повреждения спинного мозга	ультрацентрифугирование	1×10^{10} частиц 100 мкг в 0,5 мл/крыса; внутривенно, в хвостовую вену	[99]	уменьшение площади поражения; восстановление функций
Кожа					
UC-MSC	ожог	ультрацентрифугирование в 30% сахарозе/D_2O	200 мкг в 200 мкл подкожно в 3 точки	[51]	ускорение заживления ран

так и ассоциированными с EV [44], такое наблюдение неудивительно. С другой стороны, растворимая фракция CM при определенных условиях может быть лишена терапевтической активности. Например, было показано, что удаление EV приводило к потере терапевтического эффекта CM в модели бронхолегочной дисплазии, индуцированной гипоксией; в то же время EV-содержащая CM и EV, выделенные из CM, снижали воспаление легких у новорожденных животных и редуцировали морфологические изменения, вызванные гипоксией [45]. В данном исследовании препараты CM вводили путем внутрибрюшинной инъекции. Возможно, растворимые факторы CM менее эффективны при системном, чем при локальном введении. Суммируя результаты доклинических исследований, можно заключить, что производство рутинных концентратов CM может быть дешевле и быстрее и приводить к получению равных по силе или терапевтически даже более мощных по сравнению с EV препаратов. На сегодняшний день отсутствуют какие-либо данные, свидетельствующие о дополнительных побочных эффектах рутинных концентратов CM по сравнению с препаратами EV. Оба типа препаратов могут быть использованы в клинике. Однако при получении клинического препарата также необходимо учитывать другие критерии, такие, как соответствие правилам GMP (Good Manufacturing Practices) и возможность оптимизации для производства большой партии продукта. Ни метод гель-фильтрации, ни ультрацентрифугирование, которые обычно используются для получения препаратов EV, не могут быть адаптированы для широкомасштабного производства. К дополнительным критериям выбора производства препарата, помимо практических соображений себестоимости и времени, затраченного на производство, могут также относиться аспекты согласования процесса производства и конечного продукта с регуляторными инстанциями и аспекты наличия интеллектуальной собственности (патентов защищающих производство).

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ CM ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ПАТОЛОГИЙ

Известно, что концентрированные препараты CM и препараты EV содержат белки, РНК и липиды [21]. С помощью методов секвенирования мРНК нового поколения и протеомного анализа было показано, что EV обогащены мРНК и белками с ангиогенной функцией (включая факторы роста, факторы транскрипции, белки адгезии/матрикса и регулирующие их белки), а также мРНК и белками с антиапоптотической и антиоксидантной функцией [46].

Таблица 3. Сравнение обычных концентратов СМ с изолятами EV в плане увеличения количества MSC, необходимого для получения препарата СМ

Концентрированная СМ				Препарат EV			
Источник, способ введения	Модель	Число клеток на животное	Эффект и ссылка	Источник, способ введения	Модель	Число клеток на животное	Эффект и ссылка
Мышь, BM-MSC, в трахею	LPS внутрь трахеи, воспаление легких	$0,25 \times 10^6$ на мышь	снижение отека легких/воспаления [80]	человек, BM-MSC, в трахею	LPS внутрь брюшины, воспаление легких	3×10^6 на мышь	снижение отека легких/воспаления [74]
Мышь, ASC, внутривенно	LPS внутрь трахеи, воспаление легких	$0,18 \times 10^6$ на мышь	уменьшение отека легких и уровня воспалительных цитокинов [41]				
Человек, BM-MSC внутривенно	*E. coli* внутрь трахеи, воспаление легких	4×10^6 на крысу	повышение выживаемости без существенного влияния на воспаление/отек легких через 48 ч [42]	человек, BM-MSC внутрь трахеи/внутривенно	*E. coli* внутрь трахеи, воспаление легких	6×10^6 внутрь трахеи; 9×10^6 внутривенно на мышь	повышение выживаемости и значительное влияние на процесс воспаления/отека легких через 24 ч [43]
Крыса, BM-MSC внутрь трахеи	индуцированное вентиляцией воспаление легких	4×10^6 на крысу	уменьшение отека/воспаления легких [100]				
Крыса, BM-MSC внутривенно	индуцированное вентиляцией воспаление легких	4×10^6 на крысу	уменьшение отека легких без существенного влияния на воспалительный процесс [101]				

Анализ мРНК EV из MSC свиней, содержащихся на постной или богатой жирами диете, показывает, что MSC EV из «худых» животных содержат меньшее количество мРНК иммуномодулирующих генов, тогда как MSC EV животных, получавших жирную пищу, содержат меньшее количество мРНК генов, регулирующих фиброз [47]. Эта информация может быть полезна при выборе доноров MSC и скрининге терапевтического потенциала MSC при подготовке к конкретному клиническому применению. Наиболее же ценная информация, относящаяся к процессу оптимизации производства препаратов СМ, приходит к нам из исследований, показывающих, как изменения специфических компонентов в препаратах влияют на их терапевтический потенциал в моделях конкретных болезней. Ниже мы суммируем сведения о компонентах СМ, роль которых была проверена при тестировании бесклеточных препаратов в моделях определенных заболеваний. Мы также приводим работы, в которых тестировался терапевтический потенциал клеток, а не бесклеточных препаратов, но при этом была подтверждена секреция специфического фактора в кондиционную среду. Эти работы суммированы в табл. 4.

Белки. Роль целого класса факторов для терапевтической активности может быть продемонстрирована, если его полное удаление из препарата СМ приводит к потере активности. Первые результаты в этом направлении были достигнуты при сравнении терапевтического потенциала СМ, полученной после инкубации MSC с концентрациями трипсина или РНКазы, не влияющими на жизнеспособность MSC. Было замечено, что обработка клеток трипсином

значительно снижала терапевтический потенциал CM в модели повреждения почек, в то время как обработка РНКазой приводила к еще большей потере терапевтического потенциала [48]. В сумме эти данные свидетельствуют о том, что как белковый, так и нуклеиновый компоненты важны для защиты/регенерации почек, и РНК обладает большим потенциалом по сравнению с белками.

