

ОБЗОРИ
REVIEWS

ТЕРАПЕВТИЧНИЯТ ПОТЕНЦИАЛ НА СЕКРЕТОМ ОТ МЕЗЕНХИМНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ПРИ АВТОИМУННИ ПАЦИЕНТИ

А. Йорданова, Е. Иванова-Тодорова

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Катедра по клинична имунология,
Медицински факултет, Медицински университет – София, България

Резюме. Усложнените клинични случаи на пациенти с автореактивна имунна система, способна да нанесе вреда на организма, налагат задълбочено изследване на основните имунопатогенетични механизми, последвано от намиране на пътища за разработването на ефективни терапевтични стратегии. В момента най-често използваните терапевтични алтернативи са съпроводени с тежки странични ефекти и намалена ефективност след продължително лечение на пациенти с автоимунни заболявания. Секретомът на мезенхимните стволови клетки (МСК секретом) съдържа съединения с потенциални терапевтични приложения, една обещаваща нова клинична стратегия за лечение. Представените данни обобщават информацията от експериментални изследвания и малкото натрупани знания от клиничната практика, както и повдигат въпроси относно ролята на съвременните, иновативни терапии за подпомагане на автоимунни пациенти.

Ключови думи: мезенхимни стволови клетки, секретом от мезенхимни стволови клетки, автоимунитет

ВЪВЕДЕНИЕ

Автоимунните заболявания са наречени „болести на новото време“ или „модерни епидемии“ поради относително увеличени брой докладвани автоимунни случаи и глобалното им разпространение през последните години [1]. Всъщност по-голямата част от автоимунните заболявания съществуват от древни времена [2]. Палеопатологични изследвания на египетски мумии идентифицират слети прешлени, признак на тежко, хронично автоимунно заболяване – анкилозиращ спондилит (AS), част от т.нар. група на спондилоартропатии (SpA) [3]. Това е един от многото примери, които показват, че предишното твърдение е неточно, въпреки че пътят на автоимунните заболявания от определението за автоимунитет до диагнозата и превенцията е доста дълъг и неравен. За по-голяма точност и конкретност, една от причините за това „повишаване“ на автоимунните и възпалителните заболявания е бързоразвиващата се наука и методите за диагностициране на пациентите, както и съвременният начин на живот и хранене, особено на хората в развитите страни [4]. Резултатът от неправилния начин на

живот, в комбинация с други фактори на околната среда и генетична предразположеност, е причина имунната система да не различи „своето“ от „чуждото“, дали е „приятел“, или „враг“ на организма. Пациентите се описват като „живеещи с врага в себе си“, което съответства на факта, че организъмът им се самоатакува [5, 6].

За съжаление, автоимунните заболявания са едновременно хронични и нелечими. Целите, които си поставят лекарите, са постигане на ремисия и поддържането ѝ за достатъчно дълъг период от време, което се наблюдава при малък брой автоимунни пациенти [7]. Терапевтичните подходи, прилагани за постигане на тези цели, са значително подобрени и усъвършенствани. Те включват прилагането на конвенционални имуносупресивни лекарства, със или без биологични терапевтични средства, за целенасочено действие върху ключови молекули, участващи в имунопатогенезата на специфични автоимунни състояния [7]. Въпреки това не всички пациенти реагират на дадена конвенционална терапия (като пациенти с рефрактерни заболявания) и много често те се описват като „безнадеждни

случаи“ [8]. Това налага разработването на нови подходи за лечение на автоимунни заболявания.

Терапевтичното приложение на стволови клетки при множество патологични нарушения, включително хематологични, неврологични, метаболични, имуномедиирани и автоимунни заболявания, привлича значителен интерес през последните години [9]. Светът на стволовите клетки обаче е огромен и изборът на подходящия тип стволови клетки за приложение при дадено заболяване е от съществено значение. В зависимост от способността им да се диференцират, или т.нар. “пластичност”, стволовите клетки са тотипотентни, плурипотентни, мултипотентни, олигопотентни и унипотентни [10]. Повечето изследвания се провеждат с мултипотентни стволови клетки поради различни етични причини, както и поради свързани с тяхната ефективност, тъй като използването им е евтино и не се нарушават моралните и етичните права [11]. Мултипотентните стволови клетки могат да се диференцират в клетки от един зародишен слой (ектодерма, ендодерма или мезодерма) и се класифицират като хематopoетични (ХСК) и мезенхимни стволови клетки (МСК) [10]. Най-разпознаваемите мултипотентни стволови клетки са МСК, които могат да бъдат успешно размножени *in vitro* до необходимата доза за клинично приложение [12]. Затова през последните години се обръща особено внимание на възможността за приложение на МСК като подход за терапия при множество заболявания поради техните имуномодулиращи свойства, голяма пластичност, способност за тъканно възстановяване и регенерация [13]. Всички тези качества са необходими на МСК за борбата им срещу автоимунните състояния. Трябва също да се отбележи, че МСК могат да упражняват споменатите ефекти както чрез механизмите на междуклетъчния контакт, така и посредством секрецията на множество разтворими молекули с важни биологични действия [14]. Съвкупността от всички молекули, секретирани от МСК, може да се нарече с общото наименование „секретом“.

