

## АНОТАЦІЯ

*Москальов В. Б.* Одержання та оцінка біологічної активності екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 – Біологія). – Міністерство освіти і науки України. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2023.

Дисертація присвячена охарактеризуванню біологічних ефектів екзометаболітів неактивованих ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин на прояви фібротичного процесу на експериментальній моделі тетрахлорметанового фіброзу та з'ясуванню внеску окремих імунологічних показників до цих ефектів.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є популяцію високопластичних клітин, які виявляються у багатьох тканинах дорослих та приймають участь у регенеративних процесах і регуляції гомеостазу організму. Механізми їх дії можна поділити на контактні, що засновані на прямій міжклітинній взаємодії, та дистантні, що виявляються через секретовані ними речовини. МСК також можуть диференціюватися у клітини пошкодженої тканини та заміщувати таким чином втрачений клітинний матеріал, але внесок цього механізму вкрай незначний. Численні дослідження у регенеративній медицині присвячені саме ролі стовбурових клітин. На багатьох моделях були показані доволі широкий спектр біологічних та навіть клінічних ефектів стовбурових клітин. Як зазначалось, їх біологічна дія може здійснюватися двома шляхами: прямим міжклітинними контактами та екскрецією широкого спектру екзометаболітів. Регуляторна дія екзометаболітів (секретому) стовбурових клітин вивчена значно менше, ніж контактні взаємодії. З'ясування ролі секретому є важливим як для розуміння механізму дії стовбурових клітин, так й для їх практичного застосування у біотехнології. Наразі розроблені методи культивування стовбурових клітин дозволяють отримувати екзометаболіти стовбурових клітин у значущій кількості,

а використання секретому не пов'язано с потенційним ризиком терапії живими клітинами (малігнізація, атипове диференціювання, провокування імунної відповіді на поверхневі антигени клітин) та розв'язує більшість біоетичних проблем.

Секретовані МСК екзометаболіти містять розчинні компоненти – цитокіни, хемокіни, фактори росту – та везикули, що найчастіше містять мікроРНК, а у сукупності йменуються секретомом. Вплив різних чинників, наприклад, ліпополісахариду, запальних цитокінів, активує МСК та змінює профіль їх секретому, який в такому разі сильно залежить від інтенсивності дії чинника та не завжди може бути достовірно прогнозованим. Вивчення біологічної дії секретому неактивованих МСК, одержаних у відносно стандартизованих умовах культури майже не здійснювалось. Для розуміння механізму дії та потенціального використання компонентів секретому доцільно розробляти та впроваджувати ефективні та відносно недорогі способи розділення його на фракції. Щодо таких способів інтерес пригортає мембранна фільтрація, що дозволяє одержати різні за молекулярною масою компоненти. Секретом було розділено на фракцією масою менше 10 кДа, 10–30 кДа та більше 30 кДа, виконана оцінка їх біологічної дії.

В якості експериментальної моделі для оцінки біологічної дії компонентів секретому було обрано фіброз печінки. Це пояснюється тим, що хвороби печінки є поширеною причиною смерті у світі. Основним патологічним процесом, у якому виявляються ці хвороби є саме фіброз з потенційним переходом до необоротного загрозливого патологічного стану. Хоча печінка володіє високою здатністю до регенерації, в умовах інтенсивного фіброзу, що супроводжується персистуючим запаленням, відновлення пошкодженої тканини відбувається неефективно. Сучасні гепатопротектори переважно рослинного походження здатні посилювати регенерацію, але не завжди їх біологічної активності вистачає для припинення розвитку патології. Тому важливим є пошук речовин та композицій, які здатні ефективно зміщувати рівновагу «фіброз–регенерація» у бік останньої та, при цьому, зменшувати запальні прояви.

Персистуюче запалення є чинником, що підтримує фібротичний процес, а клітини імунної системи можуть продукувати надлишок прозапальних цитокінів, викликаючи явище, що описується в літературі як «цитокіновий шторм», яке призводить до пошкодження тканин. Вірогідно існують й інші імунологічні механізми підтримки фіброзу печінки. Одним з механізмів дії мезенхімальних стовбурових клітин та, як припускається у роботі, їх екзометаболітів є саме імуномодулювальна та протизапальна дія. Багато відомо про контактні механізми імуносупресії, зниження продукції запальних чинників, а у деяких мікрооточеннях – активації імунної відповіді – під впливом МСК. Дослідження ефекту секретому МСК на динаміку змін запалення, інтенсивність антитілопродукції у відповідь на ксеноантиген, фагоцитарної активності нейтрофілів та клітинних реакцій у моделі гіперчутливості уповільненого типу дозволяє одержати дані для комплексного розуміння дистантних впливів на імунну систему неактивованими МСК, що є важливим для розуміння механізмів їх антифібротичної дії.