Роль определенных компонентов в терапевтическом эффекте может быть определена из простого сравнения препаратов CM, продуцированных MSC различных биологических видов. Например, в CM BM-MSC человека содержалось в пять раз меньше VEGF, чем в CM BM-MSC свиньи. Инъекция препарата CM свиньи вызывала значительное улучшение сердечной функции у хомяков с кардиомиопатией, а инъекция CM человека была неэффективна [49], указывая на роль VEGF в кардиопротекции. В работе Gnecchi et al. [31] было показано, что повышенная экспрессия Akt1 в MSC и дальнейшая стимуляция этих клеток гипоксией приводили к (5–10)× увеличению уровня секреции VEGF, bFGF, HGF, IGF1 и TB4, по сравнению с нативными или находящимися в условиях гипоксии MSC. Соответственно, было показано, что в модели инфаркта миокарда CM из находящихся в условиях гипоксии Akt1-MSC превосходит по потенциалу CM из контрольных или гипоксических GFP-MSC, указывая на ключевую роль VEGF, bFGF, HGF, IGF1 и TB4 в процессе регенерации миокарда. Альтернативный подход для индукции трофических факторов был использован, когда клетки переносили в 3D-сфероидные культуры [33, 34]. В этих условиях культивирования секреция проангиогенных VEGF, bFGF, HGF и CXCL12 была увеличена более чем 20×. Как и ожидалось, препараты CM из сфероидных культур демонстрировали улучшенную перфузию в модели ишемии задней конечности [33] и ускоренное заживление ран [34] по сравнению с CM из монослойных культур. В целом эти исследования доказывают, что уровни проангиогенных факторов коррелируют с терапевтическим потенциалом CM в моделях, зависимых от степени регенерации сосудистой системы. Кроме того, вышеуказанные методы усиления проангиогенных свойств CM могут использоваться всякий раз, когда CM производится для клинического облегчения состояний, требующих усиленного ангиогенеза.

Таблица 4. Терапевтическая роль компонентов CM, подтвержденная в исследованиях *in vivo*

Орган/система	Белки/мРНК	miR	lncРНК	Липиды
Легкие	TSG6 [45] VEGF [44] KGF [74]			
Печень	глутатионпероксидаза 1 [53]	miR-122 [71] miR-125b [69] miR-223 [67]	Y-RNA-1 [40]	
Почки		miR-let7c [70] miR-30 [64]		
Сосудистая/сердечно-сосудистая	VEGF [33, 34] bFGF [33, 34] HGF [33, 34] CXCL12 [33, 34] IGF1 [31] TB4 [31] Wnt4 [51, 52]	miR-19a [36] miR-22 [65] miR-223 [66]		
Мозг/нейронная	неприлизин [50]	кластер miR 17-92 [35]: miR-17 miR-18a miR-19a miR-19b miR-20a miR-92a		PGE_2 [75]
Иммунная	IDO [56] галектин-3 [54] TSG6 [45]	miR-223 [66]		

Мембраносвязанные белки СМ представляют еще один класс факторов с потенциальным значением для клинического применения. Неприлизин является мембраносвязанным ферментом, вызывающим деградацию β-амилоидного пептида, характерного для болезни Альцгеймера. ASC и их экзосомы характеризуются более высокой экспрессией неприлизина по сравнению с BM-MSC. Экзосомы из ASC, но не из BM-MSC, способны снижать уровень β-амилоидного пептида в клетках нейробластомы мыши [50]. Эти результаты указывают на необходимость соответствия клеточного источника СМ конкретному клиническому применению получаемого бесклеточного препарата.

Прогресс в идентификации ключевых терапевтических элементов в препаратах СМ был достигнут в исследованиях, когда нокдаун генов применялся с целью анализа способности СМ оказывать терапевтическое воздействие. Этот подход позволил идентифицировать роль факторов транскрипции, переносимых EV, когда нокдаун *Wnt4* в UC-MSC человека привел к потере способности UC-MSC экзосом активировать бета-катенин-зависимый сигнальный путь в клетках кожи. Как результат, EV с дефицитом Wnt4 потеряли способность оказывать терапевтический эффект в модели ожога кожи крыс [51, 52]. Нокдаун генов был также использован для подтверждения роли переносимых EV антиоксидантных и иммуномодулирующих белков. Нокдаун гена глутатионпероксидазы 1 привел к потере защитного эффекта MSC EV в модели CCl4-индуцированного повреждения печени. Результаты анализа *in vitro* подтвердили антиоксидантный потенциал EVs, содержащих глутатионпероксидазу 1 [53]. Аналогично нокдаун иммуномодулятора галектина-3 ослабил терапевтический потенциал MSC в модели кардиомиопатиии при хронической болезни Чагаса, индуцированной хронической инфекцией *Trypanosoma cruzi* [54]. Известно, что этот лектин экспрессируется на поверхности MSC и секретируется ими [55]. Роль другого иммуномодулирующего белка, IDO, была показана в работе продемострировавшей связь повышенной экспрессии IDO и способности MSC индуцировать толерантность к аллографту почек, усиливая пролиферацию Treg [56]. Хотя в этой работе не рассматривалось, был ли белок секретируемым или внутриклеточным, другое исследование показало, что содержание IDO в EV коррелирует с их способностью индуцировать трансформацию мононуклеарных клеток в Treg-клетки [57]. В целом эти данные указывают на необходимость проведения протеомного анализа препаратов СМ с целью устранения колебаний терапевтического потенциала от партии к партии и оптимизации процесса производства для конкретного клинического применения. Анализ ограниченного количества отобранных и утвержденных факторов с помощью мультиплекс-ELISA может оказаться более экономичным и практическим подходом для мониторинга производственного процесса по сравнению с расширенным мульти-эррейным анализом.

РНК. Эксперименты с препаратами СМ [48] и EV [58, 59], обработанными РНКазами, подтвердили, что деградация РНК приводит к снижению способности СМ и EV защищать эпителий канальцев во время острого повреждения почек. Высокопроизводительное секвенирование молекул РНК показывает, что основным классом РНК, представленных в EV, являются некодирующие РНК, включая длинные некодирующие РНК (~11%). Вторым широко представленным классом являются рибосомальные РНК (22%). Количество miРНК составляет <1% от общего количества РНК [60]. Тем не менее было показано, что именно этот подкласс РНК важен для проявления эффектов EV, так как дальнейшие эксперименты с нокдауном Drosha, ключевого фермента, генерирующего miРНК, показали, что защита почек препаратами EV зависит от наличия miРНК [61]. Многочисленные работы по изучению состава EV пролили свет на разнообразие молекул miРНК в препаратах MSC EV [62]. Эксперименты, использующие нокдаун специфических miРНК показали, какие конкретные miРНК ответственны за терапевтический эффект MSC EV при повреждении определенных органов и тканей. Восстановление функций мозга после ишемии зависело от наличия в EV miR-133 [63]. Критическая роль miR-30 была показана для терапевтической защиты почек [64], а критическая роль miR-22 – для восстановления миокарда после инфаркта [65]. EV miR-223 защищали сердце от повреждений, индуцированных сепсисом [66], и печень – в модели аутоиммунного гепатита [67]. Вполне вероятно, что защита обоих органов была обусловлена иммуномодулирующими свойствами miR-223 [68]. Было показано, что miR-125b, содержащаяся в EV, ответственна за противофиброзный эффект MSC в модели индуцированного CCl4 повреждения печени [69].

