Возможности клеточных технологий в лечении сахарного диабета

Т.В. Никонова, Е.В. Пекарева, Ю.И. Филиппов

ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий (директор – академик РАН и РАМН И.И. Дедов), Москва

8–11 сентября 2008 года состоялась очередная 44 сессия конгресса Европейской ассоциации по изучению сахарного диабета (EASD). Программы научных сессий включали наиболее актуальные вопросы этиопатогенеза и лечения сахарного диабета (СД) и его осложнений, а также освещали современные подходы его диагностики и профилактики.

Трансплантация островков поджелудочной железы

Особый интерес вызвала лекция доктора Camillo Ricordi, посвященная трансплантации островков поджелудочной железы (ПЖЖ). Доктор C. Ricordi известен как один из ведущих ученых мира в области клеточной трансплантации. Он первым осуществил серии трансплантаций донорских островков в печень больных СД и внедрил в клиническую практику метод, позволяющий изолировать большое количество клеток островков ПЖЖ человека. Лектор представил обзор по проблеме трансплантации клеток ПЖЖ, начиная с 1990 года, когда была проведена первая серия удачных пересадок; остановился на результатах Эдмонтонского протокола по пересадке островков, в котором участвовало 50 институтов и более 700 пациентов. Основными особенностями протокола являлась методика выделения островков из ПЖЖ донора и состав комбинированной иммуносупрессивной терапии. Для выделения островков из ПЖЖ донора использовались специальные энзимы. Был ликвидирован этап приготовления культуры островков ПЖЖ. После получения очищенных островков с высоким выходом клеток и до момента трансплантации проходило не более 2-х часов. Клетки вводили в воротную вену через катетер, установленный под контролем ультразвука. Комбинация иммуносупрессивных препаратов в Эдмонтонском протоколе включала сиролимус, такролимус и даклизумаб (моноклональные антитела к рецепторам ИЛ-2). Каждый больной получил в среднем 10 000 островков на 1 кг массы тела. Такое количество островков ПЖЖ для каждого больного получали из 2–3 донорских трупных желез.

Доктор C. Ricordi отметил положительные и отрицательные стороны иммуносупрессивной терапии. Сиролимус считают наиболее современным иммуносупрессивным препаратом, играющим ключевую роль в приживлении трансплантированных клеток ПЖЖ. Его иммуносупрессивные свойства обусловлены, прежде всего, блокадой ИЛ-2-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов. Сиролимус связывается (подобно такролимусу) с белком из семейства FK-связывающих. Затем этот комплекс связывается с протеинкиназой mTOR, в результате чего блокируются пути передачи сигнала, останавливающие клеточный цикл в фазе G-1. Главным преимуществом сиролимуса перед другими иммуносупрессивными препаратами является способность сохранять функцию почек наряду с поддержанием лучшей (без отторжения) выживаемости трансплантата. Для профилактики отторжения трансплантата предпочтительно использовать инъекционные лекарственные формы, содержащие наночастицы такролимуса, сиролимуса или их комбинацию, для создания подкожного или внутримышечного депо.

Использование инкапсулированных островков, получаемых с помощью современных нанотехнологий, а также ингибиторов каспаз, позволяет избежать массовой гибели имплантированных β-клеток и предотвращает аллосенсибилизацию при трансплантации.

В исследование по Эдмонтонскому протоколу были включены больные в возрасте от 18 до 65 лет, с длительностью СД более 5 лет, ИМТ не более 26 кг/м^2, неопределяемой концентрацией С-пептида в крови. По предварительно опубликованным результатам 16 человек (44%) из 36 участников исследования (9 центров из США, Канады, Европы) через год после трансплантации островков ПЖЖ утратили потребность в экзогенно вводимом инсулине, у остальных 20 человек требовалось введение инсулина, при этом у половины из них наблюдалось улучшение контроля углеводного обмена на фоне уменьшения дозы вводимого инсулина.

