

Продолжение лекции 1.
Перспективы молекулярной
медицины (часть 2)

Профессор Мутовин Геннадий
Романович

Начало XXI века связано с внедрением в молекулярную медицину развитых стран новых бурно развивающихся технологий. Среди них: терапия генами, клеточная терапия, тканевая терапия (инженерия), нанобиотехнологии и наномедицина.

Терапия генами (генотерапия)

Эта область молекулярной медицины основана на исправлении дефектов наследственного материала путем введения в больную клетку молекул лекарства, что придает этой клетке не свойственные для нее ранее нормальные функции и предотвращает болезнь.

В роли лекарства выступает клонированный ген.

70-90 годы XX века были периодом экспериментального

применения методов генотерапии, на успех которых возлагались большие надежды. Однако, при работе с гаметами и зародышевыми клетками человека имеется высокий риск отрицательного воздействия на генотип индивида и генофонд в целом.

Вместе с тем именно тогда появилась так называемая *комплементационная генотерапия*, связанная с введением в организм полноценных генов. В США в 1990 году 4-летнему ребенку с ТКИД (мутация в гене АДА) ввели его же лимфоциты, в которых дефектный ген был заранее заменен на полноценный. Успех длился 6 месяцев и затем курс терапии повторялся.

К 1995 году было уже 10 больных с ТКИД, прошедших курс терапии геном АДА.

В дальнейшем такие попытки коснулись больных с глиобластомой, семейной гиперхолестеринемией, гемофилией В, муковисцидозом, миодистрофией Дюшенна-Бекера и др.

Были определены группы болезней для клинических испытаний методов комплементационной генотерапии: опухоли - 60% всех испытаний; моногенные болезни - 12%; сердечно-сосудистые болезни – 8%; инфекционные болезни (СПИД, гепатит В) – 6%.

Сначала рассмотрим генотерапию **инфекционных болезней**. Основной механизм этой терапии связан с блокировкой экспрессии гена-мишени, препятствующей размножению инфекционного агента. Здесь применяют 3 способа: избирательная продукция

целевого белка, воздействие генетическими вакцинами и патоген-специфическими лимфоцитами; генотерапия на основе свойств молекул нуклеиновых кислот.

Целью этих способов является **ингибирование сразу нескольких стадий клеточного цикла патогена.**

Методика предусматривает введение **антисенсов** в качестве инструмента регуляции экспрессии генов.

Антисенсы блокируют АТ- и ГЦ-пары на РНК или ДНК, приводя к утрате их способности к трансляции, или связываются с матричной цепью кодируемого гена, образуя триплетную спираль, препятствующую транскрипции.

Антисенсы можно синтезировать в соответствии со специфическими областями генома инфекта.

Генетическая вакцина - это самая маленькая структурная единица, сохранившая свойства и специфичность исходного антитела за счет оставшегося в ней участка связывания с антигеном.

Как сказано в первой части лекции, в биоинформатике определен алгоритм для создания антисенсов, который принципиально отличается от подхода, используемого при традиционной разработке лекарств. Этот алгоритм основан на известных последовательностях нуклеотидов для генов инфекционных агентов и генов человека, связанных с наследственными болезнями или опухолями, например, ген репликации вирусной ДНК (Е2-ген папиллома-вируса), ранние гены ЦМВ, гены белков: gag-ген ВИЧ.

Основные направления генотерапии:

1. Генные технологии в иммунотерапии. Основаны на ДНК-вакцинах, обеспечивающих высокий уровень защиты, длительно сохраняющих напряженность и видоспецифичность иммунного ответа, имеющих минимальный побочный эффект.

2. Генетическое конструирование цитотоксических Т-лимфоцитов на основе собственных иммунных клеток (CD4, CD8, CD34) и антиген-презентирующих клеток, инфицированных патогеном для восстановления иммунной системы, например, при ВИЧ или вирусе простого герпеса (HSV).

3. Тканеспецифическая генотерапия. Применяется при несистемных локализованных болезнях. Основана на

способности вируса к тканевому тропизму, например, вирус простого герпеса избирательно проникает в нейроны и латентно в них сохраняется много лет.

Применяется для лечения болезни Паркинсона, хореи Гентингтона, мукополисахаридоза VII типа (болезнь Слая) и злокачественной глиомы.