Зважаючи на сказане, *актуальним* є охарактеризування біологічних ефектів компонентів секретому неактивованих мезенхімальних стовбурових клітин, одержаних за певних відносно стандартних умов, на стан фібротичної печінки та можливих імунних компонентів таких ефектів, що в подальшому допоможе розв'язати проблеми практичного застосування МСК.

*Метою роботи* було розробити спосіб одержання секретому ксеногенних МСК, охарактеризувати його можливі біологічні властивості на моделі фіброзу печінки, дослідити дію секретому на деякі показники імунної системи як системи регуляції функцій організму та їх вплив на процеси регенерації печінки у стані фіброзу.

Розроблено спосіб одержання екзометаболітів МСК кістковомозкового походження, що, за необхідності, може включати кріогенне зберігання клітин, яке, вірогідно, не впливає на кількість та якість продукованих біологічно активних речовин. Збір кондиційованого екзометаболітами МСК середовища краще здійснювати від культур 3–5 пасажів, бо в цей період спостерігається максимальна

ростова та секреторна активність клітин, на 48 год. росту за умови наявності 5–6 млн клітин/мл. Екзометаболіти можуть бути розділені за масою ультрафільтрацією.

Порівняння спектрів поглинання фракцій секретому показує більшу кількість білків у цільній фракції секретому та їх відмінний від контрольного середовища амінокислотний склад. У фракціях менше 10 кДа та 10–30 кДа є піки в областях 220 нм (вірогідно, сірковмісні амінокислоти), 240 і 280 нм (вірогідно, ароматичні амінокислоти) та 340 нм (складні пептиди, можливо з металічними доменами). Фракція більше 30 кДа містить смугу пропускання від 280 нм (складні білки, вірогідно, багато ароматичних амінокислоти).

Встановлено, що екзометаболіти ксеногенних МСК стимулюють *in vitro* формування зони росту навколо фрагментів печінки, одержаних від інтактних тварин. Найбільшу активність виявляє фракція масою <10 кДа, найнижчу – фракція масою вище за 30 кДа.

Вперше досліджено вплив фракції секретому масою менше 10 кДа на фібротичну печінку *in vivo*. Зафіксовано зниження ендогенної інтоксикації продуктами аутолізу печінки, зменшення фібротичних процесів (підвищення активності аланінамінотрансферази, зниження коефіцієнта де Рітиса та зменшення візуального фіброзу) та анемічних проявів. Також спостерігалось компенсаторне посилення регенеративної активності печінки *ex vivo*.

Вперше встановлено, що екзометаболіти неактивованих ксеногенних МСК посилюють антитілопродукцію на фоні імунізації ксеноантигеном. Вплив високих доз більше виражений за внутрішньом'язового введення, вочевидь, на гуморальну ланку імунітету більше впливають їх системні ефекти, ніж паракринні. Також з'ясовано вперше, що екзометаболіти МСК здатні забезпечувати компенсацію імунодефіцитного стану. Раніше вважалось, що ключовим механізмом цитопротекції є контактна взаємодія МСК та В клітин, проте показано, що дистантні механізми відіграють не менш важливу роль у цьому.

Визначено, що вплив секретому МСК на клітинні відповіді навпроти обумовлені, вірогідно, паракринними ефектами, а не генералізованими, бо

підшкірне введення секретому викликало більш виражену супресію реакції гіперчутливості уповільненого типу, ніж внутрішньом'язове. Показано, що секретом ксеногенних неактивованих МСК не чинить ані супресуючої, ані активуючої дії на фагоцитарну активність нейтрофілів.

Досліджено динаміку антиексудативної активності під впливом екзометаболітів МСК. Вони мають виражену протизапальну дію, яка починається пізніше, ніж дія інгібіторів циклооксигеназ та виявляється більш плавно.