Эксперименты, в которых была выявлена корреляция между уровнем экспрессии miРНК и улучшением защитного эффекта EV, дополнили информацию, полученную из экспериментов с нокдаунами. Роль EV miR-19a в защите кардиомиоцитов была изначально продемонстрирована *in vitro*; экзосомы из GATA4-экспрессирующих MSC, обогащенных miR-19a, продемон-

стрировали повышенную способность восстанавливать сердечную функцию [36]. BM-MSC с повышенной экспрессией miR-let7c, подавляющей TGF-бета, снижали постинфекционный почечный фиброз более эффективно, чем контрольные клетки; терапевтический эффект был опосредован EV [70]. Аналогично ASC с повышенной экспрессией miR-122, подавляющей синтез коллагена, более эффективно ограничивали развитие фиброза печени после воздействия CCl4; и снова было показано, что этот эффект был опосредован EV [71]. EV из MSC с повышенной экспрессией кластера miR 17-92, дающего начало индивидуальным miРНК (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a и miR-92a), продемонстрировали улучшенные нейрорегенеративные свойства в модели инфаркта мозга [35].

Другой класс некодирующих регуляторов генов, а именно длинные некодирующие РНК, также играют роль в опосредованных EV эффектах. Недавно были подробно описаны различные lncРНК, выявленные в MSC EV [72]. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR) идентифицировала *Y-RNA-1* как одну из lncRNA, наиболее широко представленных в MSC EV по сравнению с родительскими MSC. Специфический нокдаун *Y-RNA-1* привел к понижению способности EV защищать гепатоциты от апоптоза, указывая на значительный вклад Y-RNA-1 в защитный эффект MSC EV в модели повреждения печени [40].

Роль мРНК, переносимых EV, также была подтверждена на специфических моделях. Первоначальное доказательство переноса мРНК EV было получено, когда клетки человека, обработанные EV мышей, стали синтезировать белки мышей [73]. В MSC EV можно обнаружить мРНК многих биоактивных факторов. Так, BM-MSC EV содержат значительные количества мРНК фактора KGF, обладающего свойством усиливать барьерную функцию эндотелия и эпителия. Нокдаун мРНК *KGF* с помощью siРНК вызывал снижение способности EV защищать легкие в модели повреждения легких, индуцированного эндотоксином [74]. Можно дискутировать, был ли этот эффект обусловлен в первую очередь снижением количества мРНК или белка в EV. Авторы утверждали, что тем малым количеством KGF, которое могло быть доставлено EV, нельзя было объяснить увеличение уровня KGF в клетках легких, обработанных EV. С помощью аналогичного подхода была доказана роль мРНК и белка VEGF в защитном эффекте EV от повреждения легких новорожденных при гипероксии [44]. В той же модели нокдаун с siРНК помог определить роль иммуномодулирующего белка TSG6 в защите от бронхолегочной дисплазии [45]. Хотя авторы не обсуждали роль мРНК *TSG6*, эффект, вызванный нокдауном, был, скорее всего, обусловлен дефицитом как мРНК, так и белка в препарате EV.

Аналогично с анализом белкового состава анализ РНК в препаратах CM желателен как для оптимизации препарата для конкретного практического применения, так и для определения критериев контроля качества (QC – quality control), необходимых для доклинической проверки терапевтического потенциала препарата. Учитывая разнообразие типов РНК в EV и наши ограниченные знания о важности конкретной miРНК, lncRNA или мРНК для конкретного терапевтического эффекта, каждый производитель должен будет разработать свою собственную эффективную стратегию анализа РНК-компонентов, наиболее важных для предполагаемого клинического применения.

Липиды. По сравнению с белками и нуклеиновыми кислотами вклад липидов в терапевтический потенциал CM изучен в гораздо меньшей мере. Недавно проведенное сравнение потенциала MSC, полученных от различных доноров, в модели травматического повреждения мозга показало, что есть хорошая корреляция между терапевтическим действием и секрецией простагландина PGE_2 [75]. Авторы предположили, что уровень PGE_2 может быть использован в качестве маркера, коррелирующего с эффективностью препаратов MSC, применяемых для лечения травматического повреждения мозга. Так как фактор секретируется в среду, это же предположение применимо и к препаратам CM.

РАЗРАБОТКА БЕСКЛЕТОЧНЫХ КОНДИЦИОННЫХ СРЕД В КАЧЕСТВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Как было описано в предыдущих разделах этого обзора, препараты CM и EV, генерированные культурой MSC, представляют потенциальные терапевтические средства для многочисленных заболеваний, нуждающихся в разработке новых медицинских подходов. По сравнению с клеточными препаратами бесклеточные CM и EV обладают рядом существенных преимуществ, касающихся безопасности и простоты обращения с препаратом. Чтобы продвинуть этот новый класс терапевтических средств до стадии клинических испытаний и в конечном итоге перейти к стадии коммерциализации продукта и его широкому применению, исследователи и разработчики должны разработать: 1) процессы, соответствующие требованиям

клинического производства (GMP) и масштабируемые до уровня, необходимого для коммерческого производства; 2) критерии контроля качества, являющиеся практичными с точки зрения реализации и позволяющими при доклиническом исследовании определить терапевтическую эффективность продукта. Регуляторные требования, разрабатываемые для продуктов на базе MSC, и уровень безопасности, продемонстрированный клеточной терапией на основе MSC, должны облегчить развитие терапии на основе бесклеточных продуктов MSC.

Разработчики бесклеточных продуктов, нацеленные на стандартизацию производственного процесса, должны сфокусироваться на выборе: 1) источника клеток позволяющего генерировать партии продукта коммерческого масштаба; 2) адгезивной 2D-культуры клеток или культуры в биореакторе; 3) культуральной среды для размножения клеток и кондиционирования; 4) процесса, обеспечивающего получение концентратов CM или изолятов EV с желаемым составом; 5) формы конечного продукта (сконцентрированный, замороженный, лиофилизированный, с консервантами, стабилизаторами и т.д.) и способа упаковки.

Представленные в настоящем обзоре доказательства демонстрируют, что эффективные терапевтические препараты CM или EV могут быть приготовлены из множественных линий MSC. Однако следует учитывать, что большая часть представленных в литературе данных получена при изучении препаратов, полученных при культивировании клеток с низким числом пассажей и выращенных в условиях культивирования, принятых в лабораториях. В связи с тем, что состав секретома MSC и его активность зависят от числа пассажей клеток и условий их культивирования [76, 77], крайне важно выработать условия, позволяющие масштабировать производство до сотен и тысяч литров среды, одновременно поддерживая биологическую активность секретома. Кроме необходимости разработки методов масштабирования клеточной культуры для генерации CM и EV, существует также необходимость разработки последующего процесса обработки среды, совместимого с правилами GMP и пригодного для получения стабильного фармацевтического продукта в форме, готовой для практического применения. Например, рутинные лабораторные методы замораживания EV могут приводить к потере определенной части везикул [78], и добавление ДМСО в качестве защитного средства будет снижать потери EV при криопрезервации. Но ДМСО необходимо будет удалять из продукта перед его клиническим применением. Более практичные подходы, такие как добавление сахаров (трегалозы или маннитола) фармацевтической чистоты, могут облегчить приготовление лиофилизированных препаратов, сохраняющих их биологический потенциал и физические свойства (отсутствие осадка после растворения и т.д.) [79]. Применение таких относительно простых рецептур учеными, проводящими доклинические исследования в этой области, могло бы уменьшить различия в получаемых из-за варьирующей стабильности препаратов результатах и облегчить возможность перехода бесклеточных препаратов к клиническим испытаниям.

