



УДК 577.21:579.25.5

Т. Г. Титок, И. Е. Костецкий, Т. Л. Чайковская,
И. С. Варзанова, Т. П. Кочубей, Л. Л. Лукаш, В. А. Кордюм

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕНА ПРЕПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА В ОРГАНИЗМ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫМ ДИАБЕТОМ КРЫС

Крысам со стрептозотоциновым и аутоиммунным (крысы ВВ) инсулинзависимым сахарным диабетом инъецировали в печень и интраперитонеально включенные в липосомы плазмиды pAINS и GINS, несущие ДНК-последовательность препроинсулинового гена человека. У крыс со стрептозотоциновым диабетом введение pAINS и GINS привело к снижению концентрации глюкозы в крови с максимальным эффектом через 6–10 ч после инъекции. Через 24 ч показатели возвращались к исходному уровню. У крыс ВВ такой реакции не зарегистрировано. Выявлена большая вариабельность в концентрации иммунореактивного продукта в сыворотке крови животных после инъекции плазмид. Обсуждается вопрос о возможных механизмах (эндокринных и иммунных) этого явления.

Введение. Достижения в создании целенаправленных полноценно активных конструкций рекомбинантных ДНК — только первый шаг на пути к генной терапии. Далее следует разработка приемов, позволяющих вводить нужные гены в значительную часть клеток соответствующей ткани организма для достижения лечебного эффекта. На сегодняшний день предложен ряд подходов для коррекции некоторых заболеваний, среди них трансформация *in vitro* извлеченных из организма клеток костного мозга или фибробластов необходимым геном с последующей реимплантацией их тем же животным [1–4], введение запущенных генов непосредственно в организм [5–7]. Полученные результаты показали, что в большинстве исследований, проведенных на экспериментальных животных, экспрессия перенесенных генов была кратковременной и обычно не устраняла полностью клинических признаков заболевания. Поэтому наиболее сложным в изучении генноинженерных манипуляций на уровне организма является последний этап — достижение полноценной сбалансированной регуляции экспрессии введенного гена и исключение возможных побочных эффектов от такого вмешательства. В данной работе представлены результаты опытов по перенесению гена препроинсулина человека крысам, больным инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) и здоровым.

Материалы и методы. В качестве моделей ИЗСД использовали крыс Wistar с диабетом, индуцированным стрептозотоцином (СТЦ-диабет), и крыс с естественной аутоиммунной формой заболевания (крысы ВВ/В). Плазида GINS сконструирована на основе ДНК pHB320, в которую под промотор гена поверхностного антигена вируса гепатита В встроены ген препроинсулина человека без области тканеспецифической регуляции. Плазида HB320, любезно предоставленная д-ром Э. Я. Греном (Ин-т орг. синтеза АН Латвии, Рига), сконструирована на основе pHR322, в BamHI-сайт которой введена полная копия ДНК вируса гепатита В. Источником гена инсулина служила плазида 322Ins [8].

© Т. Г. Титок, И. Е. Костецкий, Т. Л. Чайковская, И. С. Варзанова, Т. П. Кочубей,
Л. Л. Лукаш, В. А. Кордюм, 1993

Конструкция плазмиды *pAINS*, состав и приготовление липосом, включение в них ДНК описаны ранее [9]. Взвесь липосом в физиологическом растворе с заключенной в них ДНК (75 мкг в 0,2 мл на особь) вводили в организм крысы двумя способами — непосредственно в ткань печени и в перитонеальную полость. Тем же способом вводили пустые липосомы и физиологический раствор, служившие контролем. Содержание глюкозы в крови натощак выявляли глюкозооксидазным микрометодом при помощи «Глюкофота», иммунореактивный инсулин и *c*-пептид — радиоиммунным методом, используя набор рино-ИНС-ПГУ1¹²⁵ производства Ин-та биоорг. химии АН Беларуси (Минск). Глюкозу крови определяли перед введением ДНК, затем в динамике через 6, 10 и 24 ч после введения. Данные обработаны статистически по критерию Фишера для малых выборок.

