

14. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosomal localization / J. S. Powell, K. L. Berkner, R. V. Lebo, J. W. Adamson // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 17.—P. 6465—6469.
15. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin // New Eng. J. Med.—1987.—316, N 2.—P. 73—78.
16. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis / C. G. Winearls, D. O. Oliver, M. S. Pipard et al. // Lancet.—1986.—2, N 8517.—P. 1175—1178.
17. Клонирование гена эритропоэтина человека / И. А. Крамерова, Н. С. Незнамов, В. М. Божков и др. // Молекуляр. генетика.—1988.—№ 7.—С. 26—28.
18. Mulligan R. C., Berg P. Selection for animal cells that express *Escherichia coli* gene coding for xantine-guanine phosphoribosyltransferase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 4.—P. 2072—2076.
19. Grunstein M., Hogness D. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene // Ibid.—1975.—72, N 10.—P. 3961—3965.
20. Graham F. L., Van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // Virology.—1973.—52, N 2.—P. 456—467.
21. Монакова Т. Е. Гомеостатические процессы в изолированных системах и организмах.—Красноярск: Медицина, 1983.—210 с.
22. Krystal G. A simple microassay for erythropoietin based on <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into spleen cells treated with phenylhydrazine // Exp. Hematol.—1983.—11, N 7.—P. 649—660.
23. Radioimmunoassay of erythropoietin: circulating levels in normal and polycythemic human being / J. F. Garcia, S. Ebbe, L. Hollander et al. // J. Lab. and Clin. Med.—1982.—99, N 6.—P. 624—635.
24. Modulation of gene expression in multiple hematopoietic cell lineages following retroviral vector gene transfer / M.-C. Magli, J. E. Dick, D. Huszar et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 3.—P. 789—794.
25. Potter H., Weir L., Leder P. Enhancer-dependent expression of human immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation // Ibid.—1984.—81, N 22.—P. 7161—7165.

НИИ биомед. технологии МЗ СССР, Москва

Получено 10.12.87

УДК 577.212:577.352.27

## ЭКСПРЕССИЯ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *Escherichia coli* В ГЕМАТОЦИТАХ МЫШИ

И. Е. Костецкий, С. П. Шплевая, Л. И. Лихачева,  
Л. Г. Жарова, Д. М. Иродов, В. С. Кириллова, В. А. Кордюм

Введение клонируемых генов в отдельные органы и ткани взрослого организма является важным средством изучения их функционирования, а также механизмов, регулирующих экспрессию этих генов, что позволяет охарактеризовать работы в этом направлении как поиск путей генной терапии. К настоящему времени достаточно хорошо разработаны методы трансформации эукариотических клеток *in vitro* (среди них Са-фосфатный, ДЭАЭ-декстрановый, электропорация, микроинъекция и др.). Поэтому один из подходов в генной терапии основан на трансформации *in vitro* извлеченных из организма животного клеток и после селекции — их обратная трансплантация тому же животному [1—4]. Однако наряду с очевидными достоинствами метода ретрансплантации клеток животных в ряде случаев он не может применяться с достаточной эффективностью, из-за чего прямая инъекция генетического материала непосредственно в орган или ткань может оказаться предпочтительнее. Так, при интраперитонеальной инъекции Са-фосфатного преципитата ДНК через сутки были обнаружены значительные количества чужеродной ДНК в животных тканях новорожденных крыс, особенно в печени и селезенке [5, 6]. Экзогенная ДНК активно транскрибировалась, и экспрессия генов инсулина, человеческого гормона роста прослеживалась по белковым продуктам в печени и селезенке или по соответствующим транскриптам.

Главная задача при введении экзогенной ДНК *in vivo* заключается в защите ДНК от нуклеазного гидролиза (в кровотоке, инкубационной среде, на мембранах или внутри трансформируемых клеток). С этой целью разработан и апробирован ряд подходов, заключающихся в реконструкции *in vitro* чужеродной ДНК в нуклеопротеидный комплекс в присутствии гистонов и анионных ДНК-связывающих белков [7—9]. В качестве переносчиков генетического материала *in vivo* используют также искусственные вирусоподобные частицы [10], микрокапсулы [7], липосомы [11, 12]. Применение липосом имеет ряд преимуществ перед другими системами: биодegradуемость самих носителей, нетоксичность их для клеток животных, возможность переноса практически любых биологически активных веществ и др. Варьирование состава липосом предоставило возможность направленно влиять на избирательность их накопления в определенных клетках печени (гепатоцитах, клетках Купфера или эндотелия) [12]. Очевидно, использование различных лигандов, варьирование состава липосом наряду с применением многих других подходов позволит в будущем разработать надежные методы преимущественного накопления липосом (а следовательно, и переносимых ими биологически активных веществ) в определенных клетках заданного органа. С этой точки зрения использование липосом для переноса плазмидной ДНК кажется предпочтительнее по сравнению с другими способами доставки.