Не было случаев смерти, возникновения злокачественных опухолей или развития посттрансплантационных лимфопролиферативных состояний. Побочные эффекты трансплантации, обусловленные иммуносупрессией, включали нейтропению (5 случаев), пневмонию, стоматит, пиелонефрит. В 7 случаях из 77 инфузий островков возникло интраперитонеальное кровотечение, в 4 из них потребовалось переливание крови, в 1 — лапаротомия.

Авторы проекта считают трансплантацию островковых клеток ПЖЖ альтернативным методом лечения пациентов с нестабильным течением СД, страдающих от частых тяжелых гипогликемий, у которых все попытки компенсировать СД с помощью инъекций инсулина потерпели неудачу.

Эмбриональные стволовые клетки

Другим направлением клеточных технологий, имеющим целью восстановление массы β-клеток, является использование стволовых клеток. Этому вопросу посвящена большая часть исследований в области СД и множество публикаций.

К стволовым относятся клетки, способные образовывать большое количество различных более дифференцированных клеток. Различают эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), абортивные или фетальные стволовые клетки, стволовые клетки пуповинной крови и собственно аутологичные стволовые клетки (в основном из красного костного мозга (ККМ) самого пациента).

Альтернативным источником высоко пролиферативных плюрипотентных клеток, которые заслужили большое внимание, являются ЭСК. Полученные из эмбриона на стадии бластоцисты, эти клетки in vitro обладают способностью к дифференциации во все три зародышевых листка.

Первый отчет об успешном получении инсулин-продуцирующих клеток из ЭСК мыши был опубликован в 2000 г. Используя систему клеточных ловушек, Soria и соавт. получили клоны инсулин-продуцирующих клеток из недифференцированных ЭСК. Кластеры клеток, полученные из этих клонов, были имплантированы в селезенку мышей со стрептозотоцин-индуцированным СД. У этих животных снизилась гликемия и нормализовалась масса тела. Тем не менее, число инсулин-позитивных клеток было чрезвычайно мало.

Технология применения ЭСК стала активно развиваться в последние годы в результате разработки более специфиче-

ских режимов инкубации, позволяющих достичь их координированной дифференциации.

Недавно Blyszczuk и соавт. описали эффективную методику дифференциации in vitro ЭСК в панкреатическую линию. Дифференцированные клетки выделяют инсулин в ответ на высокую концентрацию глюкозы. Однако в другом исследовании было показано, что такие клетки выделяют инсулин под действием различных средств, усиливающих его секрецию, но не отвечают на стимуляцию глюкозой.

Исследования на человеческих ЭСК находятся в начальной стадии. При этом очевидно, что многие принципы, выявленные на ЭСК клетках мышей, не могут быть прямо применимы к человеческим. Более того, в физиологических условиях β-клетки находятся в сложной структуре островка, что позволяет контролировать инкрецию инсулина с помощью различных механизмов: нервного (например, симпатических нервных волокон), эндокринного (например, глюкагона) и паракринного (например, соматостатина). Кроме того, этические проблемы, связанные с получением инсулин-продуцирующих клеток из эмбрионов человека, осложняют дальнейшее развитие этого направления.

Внепанкреатические источники стволовых клеток

Сообщалось, что не только ЭСК, но и дифференцированные клетки разного происхождения, включая гепатоциты, клетки селезенки, ККМ и экзокринной части ПЖЖ способны образовывать инсулин. Однако у дифференцированных клеток эта способность гораздо ниже, чем у эмбриональных стволовых клеток человека. Кроме того, такие клетки в типичных случаях не содержат других важных компонентов β-клеток, необходимых для координированной инкреции инсулина, а именно глюкокиназы и GLUT-2.

В ходе развития эмбриона как печень, так и вентральная закладка ПЖЖ формируются из одной популяции клеток внутри эндодермы эмбриона. Правомерно предположили, что эпителиальные клетки ПЖЖ и печени могут происходить из единой клеточной популяции. Таким образом, стволовые клетки печени могут быть другим привлекательным источником β-клеток.

