

Профессор Владимир Азарович Исаченков стал Кавалером почетного знака «Вместе мы сильнее!» 2 степени ПОСМЕРТНО. Диплом и серебряный знак были вручены его вдове при проведении XX Российского Дня Борьбы с диабетом 25 июня 2011 г.

Фрагмент из книги Х. Каналеса «Виртуозная инсулинотерапия», М., 2002, стр. 156 -160 о методиках излечения сахарного диабета 1 типа.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ, ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ИНСУЛИН - ЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА (ИЗСД)

Профессор В.А. Исаченков (с разрешения автора)

Москва

Базовая концепция

Современные знания о молекулярно-клеточных основах диабета достигли высокого уровня, однако их применение для утилитарных целей профилактики и лечения этой патологии драматически отстает. Поистине наше время в отношении диабета – время «собирания камней». Эти записи и являются тому посильной попыткой.

Наработанные теоретические знания позволяют с высокой точностью определить ИЗСД как полисиндромную болезнь, вызванную дефицитом лишь одного гормона – инсулина. (В данной главе рассматривается концепция, отличная от мнения проф. Исаченкова В.А., при которой дефицит инсулина является уже следствием ряда процессов. Прим. ред.) Синтез инсулина блокируется в единственном месте его образования – клетках островков Лангерганса (КОЛ) поджелудочной железы. Нарушения продукции инсулина в данном случае не имеют генетических причин, а всецело обусловлены цитолизом КОЛ. Цитолиз идет строго по сценарию аутоиммунного конфликта. В преддиабетической стадии специфические антигены КОЛ вступают в порочный контакт с клеточными и гуморальными элементами иммунной системы. Результат конфликта – недостаток или полное отсутствие инсулина как следствие гибели инсулин-продуцирующих клеток. В то же время для инсулина, вводимого в организм извне, сохраняются все звенья, необходимые для коррекции патологии. Такая молекулярно-клеточная основа диабета позволяет

построить эффективную тактику и стратегию его лечения.

Важнейшие этапы этой стратегии:

1. Ранняя диагностика преддиабетического состояния.
2. Иммунобиотехнологическая и фармакологическая профилактика диабетогенных аутоиммунных процессов.
3. Биотехнологические пути лечения ИЗСД.
4. О молекулярной мимикрии.

Коротко остановимся на каждом из них.

1. Ранняя диагностика преддиабетического состояния

Как уже отмечалось, к настоящему времени аутоиммунная природа ИЗСД стала ведущей концепцией его патогенеза. Непреложен факт, что снижению секреции инсулина предшествует типичный иммунный инсулит в В-клетках островков. Долгий и трудный поиск цитоспецифических антигенов КОЛ, индуцирующих аутоиммунный процесс, увенчался к началу 90-х годов примечательным открытием. Был идентифицирован так называемый Р-64 антиген, являющийся ферментом с активностью декарбоксилазы глютаминовой кислоты (GAD-64) и ассоциированный с мембраной КОЛ. По существу эта изоформа фермента представляет собой специфический маркер для В-клеток и выступает как антиген, вызывающий появление в сыворотке крови аутоантител задолго до клинического проявления ИЗСД. Отсюда вывод: массовое диспансерное обследование населения на наличие антител GAD-64 – необходимый этап ранней диагностики преддиабетического состояния. Здесь, подобно тому как при СПИДе наличие в крови антител к вирусу является признаком вирусонасительства, так и антитела к GAD-64 - индикатор преддиабета. Вероятно, наряду с антигеном GAD-64, при более тщательном изучении антигенной поверхности КОЛ будут найдены и другие маркеры, однако, создание теста на этот антиген представляет сейчас уже более чем актуальную задачу. При консультировании диагностикумов для определения антител к GAD-64 следует заранее предусмотреть простоту и доступность выполнения массового тестирования вне специализированных центров: в медпунктах, поликлиниках и даже способом самоконтроля. Это позволяет, в частности, сделать разработанный нами метод для экспресс-анализа различных антигенов и антител с помощью простого биосенсора /1-3/

2. Иммунобиотехнологическая и фармакологическая профилактика

диабетогенных аутоиммунных состояний

После констатации аутоиммунного состояния следует логическое включение всех доступных и уже апробированных методов лечения иммунопатологии. Общая природа и механизм ИЗСД с другими аутоиммунными патологиями определяет и общую фармакологическую базу – гормонотерапия, иммунодепрессанты, десенсибилизирующие средства. Оставляя эти традиционные подходы за рамками обсуждения, выделим два способа для осуществления селективной иммунодепрессии ИЗСД.

