

11. Клонирование гена ApoM1 человека и его экспрессия в фибробластах мыши / В. Н. Шульженко, Л. Л. Лукаш, Л. П. Шуляк и др. // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 5. — С. 105—107.
12. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1980. — 479 с.
13. Gilbert W., Maxam A. M. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — 74, N 2. — P. 560—564.
14. Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. — М.: Наука, 1986. — 240 с.
15. Гааль Э., Медьеша Г., Верецки Л. Электрофрез в разделении биологических макромолекул. — М.: Мир, 1982. — 446 с.
16. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity / L. L. Abell, B. B. Levy, B. B. Brodie, F. E. Kendall // J. Biol. Chem. — 1952. — 195, N 1. — P. 357—366.
17. Киряков А., Тингерова Э. Определение холестерина и триглицеридов в липопротеидах сыворотки крови, выделенных методом двойной沉淀итации // Лаб. дело. — 1979. — № 7. — С. 398—402.
18. Киряков А., Тингерова Э., Стоянова С. Электрофореза на серуминте липопротеини въерху агарозен гел // Съевр. медицина. — 1977. — 28, № 4. — С. 29—35.
19. Breslow J. L. Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation // Ann. Rev. Biochem. — 1985. — 54. — P. 699—727.
20. Корнеев С. А. Повторяющиеся последовательности генома человека // Генетика. — 1988. — 24, № 6. — С. 965—979.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
НИИ геронтологии АМН СССР, Киев

Получено 23.06.89

УДК 577.21:579.25.5

**Т. Г. Титок, И. Е. Костецкий, Т. Л. Чайковская, Т. П. Кочубей,  
Л. Г. Жарова, С. Д. Кириленко, И. М. Мельник, Е. М. Сильванская,  
Т. И. Бужиевская, В. А. Кордюм**

## **ПЕРЕНОС ГЕНА ПРЕПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА КРЫСАМ С ИСКУССТВЕННО ВЫЗВАННЫМ ДИАБЕТОМ**

*Крысам со стрептозотоциновым (СТЦ) диабетом инъекцировали в печень включенный в липосомы плазмиду с геном препроинсулина человека (pAINS). Введение pAINS вело к снижению гликемии и повышению концентрации иммунореактивного продукта в крови с максимальным эффектом через 6—8 ч после инъекции. Через 24 ч показатели возвращались к исходным уровням.*

**Введение.** Технология рекомбинантных ДНК достигла таких успехов, которые позволяют целенаправленно получать в достаточном количестве функционально активные конструкции. Экспериментально показано, что перенесенные гены могут экспрессироваться в гетерологичных клетках [1—3]. Манипулирование генами позволило исследователям поставить вопрос о возможности лечения наследственных болезней с помощью трансплантации. Был разработан и ряд подходов к осуществлению коррекции некоторых заболеваний: трансформация извлеченных из организма клеток костного мозга или фибробластов необходимым геном с последующей реимплантацией тем же животным [4, 5], а также введение защищенных генов непосредственно в организм [6]. О генотерапии высказываются разные мнения, но интерес к ней по-прежнему не ослабевает [7, 8]. Для оценки эффективности и побочных действий такой терапии требуется широкая апробация последней на модельных животных. В настоящей работе представлены предварительные результаты по трансплантации гена препроинсулина человека крысам с искусственно вызванным диабетом.

**Материалы и методы.** Плазмида pAINS получена путем введения *SalGI-EcoRI*-фрагмента 9, содержащего ген препроинсулина человека, в сайт *SalGI* плазмиды pALI (*pUC18*, в которой по *BamHI*-сайту встроены *Alu*-фрагмент геномной ДНК чело-

нека длиной 270 пар нуклеотидов (п. н.) (рис. 1). Липосомы готовили из смеси липидов — лецитин : холестерин : дицетиловосфат (7 : 2 : 0,5) методом упаривания диэтилового эфира после кратковременного озвучивания водно-эфирной смеси на УЗ-дезинтеграторе MSE. Заключение рекомбинантной ДНК в липосомы осуществляли методом кальциевого плавления, достигая 7—10 % включения ДНК в фосфолипидные везикулы. Целостность реэкстрагированной из липосом ДНК (по данным электрофореза) и ее биологическая активность (по данным трансформации *Escherichia coli*) не изменялись.

