

ОБЗОРЫ

УДК 577.1-616.02
©Панков

ДОСТИЖЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Ю.А.Панков

Эндокринологический научный центр РАМН, 115478 Москва, ул. Москворечье 1,
эл. почта: yuri-pankov@mtu-net.ru

Механизмы проведения гормонального сигнала инсулина в одной и той же ткани не всегда являются комплементарными. Проводники действия гормона по-разному проявляют свои эффекты в различных органах в зависимости от специфики физиологических функций последних. Нечувствительность печени к действию инсулина вызывает развитие инсулинорезистентности и повышение уровня глюкозы в крови (гипергликемию). Нечувствительность других тканей к действию инсулина сочетается с нарушениями, присущими метаболическому синдрому. Нокаутирование гена инсулинового рецептора в мышцах не вызывает нарушений углеводного обмена, но сопровождается повышением содержания липидов в крови и печени и индуцирует развитие ожирения. Нарушение механизмов действия инсулина в жировой ткани, напротив, оказывает положительное действие на многие физиологические функции, вызывает снижение жировых запасов и увеличивает продолжительность жизни. Нормальная чувствительность β -клеток к действию инсулина необходима для эффективной стимуляции секреции инсулина поджелудочной железой под действием глюкозы. Дефицит рецептора инсулина в структурах мозга нарушает регуляцию аппетита, энергетический баланс, репродуктивную функцию, а также реакцию нервных клеток на гипогликемию. Менее важным являются последствия, вызываемые блокадой действия инсулина на эндотелиальные клетки сосудов, поскольку отсутствие у них рецептора инсулина не влияет на развитие эндотелия и кровяное давление, но тормозит пролиферацию кровеносных сосудов и васкуляризацию тканей.

Ключевые слова: инсулин, рецептор, проведение гормонального сигнала, нокаутирование гена, инсулинорезистентность.

ВВЕДЕНИЕ. В современной литературе много публикаций посвящено изучению наследственной предрасположенности к сахарному диабету. Четкая связь с наследственными факторами прослеживается в семьях больных (инсулиннезависимым) сахарным диабетом II типа (СД типа II). Эта форма диабета (в отличие от СД типа I) вызывается не дефицитом эндогенного инсулина, т.е. уменьшением или прекращением его секреции β -клетками поджелудочной железы, а неспособностью эндогенного инсулина регулировать обмен веществ и другие физиологические функции. Поэтому СД типа II часто сопровождается

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА САХАРНОГО ДИАБЕТА

резистентностью к действию гормона (инсулинорезистентность) и значительным увеличением его концентрации в крови (гиперинсулинемия). По мере развития нечувствительности к действию инсулина в организме включаются компенсаторные механизмы, нацеленные на поддержание нормальной регуляции обмена веществ, что вызывает увеличение секреции инсулина поджелудочной железой, повышает его концентрацию в крови (даже на порядки¹) и в конечном итоге приводит к срыву компенсаторных механизмов и развитию СД типа II. При этом у больных снижается стимулирующее действие повышенных концентраций глюкозы на секрецию инсулина β -клетками, которое вместе с уменьшением эффективности действия инсулина на углеводный обмен и другие физиологические функции приводит к значительному возрастанию уровня циркулирующей глюкозы и другим проявлениям СД.

Настоящая публикация посвящена обзору результатов исследования действия нокаутирования различных генов, которые кодируют белки, участвующие в регуляции углеводного обмена и являющиеся проводниками гормональных сигналов инсулина, на развитие инсулинорезистентности и СД типа II у экспериментальных животных. Новые интересные данные были представлены Ronald C. Kahn 1 сентября 2004 на 12-ом Международном эндокринологическом конгрессе (12th International Congress of Endocrinology – 12th ICE) в Лиссабоне в пленарной лекции “Дальнейшее исследование патогенеза диабета на животных с нокаутированными генами” (Redefining pathogenesis of diabetes – Lessons from knockout animals). Руководимый R.C. Kahn коллектив давно занимается изучением диабета в Джослиновском диабетологическом центре (Joslin Diabetes Center, Boston, MA, USA), и каждое появление R.C. Kahn на трибунах международных конгрессов неизменно встречается бурными овациями, поскольку все с нетерпением ожидают новых интересных результатов его последних исследований. Некоторые аспекты первых работ R.C. Kahn et al., которые были доложены на проведенных ранее конференциях, частично освещены в предыдущих публикациях [1,2].

Нарушения обмена веществ и многих физиологических функций при СД носят настолько сложный характер, что изучать и идентифицировать причины их вызывающие на целом организме представляется чрезвычайно трудной задачей. Поэтому, несмотря на огромное количество исследований, регулярно публикуемых в мировой литературе, многие аспекты решения проблемы СД оказываются недоступными ученым, несмотря на едва ли безграничные возможности современной медико-биологической науки. Определенный оптимизм в достижение прогресса в этом направлении вселяют последние исследования R. C. Kahn и руководимого им коллектива.