Таблица 1

Динамика гликемии у крыс, больных диабетом, после введения им *pAINS* и *GINS*

Введенный материал	Инъекция	Количество животных	Глюкоза, ммоль/л		Падож
			Время после введения плазмиды, ч		
			0	6	
СТЦ-диабет					
<i>pAINS</i> в липосомах	В печень	32	9,0—29,6 (17,6)	1,7—21,8 (10,4)***	
<i>GINS</i> в липосомах	Интраперитонеально	4	19,0—22,7 (20,7)	4,3—13,2 (9,1)***	
Липосомы без ДНК	В печень	10	12,7—22,5 (19,9)	11,0—23,0 (17,2)	
Физиологический раствор	В печень	15	8,9—22,5 (16,5)	9,6—23,1 (16,0)	
Больные интактные животные	—	7	9,0—22,4 (17,5)	8,6—21,6 (15,7)	
Инсулин Lente	Внутрибрышечно	33	9,0—22,0 (16,1)	—	
Естественный диабет (крысы BB/W)					
<i>pAINS</i>	В печень	9	15,6—23,1 (19,1)	16,3—28,6 (18,7)	
Инсулин Lente	Внутрибрышечно	7	16,9—28,7 (19,9)	—	
Больные интактные животные	—	12	15,1—27,6 (19,8)	16,8—28,2 (18,7)	

Введенный материал	Инъекция	Количество животных	Глюкоза, ммоль/л		Падож
			Время после введения плазмиды, ч		
			10	24	
СТЦ-диабет					
<i>pAINS</i> в липосомах	В печень	32	5,3—25,7 (14,6)*	7,0—22,0 (15,6)	5
<i>GINS</i> в липосомах	Интраперитонеально	4	8,7—14,2 (11,4)**	13,7—18,0 (15,8)	1
Липосомы без ДНК	В печень	10	3,4—20,6 (12,6)***	6,2—22,6 (16,4)	—
Физиологический раствор	В печень	15	5,6—22,9 (15,2)	8,7—19,7 (14,8)	—
Больные интактные животные	—	7	10,6—22,8 (17,8)	6,8—21,6 (17,5)	—
Инсулин Lente	Внутрибрышечно	33	4,4—16,7 (11,6)***	—	—
Естественный диабет (крысы BB/W)					
<i>pAINS</i>	В печень	9	11,7—28,2 (18,7)	16,8—27,4 (18,4)	—
Инсулин Lente	Внутрибрышечно	7	3,7—8,6 (4,8)***	—	—
Больные интактные животные	—	12	13,9—24,0 (18,9)	15,2—22,7 (19,9)	—

Примечание. Приведены лимиты концентрации глюкозы, в скобках — средние величины. * $p \geq 0,95$; ** $p \geq 0,99$; *** $p \geq 0,999$ (достоверность разности средних при малочисленных выборках по критерию Фишера).

Результаты и обсуждение. Введение *pAINS* и *GINS* животным с искусственно вызванным диабетом. После инъекции липосом с плазмидой *pAINS* в печень крысам, больным СТЦ-диабетом, у большинства из них наблюдалось значительное снижение гликемии (табл. 1). Максимальный эффект выявлен через 6 ч после инъекции. К 10-му ч после введения ДНК содержание глюкозы начинало увеличиваться, но ее уровень был ниже по отношению к исходным показателям и таковым для интактных животных. Только через 24 ч показатели выходили на уровень исходных. Степень реакции животных на введение липосом с рекомбинантной ДНК была различной. У одних особей снижение глюкозы было до умеренной гликемии (7,5—8,5 ммоль/л), у других — до нормы (4,5—5,0 ммоль/л) и гипогликемии (2,0—2,5 ммоль/л). Около 9% больных СТЦ-диабетом крыс не реагировали на введение *pAINS*. Зарегистрирована также гибель животных через 6 и 10 ч (пять и одна крыса соответственно).

Плазмиду *GINS*, также несущую активный ген препроинсулина человека и заключенную в липосомы, вводили экспериментальным животным интраперитонеально в той же дозе (см. табл. 1). Несмотря на различия методов введения и структуры вектора для исследуемого гена, плазмиды *pAINS* и *GINS* вызывали сходный эффект по силе и времени проявления. Обе рекомбинантные ДНК оказывали такое же действие на организм животных, больных СТЦ-диабетом, как и медицинский препарат инсулина пролонгированного действия (цинк-инсулин-суспензия Lente производства «NOVO», Дания, с пиком действия на 10—12-й ч после введения). Ни вскрытие брюшной полости, ни введение физраствора не влияло на последующую динамику гликемии, которая не отличалась от таковой для интактных животных. Инъекция пустых липосом вызывала снижение уровней глюкозы в крови животных этой группы, но с более слабой степенью выраженности (по сравнению с эффектом *pAINS* и *GINS*) и со сдвигом во времени, а именно: с максимальным снижением концентрации глюкозы через 10 ч после введения. Случаев падежа и гипогликемии среди животных этой группы не было.