У самцов крыс Wistar весом 160—200 г вызывали состояние инсулин-зависимого диабета путем внутрибрюшинного введения СТЦ в дозе 60 мг/кг живой массы. В опыт брали крыс на

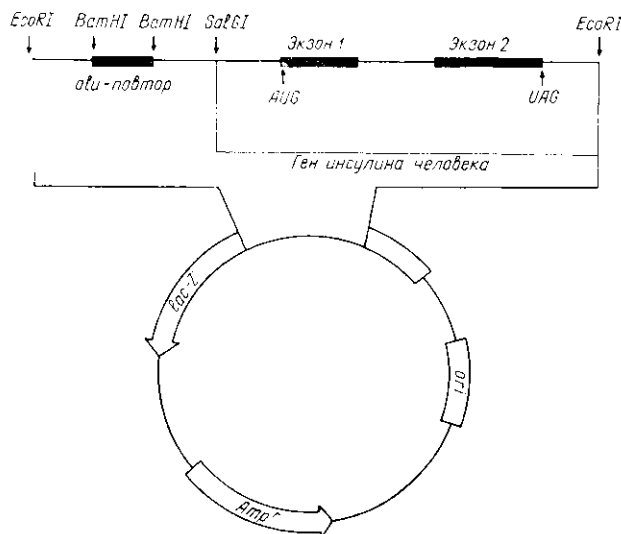


Рис. 1. Схема плазмиды *pAINS*  
Fig. 1. Scheme of *pAINS* plasmid

12—14-й день после однократного введения СТЦ, когда прекращалась потеря живой массы и устанавливалась постоянная гипергликемия. Условия содержания и кормления крыс были стандартными [10]. Перед введением *pAINS* с целью выявления инсулин-зависимого состояния всем крысам с диабетом были проведены однократные подкожные инъекции препаратов инсулина (обычного говяжьего с максимальным эффектом через 3 ч после введения или цинк-инсулин-суспензии (ИЦС) с максимальным эффектом через 9—10 ч после введения в дозах 2 и 3 ЕД на 100 г соответственно). Взвесь липосом в физиологическом растворе (75 мкг ДНК на особь, 0,2 мл) инъецировали непосредственно в правую боковую долю печени после вскрытия брюшной полости под эфирным наркозом (1-я группа, 26 животных). Контрольным животным инъецировали по 0,2 мл физиологического раствора при тех же условиях (2-я группа, 6 животных). Еще одной контрольной группой служили интактные животные со СТЦ-диабетом (3-я группа, 10 животных).

Содержание глюкозы крови определяли глюкозооксидазным микрометодом на приборе «Глюкофот»; иммунореактивный инсулин (ИРИ) и С-пептид — радиоиммунным методом, используя набор рино-ИНС-ПГ-<sup>125</sup>I для определения инсулина человека производства Ин-та биоорг. химии АН БССР.

Данные обработаны методом регрессионного и корреляционного анализов.

**Результаты и обсуждение.** Эффективность вводимой *pAINS* оценивали по динамике гликемии и уровню инсулина в сыворотке крови одних и тех же крыс через 6, 8, 10, 24 ч после инъекции. Регрессионный анализ выявил значительное снижение глюкозы в крови крыс 1-й группы на 6—8-м ч после операции с последующим повышением ее до исходного уровня через 24 ч при сравнении с показателями интактных животных 3-й группы ( $P < 0,01$ ). Хотя между собой 2-я и 3-я контрольные группы не отличались, различия по уровням гликемии в 1-й и 2-й группах были недостоверны, что, возможно, связано с недостаточной выборкой 2-й группы животных (рис. 2).

Из сопоставления результатов введения *pAINS* и препаратов инсулина (таблица) видно, что максимальное снижение глюкозы крови у животных 1-й группы на 6—8-м ч совпадало с максимальным эффектом препаратов инсулина: в случае ИЦС — через 10 ч, обычного — через 3 ч ( $r = 0,85$ ,  $P < 0,01$ ). Определение иммунореактивного продукта

в сыворотке крови в тех же временных точках выявило повышение концентрации ИРИ с достижением максимума через 6—8 ч, т. е. в период максимального снижения глюкозы с последующим возвращением к исходным показателям через 10 ч после инъекции *pAINS*. С-пептид в сыворотке этих же животных обнаружен не был. Однако статистиче-