Автор традиционно остановился на важности и необходимости изучения СД, поскольку рост заболеваемости диабетом II типа во всем мире становится глобальной проблемой. С 90-ых годов прошлого столетия количество больных СД в Европе и Северной Америке увеличилось на 24 %, а в Австралии, Азии, Африке и Южной Америке возросло значительно больше. По разным оценкам, в различных регионах мира заболеваемость СД за этот период увеличилось, по одним данным, на 150 млн., а по другим, - на 300 млн. человек. Неуклонный рост числа больных происходит, несмотря на бурное развитие научных исследований, которые призваны раскрывать причины, вызывающие СД, способствовать совершенствованию методов лечения, повышать эффективность профилактики и приводить к уменьшению количества больных. Однако заболеваемость СД повсеместно растет.

Автор отметил тесную связь СД и снижения чувствительности организма к действию эндогенного инсулина (последняя часто сочетается или предшествует началу заболевания) с такими формами патологии, как ожирение, метаболический синдром, гипертония, дислипидемия, атеросклероз, нарушения репродуктивной функции и нейродегенеративные заболевания.

Он подчеркнул, что для понимания причин, вызывающих инсулино-резистентность, важно знать молекулярные механизмы действия инсулина на углеводный обмен и другие физиологические функции. Эти механизмы включают связывание гормона с рецептором, внутриклеточный домен которого, так же как рецептор инсулиноподобного ростового фактора 1 – ИРФ-1 (IGF-1), обладает тирозинкиназной активностью (рис.1) После соединения инсулина с рецептором повышается киназная активность и увеличивается фосфорилирование остатков тирозина во внутриклеточном домене рецептора и в цитоплазматических субстратах инсулинового рецептора (СИР): СИР 1, 2, 3 и 4 (Insulin Receptor Substrate - IRS 1, 2, 3, 4), а также Shc и GRB1, которые являются внутриклеточными проводниками действия гормона. С фосфорилированными остатками тирозина в рецепторе и в проводниках гормонального сигнала связываются другие белки, содержащие SH-2 домены. Белковые SH-2 домены специфически взаимодействуют с остатками фосфотирозина в молекулах СИР и рецептора инсулина и активируют или тормозят функцию следующего каскада проводников действия гормонов. Наиболее изученным представителем этого каскада является фосфатидилинозитол-3-киназа (ФИ-3К, Phosphatidylinositol-3-Kinase - PI3K). ФИ-3К активирует несколько нетипичных протеинкиназ C (aPKC, atypical protein kinases C λ/ζ – aPKCs λ/ζ), протеинкиназу B (protein kinase B – PKB/Akt), протеинкиназу 3-фосфоинозитида (3-phosphoinositide protein kinase-1 – PDK-1), ERK и другие киназы, участвующие в проведении гормонального сигнала. Инсулин по-разному действует на активность протеинкиназ в разных органах и тканях. Он в одинаковой степени активирует ПКС и ПКВ в мышцах при дефиците СИР-1, однако в печени он стимулирует в основном ПКВ и не влияет на ПКС, а в адипоцитах, наоборот, повышает активность только ПКС и не влияет на ПКВ [3]. Полученные результаты позволяют предполагать участие не только СИР-1, но и других активаторов ФИ-3К (включая СИР-2) в регуляции инсулином ферментативной активности ПКС в печени, ПКВ в жировой ткани и двух разных ПК в мышцах.

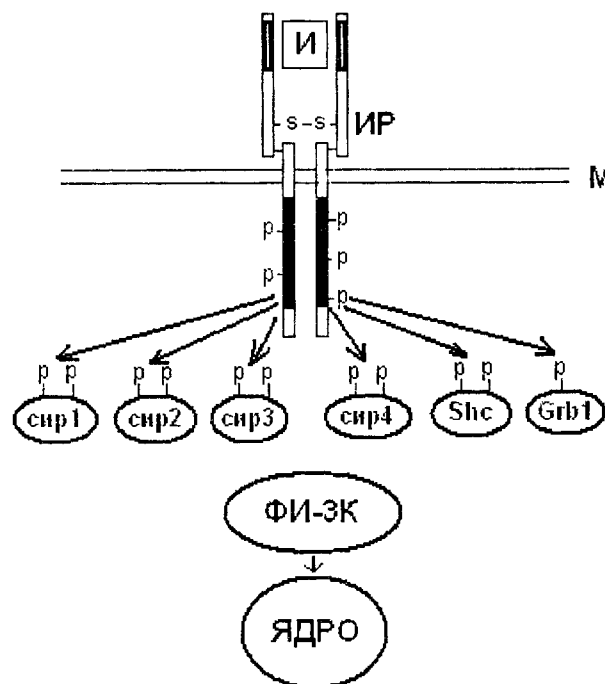


Рисунок 1

Механизм действия инсулина через трансмембранный рецептор. Обозначения: И- инсулин, ИР – инсулиновый рецептор, М – мембрана клетки, p – остаток фосфора в фосфорилированном тирозине, сир – внутриклеточные субстраты инсулинового рецептора, ФИ-3К – фосфатидилинозитол-3-киназа

