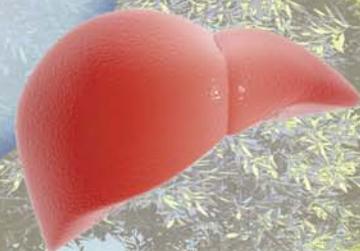


Регенеративная
медицина:



В поисках
**«ЭЛИКСИРА
ЖИЗНИ»**

Ключевые слова: регенерация, прогениторные клетки, нанотехнологии, Г-КСФ, гиалуронидаза
Key words: regeneration, progenitor cells, nanotechnologies, G-CSF, hyaluronidase

© А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков, В. В. Жданов, 2013



ДЫГАЙ Александр Михайлович – академик РАМН, профессор, доктор медицинских наук, директор и заведующий отделом патофизиологии и регенеративной медицины НИИ фармакологии СО РАМН (Томск). Лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники (2005) и международной премии Elsevier и РФФИ «SciVal / Scopus Award Russia 2012». Автор и соавтор 512 научных работ, в том числе 32 монографий, 139 авторских свидетельств и патентов



ЗЮЗЬКОВ Глеб Николаевич – доктор медицинских наук, ученый секретарь НИИ фармакологии СО РАМН (Томск). Лауреат международной премии Elsevier и РФФИ «SciVal / Scopus Award Russia 2012». Автор 170 научных работ, 41 патента

