

Инсулин-зависимый сахарный диабет: возможности генной терапии

Т. Г. Титок

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

В обзоре изложены разрабатываемые в настоящее время генно-инженерные подходы к лечению инсулин-зависимого сахарного диабета (ИЗСД). Освещены исследования, направленные на обеспечение синтеза инсулина de novo в неспецифических клетках за счет переноса в них гена инсулина для замещения разрушенных β -клеток поджелудочной железы. Анализируются поиск клеток-мишеней и пути придания им необходимых качеств: чувствительности к глюкозе и способности к продукции функционально зрелого белка in vivo. Рассмотрена также возможность лечения ИЗСД с помощью переноса генов некоторых цитокинов Т-лимфоцитам-хелперам (Тх), что ведет к изменению субпопуляционного соотношения Т-клеточного состава лимфоцитов. Тем самым можно прервать или сбалансировать специфический иммунный процесс разрушения островковых β -клеток поджелудочной железы, лежащий в основе патогенеза диабета I типа.

Введение. Инсулин-зависимый сахарный диабет (ИЗСД) — заболевание, для которого до сих пор нет иного способа лечения, кроме инсулинотерапии. Однако лечение экзогенным инсулином не является безупречным, при нем часто отсутствует гликемический контроль в физиологических пределах, как это обеспечивается естественным путем β -клетками поджелудочной железы. Подобрать адекватную дозу, соответствующую степени дефицита эндогенного гормона у больного не всегда удается. В основном доза экзогенного инсулина определяется показаниями гликемии и длительностью заболевания. Другие факторы, влияющие на индивидуальный уровень гормона, участь проблематично из-за их постоянных колебаний. В результате часто возникают тяжелые осложнения и декомпенсации (гипогликемия, ацидоз, нефропатия и другие).

Известны попытки введения инсулина альтернативными методами — трансплантацией поджелудочной железы либо выделенных из нее островков [1]. Тем не менее, надежды на восстановление секреции инсулина таким путем не оправдались из-за иммунного отторжения, ограничения донор-

ского материала и непродолжительного периода их действия.

Принципиально новую технологию лечения ИЗСД предполагает генная инженерия и, в частности, генная терапия. Стратегия генной терапии развивается параллельно в двух направлениях. Первое — предполагает замену разрушенных β -клеток больного другими инсулинпродуцирующими клетками, полученными в результате трансформации их геном инсулина вне организма (*ex vivo*) [1, 2]. Второе — перенос инсулинового гена непосредственно в организм больного (*in vivo*) [3].

Важным моментом в осуществлении генной терапии является целенаправленная доставка генетических конструкций с геном инсулина в культивируемые клетки или ткани организма с обеспечением экспрессии трансгена. Первыми кандидатами на роль таких векторов стали ретровирусы, используемые до сих пор для переноса трансгена и *ex vivo*, и *in vivo*. В ретровирусных векторах последовательность, кодирующая структурные вирусные белки, замещается на вводимую ДНК-последовательность. Переносимый структурный ген фланкируется *cis*-действующими последовательностями, существенными для его транскрипции и интеграции в геномную ДНК больного. Такая ретровирусная векторная система может переносить 7—8 тыс. п. н.

экзогенного материала. Дефектные ретровирусные векторы способны обеспечить стабильную экспрессию и последовательность транскрипции в направлении трансгена [4, 5]. Недостатком ретровирусных векторных систем, особенно в случае *in vivo*, является необходимость наличия пролиферирующих клеток-мишеней и непредсказуемое сайн-встраивание их в геноме клетки.

В качестве вектора можно использовать аденовирусы. С их помощью генетический материал, встроенный между E-1 и E-3 областями, переносится в нереплицирующиеся клетки. Привнесенная информация в большинстве случаев не интегрирует в геном трансформированной клетки, а остается в ней в форме эписомы, поэтому не представляет риска изменения ее генома. Однако эписомное положение экзогена ограничивает продолжительность его экспрессии. Следовательно, периодически эти векторы должны восполняться *in vivo*. Кроме того, аденовирусные векторы могут вызывать иммунный ответ против векторных антигенов. Поэтому создаются комбинированные системы трансфекции, совмещающие преимущества вирусных векторов и невирусных носителей, таких как липосомы, катионные липидные комплексы, предназначенные обеспечить адресную доставку, строго направленную транскрипцию, экспрессию и регуляцию привнесенного экзогена [6, 7].

Совершенствование технологии переноса генов, а также достижения в изучении молекулярных и биохимических факторов регуляции биосинтеза и секреции инсулина β -клетками здоровой поджелудочной железы послужили обнадеживающей предпосылкой заместительной генной терапии ИЗСД.

