

◆ ОБЗОРЫ

© Д. Н. ЛАПТЕВ, 2009

УДК 615.276.2/.4.03:616.379-008.64-085

Д. Н. Лаптев

ИММУНОТЕРАПИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ЕЕ ПЕРСПЕКТИВЫ. ЧАСТЬ 2

ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий, Москва

В обзоре обобщены экспериментальные данные проведенных иммунологических исследований при сахарном диабете. Представлены основные иммунотерапевтические направления при сахарном диабете, описаны предполагаемые механизмы создания иммунологической толерантности. Приводится краткий обзор проведенных и проводимых в настоящее время клинических исследований.

Ключевые слова: сахарный диабет, иммунотерапия, моноклональные антитела.

D.N. Laptev

IMMUNOTHERAPY OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS: CURRENT STATE-OF-THE-ART AND PROSPECTS. PART 2

Endocrinological Research Centre, Federal Agency of Public Health and Social Development (Roszdrav), Moscow

This review summarizes experimental findings obtained in immunological studies of diabetes mellitus. Principal immunotherapeutic approaches to the treatment of diabetes are described. Putative mechanisms behind the development of immunotolerance are considered. A brief summary of previously reported and on-going clinical studies is presented.

Key words: diabetes mellitus, immunotherapy, monoclonal antibodies

Антигеннеспецифичная терапия после манифестации сахарного диабета**Завершенные исследования**

В качестве одного из первых иммунотерапевтических препаратов (ИТП) для профилактики и лечения сахарного диабета (СД) 1-го типа был использован циклоспорин, который быстро давал протективный эффект. Однако эффект применения циклоспорина заканчивался с прекращением терапии, а серьезные побочные эффекты, в первую очередь нефротоксичность, сделали его использование неприемлемым как для клинического применения, так и для широкого научного исследования [3, 11, 17, 29, 38]. Азатиоприн в суточной дозе 2 мг/кг также давал незначительный позитивный эффект при менее выраженных побочных явлениях (табл. 1).

Линомид (Linomide, quinoline-3-carboxamide; не путать с препаратом линамид (лат. — Lunamide, международное название — Pyrazinamide), применяющимся для лечения туберкулеза) является иммуномодулятором, который при введении NOD-мышам с 5-недельного возраста в дозе 0,02 мг/дл предотвращает развитие СД [19]. Даже у животных старше 16-недельного возраста линомид сохраняет свою активность. Механизм его действия может быть связан с индукцией активации регуляторных клеток. Предотвращение диабета у NOD-мышей сочетается с устранением Т-клеточного пролиферативного дефекта [26] и улучшением регуляции Т-клеточной трансдукции сигнала p21ras [34]. Кроме того, линомид уменьшает продукцию фактора некроза опухолей (ФНО) [18], стимулирует натуральные киллеры (НК) [22] и, возможно, ингибирует процесс апоптоза β-клеток [13]. Показано также, что линомид подавляет апоптоз в гепатоцитах, вызываемый Fas-антителами [35]. Линомид дал хороший

протективный эффект на различных экспериментальных моделях, таких, как аутоиммунный энцефаломиелит, миастения гравис, гломерулонефрит. К настоящему времени проведено единственное клиническое исследование линомида при СД 1-го типа [13]. 63 пациента в возрасте 10—20 лет с недавно диагностированным СД 1-го типа (не более 10 дней) были рандомизированы в 2 группы: 1-я группа — 42 человека получали линомид в течение 1 года в дозе 2,5 мг, 2-я группа — контрольная. Через 9 и 12 мес уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) был на 10—15% ниже у больных, получавших линомид ($p = 0,003$ и $p < 0,05$ соответственно). Доза инсулина была также ниже на 32—40% на фоне применения линомида на 3-м ($p < 0,03$), 6-м ($p < 0,02$), 9-м ($p < 0,001$) и 12-м месяце ($p = 0,01$), секреция С-пептида была выше в группе, получавшей лечение, однако недостоверно. Из побочных эффектов линомида у больных СД были зарегистрированы лишь незначительная транзиторная анемия, тромбоцитопения и субъективные боли в суставах. Однако зарегистрировано 13 случаев экссудативного перикардита среди 754 пациентов с рассеянным склерозом и лейкоемией, получавших линомид [23]. И хотя в этом исследовании не выявлено тяжелых осложнений, высокая кардиоваскулярная токсичность послужила поводом для прекращения нескольких клинических исследований по линомиду.

Диазоксид является АТФ-чувствительным активатором K⁺-каналов, который ингибирует секрецию инсулина. Было установлено, что экспрессия аутоантигенов регулируется концентрацией глюкозы и увеличивается при стимуляции секреции инсулина [7, 20]. Постепенно увеличивающаяся концентрация глюкозы приводит к повышенной чувствительности клеток, к деструктивному действию стрептозоцина [15], которое, как было показано на животных моделях, может быть предотвращено введением диазоксидина [25]. У людей снижение функции β-клеток носит частичный характер и не всегда достижимо, что в исследованиях отражается различным уровнем секреции С-пептида за время лечения [8]. Тем не менее применение диазоксидина может приводить к сохранению остаточной

Для контактов:

Лаптев Дмитрий Никитич, канд. мед. наук, науч. сотр.
Телефон/факс: 8-499-124-02-66
E-mail: laptevdn@ya.ru

секреции инсулина и задерживать период ремиссии. Результаты применения диазоксид у детей хуже, чем у взрослых [31]. Высокая частота несерьезных осложнений и меньшая эффективность диазоксид у детей делают его применение в этой группе менее привлекательным. Появ-

ление новых высокоселективных АТФ-чувствительных активаторов K^+ каналов в сочетании со стандартной инсулинотерапией и/или другими методами иммунотерапии может быть перспективным направлением.