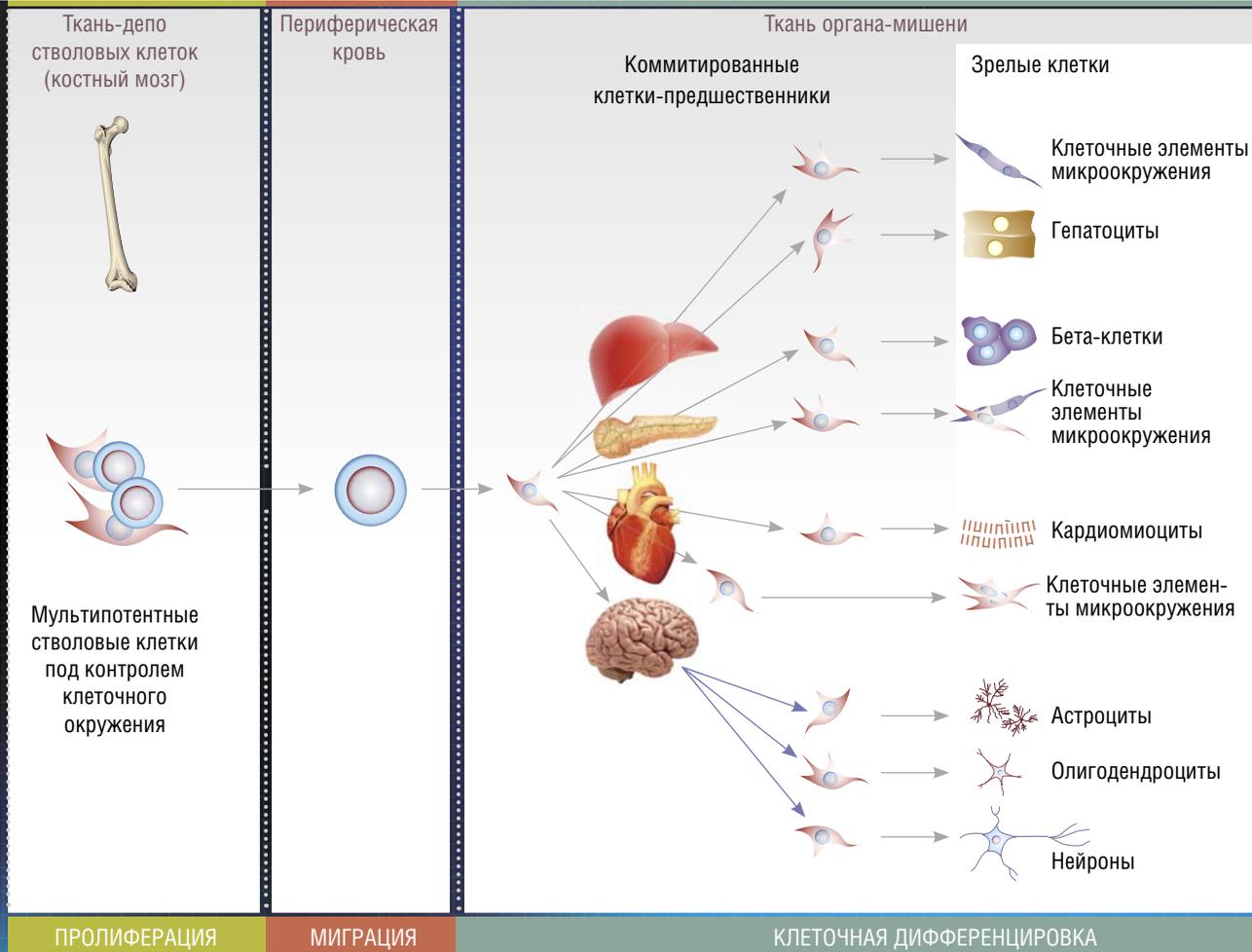


ЖДАНОВ Вадим Вадимович – профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией патологической физиологии и экспериментальной терапии НИИ фармакологии СО РАМН (Томск). Автор 259 научных работ и 45 патентов

Регенерация (от лат. regeneratio – «возрождение») – это естественный процесс восстановления клеток, тканей и органов. Конечно, у человека, в отличие от той же саламандры, не происходит восстановления утраченных конечностей, но так называемая физиологическая регенерация идет в каждом из нас: клетки почти всех тканей непрерывно обновляются, срастаются сломанные кости, заживают раны... При этом еще не так давно считалось, что при таких серьезных патологиях, как хроническая почечная недостаточность или сахарный диабет, восстановление пострадавших из-за болезни органов в принципе невозможно. Однако бурное развитие клеточных технологий в последние десятилетия открыло заманчивые перспективы регенеративной медицины в случаях, ранее считавшихся неизлечимыми

Большинство клеток нашего организма выполняют строго определенные, свойственные только им функции. Так, в миоцитах – клетках мышечной ткани, синтезируется сократительный белок миозин; в β-лимфоцитах крови – специфические иммуноглобулины, позволяющие бороться с инфекциями; нейроны – клетки нервной ткани, способны генерировать электрический импульс и т. д. Все такие клетки имеют свои морфофизиологические особенности, т. е. являются высокодифференцированными и не способны превращаться друг в друга.

Однако в организме имеются и клетки совершенно другого типа – стволовые. Стволовая клетка не принадлежит ни к какой конкретной ткани, однако она способна превратиться в специализированную клетку: нейрон, миоцит, гепатоцит и т. д. Именно универсальные стволовые клетки, способные бесконечно делиться и порождать клетки всех тканей организма, стали одной из центральных фигур регенеративной медицины – современного терапевтического направления, занимающегося восстановительными процессами в организме.



Самыми ранними, абсолютно неспециализированными стволовыми клетками являются оплодотворенная яйцеклетка и клетки, возникающие в процессе нескольких первых циклов ее деления. Они называются тотипотентными (от лат. *totus* – совокупный и *potentia* – сила, возможность). При дальнейшем развитии организма эти клетки приобретают более специализированные свойства, превращаясь в мультипотентные стволовые клетки. Такие клетки способны давать начало клеткам одного из трех так называемых зародышевых листков: эктодермы, из которой происходят, в частности, клетки кожи и нервной системы; мезодермы – родоначальницы клеток соединительной и мышечной ткани; энтодермы, из которой развиваются внутренние органы, такие как печень и легкие. Стволовые клетки, способные быть предшественниками лишь некоторых, «родственных» типов клеток, называются олигопотентными; только одного типа клеток – унипотентными. Во взрослом организме имеются гемопоэтические стволовые клетки (родоначальницы всех клеток крови), стволовые клетки кожи, скелетной мускулатуры, миокарда, нейрональные стволовые клетки. Все эти клетки, «обитающие» в конкретных тканях, обладают высоким потенциалом к размножению и дифференцировке – и не только в клетки соответствующей ткани! Так, стволовые клетки кожи способны дифференцироваться в нейроны

Депо мультипотентных стволовых клеток находится в костном мозге под контролем клеточного окружения. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и фермент гиалуронидаза способны стимулировать эти клетки, вызывая их пролиферацию (размножение) и миграцию в кровотоки и далее, в органы-мишени, такие как печень, поджелудочная железа, сердце и мозг. В этих органах мультипотентные стволовые клетки дифференцируются в клетки-предшественники, а затем и в соответствующие зрелые специализированные клетки

Клеточные технологии: «за» и «против»

Исходно все узкоспециализированные клетки организма образуются в процессе эмбрионального развития из неспециализированных стволовых клеток подобно тому, как из ствола дерева растут ветки и листья. Но стволовые клетки присутствуют не только у эмбриона: они обеспечивают развитие ребенка, а в течение всей дальнейшей жизни отвечают за обновление тканей как при естественной убыли клеток (например, популяция эритроцитов обновляется каждые три-четыре месяца), так и при повреждениях.