Введение *pAINS* и *GINS* здоровым крысам Wistar. Аналогичные эксперименты по введению плазмид *pAINS* и *GINS* были проведены с использованием здоровых крыс Wistar. Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что здоровые животные реагировали на введение рекомбинантных ДНК, несущих инсулиновый ген человека. У них снижался уровень глюкозы крови на 0,7—1,8 ммоль/л по сравнению с исходными уровнями и показателями для интактных крыс в тех же временных интервалах, что и в предыдущей опытной группе. Сходная реакция наблюдалась и на введение пустых

Таблица 2

Динамика уровней глюкозы после введения *pAINS* и *GINS* здоровым крысам

Введенный материал	Инъекция	Количество животных	Глюкоза, ммоль/л			
			Время после введения плазмиды, ч			
			0	6	10	24
<i>pAINS</i> в липосомах	В печень	11	4,0—5,1 (4,6)	2,7—4,3 (3,5)	3,3—5,4 (4,0)	4,0—5,7 (4,8)
<i>pAINS</i> в липосомах	Внутрибрюшинно	5	4,2—6,0 (5,0)	2,0—5,7 (3,8)	2,3—5,4 (3,6)	3,1—5,9 (4,8)
<i>GINS</i> в липосомах	»	5	4,5—6,0 (5,1)	2,7—5,0 (3,8)	3,1—5,6 (4,3)	4,2—5,7 (5,0)
Липосомы без ДНК	В печень	5	4,3—5,5 (5,1)	2,4—5,3 (3,7)	3,9—4,9 (4,5)	3,9—5,7 (4,7)
Физраствор	Внутрибрюшинно	3	4,4—5,1 (4,8)	3,9—4,7 (4,4)	4,1—5,4 (4,8)	4,3—5,1 (4,8)
Интактные животные	—	6	4,3—5,7 (5,0)	4,3—5,7 (5,2)	4,0—5,1 (4,9)	3,5—5,6 (4,7)

липосом и отсутствовала после инъекции физраствора. Нужно отметить, что наблюдаемое снижение уровней глюкозы крови у здоровых животных не выходило на пределы нижних границ колебаний в норме (2,5—3,0 ммоль/л), т. е. находилось в пределах нормы реакции. Случаев падежа от гипогликемии, отмечавшихся у больных крыс с индуцированным диабетом, у здоровых животных не зарегистрировано.

Введение *pAINS* крысам ВВ/В. В табл. 1 представлены также результаты введения в печень *pAINS* экспериментальным животным иной модели ИЗСД — крысам ВВ/В, у которых болезнь развивается в результате нарушения аутоиммунных процессов. Введенная плазма в той же дозе не вызывала реакции в отношении глюкозы крови. Не выявлено отличий от интактных животных даже у двух самцов, которым *pAINS* вводили дважды с интервалом в три недели. На инъекции медицинских препаратов инсулина крысы ВВ реагировали снижением глюкозы в крови и моче, благодаря чему поддерживалась их жизнеспособность и размножение.

Эффект снижения глюкозы у больных СТЦ-диабетом и здоровых животных после введения им гена препроинсулина человека в составе плазмид можно объяснить транзитной экспрессией привнесенного гена. Было проведено определение иммунореактивного продукта в сыворотке крови четырех опытных крыс в период максимального снижения у них глюкозы и пяти контрольных (три интактных больных животных СТЦ-диабетом и два больных — после инъекции физраствора, табл. 3). В случае синтеза инсулина или его предшественника проинсулина должны наблюдаться количественные изменения соответствующего белка в сыворотке крови, так как оба продукта подобны в иммунной реакции (ИРИ) со специфической сывороткой против инсулина человека. Полученные показатели ИРИ значительно варьируют в опытной группе животных в сравнении с контролями. Если у крысы № 16 снижение глюкозы можно увязать с синтезируемым продуктом перенесенного гена, то у остальных крыс такой связи не прослеживается. Более того, у животного № 8 при значительном падении гликемии величина ИРИ была на очень низком уровне. В сыворотке крови опытных животных *c*-пептид не выявлен. Таким образом, если экспрессия перенесенного гена препроинсулина у крысы № 16 и имела место, то отсутствие *c*-пептида свидетельствует о накоплении непротессированного проинсулина, метаболическая активность которого составляет только около 5% активности зрелого инсулина [10]. К тому же аналогичный ответ (снижение глюкозы) на введение ненагруженных липосом у больных СТЦ-диабетом и здоровых животных, с одной стороны, и отсутствие реакции у крыс ВВ/В — с другой, свидетельствуют о том, что снижение глюкозы, по-видимому, обусловлено иным(и) механизмом(и).