4. Суицидные гены. Созданы для синтеза токсических белков против инфицированных клеток. Например, ген, экспрессирующий А-цепь дифтерийного токсина (DT-A), гены цитозиндезаминазы и HSV-имидинкиназы (последний ген вызывает апоптоз, если клетка «лечится» *ганцикловиром* при раке простаты).

5. Генотерапия опухолей. Ряд опухолей вызывается вирусами. Поэтому здесь используются те же подходы, что и в генотерапии инфекционных болезней. Например,

антиген-презентирующие клетки можно применять как **трансфицированные векторами клетки** для борьбы с метастазами при несформировавшихся узлах и даже при единичных опухолевых клетках.

6. Генотерапия наследственных болезней. Результаты в целом здесь мало эффективны, но другой альтернативы нет.

7. Генотерапия в трансплантологии направлена на предупреждение острого и хронического воспаления и отторжения трансплантата. Перспективные гены: протоонкоген c-myc, гены MNC-1, гены цитокиновых иммуносупрессоров, гены блокаторов сигналов (CTLA 41q; CTLA-4), гены против хронического отторжения

трансплантата (гены клеточной адгезии 1, ген синтазы 2, ген c-myb).

Клеточные технологии

Использование для лечения клеток, выделенных из тканей и органов - это **регенераторная медицина**.

В ней 2 направления: клеточная терапия (инженерия) и тканевая терапия (инженерия).

Клеточная терапия - это выделение определенных типов клеток, придание им *in vitro* специфических свойств (с помощью генетических конструкций и ряда сигнальных молекул) с последующим их введением в организм *in vivo*.

Эта терапия базируется на введении в клетку нормального гена или удалении из нее дефектного гена. В результате происходит восстановление функции или добавление новых функции с регуляцией активности других генов.

Эти манипуляции осуществляются с помощью методов молекулярной биологии, использующих физическое воздействие на генетический материал. Главными инструментами являются: **стволовые клетки и дендритные клетки** (для модуляции иммунного статуса). В качестве мишеней в 40% случаев применяют самоподдерживающиеся гемопоэтические стволовые клетки. Они выделяются из периферической крови и костного мозга взрослых лиц или из пуповинной крови новорождённых.

Эти клетки легко идентифицируются и хорошо сохраняются. Их 2 типа: эмбриональные стволовые (ЭСК) и собственно стволовые (ССК). У них имеются как преимущества, так и недостатки.

Первые клетки – это, с одной стороны, возможность бесконечной пролиферации симметричным делением, выраженная клоногенность, плюрипотентность.

С другой стороны, это иммунологическая несовместимость при пересадке реципиенту, неполное соответствие условий дифференцировки *in vivo* и *in vitro*, невозможность обнаружения дефектов до пересадки реципиенту, отсутствие эффективности и безопасности применения, этические и другие проблемы.

Вторые клетки , с одной стороны, это пластичность и способность поддерживать дифференцировку клеток в тканях взрослого организма в течение всей жизни. Для них нет проблем иммунологического отторжения (это клетки самого пациента), они не дают тератом и не связаны с этическими проблемами.

С другой стороны, это слабая пролиферация, асимметричное деление, малочисленность популяции в тканях, ограниченная способность к росту в культуре, отсутствие стандартных методов длительного поддержания и преобразования в зрелые клетки других тканей, отсутствие надежных маркеров идентификации.

В свою очередь **дендритные клетки** (DCs) обладают уникальной способностью представлять антигены наивным Т-лимфоцитам и участвовать в определении

направления иммунных реакций при опухолях, инфекциях и аутоиммунной патологии. Они служат векторами и мишенями для изменения иммунного статуса организма.

Выделен ряд популяций DCs, изучена их морфология, экспрессия в них молекулярных маркеров и функции. Описаны методики выделения DCs из селезенки, миндалин, кожи, печени и периферической крови. Они способны мигрировать через ткани в опухоль, где захватывают специфические антигены, переваривают их и реэкспрессируют для эффективной индукции клеточно-опосредованного иммунного ответа.

Дендритные клетки применяют у некурабельных больных с множественными метастазами и неэффективностью традиционных методов терапии.

Формы опухолей: меланома, В-клеточная лимфома, раки простаты, молочной железы, яичника, толстой кишки, легких, поджелудочной железы, почечно-клеточный рак,

Имеются данные о широком применении вакцин на основе DCs –клеток при опухолях ЦНС.