Создание инсулин-продуцирующих клеточных линий, предназначенных для коррекции ИЗСД. Трансфицированные геном инсулина клетки могут стать альтернативой β -клеткам, если будут обладать рядом необходимых свойств: способностью к процессингу проинсулина в инсулин и глюкозо-стимулированной секреции инсулина, стабильностью генома и иммунологической толерантностью.

Прежде всего, предлагали использовать аутологичные клетки, чтобы избежать их иммунологической деструкции. Полученные от больного клетки (печени, кожи, мышц) после трансформации их *in vitro* должны возвращаться к нему обратно. К сожалению, технически трансформировать первичную культуру, в отличие от клеточных линий, довольно трудно. Она более требовательна и при культивировании часто теряет свою специфику. Для этого были испытаны многие типы клеточных культур. В первую очередь, нейроэндокринные

клетки, которым характерны секреторная функция и наличие протеаз, осуществляющих процессинг синтезируемых прогормонов. Испытание созданных трансформированных геном *ins* нейроэндокринных клеточных линий выявило, что большинство из них синтезировали и выделяли инсулин, но стимуляция его секреции осуществлялась не глюкозой, а другими секретогенами и опосредовалась Ca^{+2} -деполяризацией клеточной мембраны. Максимальную секрецию инсулина в них наблюдали при субфизиологических концентрациях глюкозы. Происходило это в результате того, что преобладающими фосфорилирующими ферментами в таких клетках были гексокиназы I—II типа с аффинностью к глюкозе в пределах концентрации 0,2—1,2 мМ и с чувствительностью к другим секретогенам. Напротив, в β -клетках поджелудочной железы основным стимулятором секреции инсулина является глюкоза, действие которой осуществляется через фосфорилирование ее глюкокиназой (ГК — гексокиназой IV типа), аффинность которой находится в пределах 4,5—12 мМ. Поэтому такие нейроэндокринные клетки не могли обеспечить физиологически необходимый организму уровень инсулина. К тому же наряду с инсулином в них часто происходила косекреция собственных клеточных гормонов (например, в линии AtT-20ins — адренокортикотропного гормона), являющихся антагонистами действия инсулина [8, 9].

Логической альтернативой β -клеткам было получение инсулиномных клеточных линий. Такие клетки сохраняют способность к процессингу проинсулина и элементы чувствительности к глюкозе. В ходе исследований оказалось, что инсулиномные клетки большинства созданных и трансформированных линий в процессе культивирования теряли основное свойство — реагировать на глюкозу в физиологических пределах. Часто в клетках инсулиномных линий экспрессировался высокоаффинный к глюкозе ее транспортер GLUT-1, а не GLUT-2, и снижалась активность ГК, являющихся основными стимуляторами запуска синтеза и секреции инсулина в β -клетках поджелудочной железы [10]. Дополнительная постадийная трансформация инсулиномных клеток кДНК генов *GLUT-2* и *GK* вела к восстановлению чувствительности их к глюкозе, но через несколько пассажей *in vitro* их чувствительность снова снижалась, поскольку в клетках изменялось соотношение *GK*/гексокиназы_{I-II} и секреция инсулина происходила при субфизиологических концентрациях глюкозы. При переносе инсулиномных клеток, трансформированных генами *GLUT-2* и *GK in vivo*, через непродолжительное время чувствительность их к глюкозе также зату-

хала. К тому же при использовании таких клеток необходимо строго контролировать их пролиферацию во избежание образования опухолей [2, 10, 11].

Исследования проводили и с другими соматическими клетками: гепатомами, фибробластами [12], эпителиальными клетками почек [13, 14]. Эти клетки не имеют ни глюкозорегулируемых путей, ни механизмов превращения инсулина в проинсулин. Поэтому их подвергали поэтапной трансформации соответствующими генами для приобретения этих свойств.

Особые надежды возлагались на гепатоциты, поскольку они имеют такой же глюкозочувствительный аппарат, как и β -клетки поджелудочной железы, и содержат фурины — протеазы, родственные протеазам PC-2 и PC-3 β -клеток, осуществляющие процессинг проинсулина в них. Фурины — это трансмембранные белки, находящиеся в транспортной сети Гольджи, расщепляющие мембранно-белковые предшественники многих ростовых факторов и гликопротеинов. Они специфически узнают последовательности Arg-Arg и Arg-Lys в белковой молекуле. При помощи сайт-направленного мутагенеза в проинсулиновой кДНК, используемой для трансформации клеток, сайты действия протеаз PC-2 и PC-3, выщепляющие с-пептид из проинсулина, были предварительно заменены сайтами действия фурина [15—17]. Клетки, трансформированные такой модифицированной кДНК (с сайтами для фуринов) гена инсулина, секретировали процессированный инсулин, и его количество коррелировало с уровнем фурина [13, 17].