Таблица 1

Антигеннеспецифичная иммунотерапия после манифестации СД 1-го типа

Иммунотерапевтический препарат	Название и статус исследования	Количество участников и критерии включения в исследование	Путь введения и дозировка препарата	Результат	Источник
<i>Завершенные исследования</i>					
Циклоспорин	Ряд исследований в период с 1986 по 1996 г.	—	—	Отсутствие длительного эффекта, серьезное побочное действие	[3, 11, 17, 29, 38]
Азатиоприн	Завершено в 1989 г.	49 больных СД 1-го типа в возрасте 2—20 лет с длительностью заболевания не более 20 дней	Перорально 2 мг/кг/сут в течение 12 мес	Незначительный эффект: непродолжительное увеличение секреции С-пептида натощак	[24]
Азатиоприн + кортикостероиды	Завершено в 1988 г.	46 больных СД 1-го типа в возрасте 4,5—32,8 года с длительностью заболевания не более 2 нед	Перорально азатиоприн 2 мг/кг/сут в течение 12 мес, кортикостероиды в течение 10 нед	50% лиц из группы, получавшей лечение, и 15% из контрольной группы достигли компенсации: уровень HbA_{1c} менее 6,8%, стимулированный С-пептид более 0,5 нмоль/л, доза инсулина менее 0,4 Ед/кг/сут	[12]
Nicotinamide отдельно и в сочетании с циклоспорином	IMDIAB 1 Завершено Пилотное	90 пациентов с недавно выявленным СД (менее 4 нед)	Никотинамид 25 мг/кг/сут или никотинамид 25 мг/кг/сут + циклоспорин-А 5 мг/кг/сут	Отсутствие эффекта	[32]
Антитимоцитарный глобулин и преднизолон	Завершено Пилотное	—	—	Уменьшение соотношения T4/T8, снижение уровня HbA_{1c} и потребности в инсулине, серьезная тромбоцитопения	[14]
БЦЖ	Завершено Пилотное	94 детей и подростков в возрасте 5—18 лет с длительностью СД 1-го типа не более 4 мес	0,1 мл ($2 \cdot 10^6$ КОЕ) внутривенно, однократно	Отсутствие эффекта: ремиссия отмечена у 1 пациента из основной группы и 1 пациента из группы, получавшей плацебо	[2]
БЦЖ	Завершено Пилотное	26 больных СД 1-го типа, средний возраст 12,8 года (основная группа) и 13,4 года (контрольная группа) с длительностью заболевания не более 1 года, уровень базального С-пептида более 0,06 нмоль/л	0,1 мл ($2 \cdot 10^6$ КОЕ) внутривенно, однократно	Отсутствие эффекта	[16]
Диазоксид	Завершено	20 больных СД 1-го типа в возрасте 19—38 лет с впервые выявленным СД	—	Более высокая остаточная секреция инсулина в группе, получавшей лечение, отсутствие различий в метаболическом контроле и уровне антител	[31]
Диазоксид	Завершено	56 детей и подростков больных СД 1-го типа в возрасте 7—17 лет включены в исследование в течение 1 нед после 1-й инъекции инсулина	5—75 мг/кг 3 раза в сутки в течение 3 мес	Удлинение периода ремиссии, сохранение более высокой остаточной секреции инсулина. Побочные эффекты	
IFN- α	Завершено	10 пациентов с длительностью СД 1-го типа не более 1 мес	30 000 МЕ перорально	Увеличение секреции С-пептида у 8 пациентов минимум на 30%, отсутствие видимых осложнений	[10]

Иммунотерапевтический препарат	Название и статус исследования	Количество участников и критерии включения в исследование	Путь введения и дозировка препарата	Результат	Источник
Анти-CD3 МКАТ hОКТ3γ1(Ala-Ala)	Завершена 1-я фаза	24 больных СД 1-го типа в возрасте 7,5–30 лет в течение 6 нед после манифестации болезни	14 дней: 1-й день — 1,42 мкг/кг; 2-й день — 5,67 мкг/кг; 3-й день — 11,3 мкг/кг; 4-й день — 22,6 мкг/кг; 5–14-й дни — 45,4 мкг/кг	Сохранение или улучшение секреции С-пептида, снижение уровня HbA _{1c} и суточной дозы инсулина через 12 мес у 10 из 12 больных СД 1-го типа, получавших лечение	[21]
Анти-CD3 моноклональные антитела ChAglyCD3	Завершена 2-я фаза	80 больных СД 1-го типа в возрасте 12–39 лет с уровнем секреции С-пептида выше 0,2 нмоль/л, в течение 4 нед после начала инсулинотерапии	Внутривенно 8 мг — 6 последовательных инъекций	Сохранение или улучшение секреции С-пептида, сохранение уровня HbA _{1c} и суточной дозы инсулина через 18 после лечения	[24]
Линомид (quinoline-3-carboxamide)	Закончено 1998 г.	63 пациента в возрасте 10–20 лет с длительностью СД 1-го типа менее 10 дней	2,5 мг/сут перорально в течение 1 года	Достоверное снижение уровня HbA _{1c} и суточной дозы инсулина в группе, получавшей линомид, побочные эффекты. Кардиоваскулярная токсичность	[35]
<i>Исследования, проходящие в настоящее время</i>					
Анти-CD3 моноклональные антитела hОКТ3γ1(Ala-Ala; Teplizumab)	AbATE Trial (Autoimmunity-blocking antibody for tolerance in early type 1 diabetes)	Планируется включить в исследование 81 участника в возрасте 8–30 лет в течение 6 нед после манифестации СД 1-го типа	Внутривенно	—	http://www.abatetrial.org
Анти-CD3 моноклональные антитела hОКТ3γ1(Ala-Ala; Teplizumab)	Protégé study Продолжается	530 человек из 10 стран в возрасте 8–35 лет, диагноз СД 1-го типа поставлен в течение 12 нед до включения в исследование	Внутривенно	—	http://www.mac.rogenics.com/pipe-line/autoimmunity.mspix
Анти-CD3 моноклональные антитела hОКТ3γ1(Ala-Ala; Teplizumab)	Anti-CD3 mAb Treatment of Recent Onset Type 1 Diabetes Продолжается	Планируется включить в исследование 60 пациентов в возрасте 8–30 лет с длительностью СД 4–12 мес	Внутривенно 14 дней, суточные дозы: 51 мкг/м ² , 103 мкг/м ² , 207 мкг/м ² , 413 мкг/м ² и 10 инъекций 826 мкг/м ²	—	NCT00378508*
Анти-CD3 моноклональные антитела (TRX4 Otelixizumab)	DEFEND-1 (Durable-Response Therapy Evaluation For Early or New-Onset Type 1 Diabetes) Продолжается	Планируется набрать 240 больных СД 1-го типа в возрасте 18–35 лет с длительностью болезни не более 90 дней	—	—	NCT00678886* http://www.tolerrx.com
Анти-CD3 моноклональные антитела (TRX4 Otelixizumab)	TTEDD (Therapeutic Evaluation of Different Multi-Dose Regimens in Type 1 Diabetes Mellitus) Продолжается	Планируется набрать 100 больных СД 1-го типа в возрасте 18–60 лет с определяемым уровнем С-пептида	—	—	NCT00451321* http://www.tolerrx.com
Анти-CD20 моноклональные антитела (Rituximab)	Rituximab Study Продолжается	Больные СД 1-го типа в возрасте 8–45 лет с длительностью заболевания не более 3 мес	Внутривенно	—	http://www2.diabetestrial-net.org/oant1
Антитимоцитарный глобулин (полноклональные анти-Т-клеточные антитела)	Polyclonal Anti-T-Lymphocyte Globulin (ATG) in Type 1 Diabetes Продолжается	24 участника в возрасте 15–35 лет с длительностью СД 1-го типа не более 6 нед и стимулированной секрецией С-пептида ≥ 0,3 пмоль/мл	Внутривенно 4 дозы: 1-я — 9 мг/кг, затем 3 последовательные дозы по 3 мг/кг	—	NCT00190502*
Анти-CD52 моноклональные антитела Campath-1H (Alemtuzumab)	Прекращено до начала набора пациентов	—	Внутривенно	—	NCT00214214*