Yang и соавт. описывают способность высоко очищенных овальных стволовых клеток взрослых крыс дифференцироваться в эндокринные клетки ПЖЖ при выращивании их в среде с высоким содержанием глюкозы. Такие дифференцированные клетки способны самостоятельно объединяться в трехмерные островковоподобные кластеры клеток и снижать гликемию у NOD мышей с комбинированным иммунодефицитом. Получены многообещающие результаты на взрослых печеночных клетках человека. Используя ген Pdx-1 и растворимые факторы, Sapir и соавт. достигли существенного успеха по преобразованию таких клеток в функциональные инсулин-продуцирующие. Трансплантация этих клеток под почечную капсулу иммунодефицитных NOD мышей приводила к длительной нормализации гликемии. Недавно прошедшее исследование под руководством Tang и соавт. успешно показало возможность репрограммирования стволовых WB клеток печени в предшественники эндокринных клеток ПЖЖ с помощью постоянной экспрессии генов Pdx-1 и Pdx-1-VP 16. При трансплантации диабетическим мышам эти клетки становятся функциональными инсулин-продуцирующими и восстанавливают эугликемию. Таким образом, клетки печени можно использовать для получения трансплантабельных инсулин-продуцирующих клеток.

Породили особую надежду многообещающие результаты исследований Faustman и соавт. (2001–2003 гг.) по введению аллогенных спленоцитов NOD мышам, что в конечном счете приводило к регенерации островков ПЖЖ. Традиционных островков ПЖЖ, получаемых от трупного материала, не хватает для широкого использования, и теперь у докторов появилась возможность накапливать материал селезенки. В 2006 г. три группы исследователей повторили эксперимент Faustman. В результате ни одна группа не выявила в крови и лимфатических узлах мышей новых β-клеток, трансформированных из донорских клеток селезенки. Предполагают, что их уничтожила иммунная система.

ККМ служит важным источником стволовых клеток у взрослых. В дополнение к их способности поддерживать систему гемопоэза, эти клетки могут дифференцироваться как в экто-, так и в эндодермальном направлениях.

В исследовании Ianus и соавт. сообщается, что 1,7–3,0% всех β-клеток у мышей-реципиентов были донорского происхождения и обнаруживались в течение 4–6 недель после трансплантации ККМ. Moriscot и соавт. также сообщают, что стволовые клетки ККМ человека способны in vitro дифференцироваться в инсулин-секретирующие клетки путем активации некоторых факторов транскрипции. Hess и соавт. описали эндогенную регенерацию ПЖЖ после трансплантации стволовых клеток ККМ. Обнаружено, что встраивание и приживление этих клеток к протокам и островкам ПЖЖ сопровождается быстрой пролиферацией клеток ПЖЖ реципиента и неогенезом инсулин-позитивных клеток. Считают, что трансплантированные стволовые клетки ККМ преобразуются в сосудистые эндотелиальные клетки, стимулирующие регенерацию β-клеток в ПЖЖ из клеток реципиента путем выработки пока еще неизвестных факторов роста и дифференциации.

В дополнение к отмеченным выше результатам можно добавить, что гемопоэтические стволовые клетки взрослых людей могут вызывать повторную устойчивость к аутоантигенам. Хотя гемопоэтические стволовые клетки потенциально можно использовать для лечения аутоиммунных заболеваний, клиническое применение данного подхода ограничено рисками, связанными с аллогенной трансплантацией.

Стволовые клетки пуповинной крови

В настоящее время Haller и соавт. (2008) проводят клинические испытания эффективности применения пуповинной крови для лечения пациентов с СД1. Подбор больных с сохраненной пуповинной кровью осуществлялся с 2005 г. На сегодняшний день в исследовании принимают участие 15 детей в возрасте от 3,5 до 7 лет, каждому из которых внутривенно вводили клетки пуповинной крови в объеме не более 100 мл. Предтрансплантационная подготовка не проводилась. Результаты оценивали каждые 3 мес. в течение первого года и 6 мес. в течение второго года. Исследование направлено на коррекцию функциональных нарушений иммунной системы, увеличение пула регуляторных Т-лимфоцитов, супрессию Т-эффекторов для предотвращения дальнейшей деструкции β-клеток.