В результате проведенных исследований получены несомненно важные данные о регуляции молекулярных и биологических механизмов синтеза и секреции инсулина, о взаимосвязи этих процессов с метаболизмом глюкозы в клетке. Целенаправленная поэтапная трансформация клеток для приспособления их к глюкозорегулируемой секреции инсулина довольно сложна и проблематична. К тому же уровень инсулина в циркулирующей крови будет определяться количеством трансформированных выживших клеток, секретирующих инсулин. Остается еще много невыясненных моментов, из которых самым важным является вопрос о регулируемом синтезе инсулина и его синхронной секреции, отвечающей требованиям организма. Поиски наиболее подходящих клеток-мишеней продолжаются.

В частности, в последнее время изучены клетки желудочно-кишечного тракта [18]. Из них выделены эндокринные клетки К, экспрессирующие глюкозозависимый инсулиноподобный полипептид

(GIP). Установлено, что в здоровом организме кинетика секреции полипептида GIP параллельна кинетике выделения инсулина β -клетками и функционирует он в качестве усилителя секреции инсулина после приема пищи. Хотя полностью механизм действия этого полипептида еще не изучен, важным является то, что секреция его клетками К глюкозозависима, и к тому же именно глюкокиназа выполняет роль глюкозного сенсора, как и в клетках поджелудочной железы. Показана [18] возможность использования промотора гена *GIP* для осуществления эктопической экспрессии гена *ins* человека, причем такая экспрессия оказалась клеточно-специфичной. Только в трансформированных кДНК *GIP/ins* клетках линии GTC-1 (интестинальные клетки мыши) наблюдали глюкозозависимый корректный синтез экзогена *GIP/ins* в отличие от других типов клеток (INS-1, HepG2, 3T3-11 и др.) Авторы предположили, что выявленные эндокринные К-клетки можно будет использовать для генной терапии ИЗСД.

Введение рекомбинантных конструкций с геном препроинсулина непосредственно в организм (*in vivo*). Способ переноса гена проинсулина непосредственно в организм разрабатывался параллельно с методом опосредованного переноса его через соматические трансформированные *ex vivo* клетки. Впервые авторы [3] получили экспрессию экзогена в печени крыс на протяжении трех недель. Крысину кДНК *insI*-гена под контролем терминальных повторов вируса Молони в составе плазмиды *LX/2INS* вводили крысам в порталную вену. За сутки до введения таким крысам была проведена гепатэктомия для создания в печени очага пролиферации, необходимой для включения в геном гепатоцитов вводимой ретровирусной конструкции [5]. Результат, прежде всего, показал, что в печени происходит синтез проинсулина *de novo* и поступление его в кровеносное русло. Эктопическая экспрессия инсулинового гена защищала животных от диабета, вызываемого у этих крыс введением им высокой дозы стрептозотоцина (СТЦ), специфически разрушающего β -клетки поджелудочной железы. В контрольной группе все животные погибли в течение 6 дней после введения СТЦ, тогда как крысы с экспрессируемым трансгеном жили 21 день. Количество иммунореактивного инсулина в их кровяном русле было в 5 раз больше, чем у здоровых, что свидетельствовало о конститутивном синтезе его *de novo*, вызывающем гиперинсулинемию. У таких крыс не выявили накопления триглицеридов, отсутствовал и кетоацидоз — признаки, сопровождающие ИЗСД. Но гипергликемия сохранилась [3].

Аналогичные исследования проведены в работе [19] на мышах. Для переноса крысиного гена *insI* авторы использовали дефектный аденоассоциированный вирус AAV-Ins. Вводили его непосредственно в паренхиму печени мышам, у которых предварительно был спровоцирован СТЦ-диабет. Привнесенный ген экспрессировался в гепатоцитах, что было подтверждено инсулин-специфической RT-PCR и иммуноцитохимическими методами. Однако нормализации гипергликемии не происходило, хотя в течение 6 сут после инъекции гена уровень глюкозы в крови таких мышей был ниже, чем у животных из контрольной группы, которым вводили вектор без инсулинового гена.

Местом введения гена инсулина печень выбрана неслучайно. Именно она утилизирует избыточное количество глюкозы, поглощая ее из кровотока и запаса в виде гликогена, или, напротив, при недостатке глюкозы в кровотоке производит ее в соответствии с потребностями организма, поддерживая ее гомеостаз. При ИЗСД в результате нарушения гормонального соотношения инсулин/глюкагон поглощение глюкозы печенью снижается, глюконеогенез, напротив, усиливается, что ведет к гипергликемии. Для нормализации этих процессов необходима активация генов гликолитического пути в печени, осуществляемая инсулином [20].

