

## НАУЧНИ ОБЗОРИ SCIENTIFIC REVIEWS

### СТВОЛОВИ КЛЕТКИ: ПРИЛОЖЕНИЕ В МЕДИЦИНАТА

*Н. Бояджиева, М. Варадинова и Р. Методиева*

*Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет,  
Медицински университет – София*

### STEM CELLS: THEIR APPLICATION IN MEDICINE

*N. Boyadzhieva, M. Varadinova and R. Metodieva*

*Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty,  
Medical University – Sofia*

**Резюме.** Стволовите клетки са недиференцирани клетки, които са основно две групи: ембрионални и следембрионални (във възрастния организъм). Те имат следните характеристики: А. Способност да пролиферират; Б. Способност да се диференцират; В. Могат да аглутинират и да образуват т.нар. сфери. Те експресират специфични антигени (маркери). По време на ембрионалното развитие от бластулата се оформя колония от стволови клетки, която формира 3 важни групи от дермални слоеве на стволови клетки: ендодерма, мезодерма и ектодерма. Стволовите клетки на тези слоеве се диференцират в различни клетки, както следва: 1. От ендодермата се диференцират клетките на бял дроб, щитовидна жлеза и панкреас. 2. От мезодермата се диференцират клетки на сърдечен мускул, скелетен мускул, бъбрек, гладък мускул на храносмилателна система и червени кръвни клетки. 3. От ектодермата се диференцират клетки на кожа, неврони, глия на мозък и пигментни клетки. Приложението на стволовите клетки е в различни области на медицината за лечение на много заболявания, като: неврологични, злокачествени, хемопоетични, сърдечно-съдови, аутоимунни, ендокринни, репродуктивни, кожни и др. В допълнение, проучванията върху стволови клетки имат роля за бъдещ прогрес в клетъчната трансплантация (клетъчно базираната терапия).

**Ключови думи:** стволова клетка, клетъчно базирана терапия, клетъчна трансплантация, диференциация на фенотипни клетки

**Адрес за кореспонденция:** Д-р Мирослава Георгиева Варадинова, дм, Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет, ул. „Здраве“ № 2, София, тел.: 02/9520539, e-mail: miria@abv.bg

---

*Summary.* Stem cells are undifferentiated cells. They are 2 groups: embryonic and adult stem cells. They have the following characteristics: a) the capacity to proliferate (self-renewal); b) the capacity to differentiate in various mature cells; c) agglutination. They express antigens (markers). During development of embryo, basic blastula forms the colony of stem cells and the colony forms 3 important groups of stem cells: endoderm, mesoderm and ectoderm. Each of them can differentiate in different mature cells as followings: endoderm (lung cells, pancreatic cells and thyroid gland cells), mesoderm (muscle cells, cardiomyocytes, erythrocytes, kidney cells, etc.) and ectoderm (skin cells, neuronal cells, glia, etc.). The application of stem cells in medicine is to treat various diseases as the followings: neurological, cancers, haemopoetic, cardiovascular, autoimmune, endocrine, reproductive, skin diseases, etc. In addition, the in vitro and in vivo studies on stem cells plays a role in future progress for cell transplantation (cell-based therapy).

*Key words:* stem cells, cell-based therapy, cell transplantation, phenotype cell differentiation

*Address for correspondence:* Miroslava Georgieva Varadinova, MD, PhD, Department of Pharmacology and Toxicology, Medical University, 2 Zdrave St., Bg – 1431 Sofia, tel.: 00359 2/952 05 39, e-mail: miria@abv.bg

---

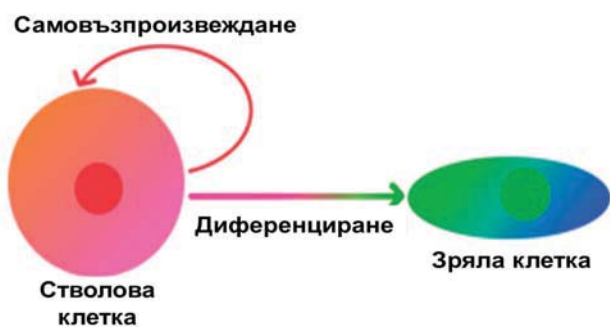
## ВЪВЕДЕНИЕ

Стволовите клетки се изследват задълбочено през последните години и се търсят възможности за тяхното диференциране в различни фенотипни клетки с цел бъдещи трансплантации. Значими научни факти се публикуваха за възможностите на стволовите клетки и лечението на ракови заболявания, невродегенеративни заболявания (като Паркинсонова болест), ендокринни (захарен диабет), хемопоетични (лимфоми, левкози и др.), сърдечно-съдови (инфаркт на миокарда), епилепсия, автоимунни и др.

