

5. Vannice J. L., Levinson A. D. Properties of the human hepatitis B virus enhancer: position effects and cell-type nonspecificity // J. Virol.—1988.—62, N 4.—P. 1305—1313.
6. Козловская Т. М., Пулиен П. П. Структура и экспрессия гена поверхностного антигена вируса гепатита В человека // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 4.—С. 884—901.
7. Shahid J., Aleem S. The human hepatitis B virus enhancer requires trans-acting cellular factor(s) for activity // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 2.—P. 710—715.

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

Получено 24.07.89

УДК 577.352.27:57.086.3

**К. М. Билич, Д. М. Иродов, В. А. Кордюм**

### **НЕКОТОРЫЕ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ ПРЯМОЙ ИНЪЕКЦИИ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ ПЛАЗМИДНУЮ ДНК, В ПЕЧЕНЬ МЫШИ**

*Методом просвечивающей электронной микроскопии исследована реакция клеток печени на прямое введение в составе липосом бактериальной плазмиды кодирующей синтез β-галактозидазы. Через сутки после инъекции в гепатоцитах отмечены гипертрофия элементов аппарата Гольджи и структурные изменения митохондрий часть из которых носит обратимый характер. С помощью методики, оптимально выявляющей фосфолипиды, предприняты попытки исследовать ультратонкое строение вводимых липосом, а также их распределение в печени. Через 5 мин после инъекции липосомы располагались у ядер гепатоцитов — вблизи поровых комплексов и в перинуклеарном пространстве. Эта локализация отмечалась и через сутки. Выявление липосом в ткани, богатой эндогенными липидами, сопряжено с рядом трудностей, которые обсуждаются.*

**Введение.** Ограниченная проницаемость фосфолипидных мембран позволяет использовать липосомы в качестве носителей физиологически активных веществ, обеспечивающих дозированное поступление последних в определенный орган. Варьируя состав липосом, можно направленно влиять на избирательность их накопления в определенных клетках печени [1]. Ранее было высказано предположение [2], что прямая инъекция липосомной суспензии в печень предпочтительнее внутривенной, так как в этом случае липосомы непосредственно контактируют с гепатоцитами, обеспечивая доставку экзогенной ДНК в эти клетки.

Механизмы взаимодействия липосом с клетками к настоящему времени изучены достаточно полно [3, 4]. Следует, однако, заметить, что реже других для выяснения этих механизмов применялся метод просвечивающей электронной микроскопии. Такое обстоятельство объясняется, с одной стороны, методической сложностью стабилизации хрупких липосом в ходе проводки и заливки [5, 9], с другой — существенной трудностью в дальнейшем наблюдении за липосомами в тканях с активным эндоцитозом. В обход второго затруднения ряд исследователей предпочитает работать со сравнительно простыми модельными системами [5—7]. Однако на подступах к генотерапевтическим исследованиям [8] становится все более очевидной необходимость электронно-микроскопического контроля качества вводимых липосом, их распределения в ткани животных и возможных реакций различных ультраструктур клетки на вводимый генетический материал.

Целью настоящей работы явилось изучение ультратонкой организации липосом, приготовленных методом Са-ЭДТА, их распределения в ткани печени при прямом введении, а также реакции ультраструктур на плазмидную ДНК, инъецируемую в составе липосом.

**Материалы и методы.** В работе использовали ДНК плазмиды *pGA293*, содержащей *lacZ*- ген *Escherichia coli*, кодирующий синтез бактериальной β-галактозидазы. Плазмиду заключали в липосомы следующего состава (%): лецитин — 70, холестерин — 20, децил-фосфат — 9, фосфатидил-этанолламин — 1. Основной способ приготовления — кальциевая плавка с последующей обработкой ЭЛТА. Был также апроби-

раван метод детергентного анализа и ряд других способов приготовления липосом. Контролем служили липосомы, не содержащие ДНК плазмиды («пустые»).

Липосомы выявляли методом негативного контрастирования фосфорновольфрамовым калием (рН 6,8), а также по методике [5, 9], оптимально сохраняющей и выявляющей фосфолипиды. В течение 10 мин липосомы префиксировали в 0,2 %-ном растворе глутарового альдегида («Serva», ФРГ) (исходный раствор разводили до концентрации 0,2 % влиевью липосом). После этого препарат смешивали в объемном отношении 1:1 с теплым раствором легкоплавкой агарозы («Bio-Rad», США), приготовленном на 0,1 М натрий-кальциевом буфере (КБ). Полученные пластинки застывшей агарозы с иммобилизованными липосомами измельчали до кусочков рабочего объема. Фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутаральдегида в 0,1 М КБ (рН 7,4) с добавлением 0,2 % таниновой кислоты (ТК) при комнатной температуре в течение 4 ч. После серии отмивок в буфере образцы постфиксировали в растворе, содержащем 1 %  $\text{OsO}_4$  и 1,5 %  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  на 0,1 М КБ (окончательный рН раствора 7,7), в течение 4 ч при 0 °С. Снова тщательно промывали буфером, в течение 2 ч обрабатывали 2 %-ным раствором ТК (в темноте при комнатной температуре) и промывали холодной дистиллированной водой. После обезвоживания в серии холодных растворов этанола возрастающей концентрации и обработки пропиленоксидом образцы заливали в эпоксиаралдит. Ультратонкие срезы с блоков изготавливали на ультратоме LKB-III («LKB», Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали на электронном микроскопе «JEM-7A» при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Липосомы, содержащие плазмиду, инъецировали двухмесячным мышам линии BALB/c в крупную нижнюю долю печени. Локализацию нужной доли устанавливали через разрез наружного покрова на уровне органа. Объем вводимого материала всегда составлял 60 мкл на особь, в случае инъецирования плазмиды вводимый материал содержал 300 мкг липидов и 10 мкг ДНК. Контролем служили животные, которым вводили «пустые» липосомы, а также интактные животные. На вариант опыта выделяли группу животных из четырех особей. Мышей забивали через 5 мин, 24 ч и 30 сут после инъекции.