Суммируя сказанное, хочется подчеркнуть, что методы производства концентратов CM и изолятов EV, используемых в исследованиях, широко варьируют, и в настоящее время мало известно о том, как изменение индивидуальных, а тем более множественных условий производства отразится на составе и эффективности продукта. С этой целью стандартизация производственного процесса и тщательная характеристика бесклеточных препаратов на ранних этапах разработки имеют первостепенное значение для максимального развития этого класса фармацевтических препаратов, характеризуемых не определенной формулой, а определенными условиями производства («продукт как результат процесса»).

Концентраты кондиционной среды и изоляты EV представляют новый класс терапевтических средств с широким спектром применения для лечения заболеваний и повреждений органов. Несмотря на то что методы приготовления этих препаратов варьируют, в доклинических исследованиях они показали свою эффективность при отсутствии существенных проблем, касающихся их безопасности. Некоторые бесклеточные препараты уже продемонстрировали обнадеживающие результаты на ранних стадиях клинических испытаний. Накопленные результаты говорят о широком диапазоне возможностей для разработки фармакологических продуктов, адаптированных для конкретных клинических применений. Была показана связь между отдельными белковыми, нуклеиновыми и липидными компонентами бесклеточных препаратов, с одной стороны, и терапевтическим потенциалом в определенной модели болезни, с другой. Однако многофакторный анализ состава препаратов в контексте их терапевтического потенциала еще предстоит разработать. В настоящем обзоре подчеркнута необходимость для исследователей и разработчиков бесклеточных препаратов сфокусироваться на стандартизации производственных процессов и методов, а также вы-

работке ключевых параметров для характеристики препаратов.

Финансирование. Данная работа была выполнена при частичной поддержке Национального института изучения диабета, болезней пищеварительной системы и почек (грант № R41 1R41DK115317) (доктор Колман).

Конфликт интересов. У доктора Богачевой имеется патент, позволяющий применять ASC-CM для лечения синдрома острого дыхательного дистресса. Доктор Колман является главным исполнительным директором Theratome Bio Inc, биотехнологической стартап-компании, разрабатывающей продукты на основе ASC-CM для клинических испытаний.

Соблюдение этических норм. В данной статье не содержатся описания исследований, выполненных авторами с участием людей или использования животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Squillaro, T., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016) Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update, *Cell Transplant.*, **25**, 829–848, doi: 10.3727/096368915x689622.
2. Galipeau, J., and Sensebe, L. (2018) Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities, *Cell Stem Cell*, **22**, 824–833, doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
3. Olsen, T.R., Ng, K.S., Lock, L.T., Ahsan, T., and Rowley, J.A. (2018) Peak MSC-are we there yet? *Front. Med. (Lausanne)*, **5**, 178, doi: 10.3389/fmed.2018.00178.
4. Kuzmina, L.A., Petinati, N.A., Parovichnikova, E.N., Lubimova, L.S., Gribanova, E.O., Gaponova, T.V., Shipounova, I.N., Zhironkina, O.A., Bigildeev, A.E., Svinareva, D.A., Drize, N.J., and Savchenko, V.G. (2012) Multipotent mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of acute graft-versus-host disease-a phase II study, *Stem Cells Int.*, **2012**, 968213, doi: 10.1155/2012/968213.
5. Kuzmina, L.A., Petinati, N.A., Shipounova, I.N., Sats, N.V., Bigildeev, A.E., Zezina, E.A., Popova, M.D., Drize, N.J., Parovichnikova, E.N., and Savchenko, V.G. (2016) Analysis of multipotent mesenchymal stromal cells used for acute graft-versus-host disease prophylaxis, *Eur. J. Haematol.*, **96**, 425–434, doi: 10.1111/ejh.12613.
6. Kuzmina, L.A., Petinati, N.A., Sats, N.V., Drize, N.J., Risinskaya, N.V., Sudarikov, A.B., Vasilieva, V.A., Drokov, M.Y., Michalzova, E.D., Parovichnikova, E.N., and Savchenko, V.G. (2016) Long-term survival of donor bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells implanted into the periosteum of patients with allogeneic graft failure, *Int. J. Hematol.*, **104**, 403–407, doi: 10.1007/s12185-016-2014-2.
7. Petinati, N., Drize, N., Sats, N., Risinskaya, N., Sudarikov, A., Drokov, M., Dubniak, D., Kraizman, A., Nareyko, M., Popova, N., Firsova, M., Kuzmina, L., Parovichnikova, E., and Savchenko, V. (2018) Recovery of donor hematopoiesis after graft failure and second hematopoietic stem cell transplantation with intraosseous administration of mesenchymal stromal cells, *Stem Cells Int.*, **2018**, 6495018, doi: 10.1155/2018/6495018.
8. Caplan, A.I. (2017) Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.*, **6**, 1445–1451, doi: 10.1002/sctm.17-0051.
9. Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., and Dzau, V.J. (2008) Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy, *Circ. Res.*, **103**, 1204–1219, doi: 10.1161/circresaha.108.176826.
10. Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells, *Circulation*, **109**, 1292–1298, doi: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1.
11. Chang, M.G., Tung, L., Sekar, R.B., Chang, C.Y., Cysyk, J., Dong, P., Marban, E., and Abraham, M.R. (2006) Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an *in vitro* coculture model, *Circulation*, **113**, 1832–1841, doi: 10.1161/circulationaha.105.593038.
12. Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J.M., Fries, J.W., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., Welz, A., Bloch, W., Jacobsen, S.E., and Fleischmann, B.K. (2007) Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts, *Blood*, **110**, 1362–1369, doi: 10.1182/blood-2006-12-063412.
13. Moll, G., Alm, J.J., Davies, L.C., von Bahr, L., Heldring, N., Stenbeck-Funke, L., Hamad, O.A., Hinsch, R., Ignatowicz, L., Locke, M., Lonnies, H., Lambris, J.D., Teramura, Y., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., and Le Blanc, K. (2014) Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*, **32**, 2430–2442, doi: 10.1002/stem.1729.
14. Bruno, S., Collino, F., Deregibus, M.C., Grange, C., Tetta, C., and Camussi, G. (2013) Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth, *Stem Cells Dev.*, **22**, 758–771, doi: 10.1089/scd.2012.0304.
15. Wu, S., Ju, G.Q., Du, T., Zhu, Y.J., and Liu, G.H. (2013) Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*, *PLoS One*, **8**, e61366, doi: 10.1371/journal.pone.0061366.
16. Qi, J., Zhou, Y., Jiao, Z., Wang, X., Zhao, Y., Li, Y., Chen, H., Yang, L., Zhu, H., and Li, Y. (2017) Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway, *Cell. Physiol. Biochem.*, **42**, 2242–2254, doi: 10.1159/000479998.
17. Vallabhaneni, K.C., Penfornis, P., Dhule, S., Guillonneau, F., Adams, K.V., Mo, Y.Y., Xu, R., Liu, Y., Watabe, K., Vemuri, M.C., and Pochampally, R. (2015) Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites, *Oncotarget*, **6**, 4953–4967, doi: 10.18632/oncotarget.3211.
18. Yang, Y., Bucan, V., Baehre, H., von der Ohe, J., Otte, A., and Hass, R. (2015) Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes, *Int. J. Oncol.*, **47**, 244–252, doi: 10.3892/ijo.2015.3001.
19. Pascucci, L., Cocce, V., Bonomi, A., Ami, D., Ceccarelli, P., Ciusani, E., Vigano, L., Locatelli, A., Sisto, F., Doglia, S.M., Parati, E., Bernardo, M.E., Muraca, M., Alessandri, G., Bondiolotti, G., and Pessina, A. (2014) Paclitaxel is incor-

