

20. High-level production of biologically active human α_1 -antitrypsin in *Escherichia coli* / M. Courtney, A. Buchwalder, L. H. Tessier et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81, N 3.— P. 669—673.
21. Isolation and properties of recombinant DNA produced variants of human α_1 -proteinase inhibitor / J. Travis, M. Owen, P. George et al. // J. Biol. Chem.— 1985.— 260, N 7.— P. 4384—4389.
22. Шелкунов С. Н. Клонирование генов.— Новосибирск: Наука, 1986.— 228 с.
23. Production of glycosylated physiologically «normal» human α_1 -antitrypsin by mouse fibroblasts modified by insertion of a human α_1 -antitrypsin cDNA using a retroviral vector / R. I. Garver, A. Chitul, S. Karlsson et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1987.— 84, N 4.— P. 1050—1054.
24. Clonal gene therapy: transplanted mouse fibroblast clones express human α_1 -antitrypsin gene *in vivo* / R. I. Garver, A. Chitul, M. Courtney, R. G. Crystal // Science.— 1987.— 237, N 4816.— P. 762—764.
25. Genaro C., Luciana D., Riccardo C. Cell-specific expression of a transfected human α_1 -antitrypsin gene // Cell.— 1985.— 41, N 2.— P. 531—540.
26. Synthesis in yeast of functional oxidation-resistant mutant of human α_1 -antitrypsin / S. Rosenberg, P. J. Barr, R. C. Najarian, R. A. Hallowell // Nature.— 1984.— 312, N 5989.— P. 77—80.
27. Synthesis in *E. coli* of α_1 -antitrypsin variants of therapeutic potential for emphysema and thrombosis / M. Courtney, S. Jallat, L. H. Tessier et al. // Ibid.— 313.— P. 149—151.
28. Pat. 4711848 USA, IC³ C12 P19/34; C12 N1/100. Site specific mutagenesis in alpha-1-antitrypsin / M. Y. Insley, G. Kawasaki.— Publ. 08.12.87.
29. Roberts L. New targets for human gene therapy // Science.— 1988.— 241, N 4868.— P. 906.
30. Ledley F. D., Woo S. L. C. Molecular basis of α_1 -antitrypsin deficiency and its potential therapy by gene transfer // J. Inher. Metab. Dis.— 1986.— 9, suppl. 1.— P. 85—91.
31. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals / J.-F. Mornex, A. Chytil-Weir, Y. Martinet et al. // J. Clin. Invest.— 1986.— 77, N 6.— P. 1952—1961.
32. The human α_1 -antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes // EMBO J.— 1987.— 6, N 9.— P. 2767—2771.
33. Клонирование гена α_1 -антитрипсина человека и возможные аспекты его применения / Н. С. Незнанов, И. В. Макарова, И. А. Крамерова, К. Г. Газарян // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 43—47.
34. Буржневская Т. Н. Вирус-индуцированный мутагенез в клетках млекопитающих.— Киев: Наук. думка, 1984.— 136 с.
35. Müller H. Human gene therapy: possibilities and limitations // Experientia.— 1987.— 43, N 4.— P. 375—378.
36. Utmanen I., Kallio A. Gene therapy of somatic cells, the principle and techniques // Ann. Clin. Res.— 1986.— 18, N 5—6.— P. 316—321.
37. Cox D. W., Mausfield T. Prenatal diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency and estimates of fetal risk for disease // J. Med. Genet.— 1987.— 24, N 1.— P. 52—59.
38. Prenatal diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency by direct analysis of the mutation site in the gene / Y. J. Kidd, M. S. Globus, R. B. Wallace et al. // New Engl. J. Med.— 1984.— 310, N 10.— P. 639—642.
39. Diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products / C. N. Newton, N. Kalsheker, A. Graham et al. // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 17.— P. 8233—8243.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 23.06.89

УДК 577.2.08:577.214.622

**А. П. Перевозчиков, Б. Л. Вайсман, Д. И. Дозорцев, А. В. Сорокин,
С. В. Орлов, А. Д. Денценко, А. П. Дыбан, А. Н. Климов**

**СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ — ТРАНСГЕННЫХ КРОЛИКОВ, —
СОДЕРЖАЩИХ В ГЕНОМЕ АНТИСМЫСЛОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ
ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА А1 ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ
АТЕРОГЕННЫХ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА**

Сконструированные рекомбинантные ДНК, содержащие способный к экспрессии анти-смысловой ген апоА1 человека, были инъецированы в зиготы кроликов для получения трансгенных животных. Методами дот-блот-гибридизации ДНК и биохимического ана-

лиза липидов и липопротеидов сывороток крови родившихся кроликов выявлены животные, содержащие разное число копий интегрированной в хромосому экзогенной ДНК и с разной степенью нарушения липидного обмена.

В одном случае экспрессия антисмыслового гена привела к подавлению синтеза липопротеидов высокой плотности, в двух — к снижению содержания α -липопротеидного холестерина (ХС) по отношению к общему. Во всех трех случаях наблюдались и другие изменения показателей липидного обмена (повышение общего ХС, триглицеридов), характерные для атеросклероза.

Полученные трансгенные кролики могут, таким образом, служить моделью для разработки подходов к генетической коррекции этой патологии.

Введение. Развитие атеросклероза протекает при повышении в крови уровня атерогенных липопротеидов (липопротеидов низкой и очень низкой плотности — ЛПНП и ЛПОНП) и снижении уровня антиатерогенных липопротеидов (липопротеидов высокой плотности — ЛПВП). Имеют место случаи, когда клинические проявления атеросклероза, такие как ишемическая болезнь сердца (ИБС), наблюдаются у лиц с нормальным или даже пониженным уровнем атерогенных липопротеидов, если понижен уровень антиатерогенных. Наиболее часто в качестве маркера содержания ЛПВП определяют уровень ХС ЛПВП — α -холестерина. Из клинических наблюдений, выполненных в разных странах, в том числе и в СССР, известно, что существует корреляция между уровнем α -ХС в крови и распространенностью ИБС. В связи с этим стремление врачей-кардиологов направлено не только на снижение уровня атерогенных липопротеидов, но и на повышение уровня антиатерогенных ЛПВП.

ЛПВП содержат набор апопротеинов. Среди них первое место занимает А1, на долю которого приходится 70 % содержания апопротеинов ЛПВП. Можно полагать, что активация или угнетение синтеза апоА1 будет сопровождаться повышением или уменьшением образования ЛПВП соответственно [1].

Для разработки методов генетической коррекции атерогенных нарушений липидного обмена важно иметь полную характеристику наследуемого дефекта, а также механизма его реализации на субклеточном уровне. Мутантные кролики *Watanabe*, дефектные по гену рецептора ЛПНП, могут быть использованы как модельные объекты генотерапии для восстановления функции рецепции ЛПНП путем переноса в их геном экзогенного нормального гена рецептора. *In vitro* такая работа уже осуществляется [2, 3]. Однако важно также исследовать возможности генетической коррекции другой формы атерогенных нарушений, связанных с дефектом генов, контролирующих образование ЛПВП. Для этого необходимо иметь соответствующую модель, лучше всего кроликов с генетическим нарушением функции ЛПВП.

В настоящей работе продемонстрирована возможность получения путем трансгеноза кроликов, у которых смоделированы генетические нарушения, вызывающие дефект функционирования ЛПВП. Такие модели были получены введением в геном оплодотворенной яйцеклетки кролика генетической конструкции, содержащей поставленный в антисмысловую ориентации ген апоА1 или его фрагмент в паре с активным промотором, направляющим транскрипцию данного гена в клетках трансгенных кроликов. Транскрипты генов, поставленных в антисмысловую ориентации («антисмысловых» генов), представленные в избытке по сравнению с транскриптами соответствующих эндогенных «смысловых» генов, способны в виде «антисмысловых» РНК препятствовать экспрессии «смысловых» генов и тем самым приводить к дефекту их функции [4].