Для приготовления препаратов ткань иссекали из участков печени, в который вводили материал. Кусочки ткани обрабатывали по той же методике, что и липосомы, исключая ненужные в случае ткани этапы префиксации и заливки в уплотнитель. Кроме того, ткань обрабатывали и по стандартной электронно-микроскопической методике (глутаровый альдегид — четырехокись осмия с заливкой в эпоно).

Реакцию ткани печени на введение плазмидной ДНК исследовали через 24 ч и 30 сут у тех мышей, где продукт экспрессии был заранее тестирован методом иммунофлюоресцентного анализа [2]. После предварительного просмотра полутонких срезов для дальнейшей обработки выбирали периферические зоны долек, отличающиеся наименьшей гетерогенностью ультраструктур [10]. Анализировали по три блока с животного, соблюдая принцип рандомизации срезов [10.] Приготовление срезов, контрастирование и параметры просмотра были аналогичны таковым при исследовании липосом.

**Результаты и обсуждение.** Строение липосом. Считается, что кальциевая плавка осуществляется в мягких физиологических условиях и приготовленные этим способом липосомы можно с успехом использовать для захвата лабильных биополимеров [3]. Необходимый для осуществления кальциевой плавки отрицательный заряд привносится децитил-фосфатом. Некоторую избыточность этого отрицательного заряда с успехом снимает микродобавка фосфатидил-этаноламина. Негативное контрастирование позволило оценить препарат как достаточно гомогенный, без крупных агрегатов, с размером везикул от 150 до 250 нм. Малый процент везикул с окрашенной водной полостью разрешает сделать косвенное заключение о первоначальной целостности мембран в большинстве липосом, получаемых данным способом (рис. 1, а).

Анализ ультратонких срезов дает представление о внутренней ламеллярной организации и о рабочем объеме липосом. Процесс образования липосом протекает, вероятно, в две стадии. Сперва под влиянием кальция исходные озвученные липосомы агрегируют с образованием складчатых мультиламеллярных структур (рис. 1, б). При обработке ЭДТА эти структуры переходят в большие одно-, дву- и

мультиламеллярные везикулы диаметром 150—250 нм (рис. 1, *в*). Промечивается четкая тенденция этих везикул собираться в своеобразные тандемы (рис. 1, *з, д*). Число везикул в тандеме не превышает