Здесь уместно привести данные авторов [21] о достигнутой ими частично регулируемой экспрессии *ins*-гена в печени трансгенных мышей. Хотя использование трансгенных животных не может быть методическим подходом к лечению ИЗСД, но они служат прекрасной моделью для выяснения решения многих важных вопросов функционирования чужеродного гена (в данном случае *ins*-гена) в естественных условиях *in vivo*. Для регуляции синтеза инсулина в печени в работе [21] сконструировали химерный *ins*-ген человека, включив в его кДНК дополнительный промотор фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK) — фермента, участвующего в гликолизе и глюконеогенезе, чтобы сделать регуляцию трансгена подобной регуляции эндогенного гена *PEPCK*. Получены трансгенные мыши, экспрессирующие этот химерный ген в печени. Затем у таких мышей индуцировали ИЗСД при помощи СТЦ и определяли активность экзогена и ключевых ферментов метаболизма глюкозы в печени (глюкокиназы — GK и L-пируваткиназы — L-PK). Выявлено, что у больных мышей *ins*-ген человека не только экспрессировался, что подтверждалось наличием *ins* мРНК, но и синтезируемый им продукт был физиологически активен. В их печени в значительной степени восстанавливался метаболизм глюкозы — гликолиз (через активацию

GK) и гликогенолиз в сравнении с больными мышами, не имевшими *ins*-трансгена. В крови больных диабетом трансгеников выявлено также повышенное количество человеческого с-пептида, однако гипергликемия полностью не нормализовалась. Она снижалась частично, вероятно, как полагают исследователи, из-за отсутствия процессинга проинсулина, обладающего меньшей физиологической активностью, чем инсулин [21, 22].

Группа авторов [23] для выяснения возможности регулирования экспрессии экзогена использовала также химерный (с сайтами для фуринов) *ins*-ген человека с дополнительным промотором гена *L-PK* — фермента гликолитического пути в печени. С помощью такой кДНК-L-PK/INSm конструкции получены трансгенные мыши, несущие трансген в печени. Авторы показали, что у этих мышей экспрессия привнесенного экзогена могла регулироваться метаболически. При усиленной углеводной диете происходила активация продукции инсулина, при голодании — ее угнетение. Осуществлялась и процессинг проинсулина, о чем свидетельствовала высокая концентрация человеческого с-пептида в крови трансгенных мышей. Но несмотря на высокий уровень инсулина, гипогликемии не наблюдали, так как инсулин быстро выводился с мочой [23].

Для обеспечения регулируемой экспрессии инсулинового трансгена в работе [24] целенаправленно для печени создали аденовирусный вектор, состоящий из мутантного *ins*-гена человека (включены последовательности воздействия фуринов), глюкозочувствительного комплекса GIRE промотора *L-PK*-гена и инсулин-репрессорирующего элемента промотора гена *IGFPB-1 — Ad/(GIRE)3PB-12xfur*. Известно, что ген *IGFPB-1* гепатоцитов синтезирует одноименный белок (специфический челнок), предназначенный для связывания и транспортировки инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) из печени в кровь и из нее в ткани. Характерным для гена *IGFPB-1* является сходство его регуляции с регуляцией гена *PEPCK*-фермента, регулирующего скорость глюконеогенеза, а также зависимость его экспрессии от кормления [25, 26]. После введения такого сложного трансгена в печень крысам, больным СТЦ-диабетом, наблюдали значительное падение уровня гипергликемии. Концентрацию глюкозы в крови поддерживали на уровнях, близких к норме, даже в периоды 10-ч голоданий, что свидетельствовало о происходящих физиологических процессах глюконеогенеза в печени. Не зарегистрировано также случаев летальной гипогликемии среди таких крыс в течение 12 недель, в отличие от больных контрольных, кото-

рым не вводили трансгена. К тому же после такого генного лечения крысы прибавляли в массе [24].

Анализ полученных результатов лечения ИЗСД путем введения *ins*-экзогена *in vivo* показал, что заметный положительный эффект наблюдался, в основном, в печени на уровне процессов глюконеогенеза и кетогенеза [19, 21—24]. Это вело к улучшению состояния больных животных за счет снижения образования триглицеридов и кетоновых тел и тем самым снимало диабетический кетоацидоз и нормализовало рН крови, что важно для инсулино-рецепторного взаимодействия [27]. Концентрация глюкозы в крови животных, экспрессирующих *ins*-трансген в печени, полностью не нормализовалась. Она снижалась до уровней, близких к норме, на какой-то период, затем либо падала до гипогликемии [19], либо возвращалась на исходные уровни [3, 24]. Такие результаты эктопической экспрессии инсулинового гена, по-видимому, зависели не только от вектора, определяющего количество и качество продукта (количество трансдуцированных гепатоцитов, копийности его в клетке), но и каких-то других причин. Например, для поддержания глюкозного гомеостаза в организме необходима синхронность секреции инсулина с его потребностью в кровотоке. Достичь такой синхронности при экспрессии *ins*-гена в печени чрезвычайно трудно по нескольким причинам. Известно, что основная часть (до 60 %) эндогенного инсулина метаболизируется в печени и только небольшая часть его поступает в кровоток [28]. С другой стороны, показано [22], что физиологические возможности проинсулина отличаются от таковых инсулина. В печени репрессирующее действие проинсулина на гликогенолиз и глюконеогенез аналогично инсулину в равной ему концентрации. Для поглощения печенью глюкозы и запуска гликолиза в кровотоке требуется в 8—10 раз больше проинсулина, чем инсулина. Объясняется это снижением аффинности проинсулина к инсулиновым рецепторам [22, 27].