Материалы и методы. Для создания генетических конструкций использованы регуляторные участки промотора и терминатора хромосомного гена рибосомного белка мыши *L32* [5] (ген был предоставлен Н. В. Томилиным), субклонированные в плазмиде *pUC19*, и вектор экспрессии, сконструированный из этих элементов. кДНК-ген апоА1 человека (получен от Л. Чена, США) [6] был перенесен в обратной ориентации ниже (правее) активного участка промотора в соответствующие плазмиды. Схема

экспериментов приведена на рис. 1. I вариант — 5'-фрагмент к-ДНК апоА1 (0,56 т. п. о.) в обратной ориентации соединен с активным участком промотора P_{L32} . II вариант — 5'-фрагмент к-ДНК апоА1 в обратной ориентации встроен между участками промотора (P_{L32}) и терминатора (T_{L32}). Созданные конструкции в виде плазмид амплифицировали, очищали и инъецировали в мужские пронуклеусы оплодотворенных

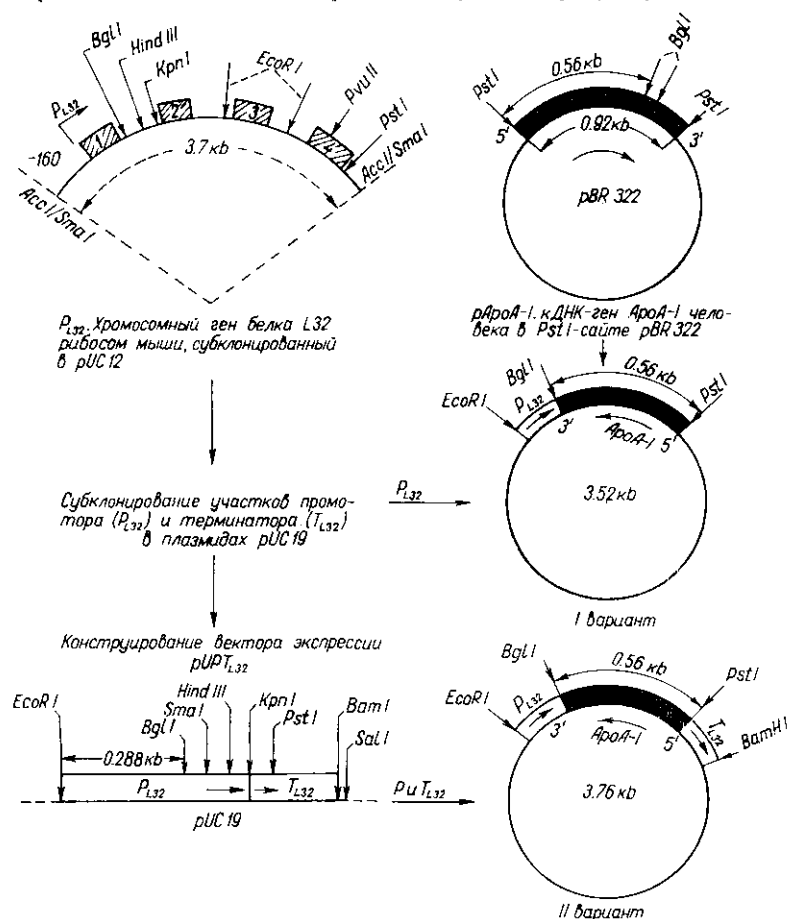


Рис. 1. Схема создания антисмысловых конструкций гена апоА1 человека (пояснения в тексте)

Fig. 1. Construction of two vectors containing antisense human apoA-1 genes. P_{L32} -promoter and T_{L32} -terminator elements were derived from the ribosomal L_{32} mouse gene

яйцеклеток кролика породы шиншилла, после чего яйцеклетки трансплантировали в матки ложнобеременных самок в соответствии с [7].

У 3-недельных кроликов отрезали часть уха и выделяли ДНК с помощью фенольно-детергентной экстракции. Определяли концентрацию ДНК, проводили дот-блот-гибридизацию с меченой ^{32}P (методом олигомечения) исходной плазмидой или pBR322. Для расчета числа копий интегрированной экзогенной ДНК к ДНК контрольных кроликов добавляли исходную плазмиду.