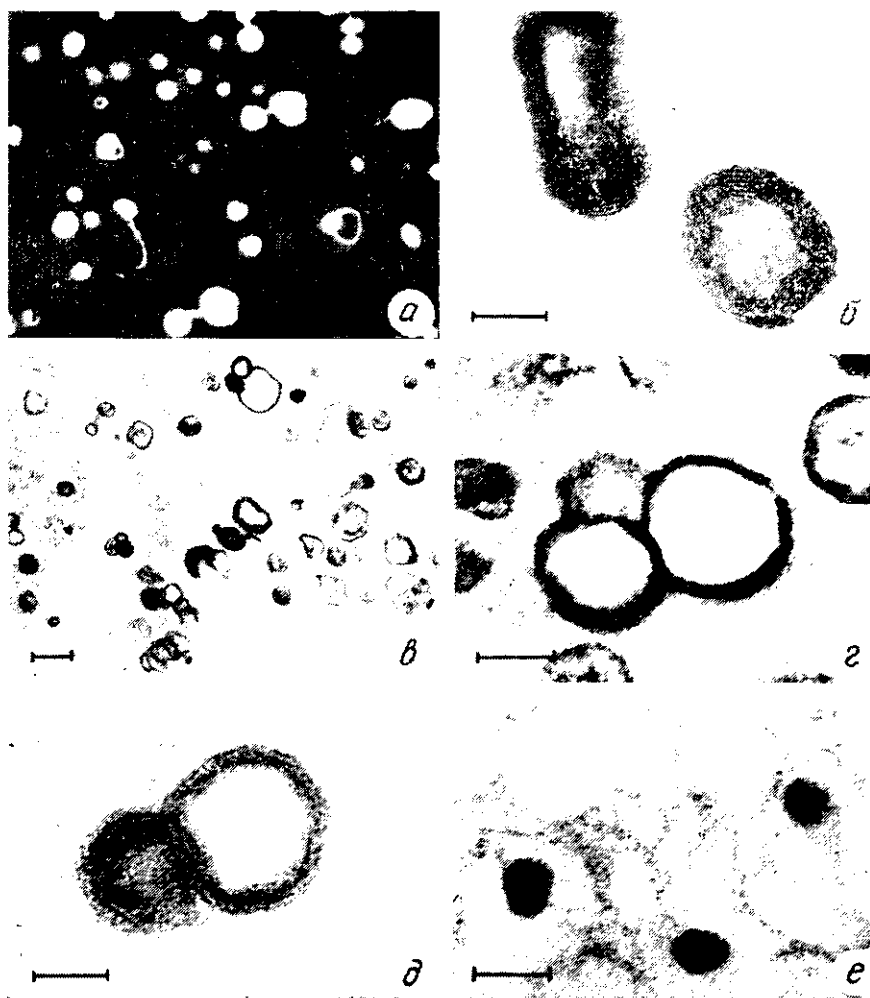


Рис. 1. Фракция липосом, приготовленных методами Ca-ЭДТА (*a—д*) и detergent dialysis (*e*); *a* — негативное контрастирование,  $\times 32\,000$ , масштаб 0,3 мкм; *б—e* — срезы липосом, иммобилизованных в агарозе и зафиксированных по методике «танининовая кислота—ферроцианид осмия»; *б* — липосомы после обработки  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\times 86\,000$ , масштаб 0,12 мкм; *в* — то же, Ca-ЭДТА,  $\times 22\,000$ , масштаб 0,22 мкм; *з* — липосомный тандем,  $\times 71\,000$ , масштаб 0,15 мкм; *д* — то же,  $\times 158\,000$ , масштаб 0,05 мкм; *е* —  $\times 102\,000$ , масштаб 0,1 мкм

Fig. 1. Fraction of liposomes produced by Ca-EDTA methods (*a—d*) and detergent dialysis method (*e*,  $\times 102\,000$ , bar — 0.1  $\mu\text{m}$ ); *a* — negative contrast,  $\times 32\,000$ , bar — 0.3  $\mu\text{m}$ ; *б—e*: sections of liposomes immobilized in agarose and fixed by tannic-ferrocyanide  $\text{OsO}_4$  method; *б* — liposomes after  $\text{Ca}^{2+}$ -treatment,  $\times 86\,000$ , bar — 0.12  $\mu\text{m}$ ; *в* — liposomes after Ca-EDTA treatment,  $\times 22\,000$ , bar — 0.22  $\mu\text{m}$ ; *з* — «tandems» of liposomes,  $\times 71\,000$ , bar — 0.15  $\mu\text{m}$ ; *д* — the same —  $\times 158\,000$ , bar — 0.1  $\mu\text{m}$

трех. На срезе полость одной или двух липосом, составляющих тандем, оказывается вскрытой, тогда как одна—две другие — заполнены мультиламеллярной намоткой. Очевидно, такая картина отражает прохождение плоскости среза. Хотя толщина среза и средний диаметр липосомы — величины сопоставимые, тем не менее каждая везикула срезается в 2—4 приема. Этим, очевидно, объясняется наличие на препаратах определенного процента «горбушек», т. е. верхушечных срезов. Что же касается тандемов, то, не исключая агрегирования, предположительнее было бы считать их продуктом «сшивки», сопровождаемой обобществлением мембран.



Рис. 2. Распределение электронноплотных мультислойных структур в гепатоцитах intactных (*a—г*) и инъектированных (*д—з*) мышей: для сравнения: *a* и *ж* — в просвете канальцев эндоплазматического ретикулума, *a* —  $\times 56\,000$ , масштаб 0,2 мкм; *ж* —  $\times 120\,000$ , масштаб 0,16 мкм; *б* и *д*, *е* — у наружной и внутренней мембран митохондрий, *б* —  $\times 111\,000$ , масштаб 0,1 мкм; *д* —  $\times 29\,000$ , масштаб 0,17 мкм; *е* —  $\times 69\,000$ , масштаб 0,15 мкм; *в*, *г* и *з* — окаймляющие эндогенную липидную глобулу, *в* —  $\times 25\,000$ , масштаб 0,2 мкм; *г* —  $\times 111\,000$ , масштаб 0,1 мкм, *з* —  $\times 63\,000$ , масштаб 0,15 мкм. Длительность всех опытов 5 мин после прямой инъекции липосом

Fig. 2. Distribution of electron-dense multilamellar structures in the hepatocytes of intact (*a—г*) and injected (*д—з*) mice. (Fixation according to tannic-ferrocyanid  $\text{OsO}_4$  method). To compare: *a* and *ж* — in the lumen of endoplasmic reticulum; *б* and *д*, *е* —

Наши данные несколько расходятся со сводкой [3], где получаемые этим способом липосомы характеризуются как большие одноламеллярные: в получаемых нами образцах количество ламелл варьирует.

