

## ДОСТИЖЕНИЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ В ЛЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА.

Кужекина Ю.С., Воробьева А.С., Василенко С.А., Купша Е.И.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

Генную инженерию как один из разделов биотехнологии относят к числу приоритетных наук, открывающих безграничные возможности, как для биологии, так и для клинической медицины. Применение методов в генной инженерии в лечение таких заболеваний, как сахарный диабет, может стать настоящим прорывом в науке и медицине, так как сахарный диабет – это заболевание, которое становится все более распространенным в наше время. На сегодняшний день важнейшим достижением биотехнологии является разработка и применение в клинической практике фармацевтических препаратов, полученных с помощью генетической инженерии, которые в последующем будут применяться в медицинской практике. В статье собраны и проанализированы сведения о достижениях методов генной инженерии в лечении сахарного диабета.

Ключевые слова: генная инженерия, сахарный диабет, инсулин, инсулин-продуцирующие клетки.

## GENETIC ENGINEERING IN THE DIABETES TREATMENT.

*Kuzhekina J.S., Vorobjova A.S., Vasilenko S.A., Kupsha E.I.*

The Medical Academy of Crimea Federal University

Genetic engineering is one of the priority of sciences, which discovers unlimited possibilities for both biology and clinical medicine. Application of methods in genetic engineering in the treatment of diseases such as diabetes can be a real breakthrough in science and medicine, since diabetes is a disease that is becoming more common nowadays. Today, the most important achievement of biotechnology is the development and use in clinical practice of pharmaceutical preparations obtained with the help of genetic engineering, which will subsequently be used in medical practice. Information about the genetic engineering techniques achievements in the treatment of diabetes has collected and analyzed in the article.

Keywords: genetic engineering, diabetes, insulin, insulin-producing cells.

21 век – время грандиозных по своему масштабу открытий в медицине. Изобретение новых препаратов для лечения гемофилии, вакцин, гормонов, иммунокорректирующих веществ, расшифровка человеческого генома, – далеко не весь перечень научных открытий, созданных с помощью генной инженерии. Достижения генной инженерии в эндокринологии вот уже более 20 лет остаются в центре внимания медицинского сообщества в связи с тем, что распространение сахарного диабета (СД) в последние годы получило характер эпидемии. По данным Международной федерации диабета в 2014 г. в мире зарегистрировано 387 млн больных, ожидается, что к 2035 г. их количество увеличится до 592 млн. Только в РФ насчитывается 3,5 млн больных сахарным диабетом, однако в реальности это число может достигать 9 млн человек. [4]

Результаты генно-инженерных исследований, от производства рекомбинантного человеческого инсулина до имплантации инсулин-продуцирующих клеток, полученных из собственных клеток пациента, позволяет полагать, что разработка ряда эффективных методов лечения инсулинозависимого СД становится реальностью.

Открытие инсулина Ф. Бантингом и его коллегами в 1921 г. привело к значительному прогрессу в лечении инсулинозависимого СД: продолжительность жизни после постановки диагноза увеличилась с 1,3 года до 45 лет. Однако, успешное лечение СД очищенным бычьим инсулином сопровождалось неблагоприятными побочными эффектами: воспалением, формированием абсцессов в месте введения, в дополнение к потенциально смертельным аллергическим реакциям, а недостаточная степень очистки приводила к ошибкам в дозировании препарата. Несмотря на это, очищенный бычий инсулин был основным препаратом для лечения СД вплоть до начала 1980 годов. В то же время стремительно стала развиваться генная инженерия, позволяющая конструировать рекомбинантные ДНК вне биологических систем (*in vitro*), а затем вводить их в геном другого организма. [2]