Сыворотку крови голодавших кроликов использовали для определения липидного состава и электрофореза липопротеидов и белков. Общий ХС, триглицериды и α -липопротеидный ХС определяли на автоанализаторе АА-2 фирмы «Техникон». Электрофорез липопротеидов с последующей окраской суданом IV в преформированном градиенте полиакриламидного геля проводили по [8].

Результаты и обсуждение. Используемые для трансгеноза конструкции имели отличительные особенности, заключающиеся в следующем. 1. В качестве промотора использовали активный участок промотора гена рибосомного белка мыши L_{32} семейства рибосомных генов [9].

Этот промотор не является тканеспецифичным, соответствует по характеристикам промоторам генов «домашнего хозяйства» и, в частности, характеризуется консервативными участками последовательности у ряда позвоночных животных, что позволяет ожидать слабой его видоспецифичности. Промоторная активность по силе соответствует таковой промоторов района ранних генов *SV40*, *LTR*, *RSV* и *MMTV*. 2. Первичная структура белка апоА1 и соответствующих ей экзонов гена апоА1 человека, кролика, крысы весьма консервативна и имеет гомологию более 60 % (68—83 %) [10, 11]. Это позволяет надеяться, что угнетение экспрессии эндогенного гена апоА1 кролика может происходить за счет транскрипции чужеродного «антисмыслового» гена.

Общие параметры, характеризующие процесс получения трансгенных кроликов, представлены в табл. 1. Анализ ДНК родившихся кро-

Таблица 1
Получение трансгенных кроликов
Characteristics of steps for getting of transgenic rabbits

Серия эксперимента	Интродуцируемая плазмида	Число реципиентов	Трансплантационные зygоты	Число родившихся крольчат	Число родившихся крольков	Число выживших крольков	Проанализировано	Трансгенных	Кролики с резко выраженными нарушениями липидного обмена
I	I вариант	9	85	3	16	6	6	2	1
II	II вариант	2	11	2	5	3	4	3	2

Таблица 2
Анализ липидного состава сыворотки обследованных кроликов и результатов трансгенноза
Analysis of lipid contents in newborn rabbits sera after transgenesis

№ проанализированного кролика	Общий ХС, мг%	Триглицериды, мг%	α -ХС, мг%	α -ХС по отношению к общему, %	Инъектируемая плазмида	Число интегрированных копий на геном
I-3*	55	193	27	50	I	~25
I-4	100	135	28	30	I	0
I-5	123	28	47	39	I	1—2
I-6	90	101	26	29	I	1—2
I-7	90	36	30	33	I	0
I-8	81	28	28	34	I	0
I-10			Не исследовали		I	0
II-1	204	166	27	13	II	10—15
II-2	120	237	18	15	II	~20
II-3	229	30	28	12	II	~40
II-9			Не исследовали		II	0

* В возрасте 3 месяцев; остальные — в возрасте 1 месяца.

ликов выявил присутствие в ряде из них последовательностей введенных плазмид (у 5 из 10 обследованных животных) (рис. 2).

В табл. 2 приведены результаты анализа липидного состава сыворотки крови родившихся кроликов. Обращает на себя внимание тот факт, что трансгенные кролики (II-1 и II-3) отличаются особо высоким содержанием общего ХС и триглицеридов, а также низким содержанием α -ХС (кролик II-2). Кролики, в геноме которых не обнаружено интегрированной экзогенной ДНК, имеют липидные показатели, характерные для интактных животных данного возраста. Кролик I-5, содержащий в своем геноме небольшое число копий вводимой ДНК, не имеет заметных отличий от нормы. Сильная корреляция между низким содержанием α -ХС и высоким содержанием триглицеридов вызывает большой интерес, поскольку это весьма характерно для нарушения функции ЛПВП при атеросклерозе [1, 12]. Эти данные свидетельству-

ют об экспрессии экзогенного «антисмыслового» гена apoA1 и угнетении его транскриптом экспрессии гена основной белковой составляющей ЛПВП кролика — apoA1.