В обзора се подчертава потенциалът на секретомата на мезенхимните стволови клетки (секретом, получен от МСК) да повлиява имунните клетки и неговите ползи за автоимунни заболявания. Повдигат се и следните въпроси: Би ли могла в момента науката да говори авторитетно за мястото на тези стволови клетки и техните продукти в областта на автоимунитета? До каква степен стволовите клетки имат ефект след прилагането им? Този тип терапия отговаря ли на критериите

те за безопасност за пациентите? Отговорите на тези въпроси могат да бъдат намерени в следващите редове, които представят литературни данни, регистрирани през последните десет години както във фундаменталните изследвания, така и в клиничната практика.

АВТОИМУННИ ЗАБОЛЯВАНИЯ И ТЕРАПЕВТИЧНИЯТ ПОТЕНЦИАЛ НА СЕКРЕТОМА ОТ МСК

Класическите автоимунни и имуномедиирани заболявания с автовъзпалителни характеристики са част от т.нар. имуномедиирани възпалителни заболявания (IMIDs). Класическите автоимунни заболявания включват системен лупус еритематозус (SLE), ревматоиден артрит (RA), множествена склероза (MS), псориазис и atopичен дерматит. Имуномедираните заболявания с автовъзпалителни характеристики са SpA, болест на присадката срещу гостоприемника (GVHD), възпалителни болести на червата (IBD) и други [15]. Има над 80 автоимунни заболявания, засягащи приблизително 4,5% от човешката популация, разделени в две групи въз основа на техните целеви органи: орган-специфични (тиреоидит на Хашимото, болест на Адисън, болест на Грейвс, диабет тип 1, витилиго и др.) и системни автоимунни заболявания (SLE, RA, васкулит, системна склероза (SSc), MS и др. [4, 15]. За съжаление, броят им нараства, а разпространението е различно при мъжете и жените, като за женския пол се съобщава по-висока честота на автоимунни случаи [16]. Освен това етиологията на автоимунните заболявания включва множество фактори. Наблюдава се загуба на баланс между про- и противовъзпалителните имунни отговори, като възстановяването на този баланс също изисква прилагането на комплексни и същевременно безопасни подходи [7].

От друга страна, МСК предоставят възможност за персонализиран подход за терапия на нелечими състояния като описаните. Като представители на постембрионалните мултипотентни стволови клетки МСК се отличават с фибробластноподобна морфология, адхезия към пластмасова повърхност и голям потенциал за лечение не само на имуномедиирани заболявания, но и на заболявания, при които е необходима тяхната регенеративна способност [12]. МСК притежават голяма пластичност и могат да претърпят мезодермална диференциация в остеоцити, адипоцити и хондроцити *in vitro* под действието

на специфични фактори [10, 12]. В продължение на много години изследователите са изучавали техните качества и функции като стволови клетки и потенциалните им приложения в областта на клетъчно-базираните терапии. Действително, първото използване на МСК в клиничната практика е през 1945 г. фаза I на изпитване на прогениторни стромални клетки от човешки костен мозък при пациенти с хематологични злокачествени заболявания [17]. Оттогава клиничният потенциал на МСК е широко проучен при различни медицински състояния. Част от способността на МСК да влияят на редица имунокомпетентни клетки се дължи на формирането на клетъчни контакти и участието на специфични молекули в тези тесни взаимодействия. Programmed death 1/ Programmed cell death ligand 1 (PD-1-PD-L1), Fas/ Fas лиганд, тумор-некротизис фактор (TNF)/рецептор на TNF (TNF-/TNF-R), HLA-G/LIRB2 (ILT4/CD85d) и KIR2DL4 (CD158d) са примери за такива взаимодействия [18]. Благодарение на тези междуклетъчни контакти МСК участват в контрола на клетъчни процеси като апоптоза и ограничаване на клетъчната пролиферация [18]. Следователно, важно е да не се подценяват директните взаимодействия между МСК и имунните клетки, въпреки че откритията около секретом на МСК са също доста окуражаващи.