Настоящото изследване демонстрира както данни от наши проучвания, така и изследвания на други автори върху възможностите за приложение на стволови клетки в медицината.

## ХАРАКТЕРИСТИКА НА СТВОЛОВА КЛЕТКА

Стволовата клетка е недиференцирана клетка, която има способността да се възпроизвежда и диференцира. Тя експресира специфични протеини (антигени), за които се създадоха различни антитела, и това определи прогрес в научните изследвания върху стволови клетки. Способността да се самовъзпроизвежда (self-renewal) се документира както при *in vivo*, така и при *in vitro* изследвания. Това е важна характеристика на стволовите клетки и показва, че те имат своята клетъчна структурна възможност да се възпроизведат (фиг. 1).



Фиг. 1. Стволова клетка

Втората характеристика е свързана с възможността стволовите клетки да се диференцират в различни направления, с образуване на различни фенотипни клетки. В този процес е изключително важен началният етап, когато стволовата клетка произвежда т.нар. прогениторна (прекурсорна) клетка. Този етап определя посоката и механизмите на диференциране. Известни са различни прогениторни клетки, за които също има специфични антитела (маркери), като: невронни прогениторни клетки, хемопоетични прогениторни клетки и др. В

механизмите на диференциране участват много фактори, на които ще се спрем по-долу.

Третата характеристика на стволовите клетки е тяхната способност да аглутинират (да се свързват една с друга) и да образуват т.нар. сфери. Аглутинацията е механизъм на запазване на стволовите клетки в съответната среда, осигуряване на по-продължителен живот като стволова клетка и др.

Две са основните групи стволови клетки: ембрионални и следембрионални (на възрастния организъм) [1, 2]. Ембрионалните стволови клетки са в значим брой и определят диференцирането на клетки и на тъкани. Блестоцитът е началото, от което се образува ембрионалната колония от стволови клетки. От колонията се поставя началото на трите слоя на развитието: ектодерма, мезодерма и ендодерма.

Втората водеща група стволови клетки се изолират от различни тъкани на развиващия се след раждането организъм: главен мозък, зъбна пулпа на млечните зъби, костен мозък, мускулна тъкан, мастна тъкан, тестиси, кожа, панкреас, черен дроб и други органи [3, 6, 9, 11]. Изследванията върху ембрионални и постембрионални стволови клетки са значими и с много доказателства за техните възможности в медицината. Например: стволовите клетки в мозъка на човека имат важна роля за образуване на невронни прогениторни клетки и от тях на неврони и глия. Нашата хипотеза е, че след мозъчен инсулт започва диференциране на стволови клетки в невронни/глиални и това определя степента и бързината на възстановяване на пациента. Ако физиологичният процес на диференциране се отключи към глия – астроглия и олигодендроцити, то тогава механизмите на възстановяване невинаги са предвидими във времето. Науката изучава точно факторите и веществата, които повлияват механизмите на диференциране на неврони или глия от стволови клетки във възрастния организъм и съответно от ембрионални клетки при вътреутробното развитие. Нашите изследвания, представени по-долу, които са първи в света, демонстрират механизми на образуване на бета-ендорфинови неврони от мозъчни стволови клетки.

## ДИФЕРЕНЦИАЦИЯ НА КЛЕТКИ ОТ ТРИТЕ ДЕРМАЛНИ СЛОЯ ПРИ ЕМБРИОНАЛНОТО РАЗВИТИЕ

Както вече посочихме, от ембрионалните стволови клетки на ендодерма, мезодерма, ектодерма се диференцират, както следва:

1. От ендодермата се диференцират клетките на бял дроб, щитовидна жлеза и панкреас.

2. От мезодермата се диференцират клетки на сърдечен мускул, скелетен мускул, бъбрек, гладък мускул на храносмилателна система и червени кръвни клетки.

3. От ектодермата се диференцират клетки на кожа, неврони, глия на мозък и пигментни клетки.