Сравнительно недавно внимание исследователей привлекли гормональные пептиды энтероинсулярной оси, являющиеся трансактиваторами *ins*-гена в здоровом организме [29—31]. Известно несколько таких пептидов и одним из них является GIP, экспрессируемый К-клетками, охарактеризованными выше. Установлено, что экспрессия GIP не только глюкозозависима, но и происходит исключительно в ответ на поступление пищи в желудок. Важно, что экспрессия GIP тканеспецифична и устойчива к цитокинам и свободным радикалам — звеньям, причастным к разрушению β -клеток при ИЗСД [32, 33]. Кинетика секреции GIP

аналогична таковой инсулина. Исходя из этих предпосылок, исследователи предположили [29], что промотор GIP может быть хорошим кандидатом для осуществления эктопической экспрессии *ins*-гена. Первый результат [18, 29] подтвердил это предположение. У трансгенных мышей, несущих *ins*-ген человека под контролем промотора гена GIP, сохранялась масса и гликемический гомеостаз даже после глюкозной нагрузки — после индукции у них СТЦ-диабета, в отличие от обычных мышей без трансгена, быстро погибающих от индуцированного ИЗСД [29].

Авторы [18] считают, что технология переноса инсулинового гена в эпителиальные клетки желудка и двенадцатиперстной кишки больным ИЗСД не представляет большой сложности. Эта область легко доступна *per os* или с помощью эндоскопии. Кишечному эпителию характерно наличие большого количества стволовых, пролиферирующих клеток, что позволяет применять ретровирусные векторы, разрабатываемые в настоящее время.

ИЗСД — сложное, полигенное, многоуровневое заболевание и, по-видимому, поиск одного пути лечения, направленного на восполнение недостающего в организме инсулина, будет недостаточным. Диабет I типа — аутоиммунное заболевание, поэтому разрабатываются, с одной стороны, возможные кандидаты на аутоантигены и, с другой, — лечение диабета генно-инженерным способом, основанное на прерывании процесса иммунного разрушения β -клеток поджелудочной железы.

Результаты раннего (с рождения и до 5 лет) 100 %-го выявления антител к инсулину у детей, заболевших ИЗСД [28, 34], и зависимость титра этих антител от степени деструкции β -клеток позволили предположить потерю такими пациентами толерантности к гормону. Это предположение нашло свое подтверждение в последующих исследованиях [35—37].

Так, показано, что в человеческом тимусе в плодный и ранний постнатальный периоды развития экспрессируется *ins*-ген. Полагают, что такая экспрессия гена является механизмом, определяющим толерантность к транслируемому продукту посредством селекции и утери аутореактивных или регуляторных Т-лимфоцитов к собственному тканеспецифичному белку [38]. К тому же выявлено, что генетическая предрасположенность к ИЗСД связана не только с локусом главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), но и локусом, расположенным со стороны 5'-конца гена *ins* человека. Этот локус представляет собой полиморфную область tandemных повторов из 14—15 нуклеотидов (variable member of tandem repeats — VNTR), кото-

рая связана с возникновением ИЗСД через регуляцию транскрипции *insD*-гена. Выявлена аллельная варибельность количества таких повторов трех классов. Уровень транскрипции и количество транслируемого продукта гена инсулина в тимусе плода, который не процессируется у гомо- и гетерозигот *insVNTR*, различны, что в неодинаковой степени влияет на селекцию Т-лимфоцитов в тимусе и развитие их толерантности к проинсулину [36—39]. Аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (GAD), тирозинфосфатазе (IA-2) и др. появляются позже, после манифестации диабета у больных, и не одновременно, а последовательно [28, 34]. Поэтому считают, что проинсулин является ключевым аутоантигеном, запускающим разрушение β -клеток [37, 38, 40] в результате потери толерантности к нему.