Иммунотерапевтический препарат	Название и статус исследования	Количество участников и критерии включения в исследование	Путь введения и дозировка препарата	Результат	Источник
Стволовые клетки пуповинной крови	Umbilical Cord Blood Infusion to Treat Type 1 Diabetes Продолжается	23 ребенка старше 1 года с сохраненной пуповинной кровью	—	—	NCT00305344*
Аутологичные дендритные клетки (Diabetes-suppressive dendritic cell vaccine)	Продолжается	15 больных СД 1-го типа в возрасте 18—35 лет с длительностью болезни более 5 лет	—	—	NCT00445913*
Культированные ex vivo мезенхиальные стволовые клетки взрослого человека (PROCHYMAL™)	Продолжается	Планируется набрать в исследование 60 больных СД 1-го типа в возрасте 18—30 лет с длительностью болезни от 2 до 16 нед	Внутривенно	—	NCT00690066* http://www.osiristx.com/
CTLA-4 Ig (Abatacept)	Продолжается	Планируется набрать в исследование 108 больных СД 1-го типа в возрасте 6—45 лет с длительностью болезни не более 100 дней	Внутривенно	—	http://www2.diabetestrial-net.org/ctla4 NCT00505375*

Примечание. * — Идентификатор клинических исследований (<http://www.ClinicalTrials.gov>).

hOКТ3γ1(Ala-Ala) и *ChAglyCD3(Teplizumab)* являются рекомбинантными моноклональными антителами (МКАТ) с мутированным или агликозилированным Fc-регионом соответственно, которые связываются с CD3 (Т-клеточным рецептором) Т-клеток человека. У этих МКАТ имеется измененный Fc-фрагмент, делающий связывание с Fc-рецептором невозможным. Связывание с этим рецептором в норме приводит к активации Т-клеток с высвобождением цитокинов. МКАТ, направленные против CD3, приводят только к синдрому кратковременного выделения цитокинов с потерей или перераспределением Т-клеток, однако сразу после курса лечения восстанавливается полная иммунокомпетентность с увеличением популяции CD4⁺ CD25⁺ Т-клеток, экспрессирующих FoxP3-транскрипционный фактор, которая, как считается в настоящее время, выполняет иммунорегуляторную функцию. FoxP3 (Fork-head Box Protein 3) входит в состав fork-head-семейства белковых транскрипционных факторов. FoxP3-белки являются важнейшим элементом в дифференциации и развитии регуляторных Т-клеток [1]. Увеличение популяции этих Т-клеток может быть связано с длительной защитой β-клеток после курса МКАТ. Хотя механизм действия анти-CD3 МКАТ не вполне ясен, показано, что короткий курс лечения ими приводит к снижению уровня аутоагрессивных Т-клеток вместе с увеличением популяции регуляторных Т-клеток, экспрессирующих α-цепь рецептора ИЛ-2 (CD25), опосредованную TGF-β [4]. Как показано в двух завершённых к настоящему времени исследованиях это сопровождается улучшением секреции С-пептида, снижением уровня HbA_{1c} и дозы инсулина [21, 24]. Получение положительных результатов от применения анти-CD3 МКАТ способствовало началу еще нескольких исследований в этом направлении (см. табл. 1).

Otelixizumab (TRX4, ChAglyCD3) разработан совместно "Tolerx" (США) и "GlaxoSmithKline" (Великобритания) специально для лечения СД 1-го типа, в отличие от других анти-CD3 МКАТ. Однако производители в дальнейшем планируют использовать *Otelixizumab* и для лечения других болезней, таких, как псориаз и ревматоидный артрит. В настоящее время продолжается набор в III фазу центрального исследования DEFEND-1 (Durable-Response Therapy Evaluation For Early or New-Onset Type 1 Diabetes), а также продолжается II фаза исследования TTEDD (Therapeutic Evaluation of Different Multi-Dose

Regimens in Type 1 Diabetes Mellitus), целью которого является изучение режимов дозировки препарата.

К сожалению, повысить эффективность применяемых в настоящее время анти-CD3 МКАТ путем увеличения дозы не представляется возможным, даже в используемых сейчас дозах МКАТ приводят к реактивации латентно протекающей вирусной инфекции Эпштейна-Барр [24] и продукции антител к самим МКАТ [21]. Таким образом необходимо искать новые подходы к применению МКАТ, например используя их до манифестации СД или в комбинации с другими иммунотерапевтическими препаратами.

CD20 — пан-В-маркер, как и *CD19*, часто использующийся для идентификации В-клеток. *CD20* — фосфопротеин, молекулярная масса которого равна 33—37 кД, экспрессирован у человека и мышей только на В-лимфоцитах. У человека он встречается как на покоящихся, так и на активированных В-лимфоцитах, но отсутствует на плазматических клетках. *CD20* принимает участие в В-клеточной активации и В-клеточной пролиферации. Моноклональные антитела к *CD20* (*Rituximab*) ингибируют клеточную пролиферацию, вызванную анти-Ig. *Rituximab* одобрен FDA для лечения В-лимфоцитарных лимфом. В настоящее время проводится исследование по его клиническому применению при СД 1-го типа.