В основе получения человеческого инсулина также лежит использование методов генной инженерии. Аминокислотная последовательность человеческого инсулина была разработана Фредериком Сенгером еще в 1958 г. Как известно, инсулин состоит из двух пептидных цепей А и В, связанных двумя дисульфидными мостиками между аминокислотами цистеина, присутствующими в этих двух цепях, третий дисульфидный мостик находится в цепи А. Уже через 20 лет человеческий инсулин был создан с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Рекомбинантный человеческий инсулин синтезируется методом внедрения ДНК каждой цепи инсулина отдельно в ДНК ослабленных неинфекционных штаммов бактерий *E.coli*. После многократных циклов деления, бактерии могут производить множество копий каждой цепи инсулина. Индивидуальные цепи молекулы инсулина извлекают из бактерий и очищают. После очистки молекулы рекомбинантного инсулина, для улучшения её функции, проводят замещение одной аминокислоты в молекуле. Эти изменения способствуют производству инсулина быстрого или длительного действия. Рекомбинантный человеческий инсулин, получаемый с использованием в *E.coli* и *Saccharomyces cerevisiae*, не вызывает опасных побочных эффектов, отмечаемых при использовании инсулина животного происхождения.

Более эффективный метод, также с использованием *E.coli*, включает в себя производство проинсулина, а не отдельных фрагментов его синтеза. Как известно, синтез инсулина *in vivo* и его выделение представляют собой сложный многоэтапный процесс. Первоначально образуется неактивный предшественник гормона, проинсулин, который после ряда химических превращений переходит в активную форму. В процессе созревания из молекулы проинсулина с помощью специфических эндопептидаз вырезается С-пептид — фрагмент из 31 аминокислоты, соединяющий В-цепь и А-цепь, таким образом молекула проинсулина разделяется на инсулин и биологически инертный пептидный остаток. Ген, кодирующий проинсулин, трансфицируют в клетки *E.coli*, где он в дальнейшем экспрессируется. Полученный гормон очищается, а цепь С протеолитически удаляется. [5]

Привлекательной системой экспрессии, которая может быть использована для производства инсулина в промышленных масштабах для терапевтического применения у человека как в парентеральной, так и в пероральной и ингаляционной формах, являются трансгенные растения. Рекомбинантный человеческий инсулин успешно экспрессируется и продуцируется в масличных культурах Резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*). Эта технология включает целенаправленную экспрессию инсулина в субклеточных структурах, известных как *oilbodies*, которые состоят из гидрофобного ядра триацилглицерина,

заключенного в капсулу из фосфолипидной мембраны и наружной оболочки протеинов, известных как олеозины. Затем oilbodies отделяются от других компонентов семян, и рекомбинантный инсулин отщепляют от ассоциации с олеозином. Последующее созревание для получения биологически активного инсулина может быть осуществлено с использованием стандартных ферментативных методов. Масличные могут также выступать в качестве естественного клеточного склада, где рекомбинантный инсулин может быть складируем до тех пор, пока потребуется. [6]

В других исследованиях были получены трансгенные растения, в которых человеческим проинсулином трансформировали хлоропласты табака и салата-латука. Обнаружено, что листья табака накапливают до 47%, а листья салата до 53% проинсулина от общего белка листьев. Проинсулин, содержащийся в листьях салата оказался очень стабильным, около 40% проинсулина обнаруживается даже в стареющих и высушенных листьях. Затем проинсулин экстрагируют и расщепляют с помощью протеаз. Доказано, что пероральное введение мышам необработанного проинсулина, инкапсулированного в растительной клетке, приводит к снижению уровня глюкозы в крови, подобно введению коммерчески доступных инсулинов. При этом получение инсулина с использованием трансгенных растений обладает рядом преимуществ: экономическая эффективность, отсутствие человеческих патогенов, простота производства и наличие эукариотической машины для посттрансляционных модификаций. [7]

Не менее интересны эксперименты по производству высоких уровней человеческого проинсулина в молоке трансгенных мышей, несущих кДНК человеческого инсулина с экспрессией, приводимой в действие промотором гена - козьим  $\beta$ -казеином. Уровень экспрессии человеческого проинсулина в молоке была максимальной в середине лактации и достигала 8,1 г/л. При этом уровни глюкозы в крови и уровни инсулина, так же как и состав молока были неизменными, и трансгенные животные не имели видимых дефектов здоровья. Зрелый инсулин, полученный из проинсулина молока сохранял свою биологическую активность. [8]