Три других апробированных нами способа не дали положительных результатов. Так, например, при детергентном диализе получается достаточно стабильный препарат мультиламеллярных липосом, лишенных внутренней полости (рис. 1, *e*).

**Распределение липосом в ткани.** Двухступенчатая обработка танниновой кислотой в сочетании с фиксацией в OsFeCN придает ламеллярным фосфолипидным структурам повышенную электронную плотность, что позволяет легко идентифицировать их при любом уровне контрастирования ткани в срезе.

При анализе образцов печени интактных мышей, которым липосом не вводили, были получены достаточно неожиданные результаты. В гепатоцитах этих мышей встречались электронноплотные олиголамеллярные везикулы, локализованные в просветах расширенных канальцев гладкого эндоплазматического ретикулума (рис. 2, *a*), в цитоплазме вблизи митохондрий и в матриксе митохондрий (рис. 2, *b*). Размеры этих структур, периодичность укладки ламелл, электронная плотность были настолько сходны с соответствующими параметрами липосом, что это дало нам повод назвать их псевдолипосомами (ПЛ). Кроме того, в цитоплазме интактных мышей эндогенные липидные глобулы нередко окаймлены электронноплотными мультиламеллярными тяжями (рис. 2, *в*). Плотность укладки мембран здесь такая же, как в липосомах и в ПЛ (рис. 2, *г*), но протяженность тяжей больше.

У подопытных животных, которым инъецировали липосомы («пустые» и содержащие плазмиду), на всех сроках исследования в гепатоцитах наблюдались олиголамеллярные везикулы вышеописанной формы, ультраструктурной организации и локализации (рис. 2, *д*—*з*). Размеры этих структур соответствовали ранее описанным размерам липосом, не превышая 250 нм (за исключением ламеллярных тяжей вокруг липидных глобул).

Разница между опытом и чистым контролем состояла в том, что при экспозиции ткани с липосомами в течение 5 мин случаи контакта везикул с митохондриями (рис. 2, *д*) и их включения в матрикс (рис. 2, *e*) наблюдались значительно чаще. В то же время в гепатоцитах интактных мышей была очевидной структурная связь ПЛ с митохондриальной мембраной (рис. 2, *б*).

Ни в опыте, ни в контроле не отмечалось случаев включения электронноплотных везикул в цитоплазматические вакуоли, вторичные липосомы или их объединения с эндоцитозными пузырьками.

Через 5 мин после инъекции липосом электронноплотные олиголамеллярные везикулы прослеживались вблизи ядер гепатоцитов — у ядерных пор и в расширениях перинуклеарного пространства (рис. 3, *a*). Через сутки после инъекции липосом частота встречаемости везикул у ядер гепатоцитов еще достаточно велика (рис. 3, *б*), множественные скопления прослеживаются между микроворсинками желчных канальцев (рис. 3, *б*), а также вблизи эндотелиальной выстилки пространства Диссе. К 30-тым сут после инъекции везикулы у ядер не обнаружены.

Структуры, локализованные у ядра, всегда уплощены, вытянуты, свойственные липосомам просвет и первоначальные сферические очертания частично или полностью утрачены (рис. 3, *a*), но во всех случаях сохраняются высокая электронная плотность и периодичность ламеллярной намотки (рис. 3, *г*, *д*). Нередко в липосомах у ядер прослеживается тандемность (рис. 3, *г*). В нуклеоплазме везикулы не бы-

---

near the outer and inner membranes of mitochondria; *в*, *г* and *з*—bordering the endogenous lipid droplet. *a*— $\times 56000$ , bar 0.2  $\mu\text{m}$ , *б*— $\times 111000$ , bar 0.1  $\mu\text{m}$ , *в*— $\times 25000$ , 0.2  $\mu\text{m}$ ; *г*— $\times 111000$ , bar 0.1  $\mu\text{m}$ ; *д*— $\times 29000$ , bar 0.17  $\mu\text{m}$ ; *e*— $\times 69000$ , bar 0.15  $\mu\text{m}$ ; *ж*— $\times 120000$ , bar 0.16  $\mu\text{m}$ ; *з*— $\times 63000$ , bar 0.15  $\mu\text{m}$ . The experiment in all the cases is 5 minutes after direct injection of liposomes into tissue