У кролика I-3, родившегося после введения плазмиды I варианта, сыворотка крови имеет измененные показатели липидного обмена

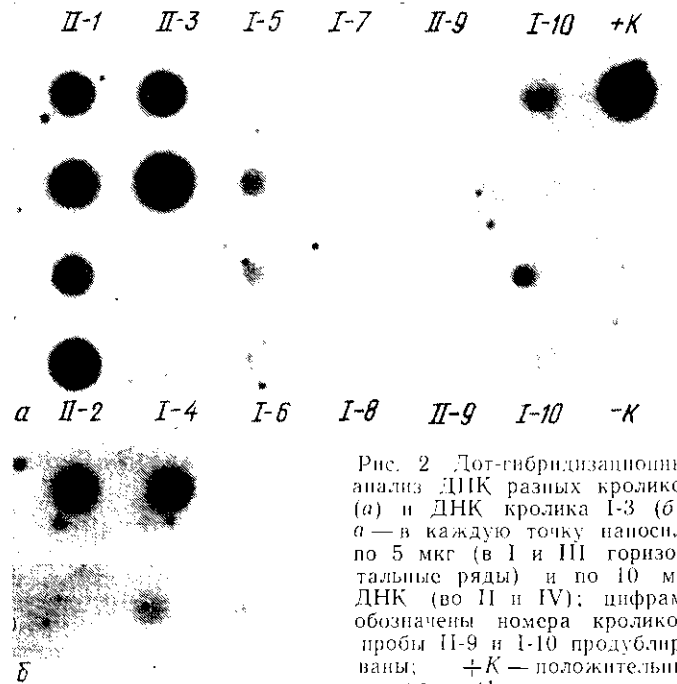


Рис. 2 Дот-гибридизационный анализ ДНК разных кроликов (а) и ДНК кролика I-3 (б): а — в каждую точку наносили по 5 мкг (в I и III горизонтальные ряды) и по 10 мкг ДНК (во II и IV); цифрами обозначены номера кроликов; пробы II-9 и I-10 продублированы; +K — положительный контроль (1 точка, нанесено 10 мкг кроличьей ДНК вместе

с плазмидой (I вариант конструкции) в количестве, соответствующем 25 копиям на геном); -K — отрицательный контроль (5 и 10 мкг кроличьей ДНК); зонд — ^{32}P -меченная плаزمида pBR322; б — верхний ряд — кроличья ДНК в количестве 5 и 10 мкг; нижний ряд (слева направо) — контрольная ДНК (10 мкг), далее та же ДНК, но с добавленным плазмидой, вводившейся кролику в количестве, соответствующем 5 и 1 копиям на геном; зонд — ^{32}P -меченный BglII/PstI-фрагмент плазмидной ДНК, содержащий ген apoA1

Fig. 2. Dot/blot hybridization of DNAs of newborn rabbits with original plasmids; a — each dot contains 5 or 10 μg DNA (I and 3 or 2 and 4 lines, respectively); figures indicate the number of rabbits; samples II-9 and I-10 are repeated; +K — positive control; the dot contains 10 μg of rabbit DNA (variant I) — 25 copies per genome. —K — negative control (dots contain 5 and 10 μg of rabbit DNA). ^{32}P -labelled plasmid pBR322 was used as a probe for hybridization. б — Hybridization analysis of rabbit I-3 DNA: upper line: rabbit DNAs (4 and 10 μg of DNA, respectively); lower line (from left of right): control DNA, 10 μg (free of plasmid); the same quantity of DNA with added plasmid DNA (5 and 1 copies per genome). ^{32}P -labelled apoA-I human gene was used as a probe for hybridization

(табл. 2) и отличается гиперлипидемией, определяемой также и визуально. Интересно, что этот кролик заметно отличается также и по динамике прибавления в весе с возрастом (рис. 3). На рис. 4 представлены результаты электрофореза липопротеидов крови этого кролика в полиакриламидном геле, которые указывают на измененные по сравнению с контролем количественные соотношения ЛПНП и ЛПВП в сторону преобладания первых. Электрофоретический анализ белков выделенных ЛПВП демонстрирует значительные различия белковых спектров в зоне apoA1 у кролика I-3 и контрольного животного (не показано).