Добре известно е, че МСК са източник на широка гама от разтворими фактори, включително ензими, цитокини, различни протеини, растежни фактори, хемокини, ДНК и РНК молекули и много вторични метаболити или крайни продукти на техния метаболизъм (таблица 1) [19, 20]. Някои от процесите, в които участват молекулите и факторите на МСК, независимо дали са в свободна форма, или капсулирани, включват ангиогенеза, апоптоза, имуномодулация, пролиферация, предотвратяване на смърт на невронни клетки, подкрепа за ХСК и инхибиране на микробното развитие [19]. Важно е обаче да не се забравя, че типът на молекулите, освободени от МСК, зависи от тъканния източник (костен мозък, пъпна връв, мастна тъкан и т.н.), времето за култивиране, степента на конфлуентност, условията на средата и стимулите, физиологични или патологични, които клетките получават по време на *in vitro* култивиране [21]. Има доказателства, че в зависимост от това кой Toll-подобен рецептор (TLR), експресиран на тяхната повърхност, се задейства, МСК могат да проявяват или МСК1, или МСК2 фенотип [15]. Когато МСК се стимулират с липополизахарид (LPS), TLR-4 се активира и се произвеждат провъзпалителни медиатори. В присъствието на TNF- α и интерферон- γ (IFN- γ), TLR-3 се активира и МСК се поляризират към

Таблица 1. Предложен състав на секретом от МСК

Основни метаболити	Протеини, ензими и биологично активни фактори	Хемокини	Екстрацелуларни везикули (ЕВ)
Ацетат Аланин Холин Етанол Формат Глутамат Глутамин Лактат Никотинамид Пируват Тирозин L-глюкоза D-глюкоза	BMP-9/GDF-2, EGF, Ендоглин, Ендотелин-1, Еотаксин-1, FGF-1, FGF-2, Flt-3L, Фолиостатин, G-CSF, GM-CSF, GRO pan, HB-EGF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-1B, IL-1RA, IL-12, IL-6, IL-7, IL-9, LIF, Лептин, PDGF-AA, PDGF-BB, PLGF, TGF- β 1/ β 2/ β 3, TNF- α / β , TSG-6, VEGF-A/C/D, IDO, PGE2, MIF, KGF, IGF-1, Галектини, HO-1, NOS, ICAM, MMP-1/2/7, TIMP-1/2, LL-37, TPO	CCL2 (MCP-1), CCL3, CCL4, CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20, CCL21, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8 (IL-8), CXCL12, CXCL16, CX3CL1 (Фракталики)	Апоптотични телца (> 1000 nm) Микровезикули (200-1000nm) Екзозоми 30-200 nm) МСК-екзозоми и част от тяхното съдържание: тетраспанини (CD9, CD63, CD81), RNA (mRNA, miRNA, Pre-mi-RNA, si-RNA, t-RNA, sn-RNA), DNA (mt-DNA, ds-DNA, ssDNA), ATPase, PGK1, GAPDH, Алдолаза, G протеин, синтетин, HSP60, HSP70, HSP90, RTK, анексини, GTPases, RAB протеин

Забележка: Съставът и количеството на освободените фактори, молекули и ЕВ се различават при МСК от различен тъканен произход, както и при различни условия на култивиране [19, 20].