porated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery, *J. Control. Release*, **192**, 262–270, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.07.042.
20. Vakhshiteh, F., Atyabi, F., and Ostad, S.N. (2019) Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy, *Int. J. Nanomedicine*, **14**, 2847–2859, doi: 10.2147/ijn.S200036.
21. Deng, H., Sun, C., Sun, Y., Li, H., Yang, L., Wu, D., Gao, Q., and Jiang, X. (2018) Lipid, protein, and microRNA composition within mesenchymal stem cell-derived exosomes, *Cell. Reprogram.*, **20**, 178–186, doi: 10.1089/cell.2017.0047.
22. Dahbour, S., Jamali, F., Alhattab, D., Al-Radaideh, A., Ababneh, O., Al-Ryalat, N., Al-Bdour, M., Hourani, B., Msallam, M., Rasheed, M., Huneiti, A., Bahou, Y., Tarawneh, E., and Awidi, A. (2017) 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.*, **23**, 866–874, doi: 10.1111/cns.12759.
23. Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T.R., Epple, M., Horn, P. A., Beelen, D.W., and Giebel, B. (2014) MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease, *Leukemia*, **28**, 970–973, doi: 10.1038/leu.2014.41.
24. Nassar, W., El-Ansary, M., Sabry, D., Mostafa, M.A., Fayad, T., Kotb, E., Temraz, M., Saad, A.N., Essa, W., and Adel, H. (2016) Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases, *Biomater. Res.*, **20**, 21, doi: 10.1186/s40824-016-0068-0.
25. Zhou, B.R., Xu, Y., Guo, S.L., Xu, Y., Wang, Y., Zhu, F., Permatasari, F., Wu, D., Yin, Z.Q., and Luo, D. (2013) The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing, *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 519126, doi: 10.1155/2013/519126.
26. Fukuoka, H., Narita, K., and Suga, H. (2017) Hair regeneration therapy: application of adipose-derived stem cells, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **12**, 531–534, doi: 10.2174/1574888x12666170522114307.
27. Shin, H., Won, C.H., Chung, W.K., and Park, B.S. (2017) Up-to-date clinical trials of hair regeneration using conditioned media of adipose-derived stem cells in male and female pattern hair loss, *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **12**, 524–530, doi: 10.2174/1574888x12666170504120244.
28. Katagiri, W., Watanabe, J., Toyama, N., Osugi, M., Sakaguchi, K., and Hibi, H. (2017) Clinical study of bone regeneration by conditioned medium from mesenchymal stem cells after maxillary sinus floor elevation, *Implant Dent.*, **26**, 607–612, doi: 10.1097/id.0000000000000618.
29. Fujita, Y., Kadota, T., Araya, J., Ochiya, T., and Kuwano, K. (2018) Clinical application of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-based therapeutics for inflammatory lung diseases, *J. Clin. Med.*, **7**, doi: 10.3390/jcm7100355.
30. Balducci, L., Blasi, A., Saldarelli, M., Soleti, A., Pessina, A., Bonomi, A., Cocce, V., Dossena, M., Tosetti, V., Ceserani, V., Navone, S.E., Falchetti, M.L., Parati, E.A., and Alessandri, G. (2014) Immortalization of human adipose-derived stromal cells: production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors, *Stem Cell Res. Ther.*, **5**, 63, doi: 10.1186/scrt452.
31. Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O.D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L. G., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., and Dzau, V.J. (2006) Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement, *FASEB J.*, **20**, 661–669, doi: 10.1096/fj.05-5211com.
32. Wang, X., Chen, Y., Zhao, Z., Meng, Q., Yu, Y., Sun, J., Yang, Z., Chen, Y., Li, J., Ma, T., Liu, H., Li, Z., Yang, J., and Shen, Z. (2018) Engineered exosomes with ischemic myocardium-targeting peptide for targeted therapy in myocardial infarction, *J. Am. Heart Assoc.*, **7**, e008737, doi: 10.1161/jaha.118.008737.
33. Bhang, S.H., Lee, S., Shin, J.Y., Lee, T.J., Jang, H.K., and Kim, B.S. (2014) Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **22**, 862–872, doi: 10.1038/mt.2013.301.
34. Kwon, S.H., Bhang, S.H., Jang, H.K., Rhim, T., and Kim, B.S. (2015) Conditioned medium of adipose-derived stromal cell culture in three-dimensional bioreactors for enhanced wound healing, *J. Surg. Res.*, **194**, 8–17, doi: 10.1016/j.jss.2014.10.053.
35. Xin, H., Katakowski, M., Wang, F., Qian, J.Y., Liu, X.S., Ali, M.M., Buller, B., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2017) MicroRNA cluster miR-17-92 cluster in exosomes enhance neuroplasticity and functional recovery after stroke in rats, *Stroke*, **48**, 747–753, doi: 10.1161/strokeaha.116.015204.
36. Yu, B., Kim, H.W., Gong, M., Wang, J., Millard, R.W., Wang, Y., Ashraf, M., and Xu, M. (2015) Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection, *Int. J. Cardiol.*, **182**, 349–360, doi: 10.1016/j.ijcard.2014.12.043.
37. Li, H., Liu, D., Li, C., Zhou, S., Tian, D., Xiao, D., Zhang, H., Gao, F., and Huang, J. (2017) Exosomes secreted from mutant-HIF-1alpha-modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit, *Cell Biol. Int.*, **41**, 1379–1390, doi: 10.1002/cbin.10869.
38. Bruno, S., Tapparo, M., Collino, F., Chiabotto, G., Deregibus, M.C., Soares Lindoso, R., Neri, F., Kholia, S., Giunti, S., Wen, S., Quesenberry, P., and Camussi, G. (2017) Renal regenerative potential of different extracellular vesicle populations derived from bone marrow mesenchymal stromal cells, *Tissue Eng. Part A*, **23**, 1262–1273, doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0069.
39. Wen, S., Dooner, M., Cheng, Y., Papa, E., Del Tatto, M., Pereira, M., Deng, Y., Goldberg, L., Aliotta, J., Chatterjee, D., Stewart, C., Carpanetto, A., Collino, F., Bruno, S., Camussi, G., and Quesenberry, P. (2016) Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells, *Leukemia*, **30**, 2221–2231, doi: 10.1038/leu.2016.107.
40. Haga, H., Yan, I. K., Takahashi, K., Matsuda, A., and Patel, T. (2017) Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve survival from lethal hepatic failure in mice, *Stem Cells Transl. Med.*, **6**, 1262–1272, doi: 10.1002/sctm.16-0226.
41. Lu, H., Poirier, C., Cook, T., Traktuev, D.O., Merfeld-Clauss, S., Lease, B., Petrache, I., March, K.L., and Bogatcheva, N.V. (2015) Conditioned media from adipose stromal cells limit lipopolysaccharide-induced lung injury, endothelial hyperpermeability and apoptosis, *J. Transl. Med.*, **13**, 67, doi: 10.1186/s12967-015-0422-3.
42. Devaney, J., Horie, S., Masterson, C., Elliman, S., Barry, F., O'Brien, T., Curley, G.F., O'Toole, D., and Laffey, J.G. (2015) Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by *E. coli* in the rat, *Thorax*, **70**, 625–635, doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-206813.