Стволовые клетки представляют перспективный метод лечения СД 1-го типа. Пересадки костного мозга давно уже используются для терапии больных с различными опухолевыми процессами, пациентов, подвергшихся химиотерапии, а также для лечения различных аутоиммунных заболеваний, таких, как рассеянный склероз, красная волчанка и ревматоидный артрит. Недавние исследования на мышах с иммунодефицитом показали, что стволовые клетки костного мозга могут инициировать регенерацию β-клеток. Пуповинная кровь представляет собой идеальный источник стволовых клеток, в ней содержится гораздо больше стволовых клеток, чем в костном мозге. Пуповинная кровь успешно используется для лечения острого лимфобластного и миелобластного лейкоза, лимфом и т. д. Кроме того, пуповинная кровь содержит большое количество так называемых регуляторных Т-клеток. Эти клетки могут уменьшить аутоиммунные процессы. Необходимость восстановления иммунологической толерантности у больных СД 1-го типа делает применение стволовых клеток пуповинной крови у этой категории больных очень перспективным. В настоящее

время Университетом Флориды (США) проводится исследование по применению стволовых клеток пуповинной крови у больных старше 1 года с впервые выявленным СД 1-го типа и замороженной пуповинной крови. Цель переливания аутологичной пуповинной крови состоит в попытке восстановить иммунологическую толерантность и, возможно, вызвать регенерацию панкреатических β -клеток. Также в процессе исследования будут изучены потенциальные изменения в метаболических/иммунных функциях, приводящие к регенеративным процессам.

Активным компонентом препарата PROCHYMAL™ ("Osiris Therapeutics, Inc.", США) являются культивированные *ex vivo* мезенхиальные (печеночные) стволовые клетки (МСТ) взрослого человека. Эти клетки производятся от здоровых взрослых добровольцев, а не от плодов, эмбрионов или животных. Перед введением пациенту препарат подвергается ряду серьезных проверок, в частности на наличие инфекционных агентов. Исследованиями показано, что МСТ являются универсально совместимыми и могут быть использованы без учета тканевой совместимости. На животных моделях было установлено, что МСТ мигрируют в очаги воспаления организма. Взаимодействуя с иммунокомпетентными клетками, они уменьшают воспалительные явления и способствуют регенерации поврежденной ткани. Компанией "Osiris Therapeutics" при поддержке JDRF ("Juvenile Diabetes Research Foundation") в настоящее время проводится исследование по клиническому применению препарата PROCHYMAL™ у больных с недавно манифестировавшим СД 1-го типа.

CTLA-4 Ig (Abatacept) представляет собой объединенный протеин из внешнего домена CTLA4 и тяжелой цепи Fc-фрагмента молекулы IgG, который модулирует Т-клеточную ко-стимуляцию, опосредованную через CD28/CD80/CD86. На рисунке (см. на вклейке) представлен механизм активации Т-клеток. Активация Т-клетки требует двух сигналов. Первый — антигенспецифическое взаимодействие Т-клеточного рецептора (ТКР) с комплексом МНС/АГ на поверхности АПК. В активации Т-клеток, распознавших антиген, помимо белков CD3 принимают участие белки CD4/CD8. Долгое время функция этих белков оставалась неизвестной. Впоследствии стало ясно, что они принимают самое непосредственное участие в качестве корецептора в процессе взаимодействия ТКР с молекулами МНС. На клеточной поверхности ТКР и CD4/CD8 представлены независимо друг от друга. Их встреча происходит в процессе формирования ответа на антиген. После распознавания Т-клеточным рецептором антигенного комплекса происходит взаимодействие CD4/CD8 с молекулой МНС.

Второй сигнал (костимуляция) может быть опосредован множеством потенциальных костимуляторных механизмов, основным из которых является взаимодействие между молекулой CD28 на поверхности Т-клетки и CD80/CD86 на поверхности антигенпрезентирующей клетки (АПК). Костимуляция необходима для Т-клеточного ответа, без нее происходит анергия Т-лимфоцита. Т-клетки могут экспрессировать на своей поверхности CTLA-4, который в 20 раз активнее связывается с CD80/CD86 по сравнению с CD28, но при этом не активируют Т-клетки. Это приводит к блокировке стимуляции через CD80/CD86 и ингибированию активации Т-клеток.

В отличие от животных моделей, иммунотерапевтические препараты (ИТП), использованные в качестве системных иммуномодуляторов, показали значительно худший результат. Иммунизация с использованием БЦЖ не привела к успеху. Терапию ИФН- α проводили небольшой группе из 10 человек, было продемонстрировано увеличение секреции С-пептида минимум на 30% у 8 пациентов, предполагая лишь возможную эффективность этого подхода (см. табл. 1).

Цитокины

Введение цитокинов для лечения СД 1-го типа рассматривается уже давно. К настоящему времени описано множество положительных и побочных эффектов от их применения на лабораторных животных. При этом в основном используются цитокины — Т-хелперы 1-го (Тх1)- и 2-го (Тх2) типа для уменьшения количества аутоагрессивных и увеличения регуляторных Т-клеток. Важным обстоятельством является то, что эффект при использовании цитокинов зависит от времени, дозы и пути введения (системно или в виде ДНК-вакцин). Например, экспрессия ИЛ-10 в β -клетках способствует прогрессированию аутоиммунного процесса при СД, в то время как использование ДНК-вакцины частично предотвращает развитие болезни [41]. Например, введение ИЛ-18 NOD-мышам на 4-й неделе жизни приводит к усилению Тх1-опосредованного иммунного ответа при развитии СД [30]. При введении на 10-й неделе жизни ИЛ-18 играет супрессорную роль, изменяя Тх1/Тх2 баланс [36]. Кроме того, локальная экспрессия специфического цитокина может снижать любой антидиабетический эффект от его системного применения. Все это подчеркивает сложность использования цитокинов для лечения СД 1-го типа.

Комбинированная иммунотерапия

Как следует из предыдущих разделов, в настоящее время какой-либо ИТП в виде монотерапии не дал достаточного эффекта при лечении СД 1-го типа. Позитивные результаты отмечены лишь для нескольких ИТП. Перспективным представляется использование комбинированной терапии, которая будет направлена на увеличение точек приложения или на усиление эффекта иммунотерапии (табл. 2).