Наиболее изученной популяцией стволовых клеток во взрослом организме является популяция мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Такие клетки способны мигрировать по кровотоку в отдаленные органы и дифференцироваться во многие специализированные клеточные типы. Восстанавливая численность поврежденных и погибших клеток ткани, они восстанавливают структуру и, следовательно, функцию соответствующего органа.

Полученные за последние десятилетия сведения о свойствах и закономерностях жизнедеятельности стволовых клеток послужили толчком к развитию нового направления в лечении многих заболеваний – клеточной терапии. Но хотя сегодня эта область входит в число наиболее популярных в мировой медицинской науке, здесь имеется много проблем. Для терапевтических целей наиболее идеальными являются стволовые клетки 4–7-дневного эмбриона, так как при их использовании не возникает реакция отторжения трансплантата. Но в этом случае имеется немалый риск возникновения онкологических заболеваний, не говоря уже об этической проблеме использования эмбриональных клеток.

Поэтому наиболее рациональным (и наиболее физиологичным!) подходом к решению задач регенеративной медицины можно считать стимуляцию функций эндогенных, т. е. собственных стволовых клеток организма,

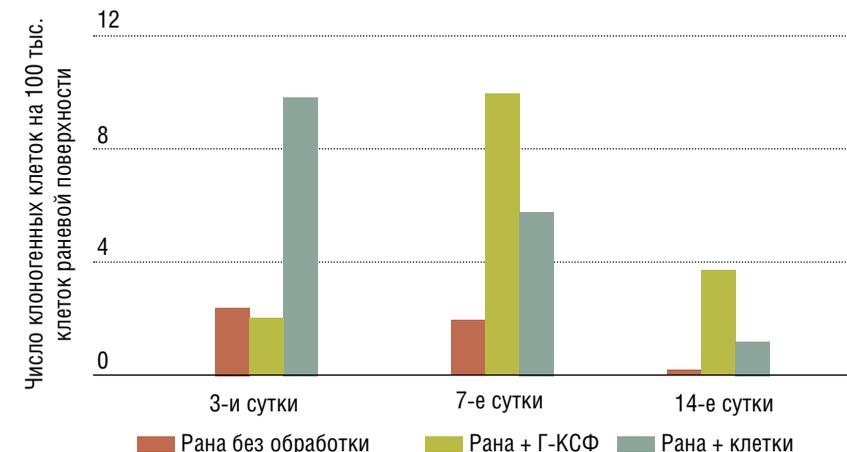
имитируя деятельность его естественных регуляторных систем. Именно такими исследованиями занимаются в «НИИ фармакологии» СО РАМН (Томск), где разрабатываются фармакологические средства воздействия на эндогенные стволовые клетки.

Исследования начались с поиска ответа на важный вопрос: как реагируют стволовые клетки взрослого организма на серьезные патологические состояния? Для этого на экспериментальных животных моделировались такие патологии, как тяжелая форма гепатита с начальной стадией цирроза печени или сахарный диабет. При этом фиксировались маркерные показатели: количество мультипотентных стволовых клеток в костном мозге, периферической крови и в пораженном патологией органе.

