

И.И. Никберг, д.м.н., профессор, г. Сидней, Австралия

Новые биотехнологии и перспективы их применения в медицине

Продолжение. Начало на № 20.

Стволовые клетки

В рамках поисков возможностей более эффективного лечения сахарного диабета все большее внимание исследователей привлекает использование т. н. стволовых клеток, первооткрывателем которых является русский ученый, профессор гистологии Петербургской военно-медицинской академии Александр Максимов. В 1908 г., исследуя клетки костного мозга, он обнаружил, что некоторые из них могут самопроизвольно делиться, образуя клетки, способные преобразовываться в клетки другого типа. Эти исходные клетки А. Максимов назвал стволовыми, подчеркнув тем самым их способность создавать своеобразные клеточные линии с определенными морфофункциональными свойствами. В 1960-е гг. это наблюдение было дополнено и расширено московскими учеными Александром Фриденштерном и Иосифом Чертковым. Они показали, что в костном мозге имеются стромальные стволовые клетки, которые при посадке в другой орган способны формировать ткань, присущую этому органу. Затем последовал ряд важных научных открытий, позволивших приблизиться к практическому использованию стволовых клеток для лечения различных заболеваний.

Согласно современным научным представлениям после проникновения сперматозоида в яйцеклетку развивается зигота. К 4-5-му дню из зиготы формируется предэмбрион (бластоциста), представляющий собой скопление нескольких десятков (50-150) одинаковых первичных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), из которых далее образуется второе поколение клеток — гемопоэтические и стромальные. В процессе последующего развития зародыша ЭСК дифференцируются в 3 основных первичных зародышевых листка — эктодерму, энтодерму и мезодерму, содержащих более 200 разновидностей клеток. Из них в дальнейшем формируются все органы и ткани человека. Но оказалось, что подобные ЭСК стволовые клетки имеются и в ряде других органов взрослого человека, прежде всего в костном мозге. Последний является основным депо исходных стволовых клеток, используемых организмом для восстановления мышечной (в т. ч. сердечной), костной, нервной и других тканей. Запасы стволовых клеток в костном мозге не безграничны — чем старше человек, тем меньше у него таких клеток, тем более ослаблены процессы восстановления (замещения) клеточных тканей. Если у эмбриона соотношение ЭСК и других клеток составляет 1:10 000, то у человека 60-70 лет на 1 ЭСК приходится несколько миллионов других клеток.

Некоторое количество стволовых клеток содержится и в других органах (печени, жировой ткани, коже, скелетной мускулатуре), но в отличие от стволовых клеток костного мозга, способных преобразовываться в различные типы клеток, эти стволовые клетки могут воспроизводить только ткань органа, из которого происходят.

В последние годы проводятся масштабные исследования, посвященные поиску путей практического использования стволовых клеток в терапевтических целях. Возможность применения стволовых клеток для лечения и профилактики сахарного диабета основывается на механизме возникновения и течения этого заболевания. Доказано, что в подавляющем большинстве случаев сахарный диабет возникает в результате абсолютной или относительной недостаточности функционирования β -клеток поджелудочной железы, производящих гормон инсулин. Поскольку стволовые клетки могут преобразовываться в любые другие клетки организма, то логично предположить, что они могут преобразовываться и в β -клетки поджелудочной железы. Предшествовавшие наблюдения показали, что подсадка здоровых β -клеток больному в ряде случаев дает очевидный лечебный эффект: увеличивается продукция инсулина, снижается, а иногда и вовсе исчезает потребность в его инъекционном введении. Однако вследствие иммунологической несовместимости и других причин положительный эффект в данном случае длится недолго — несколько месяцев, в лучшем случае — лет. К тому же достаточно сложно получить подходящий донорский материал. В этой ситуации проблему может решить не подсадка чужих β -клеток, а использование стволовых клеток, способных формировать β -клетки, иммуносовместимые с тканями данного человека. Теоретически источниками таких стволовых клеток могут быть эмбриональные, фетальные (абортинные, получаемые при искусственном прерывании беременности) стволовые клетки пуповинной крови, собственные стволовые клетки костного мозга пациента и др.