В исследовании D. Bresson и соавт. [9] на 2 линиях мышей были показаны великолепные результаты применения анти-CD3 МКАТ в сочетании с проинсулином, вводимым интраназально, которые значительно превосходили результаты монотерапии каждым из этих ИТП. Возможно, это связано с тем, что анти-CD3 и иммунизация аутоантигенами оказывают синергетическое действие и способствуют увеличению количества и распространению Т-клеток, обладающих регуляторными свойствами. Кроме того, уменьшение количества аутоагрессивных Т-клеток под действием МКАТ создаст "окно", которое будет способствовать пролиферации новых регуляторных Т-клеток. Предполагается, что вновь образующиеся регуляторные Т-клетки не способны подавлять активность уже циркулирующих, активированных аутоагрессивных Т-клеток, эту задачу и призваны выполнить анти-CD33 МКАТ [27].

В настоящее время DiabetesTrialNet проводит исследование эффективности сочетания ингибитора инозинмонофосфатдегидрогеназы микофенолата мопетила (Mycophenolate mofetil/CellCept®), и анти-CD25 МКАТ даклизумаба (Daclizumab/Zenapax®). Оба препарата с успехом используются для лечения других аутоиммунных заболеваний и при трансплантации, в том числе островковых клеток.

Сочетание ИЛ-2 с сиролимусом (Sirolimus) показало превосходный результат в преclinical исследованиях [33]. Сиролимус является иммуносупрессантом, который ингибирует Т-клеточную пролиферацию, опосредованную ИЛ-2, при этом не влияя на ИЛ-2-индуцированный апоптоз Т-клеток. Совместное введение этих препаратов ведет к смещению от пролиферации к апоптозу Т-клеток. Кроме того, комбинация этих ИТП защищает β -клетки от рекуррентного аутоиммунного разрушения при трансплантации их у NOD-мышей. В 2007 г. старто-

вала 1-я фаза клинического исследования комбинации этих препаратов.

Регенеративная терапия

В дополнение к иммунотерапии в перспективе можно будет использовать препараты, активирующие регенерацию β -клеток. Например, комбинация эпидермального ростового фактора (epidermal grow factor — ЭРФ) с гастрином приводят к значительному увеличению массы β -клеток, культивируемых *ex vivo* [39].

Метод генерации новых β -клеток воссоздает процесс неогенеза в развивающемся плоде, когда β -клетки развиваются из примитивных предшественников (прекурсоров). Этот процесс может быть заново активирован сочетанием ЭРФ и гастрин, с включением клеток-предшественников, присутствующих в панкреатическом протоке любого человека. Новые исследования показали, что сочетание этих 2 ростовых факторов может увеличить количество β -клеток в 3 раза. ЭРФ способствует делению прекурсорных клеток, а гастрин способствует их дифференцировке в β -клетки. Таким образом отдельно ни один ростовой фактор не эффективен, только сочетание дает должный результат. Процесс неогенеза можно остановить в любой момент, прекратив введение факторов роста и дифференцировки.

Регенерация позволит восстановить функцию β -клеток без трансплантации, которая требует источника островковых клеток. Кроме того, в настоящее время чтобы получить достаточное количество β -клеток для одной трансплантации необходимо 2—3 поджелудочные железы. Культивирование β -клеток *in vitro* позволит получить достаточное их количество для 3 пересадок (<http://www.jdrf.org>). Успешный результат применения ЭРФ с гастрином способствовал началу новых клинических исследований (<http://www.transitiontherapeutics.com/>).

Вероятно, для больных СД 1-го типа с большим стажем заболевания, т. е. с очень низкой или полностью отсутствующей собственной остаточной секрецией инсулина, необходимо будет применять иммунотерапию в сочетании с трансплантацией β -клеток.

Дендритные клетки

Дендритные клетки (ДК) относятся к группе антиген-презентирующих клеток. Следовательно, основной их функцией является обработка и презентация антигенного материала другим иммунным клеткам. Больше всего ДК находится в тканях, которые соприкасаются с внешней средой, например в толще эпителиального слоя слизистой оболочки кишечника, в подслизистой респира-

торного, желудочно-кишечного и урогенитального трактов. Развитие иммунологической толерантности в первую очередь связывают именно с ДК.

При попадании в очаг воспаления незрелые ДК, взаимодействуя с антигенами и подвергаясь воздействию провоспалительных сигналов, претерпевают процесс созревания посредством ряда внутренних механизмов. Затем они мигрируют в анатомически ближайшие лимфатические узлы, где происходит процесс антигенпрезентации комплекса МНС/антиген наивным (не активированным) Т-клеткам через ТКР. Активация Т-клетки требует двух сигналов. Первый — это антигенспецифическое взаимодействие ТКР с комплексом МНС/АГ на поверхности АПК. Второй сигнал опосредован взаимодействием между молекулой CD28 на поверхности Т-клетки и CD80/CD86 на поверхности АПК. Т-клетки экспрессируют на своей поверхности CTLA-4(CD152), который в 20 раз активнее связывается с CD80/CD86 по сравнению с CD28, но при этом не активирует Т-клетки. Отсутствие ко-стимуляторных молекул или ко-стимуляторного сигнала приводит к нарушению активации Т-клетки, что ведет к апоптозу или функциональной анергии (см. рисунок).

Многими исследованиями установлено, что незрелые ДК играют огромную роль в создании иммунологической толерантности. Экзогенное введение функционально незрелых ДК сопровождается длительным и стабильным выживанием аллогенного трансплантата у различных животных моделей [40]. Механизм, посредством которого осуществляется создание иммунологической толерантности, состоит в прямом и непрямом (через цитокины) воздействии ДК на Т-клетки, а также в стимулировании функционирования и развития регуляторных CD4⁺CD25⁺Foxp32⁺-Т-клеток [28].

В настоящее время проходит I фаза клинического исследования у взрослых больных СД 1-го типа с длительностью заболевания более 5 лет. ДК получают *in vitro* из аутологических лейкоцитов и добавляют к ним олигодигуоксинуклеотиды (AS-ODN). Такие ДК экспрессируют очень малое количество котимуляторных молекул CD80/CD86, их вводят пациентам внутривенно в область проксимальнее поджелудочной железы с целью добиться миграции введенных ДК в ближайшие к поджелудочной железе лимфатические узлы. В лимфатических узлах происходит взаимодействие этих ДК с аутоантигенами и затем с Т-клетками. Недостаток "второго сигнала" приведет к снижению активности аутореактивных и формированию регуляторных Т-клеток.