В медицината се документира **контролирано диференциране на стволови клетки** [7, 8, 10, 13, 14, 18]. То се извършва при *in vitro* изследвания и изисква значим опит от изследователите върху съответната система от клетки. В процеса на диференциране се използва специфична клетъчна среда, в която има вещества с влияние върху механизми на диференциране. Тези вещества директно насочват диференцирането към дадена клетка. Много фактори, ендогенни и екзогенни, в живия организъм оказват влияние върху механизмите на диференциране на стволови клетки. При ембрионалното развитие има етапно диференциране, при което различни фактори се експресират и активират образуването на фенотипни клетки. С важно значение в тези механизми са растежните фактори, пептиди, цитокини и много други. При директното диференциране в *in vitro* система се използват различни растежни фактори, като фибробластен растежен фактор, епидермален растежен фактор, инсулиноподобен фактор и др.

Във връзка с диференцирането, стволовите клетки се разделят на две групи: А. Клетки, които се диференцират само в един фенотип клетки, и Б. Клетки, които се диференцират в различни фенотипни клетки.

Двете групи стволови клетки се намират в трите дермални слоя. Например: от мезодермата някои стволови клетки се диференцират само в клетки на надбъбрек. Те се наричат *unipotent* (едноактивни). Голям брой стволови клетки от мезодермата могат да се диференцират в различни фенотипни клетки и се наричат *multipotent* (*multipotent* – многоактивни). Например: част от мезенхимните стволови клетки са *multipotent* и от тях се образуват клетки на кости, сухожилия, мастна тъкан (фиг. 2). Хемопоеичните стволови клетки също са *multipotent*, защото от тях могат да се диференцират различни клетки на

хемопоеза (лимфоцити, еритроцити и др.). Това направление е с голямо значение за хематологията и практическото лечение на заболяванията.

**Основни направления за приложение на стволови клетки в медицината:**

1. Диференцирани фенотипни клетки от стволови клетки се трансплантират при лечение на кръвни заболявания: левкемии – остри и хронични, миелоидни заболявания и др. [21].

2. Диференцирани невронни клетки с фенотип на допаминергични неврони са трансплантирани експериментално и са проведени клинични изследвания с хора, страдащи от заболяването на Паркинсон. Клиничните изследвания са извършвани върху млади хора – част от тях с генетично детерминирано заболяване. Известно е, че при паркинсонизъм са намалени допаминергичните неврони, съответно концентрацията на важен невротрансмитер – допамин, и това определя нарушенията в двигателната активност, поведение и др. Трансплантацията локално/чрез хирургичен метод на допаминергични неврони, които са диференцирани от невронни стволови клетки в *in vitro* среда, е показала прогрес в лечението на заболяването при повече от 50% от клиничните случаи.

3. Панкреатични клетки (острови на панкреаса), които произвеждат инсулин, са диференцирани от стволови клетки и са трансплантирани на пациенти с тежки форми на захарен диабет и силна резистентност към инсулиновите лекарства. Тези трансплантации са извършвани в хода на клинични изпитвания на метода и резултатите показват под 50% успех в лечението/удължаването на живота на диабетно болни. Понастоящем се усъвършенства методът чрез трансплантация на черен дроб и панкреас (заедно) с оглед удължаване живота на пациентите. В това направление има надежда, но има и доста въпроси.

4. Публикувани са много убедителни факти за трансплантация на диференцирани клетки на сърдечен мускул при експериментален миокарден инфаркт и за ефективност на трансплантата. И в това направление има обнадеждаващи факти за успех в кардиологията при хора, но има и доста посочени рискове при различни индивидуални особености.

5. Значим брой доказателствени материали са публикувани върху възможностите на стволовите клетки за приложение в онкологията (лечение на злокачествени тумори) [15, 16]. Голяма част от фактите са свързани с изследвания на ролята на стволови клетки в механизма на развитие и разпространение на солидни тумори. Новост в медицината е откритието, че при развитие на тумора има два вида стволови