Съкращения: костен морфогенен протеин/фактор 2 на растежа и диференциацията (BMP-9/GDF-2), епидермален растежен фактор (EGF), фибробластен растежен фактор (FGF), Fms-свързан тирозин киназа 3 лиганд (Flt-3L), гранулоцит/гранулоцит-макрофагиален колония-стимулиращ фактор (G-CSF, GM-CSF), хепарин-свързващ EGF-подобен растежен фактор (HB-EGF), хепатоцитен растежен фактор (HGF), интерферони (IFNs), интерлевкини (ILs), тромбоцитни растежни фактори (PDGFs), плацентален растежен фактор (PIGF), трансформиращи растежни фактори (TGFs), тумор некротизис фактор (TNF), тумор некротизис фактор (TNF)-стимулиращ ген-6 (TSG-6), васкуларен ендотелен растежен фактор (VEGF), индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO), простагландин Е2 (PGE2), инхибиторен фактор на миграцията на макрофагите (MIF), кератиноцитен растежен фактор (KGF), инсулин-подобен растежен фактор 1 (IGF-1), хем оксигеназа-1 (HO-1), азотен оксид синтаза (NOS), междуклетъчна адхезионна молекула-1 (ICAM-1), матриксни металопротеинази (MMPs), тъканен инхибитор на металопротеиназа (TIMP), човешки кателицидин (LL-37), тромбоцитин (TPO), моноцитен хемоатрактантен протеин (MCP), фосфоглицерат киназа 1 (PGK1), глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа (GAPDH), протени на топлинния шок (HSP), рецепторна тирозин киназа (RTK), Ras-асоциирани свързващи (Rab) протеини;

МСК2 фенотип, който е отговорен за имунологичната хомеостаза, постигната чрез имуносупресия [15]. Ето защо вече е добре известно, че МСК работят като „сензори“ и за да проявят своите терапевтични ефекти, трябва да бъдат стимулирани. От това следва, че възможността за манипулиране на секретомата, получен от МСК, е причината много изследователи да използват в своите експериментални постановки различни биохимични стимули, цитокини като IL-1, TNF- α , IFN- γ , хипоксично прекодициониране и триизмерно (3D) култивиране, главно за насочване или подпомагане на имуносупресивната активност на стволовите клетки [15].

ПЛЮСОВЕ И МИНУСИ НА МЕЗЕНХИМНИТЕ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ И СЕКРЕТОМА, ПОЛУЧЕН ОТ ТЯХ

Повечето от секретираниите фактори от различни видове клетки действат като сигнални молекули, които допринасят за осъществяването на междуклетъчната комуникация. Всички клетки, независимо дали са вътре, или извън организма, от които произхождат, са чувствителни към факторите на околната среда и в резултат на това реагират на тях по специфичен начин [22]. Генерираните сигнални молекули от МСК също работят на този принцип, предизвиквайки т.нар. „процес на сигнална трансдукция“, който води до промяна във функцията и поведението на целевата клетка, поради което те могат да превключват много прецизно фенотипа на имунните клетки. Условно секретомът на МСК може да се раздели на секреторна част и везикуларна част, като и двете са много важни за междуклетъчната комуникация. Секреторната част вече беше описана и представена в таблица подробно, но също така другият интригуващ аспект на секретомата, получен от МСК, е везикуларната фракция, която включва извънклетъчните везикули (апоптотични телца, микровезикули и екзозоми) [15], от които екзозомите са с най-голямо значение и потенциал в научните изследвания. Екзозомите обикновено съдържат микро-РНК (miRNAs), липиди, протеини и вторични метаболити. Техният размер варира от 30 до 200 nm, така че те са известни също като нановезикули, и последно, но също толкова съществено е, че екзозомите имат липиден двоен слой, което ги прави много подходящи за освобождаване на тяхното съдържание директно в цитозола на клетките [15]. В действителност съдържанието и функцията на екзозоми-

те се считат за еквивалентни на тези на МСК, от които произхождат, но в същото време тези везикули имат няколко предимства пред стволовите клетки, като ниска имуногенност, непроменена функционална активност по време на замразяване и размразяване, както и липса на способност за формиране на тумори. [21]. Въпреки това изолирането и отделянето на екзозоми е отнемашко време и скъп процес, без наличен все още стандартизиран протокол [23].

