

УДК: 576.362:612.111.7

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2026.1.455

ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛОШАДИ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ IN VITRO

Нечаев А.Ю.^{1,2} – д-р ветеринар. наук, проф., зав. каф. общей, частной и оперативной хирургии, интерн (ORCID 0000-0001-9035-0036); **Бокарев А.В.**¹ – д-р ветеринар. наук, доц. каф. общей, частной и оперативной хирургии (ORCID 0000-0002-4623-5388); **Минина А.О.**^{1*} – канд. ветеринар. наук, доц., доц. кафедры общей, частной и оперативной хирургии (ORCID 0000-0002-4176-4053); **Сорока В.А.**¹ – канд. ветеринар. наук, асс. каф. общей, частной и оперативной хирургии (ORCID 0000-0002-1413-4486); **Али С.Г.**³ – канд. биол. наук, начальник НПЛ клеточных технологий ООО «Стэм реновацио» (ORCID 0000-0002-0528-671X);

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

² ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет»

³ ООО «Стэм реновацио»

* bluzma-nast@yandex.ru

Ключевые слова: тромбоциты, секретом, тромбообразование, агрегации, сосудисто-тромбоцитарный гемостаз.

Key words: platelets, secretions, thrombosis, aggregations, vascular-platelet hemostasis.

Финансирование: Материалы подготовлены в рамках Российского научного фонда 2025 года «Использование продуктов секреции мезенхимальных стволовых клеток для стимуляции физиологической и репаративной регенерации кардиореспираторной системы у лошадей» (соглашение №25-16-00265 от 29.05.2025).

Поступила: 31.08.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 01.04.2026



РЕФЕРАТ

Исследовали влияние секретом МСК лошади на способность к индукции тромбообразования in vitro путем визуальной оценки агрегации тромбоцитов под действием данного препарата на предметном стекле по методу А. С. Шитиковой, наблюдая процесс под фазовым контрастом. Определение влияния секретом на тромбообразование in vitro проводили на тромбоцитарной плазме, выделенной из крови лошадей с антикоагулянтом - цитратом натрия. В пробирки с тромбоцитарной плазмой вносили физиологический раствор (контроль 1), 10,0% раствора хлорида кальция (контроль 2), секретом в пропорции 10 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секретом (опыт 1), секретом в пропорции 20 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части

секретома (опыт 2), секретом в пропорции 20 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секретома и 10,0% раствора хлорида кальция (опыт 3). После добавления контрольных и опытных препаратов к образцам тромбоцитарной плазмы, 10,0 мкл смеси микроскопировали при увеличении X400 используя фазовый контраст. В результате наших исследований были получены данные, указывающие на то, что у секретома МСК лошади отсутствует способность индуцировать агрегацию тромбоцитов. Плазма, обогащенная тромбоцитами, полученная от лошадей (n=10) с цитратом натрия не проявляла признаков агрегации, в отличие от плазмы, обогащенной тромбоцитами с цитратом натрия, активированная хлористым кальцием. При добавлении секретома в концентрациях 10 к 1 (10 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секретома) и 20 к 1 (20 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секретома) агрегация тромбоцитов также не наблюдалась. В то же время, при внесении хлористого кальция в образец плазмы, обогащенной тромбоцитами с добавлением секретома, агрегация тромбоцитов была в пределах нормы.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В настоящее время мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются одним из перспективных направлений в регенеративной медицине. Однако применение стволовых клеток всегда сопряжено с риском возникновения неоплазий, индукции воспалительной реакции или тромбообразования [1]. Считается, что значительную часть положительных эффектов МСК оказывают за счет секреции различных факторов роста, белков, цитокинов, компонентов, выделяемых клетками в окружающую их среду и переносимых в том числе в составе внеклеточных везикул [2, 3, 4, 5, 6]. В связи с этим, если отсутствует необходимость в непосредственном ускорении регенерации путем введения МСК, более доступной и безопасной альтернативой регенеративной терапии может быть использование секретома. Т.е., кондиционной среды, обогащенной различными биологически активными веществами выделяемыми МСК в процессе роста и пролиферации.

Основными преимуществами использования секретома является снижение рисков, связанных с клеточной терапией, а также более простое и быстрое производства секретома в сравнении с МСК [7].