Для проверки такого предположения в работе [40] использовали возможности генно-инженерного подхода. Были получены трансгенные линии мышей NOD (с естественным спонтанным диабетом) с геном *ins* под контролем промотора гена *IE α ^k* — антигена II класса ГКГС, для целенаправленной презентации экспрессируемого продукта иммунокомпетентным клеткам. Такой подход предпринят исследователями для устранения аутореактивных к проинсулину клеток в период эмбрионального развития, чтобы вызвать толерантность к нему. Действительно, только в тимусе и селезенке плодов была выявлена мРНК проинсулина и подтвержден синтез гормона *in vitro* этими клетками. Результат действия трансгена был специфично защитным для островковой патологии. У таких трансгенных мышей (в отличие от обычных мышей NOD) отсутствовали инсулиты и не развивался спонтанный диабет. К тому же эффект циклофосамида, который у обычных мышей линии NOD ускоряет и усиливает заболевание, у трансгенных не наблюдался. Другие функции Т-клеток и общий иммунный ответ у них при этом не изменялись. В работе [40] также показано, что наиболее вероятным аутоантигеном является проинсулиновый пептид, представляющий собой аминокислотную последовательность 9—36 и соединяющий β -цепь с с-пептидом. Авторы [41] установили, что отрицательная селективная способность тимуса сочетается с экспрессией HLA-DR-2 локуса у людей, чем и объясняют низкую аутореактивность к проинсулину/инсулину у таких лиц.

Регулирование аутореактивности для достижения толерантности в период плодного развития представляется проблематичным, а перенаправление или прерывание течения иммунного процесса с помощью генно-инженерного подхода исследовате-

лями предпринимаются. Известно, что регуляция иммунного процесса осуществляется Т-лимфоцитами-хелперами (Тх), выделяющими определенные наборы цитокинов, от которых и зависит направление иммунного ответа. Изменяя профиль и количественное соотношение цитокинов, можно изменить их эффекторные функции и направление ответа [42]. Например, выявлено, что цитокин IL-10 является ингибитором презентации антигенов макрофагами определенным Т-лимфоцитам и, следовательно, соответствующей Т-клеточной пролиферации. IL-10 может подавлять синтез интерферона γ (ИФ γ) и фактора некроза опухоли (ФНО α) — индукторов экспрессии молекул II класса ГКГС на клетках, что должно благоприятствовать развитию иммунного ответа по Тх2 типу, т. е. подавлению клеточного ответа [42]. Это послужило для авторов [43] предпосылкой к тому, что IL-10 можно использовать для подавления развития аутодиабета. Ими были выделены из островковых инфильтратов поджелудочной железы у мышей линии NOD, болеющих спонтанным ИЗСД, активные, т. е. экспрессирующие ИФ γ , Тх-клетки. Затем эти лимфоциты подвергали *in vitro* трансфекции ретровирусным вектором MoMLV с кДНК IL-10. Далее отобранные секретирующие IL-10 клетки интраперитонеально переносили восьмидневным мышатам NOD.

Показано, что привнесенные трансфицированные Т-клетки целенаправленно мигрировали в поджелудочную железу мышат, пролиферировали вокруг панкреатических островков и синтезировали IL-10 *in situ*. Впоследствии у таких мышей выявлена супрессия развития инсулитов и среди них количество заболевших ИЗСД мышей снизилось с 66 до 8 %. Авторы полагают, что привнесенные Т-клетки проявляли иммуносупрессивное действие на деструкцию β -клеток поджелудочной железы, подавляя синтез ИФ γ посредством аутокринной и паракринной функций IL-10 [43].

Таким образом, возможно, появляется еще одно направление генной терапии ИЗСД, предусматривающее прерывание или балансировку специфического локального аутоиммунного ответа островковых β -клеток.

Несмотря на очевидные достижения в исследованиях генотерапии ИЗСД, реальных успехов пока не достигнуто. Наиболее сложными моментами остаются создание эффективных и надежных систем доставки *ins*-гена, достижение регулируемой экспрессии и синхронности секреции продукта гена согласно физиологическим требованиям организма. Возможно, что генно-иммунологический подход, если при этом действительно будут устраняться

аутоантигены, т. е. причина развития болезни, в дальнейшем и будет наиболее перспективным методом.

T. G. Titok

The insulin-dependent diabetes mellitus, potential of gene therapy

Summary

The gene engineering approaches to the Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) treatment are presented in the review. On the one hand, some studies are directed to provide the insulin de novo synthesis in non-specific cells by transferring the insulin gene into them to compensate the function of destroyed pancreatic β -cells. The search for the target cells and providing them with essential qualities such as sensitivity to glucose and production of functionally matured protein in vivo are also discussed. On the other hand, it was shown a possibility of IDDM treatment by transferring some cytokine genes to Th-cells, that caused changes in the subpopulation ratio of T-cells composition. In such a way it is possible to interrupt or balance the specific immune process in the island cells, which contributes substantially to the 1 type diabetes pathogenesis.