За разлика от тях МСК са много лесни за изолиране, с бързи темпове на растеж при лабораторни условия, като необходимият брой клетки за дадена терапия може лесно да бъде манипулиран [12]. Използването на стволови клетки, получени от пациенти (автоложна трансплантация), става все по-популярно за персонализирани терапевтични приложения. Въпросът дали трябва да се използват автоложни, или алогенни стволови клетки, все още остава отворен [24]. Предполага се, че МСК от автоимунни пациенти са предварително „подготвени“ да произвеждат повече имуносупресивни молекули, тъй като те са пребивавали в потенциално възпалителната среда на организма, от които произхождат, и рискът от имунологично отхвърляне на транспланта също би бил предотвратен. Това обаче се оказва невярно твърдение, тъй като има данни, които показват дефектна или недостатъчна функция на МСК, изолирани от пациенти с автоимунни заболявания [25, 26]. Като цяло МСК са слабо имуногенни, с ниска експресия на костимулаторни молекули (CD80, CD86, CD40 и CD40L), липса на HLA клас II експресия, заедно с липса или слаба експресия на HLA клас I молекули [19, 27]. Това навежда на мисълта, че алогенната трансплантация също е един добър терапевтичен вариант. За съжаление, в науката нещата невинаги са еднозначни и следват логичен път. Приложението на МСК се счита за безопасно; съществуват обаче редки рискове от белодробна емболия, тумори и образуване на ектопична тъкан, както и възможността за несъответствие на HLA молекулите при трансплантация [21, 28]. Освен това не трябва да се пренебрегват обезсърчаващите доказателства, че МСК са краткоживеещи след инфузия *in vivo* поради т.нар. „клирънс“ или изчистването им от страна на макрофагите [29], въпреки че начинът на приложение, локален или системен, също е важен за ефикасността на клетъчната инфузия [29, 30].

Някои изследователи предлагат да се използват молекули, произведени от МСК, поради потенциалните недостатъци и ограничения на

клетките, които са документирани в литературата. Това включва или кондиционирана среда, получена след култивиране на клетките *in vitro* за определен период от време, или отделни продукти от кондиционираната среда на МСК, като техните освободени извънклетъчни везикули (ЕВ), получени чрез специфични методи, необходими за тяхното диференциране. Според данни в областта [25, 31] безклетъчната терапия е алтернативна терапия, която, ако не може да помогне на пациентите, то поне не би им нанесла вреда. Има няколко предимства за прилагането на секретом, получен от МСК, за сравнение с приложението на самите клетки. Например няма нужда от специфичен разтвор за изолиране на клетките, липсва опасност от предозиране и тестването им също е безопасно, налице са удобство на приложение, както и способност за успешно манипулиране на състава на секретомата, произведен от стволовите клетки [15]. Ако трябва да бъдем напълно честни, само няколко проучвания в литературата показват, че секретомът на МСК е свързан с някои странични ефекти [15, 32]. Трябва също така да се има предвид, че различните изследователи в своите експерименти не разчитат на един общоприет протокол за получаване и изследване на ефекта на секретомата, получен от МСК. Профилът на секретирани фактори зависи от условията и времето, за което клетките се култивират. Поради това е необходимо разработването на стандартизирана методология за получаване на секреторни продукти от МСК, както и по-нататъшно изследване и изучаване на темата за МСК и техния секретом.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ *IN VITRO* И *IN VIVO* ИЗСЛЕДВАНИЯ СЪС СЕКРЕТОМ ОТ МСК

В допълнение към това, което вече беше посочено, трябва да се обърне по-сериозно внимание на потенциалната роля на терапевтичното приложение на кондиционираната среда, която включва секреторни МСК молекули и извънклетъчни везикули. Действително през последното десетилетие непрекъснато нарастващите литературни данни показват интересни резултати за потенциала на секретирани от МСК фактори, влияещи върху имунните клетки на пациенти, диагностицирани с автоимунни заболявания [15]. Важен аспект на адаптивната имунна система е, че Т- и В-лимфоцитите, заедно с други вродени имунни клетки, участват в различни механизми като част от имунопатогенезата на автоимун-

ните заболявания. Във връзка с това трябва да се отбележи, че секретомът на МСК е свързан с потисната експресия на ключови участници в програмираната клетъчна смърт при естествените Т-клетки убийци (NKT), като FASL и лиганд, индуциращ апоптоза, свързан с тумор-некрозис фактор-алфа – TNF- α (TRAIL) [33], както и трансформацията на NKT клетки в имуносупресивни [34]. Едновременно с това беше демонстрирано, че кондиционираната среда на МСК от адипозна тъкан (AT-МСК) има имуносупресивен ефект върху Th17/Treg оста при пациенти с PA *in vitro* [35]. Молекули като IDO, NO, HO-1 и PGE2 инхибират Т-клетъчната пролиферация по различни начини, включително фосфорилиране на STAT-5, инхибиране на IL-2-сигналния път и активиране на циклин-зависимия киназен инхибитор p27kip1 [36-38]. МСК обаче невинаги могат да потиснат пролиферацията на имунните клетки, а по отношение тази на В-клетките данните са доста противоречиви [39]. IDO, продуциран от МСК, има различни ефекти върху В-клетките: той може да индуцира ефект, свързан с оцеляването на CD5+ В-клетки, което да предизвика диференциация на Т-клетките в регулаторни Т-клетки (Tregs) чрез производството на IL-10 [40]; освен това IDO, заедно с CCL2, се свързва с потискане производството на антитела [36]. Gazdic и сътрудници (2018), от друга страна, демонстрират, че NO и кинуренин имат потенциала да намалят производството на IL-6 и TNF- α от В-клетки, като същевременно повишават регулаторния фенотип на В-клетките на маргиналната зона (MZ) (CD23-CD21+IgM+) в черен дроб [33, 41]. И това не е всичко, защото ефектът на секретирани фактори от МСК не се ограничава до клетките на адаптивния имунен отговор.