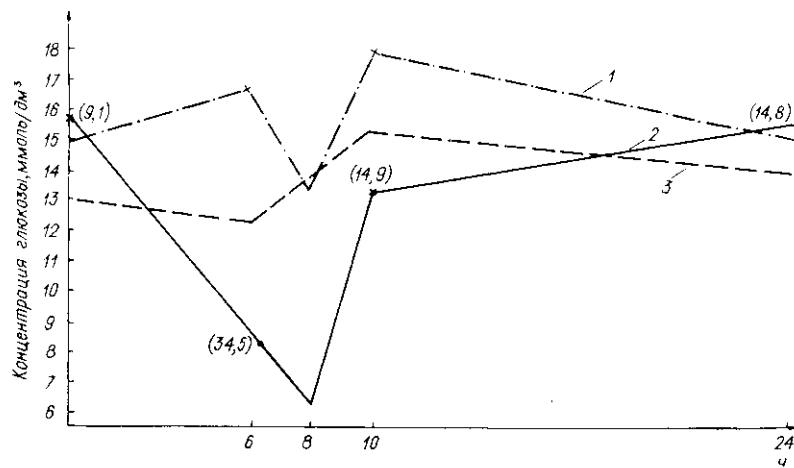


Рис. 2. Динамика гликемии у крыс: 1 — intactные животные со СТЦ-диабетом; 2, 3 — после введения *pAINS* и физиологического раствора соответственно. В скобках — концентрация инсулина в сыворотке крови ( $\mu\text{E}/\text{мл}$ ), определенная через 0, 6, 10 и 24 ч. Fig. 2. Dynamics of glycemia in rats: 1 — intact animals with streptozotocin diabetes; 2, 3 — after injection of *pAINS* and physiological solution, respectively. In brackets — insulin concentration in blood serum ( $\mu\text{E}/\text{ml}$ ) determined after 0, 6, 10 and 24 h

скую обработку в данном случае провести было нельзя из-за очень малочисленной выборки (по 1—2 животных на временную точку). Следует указать на широкую вариабельность уровней гликемии у крыс со СТЦ-диабетом (от 25,4 до 8,2 ммоль/дм<sup>3</sup>), а также на неоднозначную

*Гликемия у крыс с СТЦ-диабетом после введения им различных препаратов инсулина и pAINS*  
*Glycemia after injection of insulin preparations and pAINS into streptozotocin diabetic rats*

Исходная	Концентрация глюкозы, ммоль/дм <sup>3</sup>			Коэффициент корреляции, r
	10 ч после введения ИЦС	3 ч после обычного инсулина	6 ч после введения <i>pAINS</i>	
14,6	10,1	—	4,1	0,27
11,4	9,9	—	5,9	
12,1	9,6	—	6,7	
15,4	9,8	—	5,0	
14,2	11,2	—	9,7	
17,4	—	14,8	14,0	0,85
18,2	—	10,7	17,7	
16,2	—	12,6	17,3	
25,2	—	14,2	12,1	
16,1	—	3,9	7,0	
8,2	—	1,3	2,9	
9,0	—	4,4	6,4	

реакцию на вводимый инсулин (падение гликемии в 1,5—4 раза у одних и сохранение прежнего уровня у других животных).

Снижение гликемии и повышение концентрации иммунореактивного продукта можно объяснить прежде всего транзитной экспрессией привнесенного гена, причем с осуществлением полноценного процессинга препроинсулина в клетках печени, так как известно, что метаболическая активность проинсулина невелика (около 5 % инсулина) [11],

а С-пептид в сыворотке опытной группы животных не выявлен. Можно предположить и другой механизм коррелятивного изменения гликемии и ИРИ, если принять во внимание данные литературы о роли липидов клеточных мембран в механизмах клеточной активации. Показано, что, изменяя содержание холестерина, можно изменить жидкость клеточной мембраны и функцию клеток в результате варьирования суммарного липидного состава холестерина: фосфолипиды, которое должно находиться в определенных пределах [12]. С такой перестройкой клеточной мембраны связана активация некоторых мембранных и внутриклеточных ферментов: фосфодиэстеразы, фосфатаз, аденилатциклазы и др. С другой стороны, показано, что одним из механизмов действия инсулина является перераспределение и конформационное изменение мембранных компонентов клетки, что ведет, в частности, к активации кодирующего гена переносчика глюкозы. Примечательно, что синтез мРНК этого гена переносчика глюкозы после стимула увеличивался через 3 ч и поддерживался на максимальном уровне до 12 ч, падая затем до исходного [13]. На основании вышеизложенного можно предположить, что адсорбированные липосомы, используемые в качестве переносчика рекомбинантной ДНК, могли изменить соотношение типов липидов, изменяя липидную структуру клеточных мембран гепатоцитов, что в свою очередь привело к активации мембранных компонентов, имитирующих действие инсулина с последующей активацией гена переносчика глюкозы — начального этапа процесса утилизации глюкозы. Такой механизм, вероятно, мог привести к сходным результатам в работе [6] у здоровых крыс после внутривенного введения им заключенных в липосомы рекомбинантных ДНК с 1-м крысиным геном препроинсулина.