T. G. Titok

Инсулин-залежний цукровий діабет: можливості генної терапії

Резюме

В огляді викладено генно-інженерні підходи, які розробляються для лікування інсулін-залежного цукрового діабету (ІЗЦД). Висвітлюються дослідження, спрямовані на забезпечення синтезу інсуліну de novo в неспецифічних клітинах за рахунок переносу в них гена інсуліну для заміщення β -клітин підшлункової залози. Проаналізовано пошук клітин-мішеней та шляхів набуття ними необхідних якостей: чутливості до глюкози і здатності до продукції функціонально зрілого білка in vivo. Розглянуто також можливість лікування ІЗЦД за допомогою переносу генів деяких цитокінів Т-лімфоцитам-хелперам (Тх-клітинам), що спричинює змінення субпопуляційного співвідношення Т-клітинного складу. Таким чином, можна перервати або збалансувати специфічний імунний процес в острівцевих клітинах, який лежить в основі патогенезу діабету 1 типу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Newgard Ch. B. Cellular engineering and gene therapy strategies for insulin replacement in diabetes // *Diabetes*.—1994.—43, N 3.—P. 341—350.
- Newgard Ch. B., Clark S., Beltrandel R. H., Hohmeier H. Quadre C., Normington K. Engineered cell lines for insulin replacement in diabetes: current status and future prospects // *Diabetologia*.—1997.—40.—P. 42—47.
- Kolodka T. M., Finegold M., Moss L., Woo S. Gene therapy for diabetes mellitus in rats by heratic expression of insulin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1995.—43, N 4.—P. 3293—3297.
- Miller A. D. Retroviral vectors // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*—1992.—152.—P. 1—24.
- Vile R. G., Russell S. J. Retroviruses as vectors // *Brit. Med. Bull.*—1995.—51.—P. 12—30.
- Зеленин А. В., Кайгородов В. А., Прасолов В. С. Генная терапия сегодня и завтра // *Молекуляр. биология*.—1998.—32, № 2.—С. 219—228.
- Kay M. A., Liu D., Hoogerbrugge P. M. Gene therapy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1997.—94, N 24.—P. 12744—12746.
- Moore H. P., Walker M. D., Lee F. Expressing a human proinsulin cDNA in mouse ACTH-secreting cell: intracellular storage, proteolytic processing and secretion on stimulation // *Cell*.—1993.—35.—P. 531—538.
- Stewart C., Taylor N. A., Green I. S. Insulin-releasing pituitary cells as model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus // *J. Endocrinol.*—1994.—142.—P. 339—343.
- Knaak D., Fiore D. M., Surana M. Clonal insulinoma cell line that stably maintains correct glucose responsiveness // *Diabetes*.—1994.—43.—P. 1413—1417.
- Clark S. A., Quaade C., Constandy H. Novel insulinoma cell after transfection with human GLUT-2 glucose transporter cDNA // *Biochem. J.*—1997.—296.—P. 113—119.
- Palmer T. D., Rosman G. J., Osborne W. R. Genetically modified scin fibroblasts, persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1991.—88.—P. 1330—1334.
- Simpson A. M., Tuch B. E., Swan M. A. Functional expression of the human insulin gene in human hepatoma cell line (Hep G₂₁₀₃) // *Gene Ther.*—1995.—2.—P. 223—231.
- Simpson A. M., Marshall G. M., Tuch B. E., Maxwell L., Szymanska B., Tu J., Swan M. A., Camacho M. Gene therapy of diabetes: glucose-stimulated insulin secretion in a human // *Gene Ther.*—1997.—4.—P. 1202—1215.
- Bailey C. J., Davies E. L., Docherty K. Prospects for insulin delivery by ex vivo somatic cell gene therapy // *J. Mol. Med.*—1999.—77, N 1.—P. 244—249.
- Docherty K. Gene therapy for diabetes mellitus // *Clin. Sci.*—1997.—92.—P. 321—330.
- Yanagita M., Hoshino H., Nakayama K. Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insuline reflects the expression of furin in non-endocrine cell lines // *Endocrinology*.—1993.—133.—P. 639—644.
- Cheung A. T., Dyanandan B., Lewis J. T., Korbitt G. S., Rajotte R. V., Bryer-Ash M., Boylan M. O., Wolfe M. M., Kieffer T. J. Glucose-dependent insulin release from genetically engineered k-cells // *Science*.—2000.—290, N 5498.—P. 1059—1062.
- Sugiyama A., Haffori S., Tanaka S., Isoda F., Kleopoulos S., Rosenfeld M., Kaplitt M., Sekihara H., Mobbs C. Defective adenoassociated viral-mediated transfection of insulin gene by direct injection into liver parenchyma decreases blood glucose of diabetic mice // *Horm. Metab. Res.*—1997.—29, N 8.—P. 599—603.
- Vaulont S., Kahn A. Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates // *FASEB J.*—1994.—8, N 1.—P. 28—34.
- Valera A., Fillat Ch., Costa Ch., Sabater J., Visa J., Pujol A., Bosch F. Regulated expression of human insulin in the liver of transgenic mice corrects diabetic alterations // *FASEB J.*—1994.—8, N 6.—P. 440—447.
- Galloway J. A., Hooper S. A., Spradlin C. T., Howey D. C., Frank B. H., Bowsheer R., Anderson J. H. Biosynthetic human proinsulin // *Diabet. Care*.—1992.—15, N 5.—P. 666—692.
- Mitanchez D., Chen R., Massias J. F., Porter A., Mignon A., Bertagna X., Kahn A. Regulated expression of nature human insulin in the liver of transgenic mice // *FEBS Lett.*—1998.—421.—P. 285—289.
- Thule P. M., Liu J. M. Regulated hepatic insulin gene therapy of STZ-diabetic rats // *Gene Ther.*—2000.—N 20.—P. 1744—1752.
- Straus D. S. Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth // *FASEB J.*—1994.—8, N 1.—P. 6—12.