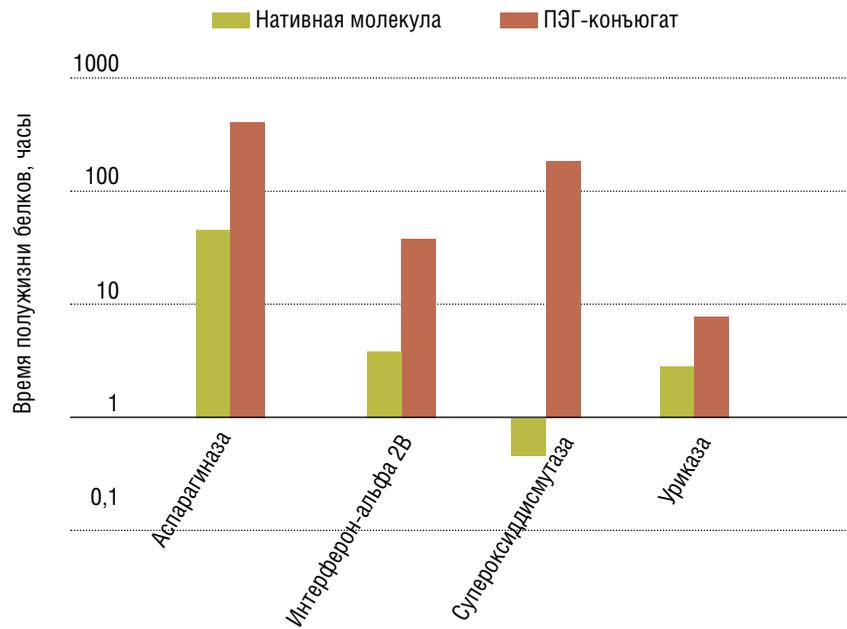
Оказалось, что независимо от характера повреждения число стволовых клеток гемопоэтической ткани в костном мозге возрастает, однако при этом не наблюдается увеличения их выхода в кровь, миграции к поврежденному органу и дифференцировки в соответствующие типы клеток. Требовалось заставить эндогенные стволовые клетки работать в полную силу – эту задачу удалось решить с помощью препаратов, созданных на основе веществ и в естественных условиях участвующих в процессах кроветворения.

Мобилизация ресурсов

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) – полипептид, который стимулирует пролиферацию (размножение) и запускает дифференцировку кроветворных клеток гранулоцитарного ряда (эритроцитов, сегментоядерных лейкоцитов – нейтрофилов, базофилов, эозинофилов, клеток иммунной системы – моноцитов и макрофагов). Кроме того, он способен стимулировать мобилизацию и миграцию в органы-мишени мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, а также их последующую клеточную дифференцировку.



В эксперименте кожные раны у лабораторных животных наиболее быстро заживали при обработке раны непосредственно стволовыми клетками. Заживление ускорялось и при использовании гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Благодаря его действию в поврежденной ткани увеличивается число клоногенных клеток – предшественников фибробластов



Иммобилизация белковых препаратов на носители-полиэтиленгликоле благодаря повышенной гидрофильности образующихся наночастиц не только увеличивает биодоступность этих средств, но и намного увеличивает срок их жизни в организме, защищая от действия иммунной системы. Слева – препараты, модифицированные с помощью технологий химического пегилирования

Еще более широкий спектр действия имеет гиалуронидаза – фермент, который разрушает гиалуроновую кислоту, один из компонентов межклеточного матрикса, (вещества, заполняющего пространство между клетками). В нативном виде гиалуроновая кислота способна взаимодействовать со специфическими рецепторами стволовых клеток; расщепляясь на фрагменты в результате действия фермента, она активирует процессы их деления, дифференцировки и миграции. В результате гиалуронидаза способна опосредованно повышать активность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и кроветворных клеток-предшественников, а также усиливать действие гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

Идея использовать эти биологически активные вещества для активации стволовых клеток, достаточной для регенерации тех или иных пораженных органов, кажется очень привлекательной. Однако в дозах, превышающих их нормальное содержание в организме (но необходимых для такой стимуляции!), и Г-КСФ, и гиалуронидаза очень токсичны, настолько, что это делает невозможным их широкое применение в качестве средств регенеративной медицины.

Однако выход из тупика был найден: нужно использовать для этих веществ специальные носители. Создание специфических носителей для лекарств – реальная перспектива приложения нанотехнологий в практической фармакологии. Конечно, в этом случае мы имеем дело не с такими футуристическими продуктами, как оснащенные по последнему слову техники нанороботы, способные работать внутри человеческого организма. Однако благодаря относительно простой манипуляции – «пришиванию» фармакологически активных