Всі дослідження, результати яких представлені у дисертаційній роботі, виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведено пошук та аналіз наукових джерел, виконано основну частину експериментальної роботи, здійснено статистичний аналіз одержаних результатів, а також апробація результатів на Всеукраїнських та міжнародних конференціях. Планування експериментальних досліджень, аналіз та обговорення отриманих даних, підготовка рукописів статей проводилося спільно з науковим керівником д. б. н., проф. Божковим А. І.

**Ключові слова:** секретом (екзометаболіти) мезенхімальних стовбурових клітин, клітинна біотехнологія, секреторна активність, регенерація, антитіла (імуноглобуліни), цитокіни, фагоцитоз нейтрофілів, гіперчутливість уповільненого типу, запалення, карагеніновий набряк, органотипова культура, печінка, фіброз, гематологічні показники, спектрофотометрія, культури *in vitro*.

## SUMMARY

*Moskalov V. B.* Obtaining and evaluating the biological activity of exometabolites of mesenchymal stem cells. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation (thesis) for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 – Biology). – Ministry of education and science of Ukraine. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2023.

This dissertation (thesis) is devoted to the characterization of the biological effects of non-activated mesenchymal stem cells exometabolites on the manifestations of the fibrotic process on the experimental model of tetrachloromethane fibrosis and to elucidate the contribution of individual immunological indicators to these effects.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of highly plastic cells that are found in many tissues of adults and take part in regenerative processes and regulation of body homeostasis. The mechanisms of their action can be divided into contact, based on direct intercellular interaction, and distant, which are manifested through substances secreted by them. MSCs can also differentiate into cells of the damaged tissue and thus replace the lost cellular material, but the contribution of this mechanism is extremely small. Numerous studies in regenerative medicine are devoted to the role of stem cells. A wide range of biological and even clinical effects of stem cells have been shown in many models. As mentioned, their biological action can be carried out in two ways: direct intercellular contacts and excretion of a wide range of exometabolites. The regulatory effect of exometabolites (secretome) of stem cells has been studied much less than contact interactions. Elucidating the role of the secretome is important both for understanding the mechanism of stem cells action and for their practical application in biotechnology. The methods of stem cell cultivation now developed allow obtaining stem cells exometabolites in significant quantities, and the use of the secretome is not related to the potential risk of living cell therapy (malignancy, atypical differentiation, provoking an immune response to cell surface antigens) and solves most bioethical problems.

Exometabolites secreted by MSCs contain soluble components – cytokines, chemokines, growth factors – and vesicles, which most often contain miRNAs, and are collectively called the secretome. The influence of various factors, for example, lipopolysaccharide, inflammatory cytokines, activates MSCs and changes the profile of their secretome, which in this case strongly depends on the intensity of the factor effect and cannot always be reliably predicted. The study of the biological effect of the secretome of non-activated MSCs, obtained under relatively standardized conditions, was almost never carried out. To understand the mechanism of action and potential use of secretome components, it is advisable to develop and implement effective and relatively inexpensive methods of fractionating. In relation to such methods, membrane filtration, which allows obtaining components of different molecular weight, is of interest. The secretome was separated into fractions weighing less than 10 kDa, 10–30 kDa, and more than 30 kDa, and their biological effects were evaluated.

Liver fibrosis was chosen as an experimental model for evaluating the biological action of secretome components. This is explained by the fact that liver disease is a common cause of death in the world. The main pathological process in which these diseases are manifested is exactly fibrosis with a potential transition to an irreversible, dangerous pathological condition. Although the liver has a high capacity for regeneration, in conditions of intense fibrosis accompanied by persistent inflammation, the recovery of damaged tissue is ineffective. Modern hepatoprotectors, mainly of plant origin, are able to enhance regeneration, but their biological activity is not always enough to stop the development of pathology. Therefore, it is important to search for substances and compositions that can effectively shift the balance of "fibrosis–regeneration" towards the latter process and, at the same time, reduce inflammatory manifestations.

Persistent inflammation is a factor that supports the fibrotic process, and cells of the immune system can produce an excess of pro-inflammatory cytokines, causing a phenomenon described in the literature as a "cytokine storm" that leads to tissue damage. There are probably other immunological mechanisms supporting liver fibrosis. One of the mechanisms of mesenchymal stem cells action and their exometabolites as

suggested in this work is exactly the immunomodulatory and anti-inflammatory effect. Much is known about the contact mechanisms of immunosuppression, the reduction of the inflammatory factors production, and in some microenvironments, the activation of the immune response under the influence of MSCs. The study of the MSCs secretome effect on the dynamics of inflammation changes, the intensity of antibody production in response to xenoantigen, the phagocytic activity of neutrophils and cellular reactions in the model of delayed type hypersensitivity allows to obtain the data necessary for a comprehensive understanding of the distant mechanisms of immunomodulation by non-activated MSCs, which is important for understanding the mechanisms of their antifibrotic action.