43. Monsel, A., Zhu, Y.G., Gennai, S., Hao, Q., Hu, S., Rouby, J.J., Rosenzwajg, M., Matthay, M.A., and Lee, J.W. (2015) Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell-derived microvesicles in severe *Pneumonia* in mice, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **192**, 324–336, doi: 10.1164/rccm.201410-1765OC.
44. Ahn, S.Y., Park, W.S., Kim, Y.E., Sung, D.K., Sung, S.I., Ahn, J.Y., and Chang, Y.S. (2018) Vascular endothelial growth factor mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against neonatal hyperoxic lung injury, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 26, doi: 10.1038/s12276-018-0055-8.
45. Chaubey, S., Thueson, S., Ponnalagu, D., Alam, M.A., Gheorghe, C.P., Aghai, Z., Singh, H., and Bhandari, V. (2018) Early gestational mesenchymal stem cell secretome attenuates experimental bronchopulmonary dysplasia in part via exosome-associated factor TSG-6, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 173, doi: 10.1186/s13287-018-0903-4.
46. Eirin, A., Zhu, X.Y., Jonnada, S., Lerman, A., van Wijnen, A.J., and Lerman, L.O. (2018) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles improve the renal microvasculature in metabolic renovascular disease in swine, *Cell Transplant.*, **27**, 1080–1095, doi: 10.1177/0963689718780942.
47. Meng, Y., Eirin, A., Zhu, X.Y., O'Brien, D.R., Lerman, A., van Wijnen, A.J., and Lerman, L.O. (2018) The metabolic syndrome modifies the mRNA expression profile of extracellular vesicles derived from porcine mesenchymal stem cells, *Diabet. Metab. Syndr.*, **10**, 58, doi: 10.1186/s13098-018-0359-9.
48. Reis, L.A., Borges, F.T., Simoes, M.J., Borges, A.A., Sinigaglia-Coimbra, R., and Schor, N. (2012) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats, *PLoS One*, **7**, e44092, doi: 10.1371/journal.pone.0044092.
49. Zisa, D., Shabbir, A., Suzuki, G., and Lee, T. (2009) Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 834–838, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.058.
50. Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M., and Ochiya, T. (2013) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes, *Sci. Rep.*, **3**, 1197, doi: 10.1038/srep01197.
51. Zhang, B., Wang, M., Gong, A., Zhang, X., Wu, X., Zhu, Y., Shi, H., Wu, L., Zhu, W., Qian, H., and Xu, W. (2015) HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing, *Stem Cells*, **33**, 2158–2168, doi: 10.1002/stem.1771.
52. Zhang, B., Wu, X., Zhang, X., Sun, Y., Yan, Y., Shi, H., Zhu, Y., Wu, L., Pan, Z., Zhu, W., Qian, H., and Xu, W. (2015) Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-catenin pathway, *Stem Cells Transl. Med.*, **4**, 513–522, doi: 10.5966/sctm.2014-0267.
53. Yan, Y., Jiang, W., Tan, Y., Zou, S., Zhang, H., Mao, F., Gong, A., Qian, H., and Xu, W. (2017) hucMSC exosome-derived GPX1 is required for the recovery of hepatic oxidant injury, *Mol. Ther.*, **25**, 465–479, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.019.
54. Souza, B.S.F., da Silva, K.N., Silva, D.N., Rocha, V.P.C., Paredes, B.D., Azevedo, C.M., Nonaka, C.K., Carvalho, G.B., Vasconcelos, J.F., Dos Santos, R.R., and Soares, M.B.P. (2017) Galectin-3 knockdown impairs survival, migration, and immunomodulatory actions of mesenchymal stromal cells in a mouse model of chagas disease cardiomyopathy, *Stem Cells Int.*, **2017**, 3282656, doi: 10.1155/2017/3282656.
55. Sioud, M., Mobergslien, A., Boudabous, A., and Floisand, Y. (2011) Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins, *Int. J. Oncol.*, **38**, 385–390, doi: 10.3892/ijo.2010.869.
56. He, Y., Zhou, S., Liu, H., Shen, B., Zhao, H., Peng, K., and Wu, X. (2015) Indoleamine 2, 3-Dioxgenase transfected mesenchymal stem cells induce kidney allograft tolerance by increasing the production and function of regulatory T Cells, *Transplantation*, **99**, 1829–1838, doi: 10.1097/tp.0000000000000856.
57. Zhang, Q., Fu, L., Liang, Y., Guo, Z., Wang, L., Ma, C., and Wang, H. (2018) Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF-beta and IFN-gamma promote Treg differentiation, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 6832–6840, doi: 10.1002/jcp.26436.
58. Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M.C., Calogero, R.A., Saviozzi, S., Collino, F., Morando, L., Busca, A., Falda, M., Bussolati, B., Tetta, C., and Camussi, G. (2009) Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20**, 1053–1067, doi: 10.1681/asn.2008070798.
59. Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., and Camussi, G. (2011) Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury, *Nephrol. Dial. Transpl.*, **26**, 1474–1483, doi: 10.1093/ndt/gfr015.
60. Harting, M.T., Srivastava, A.K., Zhaorigetu, S., Bair, H., Prabhakara, K.S., Toledano Furman, N.E., Vykoukal, J.V., Ruppert, K.A., Cox, C.S. Jr., and Olson, S.D. (2018) Inflammation-stimulated mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate inflammation, *Stem Cells*, **36**, 79–90, doi: 10.1002/stem.2730.
61. Collino, F., Bruno, S., Incarnato, D., Dettori, D., Neri, F., Provero, P., Pomatto, M., Oliviero, S., Tetta, C., Quesenberry, P.J., and Camussi, G. (2015) AKI recovery induced by mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles carrying microRNAs, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **26**, 2349–2360, doi: 10.1681/asn.2014070710.
62. Qiu, G., Zheng, G., Ge, M., Wang, J., Huang, R., Shu, Q., and Xu, J. (2018) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 320, doi: 10.1186/s13287-018-1069-9.
63. Xin, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, X., Shang, X., Cui, Y., Zhang, Z. G., and Chopp, M. (2013) MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles, *Stem Cells*, **31**, 2737–2746, doi: 10.1002/stem.1409.
64. Gu, D., Zou, X., Ju, G., Zhang, G., Bao, E., and Zhu, Y. (2016) Mesenchymal stromal cells derived extracellular vesicles ameliorate acute renal ischemia reperfusion injury by inhibition of mitochondrial fission through miR-30, *Stem Cells Int.*, **2016**, 2093940, doi: 10.1155/2016/2093940.
65. Feng, Y., Huang, W., Wani, M., Yu, X., and Ashraf, M. (2014) Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22, *PLoS One*, **9**, e88685, doi: 10.1371/journal.pone.0088685.
66. Wang, X., Gu, H., Qin, D., Yang, L., Huang, W., Essandoh, K., Wang, Y., Caldwell, C.C., Peng, T., Zingarelli, B., and Fan, G.C. (2015) Exosomal miR-223 contributes to mesenchymal stem cell-elicited cardioprotection in polymicrobial sepsis, *Sci. Rep.*, **5**, 13721, doi: 10.1038/srep13721.
67. Chen, L., Lu, F.B., Chen, D.Z., Wu, J.L., Hu, E.D., Xu, L.M., Zheng, M.H., Li, H., Huang, Y., Jin, X.Y.,