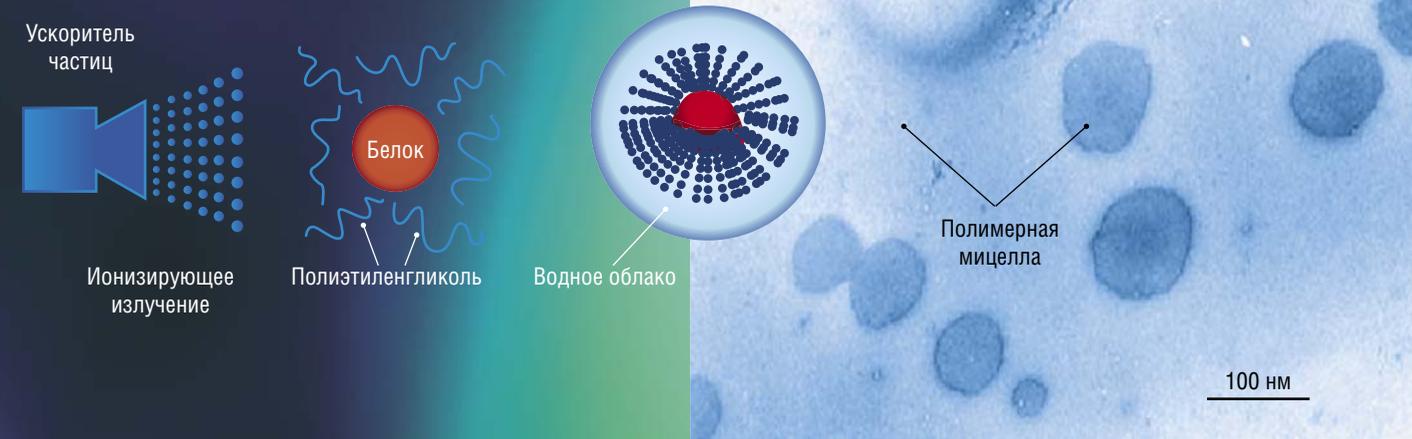
веществ к долгоживущим полимерным молекулам, удастся повысить способность терапевтических молекул преодолевать тканевые барьеры, уменьшить негативные побочные действия (токсичность, аллергенность) лекарств и повысить его эффективность за счет увеличения продолжительности «жизни» в организме.

Следует упомянуть, что классические технологии создания комплексов «лекарство+носитель» очень затратны. Однако специалисты ряда новосибирских научных и научно-производственных организаций – Института ядерной физики СО РАН, Института цитологии и генетики СО РАН и ООО «Саентифик фьючер менеджмент», создали новую технологию радиационного (электронно-лучевого) синтеза, позволяющую в разы снизить затраты на производство таких препаратов при сохранении высокой эффективности.

«Чистые» проигрывают

С использованием технологии радиационного синтеза в «НИИ фармакологии» СО РАМН совместно с ООО «Саентифик фьючер менеджмент» были разработаны нанотехнологичные модификаторы функций стволовых клеток. Это все те же гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и гиалуронидаза, но иммобилизованные (химически присоединенные) на полиэтиленгликоле.

Такие модифицированные препараты показали не только более высокую эффективность по сравнению с обычными «чистыми» веществами, но и отличались от них по механизму действия. Так, оказалось, что иммобилизованный на полиэтиленгликоле Г-КСФ в большей степени влияет на пролиферацию и диф-



При пегилировании по технологии электронно-лучевого синтеза к молекуле терапевтического белка может присоединиться до 60 молекул полиэтиленгликоля, тогда как при химическом пегилировании – всего одна молекула. Поскольку каждая из молекул полиэтиленгликоля притягивает несколько молекул воды, то вокруг образовавшейся частицы формируется «водное облако». На рисунке – полимерная мицелла, полученная с помощью технологии электронно-лучевого синтеза при иммобилизации гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на полиэтиленгликоле. Электронная микроскопия

РАДИАЦИОННЫЙ СИНТЕЗ: БЫСТРО, ПРОСТО, ДОСТУПНО!

В фармакологии в качестве носителей лекарств используются наноконструкции двух типов: содержащие неорганические и органические компоненты. Первые представляют наименьший интерес, потому что в организме нет системы для их выведения и, следовательно, они могут неконтролируемо накапливаться в тканях, что чревато негативными последствиями. Кроме того, неорганические вещества часто обладают выраженной реакционной способностью, что ведет к повреждению клеток и их генетического аппарата.