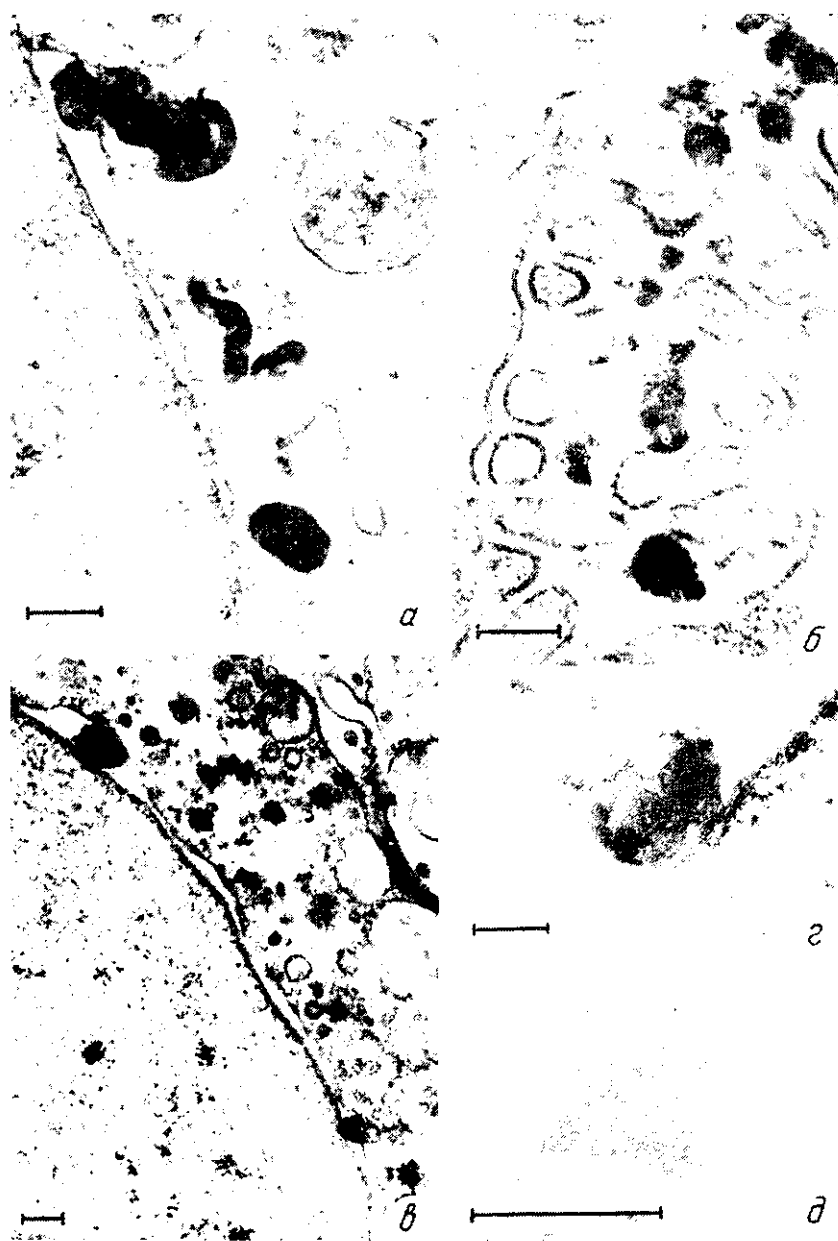


Рис. 3. Мультиламеллярные везикулы в гепатоцитах мышей, инъецированных липосомами, содержащими плазмидную ДНК: *a* — вблизи ядерного порового комплекса и в расширении перинуклеарного пространства,  $\times 83\,000$ , масштаб 0,12 мкм; *b* — в просвете желчного канальца,  $\times 73\,000$ , масштаб 0,12 мкм; *c* — в расширении перинуклеарного пространства,  $\times 33\,000$ , масштаб 0,15 мкм; *d* — увеличенные фрагменты *a*; *c* —  $\times 86\,000$ , масштаб — 0,12 мкм; *d* —  $\times 195\,000$ , масштаб 0,12 мкм; *a* — 5 мин после инъекции; *b* — *d* — 24 ч после инъекции

Fig. 3. Multilamellar vesicles in hepatocytes after injection of liposomes with enclosed plasmid DNA: *a* — in the vicinity of pore complex and in perinuclear space, 5 minutes after injection,  $\times 83\,000$ , bar 0.12  $\mu\text{m}$ ; *b* — in the lumen of bile canaliculus:  $\times 73\,000$ , bar 0.12  $\mu\text{m}$ ; *c* — in perinuclear space:  $\times 33\,000$ , bar 0.15  $\mu\text{m}$ ; *d* — the enlarged fragments of Fig. 3, *a*; *c* —  $\times 86\,000$ , bar 0.12  $\mu\text{m}$ ; *d* —  $\times 195\,000$ , bar 0.12  $\mu\text{m}$ ; *b* — *d* — 24 hours after injection

ли отмечены ни разу, так же, как ни разу их околоядерное расположение не было сопряжено с каким-либо изменением ядерной мембраны. Когда же везикулы располагались в просветах перинуклеарного пространства, то степень расширения последнего не была значительной, разрывов ядерной оболочки и обобществления мембран не наблюдали.

При сравнении мышей, получавших плазмиду, с мышами, инъецированными «пустыми» липосомами, не наблюдалось какой-либо существенной разницы в локализации и распределении описываемых околоядерных структур.