Gong, Y.W., Lin, Z., Wang, X.D., and Chen, Y.P. (2018) BMSCs-derived miR-223-containing exosomes contribute to liver protection in experimental autoimmune hepatitis, *Mol. Immunol.*, **93**, 38–46, doi: 10.1016/j.molimm.2017.11.008.

68. Fernandez-Messina, L., Gutierrez-Vazquez, C., Rivas-Garcia, E., Sanchez-Madrid, F., and de la Fuente, H. (2015) Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles, *Biol. Cell*, **107**, 61–77, doi: 10.1111/boc.201400081.
69. Hyun, J., Wang, S., Kim, J., Kim, G.J., and Jung, Y. (2015) MicroRNA125b-mediated Hedgehog signaling influences liver regeneration by chorionic plate-derived mesenchymal stem cells, *Sci. Rep.*, **5**, 14135, doi: 10.1038/srep14135.
70. Wang, B., Yao, K., Huuskes, B.M., Shen, H.H., Zhuang, J., Godson, C., Brennan, E.P., Wilkinson-Berka, J.L., Wise, A.F., and Ricardo, S.D. (2016) Mesenchymal stem cells deliver exogenous microRNA-let7c via exosomes to attenuate renal fibrosis, *Mol. Ther.*, **24**, 1290–1301, doi: 10.1038/mt.2016.90.
71. Lou, G., Yang, Y., Liu, F., Ye, B., Chen, Z., Zheng, M., and Liu, Y. (2017) MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis, *J. Cell. Mol. Med.*, **21**, 2963–2973, doi: 10.1111/jcmm.13208.
72. Fatima, F., Ekstrom, K., Nazarenko, I., Maugeri, M., Valadi, H., Hill, A.F., Camussi, G., and Nawaz, M. (2017) Non-coding RNAs in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: deciphering regulatory roles in stem cell potency, inflammatory resolve, and tissue regeneration, *Front. Genet.*, **8**, 161, doi: 10.3389/fgene.2017.00161.
73. Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654–659, doi: 10.1038/ncb1596.
74. Zhu, Y.G., Feng, X.M., Abbott, J., Fang, X.H., Hao, Q., Monsel, A., Qu, J.M., Matthay, M.A., and Lee, J.W. (2014) Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of *Escherichia coli* endotoxin-induced acute lung injury in mice, *Stem Cells*, **32**, 116–125, doi: 10.1002/stem.1504.
75. Kota, D.J., Prabhakara, K.S., Toledano-Furman, N., Bhattarai, D., Chen, Q., DiCarlo, B., Smith, P., Triolo, F., Wenzel, P.L., Cox, C.S., Jr., and Olson, S.D. (2017) Prostaglandin E2 indicates therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury, *Stem Cells*, **35**, 1416–1430, doi: 10.1002/stem.2603.
76. Ozcan, S., Alessio, N., Acar, M.B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016) Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses, *Aging*, **8**, 1316–1329, doi: 10.18632/aging.100971.
77. Sarkar, P., Redondo, J., Kemp, K., Ginty, M., Wilkins, A., Scolding, N.J., and Rice, C.M. (2018) Reduced neuroprotective potential of the mesenchymal stromal cell secretome with *ex vivo* expansion, age and progressive multiple sclerosis, *Cytotherapy*, **20**, 21–28, doi: 10.1016/j.jcyt.2017.08.007.
78. Romanov, Y.A., Volgina, N.E., Dugina, T.N., Kabaeva, N.V., and Sukhikh, G.T. (2019) Effect of storage conditions on the integrity of human umbilical cord mesenchymal stromal cell-derived microvesicles, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 131–135, doi: 10.1007/s10517-019-04476-2.
79. Charoenviriyakul, C., Takahashi, Y., Nishikawa, M., and Takakura, Y. (2018) Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization, *Int. J. Pharm.*, **553**, 1–7, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.032.
80. Ionescu, L., Byrne, R.N., van Haaften, T., Vadivel, A., Alphonse, R.S., Rey-Parra, G.J., Weissmann, G., Hall, A., Eaton, F., and Thebaud, B. (2012) Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: *in vivo* evidence for stem cell paracrine action, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **303**, L967–L977, doi: 10.1152/ajplung.00144.2011.
81. Rathinasabapathy, A., Bruce, E., Espejo, A., Horowitz, A., Sudhan, D.R., Nair, A., Guzzo, D., Francis, J., Raizada, M.K., Shenoy, V., and Katovich, M.J. (2016) Therapeutic potential of adipose stem cell-derived conditioned medium against pulmonary hypertension and lung fibrosis, *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 2859–2879, doi: 10.1111/bph.13562.
82. Ahmadi, M., Rahbarghazi, R., Aslani, M.R., Shahbazfar, A.A., Kazemi, M., and Keyhanmanesh, R. (2017) Bone marrow mesenchymal stem cells and their conditioned media could potentially ameliorate ovalbumin-induced asthmatic changes, *Biomed. Pharmacother.*, **85**, 28–40, doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.127.
83. Parekkadan, B., van Poll, D., Suganuma, K., Carter, E.A., Berthiaume, F., Tilles, A.W., and Yarmush, M.L. (2007) Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure, *PLoS One*, **2**, e941, doi: 10.1371/journal.pone.0000941.
84. Bi, B., Schmitt, R., Israilova, M., Nishio, H., and Cantley, L. G. (2007) Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 2486–2496, doi: 10.1681/asn.2007020140.
85. Kay, A.G., Long, G., Tyler, G., Stefan, A., Broadfoot, S.J., Piccinini, A.M., Middleton, J., and Kehoe, O. (2017) Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces disease severity and immune responses in inflammatory arthritis, *Sci. Rep.*, **7**, 18019, doi: 10.1038/s41598-017-18144-w.
86. Linero, I., and Chaparro, O. (2014) Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration, *PLoS One*, **9**, e107001, doi: 10.1371/journal.pone.0107001.
87. Fontanilla, C.V., Gu, H., Liu, Q., Zhu, T.Z., Zhou, C., Johnstone, B.H., March, K.L., Pascuzzi, R.M., Farlow, M.R., and Du, Y. (2015) Adipose-derived stem cell conditioned media extends survival time of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Sci. Rep.*, **5**, 16953, doi: 10.1038/srep16953.
88. Yamagata, M., Yamamoto, A., Kako, E., Kaneko, N., Matsubara, K., Sakai, K., Sawamoto, K., and Ueda, M. (2013) Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice, *Stroke*, **44**, 551–554, doi: 10.1161/strokeaha.112.676759.
89. Bai, L., Lennon, D.P., Caplan, A.I., DeChant, A., Hecker, J., Kranso, J., Zaremba, A., and Miller, R.H. (2012) Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models, *Nat. Neurosci.*, **15**, 862–870, doi: 10.1038/nn.3109.
90. Suto, N., Mieda, T., Iizuka, A., Nakamura, K., and Hirai, H. (2016) Morphological and functional attenuation of degeneration of peripheral neurons by mesenchymal stem cell-conditioned medium in spinocerebellar ataxia type 1-knock-in mice, *CNS Neurosci. Ther.*, **22**, 670–676, doi: 10.1111/cns.12560.
91. Sun, J., Zhang, Y., Song, X., Zhu, J., and Zhu, Q. (2019) The healing effects of conditioned medium derived from mesenchymal stem cells on radiation-induced skin wounds in rats, *Cell Transplant.*, **28**, 105–115, doi: 10.1177/0963689718807410.
92. Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., El Oakley, R.M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D.P., and Lim, S.K.