Исследователи пока не приводят окончательных статистических данных, отмечая улучшение оцениваемых параметров (Hb_{A1c}, С-пептид, результаты теста со смешанной пищей, суточную инсулинопотребность, а также количество $CD3^+$-, $CD4^+$-, $CD8^+$-, $CD25^+$-лимфоцитов). Авторы отмечают безопасность введения аутологичной пуповинной крови.

Возможности регенерации β-клеток

Альтернативная стратегия для восстановления массы β-клеток у пациентов с СД состоит в индукции регенерации их из эндогенных источников. Доказано, что масса β-клеток динамична и способна адаптивно изменяться в соответствии с различными потребностями организма в инсулине. У людей масса β-клеток увеличивается примерно на 50% при ожирении; инкреция инсулина. Масса β-клеток увеличивается также у беременных женщин. Аналогичным образом масса β-клеток увеличивается примерно в 2,5 раза к концу беременности у грызунов и быстро снижается в послеродовом периоде.

Это происходит благодаря ускорению апоптоза и замедлению митоза β-клеток в послеродовый период.

Продолжаются дебаты о механизмах поддержания массы и численности популяции β-клеток у взрослых. Обсуждаются два возможных основных пути. С одной стороны, убедительно доказана возможность митотического деления предсуществующих β-клеток в поджелудочной железе взрослых мышей, крыс и людей, доказано также образование новых β-клеток у постнатальных мышей исключительно путем митотического деления существующих β-клеток. С другой стороны, тесную связь между экзокринными протоками и β-клетками считают доказательством того, что β-клетки могут возникать также из стволовых клеток эпителия протоков ПЖЖ. Значение этого пути убедительно не доказано. Отсутствует надежный маркер существования предшественников β-клеток, и в качестве суррогатного маркера часто используют процентное содержание образующих инсулин клеток протока. Обнаружено значительное увеличение числа таких клеток у грызунов после частичной резекции ПЖЖ, а также после длительной гипергликемии или лечения глюкагоноподобным пептидом-1 (GLP-1). Обнаружена совместная локализация β-клеток и экзокринных протоков в эмбриональной ткани человека и в препаратах ПЖЖ взрослых людей, страдающих и не страдающих СД. Несмотря на очевидную связь между протоковым эпителием и β-клетками этот феномен может быть связан только с эмбриональным развитием ПЖЖ, и что наблюдаемое увеличение числа инсулин-позитивных клеток в экзокринных протоках или вблизи них связано больше с увеличением массы β-клеток (без причинной связи с эпителием протока).

В то время как присутствие и скорость образования новых β-клеток из экзокринных протоков должно быть еще доказано, нет сомнения в том, что деление β-клеток продолжается в течение всей жизни. Однако частота репликации β-клеток в ПЖЖ взрослых людей очень низка, что затрудняет ее определение. Обнаружено, что у взрослых крыс в сутки делится только 0,07% β-клеток. Однако при использованной методике определения возможно подавление клеточной пролиферации.

Несмотря на низкую скорость деления β-клеток при нормальных условиях, при значительной потребности в инсулине она возрастает. У грызунов скорость деления β-клеток увеличивается в 5–10 раз после частичной резекции ПЖЖ, во время беременности, при хронической инфузии глюкозы и после лечения аналогами GLP-1. Это свидетельствует о значительной пластичности эндокринной части ПЖЖ у грызунов. У людей способность к репликации β-клеток значительно ниже, чем у грызунов, и в ПЖЖ взрослого человека можно обнаружить очень мало делящихся β-клеток (одна клетка примерно в 50 островках из примерно 100 β-клеток на каждом поперечном срезе). Встречается, однако, у людей и более высокая способность β-клеток к делению. Так, она увеличивается больше чем в 10 раз при наличии соседних с ПЖЖ опухолей, образующих гастрин, а также в ПЖЖ пациентов с начальной стадией СД1.

В ряде недавних исследований высказывается предположение о том, что β-клетки человека сохраняют некоторую способность к регенерации даже на очень поздних этапах жизни.