Факт обнаружения олиголамеллярных везикул в ткани втактных животных требует особой осторожности при оценке результатов опыта. Вероятнее всего, к истинным липосомам можно отнести лишь везикулы, локализованные у ядер гепатоцитов, поскольку в чистом контроле они не встречались. Появление липосом (и «пустых» и «нагруженных») у ядер за столь короткий с момента инъекции промежуток времени хорошо согласуется с наблюдениями авторов работы [12]. Методом электронно-микроскопической радиоавтографии эти исследователи показали, что уже через 3 мин после внутривенной инъекции мышам липосом, содержавших ДНК, последняя обнаруживалась в ядрах. Характерно, что самих липосом вблизи ядер авторам выявить не удалось, ибо при радиоавтографической обработке нестабилизированные фосфолипиды вымывались из клеток. Поэтому никаких предположений о механизме попадания ДНК из липосом в ядра ими не высказано. В цикле работ [11—13] достоверно продемонстрировано, что внутривенно вводимые мышам липосомы уже через 20 мин после инъекции ассоциированы с митохондриями, и эта связь прослеживается вплоть до 4 ч после инъекции. Однако в работе [11] липосомы всегда оказывались заключенными в соответствующие цитоплазматические вакуоли и только такие конгломераты интернализировались в матрице органелл. Отсутствие вакуолей вокруг липосом в нашем опыте объяснить трудно, так же, впрочем, как и наличие в чистом контроле определенного количества ПЛ. Нельзя сказать, что подобные картины ранее не наблюдались и не оговаривались исследователями. Появление так называемых миелиновых фигур в связи с частичным разрушением клеточных липопротеидных мембран при альдегидной фиксации — факт общеизвестный [14]. Однако в работе [11] подчеркнута явная разница миелиновых фигур от липосом — и по размерам, и по степени периодичности укладки ламелл, чего мы подтвердить не можем. ПЛ, наблюдавшиеся нами, порою неотличимы от истинных. Более всего они напоминали липосомы на промежуточной стадии их приготовления, до обработки ЭДТА (сравнить рис. 2, а с рис. 1, б). Что же касается уплощения везикул, потери ими просвета полости и сферических очертаний, то эти же особенности отмечали Белицер и др. [5, 6] и, очевидно, они возникают при любом взаимодействии фосфолипидных глобул с клетками.

По всей вероятности, методика [9], оптимально выявляющая искусственно синтезированные фосфолипидные глобулы, не является вполне адекватной при их выявлении в тканях, богатых эндогенными липидами. В пользу этого свидетельствуют нередкие случаи выявления как в опыте, так и в чистом контроле электронноплотных мультиламеллярных тяжей, опоясывающих внутриклеточные липидные глобулы (сравнить рис. 2, в, г и 2, з). Конфигурация таких тяжей явно отличается от липосомной, и их эндогенное происхождение очевидно.

Реакция ультраструктур на введение плазмиды. Через сутки после инъекции в печенку липосом, содержавших плазмиду, во многих гепатоцитах прослеживались нарушения ультраструктуры митохондрий: набухание ряда органелл с просветлением матрикса и умеренной фрагментацией крист (рис. 4, а), частичная потеря двуконтурности митохондриальных мембран (рис. 4, в). В отдельных органеллах наблюдалась очаговая вакуолизация и миелинизация (рис. 4, б). При инъецировании «пустых» липосом все перечисленные нарушения встречались с меньшей частотой и, вероятно, укладывались в рамки общей неспецифической реакции органелл на стресс после прямой инъекции.

К 30-тым сут после инъекции липосом, содержавших плазмиду, структура органелл в большинстве проанализированных клеток вос-