Первый из них – создание так называемой противодиабетической вакцины. Следует иметь в виду, что островковый инсулин вызывается субпопуляцией Т-лимфоцитов-киллеров. Особенность этой субпопуляции наличие на их поверхности рецепторных молекул, комплементарных к антигенным структурам островков. Другая особенность – высокая скорость деления клеток в процессе аутоиммунного конфликта и количественное возрастание их доли среди других лимфоцитов крови. Эта субпопуляция лимфоцитов, обладающая сродством к антигенам КОЛ, может быть легко изолирована из общей массы иммунных клеток с помощью иммуноаффинной техники. Последующая активная иммунизация этими клетками, а точнее, препаратами из них, должна приводить к избирательному элиминированию противоостровковых Т-лимфоцитов. Как и всякая вакцина – это радикальный путь контроля клеточного звена иммунитета. Его же гуморальное звено предполагается регулировать следующим способом.

Аутоантитела к КОЛ продуцируются В-лимфоцитами. Они взаимодействуют с мембраной инсулин-продуцирующих клеток, фиксируют комплекс, в результате чего неминуемо наступает лизис этих клеток. Для устранения подобного цитолиза предполагается применить «отвлекающую» стратегию. В качестве такого «отвлекающего средства» целесообразно использовать синтетические эпитопы из антигенов КОЛ, индуцирующих аутоиммунный процесс. Эпитопы – часть антигена, взаимодействующая с антителами. Это, как правило, короткие фрагменты молекулы антигена (3-5 аминокислотных остатков), химический синтез которых доступен и дешев. Важно то, что эпитопы могут полноценно имитировать цельную молекулу антигена при взаимодействии с антителами, нейтрализовать их активность и предотвратить фиксирование на КОЛ. Такие псевдо антиген-антительные комплексы лишены способности к иммунной атаке КОЛ, но могут быстро выводиться из организма путем иммунного лизиса, почечной фильтрации, деградации Купферовскими клетками печени. В результате одним действием достигаются две цели – нейтрализация противоостровковых антител и выведение их из циркуляции.

3. Биотехнические методы лечения ИЗСД

Лечение ИЗСД сводится к обеспечению организма инсулином извне. При этом важны как источники инсулина, так и способы его доставки и транспорта, в организме, иначе говоря, его лекарственные формы. Со стороны биотехнологии можно наметить следующие пути реализации этих направлений.

Источники инсулина можно разделить на эндогенные и экзогенные.

А. Эндогенные источники инсулина.

Атрофия островкового аппарата при ИЗСД выдвигает вопрос альтернативных источников инсулина в организме. Наиболее радикальный путь – генная трансплантация. Химический синтез гена в настоящее время представляет собой рутинную процедуру, несложен и его перенос в разнообразные клетки-реципиенты. Новым шагом в рекомбинантной технологии инсулина явилась бы имплантация гена инсулина в собственные соматические клетки больного. При этом отпадает проблема иммунного отторжения такого аутологичного клеточного материала. Клетки-реципиенты гена должны удовлетворять двум требованиям – иметь достаточно высокую потенцию к делению и легко приживаться при ретрансплантации. По-видимому, этим требованиям могут отвечать фибробласты, эпителий слизистых, клетки паренхимы слюнной железы или простаты. При введении наряду с геном соответствующих регуляторных участков – оперонов, промоторов – такие клетки будут работать подобно островковым, и экспрессия инсулина будет зависеть от концентрации глюкозы в крови. Другой аспект этой проблемы – пластика, протезирование такого «Инсулинового реактора». По-видимому, имитатор островковой ткани должен создаваться с помощью хирургов и выглядеть как образование с развитой поверхностью для размещения в нем достаточного количества клеток, снабженных хорошим кровообращением.

Несколько слов о других возможных источниках эндогенного инсулина. Как известно, синтез инсулина КОЛ осуществляется только в стадии их наивысшей дифференцировки после утраты клетками способности к делению. Дифференцированное состояние достигается, в свою очередь, серией деления клеток-предшественников. В отличие от известного процесса дифференцировки стволовых клеток крови с участием регуляторов, пример, зрителипоэтина, факторы, стимулирующие дифференцировку клеток островков, четко не определены. Вместе с тем, целый ряд экспериментальных

данных указывает на их существование. Так, например, клетки инсулиномы золотистого хомячка, бесконечно пассируемые вне организма, утрачивают способность к синтезу и секреции инсулина, но после возвращения в организм быстро восстанавливают способность к продукции инсулина. Возможно, поиск факторов, обеспечивающих пролиферацию, дифференцировку клеток и регуляцию образования инсулина будет также плодотворен, как это имело место ранее при обнаружении целой гаммы пептидов – регуляторов синтеза гормонов клеткам гипофиза.

Б. Экзогенные источники инсулина.