Секретом активно используют для ускорения регенерации тканей, в случаях альтернативы применения стволовых клеток для лечения патологий сердечно-сосудистых, дыхательных, опорно-двигательных и других систем [8, 9, 10].

Секретом, как продукт секреции мезенхимальных

стволовых клеток содержит различные белковые молекулы (от 0,5 до 1,5 г/мл) которые, соответственно, как и любые белки, обладающие биологической активностью, могут вызывать локальные или генерализованные изменения, вплоть до негативных, в сосудистом русле, взаимодействуя с рецепторами на мембранах клеток эндотелия или форменных элементов крови.

Целью нашей работы было определить влияние секретома МСК лошади на способность к индукции тромбообразования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Определение способности секретома МСК лошадей индуцировать тромбообразование проверяли в эксперименте *in vitro* путем визуальной оценки агрегации тромбоцитов под действием данного препарата на предметном стекле по методу А. С. Шитиковой, наблюдая процесс под фазовым контрастом.

Определение влияния секретома на тромбообразование *in vitro* проводили следующим образом:

1 – у 10 лошадей отобрали по 10,0 мл крови с антикоагулянтом натрия цитратом.

2 – кровь центрифугировали при 1500 оборотах в минуту 10 минут.

3 – плазму с тромбоцитами отобрали в отдельную пробирку.

4 - в четыре пробирки эпендорф внесли по 500,0 мкл мл тромбоцитарной плазмы.

КОНТРОЛЬ 1. В пробирку №1 добавляли 20,0 мкл физиологического раствора.

КОНТРОЛЬ 2. В пробирку №2 добавляли 20,0 мкл 10,0% раствора хлорида кальция.

ОПЫТ1. В пробирку №3 добавляли 50,0 мкл секрета (10 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секрета).

ОПЫТ2. В пробирку №4 добавляли 25,0 мкл секрета (20 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секрета).

ОПЫТ 3. В пробирку № добавляли 50,0 мкл секрета (10 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секрета) и 20,0 мкл 10,0% раствора хлорида кальция.

5 – после добавления контрольных и опытных препаратов к образцам тромбоцитарной плазмы, 10,0 мкл смеси переносили на предметное стекло и накрывали покровным. Степень агрегации тромбоцитов оценивали визуально микрофотографируя образцы при увеличении X400 используя фазовый контраст.

Все контрольные и опытные варианты эксперимента выполняли в пяти (5) повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Результаты исследования показали, что в полученных образцах плазмы отсутствует спонтанная агрегация тромбоцитов (контроль №1 – Рис. 1). Но тромбоциты сохраняют способность к агрегации при активации, что показывают эксперименты с добавлением хлорида кальция (контроль №2 – Рис. 2).

Так же проведенные исследования показали, что секретом ни в высокой концентрации (10 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секрета), ни в низкой концентрации (20 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секрета) не индуцирует агрегацию тромбоцитов (Опыт №1 – Рис. 3 и Опыт №2 – Рис. 4 соответственно).

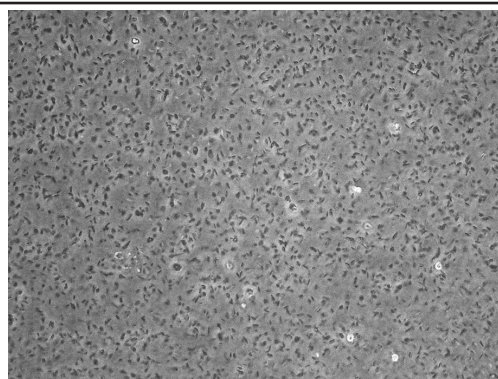


Рисунок 1 – Нативные тромбоциты.
Увеличение X 200.

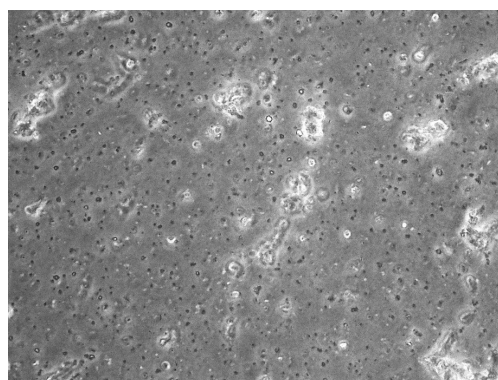


Рисунок 2 – Агрегация тромбоцитов после внесения в образец тромбоцитарной плазмы хлористого кальция.
Увеличение X 200.