Именно через регуляцию активности ФИ-3К и различных ПК инсулин стимулирует транспорт и перенос глюкозы в клетки и регулирует биосинтез белков. С участием ФИ-3К гормон активирует экспрессию генов и дифференциальный синтез специфических белков в разных тканях. Сейчас мы знаем о механизмах действия инсулина значительно больше, чем 20 лет назад. Многие биологические эффекты инсулина, например, регуляция углеводного, липидного и белкового обмена, осуществляются через активацию ФИ-3К. В регуляции других физиологических функций в большей степени преобладают одни направления действия инсулина и в меньшей степени проявляются другие. В организме часто развивается одинаковая резистентность ко всем биологическим эффектам гормона, но бывает преобладание резистентности только к некоторым действиям инсулина при значительном сохранении других форм его гормональной активности.

Важным является вопрос, каким образом и насколько резистентность отдельных органов к действию гормона определяет суммарную инсулинорезистентность и приводит к развитию СД. При этом важно рассматривать не только органы и ткани, которые традиционно считались мишенями действия инсулина, но и такие, как мозг, ткани кровеносных сосудов, β -клетки поджелудочной железы, в которых также синтезируется рецептор инсулина, и определять, в какой степени и в какой форме развитие инсулинорезистентности в этих тканях определяет общую картину патогенеза СД типа II и его осложнений.

В современных условиях наиболее эффективным подходом к изучению СД стали экспериментальные животные с нокаутированными генами белков, которые в здоровом организме являются проводниками действия инсулина, а у экспериментальных животных их биосинтез блокируется в результате генетических рекомбинаций. У мышей обычно проводят нокаутирование отдельных или нескольких генов и изучают вызываемые ими изменения обмена веществ. Большим достижением современной науки стала разработка методов специфического для определенных тканей нокаутирования, т.е. нарушения экспрессии исследуемых генов только в отдельных органах или тканях, и изучение их влияния на обмен веществ и физиологические функции целого организма.

Другой подход заключается в торможении экспрессии генов (например, генов СИР) путем ингибирования трансляции их мРНК короткими фрагментами прямых или обратных нуклеотидных последовательностей, соответствующих природным РНК.

1. Нокаутирование генов субстратов инсулинового рецептора.

В ранее проведенных исследованиях с повреждением генов, которые кодируют биосинтез проводников сигнала инсулина, разные авторы показали, что нокаутирование гена СИР-1 во всем организме индуцирует нечувствительность в основном мышц и жировой ткани к действию инсулина, что сопровождается также снижением чувствительности этих тканей к действию ИРФ-I [4,5]. В результате у животных, помимо нарушения функции инсулина, задерживается рост тела, поскольку СИР-1 служит проводником сигналов не только инсулина, но и ИРФ-I, который, в свою очередь является проводником действия гормона роста [1,2,4,5]. Однако у всех мышей с нокаутированным геном СИР-1 не наблюдается заметных нарушений углеводного обмена и не развивается СД. Интересные результаты получены при исследовании мышей с дефицитом СИР-1 после их скрещивания с трансгенными мышами, у которых повышается экспрессия гена ИРФ-I, и резко увеличивается концентрация ИРФ-I в циркулирующей крови [6]. Целью этих исследований было выяснение вопроса о том, не могут ли нарушения, наблюдаемые у мышей с дефицитом СИР-1, компенсироваться повышенной продукцией ИРФ-I, одним из медиаторов биологической функции которого является СИР-1. Проведенные исследования показали, что повышенная экспрессия гена ИРФ-I и увеличение концентрации ИРФ-I в крови не способны компенсировать вызываемые дефицитом СИР-1 нарушение роста экспериментальных животных, которое, однако,

в большей степени преобладает у самок, чем у самцов. Таким образом, полученные данные указывали на важную роль СИР-1 в проведении гормонального сигнала ИРФ-I, а, следовательно, и гормона роста, и вызываемую ими стимуляцию роста мышечной ткани. Удивительность опубликованных результатов заключалась в том, что в отсутствие СИР-1 повышенные концентрации ИРФ-I, в отличие от неспособности увеличивать рост мускулатуры и всего тела при недостатке СИР-1, сохраняли способность стимулировать рост внутренних органов и увеличивали размеры мозга, кишечника и селезенки, которые, однако, не у всех животных достигали нормальных величин [6]. Следовательно, действие ИРФ-I на рост перечисленных внутренних органов, в отличие от стимуляции роста мышечной ткани, могло осуществляться не только через СИР-1, но и через альтернативные медиаторы активации роста: ИРФ-2, Shc и др., которые экспрессируются в некоторых внутренних органах более активно, чем в мышцах, и делают их рост менее зависимым от нарушения функции ИРФ-1 и СИР-1. Интересно, что у самцов сохранялось активирующее действие ИРФ-I также на рост сердца и почек, которое отсутствовало у самок с нокаутированным геном СИР-1, что указывало на сниженную способность самок использовать альтернативные механизмы стимуляции роста этих органов по сравнению с самцами [6].