Таким образом, введение *pAINS* в составе липосом в печень крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом приводит к однопиковому падению концентрации глюкозы крови с максимумом через 8 ч и возвращению через сутки к исходному уровню гликемии. Эффекты от введения в печень *pAINS* (через 6–8 ч) и от подкожного введения говяжьего обычного инсулина (через 3 ч) совпадали. Однако пока остается неясным, какова судьба введенной в печень рекомбинантной ДНК и роль липосом в наблюдаемом после операции гипогликемическом эффекте. Последующие этапы нашей работы будут направлены, в частности, на выяснение этих вопросов.

#### TRANSFER OF HUMAN PREPROINSULIN GENE INTO STREPTOZOTOCIN DIABETIC RATS

*T. G. Titok, I. E. Kostetsky, T. L. Chaikovskaya, T. P. Kochubej, L. G. Zharova, S. D. Kirilenko, I. M. Melnik, E. M. Silcanskaya, T. I. Buzhievskaya, V. A. Kordium*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev  
Research Institute of Endocrinology and Metabolism,  
Health Department of the Ukrainian SSR

#### Summary

Recombinant plasmid encapsulated in liposomes containing DNA sequences of human preproinsulin gene (*pAINS*) was injected into the liver of streptozotocin diabetic rats. The injection of *pAINS* decreased glycemia level and increased immunoreactive blood product concentration. Maximal effect was detected 6–8 h after injection, and insulin concentration returned to their initial levels after injection.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Laub O., Rutter W. J.* Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system // *J. Biol. Chem.*— 1983.— 258, N 10.— P. 6043–6050.
2. *Transfer of a human preproinsulin gene contain plasmid into non-pancreatic mammalian cells/W. R. I. Leibiger, U. Kiessling, D. Sarrach, S. D. H. Zühlke* // *Biomed. et biochim. acta.*— 1988.— 47, N 4–5.— P. 343–348.

3. *Human insulin gene in transgenic mouse lines* / M. Fromont-Racine, D. Bucchini, P. Desbois et al. // *Ibid.*— P. 349—353.
4. *Expression of foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors* / G. Keller, C. Paige, E. Gilboa et al. // *Nature.*—1985.— 318, N 6042.— P. 149—153.
5. *Clonal gene therapy: transplanted mouse fibroblast clones express human  $\alpha_1$ -anti-trypsin gene in vivo* / R. T. Garver, J. A. Chytil, M. Courtney et al. // *Science.*—1987.— 237, N 4816.— P. 762—764.
6. *In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin-1* // C. Nicolau, A. Le Pape, Ph. Soriano et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.— 80, N 4.— P. 1068—1072.
7. *Anderson W. F. Prospects for human gene therapy in the born and unborn patient* // *Clin Obstet. and Gynecol.*—1986.— 29, N 3.— P. 568—594.
8. *Joyce C. Americans plan gene therapy on people* // *New Sci.*—1988.— 119, N 1624.— P. 24.
9. *Молекулярное клонирование гена инсулина человека* / Н. С. Незнанов, Б. М. Трояновский, А. Л. Гартель и др. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.*—1987.— № 7.— С. 14—15.
10. *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте* / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария и др.— Киев: Вища шк., 1983.— 243 с.
11. *Ляшенко В. А., Дрожженников В. А., Молотковская И. М. Механизмы активации иммунокомпетентных клеток.*— М.: Медицина, 1988.— 239 с.
12. *King G., Kahn R. Effect of insulin on growth in vivo and cells in culture* // *Control of animal cell proliferation* / Eds A. L. Boyton, H. L. Leffert.— Orlando etc.: Acad. press, 1985.— Vol. 1.— P. 201—249.
13. *Regulation of glucose-transporter gene expression by insulin in cultured human fibroblasts* / K. Atsushi, K. Hideshi, Y. Yasunao et al. // *Diabetes.*—1988.— 37, N 11.— P. 1583—1586.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
НИИ эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР, Киев

Получено 23.06.89