Получение стволовых клеток, пригодных для использования в качестве исходных для формирования нормально функционирующих β -клеток, — достаточно сложный и трудоемкий процесс. При этом необходимо решить несколько важных задач. Весьма сложным и пока не полностью осуществимым является формирование β -клеток, способных продуцировать, накапливать и выделять инсулин не спонтанно, а с учетом потребности организма, которая, в свою очередь, зависит от реального уровня содержания глюкозы в крови. Потенциальную угрозу представляет и опасность перерождения ЭСК в злокачественные. На преодоление этих и других проблем направлены интенсивные научные исследования. Их результаты обнадеживают.

Имеется немало клинических наблюдений, показавших, что подсадка стволовых клеток позволяет если не полностью излечить диабет, то, во всяком случае, существенно облегчить его течение, на длительное время нормализовать уровень глюкозы в крови пациента, а в ряде случаев отказаться от инсулинотерапии.

Доказано, что сахарный диабет 1 типа — это аутоиммунное заболевание, возникающее вследствие поражения β -клеток

островков Лангерганса. Т-лимфоциты реагируют с антигенами, которые специфически синтезируются β -клетками, и разрушают клетки, что приводит к недостатку вырабатываемого в норме инсулина и повышению уровня глюкозы в крови.

Имеются положительные результаты исследований, показавших возможность трансплантации пациентам их собственных стволовых клеток (в частности, стволовых клеток протоков поджелудочной железы) и преобразование их в инсулинпродуцирующие клетки. Установлено также, что в некоторых случаях β -клетки поджелудочной железы способны самопроизвольно преобразовываться в β -клетки, производящие инсулин.

Имеются перспективы использования наноструктур и наноматериалов для воспроизведения и дифференциации стволовых клеток. В настоящее время запатентованы новые биоинженерные технологии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и биополимерные конструкции — матриксы для стволовых клеток, позволяющие формировать в поврежденном мозге искусственную нервную ткань. В эксперименте удалось восстановить двигательную активность у животных с полным разрывом спинного мозга; проведены 30 успешных операций у пациентов с травмой спинного мозга.

Американский профессор Гордон Уэйр (G. Weir, Diabetes Voice, Vol. 53, 2, 2008) сделал вывод: «Исследователи, работающие над проблемой радикального излечения диабета, возлагают большие надежды на стволовые клетки. Диабетическое сообщество, десятилетиями слышавшее, что средство от диабета откроют вот-вот, на днях, а то и раньше, относится к очередным обещаниям скептически. Между тем именно изучение стволовых клеток можно считать самым перспективным путем в победе над диабетом». Добавим к сказанному, что, невзирая на научно обоснованный оптимизм по поводу перспективы радикального излечения сахарного диабета с помощью стволовых клеток, каждый больной, тем не менее, должен строго соблюдать оправдавшие себя требования к повседневному образу жизни пациента с данным заболеванием.

Генная терапия диабета

Благодаря достижениям современной химии и генетики было создано много новых искусственных веществ, использование которых в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, кулинарии и медицине произвело подлинную технологическую революцию. С чем же связаны и как практически могут быть использованы наши знания о генетике в интересах лечения и профилактики сахарного диабета? Вопрос этот достаточно сложен, и для ответа на него необходимо восстановить в памяти базовые данные о генах и генетике.

Известно, что многие признаки любого животного или растительного организма переходят из поколения в поколение, наследуются. Эти признаки



И.И. Никберг

касаются как внешних (общий облик, особенности телосложения, цвет глаз, черты характера и др.), так и внутренних (особенности обменных процессов, склонность к тем или иным заболеваниям, адаптация к существованию в разных условиях окружающей среды и др.) биологических характеристик организма.

Сравнительно недавно, в начале 1970-х гг., ученые выяснили основные причины и биологический механизм наследственности. Оказалось, что носителями различных наследственных признаков являются гены — микроскопические белковые формирования, входящие в состав дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК). Как сами ДНК, так и входящие в их состав гены (индивидуальная и видовая их совокупность получила название «геном») у разных видов животных и растений отличаются друг от друга. Поэтому открытие ДНК и их генной структуры обусловило стремление использовать те или иные гены, ответственные за нужный наследственный признак, для переноса последнего в другой организм с целью придания ему необходимых, но отсутствующих (или недостаточных) природных свойств. Так появилась и сделала первые шаги новая наука — биогенная инженерия, изучающая биотехнологическое воздействие на живые организмы.