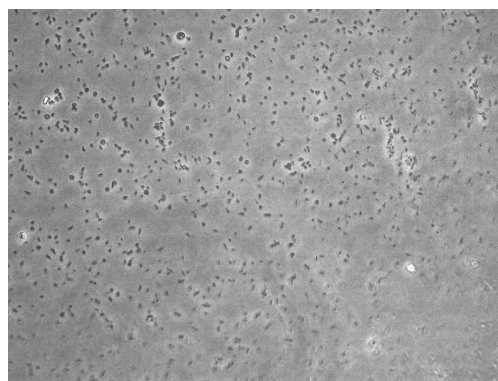


Рисунок 3 – Внешний вид тромбоцитов после смешивания тромбоцитарной плазмы и секрета 10 к 1.
Увеличение X 200.

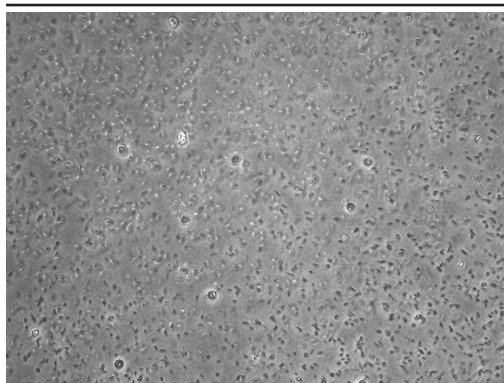


Рисунок 4 – Внешний вид тромбоцитов после смешивания тромбоцитарной плазмы и секретома 20 к 1. Увеличение X 200.

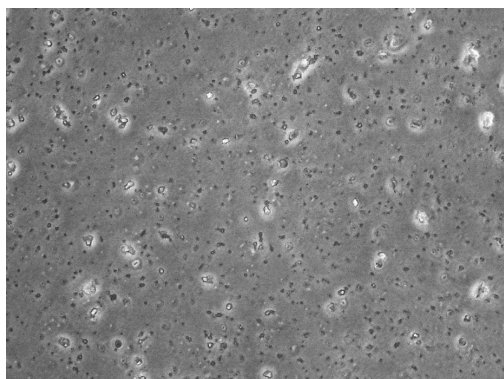


Рисунок 5 – Внешний вид тромбоцитов после смешивания тромбоцитарной плазмы и секретома в соотношении 10 к 1 и последующего добавления хлорида кальция. Увеличение X 200.

Дополнительное исследование показало, что добавление хлористого кальция к тромбоцитарной плазме, в которую предварительно уже был введен секретом в соотношении 10 к 1, индуцирует нормальную агрегацию тромбоцитов (Опыт №3 – Рис. 5).

В результате наших исследований были получены данные, указывающие на то, что у секретомы МСК лошади отсутствует способность индуцировать агрегацию тромбоцитов. Плазма, обогащенная тромбоцитами, полученная от лошадей (n=10) с цитратом натрия не проявляла признаков агрегации, в отличие от плаз-

мы, обогащенной тромбоцитами с цитратом натрия, активированная хлористым кальцием. При добавлении секретомы в концентрациях 10 к 1 (10 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секретомы) и 20 к 1 (20 частей объема плазмы, обогащенной тромбоцитами к 1 части секретомы) агрегация тромбоцитов также не наблюдалась. В то же время, при внесении хлористого кальция в образец плазмы, обогащенной тромбоцитами с добавлением секретомы, агрегация тромбоцитов была в пределах нормы.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Таким образом, исследования проведенные *in vitro* позволяют сделать вывод, что секретом самостоятельно не провоцирует сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и поэтому не может быть причиной тромбоэмболий. Но также и не препятствует индуцированному сосудисто-тромбоцитарному гемостазу поэтому не может являться причиной спонтанных или причиной нарушения остановки индуцированных кровотечений.