Биологично активни молекули и фактори като IL-8, MIF, PGE2, TSG-6 и IL-6 стимулират функцията на фагоцитиращи клетки като неутрофили и макрофаги, както и тяхната способност да се борят с патогенни микроорганизми [42, 43]. Често в научната литература се обръща внимание на уникалната способност на МСК да изместват фенотипната поляризация на макрофагите от M1 (провъзпалителни) към M2 (противовъзпалителни) макрофаги, с помощта на вещества като PGE2, TSG-6, IL-6, KGF и IGF-1 [43]. Не може да не се отбележи, че получените екзозоми от МСК могат дори да повлияят на трансформацията на дендритни клетки (DC) в толерогенни, а именно DC са известни като мост между вродените и адаптивните имунни отговори [44]. Също същест-

вен факт е, че разтворимите фактори на МСК имат способността да потискат пролиферацията, активирането и производството на костимулаторни молекули от DC. Всичко това води до нарушено антигенно представяне и неспособност за активиране на наивните Т-лимфоцити [45]. И накрая, интересно е да се отбележи, че молекулите на МСК могат да инхибират функционалната активност на цитотоксичните Т-лимфоцити (CTL) и клетките естествени убийци (NK), както и експресията на активиращи рецептори от NK клетките (NKp30, NKp44 и NKG2D) [36, 45]. Тези констатации са само малка част от *in vitro* проучванията, проследяващи ефекта на секретирани фактори от МСК върху някои имунни клетки, но те са фундаментални за последващите предклинични изследвания в областта.

В допълнение към описаните открития, има доста значителни експериментални данни, получени от *in vivo* проучвания с експериментални животни и автоимунни пациенти. Едно от класическите автоимунни заболявания, чието лечение е обект на засилен интерес и изследвания в областта на терапиите, базирани на МСК, е SLE. Някои автори предполагат, че МСК и техните екзозоми индуцират M2 поляризация на макрофагите [46], инхибират Т-клетъчната диференциация към Th1 чрез процеса на гликолиза и регулиране на цитокинов път [47], инхибират Th17 и най-същественото е, че стимулират развитието на Tregs [48]. Обобщените данни от обширен метаанализ, проведен през 2020 г., показват, че лечението с МСК при животински модели на лупусен нефрит е довело до по-ниски нива на антитела срещу дв-ДНК, антинуклеарни антитела (ANA), серумен креатинин, урея, протеинурия и т.нар. "renal sclerosis score" [49]. Това знание е доказателство за противовъзпалителните и благоприятните ефекти от приложението на МСК в миши модели на лупус и способността на секретомата, получен от МСК, да регулира хроничното възпаление, една много характерна черта на заболяването. Въпреки това ролята на МСК в имунопатогенезата на СЛЕ трябва да бъде подчертана не само поради известния дефицит или дефектна функция на МСК, изолирани от пациенти с лупус [50], но и поради участието на miRNAs, некодиращи РНК (ncRNAs) и кръгови РНК (circRNAs) молекули, в задвижването на самия автоимунен процес [51, 52]. Поради тези обезсърчаващи и противоречиви резултати са необходими допълнителни експериментални и клинични проучвания с МСК и техните секреторни продукти при СЛЕ.