Суть биогенной инженерии заключается в том, чтобы извлечь из ДНК носителя фрагмент или конкретный ген, отвечающий за необходимый признак, и затем «встроить» его в молекулу ДНК другого организма, который после этого будет обладать желаемым свойством. Для «встраивания» «нужной» чужеродной ДНК в геном реципиента используют различные методы, например предварительное клонирование нужного гена растения в одну из почвенных бактерий, затем инфицирование этой бактерией растения-реципиента, приобретение последнего необходимых свойств (устойчивость к холоду, вредителям, повышенную урожайность, улучшенные внешние, вкусовые свойства и др.). Клеточную структуру растения-реципиента предварительно обрабатывают с целью частичного разрушения клеточной оболочки, помещают в раствор с «нужной» ДНК и веществами, облегчающими проникновение последней в клетку. Затем из клетки выращивают целое растение.

Приведем пример получения необходимого для лечения больных сахарным диабетом гормона инсулина. Используя ранее инсулины получали путем переработки поджелудочных желез животных. Из-за примесей других белков эти препараты нередко вызывали неблагоприятные, в первую очередь аллергические, реакции у пациентов. Применяя методы генной инженерии, удалось синтезировать препараты

инсулина, практически идентичные по своему составу человеческому. Суть метода заключается в том, что из многокомпонентного носителя наследственной информации ДНК выделяется ген, ответственный за передачу наследственной информации о нужном виде инсулина. Затем этот ген переносится («встраивается») в другую органическую систему, например в микроорганизм — кишечную палочку, дрожжевые клетки. В процессе последующего размножения эти бактерии (дрожжевые клетки) продуцируют человеческий инсулин, эффективный и безопасный в применении. Впервые такой инсулин был получен в 1982 г. Проводимые в течение почти 30 лет наблюдения за многими тысячами больных не выявили никаких отрицательных последствий, связанных с трансгенным происхождением указанного препарата, и сейчас он широко применяется во всем мире.

Материальной основой для выполнения различных задач биогенной инженерии, в т. ч. в сфере диабетологии, являются носители генов — хромосомы. Хромосомами называют белковые структуры длиной несколько сантиметров (в растянутом виде), содержащиеся в ядрах клеток и являющиеся носителями основной части наследственной информации. Структура ДНК была расшифрована в 1953 г. английскими учеными Френсисом Криком, Розалиндой Франклин и американским биохимиком Джеймсом Уотсоном.

Основой хромосомы являются двухцепочечные макромолекулы ДНК, состоящие из отдельных звеньев — нуклеотидов (аденина, гуанина, тимина, цитозина), содержащих 5 специализированных (гистонов) и ряд неспециализированных белков. В каждом клеточном

ядре содержатся 23 пары хромосом, включая одну женскую (XX) или одну мужскую (XY), а общее количество генов в них превышает 28 тыс. Метрическая длина ДНК различна в клетках разных биологических видов и варьирует от десятков микрометров в вирусах до 2 м у человека, при этом общая длина всех ДНК человека достигает 2×10^{10} км. Каждый ген определяет тот или иной наследственный признак и может быть представлен одной или большим числом форм, называемых аллелями.

Генетическая информация передается поэтапно путем копирования родительской ДНК (образования дочерних ДНК), преобразования генетической информации в рибонуклеиновые кислоты (РНК) и перевода информации с РНК в белковую форму. Исследованиями генетиков из стран Европы, а также ученых из Австралии, Канады и США, в ходе которых проанализированы геномы 122 тыс. человек, установлено, что существует несколько генов, влияющих на уровень инсулина и метаболизм глюкозы. К настоящему времени выявлено свыше 10 вариаций таких генов. Наиболее важным считается ген GIPR-A, при мутации которого нарушается иммунный ответ и повышается концентрация глюкозы в крови.