Considering the above, it is *relevant* to characterize the biological effects of non-activated mesenchymal stem cells secretome components, obtained under certain relatively standard conditions, on the state of the fibrotic liver and the potential immune components of such effects, which in the future will help to solve the problems of the MSCs practical use.

The *aim of the work* was to develop a method of obtaining the secretome of xenogenic MSCs, to characterize its possible biological properties on a model of liver fibrosis, to investigate the effect of the secretome on some indicators of the immune system as a system of regulating body functions and regeneration processes of the liver in the fibrosis state.

A method for obtaining exometabolites of MSCs of bone marrow origin has been developed, which, if necessary, may include cryogenic storage of cells, that highly likely does not affect the quantity and quality of biologically active substances produced. It is better to collect MSCs conditioned medium with exometabolites from cultures of passages 3–5, because the maximum growth and secretory activity of cells is observed in this period, for 48 h growth provided there are 5–6 million cells/ml. Exometabolites can be separated by mass by ultrafiltration.

A comparison of the secretome fractions absorption spectra shows a greater number of proteins in the whole fraction of the secretome and their difference from the control medium in amino acid composition. The fractions less than 10 kDa and 10–30



kDa had peaks in the regions of 220 nm (highly likely, sulfur-containing amino acid), 240 and 280 nm (highly likely, aromatic amino acid), and 340 nm (complex peptides, possibly, with metal domains). The fraction greater than 30 kDa contains a transmission band from 280 nm (complex proteins, highly likely, many aromatic amino acid).

It was established that exometabolites of xenogeneic MSCs stimulate *in vitro* formation of a growth zone around liver fragments obtained from intact animals. The fraction with a mass <10 kDa showed the highest activity, the fraction with a mass >30 kDa showed the lowest activity.

For the first time, the effect of the secretome fraction with a mass of less than 10 kDa on the fibrotic liver *in vivo* was investigated. A decrease in endogenous intoxication by liver autolysis products, a decrease in fibrotic processes (increased alanine aminotransferase activity, a decrease in the de Ritis ratio, and a decrease in visual fibrosis) and anemic manifestations were recorded. Compensatory enhancement of liver regenerative activity *ex vivo* was also observed.

It was established for the first time that non-activated xenogeneic MSCs exometabolites enhance antibody production against the background of xenoantigen immunization. The effect of high doses is more pronounced after intramuscular administration, obviously, the humoral link of immunity is more affected by their systemic effects than by paracrine ones. It was also found out for the first time that exometabolites of MSCs are able to compensate for the immunodeficiency state. Previously, it was believed that the key mechanism of cytoprotection is the contact interaction of MSCs and B cells, but it has been shown that distant mechanisms play an equally important role in this.

It was determined that the impact of the MSCs secretome on cellular responses, on the contrary, is probably due to paracrine effects, and not generalized ones, because the subcutaneous administration of the secretome caused a more pronounced suppression of the delayed-type hypersensitivity reaction than the intramuscular one. It was shown that the secretome of xenogeneic non-activated MSCs has neither a suppressive nor an activating effect on the phagocytic activity of neutrophils.

The dynamics of anti-exudative activity under the impact of MSCs echometabolites was studied. They have a pronounced anti-inflammatory action, which begins later than the action of cyclooxygenase inhibitors and is more gradual.

All researches, the results of which are presented in the dissertation work (thesis), were performed personally or with the direct participation of the applicant. The author of the dissertation independently carried out a search and analysis of scientific literature, performed the main part of the experimental work, carried out a statistical analysis of the obtained results, as well as its approbation at All-Ukrainian and international conferences. Planning of experimental researches, analysis and discussion of the obtained data, preparation of manuscripts of articles was carried out together with the supervisor prof. Bozhkov A. I.

**Key words:** secretome (exometabolites) of mesenchymal stem cells, cellular biotechnology, secretory activity, regeneration, antibodies (immunoglobulins), cytokines, neutrophil phagocytosis, delayed-type hypersensitivity, inflammation, carrageenan edema, organotypic culture, liver, fibrosis, hematological indicators, spectrophotometry, *in vitro* cultures.