26. *Martin J. L.* IGFBPs down under // *Trends Endocrinol. and Metab.*—2001.—12, N 4.—P. 142—144.
27. Гребенщиков Ю. Б., Мошковский Ю. Ш. Физико-химические свойства, структура и функциональная активность инсулина.—М.: ВИНТИ, 1986.—С. 186. (Итоги науки и техники. Сер. Биорг. химия; Т. 7).
28. Балаболкин М. И. Диабетология.—М.: Медицина, 2000.—672 с.
29. *Corbett J. A.* K-cell: a novel target for insulin gene therapy for the prevention of diabetes // *Trends Endocrinol. and Metab.*—2001.—12, N 4.—P. 140—142.
30. *Herman C., Goke R., Richter G.* Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients // *Digestion.*—1995.—56.—P. 117—126.
31. *Holst J. J., Wojdemann M., Andre W., Lars R.* Potent enterogastrone action of the insulinotropic hormone, glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Mechanisms of action // *Diabetes.*—1999.—48, Suppl N 92.—P. 21.
32. *Delaney C. A.* Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells // *Endocrinology.*—1997.—138.—P. 2610—2614.
33. *Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W. L.* Cytokines and their role in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin dependent diabetes mellitus // *Biochem. Pharmacol.*—1998.—55.—P. 1139—1149.
34. *Liegler A. G., Hillebrand B., Rabl W., Mayrhofer M., Hummel M., Mollenhaner V., Vordeman J., Lenz A., Standl E.* On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth // *Diabetologia.*—1993.—36.—P. 402—408.
35. *Bennett S. T., Lucassen A. M., Cough S. C. L., Powell E. E., Undlien D. E., Merriman M. E., Kawauchi Y., Dronsfield M. J., Pociot F., Nereep J., Bouzekri N., Cambon-Thompson A., Ronningen K. S., Barnett A. H., Bain S. C., Todd J. A.* Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus // *Nature Genet.*—1995.—9, N 3.—P. 284—291.
36. *Vafiadis P., Bennett S., Todd J. A., Nadean J., Grabs R., Goodyer C. G., Wickramasinghe S., Colle E., Polychronakos C.* Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus // *Nature Genet.*—1997.—15, N 3.—P. 289—291.
37. *Pugliese A., Leller M., Fernandez A., Lanenberg L. J., Bartlett R. J., Ricordi C., Pietropaolo M., Eisenblath G. S., Bennett S. T., Patel D. D.* The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the ins VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes // *Nature Genet.*—1997.—15, N 3.—P. 293—297.
38. *Jolicœur Ch., Hanahan D., Smith K. M.* T-cell tolerance toward a transgenic β -cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91, N 14.—P. 6707—6711.
39. *Sezda E., Wallace V. A., Mayer J., Yeung R. S. M., Mak T. W., Ohashi P. S.* Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide // *Science.*—1994.—263.—P. 1615—1618.
40. *French M. B., Allison J., Gram D. S., Thomas H. E., Dempsey-Collier M., Silva A., Georgion H. M., Kay T. W., Harrison C., Lew A. M.* Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in Nonobese diabetic mice // *Diabetes.*—1997.—46, N 1.—P. 34—39.
41. *Geluc A., Van Meijgaarden K. E., Schloot N. C.* HLA-DR-binding analysis of peptides from islet antigens in IDDM // *Diabetes.*—1998.—47.—P. 1594—1601.
42. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология.—М.: Мир, 2000.—800 с.
43. *Moritani N., Yoshimoto K., Li S., Kendo M., Iwahana H., Yamaoka T., Sano T., Makano N., Kikutani H., Itakura M.* Prevention of adoptively transferred diabetes in nonobese diabetic mice with IL-10 transduced islet-specific Th-1 lymphocytes // *J. Clin. Invest.*—1996.—98.—P. 1851—1859.

УДК 572.21:579.25.5
Надійшла до редакції 09.01.01