Таблица 3

Концентрация инсулина в сыворотке крови через 6—8 ч после инъекции в печень *pAINS* крысам с искусственно вызванным диабетом

Введенный материал	№ животного	Глюкоза, ммоль/л		ИРИ (мкЕ/мл) после введения <i>pAINS</i>
		До введения	После введения	
<i>pAINS</i>	2	17,2	5,6	12,9
	8	16,1	3,9	8,2
	16	9,7	3,3	34,48
	17	16,5	5,1	12,8
Физраствор	20	13,7	14,4	12,8
	23	15,4	15,3	13,9
Интактные животные	7	13,2	—	10,34
	12	17,7	—	13,78
	6	16,4	—	12,64

Известно, что в печени и перитонеальной полости (места введения плазмид) располагаются наибольшие популяции макрофагов, называемые в печени купферовскими клетками, которые являются первым звеном защитной системы организма млекопитающих. Вводимые липосомы быстро фагоцитируются макрофагами и в процессе фагоцитоза активируются. Для активированных макрофагов характерна высокая активность пентозо-фосфатного пути использования глюкозы [11]. Это не основной путь обмена глюкозы у млекопитающих, его доля зависит от функционального состояния клеток, а именно: если им необходима восстановленная НАДФ·Н для усиленного синтеза целенаправленных продуктов-медиаторов, дополнительного количества внутриклеточных ферментов, т. е. когда клетка переключает все энергетические ресурсы на усиленную цитотоксичность и способность к фагоцитозу. При этом потребление глюкозы купферовскими клетками возрастает в 3—4 раза. Подобный механизм снижения уровня глюкозы согласуется с данными Рея [12] о значении интерлейкина-1 (ИЛ-1) — медиатора активированных макрофагов в эндокринном контроле гомеостаза глюкозы у млекопитающих. Одноразовое введение ИЛ-1 вело к существенному и продолжительному (до 8 ч) снижению содержания глюкозы у мышей, больных химически индуцированным СТЦ и естественным (C57BL db/db) диабетом. Степень такого снижения зависела от дозы ИЛ-1 и не зависела от концентрации инсулина в сыворотке крови.

В наших экспериментах снижение уровня глюкозы у различных групп могло определяться, с одной стороны, активностью макрофагов у крыс-реципиентов, с другой — их физиологическим состоянием. Активация, вызванная фагоцитозом, значительно усиливается под воздействием полинуклеотидов [13]. Наличие свободной ДНК, вводимых плазмид или их фрагментов в наших экспериментах вероятно, так как в результате контакта нагруженных липосом с клеточной поверхностью часть их может разрушиться, и заключенная в них ДНК — выйти в межклеточное пространство [14] и вызвать более ранний и сильный ответ, чем пустые липосомы.

В то же время у здоровых животных уровень снижения глюкозы не превышает нижние физиологические границы и примерно одинаков для пустых и нагруженных липосом. У больных животных на ранней стадии СТЦ-диабета наблюдается более широкий спектр реакции, у крыс ВВ/В — такая реакция отсутствует полностью. Крысы ВВ/В — естественная модель ИЗСД, в основе развития которого лежат аутоиммунные процессы [15, 16]. При аутоиммунных эндокринных заболеваниях в физиологической регуляции функций центральную роль играют макрофаги, киллеры и их продукты [17]. У крыс ВВ/В выявлена неспособность образовывать необходимые киллерные клетки после активации лектинами или лимфокинами [18]. К моменту манифестации заболевания (период, в который проводились наши исследования) у них, по-видимому, уже проявляется дефектность макрофагов, так же как и у мышей C57BL db/db [12], что может объяснить и наши результаты.