Опуская проблему инсулина, получаемого рекомбинантной технологией с помощью микроорганизмов, отметим лишь, что время повышенного энтузиазма по поводу применения для лечения ИЗСД рекомбинантного гормона уже прошло. Сложность организации молекулы инсулина (двухцепность) и необычный ее процессинг (прогормон, С-пептид) еще долго не позволят отказаться от традиционных источников гормона – поджелудочной железы свиньи и крупного рогатого скота. Тем не менее, даже эти традиционные источники инсулина могут быть использованы с большей эффективностью при приложении к ним новых биотехнологических достижений. Выделим в этом плане три подхода.

1) В связи с особой подверженностью островкового аппарата аутоиммунной агрессии, препараты, применяемые для коррекции ИЗСД, должны быть проверены с учетом новых параметров. При длительной заместительной терапии вместе с гормоном могут попадать и присутствующие в препарате аллергены. Не сам инсулин, а, в первую очередь, антигены, экстрагируемые из островков, становятся первопричиной аутоиммунного отторжения КОЛ. Эти антигены могут иметь эволюционно консервативную структуру, и, несмотря на их ксеногенное происхождение (свинья, бык), оказывать вакцинирующее действие при введении человеку. Следует ввести обязательное тестирование препаратов инсулина, производимых эндокринной индустрией, на цитотоксическое действие по отношению к КОЛ, проводимое по специальным методикам.

2) Длительное применение инсулина животного происхождения неизбежно вызывает образование антител к нему. Резистентность к все повышающимся дозам гормона при длительной терапии становится следствием иммунной нейтрализации биологической активности инсулина. Зная антигенную структуру свиного или бычьего инсулина по отношению к человеку, инъекции инсулина следует предварять введением эпитопных фрагментов (см. выше). Эти фрагменты, подобно молекулярным наездникам,

уведут антитела из кровотока и предотвратят их антигормональное действие.

3) Использование управляемых микрокапсул для транспорта и доставки

инсулина. Применяемые ныне инъекции инсулина во многих отношениях мало адекватны, хотя бы по хронобиологическим закономерностям. Преодолеть это узкое место – заветная мечта врача. Вероятно, создание так называемых управляемых микро контейнеров инсулина решило бы эту проблему. Внутренний объем капсул заполняют инсулином, оболочка состоит из белково-липидных компонентов, совместимых с внутренней средой организма. Капсулы имеют микронные размеры, так что они беспрепятственно распределяются по всему кровотоку, вплоть до капиллярного. Самое же примечательное свойство этих капсул – встроенные в их мембрану инсулиновые каналы. Эти каналы, по сути, представляют собой ферментативные сенсоры, способные определять концентрацию глюкозы в крови. При возрастании её уровня над физиологической нормой, инсулиновые каналы открываются и обеспечивают вход гормона из капсул в кровоток. При нормализации показателя глюкозы каналы закрываются и удерживают инсулин до новой потребности в нем.

4. Молекулярная мимикрия

И, наконец, несколько замечаний по поводу одной из ведущих причин аутоиммунного конфликта. На протяжении десятилетий медицинская статистика накопила данные, свидетельствующие о том, что первая манифестация диабетического состояния происходит после ряда вирусных, микробных и паразитарных инфекций. Детальный анализ этих причинно-следственных отношений привел к проблеме так называемой молекулярной мимикрии возбудителей инфекций. Дело в том, что диверсия возбудителя осуществляется под камуфляжем структур, химически родственных антигенам КОЛ. Это общебиологическое явление оказалось особенно характерным для патогенеза диабета. Общие антигенные детерминанты возбудителя и КОЛ после инфекционного криза оставляют пролонгированный аутоиммунный конфликт. Биотехнологические подходы к решению этой поистине интригующей проблемы диабета находятся в рамках конструирования синтетических вакцин нового поколения к различным возбудителям, способным к молекулярной мимикрии.

Изложенная программа не претендует на исчерпывающий охват столь сложной проблемы как ИЗСД и может быть дополнена и детелизирована. Вместе с тем, она затрагивает корневые аспекты проблемы, акцентируя внимание на возможностях биотехнологии в решении задач диагностики, профилактики и лечения ИЗСД. Для реализации их в интересах огромного числа больных целесообразно было бы сконцентрировать усилия сохранившихся научных коллективов, объединив их общей программой.

Литература.

1. Исаченков В.А., Шип О.П. Визуаметрический иммуноферментный анализ на основе простого биосенсора.// Биотехнология. – 1994. - № 9-10.-С.49.
2. Исаченков В.А., Котов Ю.А., Шип О.П. Бесприборный анализ для медицины катастроф.// Медицина катастроф. – 1995.- № 3(11).-С.111.
3. Исаченков В.А., Шип О.П. Энзимографический анализ.// Биотехнология. – 1997. – С.51.