Использование ДК до манифестации или сразу после нее должно значительно усилить эффект от их примене-

Таблица 2

Комбинированная иммунотерапия СД 1-го типа

Иммунотерапевтический препарат	Название исследования, статус	Количество, характеристика участников и критерии включения в исследование	Путь введения и дозировка препарата	Результат	Источник
ИЛ-2 и сиролimus	Продолжается 1-я фаза	10 больных СД 1-го типа в возрасте 18—45 лет с длительностью болезни 3—48 мес	ИЛ-2 подкожно 4,5 · 10 ⁶ МЕ/сут, сиролimus перорально 2 мг	—	NCT00525889*
Микофенолата мофетил (Mycophenolate mofetil/CellCept®) и даклизумаб (Daclizumab/Zenara®)	ROPII (Preservation of Pancreatic Production of Insulin Through Immunosuppression), продолжается	108 больных СД 1-го типа в возрасте 8—45 лет с длительностью болезни не более 3 мес	—	—	NCT00100178*
Анти-CD3 и проинсулин	Планируется	—	—	—	http://www.dvdc.org.au
Гастрин (TT-223) и GLP-1	Продолжается 2 фаза	—	—	—	http://www.transitiontherapeutics.com

Примечание. * — Идентификатор клинических исследований (<http://www.ClinicalTrials.gov>).

ния, что будет сопровождаться значительно лучшим результатом. Такое исследование планируется сразу после окончания 1-й фазы проходящего в настоящее время, которое должно показать безопасность применения аутологических ДК у людей.

Заключение

Первые клинические результаты применения некоторых ИТП обнадеживают. Положительные результаты отмечены для анти-CD3 МКАТ, DiaPep277 и GAD65 (DI-AMYD®). Однако ни у кого из пациентов в этих исследованиях не была достигнута эугликемия и толерантность к β -клеткам. Еще рано говорить о широком применении данных препаратов, необходимо дождаться окончания проводимых в настоящее время исследований на больших группах больных СД, оценить эффективность и выявить возможные побочные эффекты в течение более длительного периода времени.

Существуют два основных направления в поиске новых ИТП: антигенспецифичная и антигеннеспецифичная терапия. Преимущества антигенспецифичной терапии состоят в локальности ее воздействия, с минимумом или полным отсутствием побочных эффектов, а эффект от такого лечения должен быть длительным и не требовать повторных введений. Однако надо помнить, что не все аутоантигены одинаково эффективны. Нельзя исключать возможность того, что они могут приводить к прогрессированию СД, как в случае с рассеянным склерозом [5]. К сожалению, среди всех апробированных аутоантигенов лишь только рекомбинантный GAD65 (DI-AMYD®) у пациентов с LADA и пероральный инсулин в группе больных с высоким титром IAA оказались эффективными. Тем не менее ученые не оставляют попыток найти эффективные методы антигенспецифичной терапии, о чем свидетельствуют продолжающиеся исследования в этом направлении. В таком случае, казалось бы, перспективней должны выглядеть методы антигеннеспецифичной терапии. Однако они имеют свои недостатки, основной из которых — побочные эффекты.

Также существенным является вопрос о времени начала иммунотерапии. С одной стороны, чем раньше будет начато лечение СД, тем выше вероятность успеха. Для решения этой задачи в настоящее время имеются мощные средства: исследование генетических HLA-маркеров, антител к β -клеткам, исследование секреции инсулина и толерантности к глюкозе. Дополнением к этому будет служить идентификация новых аутоантигенов, участвующих в аутоиммунном процессе, например ZnT8(Slc30A8), который обнаруживается у 26% больных СД 1-го типа, негативных по IAA, GAD, ICA и IA-2 [40]. С другой стороны, иммунотерапия после манифестации СД связана с более оправданным риском вмешательства и меньшей длительностью иммунотерапии, с быстрым получением результата.

Далеко не все проведенные иммунотерапевтические вмешательства были эффективны. Использование широкого спектра ИТП отчасти связано с недостаточно ясным пониманием в настоящее время как самого патогенетического механизма аутоиммунного поражения β -клеток, так и факторов, провоцирующих и предрасполагающих к этому. СД 1-го типа — Т-клеточноопосредованное тканеспецифичное аутоиммунное заболевание, основным патогенетическим звеном которого является возникновение аутоагрессивных Т-клеток. В-клетки также играют роль в аутоиммунном процессе, однако их значение в нем до конца не ясно [6]. Появление АТ к β -клеткам не всегда связано с развитием СД 1-го типа, а отсутствие иерархии в появлении аутоантител свидетельствует либо о том, что инициализирующий антиген еще не известен, либо о том, что существует множество путей развития и различных форм СД 1-го типа в зависимости от имму-