Не следует, однако, считать, что наличие в ДНК «гена диабета» непременно влечет за собой возникновение заболевания. Среди обладателей такого гена есть немало здоровых людей. С учетом этого становится понятной роль факторов риска. В подавляющем большинстве случаев заболевание возникает при сочетании наличия «гена диабета» и одного или нескольких факторов риска. Следовательно, есть реальная возможность профилактики заболевания.

Экспериментальные исследования позволили получить ряд важных и перспективных для проблем диабетологии результатов. Внимание ученых привлекла, например, работа, выполненная под руководством П. Сантамарии (P. Santamaria). С применением наночастиц, покрытых белковыми фрагментами, характерными для диабета I типа, была создана вакцина, с помощью которой удалось излечить мышей с экспериментально индуцированным диабетом I типа. Авторы исследования доказали, что вакцина из наночастиц работает за счет увеличения числа регуляторных Т-клеток, подавляющих агрессивную иммунную атаку, разрушающую β -клетки, путем предотвращения стимуляции агрессивных аутоиммунных клеток, содержащихся в вакцине пептидом либо любым другим аутоантигеном диабета I типа.

Риск развития диабета связан с генетическими мутациями клеток HLA (human leucocyte antigens), кодирующими белковые молекулы, регулирующие иммунный ответ организма. К успеху в сфере генной терапии диабета I типа приблизились австралийские ученые под руководством Энн Симпсон (Ann Simpson). В лабораторном эксперименте они внедрили ген инсулина в культуру клеток печени, и последние стали вырабатывать инсулин.

Многообещающий метод терапии диабета разработали американские ученые из университетов штатов Техас и Северная Каролина. Они внутривенно вводили крысам фосфолипидные «микропузырьки», содержащие ген, ответственный за синтез инсулина. С током крови пузырьки попадали в поджелудочную железу, где разрушались с помощью ультразвуковых волн, а высвободившиеся

гены проникали внутрь клеток и запускали в них синтез инсулина.

Следует отметить, что, учитывая различные обстоятельства и проблемы, основные надежды в сфере генной терапии сахарного диабета ученые связывают с генноклеточной терапией, при которой необходимые нормальные гены первоначально внедряют в клеточный материал, а затем генетически обогащенные клетки вводят в организм больного, где приживаются и «работают» в физиологическом режиме. Впервые метод генной терапии был применен на практике в 1990 г. в США. Из организма 4-летней девочки, страдавшей врожденным первичным иммунодефицитом, были выделены неполноценные клетки иммунной системы, в них ввели нормальные человеческие гены и возвратили в организм девочки. Это позволило «перестроившимся» клеткам производить фермент, недостаток которого был причиной заболевания.

Первое десятилетие XXI в. показывает, что медицина переходит от оборонительной тактики к наступательной и упреждающей. Важная роль в этом процессе принадлежит новым технологиям. Их применение приближает человечество к осуществлению давней мечты — эффективно излечивать диабет, а в идеале — избавить мир от этого тяжелого заболевания.

Тем, кто хотел бы получить более подробную информацию по вопросам использования нанотехнологий в медицине, можно рекомендовать такие Интернет-ресурсы:
<http://nanovsem.ru>,
<http://popnano.ru>,
<http://www.nanosvit.com>,
<http://www.rusnano.com>,
<http://www.technologyreview.com/biomedicine>,
www.nanomedicine.com,
<http://www.icspb.com/index.html>,
<http://www.nano-medicine.ru>,
<http://www.ntbm.ru>.



КЛИНИЧЕСКАЯ ЗАДАЧА

Классические признаки системного заболевания

Вопросы на стр. 41.

Ответы

1. На передней поверхности обеих лодыжек отчетливо видна ограниченная область массивной эритемы. Область покраснения слегка возвышается над поверхностью неизменной кожи. Аналогичные кожные изменения отмечены на разгибательной поверхности левого колена. Наиболее вероятно в данном случае описаны проявления узловой эритемы (erythema nodosum) — одного из наиболее частых клинико-патологических вариантов панникулита. Типичная картина узловой эритемы характеризуется острым началом; внезапным появлением симметричных, напряженных, эритематозных, теплых на ощупь узелков и приподнятых бляшек, чаще всего на голени, коленях, лодыжках. Узелки (от 1 до 5 см и более в диаметре) обычно расположены билатерально. Повреждения локализируются в основном на разгибательных поверхностях нижних конечностей и характеризуются спонтанными регрессиями без язвообразования, рубцов и атрофии. Рецидивы бывают редко.