Тканевая терапия

Является инструментом экзогенного управления молекулярными процессами в клетках и тканях (тонкие механизмы дифференцировки, пролиферации и функционирования).

История вопроса. Сначала в медицине появились возможности для понимания механизмов регуляции метаболизма внеклеточного матрикса, учитывающие

особенности межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий и их роль в поддержании гомеостаза клеток и целостности тканей. Все это послужило основой для разработки **комплексных клеточных биоматриксных систем вне организма**, или так называемых **тканевых эквивалентов**.

Параллельное развитие биотехнологии, химии полимеров и применение инженерных принципов по отношению к тканевым эквивалентам позволило сконструировать **трехмерные функциональные анатомические единицы**, обусловившие развитие тканевой терапии, направленной на замену пораженных тканей и органов. Такая ткань восстанавливает, поддерживает и улучшает их функции. При этом она

хорошо интегрируется в организм, осуществляя в нем постоянное лечение. Например, так осуществляется пересадка компонентов кожи при лечении ожогов, когда вводятся кожные эквиваленты (путем добавления культивированных фибробластов дермы в трехмерный коллагеновый гель), восстанавливающие эпителиально-стромальные дефекты

Эта **основная модель** используется в биологии, фармакологии (доклиническая апробация лекарств), косметологии (апробация косметических средств), дерматологии (инфекционно-аллергические заболевания кожи), токсикологии, хирургии, травматологии (заживление ран и трансплантация кожи), офтальмологии (реконструкция роговицы глаза для восстановления специализированного покрова).

Вторая модель - это имплантация клеток, содержащих вещества, индуцирующие репарацию и восстановление функции поврежденной ткани. Модель основана на технике выделения клеток, добавлении к ним сигнальных молекул, подобных факторам роста, и переносе этих клеток в биоматериалы для регенерации тканей, например, стимуляторы роста костной ткани при болезнях периодонта в стоматологии.

Третья модель – это использование внутреннего потенциала поврежденных тканей и органов для восстановления собственных функций. Модель основана на технике выделения стволовых клеток, имплантируемых пациенту непосредственно в суспензии, в структурном матриксе или после их преобразования *in vitro*.

Нанотехнологии и нанобъекты

Нанотехнологии оперируют с объектами нанометрового размера («нано» - происходит от греческого «гнон», или «карлик»). При чем переход технологий от «микро» к «нано» - это совсем не количественный, а именно качественный переход: от манипуляции отдельным веществом до манипуляции его отдельными молекулами и атомами.

Нанобъекты (наноматериалы) имеют нанометровые размеры (в пределах от микро- до ультра: 10^{-3} до 10^{-18} метра); 1 нанометр (нм) равен 10^{-9} метра. *Атомолярный уровень* начинается от 10^{-18} .

Среди наноматериалов: нанокompозиты, нанотрубки, надмолекулярные ансамбли и конструкции, пористые

материалы, мицеллярные системы и микроэмульсии, тонкие пленки и поверхностные слои, биологические мембраны, жидкие кристаллы, фотонные кристаллы, фуллерены, липосомы и др.

Применение нанотехнологий и наноматериалов – это новые возможности в электронике, химической промышленности, энергетике, биологии, медицине, сельском хозяйстве и других отраслях.

Нанобиотехнологии и наномедицина

Это новое направление, анализирующее живые системы на молекулярном уровне с помощью наноматериалов и наночастиц. Благодаря своим *супермикроскопическим размерам*, наночастицы приобретают **новые физико-химические свойства и функции**, отличающиеся от тех, которыми обладают

микрочастицы и составляющие их молекулы и атомы большего размера.

Нанобиотехнологии - это слежение, исправление, конструирование и контроль за управлением биологическими системами человека с помощью упомянутых микрочастиц, или специальных микроустройств, которые обладают большим терапевтическим эффектом, способны выполнять разные операции, начиная от диагностики и мониторинга, и кончая уничтожением патогенных микроорганизмов.

Эти микроустройства эффективно восстанавливают поврежденные клетки, ткани и органы, их снабжение необходимыми веществами и имеют другие функции.

Наномедицина - это разработка и внедрение нанобиотехнологий в медицину для диагностики и лечения болезней. При этом используются атомно-силовые, оптико-биосенсорные, нанопроводные и нанопоровые подходы, позволяющие улучшить чувствительность и значительно сократить время диагностики разных заболеваний.