нологической перспективы. Комплексность развития заболевания может быть дополнена независимыми этиологическими событиями, запущенными различными внешними факторами. Результаты завершенных к настоящему времени иммунотерапевтических исследований при СД также свидетельствуют в пользу достаточно гибкого и полиморфного иммунопатологического процесса, лежащего в основе аутоиммунного поражения при СД. Такие иммунотерапевтические вмешательства, как DiaPep277, GAD65 и др., оказываются эффективными не у всех больных: например, применение инсулина с профилактической целью оказалось эффективным только в группе высокого риска по развитию СД с высоким титром IAA. Таким образом, дальнейшее продвижение в понимании аутоиммунного процесса при СД, очевидно, будет способствовать появлению и внедрению других — новых и более эффективных ИТП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верещакин Е. И., Хоценко О. М., Душкин М. И. // Цитокины и воспаление. — 2008. — Т. 7, № 2. — С. 3—8.
2. Allen H. F., Klingensmith G. J., Jensen P. et al. // *Diabetes Care*. — 1999. — Vol. 22. — P. 1703—1707.
3. Anonymous. The Canadian-European Randomized Control Trial Group // *Diabetes*. — 1988. — Vol. 37. — P. 1574—1582.
4. Belghith M. et al. // *Nat. Med.* — 2003. — Vol. 9. — P. 1202—1208.
5. Bielekova B. et al. // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6, N 10. — P. 1167—1175.
6. Bingley P. J., Christie M. R., Bonifacio E. et al. // *Diabetes*. — 1994. — Vol. 43. — P. 1304—1310.
7. Bjork E., Kampe O., Andersson A., Karlsson F. A. // *Diabetologia*. — 1992. — Vol. 35. — P. 490—493.
8. Bjork E., Berne C., Kampe O. et al. // *Diabetes*. — 1996. — Vol. 45. — P. 1427—1430.
9. Bresson D., Togher L., Rodrigo E. et al. // *J. Clin. Invest.* — 2006. — Vol. 116. — P. 1371—1381.
10. Brod S. A., Atkinson M., Lavis V. R. et al. // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2001. — Vol. 21. — P. 1021—1030.
11. Chase H. P., Butler-Simon N., Garg S. K. et al. // *Pediatrics*. — 1990. — Vol. 85. — P. 241—245.
12. Cook J. J., Hudson I., Harrison L. C. et al. // *Diabetes*. — 1989. — Vol. 38. — P. 779—783.
13. Coutant R., Landais P., Rosilio M. et al. // *Diabetologia*. — 1998. — Vol. 41. — P. 1040—1046.
14. Eisenbarth G. S., Srikanta S., Jackson R. et al. // *Diabetes Res.* — 1985. — Vol. 2. — P. 271—276.
15. Eizirik D. L., Strandell E., Sandler S. // *Diabetologia*. — 1988. — Vol. 31. — P. 168—174.
16. Elliott J. F., Marlin K. L., Couch R. M. // *Diabetes Care*. — 1998. — Vol. 21. — P. 1691—1693.
17. Feutren G., Papoz L., Assan R. et al. // *Lancet*. — 1986. — Vol. 2. — P. 119—124.
18. Gonzalo J. A., Gonzalez-Garcia A., Kalland T. et al. // *Eur. J. Immunol.* — 1993. — Vol. 23. — P. 2372—2374.
19. Gross D. J., Sidi H., Weiss L. et al. // *Diabetologia*. — 1994. — Vol. 37. — P. 1195—1201.
20. Hagopian W. A., Karlsen A. E., Petersen J. S. et al. // *Endocrinology*. — 1993. — Vol. 132. — P. 2674—2681.
21. Herold K. C., Hagopian W., Auger J. A. et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 346. — P. 1692—1698.
22. Kalland T., Alm G., Stalhandske T. // *J. Immunol.* — 1985. — Vol. 134. — P. 3956—3961.
23. Karussis D. M., Meiner Z., Lehmann D. et al. // *Neurology*. — 1996. — Vol. 47. — P. 341—346.
24. Keymeulen B., Vandemeulebroucke E., Ziegler A. G. et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 352. — P. 2598—2608.
25. Kullin M., Li Z., Hansen J. B. et al. // *Diabetes*. — 2000. — Vol. 49. — P. 1131—1136.
26. Larson E. T. // *Int. J. Immunopharmacol.* — 1987. — Vol. 9. — P. 425.
27. Nagler-Anderson C., Bhan A. K., Podolsky D. K., Terhorst C. // *Nat. Immunol.* — 2004. — Vol. 5. — P. 119—122.
28. Nouri-Shirazi M., Thomson A. W. // *Expert Opin. Biol. Ther.* — 2006. — Vol. 6, N 4. — P. 325—339.

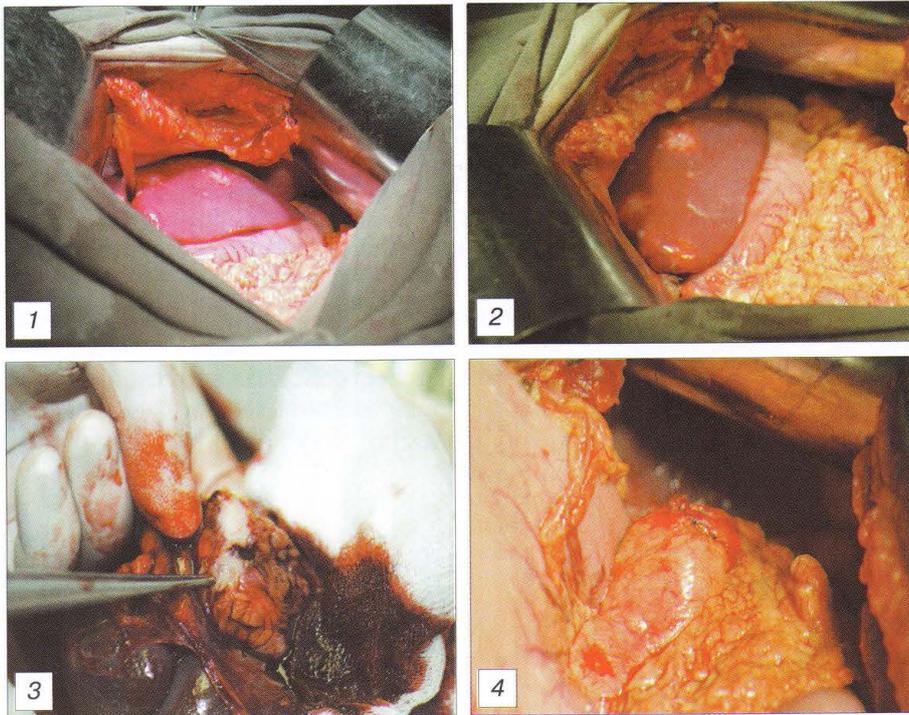
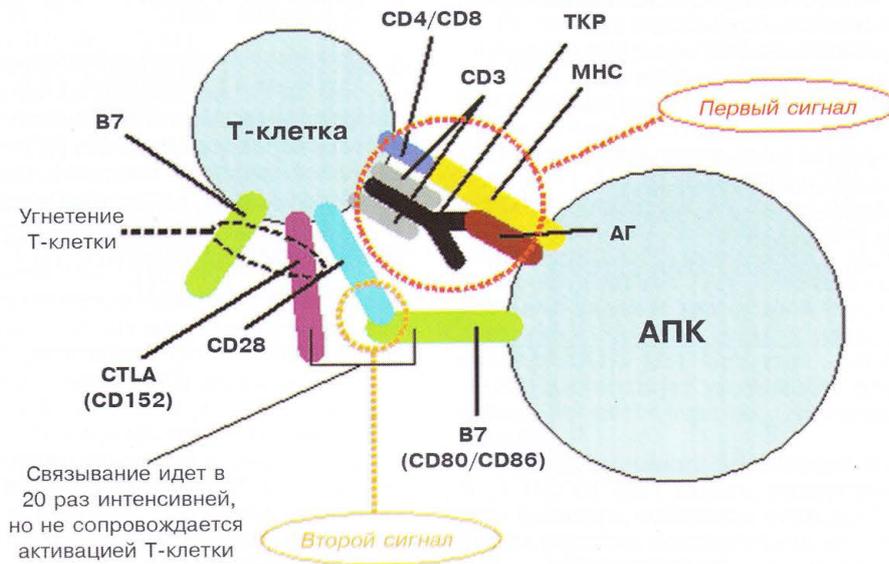


Рис. 4. Ход операции: дистальная резекция поджелудочной железы. Метастатическое поражение печени.