Независимо от това, доказано е, че екзозомите на МСК имат благоприятни ефекти при много други автоимунни животински модели. Например системното приложение на екзозоми от МСК има хепатопротективни ефекти при животински модели на автоимунен хепатит. Според две независими проучвания от 2017 и 2019 г. тези ефекти се дължат на потисната индуцирана от каспаза-3 апоптоза и индуцирана от каспаза-1 пироптоза на хепатоцитите [53, 54]. Освен това в хода на изследванията за лечение на MS, най-често срещаното възпалително заболяване на централната нервна система (ЦНС), различни проучвания върху животински модели на експериментален автоимунен енцефаломиелит (EAE) демонстрират подобрене на невроповеденческите симптоми, намаляване на възпалението и демиелинизацията в ЦНС. Резултатите при експериментален автоимунен увеит [55] и миши модели на автоимунен диабет (NOD) също са окуражаващи, с данни за понижена кръвна глюкоза, възстановени панкреатични острови и увеличени количества клетки, произвеждащи инсулин [56, 57].

При ревматичните заболявания резултатите са противоречиви, вероятно поради голямото участие на МСК в имунопатогенезата на тези състояния. Различни типове miRNAs от екзозоми на МСК участват в потискането на артрит и увреждането на костите чрез повлияване на два основни типа клетки, участващи в имунопатогенезата на RA, а именно така наречените фибробластоподобни синовиоцити и произвеждащите антитела В-лимфоцити [58]. Тези открития са обнадеждаващи за хората, диагностицирани с RA. В същото време, подобно на SLE, МСК от пациенти със SpA (SpA-MSC) могат да имат както полезни, така и вредни ефекти. При TNF трансгенен миши модел на болестта на Бехтерев МСК участват във възпалението на ставите, доказателство за което е експресията на TNF рецептор I и наличието на ентезит [15]. Друго важно откритие, направено при проучване върху експериментален синдром на Сьогрен, показва, че IL-6, освободен от екзозомите на обонятелни ектомезенхимни стволови клетки (OE-МСК), води до потискане прогресията на заболяването чрез стимулиране на експресията на ензима аргиназа и последващото повишаване на нивата на реактивните кислородни субстанции (ROS) и NO [59]. В подкрепа на тези данни са изследванията на В. Hai и сътрудници (2018), които показват намалена лимфоцитна инфилтрация в слюнчените жлези и намалени серумни нива на автоантитела

след инфузия на ЕВ, произведени от индуцирани плурипотентни МСК (iPSC-MSCs) [60].

Не липсват и данни в областта на хроничните заболявания като IBD, особено болест на Крон и улцерозен колит, за които се наблюдава нарастване на случаите в световен мащаб през последните години. Проучвания върху експериментален колит с използване на екзосоми от МСК разкриха понижено възпаление на лигавицата, добро клинично повлияване на симптоматиката и намалена смъртност [61-63]. Металотионеин 2, mi-RNA 146, TSG-6 и други все още неидентифицирани молекули са сред факторите, отговорни за тези благоприятни резултати. Според съвсем скорошното проучване на Li-Li и сътрудници (2021) [64] активирана кондиционирана среда (CM-AscMSCs), произведена от AT-МСК, предварително третирани със серум от плъши модели на колит, индуцирани от декстран натриев сулфат (DSS), води до значително повишена експресия на муцин 2 (MUC2) и плътните контакти, заедно с потиснато производство на провъзпалителни цитокини в тъканите на дебелото черво. Тази работа е окуражаваща, защото не само демонстрира нов метод за “презареждане” на МСК, но също така показва начин за подобряване на ефективността на продуктите, които този тип стволови клетки произвеждат.

СЕКРЕТОМЪТ ОТ МСК, АВТОИМУННИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ И КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

Нарастващото разнообразие от експериментални методи и набор от знания за способността на стволовите клетки да отделят вещества, които могат да повлияят на имунната система, са доказателство за силното желание на научната общност да помогне за лечението и по-доброто разбиране на нелечимите автоимунни заболявания. Въпреки това трябва да се отбележи, че тези експериментални подходи при мишки например са извършени при силно контролирани стерилни условия, в среда без патогени. Това не би могло да се постигне при клиничните изпитвания върху хора [25]. Освен това дори в ремисия, пациентите с различни автоимунни заболявания трябва да приемат необходимите средства за лечение, докато при описаните миши модели често се позволява провеждането на експериментални изследвания върху нелекувани кохорти [25]. Посоката на медикобиологичното знание обаче тръгва от лабораториите и стига до болничните заведения, където създадените терапевтични продук-

ти намират безценно приложение. Поради това предклиничните, *in vivo* и *in vitro* проучванията са обещаващи и не бива да се подценяват, но е важно да се имат предвид споменатите разлики.