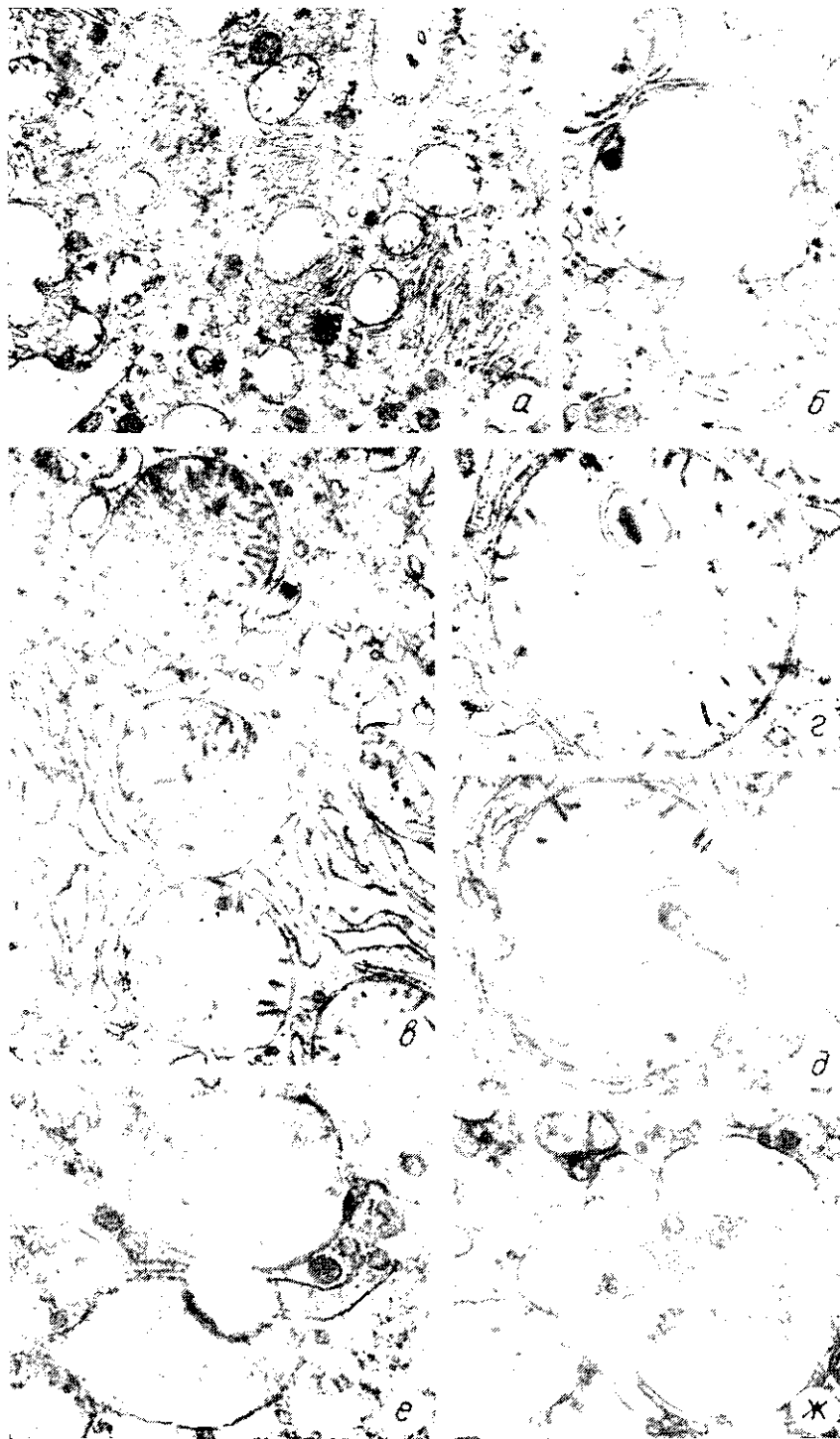


Рис. 4. Ультраструктурные изменения в гепатоцитах мыши после прямого введения липосом, содержащих плазмидную ДНК. Изменения в митохондриях: *a*—*в*—24 ч после введения плазмидной ДНК ( $\times 10\,000$ ;  $\times 23\,000$ ;  $\times 19\,000$  соответственно); *д*, *е*—то же через 30 сут ( $\times 20\,000$ ); гипертрофия аппарата Гольджи: *е*—через 24 ч ( $\times 46\,000$ ); *ж*—30 сут после инъекции ( $\times 42\,000$ )

Fig. 4. Ultrastructural changes in mice hepatocytes after direct injection of liposomes with enclosed plasmid DNA: different changes in mitochondria: *a*—*в*—24 hours after injection of plasmid DNA ( $\times 10000$ ;  $\times 23000$ ,  $\times 19000$ , respectively); *д*, *е*—30 days after injection ( $\times 20000$ ); Golgi region hypertrophy: *е*—24 hours after injection ( $\times 46000$ ); *ж*—30 days after injection ( $\times 42000$ )



становилась, процент набухших митохондрий был меньше, случаи фрагментации крист встречались реже. Однако случаи вакуолизации и миелинизации (рис. 4, *г, д*), оставаясь, по-видимому, необратимыми, встречались с прежней частотой. У интактных животных миелинизированные митохондрии встречались редко, степень миелинизации была незначительной.

Не исключено, что в митохондриях с определенными нарушениями мембран интенсивнее протекают процессы миелинизации, и такие именно органеллы обладают повышенным сродством к поступающему извне фосфолипидному материалу. Но в таком случае действительно очень трудно отделить причину от следствия, т. е. дифференцировать в опыте истинные липосомы, включившиеся в матрикс, от ПЛ, формирующихся при нарушении целостности митохондриальных мембран из их же (мембран) фосфолипидного содержимого.

В гепатоцитах мышей, получивших плазмиду, через сутки после инъекции отмечалась значительная гипертрофия элементов комплекса Гольджи: резкое вздутие секреторных пузырьков с высвобождением в цитоплазму секреторных гранул (рис. 4, *е*). Напряженность этой органеллы к 30-тым сут после инъекции оставалась высокой (рис. 4, *ж*). У животных, которым инъецировали «пустые» липосомы, строение комплекса Гольджи оставалось в пределах нормы. Функциональное напряжение комплекса Гольджи, вероятнее всего, связано с экспрессией плазмидного гена. Представляется перспективным провести гистохимическое выявление  $\beta$ -галактозидазы и сопоставить ультраструктурное распределение фермента с реакцией данной органеллы.

В ядрах гепатоцитов никаких существенных нарушений при введении липосом с плазмидой обнаружено не было. Некоторое расширение перинуклеарного пространства и незначительное увеличение числа интерхроматиновых гранул отражали, по-видимому, общее повышение функциональной нагрузки в клетках, активно продуцирующих фермент.

«Ревизия» других органелл не выявила каких-либо существенных изменений по сравнению с печенью интактных животных.

