

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ К ЛЕЧЕНИЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Я.М. Покровская, студент

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
(Россия, г. Калуга)

DOI: 10.24412/2500-1000-2024-6-4-112-115

Аннотация. Современные подходы генной терапии стали многообещающими при лечении диабета – хронического заболевания с устойчиво высоким уровнем глюкозы в крови из-за недостаточной выработки инсулина, рост заболеваемости которого к 2030 году ожидается на 11,3%. Данный обзор включает в себя рассмотрение современных подходов генной терапии в лечении диабета, описание основных технологий с обозначением их недостатков. Объясняется технология CRISPR/Cas9: система, которая определяет целевую область генома и осуществляет двухцепочечный разрез ДНК, после чего происходит вставка необходимой последовательности. При использовании векторов аденоассоциированного вируса продемонстрирована долгосрочная эффективность в достижении нормогликемии без необходимости использования экзогенного инсулина. А исследование с плазмидой pVAX позволило обеспечить временную экспрессию генов-мишеней и был успешно экспрессирован ген инсулиноподобного фактора роста. Тем не менее, несмотря на эффективность технологий генной терапии, на современном этапе существует ряд ограничений по их использованию в клинической практике, поскольку имеются некоторые сомнения в их безопасности при случайной интеграции вируса в геном хозяина, а также недостатки в эффективности трансдукции и отсутствии клеточной специфичности, поэтому можно заключить о необходимости дальнейших научных исследований в данной области.

Ключевые слова: сахарный диабет, инсулин, генная терапия, ген, CRISPR/Cas9, вирусный вектор.

Сахарный диабет (далее СД) представляет собой хроническое заболевание с устойчиво высоким уровнем глюкозы в крови по причине недостаточной выработки инсулина или из-за того, что организм не может использовать инсулин при его выработке, в то время как инсулин играет важную роль в поддержании метаболического гомеостаза организма. Основной причиной диабета 1 и 2 типов является аутоиммунная гибель бета-клеток поджелудочной железы [1], где происходит экспрессия инсулина различными комбинациями транскрипционных факторов. По подсчетам Международной диабетической федерации (IDF) в 2021 году диабетом страдают более 10,5% мирового населения, а распространенность СД ожидается к увеличению на 11,3% к 2030 году, что ляжет тяжелым бременем на развитие экономики из-за увеличения расходов на здравоохранение. К ключевым факторам,

способствующим увеличению численности заболевших диабетом, являются: урбанизация, старение, уменьшение степени физической активности, рост распространенности избыточного веса и ожирения [2]. Клеточная терапия, основанная на трансплантации донорских клеток, видится многообещающей, однако нехватка донорского материала является сдерживающим фактором для развития подобных технологий. Еще одним перспективным подходом в лечении диабета является дифференцировка эмбриональных стволовых клеток, но соответствующие протоколы находятся в разработке. Современные подходы генной терапии, как вирусные, так и невирусные, стали перспективными для лечения диабета, многие исследования подтверждают ее эффективность. Перенос генов можно разделить на перенос *in vivo* и *in vitro*. Для успешной доставки *in vivo* носитель трансгена должен быть соответ-

ствующим образом направлен к клеткам-мишеням, а генный продукт должен быть защищен от иммунной атаки. Генетическое манипулирование клетками *in vitro* менее инвазивно, чем методы *in vivo*, однако клетки-мишени должны легко удаляться и трансплантироваться обратно хозяину [3].

Технология CRISPR/Cas9

Одним из перспективных подходов для лечения диабета являются технологии редактирования генов с применением кластеризованных коротких палиндромных повторов с регулярными интервалами (CRISPR/Cas9). Существует много подходов реализации данной системы, однако этот метод относительно новый и доказательства его эффективности отсутствуют. Система CRISPR/Cas9 представляет собой две ключевые молекулы – гидовую РНК (далее гРНК), которая дает направление комплексу в требуемый участок генома, и эндонуклеаза CAS9, которая осуществляет двухцепочечный разрез ДНК. Комплекс находит в геноме целевой участок, связывается и раскручивает двухцепочечную спираль, а комплементарная последовательность гРНК связывается с одной из цепей. Эндонуклеазные домены CAS9 при эффективном связывании расщепляют обе цепи ДНК. После разрезания ДНК в клетке запускается механизм репарации. При гомологичной рекомбинации осуществляется вставка необходимой исследователю последовательности ДНК, а систему легко адаптировать под любую мишень просто изменив гРНК, CAS9 остается без изменений. При негомологичном соединении концов с образованием вставок или делеций некоторого числа нуклеотидов может быть реализована неправильная работа функциональных элементов генома.