Фиг. 2. Мултипотентна стволова клетка

клетки: неканцерогенни и канцерогенни. Рискови са канцерогенните, защото те са носители на гени, произвеждащи туморните клетки. Канцерогенните стволови клетки, както и неканцерогенните, имат посочената по-горе способност да се самовъзпроизвеждат. Самовъзпроизвеждащите се канцерогенни стволови клетки и диференциращи се съответно в тумори увеличават както размера на тумора, така и риска от неговото разпространение в други органи (метастазиране). Публикувани са експерименти с приложение на антитела за интерлевкин-4 (IL-4), които потискат пролиферацията на канцерогенните стволови клетки, и това предизвиква намаляване на тумора и на неговото метастазиране. Тези факти са доказани за рак на дебелото черво и това е т.нар. таргетна терапия чрез антитяло за IL-4 цитокин, който е в патогенезата на този вид тумор. Изследвания документират, че концентрацията/експресията на IL-4 в туморна тъкан на дебело черво е многократно по-голяма в сравнение с тази концентрация в нормална тъкан на дебело черво. Допълнително е установено, че отделните ракови клетки експресират високи нива на IL-4. На базата на тези факти се провежда и таргетно лечение с антитяло за този интерлевкин и блокиране развитието на тумора. По-горе посочихме, че стволови клетки се прилагат клинично и за лечение на тумори на хемопоетичната система. Публикувани са убедителни експериментални и клинични данни за лечение на ракови заболявания на белия дроб или млечната жлеза чрез стволови клетки, които са изолирани от гръбначен мозък на пациент.

6. Изследванията върху възможностите от стволови клетки да се диференцират клетки на кожа бележат прогрес. Успешно е диференцирането на кератиноцити и тяхното трансплантиране след кожни изгаряния или други увреждания. Това направление в медицината е важно във връзка с честотата на кожните травматични и други заболявания [9, 10, 20].

7. В различни други области на медицината се прилагат стволови клетки или се трансплантират диференцирани от тях фенотипни клетки, като: лечение на мускулна дистрофия, на остеоартрити и ревматоидни артрити, трансплантация на зъби, епилепсия, нарушен слух и др. [17, 19]. Едно от важните направления, по което се работи през последните десетилетия, е трансплантацията на стволови клетки в гръбначен мозък при травма, съответно при пациенти с парализи. Надеждите в това направление бяха и си остават значими. Тези надежди стартираха с един успешен експеримент върху мишки, на които се създава експериментално травма на гръбначния стълб и мозък и парализа

на задните крайници. Трансплантацията на стволови клетки на мястото на увреждането довежда до значим успех (тогава го наричат неочакван), проявен във възстановяването на двигателна активност на трансплантираните експериментални животни. Мишките започват да се движат в резултат на трансплантирани стволови клетки. По-късно стартираха и клинични проучвания. Беше създадена фондация в САЩ за лечение със стволови клетки на пациенти с гръбначномозъчни травми. Трансплантацията на невронни стволови/прогениторни клетки в гръбначния стълб на мястото на травмата води до диференциране на нови неврони, които създават мост между двете страни на прекъснатият гръбначен стълб. Така двигателните импулси от централния мозък се предават до периферията. Колкото по-бързо и устойчиво се изграждат тези невронни връзки, толкова ефектът е по-обозрим и доказуем. Резултатът от трансплантацията и терапевтичният ефект на стволовите клетки зависят от мястото на травмата. Убедителни данни показват, че колкото по-високо е травмата, толкова по-трудно е възстановяването, и различни научни екипи работят върху причините за този резултат.

#### **Наш изследователски опит**

Ние публикувахме различни изследвания, в които документирахме както диференциране на бета-ендорфинови неврони от ембрионални невронни стволови/прогениторни клетки, така и експерименталното им трансплантиране за лечение на ракови заболявания [22, 23, 24]. В механизмите на диференциране на бета-ендорфинови неврони участва цикличен аденозин-монофосфат (сAMP) и различни растежни фактори. За първи път създадохме функциониращи неврони, които произвеждат и секретират опиоидния пептид бета-ендорфин. Наши изследвания документират, че бета-ендорфин контролира имунните функции, увеличава активността на NK cells [4, 5]. След трансплантиране на новодиференцирани в *in vitro* среда бета-ендорфинови неврони на експериментални животни с различни по вид тумори беше установено потискане на метастазирането на тумора, на неговото развитие и лечебен ефект върху раковия процес. В ход са изследвания за бъдещо клинично изпитване на този нов оригинален и за първи път създаден и представен в света метод чрез стволови клетки и диференцирани от тях бета-ендорфинови неврони да се лекуват злокачествени заболявания.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Научните проучвания върху стволови клетки са надежда за лечение на тежки заболявания. Изу-