Основные направления развития нанобиотехнологий и наномедицины:

- создание нанодиагностикумов и нанобиосенсоров;
- создание молекулярных нанополупроводниковых детекторов, счетчиков молекул и анализаторов ДНК;
- использование наночастиц в качестве контейнеров для доставки лекарств;

- использование наночастиц как лекарств;
- синтетический геном на основе молекулы ДНК как самовоспроизводящейся системы;
- нанобиотехнологии для регенерации тканей;
- медицинские нанороботы, имитирующие функции разных клеток.

Нанодиагностикумы и биосенсоры

Существующий в биохимии концентрационный барьер для выделения белковых молекул в биологическом материале составляет 10^{-12} . Современные методы радиоиммунного анализа (РИА) и иммуноферментного анализа (ИФА) имеют чуть большую чувствительность: 10^{-12} - 10^{-15} .

Дальнейшее развитие протеомики определяется разработкой и внедрением методов в диапазоне концентраций от 10^{-3} до 10^{-20} , т.е. на атомолярном уровне. Именно такая чувствительность должна достигаться в многокомпонентном биологическом материале, содержащем сотни тысяч разных типов белков и при этом найти надо одну молекулу (например, ракового белка).

Использование нанотехнологий при применении электрофоретического и хроматографического методов разделения позволяет снизить объем анализируемого материала на несколько порядков и существенно сократить время для анализа. Так, с помощью наноэлектрофореза разделение сложной

смеси на 20 белков с массой 10-100 кДа проводится всего за 15 секунд против нескольких часов при традиционном 2D-электрофорезе.

Широко известны оптические биосенсоры на базе нанотехнологических устройств. Они используют **эффекты поверхностного плазменного резонанса и резонансного зеркала** (акустические биосенсоры), позволяющие за несколько секунд регистрировать в реальном времени образование комплексов макромолекул с чувствительностью (до 10^{-12}).

Молекулярные детекторы

Если имеющиеся сегодня детекторы имеют предел чувствительности до 10^{-12} - 10^{-15} , то молекулярные детекторы могут обнаружить и идентифицировать

даже отдельные молекулы и их комплексы. Среди них: атомносиловые и другие сканирующие микроскопы, криомасс-детекторы, нанопроводные и нанопоровые детекторы, помощью которых можно получить большой объем диагностической молекулярной информации о клетке. При этом единичные молекулы служат **«локальными репортерами»** микроокружения клетки, что важно для анализа гетерогенных систем и конформационных состояний, связанных со сборкой, ферментативной активностью. Так, с помощью волноводной техники уже наблюдают ДНК-полимеразную активность одной молекулы. В этих целях применяют **методы сканирующей микроскопии** (ближнее или дальнее полевое сканирование).

Например, применение широкопольной микроскопии с полным внутренним отражением позволило наблюдать реакцию каталитического расщепления АТФ одиночной молекулой миозина и ее прохождение через единичный трансмембранный канал.

Новые наноматериалы активно применяются для повышения эффективности имеющихся и создания новейших лекарств, включая фуллерены - новый тип аллотропной формы углерода $C(60)$ с одинаковой длиной двойных и одинарных бензольных связей. Доказано, что они восстанавливают повреждения в клетках в результате окислительных процессов, ингибируют апоптоз, взаимодействуя с радикалами кислорода в биологических мембранах.

Они способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, что позволяет использовать их для лечения тяжелых нейро-дегенеративных заболеваний, например, болезни Паркинсона.

Такие лекарства, снабженные системами доставки, имеют ряд преимуществ в сравнении с обычными лекарствами. Они нетоксичны, биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, имеют высокое сродство к мембранам. Для этого применяются, как правило, коллоидные инертные транспортные системы. Это также противоопухолевые препараты, снабженные фосфолипидной системой транспорта (мицеллы, липосомы).

Кроме того, современный путь к наномедицине указывает на необходимость создания и применения **медицинских нанороботов**, которые будут выполнять «ремонт» и уничтожение поврежденных клеток на молекулярном уровне. Например, это аналоги клеток крови : эритроциты, фагоциты, респироциты и др. Вместе с тем, современная молекулярная медицина не умаляет процедуру врачебного осмотра пациента. Именно врач, а не молекулярный биолог, биохимик, физиолог или другой специалист по лабораторной диагностике, является ее **главной фигурой!**