Поскольку в норме ген СИР-1 экспрессируется в β -клетках, то его отсутствие во всех тканях могло нарушать функцию β -клеток, однако, как уже отмечалось, оно не приводило к развитию СД у животных с нокаутированным геном СИР-1. Другие результаты были получены на животных с нокаутированным геном СИР-2, у которых развивалась нечувствительность печени к действию инсулина, задерживался рост β -клеток в поджелудочной железе, сопровождавшийся уменьшением их общей популяции, снижением секреции инсулина β -клетками, подавлением стимулирующего действия глюкозы на секрецию инсулина и развитием в конечном итоге синдрома СД типа II. Поэтому СИР-2, как проводник гормонального сигнала инсулина, является более важным регулятором углеводного обмена, чем СИР-1, и нарушение его функции может быть одной из причин, вызывающих СД типа II у человека. Неожиданные наблюдения были проведены после нокаутирования генов других проводников действия инсулина: СИР-3 и СИР-4. Блокада экспрессии генов этих белков не оказывала заметного влияния на рост тела и гомеостаз глюкозы. Возможное объяснение полученных результатов заключалось в том, что гены СИР-3 и СИР-4 довольно слабо экспрессируются в большинстве чувствительных к действию инсулина тканей, и СИР-3 в значительном количестве синтезируется в основном в жировой ткани, а СИР-4 – в мозге [7]. Как мы увидим далее, нарушение углеводного обмена в этих тканях оказывает более слабое влияние на общую картину патологических процессов, развивающихся при СД.

Заслуживают внимания результаты исследований с подавлением экспрессии гена рецептора инсулина. Мыши с нокаутированным геном инсулинового рецептора нормально развиваются в эмбриогенезе без симптомов инсулинорезистентности, но быстро умирают сразу после рождения от тяжелой формы кетоацидоза. Животные с нокаутированным геном рецептора ИРФ I, напротив, проявляют задержку роста в эмбриональном развитии при нормальной толерантности к глюкозе, однако также быстро умирают после рождения. Эти исследования показывают, какие изменения происходят в организме после полного удаления соответствующих генов во всех тканях. Они вызывают наиболее сильные изменения фенотипа, однако не дают ответа на вопрос о том, нарушения каких функций и в каких органах в большей степени определяют симптомы СД. Авторы показали, что вклад разных тканей в развитие общей нечувствительности организма к действию инсулина не является одинаковым, и ген инсулинового рецептора по-разному экспрессируется в тканях и регулирует в них разные физиологические функции. Для изучения этого вопроса была использована другая стратегия.

2. Торможение экспрессии генов с помощью ингибирующих РНК. Ингибирующие РНК в виде коротких фрагментов, соответствующих нуклеотидным последовательностям природных мРНК СИР-1 и СИР-2, вызывали торможение их биосинтеза. Короткие фрагменты РНК под контролем разных промоторов, определяющих специфическую их экспрессию в разных тканях, вводили мышам в форме аденовирусов, где они реплицировались, проникали в ткани и ингибировали трансляцию эндогенных мРНК. Аденовирусы СИР-1 и СИР-2 отдельно или в комбинации индуцировали “нокдаун” соответствующих генов *in vivo* и тормозили биосинтез СИР-1 и 2. (Использованный метод получил название нокдаун (knockdown) гена, экспрессия которого тормозится). Такой подход был эффективным, но экспрессию генов блокировал не на 100%. Антисмысловые РНК СИР-1 отдельно или в комбинации с короткими прямыми фрагментами РНК СИР-2 уменьшали количество белка СИР-1, а антисмысловые РНК СИР-2 как отдельно, так и в сочетании с комплементарными РНК СИР-1 тормозили синтез белка СИР-2. При блокаде синтеза СИР-1 уменьшается стимулированное инсулином фосфорилирование этого субстрата. Нокдаун СИР-2 на 50-70% снижает фосфорилирование белков, индуцируемое этим медиатором. Торможение синтеза СИР-2 снижает активность ФИ-3К в печени. Регуляция гомеостаза глюкозы и синтеза ферментов, катализирующих реакции углеводного обмена, под влиянием двух разных СИР (1 и 2) частично перекрывается, но и различается по некоторым показателям. Так, подавление функции СИР-1 в печени снижает биосинтез глюкокиназы (одного из ферментов, катализирующих обмен глюкозы и активируемых инсулином), тогда как блокада синтеза СИР-2 не оказывает подобного действия. С другой стороны, СИР-2 является более важным проводником действия инсулина на триглицериды печени, хотя СИР-1 оказывается более эффективным при регуляции триглицеридов крови.

На основании результатов проведенных исследований авторы делают вывод, что в каждой отдельной ткани функции СИР-1 и СИР-2 не являются одинаковыми, и при проведении сигнала инсулина в различных тканях конечные проявления действия внутриклеточных проводников гормональной активности могут существенно различаться.

3. Влияние сочетанного (двойного) нокаутирования разных генов на углеводный обмен.