чаването на механизмите, чрез които стволовите клетки се диференцират във фенотипни клетки, има голямо значение за развитието на *in vitro* контролирано диференциране и създаване на клетъчни суспензии за трансплантации. Стволови клетки могат да се използват от пациента или от негов пряк родственик. В много държави, включително у нас, се изолират стволови клетки от плацентата при раждане и чрез утвърдени методи се замразяват с цел бъдещо използване при необходимост в хода на развитието на дете или възрастен. Научните изследвания върху стволовите клетки са съвременни, много актуални, с много новости, фундаментални факти и голямо клинично значение. Необходими са законодателни решения и утвърждаване на различните методи за трансплантация на стволови клетки или диференцирани от тях клетки при различни заболявания. У нас има специалисти, които са с доказан опит върху стволови клетки.

#### БИБЛИОГРАФИЯ

1. Aoi, T. et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. – *Science*, **321**, 2008, 699-702.
2. Arakaki, M. et al. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. – *J. Biol. Chem.*, **287**, 2012, 10590-10601.
3. Arthur, A. et al. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. – *Stem Cells*, **26**, 2008, 1787-1795.
4. Boyadjieva, N. I. et al. Beta-endorphin neuronal cell transplant reduces corticotropin releasing hormone hyperresponse to lipopolysaccharide and eliminates natural killer cell functional deficiencies in fetal alcohol exposed rats. – *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **33**, 2009, № 5, 931-937.
5. Boyadjieva, N. I. et D. K. Sarkar. Opioid-like activity of naltrexone on natural killer cell cytolytic activity and cytokine production in splenocytes: effects of alcohol. – *J. Interferon Cytokine Res.*, **30**, 2010, № 1, 15-22.
6. Cuono, C., R. Langdon et J. McGuire. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. – *Lancet*, **1**, 1986, 1123-1124.
7. De Luca, M. et al. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. – *Burns*, **15**, 1989, 303-309.
8. Donati, L. et al. Clinical experiences with keratinocyte grafts. – *Burns*, **18**, 1992, (Suppl. 1), S19-S26.
9. Gallico, G. G. et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. – *N. Engl. J. Med.*, **311**, 1984, 448-451.
10. Gallico, G. G., et N. E. O'Connor. Cultured epithelium as a skin substitute. – *Clin. Plast. Surg.*, **12**, 1985, 149-157.
11. Gimble, J. M. et al. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. – *Stem Cells*, **29**, 2011, 749-754.
12. Green, H., O. Kehinde et J. Thomas. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1979, 5665-5668.
13. Green, H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: A new view. – *Cell*, **15**, 1978, 801-811.
14. Hauner, H. et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. – *J. Clin. Invest.*, **84**, 1989, 1663-1670.
15. Heymann, D. et F. Redini. Bone sarcomas: pathogenesis and new therapeutic approaches. – *BoneKey*, **8**, 2011, 402-414.
16. Hingorani, P. et al. Inhibition of Src phosphorylation alters metastatic potential of osteosarcoma *in vitro* but not *in vivo*. – *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2009, 3416-3422.
17. Locke, M., V. Feisst et P. R. Dunbar. Concise review: human adipose-derived stem cells (asc): separating promise from clinical need. – *Stem Cells*, **29**, 2011, 404-411.
18. Mitrečić, D., S. Gajović et R. Pochet. Toward the treatments with neural stem cells: experiences from amyotrophic lateral sclerosis. – *Anat. Rec. (Hoboken)*, **292**, 2009, № 12, 1962-1967.
19. Poitou, C. et al. Role of serum amyloid a in adipocyte-macrophage cross talk and adipocyte cholesterol efflux. – *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 2009, 1810-1817.
20. Rheinwald, J. G. et H. Green. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. – *Nature*, **265**, 1977, 421-424.
21. Rodriguez, A-M. et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. – *J. Exp. Med.*, **201**, 2005, 1397-1405.
22. Sarkar, D. K. et al. Cyclic adenosine monophosphate differentiated beta-endorphin neurons promote immune function and prevent prostate cancer growth. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2008, № 26, 9105-9110.
23. Sarkar, D. K. et al. Regulation of cancer progression by beta-endorphin neuron. – *Cancer Res.*, **72**, 2012, № 4, 836-840.
24. Sarkar, D. K. et al. Transplantation of beta-endorphin neurons into the hypothalamus promotes immune function and restricts the growth and metastasis of mammary carcinoma. – *Cancer Res.*, **71**, 2011, № 19, 6282-6291.