EFFECT OF THE SECRETOME OF HORSE MESENCHYMAL STEM CELLS ON PLATELET AGGREGATION IN VITRO

Nechaev A.Y.^{1,2} – Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Department of General, Private and Operative Surgery, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, (orcid 0000-0001-9035-0036); **Bokarev A. V.**¹ – Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of General, Private and Operative Surgery of the St. Petersburg State University of Veterinary Medicine (orcid: 0000-0002-4623-5388); **Minina A. O.**^{1*} – PhD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of General, Private and Operative Surgery of the St. Petersburg State University of Veterinary Medicine (orcid 0000-0002-4176-4053), **Soroka V.A.**¹ – PhD, Assistant Professor at the Department of General, Private and Operative Surgery of the Department of General, Private and Operative Surgery of the St. Petersburg State University of Veterinary Medi-

cine (orcid 0000-0002-1413-4486); Ali S.G.³ – PhD, Head of NPL of Cellular Technologies, Stem Renovation LLC (orcid 0000-0002-0528-671X)

¹ St. Petersburg State University of Veterinary Medicine;

² Don State Technical University

³ Stem Renovation LLC

* bluzma-nast@yandex.ru

Funding: *The materials were prepared within the framework of the Russian Science Foundation 2025 "The use of mesenchymal stem cell secretion products to stimulate the physiological and reparative regeneration of the cardiorespiratory system in horses" (Agreement No. 25-16-00265 dated 05/29/2025).*

ABSTRACT

The effect of the equine MSCs secretome on the ability to induce thrombosis in vitro was studied by visually assessing platelet aggregation under the action of this drug on a slide using the A. S. Shitikova method, observing the process under phase contrast. The effect of secretome on thrombosis in vitro was determined on platelet plasma isolated from horse blood with the anticoagulant sodium citrate. Saline solution (control 1), 10.0% calcium chloride solution (control 2), a secret in the proportion of 10 parts of the volume of plasma enriched with platelets to 1 part of the secretome (experiment 1), a secret in the proportion of 20 parts of the volume of plasma enriched with platelets to 1 part of the secretome (experiment 2) were added to tubes with platelet plasma, a secret in the proportion of 20 parts of the volume of plasma enriched with platelets to 1 part of the secretome and 10.0% calcium chloride solution (experiment 3). After adding control and experimental preparations to platelet plasma samples, 10.0 µl of the mixture was microscopied at X400 magnification using phase contrast. As a result of our research, data were obtained indicating that the secretome of horse MSCs lacks the ability to induce platelet aggregation. Platelet-rich plasma obtained from horses (n=10) with sodi-

um citrate showed no signs of aggregation, unlike platelet-rich plasma with sodium citrate activated with calcium chloride. When secretome was added at concentrations of 10 to 1 (10 parts of platelet-rich plasma volume to 1 part of secretome) and 20 to 1 (20 parts of platelet-rich plasma volume to 1 part of secretome), platelet aggregation was also not observed. At the same time, when calcium chloride was added to a platelet-enriched plasma sample with the addition of secretome, platelet aggregation was within the normal range.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Novel potency assay for MSC secretome-based treatment of idiopathic male infertility employed Leydig cells and revealed vascular endothelial growth factor as a promising potency marker / A. Monakova, G. Sagaradze, N. Basalova, et al. // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23. - № 16. – P. 9414.
2. Изучение безопасности оригинального препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток при локальном введении в яички и при внутримышечном введении крысам / А.О. Монакова, Г.Д. Сагарадзе, В.Ю. Балабаньян и др. // Безопасность и риск фармакотерапии. - 2024. - №1. - С.99-116.
3. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes / N. Kalinina, D. Kharlampieva, M. Loguinova, et al. // Stem Cell Res Ther. – 2015. - № 6. – P. 221.
4. Савченкова, И.П. Внеклеточные везикулы, в том числе экзосомы, из мезенхимных стволовых/стромальных клеток животных / И.П. Савченкова, Г.А. Надточей // Сельхозбиология. - 2023. - №6. – С. 1112-1121.
5. Расширенные исследования безопасности биологического лекарственного препарата на основе секрета мезенхимных стромальных клеток человека: иммунотоксичные и онкогенные свойства / А. О. Монакова, В. Ю. Балабаньян, В. А. Вавилова и др. // Лабораторные животные для научных исследований. - 2025.- №3. - С. 56-65.
6. Влияние кондиционированной среды

мезенхимальных стромальных клеток барана на качественные показатели сперматозоидов/ Е. А. Корочкина, А. В. Трифонова, А. Ю. Нечаев, В.С. Пушкина, Д.Е. Главацкая // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 2. – С. 276-284.