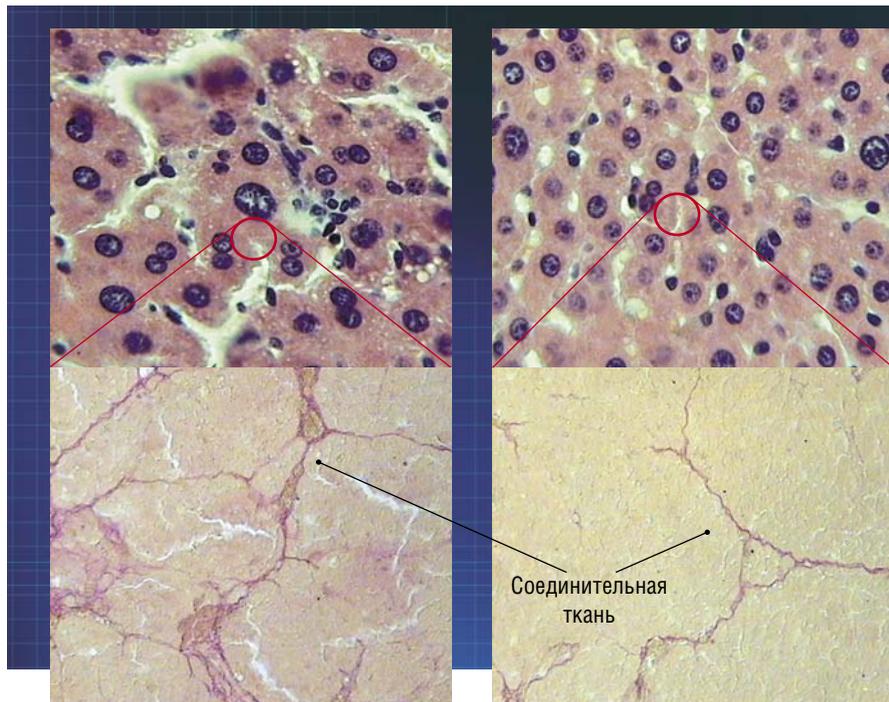
Органические наноконструкции сами по себе безопасны, а препараты, сделанные с их использованием, обладают большей стабильностью, растворимостью и меньшей токсичностью. Они также более эффективны по сравнению с немодифицированными лекарствами, так как характеризуются большим периодом полувыведения из организма. Однако технология пегилирования, которая обычно применяется для синтеза таких препаратов, представляет собой сложный, многоступенчатый и дорогостоящий процесс. Кроме того, при этом применяются высокотоксичные реагенты, что требует многочисленных стадий очистки конечного препарата.

Пегилирование – это физико-химическая модификация лекарственной молекулы белковой природы путем соединения ее с молекулами полиэтиленгликоля, многоатомного спирта, представляющего собой длинный линейный поли-

мер. Благодаря высокой гидрофильности полиэтиленгликоля вокруг модифицированного препарата образуется «водное облако», которое увеличивает биодоступность препарата и защищает его от воздействия белков иммунной системы.

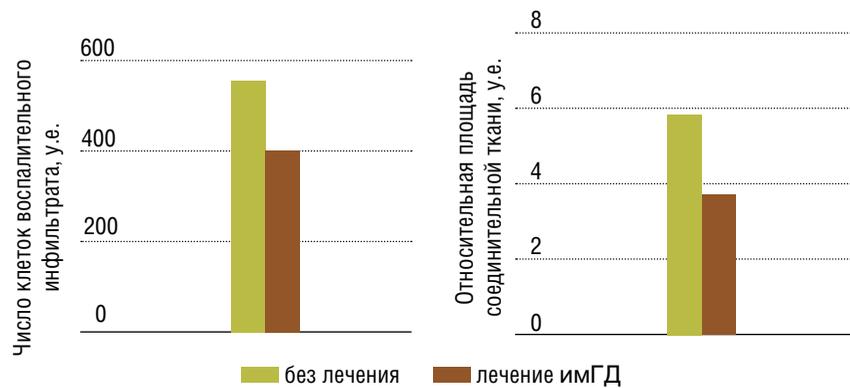
В отличие от классического химического пегилирования, технология радиационного (электронно-лучевого) синтеза «пришивает» лекарственную молекулу к полиэтиленгликолю с помощью потока ионизирующего излучения. Это могут быть ускоренные электроны, а также протоны, нейтроны, гамма-лучи, ультрафиолетовое, лазерное и прочие виды излучения с определенным спектром и энергией в несколько МэВ.