Авторы провели сочетанное (двойное) нокаутирование разных генов, белковые продукты экспрессии которых участвуют в регуляции углеводного обмена под действием инсулина, например, гена рецептора инсулина и гена СИР-1, но только в одной из двух аллелей, что приводило к снижению экспрессии каждого гена на 50%. В дальнейшем разные группы животных проявляли различающийся фенотип в зависимости от общего генетического фона. В группе черных мышей СД развивался в течение первых 2 месяцев у 90% гетерозиготных животных с нокаутированными двумя генами, тогда как в другой, с такими же генетическими нарушениями, только 2% мышей через 6 месяцев после рождения проявляли симптомы диабета; даже через 3 года многие из животных этой группы оставались здоровыми. Столь яркое расхождение, по всей вероятности, определялось разным генетическим фоном, обусловившим разную восприимчивость животных к развитию нечувствительности к действию инсулина и СД. Специальное исследование показало, что обнаруженное различие обусловлено особенностями экспрессии неизвестных генов, расположенных на 14 хромосоме. Один участок между двумя сайтами на этой хромосоме проявлял сцепление с инсулинорезистентностью и СД и требовал более детального изучения, которое планируется провести в будущем для идентификации новых генов, определяющих предрасположенность к СД. Сочетание частичных нарушений разных сайтов, участвующих в проведении гормонального сигнала инсулина может с большой вероятностью встречаться у людей и в зависимости от их генетической предрасположенности приводить (или не приводить) к развитию

нечувствительности к действию гормона и, как следствие, к формированию симптомов СД типа II

4. Тканеспецифическое нокаутирование гена рецептора инсулина.

Пожалуй, самые интересные результаты были получены при изучении влияния специфического нокаутирования гена рецептора инсулина в отдельных тканях или органах на развитие инсулинорезистентности и других нарушений физиологических функций, которые наблюдаются у больных СД. Такого рода исследования нацелены на получение ответа на вопрос о том, изменения каких функций и в каких органах несут наибольшую ответственность за различные формы патологии при СД. Для этого использовали специальную технологию, которая стала очень популярной в последних исследованиях молекулярных биологов в эндокринологии.

В бактериях существует особая ДНК-рекомбиназа – сге-рекомбиназа, которая катализирует расщепление и перераспределение ДНК-последовательностей по локусам *LoxP*, которые являются сайтами кроссинговера. В норме такие локусы и фермент отсутствуют в геноме млекопитающих. При проведении исследований в нуклеотидные последовательности генов мышей вводят сайты *LoxP*, обычно в интроны, фланкирующие один или несколько экзонов или весь ген, подлежащий нокаутированию. Таких животных скрещивают с мышами, в ДНК которых встроен ген сге-рекомбиназы под контролем тканеспецифического промотора, определяющего экспрессию этого гена только в мышцах, только в жировой ткани, только в печени или только в любой другой ткани. После скрещивания в потомстве рождаются мыши, у которых нокаутирование гена рецептора инсулина происходит только в тех тканях, где экспрессируется ген сге-рекомбиназы. В результате многолетних исследований были выведены серии линий мышей с нарушением экспрессии гена инсулинового рецептора в мышцах, в жировой ткани, в печени, в мозгу, в β -клетках поджелудочной железы, в эндотелии кровеносных сосудов, и исследованы фенотипы и наблюдаемые у животных нарушения физиологических функций.

У мышей с нокаутированным геном инсулинового рецептора в мышцах развивается нечувствительность мышечной ткани к действию гормона, однако у них не наблюдается каких-либо нарушений углеводного обмена или гомеостаза глюкозы, поскольку чувствительность печени, жировой ткани и других органов к действию инсулина сохраняется. Поглощение глюкозы жировой тканью при этом даже увеличивается, что способствует превращению углеводов в липиды, стимулирует накопление подкожного жира, вызывает разрастание жировой клетчатки и повышение уровня триглицеридов печени, которое сочетается с увеличением содержания свободных жирных кислот в крови и печени. Поэтому мыши с нокаутированным геном инсулинового рецептора в мышцах страдают ожирением, проявляют некоторые (но не все) симптомы метаболического синдрома, однако при полной нечувствительности мышечной ткани к действию инсулина у них сохраняется нормальная толерантность к глюкозе и не развивается СД. У животных на 53% увеличивается масса белой жировой ткани (в результате гиперплазии, а не гипертрофии адипоцитов), и количество клеток подкожной жировой клетчатки увеличивается на 48%. Однако размеры адипоцитов остаются нормальными и сохраняют высокую чувствительность к действию инсулина в отличие от других форм ожирения, когда она резко падает. В крови мышей на 40% увеличивается концентрация адипонектина – известного активатора чувствительности организма к действию инсулина, секретируемого в кровь жировой тканью. Животные сохраняют нормальную чувствительность к действию лептина, продуцируемого адипоцитами, и, несмотря на развитие ожирения, у них не повышается концентрация лептина в циркуляции, которая всегда увеличивается при всех других формах ожирения [8].