В результате инъекции в зиготы кроликов плазмид, содержащих «антисмысловой» ген апоА1 человека, способный к экспрессии (плазмиды I и II вариантов), получены трансгенные кролики, содержащие по данным дот-блот-гибридизации, разное число копий интегрированной в хромосому экзогенной ДНК (от 1 до 40 на геном). Такие относительно высокие копияность и вероятность трансгеноза у кролика в наших экспериментах характерны для метода микроинъекций ДНК в зиготы

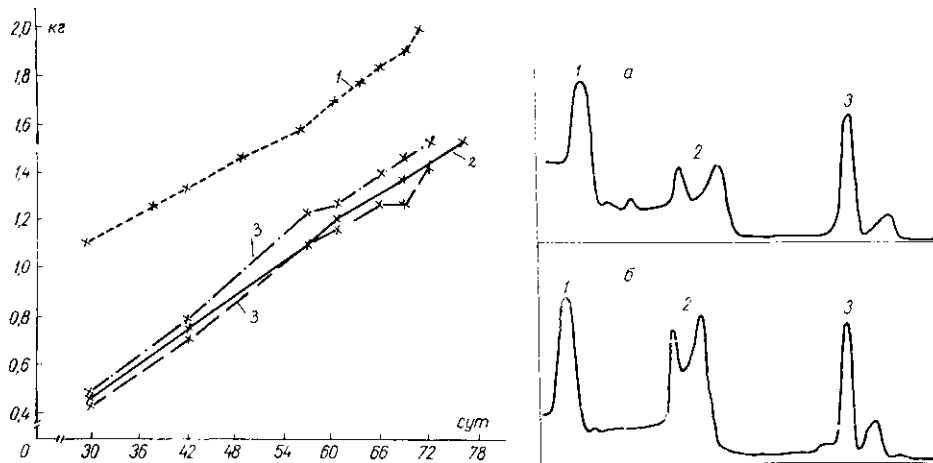


Рис. 3. Динамика прибавления массы кролика 1-3 с возрастом: 1 — кролик 1-3, родившийся после введения в зиготу ДНК, содержащей антисмысловой ген апоА1 человека; 2 — контрольные кролики; 3 — кролики, трансгенные по *v-sis* онкогену (используемые как контроль на неспецифический трансгеноз)

Fig. 3. Weight dynamics of rabbit 1—3 in the course of postnatal development: 1 — rabbit 1-3 born after exogenous DNA injection into its zygote; 2 — control rabbits; 3 — transgenic rabbit carrying *v-sis* oncogene in its genome (as positive nonspecific control)

Рис. 4. Электрофоретический анализ липопротеидов сыворотки крови кроликов в норме (а) и после трансгеноза (б, кролики 1-3): 1 — ЛПОНП; 2 — ЛПНП; 3 — ЛПВП

Fig. 4. Electrophoretical analysis of rabbit serum lipoproteins in norm (а) and after transgenesis (б, rabbits 1—3): 1 — VLDL, 2 — LDL; 3 — HDL

[13]. Интеграция плазмидной ДНК, содержащей «антисмысловой» ген апоА1, сама по себе не гарантирует экспрессии этого гена у всех выявленных трансгенных животных. Однако факт заметного нарушения липидного обмена там, где имеется много копий интегрированной плазмиды, и наличие сигнала терминации транскрипции (II вариант конструкции) позволяют с определенностью предполагать наличие экспрессии «антисмыслового» гена (5'-фрагмента) апоА1 человека, нарушающей синтез эндогенного апоА1 и повреждающей функцию ЛПВП (кролик II-2).