Ионизирующее излучение активирует молекулы полимера так, что они ковалентно взаимодействуют с находящимися в определенных положениях атомами азота белковых молекул. Варьируя дозу облучения, можно получать конъюгаты различной молекулярной массы и стереохимической структуры, меняя таким образом свойства препарата. Длительность процесса радиационного пегилирования составляет всего 2—10 мин. Если фармакологически активное вещество «не боится» облучения, процесс проводят в одну стадию. В ином случае сначала проводится облучение только полимерного носителя, который затем смешивается с активной формой лекарственной субстанции

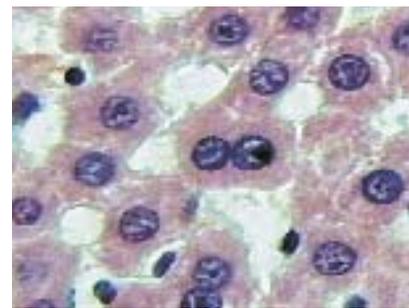


Хронический токсический гепатит 40-е сутки после введения CCl₄

Хронический токсический гепатит 40-е сутки после введения CCl₄ Лечение имГД



Эффективность действия иммобилизованных на полиэтиленгликоле терапевтических средств при лечении хронического гепатита проверялась на лабораторных животных с токсическим гепатитом, вызванным введением четыреххлористого углерода (CCl₄). Гиалуронидаза, иммобилизованная на полиэтиленгликоле (имГД), не только предотвращала склеротизирование (разрастание рубцовой соединительной ткани) печени больных животных, но и заметно снижала активность воспалительного процесса (вверху), а также секрецию гепатоцитами токсических желчных кислот. Схожий эффект в отношении развития склеротических процессов в ткани печени оказывал и иммобилизованный на полиэтиленгликоле гранулоцитарный колониестимулирующий фактор