Узловая эритема является проявлением кожной реактивности, которая запускается множеством различных стимулов, в том числе:

- туберкулезом;
- воспалительными заболеваниями кишечника;
- инфекциями дыхательных путей (стрептококком);
- саркоидозом;
- приемом различных медикаментов (в том числе сульфаниламидных препаратов, пероральных контрацептивов);
- реже — вирусными, грибковыми инфекциями, атипичной бактериальной флорой и др.

2. Повышение уровня АПФ является неспецифическим маркером саркоидоза. Уровень данного фермента может также использоваться для контроля активности заболевания и ответа на лечение. В данном клиническом

случае уровень АПФ у женщины нормализовался в течение 4 мес терапии, что соответствовало симптоматическому и клиническому улучшению.

Другим лабораторным показателем саркоидоза является повышения содержания кальция в сыворотке крови. Гиперкальциемия может встречаться при других состояниях, поэтому данный показатель должен оцениваться параллельно с другими маркерами заболевания. Гиперкальциемия при саркоидозе хорошо купируется стероидами.

3. На рентгенографии органов грудной полости можно увидеть двустороннюю лимфаденопатию прикорневых лимфатических узлов. Признаков интерстициальной патологии легких не обнаружено. В таких случаях следует проводить дифференциальный диагноз со злокачественными новообразованиями, лимфомой, туберкулезом и саркоидозом.

Этапность поражения легких при саркоидозе можно классифицировать следующим образом:

- стадия 0 — рентгенография без изменений;
- стадия 1 — двустороннее поражения прикорневых лимфатических узлов;
- стадия 2 — диффузные инфильтративные изменения в ткани обоих легких плюс двусторонняя прикорневая лимфаденопатия;
- стадия 3 — выраженное диффузное инфильтративное заболевание легких, фиброз.

4. Все клинические признаки, а также результаты лабораторных и инструментальных исследований указывают на наличие у больной саркоидоза. Это системное заболевание, при котором могут поражаться многие органы и системы, с образованием в пораженных тканях гранул — ограниченных очагов хронического воспаления. В настоящее время причина саркоидоза неизвестна.

Для установления диагноза острого саркоидоза следует учитывать триаду симптомов: узловатую эритему,

боль в суставах и двустороннюю лимфаденопатию прикорневых лимфатических узлов. Эта триада симптомов у больных саркоидозом носит название синдрома Леффрена. Кроме узловой эритемы, при саркоидозе могут наблюдаться другие разновидности поражения кожи, в том числе:

- lupus pernio (от лат. pernio — обмороженное место) — дерматоз, характеризующийся появлением плоских или несколько выступающих над уровнем кожи плотных очагов поражения различных размеров, синюшных и холодных на ощупь, которые локализируются, как правило, на лице (вокруг носа), реже на кистях, стопах, ягодицах;
- рубцовая алопеция — деструкция волосных фолликулов и формирование фиброзной ткани;
- гранулематозная инфильтрация ткани рубцов, шрамов.

5. План дальнейшего обследования должен основываться на клинических признаках заболевания у каждого конкретного пациента. Определение функции легких, оценка диффузионной способности и проведение компьютерной томографии грудной клетки с высоким разрешением играют важную роль при наличии у больного каких-либо симптомов со стороны органов дыхания.

Лечение саркоидоза в большинстве случаев заключается в назначении стероидной терапии. Учитывая то, что заболевание в некоторых случаях способно самостоятельно разрешаться, иногда можно ограничиться наблюдением, не назначая лечение. Как правило, заболевание поддается адекватному контролю.

В этом клиническом случае прогноз заболевания у пациентки благоприятный.

<http://student.bmj.com/student/archive.html>

Подготовила **Ольга Татаренко**