Аналогичная технология была использована для избирательного нарушения функции инсулинового рецептора в печени. При этом у мышей развивался фенотип, по ряду показателей, сходный с СД типа II. Животные проявляли

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА САХАРНОГО ДИАБЕТА

признаки нарушения толерантности к глюкозе и повышенный уровень циркулирующего инсулина, но поскольку в печени отсутствовал рецептор инсулина, то гормон не стимулировал ее рост, что уменьшало размеры печени и приводило к нарушению ее нормальной функции. Поэтому развитие невосприимчивости печени к действию инсулина вызывало более сильные нарушения углеводного обмена, близкие к тем, которые наблюдаются при СД, чем аналогичное повреждение гена рецептора инсулина в мышечной ткани. С другой стороны, инсулинорезистентность мышц, в отличие от нечувствительности к действию инсулина самой печеночной ткани, приводила к более выраженным изменениям липидного обмена именно в печени, обычно наблюдаемым при метаболическом синдроме, чем блокада экспрессии гена рецептора инсулина в самой печени.

Нечувствительность мышечной ткани к действию инсулина развивается также у людей в состоянии предиабета. У них мышцы также теряют способность использовать глюкозу в энергетическом обмене и переключаются на обмен липидов, что стимулирует биосинтез жиров в печени и увеличивает накопление жировых запасов во всем теле при полном отсутствии других нарушений обмена веществ, присущих СД типа II. Однако при усугублении этого процесса в дальнейшем у пациентов развивается СД.

Очень интересные и неожиданные данные получены на животных с нокаутированным геном инсулинового рецептора в жировой ткани. Ожирение является одним из наиболее ярких проявлений метаболического синдрома и СД типа II. Однако следует отметить, что, хотя жировая ткань входит в состав органов-мишеней действия инсулина, она сама является эндокринным органом и секретирует в кровь ряд гормонов, влияющих на инсулинорезистентность (лептин, фактор некроза опухоли α , интерлейкин 6 и др.). Кроме того, она вырабатывает адипонектин, повышенная секреция которого жировой тканью увеличивает чувствительность тканей к действию инсулина и таким образом поддерживает эффективность его гормональной регуляции. Поэтому присутствие адипонектина в организме становится важным фактором нормальной регуляции углеводного обмена и других физиологических функций инсулином.

Первое, что авторы наблюдали у мышей с нокаутированным геном инсулинового рецептора в жировой ткани, это уменьшение жировых запасов на 50-60%. В дальнейшем животные оставались худыми и с возрастом сохраняли повышенную устойчивость к развитию ожирения. Даже при искусственной стимуляции потребления пищи они не обнаруживали заметного увеличения массы тела. У них сохранялась нормальная чувствительность к действию инсулина и не наблюдалось нарушений толерантности к глюкозе. В свете этих наблюдений становится понятным, почему нокаутинг гена СИР-3, который в основном экспрессируется в жировой ткани, не вызвало заметных нарушений углеводного обмена в целом организме (см. выше).

Вообще нокаутинг гена инсулинового рецептора в жировой ткани оказывало благоприятное положительное воздействие, поскольку у животных снижалась смертность и увеличивается продолжительность жизни. Максимальный срок жизни обычных мышей составляет 33-36 месяцев, а у опытных животных со сниженной массой тела он возрастает на 20 %, и если 50% интактных животных умирает через 30 месяцев после рождения, то через такой же период времени около 80% опытных продолжают жить. Эти результаты еще раз подчеркивают важность сохранения нормального веса и уменьшения жировых запасов для увеличения продолжительности жизни, а снижение эффективности действия инсулина на жировую ткань при этом может оказаться даже полезным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В заключение следует подчеркнуть, что не менее интересные результаты получены при изучении действия блокады синтеза рецептора инсулина в других тканях, которые раньше не рассматривали в качестве органов-мишеней действия гормона, такие как β -клетки поджелудочной железы,

мозг и эндотелий кровеносных сосудов. Во всех предыдущих работах обычно исследовали связывание инсулина с рецептором в мышцах и печени, поскольку считали, что через регуляцию обмена веществ, главным образом, в этих органах инсулин выполняет свои основные физиологические функции, и анализировали чувствительность именно этих тканей к действию гормона. Последующие опыты показали, что рецептор инсулина и рецептор ИРФ-1 синтезируются также в β -клетках, и в них определяются другие проводники гормонального сигнала инсулина. СИР, ФИ-3К и др. Более того, глюкоза и инсулин стимулируют фосфорилирование рецептора инсулина и белков СИР в β -клетках, а инсулин повышает накопление внутриклеточного кальция и увеличивает секрецию гормона поджелудочной железой. Однако наиболее убедительные доказательства необходимости нормального действия инсулина на β -клетки для регуляции биохимических процессов в организме были получены в опытах с нокаутированием в них гена рецептора инсулина, которое сочеталось либо с нокаутированием генов СИР 1 или СИР 2, либо с их нокдауном. В этих исследованиях дефицит СИР-1 вызывал инсулинорезистентность, гиперплазию β -клеток и снижение активирующего действия глюкозы на секрецию инсулина, а недостаточность СИР-2, напротив, приводила не к гиперплазии, а к задержке роста β -клеток, поскольку СИР-2 необходим для их нормального роста и пролиферации, и в конечном итоге индуцировала снижение общей массы β -клеток и заметно уменьшала секрецию ими инсулина.