(2010) Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury, *Stem Cell Res.*, **4**, 214–222, doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003.
93. Gangadaran, P., Rajendran, R.L., Lee, H.W., Kalimuthu, S., Hong, C.M., Jeong, S.Y., Lee, S.W., Lee, J., and Ahn, B.C. (2017) Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia, *J. Control. Release*, **264**, 112–126, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.022.
94. Cosenza, S., Ruiz, M., Toupet, K., Jorgensen, C., and Noel, D. (2017) Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis, *Sci. Rep.*, **7**, 16214, doi: 10.1038/s41598-017-15376-8.
95. Doeppner, T.R., Herz, J., Gorgens, A., Schlechter, J., Ludwig, A. K., Radtke, S., de Miroschedji, K., Horn, P.A., Giebel, B., and Hermann, D.M. (2015) Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression, *Stem Cells Transl. Med.*, **4**, 1131–1143, doi: 10.5966/sctm.2015-0078.
96. Wang, S.S., Jia, J., and Wang, Z. (2018) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles suppresses iNOS expression and ameliorates neural impairment in Alzheimer's disease mice, *J. Alzheimer's Dis.*, **61**, 1005–1013, doi: 10.3233/jad-170848.
97. Zhang, Y., Chopp, M., Meng, Y., Katakowski, M., Xin, H., Mahmood, A., and Xiong, Y. (2015) Effect of exosomes derived from multipluripotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury, *J. Neurosur.*, **122**, 856–867, doi: 10.3171/2014.11.Jns14770.
98. Perets, N., Hertz, S., London, M., and Offen, D. (2018) Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice, *Mol. Autism*, **9**, 57, doi: 10.1186/s13229-018-0240-6.
99. Huang, J.H., Yin, X.M., Xu, Y., Xu, C.C., Lin, X., Ye, F.B., Cao, Y., and Lin, F.Y. (2017) Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells attenuates apoptosis, inflammation, and promotes angiogenesis after spinal cord injury in rats, *J. Neurotrauma*, **34**, 3388–3396, doi: 10.1089/neu.2017.5063.
100. Curley, G.F., Ansari, B., Hayes, M., Devaney, J., Masterson, C., Ryan, A., Barry, F., O'Brien, T., Toole, D.O., and Laffey, J.G. (2013) Effects of intratracheal mesenchymal stromal cell therapy during recovery and resolution after ventilator-induced lung injury, *Anesthesiology*, **118**, 924–932, doi: 10.1097/ALN.0b013e318287ba08.
101. Hayes, M., Curley, G.F., Masterson, C., Devaney, J., O'Toole, D., and Laffey, J.G. (2015) Mesenchymal stromal cells are more effective than the MSC secretome in diminishing injury and enhancing recovery following ventilator-induced lung injury, *Intens. Care Med. Exp.*, **3**, 29, doi: 10.1186/s40635-015-0065-y.

CONDITIONED MEDIA OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS: A NEW CLASS OF THERAPEUTICS

Review

N. V. Bogatcheva[1*,] and M. E. Coleman[2]**

[1] *Division of Pulmonary and Critical Care, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, IUPUI, Indianapolis, IN 46202, USA; E-mail: nbogatch@iu.edu*

[2] *Theratome Bio, Inc., Indianapolis, IN 46202, USA; E-mail: mcoleman@theratomebio.com*

Received June 2, 2019
Revised July 17, 2019
Accepted July 17, 2019

Mesenchymal stromal cells (MSC) represent a class of biological preparations with the perspective for employment as immunomodulatory, tissue-protective and regenerative therapeutics. In parallel with cellular therapy, cell-free therapy based on MSC-secreted bioactive factors is being actively developed. MSC secrete a variety of protein/peptides, RNA and lipid mediators which can be concentrated, frozen or even lyophilized without loss of activity, giving certain advantage over cellular products requiring liquid nitrogen storage and infrastructure to revive frozen cells. This review (i) describes currently conducted clinical trials of cell-free products containing secretome of MSC; (ii) summarizes main approaches to generation and characterization of conditioned medium concentrates and extracellular vesicle isolates; (iii) analyzes a variety of preclinical studies where effectiveness of secretome products was shown, and (iv) summarizes current knowledge about bioactive components in secretome obtained from the analysis of *in vivo* models where secretome therapeutic potential was tested.

Keywords: MSC, secretome, conditioned media, extracellular vesicles, exosomes