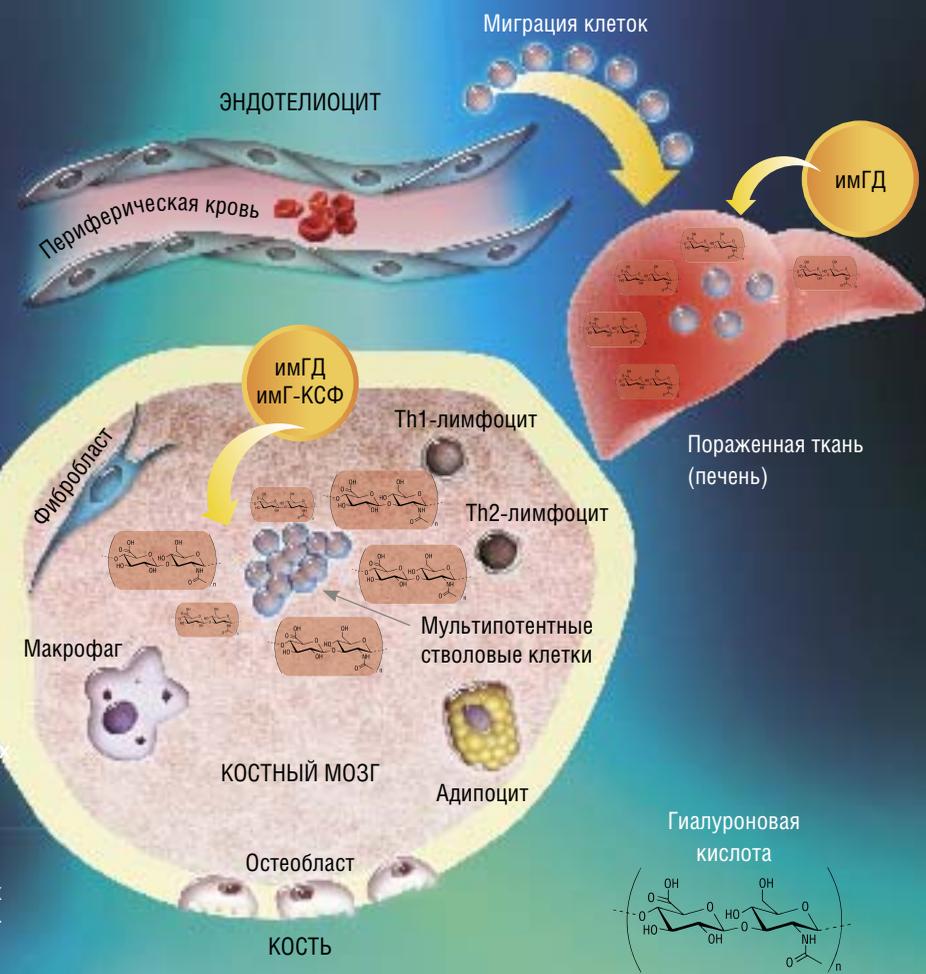
Здоровая печень

ференцировку коммитированных стволовых кроветворных клеток, которые более специализированы, чем мультипотентные. В результате снижается риск истощения популяции этих клеток, которые служат «глубоким резервом» регенерации в костном мозге. И хотя пока неизвестно, насколько велика для организма опасность снижения пула недифференцированных мультипотентных стволовых клеток при их искусственной активации, в данном случае разумнее подстраховаться.

Препараты природной гиалуронидазы (в безопасных дозах) эффективны только при местном применении. Модифицированная же гиалуронидаза обладает в организме системными эффектами, так как не разрушается соответствующими ферментами. Она стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки стволовых клеток различных классов, а при патологических состояниях вызывает их выход в кровь и миграцию в орган-мишень.

Результаты применения впечатляют: так, ее пятикратное введение лабораторным животным после экспериментально вызванного токсического гепатита привело практически к полному восстановлению морфологии и функции печени. При этом необходимые дозы препарата очень низки, а сам препарат можно принимать перорально (т. е. через рот), а не только с помощью инъекций.

Иммобилизованные на полиэтиленгликоле гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (имГ-КСФ) и гиалуронидаза (имГД) обладают выраженной способностью стимулировать процессы пролиферации и дифференцировки как регионарных стволовых клеток различных органов, так и мультипотентных клеток из костного мозга. Активация последних сопровождается их направленной миграцией в органы-мишени. Механизм этих феноменов – модификация свойств межклеточного матрикса и секреторной и связывающей способностей клеточного микроокружения наряду с изменениями свойств самих стволовых клеток. В частности, направление миграции стволовых клеток определяется уровнем продукции фактора миграции клеток (SDF-1-фактора). В стромальных клетках костного мозга – главного депо стволовых клеток, она снижается, а в органе-мишени – увеличивается



С появлением клеточных технологий у человечества появилась реальная надежда на излечение многих недугов, которые до настоящего времени считались неизлечимыми. Работы сибирских ученых по созданию фармакологических модификаторов функций стволовых клеток подтверждают, что таким образом можно нормализовать структуру и, следовательно, функцию практически любого органа – если вмешаться в патологический процесс вовремя.

Например, в условиях эксперимента удалось полностью излечить начальную стадию цирроза печени. Разрабатываются и методы безинсулиновой терапии сахарного диабета: не исключено, что за счет эндогенных стволовых клеток появится возможность восстанавливать структуру пораженной поджелудочной железы, чтобы в организме в достаточном количестве вырабатывался собственный инсулин. Из распространенных патологий нервной системы наиболее перспективными для такого лечения являются энцефалопатии, с возможностью полного восстановления когнитивных функций головного мозга; а в отдаленной перспективе – ряд таких тяжелых патологий, как болезни Паркинсона и Альцгеймера.

Конечно, пока все эти разработки находятся на доклинической стадии исследования: полный же цикл создания нового лекарственного средства долг и требует больших материальных и финансовых вложений. Но, как известно, «дорогу осилит идущий»...

Литература
Дыгай А. М., Артамонов А. В., Бекарев А. А. и др. *Нанотехнологии в фармакологии*. М.: Издательство РАМН, 2011. 136 с.

Дыгай А. М., Зюзьков Г. Н. *Клеточная терапия: новые подходы* // Наука в России. Москва: Наука, 2009. Т. 169, № 1. С. 4–8.

Дыгай А. М., Зюзьков Г. Н., Жданов В. В. и др. *Иммобилизованный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические свойства и перспективы использования*. Томск: ООО «Печатная мануфактура», 2011. 149 с.

Дыгай А. М., Жданов В. В., Зюзьков Г. Н. и др. *Гепатопротекторные эффекты иммобилизованных препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и гиалуронидазы и механизмы их развития* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 1. С. 14–18.