Авторы выражают благодарность Н. В. Белицер и сотрудникам руководимой ею лаборатории за методическую и консультативную помощь.

#### SOME ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF DIRECT INJECTION OF LIPOSOMES WITH INCLOSED PLASMID DNA INTO MICE LIVER

*K. M. Bilich, D. M. Irodov, V. A. Kordium*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

After direct injection of liposomes with inclosed bacterial  $\beta$ -galactosidase gene into mice liver the main ultrastructural changes have been observed in mitochondria and Goldgi region. Liposomes themselves were investigated by transmission electron microscopy of ultrathin sections. An attempt was made to elucidate their distribution in mice liver after direct injection.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Intrahepatic* distribution of small unilamellar liposomes as a function of liposomal lipid composition / Н. Н. Spanjer, М. V. Galen, F. N. Roerdink et al. // *Biochim. et biophys. acta.*— 1986.— 863, N 2.— P. 224—230.
2. *Экспрессия*  $\beta$ -галактозидазы *Escherichia coli* в гепатоцитах мыши / И. Е. Костенкий, С. П. Шляева, Л. И. Ляхачева и др. // *Биополимеры и клетка.*— 1989.— 5, № 2.— С. 51—58.

3. Марголис Л. В., Брейгельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками.— М.: Наука, 1986.— 240 с.
4. Марголис Л. В. Механизмы взаимодействия липосом с клетками: перспективы и ограничения применения липосом в науке и практике // Биол. мембраны.— 1987.— 4, № 5.— С. 453—467.
5. Взаимодействие отрицательно заряженных лецитиновых липосом с эритроцитами человека: исследование методом трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов / Н. В. Белицер, В. И. Чернышов, М. Г. Анишук и др. // Докл. АН СССР.— 1984.— 277, № 1.— С. 210—213.
6. Interaction of positively charged liposomes with erythrocyte membrane. An ultrastructural study / N. V. Belitser, M. G. Anischuk, V. I. Chernishov, T. R. Kozlova // Cell. Biol. Int. Rep.— 1986.— 10, N 5.— P. 331—338.
7. Чернышов В. И., Козлова Т. Р., Соколов Ю. В. Адсорбция и слияние положительно заряженных липосом с мембраной эритроцита человека. Электронная микроскопия ультратонких срезов // Биол. мембраны.— 1987.— 4, № 1.— С. 90—95.
8. Кордюм В. А. Задачи и проблемы геной терапии // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 5—15.
9. Takahashi G. Tannin-ferrocyanide OsO<sub>4</sub> method for transmission and scanning electron microscopy // Proc. XI Int. Congr. on electron microscopy.— Kyoto, 1986.— 345 p.
10. Loud A. V. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cell // J. Cell Biol.— 1968.— 37, N 1.— P. 27—46.
11. Liposomes injected intravenously into mice associate with liver mitochondria / A. Cudd, H. Lable, M. Gervais, C. Nicolau // Biochim. et biophys. acta.— 1984.— 774, N 3.— P. 169—180.
12. Cudd A., Nicolau C. Intercellular fate of liposome-encapsulated DNA in mouse liver. Analysis using electron microscope autoradiography and subcellular fractionation // Ibid.— 1985.— 845, N 4.— P. 477—491.
13. Cudd A., Nicolau C. Interaction of intravenously injected liposomes with liver mitochondria. A fluorescence and electron microscopy study // Ibid.— 1986.— 860, N 2.— P. 201—214.
14. Гайер Г. Электронная гистохимия.— М.: Мир, 1974.— 488 с.

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

Получено 23.06.89

УДК 577.21:579.25.5

Л. Л. Лукаш, Л. Н. Неборачко, Е. М. Сухорада, Е. В. Усенко,  
И. С. Варзанова, С. В. Подольская, Т. И. Бужиевская, В. А. Кордюм

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Показано, что фибробласты человека и мыши, в которые введена рекомбинантная плазмида, содержащая ген инсулина человека под собственным промотором при отсутствии гена-помощника и сильных вирусных промоторов, секретируют в культуральную среду специфический белок-продукт. Установлена сходная зависимость секреции белка — продукта гена инсулина от времени для фибробластов человека и мыши.*

**Введение.** Разработка методов лечения сахарного диабета, являющегося одним из наиболее распространенных заболеваний, — одна из первоочередных задач биотехнологии в медицине. Биотехнология в западных странах добилась значительных успехов в производстве инсулина человека генноинженерными методами. В будущем лечение этого заболевания, возможно, будет производиться с помощью геной терапии: введение в капсулах или иным путем в организм больного клеток, продуцирующих инсулин, а также прямое введение нормального гена инсулина в такой молекулярной конструкции, которая обеспечит его экспрессию в клетках больных, в том числе в неспециализированных клетках. Для разработки новых способов лечения важно изучить экспрессию введенного гена инсулина в клетках млекопитающих различного происхождения.

Задачи настоящего исследования следующие: изучение особенностей экспрессии геномного гена инсулина человека в культивируемых фибробластах человека и мыши и выяснение возможности селекции клеток, трансформированных по гену инсулина.