7. Teixeira, F.G. Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges / F.G. Teixeira, A.J. Salgado // *Neural Regen Res.* – 2020. – V. 15. - № 1. – P. 75.

8. Куралесова, А.И. Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стромальными клетками, для терапии острого респираторного дистресс-синдрома: обзор доклинических и клинических исследований / А.И. Куралесова, А.Г. Грошева, Е.Н. Генкина, и др. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* - 2025. - №3. – С. 343-356.

9. Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: overview of clinical trials / M. Ghasemi, E. Roshandel, M. Mohammadian et al. // *Stem Cell Res Ther.* - 2023. - V. 14. - №.1. - P.122.

10. Viktorova, E.V. Multipotent mesenchymal stem cells in clinical veterinary practice / E.V. Viktorova, I.P. Savchenkova // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* – 2020. – V. 548. – P. 072072.

REFERENCES

1. A new efficacy analysis for the treatment of idiopathic male infertility based on MSC secretome using Leydig cells and identifying vascular endothelial growth factor as a promising efficacy marker / A. Monakova, G. Sagaradze, N. Basalova et al. // *Int J Mol Sci.* - 2022. – Vol. 23. – No. 16. – R. 9414.

2. Study of the safety of an original drug based on the secretome of mesenchymal stromal cells when injected locally into the testicles and intramuscularly into rats / A.O. Monakova, G.D. Sagaradze, V.Y. Balabanyan et al. // *Safety and risk of pharmacotherapy.* - 2024. - No. 1. - pp.99-116.

3. Characteristics of secretomes make it possible

to identify subtypes of mesenchymal stromal cells of fatty origin / N. Kalinina, D. Kharlampieva, M. Loginova et al. // *Stem cell research.* - 2015. – No. 6. - p. 221.

4. Savchenkova, I.P. Extracellular vesicles, including exosomes, from mesenchymal stem/stromal cells of animals / I.P. Savchenkova, G.A. Nadtochey // *Agricultural biology.* 2023. No. 6. pp. 1112-1121.

5. Extended safety studies of a biological medicinal product based on the secretome of human mesenchymal stromal cells: immunotoxic and oncogenic properties / A. O. Monakova, V. Y. Balabanyan, V. A. Vavilova et al. // *Laboratory animals for scientific research.* - 2025.- No. 3. - pp. 56-65.

6. Influence of the conditioned medium of sheep mesenchymal stromal cells on the quality indicators of spermatozoa/ E. A. Korochkina, A. V. Trifonova, A. Yu. Nechaev, V. S. Pushkina, D. E. Glavatskaya // *International Bulletin of Veterinary Medicine.* 2024. No. 2. pp. 276-284.

7. Teixeira, F.G. The secret of mesenchymal stem cells: current trends and challenges of the future / F.G. Teixeira, A.H. Salgado // *Neural regeneration.* – 2020. – Vol. 15. - No. 1. – P. 75.

8. Kuralesova, A.I. Exosomes produced by mesenchymal stromal cells for the treatment of acute respiratory distress syndrome: a review of preclinical and clinical studies / A.I. Kuralesova, A.G. Grosheva, E.N. Genkina, et al. // *Biologics. Prevention, diagnosis, and treatment.* - 2025. - No. 3. – pp. 343-356.

9. Mesenchymal therapy of neurodegenerative diseases based on a secretome obtained from stromal cells: a review of clinical trials / M. Ghasemi, E. Roshandel, M. Mohammadian et al. // *Stem cell research.* - 2023. - Vol. 14. - No. 1. - p. 122.

10. Viktorova, E.V. Multipotent mesenchymal stem cells in clinical veterinary practice / E.V. Viktorova, I.P. Savchenkova // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* – 2020. – V. 548. – R. 072072.