Фотографии выполнены и представлены А. В. Егоровым и И. А. Васильевым.



Механизм активации Т-клеток. Объяснение в тексте.

29. O'Brien D., Butler N., Chase H. P. et al. // *Diabetes Care*. — 1988. — Vol. 11. — P. 297.
30. Oikawa Y. et al. // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 171, N 11. — P. 5865—5875.
31. Ortqvist E., Bjork E., Wallensteen M. et al. // *Diabetes Care*. — 2004. — Vol. 27. — P. 2191—2197.
32. Pozzilli P., Visalli N., Voccuni M. L. et al. // *Diabet. Med.* — 1994. — Vol. 11. — P. 98—104.
33. Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W. L., Shapiro A. M. et al. // *Diabetes*. — 2002. — Vol. 51. — P. 638—645.
34. Rapoport M. J., Weiss L., Mor A. et al. // *J. Immunol.* — 1996. — Vol. 157. — P. 4721—4725.
35. Redondo C., Flores I., Gonzales A. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 98, N 5. — P. 1245—1252.
36. Rothe H. et al. // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 163, N 3. — P. 1230—1236.
37. Silverstein J., Maclaren N., Riley W. et al. // *N. Engl. J. Med.* — 1988. — Vol. 319. — P. 599—604.
38. Skyler J. S., Rabinovitch A. // *J. Diabet. Compl.* — 1992. — Vol. 6. — P. 77—88.
39. Suarez-Pinzon W. L., Lakey J. R. T., Brand S. J., Rabinovitch A. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2004. — Vol. 90, N 6. — P. 3401—3409.
40. Wenzlau J. M., Juhl K., Yu L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* — 2007. — Vol. 104, N 43. — P. 17040—17045.
41. Zhang Z. L. et al. // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2003. — Vol. 24, N 8. — P. 751—756.

Поступила 10.11.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.379-008.64-055.25-06:[616.831.41+616.432+618.11]-07

О. Р. Григорян, А. А. Охотникова, Е. Н. Андреева

ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДАЛЬНАЯ СИСТЕМА ПРИ НАРУШЕНИЯХ ОВАРИАЛЬНОЙ ФУНКЦИЙ У ДЕВОЧЕК С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

ФГУ Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН и РАМН И. И. Дедов), Москва

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) оказывает негативное воздействие на становление и функционирование репродуктивной системы молодых девушек. Время дебюта СД1 (особенно в препубертатном периоде), длительность заболевания и отсутствие компенсации углеводного обмена являются причиной задержки пубертата, отрицательно влияют на возраст наступления менархе, а также увеличивают частоту нарушений менструального цикла (преимущественно по типу олиго- и аменореи).

В настоящее время, несмотря на большое количество исследований на данную тему, основную причину репродуктивной дисфункции выявить не удается, однако достоверно известно отрицательное влияние СД1 на различные звенья гипоталамо-гипофизарно-яичниковую систему. Патогенетические механизмы репродуктивных нарушений заключаются в подавлении импульсной генерации гонадотропин-рилизинг-гормона за счет повышения центральной допаминэргической и опиатной активности, снижения концентрации инсулиновых рецепторов на нейронах, продуцирующих Гн-РГ, изменения концентрации гормона лептина в сыворотке больных девочек. При СД1, помимо гипоталамических влияний, возможно непосредственное воздействие на гипофиз продуктов свободнорадикального окисления липидов, приводящее к снижению продукции тропных гормонов. Также рассматривается первично-овариальный генез нарушений менструального цикла у девушек, больных СД1. Актуальными являются исследования аутоантител к различным структурам яичников, изменений концентрации ИФР-1 и гормона грелина при СД1.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, репродуктивная система, пубертат.

O.R. Grigoryan, A.A. Okhotnikova, E.N. Andreeva

HYPOTHALAMO-PITUITARY-GONADAL AXIS IN GIRLS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS MENSTRUAL DISORDERS AND OVARIAN DYSFUNCTION

Endocrinological Research Centre, Moscow

Type 1 diabetes mellitus (DM) has negative effect on the development and functioning of the reproductive system in young girls. The time of onset of type 1 DM (especially in the puberty period), duration of the disease, and poor compensation of disturbed carbohydrate metabolism are supposed to be the most probable causes of delayed pubertal development exerting negative effect on the age of menarche and increasing the frequency of menstrual problems (largely oligo- and amenorrhea). Despite a wealth of relevant investigations, the cause of reproductive dysfunction remains unknown even though negative effect of type 1 DM on different components of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis has been fairly well documented. The pathogenetic mechanisms of reproductive disorders may consist of suppression of pulsed production of gonadotropin releasing hormone (GnRH) due to enhanced central dopaminergic and opiate activities, decreased concentration of insulin receptors on GnRH-synthesizing neurones, and changes of serum leptin level in the affected girls. In patients with type 1 DM, hypothalamic effects on the pituitary may be supplemented by the direct action of products of free radical oxidative activity leading to a decrease in the production of trophic hormones. Also considered, is primary ovarian origin of menstrual disturbances in girls with type 1 DM. Of great importance are studies concerning autoantibodies against different ovarian structures, variations in concentrations of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and hormone ghrelin.

Key words: type 1 diabetes mellitus, reproductive system, puberty

Сведения об авторах

Для контактов:

Григорян Ольга Рафаэлевна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. ЭНЦ.

Адрес: 117036, Москва, ул. Дм. Ульянова, 11

Телефон/факс: 8-499-126-75-44

iceberg1995@mail.ru

Охотникова Анна Александровна, врач-ординатор ЭНЦ.

Андреева Елена Николаевна, доктор мед. наук, профессор, зав. отд. эндокринной гинекологии ЭНЦ.