Исследования последних лет направлены на поиск возможности замещения утраченной функции инсулярного аппарата, нормализации регуляции углеводного обмена и полный отказ от экзогенного введения инсулина. Реальную возможность излечения от СД 1 типа дает аллогенная трансплантация островков поджелудочной железы: гистологически подтверждено, что островки человека, трансплантированные в печень, способны к выживанию в течение нескольких лет при отсутствии признаков отторжения и рецидива аутоиммунного процесса. Однако, для успешной функции пересаженной островковой ткани в порталную систему необходимо ввести достаточное количество островков, способных секретировать инсулин в среде с гипергликемией: высокая эффективность этого метода была продемонстрирована при пересадке более 11000 островков на 1 кг массы тела больного. Другие проблемные аспекты – это необходимость проведения иммуносупрессивной терапии, тестирование доноров на вирусы гепатита, ЦМВ и ВИЧ инфекцию, защита островков от бактериальной и грибковой контаминации. [3]

Реальной альтернативой аллогенной трансплантации является генная терапия, позволяющая направленно изменять генные дефекты путем введения нормальных генов в клетки пациентов. Для эффективной доставки чужеродного гена в клетки-мишени используют вирусные векторы, обладающие способностью к активной трансдукции и

длительной экспрессии чужеродного гена. В качестве клеток - мишеней используются лимфоциты, клетки красного костного мозга, опухолей, печени и др. [1]

В последнее время предпринимаются попытки разработать генетическую конструкцию, способную автономно функционировать по принципу «обратной связи» и секретировать адекватное содержанию глюкозы количество инсулина. В эксперименте получен клон иммортализованных  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, трансфицированных геном р-галактозы, который в течение 9 мес. способен был секретировать инсулин в ответ на стимуляцию глюкозой. Такие «инженерные»  $\beta$ -клетки сохраняли свою функциональную активность при подкожном, внутрикожном и внутримышечном введении экспериментальным животным. Методом селекции клеток инсулиномы был получен усовершенствованный клон, резистентный к-интерферону и интерлейкину-1  $\beta$ , опосредующим иммунный ответ.

На 61 конгрессе Американской диабетической ассоциации сообщалось о возможности генно-инженерных конструкций осуществлять контроль экспрессии гена инсулина в нейроэндокринных клетках кишечника. В исследовании с экспериментальным СД у крыс модифицированная кДНК проинсулина человека вместе с аденоассоциированным вирусным вектором помещалась в специальную кассету. Через 6-8 часов после перорального приема этой кассеты у диабетических животных отмечалось снижение глюкоземии, затем длительно сохранялось эугликемическое состояние, опосредованное, вероятно, трансдукцией гепатоцитов. Продемонстрирована также возможность использования в качестве продуцентов инсулина генетически измененных печеночных клеток. При помощи вектора ЦМВ в гепатоциты HEP G2 и HUH7 введена кДНК инсулина человека. Трансфицированные клетки секретировали проинсулин человека, адекватно изменению уровня глюкозы. После имплантации диабетическим мышам они продолжали продуцировать инсулин, обеспечивая нормальное содержание глюкозы сыворотки крови. [3]

Открытие белка, являющегося транскрипционным фактором (PDX-1 или IDX-1/STF-1/IPF-1), контролирующим развитие поджелудочной железы и транскрипцию гена инсулина является еще одним толчком для генной терапии СД. Фактор PDX-1 экспрессируется не только в период эмбриогенеза, но и во взрослом состоянии, что сопровождается неогенезом островков и дифференцировкой инсулинпродуцирующих (ИПК) клеток из прогениторных клеток. Предложено использование экзогенного PDX-1 для стимуляции транскрипции гена инсулина и дифференцировки под его влиянием *in vitro* и *in vivo* стволовых панкреатических клеток человека в ИПК. Превращение инсулинпродуцирующей стволовой клетки (ИПСК) в ИПК достигалось путём последовательного многостадийного воздействия на клетки факторов цитодифференцировки, при этом отмечалась экспрессия панкреатических генов PDX1 и NKX6-1. Такие клетки были способны выбрасывать кальций в ответ на добавление в среду глюкозы, упаковывать инсулин в секреторные гранулы, секретировать инсулин в количествах, близких с таковыми у зрелых  $\beta$ -клеток, в ответ на множественные эпизоды добавления глюкозы. В экспериментах *in vivo* ИПК после трансплантации диабетическим мышам проявили способность контролировать уровень глюкозы в крови.