На основании накопленных данных можно было ожидать, что нокаутирование гена инсулинового рецептора в β -клетках должно вызывать нарушение толерантности к глюкозе, и авторы подтвердили это в своих исследованиях. Более того, у 20% животных с дефицитом рецептора инсулина в β -клетках развивался диабет. Эти данные показывают, что при определенных обстоятельствах нарушение механизмов действия инсулина в β -клетках может быть достаточным для развития СД типа II, и есть основания полагать, что у человека такая форма диабета может развиваться в результате потери β -клетками способности реагировать на действие эндогенного инсулина. Естественно, изучение этой проблемы на людях представляется довольно трудной задачей, поскольку β -клетки человека недоступны для прямых экспериментальных исследований. Тем не менее, авторы провели определение в β -клетках людей, страдающих СД типа II, некоторых показателей эффективности экспрессии генов белков - проводников сигналов инсулина. Как оказалось, содержание мРНК рецептора инсулина у них было на 75% ниже, чем у здоровых людей. Уровень СИР-2 снижен на 85%, а активность фосфатазы, которая препятствует проведению гормонального сигнала инсулина, значительно повышена. Таким образом, все основные ключевые звенья действия инсулина в β -клетках больных СД проявляют признаки нарушений, которые у мышей вызываются непосредственно повреждением генов белков, являющихся проводниками гормонального сигнала инсулина.

Новым чувствительным к действию инсулина органом является мозг, поскольку ген инсулинового рецептора активно экспрессируется в различных нервных структурах и принимает участие в регуляции роста и дифференцировки нервных тканей, а нарушение функции рецептора инсулина в мозгу приводит у человека к нейродегенеративным заболеваниям типа болезни Паркинсона. Интересно, что в гипоталамусе ген рецептора экспрессируется в тех же клетках, в которых синтезируется рецептор лептина, и в действиях двух гормонов на нейроны гипоталамуса обнаруживается много общего. В частности, каждый из них в отдельности снижает экспрессию гена белка, родственного белку Агути (Agouti Gene Related Peptide – AGRP), повышающего аппетит, и одновременно стимулирует экспрессию гена и синтез α -МСГ, который в нормальных условиях связывается с рецептором MC4-R и снижает чувство голода, а AGRP, как известно, тормозит проведение сигнала α -МСГ в нейронах гипоталамуса через рецептор MC4-R и у здоровых животных вызывает повышение аппетита. В результате

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА САХАРНОГО ДИАБЕТА

эффективность действия двух гормонов (инсулина и лептина) в нейронах не только суммируется, но они вместе вызывают более сильное снижение аппетита и потребления пищи, чем получающееся после их простого сложения. У мышей с нокаутированным геном рецептора инсулина не выявляется связывание инсулина с рецептором в структурах мозга, и развиваются все перечисленные ниже нарушения, однако механизмы проведения гормонального сигнала лептина, включая и его связывание с рецептором, при этом полностью сохраняются.

Животные с нокаутированным геном рецептора инсулина в мозге, которое блокирует проведение гормонального сигнала инсулина в нейронах гипоталамуса, имеют повышенный аппетит, потребляют много пищи и страдают ожирением (содержание жира в их теле вдвое превышает норму). Содержание лептина в циркулирующей крови у них возрастает в результате увеличения жировых запасов, секретирующих этот гормон. У животных развивается резистентность к действию инсулина, повышается содержание гормона в крови (гиперинсулинемия) и увеличивается концентрация триглицеридов плазмы. Все эти нарушения вызываются блокадой экспрессии гена инсулинового рецептора в структурах мозга, и развиваются в результате нечувствительности нервной ткани к действию инсулина.

Естественно, нейроны головного мозга регулируют не только перечисленные функции. Специальные нейроны синтезируют релизинг-гормон гонадотропинов (ГРГ, Gonadotrophin-Releasing Hormone – GNRH) и участвуют в регуляции репродукции, другие реагируют на гипогликемию крови и увеличивают секрецию адреналина и норадреналина. Однако животные, мозг которых не чувствителен к действию инсулина, проявляют сниженную реакцию на адреналин и норадреналин, что вызывает отклонение в нормальной регуляции многих физиологических процессов. Полученные результаты указывают на важное участие инсулина в поддержании нормальной функции нервной системы через проведение инсулиновых сигналов в нейронах.

Заслуживают внимания результаты опытов с нокаутированием гена рецептора инсулина в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, которые также ранее считали нечувствительными к действию гормона. В них экспрессируются гены рецептора инсулина, рецептора ИРФ-1 и многих проводников гормонального сигнала, характерных для известных чувствительных к действию инсулина органов. Для этих целей использовали разработанную технологию рекомбинации LoxP-сайтов в гене рецептора под действием стерекомбиназы. Специальная проверка показала, что у экспериментальных животных рецептор инсулина действительно не синтезируется в эндотелиальных клетках, однако по внешнему виду и многим другим показателям (продолжительность жизни, репродукция, развитие кровеносной системы) они не отличаются от нормальных мышей. Животные имеют нормальное содержание инсулина и глюкозы в крови, нормальное или сниженное кровяное давление, хотя отсутствие рецептора инсулина должно было препятствовать проникновению инсулина и глюкозы внутрь эндотелия и, возможно, нарушать транспорт сахаров через сосудистую стенку. Более внимательный анализ показал, что мыши проявляют некоторую тенденцию к развитию инсулинорезистентности, однако не обнаруживают существенных изменений физиологических функций, которые наблюдаются после нокаутирования гена рецептора инсулина в других органах.