Успешный перенос «антисмыслового» гена апоА1 и нарушения вследствие этого образования ЛПВП могут и не проявляться в виде резкого изменения липидных показателей, тем не менее вызывать гиперлипидемию (кролик I-3) и изменения в липопротеидном и белковом спектрах (рис. 4). Вероятно, эффективность экспрессии экзогенного «антисмыслового» гена, угнетающей образование ЛПВП, может зависеть от места встраивания рекомбинантной молекулы в геном и ее копияности, а также строгой терминации образующихся при этом транскриптов. Возможно, с этим и связаны различия в экспрессии «антисмысловых» конструкций у кроликов II-1, II-2 и I-3. Следует также учитывать наличие определенной гомологии нетранслируемых 5'-районов генов одного кластера (генов апоА1, апоСIII и апоАIV), контролирующих образование ЛПВП млекопитающих [11, 14], и возможное влияние «антисмыслового» гена апоА1, а точнее его 5'-фрагмента, на экспрессию этих эндогенных генов. Все отмеченные особенности могут

в каждом конкретном случае уникальным образом модифицировать функцию ЛПВП трансгенных животных.

Полученные первые результаты свидетельствуют о перспективности предложенной модели как для изучения молекулярных механизмов развития атеросклероза, так и для разработки подходов к генетической коррекции этой патологии.

THE TRANSGENIC RABBITS CONTAINING A HUMAN APOA-I ANTISENSE GENE AS A MODEL FOR GENETIC CORRECTION OF ATHEROGENIC DISTURBANCES OF LIPID METABOLISM

A. P. Perevozchikov, B. I. Vaisman, D. I. Dozorisev, A. V. Sorokin,
S. V. Orlov, A. D. Denisenko, A. P. Dyban, A. N. Klimov

Institute of Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

The recombinant DNA molecules containing potentially expressing human apoA-I antisense gene were constructed and injected into the rabbit zygotes. Dot-blot hybridization techniques as well as lipid and lipoprotein analyses methods were used to reveal transgenic animals.

It was found that DNAs of several rabbits contained up to 40 copies of molecules of foreign DNA per genome. It was interesting that the patterns of serum lipid and lipoprotein metabolism of transgenic animals were shifted to atherogenic phenotype. In one case the expression of the antisense gene was able to suppress the synthesis of high-density lipoproteins. In two other cases the expression of this gene as appeared was correlated with a decrease of α -lipoprotein cholesterol level. In all the cases serum cholesterol and (or) triglyceride levels increased as well. Thus, the obtained transgenic rabbits may serve as a model to study and genetically correct atherogenic disturbances of lipid metabolism.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Климов А. И. Причины и условия развития атеросклероза // Биохим. основы патогенеза атеросклероза.— Л., 1980.— С. 3—45.
2. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit / J. Wilson, D. Jonston, D. Jefferson, R. C. Mulligan // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— 85, N 12.— P. 4421—4425.
3. Effect expression of retroviral vector-induced human low density lipoprotein (LDL) receptor in LDL receptor-deficient rabbit fibroblasts *in vitro* / A. Miyanojara, M. F. Sharkey, J. L. Witgtum et al. // Ibid.— N 17.— P. 6538—6542.
4. Van der Krol A. R., Mot J. N. M., Stuitje A. R. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences // Biotechniques.— 1988.— 6, N 10.— P. 958—975.
5. Dudov K., Perry R. The gene family encoding the mouse ribosomal protein L32 contains a uniquely expressed intron-containing gene and an unmutated processed gene // Cell.— 1984.— 37, N 6.— P. 457—468.
6. Cheung P., Chan L. Nucleotide sequence of cloned cDNA of human apolipoprotein A-1 // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 11.— P. 3703—3715.
7. Вайсман Б. Л., Голинский Г. Ф. Техника микроинъекций клонированных фрагментов ДНК (чужеродных генов) в ядро оплодотворенной яйцеклетки мыши // Общ. закономерности и контролирующие механизмы раннего эмбриогенеза млекопитающих в норме и патологии / Под ред. А. П. Дыбана.— Л.: Медицина, 1985.— С. 108—113.
8. Маграчева Е. Я. Разделение липопротеидов сыворотки крови методом дискового электрофореза в полиакриламидном геле // Вопр. мед. химии.— 1973.— 19, № 6.— С. 652—654.
9. Dubov K. P., Perry R. Properties of a mouse ribosomal protein promoter // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1986.— 83, N 12.— P. 8545—8549.
10. Borresen A. High density lipoprotein (HDL) polymorphism in rabbit. A comparative study of rabbit and human serum high density lipoprotein // J. Immunogenet.— 1976.— 3, N 4.— P. 73—82.
11. Linkage, evolution and expression of the rat apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes / J. Haddad, J. Ordovas, T. Fitzpatrick, S. Karathanasis // J. Biol. Chem.— 1986.— 261, N 28.— P. 13268—13277.

12. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипидопротеидемия и атеросклероз. — Л.: Медицина, 1984. — 223 с.
13. Возможность получения животных — продуцентов биологически активных препаратов путем микроинъекции клонированных генов в яйцеклетки / Б. Л. Вайсман, Т. В. Камелинская, Г. В. Городецкий, А. П. Дыбан // Антибиотики и химиотерапия. — 1988. — 33, № 2. — С. 154—158.
14. Karathanasis S. Apolipoprotein multigene family: Tandem-organization of human apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1985. — 82, N 16. — P. 6374—6378.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 23.06.89

УДК 616.379—008.64—001

Т. В. Игнатьева, Г. Ф. Голинский

МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ФОРМ ДИАБЕТА НА ТРАНСГЕННЫХ КРЫСАХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

Разработана методика переноса в геном крыс чужеродных клонированных генов. Получены трансгенные крысы, в геном которых интегрирован ген гормона роста человека под контролем промотора гена тирозинаминотрансферазы (ТАТ) крысы, а также кДНК-копия гена гормона роста человека под контролем промотора гена металлопротеина I мыши.

У трансгенных крыс зарегистрирована экспрессия чужеродного гена, причем уровень гормона роста в крови достигал 80 нг/мл, т. е. на порядок превышал контрольный уровень. У животных отмечались также изменения роста. Одна группа их росла быстрее, другая — медленнее контрольных.

Из-за экспрессии гена гормона роста человека у трансгенных крыс нарушалась функция островкового аппарата поджелудочной железы: снижалась толерантность к глюкозе и происходило нарушение строения островков (дегрануляция β -клеток, дегенерация и замещение островковой ткани соединительной). Изменения островкового аппарата сохранялись в трех поколениях животных.

Трансгенные крысы с экспрессирующим геном гормона роста человека являются новой биологической моделью, пригодной для изучения механизмов и разработки методов профилактики и лечения некоторых форм диабета.

Введение. У женщин, страдающих диабетом (одним из наиболее широко распространенных заболеваний человека), частота врожденных аномалий достигает 8%, что в три раза выше общепопуляционного уровня [1, 2]. Строгий контроль и лечение беременных женщин, страдающих этой патологией, приводят к значительному снижению количества мертворожденных, неонатальной болезненности и смертности. Однако частота неонатальных нарушений развития плода при диабете остается высокой, а у потомства таких матерей наблюдается понижение веса при рождении, задержка роста и болезненность [3, 4]. Патогенетический механизм этих отклонений остается неясным. Для того чтобы пролить свет на эти проблемы, необходимо, по мнению ряда авторов [3—5], изучение фундаментальных аспектов репродуктивной функции млекопитающих.

В связи с тем, что исследование многих вопросов затруднено при беременности у человека, для этих целей используют опытных животных. Известно несколько экспериментальных моделей диабета: аллоксановая [6], стрептозотоциновая [7], панкреатектомическая [8] и некоторые другие. Однако в настоящее время не существует одной идеальной модели для изучения беременности, осложненной диабетом. Поэтому поиск оптимального варианта для решения того или иного вопроса остается актуальным.

Сформировавшееся в последние годы новое направление — генная инженерия млекопитающих — позволяет вплотную подойти к выяснению некоторых теоретических проблем биологии и медицины и имеет