В настоящее время интенсивно ведутся разработки устройства ViaCyte, предоставляющего собой макроконтэйнер со средой для развития, поддержки и обеспечения жизненных потребностей ИПК, обладающий полупроницаемыми стенками, способными

пропускать инсулин, кислород и питательные вещества, но препятствующими проникновению клеток. Данный эффект обеспечивает, как протекцию трансплантированных клеток от аутоиммунной атаки, так и защиту организма реципиента от их потенциально возможного туморогенного действия. Сообщается о разрешении FDA на начало клинических испытаний по трансплантации ViaCyte как перспективного вида СД 1 типа без подавления иммунитета и без риска гипогликемии и других осложнений, связанных с диабетом [4].

Подытоживая вышесказанное, можно отметить, что результаты исследований в сфере генной инженерии позволяют не только удовлетворить потребности в инсулине больных СД 1 типа, нуждающихся в заместительной терапии, но и делают возможным возобновление утраченных функций инсулярного аппарата и нормализацию углеводного обмена и его регуляции.

#### **Список использованных источников:**

1. Бабаев А.А., Ежова Г.П., Новикова Н.А., Новиков В.В. Генная терапия: коррекция генетической информации. //Учебно-методические материалы по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах». Нижний Новгород. 2007
2. Генная инженерия и мутации [Электронный ресурс] // slideshare .– URL: <http://www.slideshare.net/olik5sch/ss-49493623>
3. Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М.. Современные аспекты трансплантации островков поджелудочной железы при сахарном диабете. Сахарный диабет. 2004. № 2. С. 34-41.- URL: [http://www.voed.ru/sc\\_24.htm](http://www.voed.ru/sc_24.htm)
4. Комаров С.С. Введение в биотехнологию [Электронный ресурс]: учебно-методическое пособие / С.С. Комаров. - Электрон. текстовые данные.— Бийск: ООО «Издательский дом «Бия», 2016. – 40 с. - URL: <http://elibrary.ru/item.asp?id=26065050>
5. Шереметьева М.Е., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В. Гены & Клетки: Том XI, №1, 2016 год, стр.: 24-34.- URL: <http://genesells.ru/article/insulin-produtsiruyushhie-kletki-v-lechenii-insulinozavisimogo-saharnogo-diabeta/>
6. Agnieszka Stryjewska<sup>1</sup>, Katarzyna Kiepur<sup>1</sup>, Tadeusz Librowski<sup>2</sup>, Stanisław Lochyński<sup>3</sup> Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. Pharmacological Reports. 2013, 65, 10751085. ISSN 1734-1140.- URL: [http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2013/5\\_1075.pdf](http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2013/5_1075.pdf)
7. Matsubayashi Y. Small Post-Translationally Modified Peptide Signals in Arabidopsis. The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists. 2011;9:e0150. doi:10.1199/tab.0150.- URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3268502/>
8. Nabih A Baeshen, Mohammed N Baeshen, Abdullah Sheikh, Roop S Bora, Mohamed Morsi M Ahmed, Hassan A I Ramadan, Kulvinder Singh Saini, and Elrashdy M Redwan. Cell factories for insulin production. Microb Cell Fact. 2014.- URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203937/>
9. Qian X, Kraft J, Ni Y, Zhao F-Q. Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice. Scientific Reports. 2014.- URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4179469/>