В работе Alzhanuly B. и др. (2021) в системе CRISPR/Cas9 применили гидовую РНК для активации транскрипции инсулина, используя клеточную линию HEK293. При этом CAS9 связался с транскрипционными факторами VP64 и KRAB, регулирующими экспрессию гена *INS*. Удалось успешно активировать экспрессию таргетного гена, что было зафиксировано с по-

мощью количественной полимеразной цепной реакции [5]. В других исследованиях есть работы по получению различных типов РНК, нацеленных на ген *UCP1* и системы CRISPR-SAM, примененные к предипоцитам человека. Результаты показали увеличение экспрессии гена *UCP1*, а мыши с ожирением, у которых развились человеческие коричневые адипоциты, показали устойчивое улучшение толерантности к глюкозе и чувствительности к инсулину. Кроме этого, известны исследования, нацеленные на ген *FABP4* в белых адипоцитах, который участвует в подавлении ожирения, снижения массы тела и улучшения метаболических показателей организма с высокой степенью ожирения. В дополнении, чувствительность к инсулину значительно улучшилась.

По современным данным, система CRISPR/Cas9 может эффективно воздействовать на любой ген в любом организме, и исследования по лечению СД на мышах продемонстрировали, что можно изменить диабетический статус путем специфического воздействия на гены. Основная сложность использования технологии CRISPR/Cas9 заключается в доставке системы к месту назначения. Вариант вирусной доставки является основным методом, однако существует вероятность тяжелой иммуногенности. В связи с этим активно ведутся работы по совершенствованию системы адресной доставки [6].

Системы доставки генетического материала

Недавние исследования по достижению совместной экспрессии генов инсулина и глюкокиназы в скелетных мышцах показали успешные результаты внедрения методов манипуляции с генами при использовании векторов аденоассоциированного вируса (AAV-векторы), посредством которых была продемонстрирована долгосрочная эффективность в достижении нормогликемии без необходимости использования экзогенного инсулина. AAV-векторы имеют положительные характеристики в генной терапии, включая минимальный иммунный ответ и инфекционность, как в делящихся клетках, так и в спящих. Со-

гласно проведенным исследованиям, мышам с СД вводили AAV-векторы содержащие гены инсулина и глюкокиназы при одновременной экспрессии которых белок-переносчик глюкозы GLUT4 и ферменты глюкокиназы транслоцируются в модифицированные мышечные клетки, увеличивая поглощение глюкозы. В результате экспрессии фермента глюкокиназы облегчалось фосфорилирование глюкозы и регулировалась выработка инсулина, приводя к нормогликемии [7].

В работе Hou W.R. и др. (2011) была создана невирусная плазида pBudCE4.1, содержащая гены проинсулина PI и регенирирующего белка поджелудочной железы Reg III. В результате введения данного комплекса, эффективно улучшилось состояние при СД, способствуя регенерации бета-клеток и индуцируя иммунологическую аутоотолерантность [8].

В исследовании Anguela X.M. и др. (2013) в лечении СД использовалась плазида pVAX, что позволило обеспечить временную экспрессию генов-мишеней как в паренхиматозных, так и в непаренхиматозных клетках печени. Был успешно экспрессирован ген инсулиноподобного фактора роста IGF-1. После десяти введе-

ний, мышцы достигали пролонгированного терапевтического эффекта без необходимости в дальнейшем лечении [9].