Большой интерес представлял вопрос о том, как дефицит рецептора инсулина в эндотелии может повлиять на развитие диабетической ретинопатии, которая интенсивно прогрессирует при плохом контроле СД и замедляется при более эффективном его лечении. При анализе результатов этих исследований необходимо было учитывать, что в некоторых случаях раннее начало инсулинотерапии оказывается неэффективным у человека и часто сочетается с тяжелой формой ретинопатии. Проведенные наблюдения указывали на возможное участие самого инсулина в активации патологического процесса, когда прямое действие гормона на эндотелиальные клетки оказывает негативное влияние на процессы васкуляризации. Повышенное разветвление кровеносных сосудов

происходит у нормальных мышей при увеличении объема потребляемого кислорода, но она значительно (на 60%) уменьшается в тех же условиях у мышей с дефицитом рецептора инсулина в эндотелиальных клетках, когда прямое действие гормона на эти клетки заблокировано. При этом значительно (на 50%) уменьшается концентрация циркулирующего фактора роста эндотелия сосудов, секреция которого в нормальных условиях стимулируется инсулином, а у экспериментальных животных снижена, что приводит к уменьшению васкуляризации и может тормозить развитие ретинопатии.

Таким образом, проведенные исследования раскрывают и уточняют некоторые стороны регуляции обмена веществ и физиологических функций в различных органах и тканях под влиянием инсулина и позволяют уточнить механизмы, вызывающие развитие осложнений при СД типа II.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Панков Ю А (1999) *Биохимия*, **64**, 93-97
- 2 Панков Ю А (2001) *Мол биол*, **35**, 315-317
- 3 Sajan M P, Standaert M L, Miura A et al (2004) *Molecular Endocrinology*, **18**, 2513-2521
- 4 Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K et al (1994) *Nature*, **372**, 182-186
- 5 Araki E, Lipes M A, Patti M E et al (1994) *Nature*, **372**, 186-190
- 6 Pete G, Fuller C R, Oldham J M et al (1999) *Endocrinology*, **140**, 5478-5487
- 7 Goren H J, Kulkarni R N, Kahn C R (2004) *Endocrinology*, **145**, 3397-3323
- 8 Cariou B, Postic C, Boudou P et al (2004) *Endocrinology*, **145**, 1926-1932

Поступила 20 01 2005

MOLECULAR GENETICS OF NON-INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

Yu. A. Pankov

Endocrine Research Centre of RAMS, Moscowvorchye str 1, Moscow, 115478 Russia,
e-mail yuri-pankov@mti-net.ru

Tissue specific insulin receptor knockout mice have been employed to study the features of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) at Research Division, Joslin Diabetes Center Boston, Massachusetts. The muscle insulin receptor knockout (MIRKO) mice display muscle insulin resistance but do not develop hyperinsulinemia or diabetes. White adipose tissue of MIRKO mice have increased the sensitivity to insulin and its glucose uptake is dramatically elevated that activates fat accumulation and induces obesity which results from an increase in adipocyte number (hyperplasia) of the same size as well as individual cells in the control mice. MIRKO mouse adipose tissue increased secretion of adiponectin that increases the insulin sensitivity and do not alter the leptin production. The liver insulin receptor knockout (LIRKO) mice develop a syndrome like NIDDM with hyperinsulinemia and hyperglycemia, decreased liver size and its function since insulin is an important liver growth factor but they do not suffer with fat accumulation. The fat tissue insulin receptor knockout (FIRKO) mice become lean with the 50-60 % reduction of fat masses. FIRKO mouse remains resistant to obesity with age and as a result it has high insulin sensitivity and normal glucose tolerance. They eat normal amount of food, increase the longevity of life and decrease the mortality. The β -cell insulin receptor knockout in combination with the insulin receptor substrates 1 or 2 or both knockouts mice develop β -cell insensitivity to insulin and the insensitivity to the stimulation of insulin secretion by glucose. The animals show the alterations of β -cell growth and 20 % of experimental mice develop II type diabetes. The brain insulin receptor knockout (BIRKO) mice are obese and insulin resistant. They have increased appetite, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and decreased responses of neurons to epinephrine. The endothelial cell insulin receptor knockout mice have the normal levels of insulin and glucose in the circulation and the normal or decreased blood pressure. They look healthy but have decreased level of the vascular endothelial growth factor in blood which may prevent the development of retinopathy as NIDDM complication.

Key words: insulin, receptor, signal transduction, gene knockout, insulin resistance