По полученным данным трудно оценить воздействие вводимой рекомбинантной ДНК с активным геном препроинсулина на метаболизм глюкозы в условиях организма. Является ли наблюдаемый эффект — снижение глюкозы — результатом эндокринного или иммунного механизмов либо их взаимодействия, покажут дальнейшие исследования. Ясно одно, в поддержании гомеостаза глюкозы на организменном уровне лежат множественные, по-видимому, взаимодополняемые механизмы, проявление которых будет зависеть от нормального или патологического состояния организма.

Summary. The encapsulated into liposomes recombinant plasmid DNAs carrying the human preproinsulin gene sequences (*pAINS* and *GINS*) were injected into the liver and the intraperitoneum of streptozotocin and autoimmune insulin-dependent diabetes rats.

The injection of plasmids decreased glucose concentration in serum of streptozotocin diabetic rats. Maximal effect was detected in 8—10 hr after injection and glucose concentration returned in 24 h to initial levels. The injected diabetic BB rats not display a similar response. There was noticeable immunoreactive product concentration variation in rat blood serum after injection. Possible endocrine and immunological mechanisms of this effect are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keller G., Keller C., Paige C. et al. Expression of foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors // *Nature*.—1985.—318, N 6042.— P. 149—153.
2. Garver R. I., Chytil A., Courtney M. et al. Clonal gene therapy: transplanted mouse fibroblast clones express human α -1 antitrypsin gene *in vivo* // *Science*.—1987.—237, N 4816.— P. 762—764.
3. Louis D. St., Verma I. M. Whole animal gene transfer // *Gene transfer vectors mammalian cells: Banbury conf. Cold Spring Harbor (New York, October 14—17, 1987)*.—New York, 1987.— P. 94—102.
4. Selden R. F., Sooskiewicz M. J., Howie K. B. et al. Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implication for gene therapy // *Science*.—1987.—236, N 4802.— P. 714—718.
5. Briand Pascale. Modeles animaux de therapies geniques // *J. genet. hum.*—1989.—37, N 4—5.— P. 289—297.
6. Nicolau C., Le Pape A., Soriano Ph. et al. *In vivo* expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1983.—80, N 4.— P. 1068—1072.
7. Wolff J. A., Malone R. W., Williams Ph. et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* // *Science*.—1990.—227, N 4949.— P. 1465—1468.
8. Лукаш Л. Л., Неборачко Л. Н., Подольская С. В. и др. Экспрессия экзогенного гена инсулина человека в субкультурах и клонах культивируемых фибробластов человека // *Докл. АН УССР*.—1989.— № 8.— С. 71—74.
9. Титок Т. Г., Костецкий И. Е., Чайковская Т. Л. и др. Перенос гена препроинсулина человека крысам с искусственно вызванным диабетом // *Биополимеры и клетка*.—1990.—6, № 2.— С. 76—80.
10. King C. L., Kaher C. R. Effect of insulin on growth *in vivo* and cell in culture // *Control of animal cells proliferation* / Eds. A. L. Boyton, H. L. Leffert.—New York: Acad. press, 1985.—Vol. 1.— P. 201—249.
11. Deker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupifer cells) // *Eur. J. Biochem.*—1990.—192, N 2.— P. 245—261.
12. Rey A. D., Besedovsky H. Antidiabetic effects of interleukin-1 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1989.—86, N 15.— P. 5943—5947.
13. Ляшенко В. Н., Дрожеников В. А., Молотковская И. М. Механизмы активации иммунокомпетентных клеток.— М.: Медицина, 1988.— 238 с.
14. Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками.— М.: Наука, 1986.— 240 с.
15. Nakano K., Mordes J. P., Handler E. S. et al. Role of host immune system in BB/Wor rat. Predisposition to diabetes residues in bone marrow // *Diabetes*.—1988.—37, N 10.— P. 519—525.
16. Полторак В. В., Блох К. О. Аутоиммунный генез инсулинзависимого сахарного диабета на модели крыс BB // *Иммунология*.—1989.— № 3.— С. 5—10.
17. Bendtzen K., Buschard K., Diamant M. et al. Possible role of IL-1, TNF α - and IL 6 in insulin dependent diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease // *Lymphokine Res.*—1989.—8, N 3.— P. 335—340.
18. Prud'homme G. J., Lapchak P. H., Parfrey N. et al. Autoimmunity-probe BB rats lack functional cytotoxic T-cells // *Cell. Immunol.*—1988.—114, N 1.— P. 198—208.

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

Получено 10.08.92