Заключение

Благодаря быстро развивающимся биотехнологиям и завершеному проекту «Геном человека», генная терапия является одной из самых многообещающих технологий нового поколения. Однако у данной технологии существует ряд ограничений, связанных с самой природой системы доставки генов: вирусный вектор для генной терапии должен безопасно доставлять генетический материал, способен воздействовать на целевой участок ДНК и обеспечить адекватную экспрессию трансгена в течение необходимого периода времени. И хотя доказана эффективность нацеливания на клетки и экспрессии генов вирусных векторов, имеются некоторые сомнения в их безопасности при случайной интеграции вируса в геном хозяина. В тоже время, невирусные векторные системы имеют недостатки в эффективности трансдукции и отсутствии клеточной специфичности. Таким образом, на данный момент времени для внедрения генной терапии в клиническую практику требуются дополнительные научные исследования.

Библиографический список

1. Hossain J., Al-Mamun, Islam R. Diabetes mellitus, the fastest growing global public health concern: Early detection should be focused // Health Sci Rep. – 2024. – №7(3). – DOI: 10.1002/hsr2.2004.
2. Самойлова Ю.Г., Матвеева М.В., Станкова А.Е., Подчиненова Д.В., Кудлай Д.А., Вазизова О.Е. Гришкевич И.Р. Влияние генетических полиморфизмов на эффективность и безопасность ингибиторов натрий-глюкозного ко-транспортера 2-го типа в лечении сахарного диабета 2-го типа // Профилактическая медицина. – 2024. – № 27 (1). – P. 67-71. DOI: org/10.17116/profmed20242701167.
3. Wong M., Hawthorne W., Manolios N. Gene therapy in diabetes // Self Nonself. – 2010. – № 1(3). – P. 165-175. DOI: 10.4161/self.1.3.12643.
4. Cheng Y., Wang H., Li M. The promise of CRISPR/Cas9 technology in diabetes mellitus therapy: How gene editing is revolutionizing diabetes research and treatment // Journal of Diabetes and its Complications. – 2023. – Vol. 37(8). – DOI: doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2023.108524.
5. Alzhanuly B., et al. Modulation of Insulin Gene Expression with CRISPR/Cas9-based Transcription Factors // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2021. – Vol. 9. № A. – P. 876-81. DOI: https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.6980.
6. Espinoza C., et al. CRISPR/CAS9 gene editing in diabetes mellitus: a future cure // Zenodo. 2023. V. 1. DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.7702879.
7. Dezashibi H.M., Shabani A. A Mini-Review of Current Treatment Approaches and Gene Therapy as Potential Interventions for Diabetes Mellitus Types 1 // Adv Biomed Res. 2023. 31:12:219. DOI: 10.4103/abr.abr_201_23.

8. Hou W.R., et al. Intramuscular delivery of a naked DNA plasmid encoding proinsulin and pancreatic regenerating III protein ameliorates type 1 diabetes mellitus // *Pharmacol Res.* – 2011. – №63. – P. 320-327.

9. Anguela X.M., et al. Nonviral-mediated hepatic expression of IGF-I increases Treg levels and suppresses autoimmune diabetes in mice // *Diabetes.* – 2013. – № 62. – № 551-560.

MODERN APPROACHES OF GENE THERAPY TO THE TREATMENT OF DIABETES MELLITUS

Y.M. Pokrovskaya, *Student*

Kaluga State University named after K.E. Tsiolkovski
(Russia, Kaluga)

Abstract. *Modern gene therapy approaches have shown promise in the treatment of diabetes, a chronic disease characterized by persistently high blood glucose levels due to insufficient insulin production, the incidence of which is expected to increase by 11.3% by 2030. This review includes a consideration of modern approaches to gene therapy in the treatment of diabetes, a description of the main technologies with an indication of their shortcomings. CRISPR/Cas9 technology is explained: a system that identifies a target region of the genome and performs a double-stranded DNA cut, after which the required sequence is inserted. Long-term efficacy in achieving normoglycemia without the need for exogenous insulin has been demonstrated using adeno-associated virus vectors. And research with the pVAX plasmid allowed for temporary expression of target genes, and the insulin-like growth factor gene was successfully expressed. However, despite the effectiveness of gene therapy technologies, at the present stage there are a number of restrictions on their use in clinical practice, since there are some doubts about their safety during random integration of the virus into the host genome, as well as shortcomings in transduction efficiency and lack of cellular specificity. Therefore, we can conclude that further scientific research is needed in this area.*

Keywords: *diabetes mellitus, insulin, gene therapy, gene, CRISPR/Cas9, viral vector.*