Инсулин-продуцирующие клетки, полученные из стволовых клеток, и островковые клетки, полученные из ПЖЖ донора, имеют некоторое сходство при трансплантации в рамках терапии СД1. Они дают надежду на адекватный контроль глюкозы крови, тем самым предотвращая развитие поздних осложнений СД, которых при применяемой в настоящее время лекарственной терапии практически невозможно избежать. Они могут быть трансплантированы аналогичным способом, т.е. введены в воротную вену. Они также сталкиваются с одними и теми же проблемами — такими, как иммунологические барьеры и рецидивы аутоиммунного процесса.

Тем не менее, лечение, основанное на пересадке стволовых клеток, существенно отличается от традиционной трансплантации островковых клеток ПЖЖ. Стволовые клетки обеспечивают теоретически неограниченный источник инсулин-продуцирующих клеток для трансплантации. Такие клетки, полученные из собственных стволовых клеток реципиента, не вызывают иммунологической несовместимости. Кроме того, стволовые клетки представляют прекрасную мишень для генной терапии.

Литература

1. Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. Современные аспекты трансплантации островков поджелудочной железы при сахарном диабете. // Сахарный диабет, 2004, № 2, 34–42.
2. Bonner-Weir S., Baxter L.A., Schuppin G.T., Smith F.E. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development // Diabetes. 1993; 42:1715–1720.
3. Bouwens L., Lu W.G., De Krijger R. Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. // Diabetologia. 1998; 40: 398–404.
4. BBouwens L., Pipeleers D.G. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. // Diabetologia. 1998; 41: 629–633.
5. Butler A.E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R.A., Butler P.C. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptpsis in humans with type 2 diabetes. // Diabetes 2003; 52: 102–110.
6. Chatenoud L. Chemical immunosuppresion in islet transplatantion – Friend or Foe? // Clinical Implication of Basic Research 2008; 358: 1192-1193.
7. Chen S., Turner S., Tsang E. et al. Measurement of pancreatic islet cell proliferation by heavy water labeling. // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007; 293: E1459–E1464.
8. Dor Y., Brown J., Martinez O.I., Melton D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. // Nature. 2004; 429: 41–46.
9. Haller M.J., Viener H.L., Wasserfall C. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. // Exp Hematol. 2008; 36: 710–715.
10. Hellerstrom C., Swenne I. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. // Diabetes. 1991; 40 Suppl 2: 89–93.
11. Kjos S.L., BuchananT.A. Gestational diabetes: risk or myth? // J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84: 1854–1857.
12. Lee D.D., Grossman E., Chang A.S. Cellular therapies for type 1 diabetes. // Horm Metab Res 2008; 40: 147–154.
13. L P., Liu F., Yan L. et al. Stem cell therapy for type 1 diabetes. // Diabetes Res Clin Pract 2007; 78; 1–7.
14. Meier J.J., Bhushan A., Butler A.E., Rizza R.A., Butler P.C. Sustained beta-cell appoptpsis in patient with long-staanding type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? // Diabetologia 2005; 48: 2221–2228.
15. Meier J.J., Bhushan A., Butler P.C. The potencial for stem cell therapy in diabetes. // Pediatr Res 2006; 59: 65R–73R.
16. Meier J.J., Butler A.E., Galasso R., Butler P.C. Hyperinsulinemic hypoglycemia after gastric bypass surgery is not accompanied by islet hyperplasia or increased beta-cell turnover. // Diabetes Care. 2006; 29: 1554–1559.
17. Meier J.J., Lin J.C., Butler A.E., Galasso R., Martines D.S., Butler P.C. Direct evidence of attemped beta cell regeneration in an 89-year old patient with resent onset type 1 diabetes. // Diabetologia 2006; 49: 1838–1844.
18. Peshavaria M., Larmie B.L., Lausier J. et al. Regulation of pancreatic beta-cell regeneration in the normoglycemic 60% partial-pancreatectomy mouse. // Diabetes. 2006; 55: 3289–3298.
19. Scaglia L., Cahill C.J., Finegood D.T., Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. // Endocrinology. 1997; 138: 1736–1741.
20. Shapiro A.M., Ricordi C. et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. // N Engl J Med. 2006; 355:1318–1330.