Най-важният фактор, определящ ефикасността на една терапия, е нейната способност да е от полза за нуждаещите се пациенти. Това може да се докаже само чрез провеждането на клинични изпитвания с участието на голям брой пациенти. Според националната медицинска библиотека (NIH) на САЩ (*ClinicalTrials.gov*) съществуват различни данни относно клиничната употреба на МСК [25, 27, 45], техният потенциал за трансплантация и способността им да коригират имунологичния дисбаланс, наблюдаван при автоимунни заболявания. Ефектът на секретомата, получен от МСК, е наблюдаван в регистрирани клинични изпитвания при атрофия на алвеоларната кост на зъбите, косопад, алоpecia, синдром на поликистозните яйчници (PCOS), заболяване на очите, регенерация след увреждане на задната кръстна връзка, исхемичен инсулт, костни дефекти и осем клинични изпитвания на различни етапи при тежки случаи на COVID-19 (*ClinicalTrials.gov*). В областта на автоимунитета и състоянията със свръхактивен имунен отговор има само четири клинични изпитвания, както е описано в таблица 2. За съжаление, все още няма изчерпателна информация и резултати от тези изследвания. Един скромнен проблясък на оптимизъм е докладваният клиничен случай на пациент с псориазис, който е получил кондиционирана среда от AT-МСК, в резултат на което е постигната пълна ремисия след лечение с продължителност един месец [65]. Наистина бързото развитие на науката и медицината ще доведе до натрупването на големи количества данни в областта и ще допринесе за по-доброто разбиране на предимствата и недостатъците на този терапевтичен подход. Досега не са натрупани обаче необходимите данни, за да се даде ясен отговор на възможността секретомът, получен от МСК, да повлиява благоприятно имунопатогенезата и цялостното състояние на пациенти с автоимунни заболявания. Като последно уточнение важно е да се спомене, че МСК и техните секреторни продукти са показали огромен потенциал да бъдат добри кандидати за създаването на терапии за автоимунни заболявания и тепърва предстои да се види техният ефект в клиничната практика.

Таблица 2. Клинични проучвания с МСК секретом при състояния с променена реактивност на имунната система

Наименование на проучването	Местоположение	Фаза на проучването	Статус	Начало на проучването	Приблизителна дата на завършване	Идентификационен номер ClinicalTrials.gov
Ефект на терапията с микро-везикули и екзозоми върху β -клетъчната маса при захарен диабет тип I (T1DM)	Учебна болница Сахел - Общ комитет на учебните болници и институти	Фаза I	Неизвестен	Април 2014	Септември 2014	NCT02138331
Проучване за безопасност и ефективност на интраназален мезенхимален трофичен фактор (MTF) за лечение на астма	Болница Пунта Пасифика Панама Сити, Панама	Фаза I Фаза II	Неизвестен	Юли 2014	Октомври 2020	NCT02192736
Безопасност на инжектирането на екзозоми, извлечени от плацентарни-мезенхимни стволови клетки, за лечение на резистентна перианална фистула при пациенти с болест на Крон	Отдел по колоректална хирургия, Катедра по хирургия, Техерански университет по медицински науки, Техеран, Иран	Фаза I Фаза II	Активен, но не се набират участници	Януари 2022	Септември 2022	NCT05499156
Проучване за безопасност и поносимост на мехлем от MSC екзозоми (при псориазис)	Национална университетска болница, Сингапур	Фаза I	Завършен	Март 2022	Април 2022	NCT05523011

Забележка: Информацията за клиничните проучвания е получена от Clinicaltrials.gov (достъпна на 11 ноември 2022)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Според литературата, включена в обзора, използването на секретом, получен от МСК, като безклетъчна алтернативна биологична терапия в клиничната практика, е в начален стадий и неговият потенциал в областта на автоимунитета остава неясен. Бъдещите проучвания трябва да бъдат съсредоточени върху по-нататъшното изследване на ефикасността и безопасността на този терапевтичен инструмент от следващо по-

коление, за да се затвори наличната празнина в литературата. Въпреки това предварителните проучвания в областта и добрите резултати сближават все повече науката и медицинската практика. Има възможност за победа над "вътрешния" враг при пациентите с тежки, рефрактерни автоимунни заболявания и бъдещето ще покаже начина за това.

Авторите декларират, че научният материал не е бил публикуван преди това в писмен или електронен вид.