Целью нашей работы явилось изучение экспрессии гена бактериальной  $\beta$ -галактозидазы в гепатоцитах печени взрослых мышей после инъекции плазмидной ДНК, заключенной в липосомы, непосредственно в заданный орган. Для этого разработана модельная система, позволяющая установить наличие продукта экспрессии и оценить его уровень в каждой клетке. Она включает маркерный ген ( $\beta$ -галактозидаза *E. coli*), систему доставки (инъекция заключенной в липосомы плазмидной ДНК непосредственно в печень), тестирование продукта экспрессии специфическими поликлональными антисыворотками с использованием иммунофлюоресцентного анализа (ИФ) с последующей микроцитометрией.

**Материалы и методы.** Плазмиды. В работе использовали ДНК плазмиды *pGA293*, любезно предоставленной нам д-ром Симплович (Канада). Данная плазмиды содержит *lacZ* ген *E. coli*, кодирующий синтез бактериальной  $\beta$ -галактозидазы. Производная этой плазмиды, *pGA293ZA*, была лишена *EcoRI*-фрагмента, несущего *lacZ*-последовательности, и использовалась нами в качестве контроля. Данные плазмиды заключали в большие моноламеллярные липосомы методом *Ca-fuzion*.

Получение и очистка сывороток. Иммунизацию кролей проводили очищенной  $\beta$ -галактозидазой, выделенной из *E. coli*. Полученную специфическую сыворотку (титры 1 : 32, 1 : 16 по Ухтерлони) подвергали очистке печеночным порошком [14]. Меченный флюоресценцизоцианидом (ФИЦ) ослиный антикроличий глобулин освобождали от несвязанного флюорохрома на 1 %-ной агарозе. Рабочее разведение кроличьей сыворотки к бактериальной  $\beta$ -галактозидазе при окраске цитологических препаратов 1 : 10, люминесцентной — 1 : 16.

Объект, инъекция материала. Исследование проведено на двухмесячных мышцах линии *BALB/c*. На вариант опыта выделяли группу животных из четырех особей, каждый опыт имел в среднем трехкратную повторяемость. Инъекции материала проводили в крупную нижнюю долю печени. Локализацию пупочной доли печени устанавливали через разрез наружного покрова на уровне органа. Проводимая операция не оказывала заметного отрицательного воздействия на животных.

Объем вводимого в печень животного материала во всех вариантах составил 60 мкл на особь. В случае инъектирования плазмид *pGA293ZA* и *pGA293*, заключенных в липосомы, вводимый материал содержал 300 мкг липидов и 10 мкг плазмидной ДНК. Кроме того, проведены инъекции плазмиды *pGA293* без липосом и липосом без плазмиды. Для проверки адекватных реакций животных на введение экзогенного материала использованы инъекции физиологического раствора (10 мМ трис-HCl, pH 7,5). Контролем к проведенным вариантам инъекций служили интактные животные.

Приготовление препаратов гепатоцитов. Для цитологических пре-

паратов использовали участок печени, в который вводили материал. Измельченную на кусочки ткань отмывали от элементов крови, выдерживали не менее 30 мин в холодном Na-цитратном буфере (0,88%-ный NaCl, 0,7 %-ный Na-цитрат, 0,1 %-ная глюкоза, 5 мкг/мл гепарин, pH 7,4) и использовали для получения мазков гепатоцитов. Качество мазков, их плотность проверяли под световым микроскопом. Мазки фиксировали 20 мин охлажденным при 4 °С ацетоном. Морфологическую сохранность и функциональную интактность гепатоцитов проверяли на отдельных препаратах окрашиванием их 0,2 %-ным трипановым синим [15]. Выход целых неповрежденных клеток гепатоцитов, которые не окрашивались трипановым синим, колебался в пределах 90–95 %.

Исследование цитологических препаратов. Продукт экспрессии *lacZ*-гена в гепатоцитах мышей тестировали непрямой ИФ методом [16] с использованием плацебо. Препараты исследовали на люминесцентном микроскопе МЛ-2 с фотометрической приставкой при длине волны 520 нм с зондом 0,5 мкм<sup>2</sup>. При просмотре препаратов пользовались объективом  $\times 70$  для водной иммерсии. В ультрафиолете окрашенный продукт экспрессии *lacZ*-гена флуоресцировал зеленым светом. Интенсивность свечения каждого отдельного гепатоцита определялась как средняя величина от измерений зондом трех точек в различных участках цитоплазмы клетки. По каждому опыту измерения проводили на 30–50 гепатоцитах препарата с 4–5-кратной повторностью.

**Результаты и обсуждение.** Для доставки плазмидной ДНК непосредственно в заданный орган в отличие от описанных в литературе методов мы использовали липосомы. Они облегчают доставку ДНК в клетки и защищают ее от биодеградации [17], инъекция же липосом непосредственно в орган позволяет увеличить эффективность этих процессов. Тестирование бактериальной  $\beta$ -галактозидазы осуществляли через 24 и 48 ч после инъекции заключенной в липосомы плазмидной ДНК (рис. 1).

При анализе флуоресценции гепатоцитов мышей контрольных групп (введение липосом, физиологического раствора) через 24 и 48 ч после инъекции между отдельными вариантами отмечалась сходная

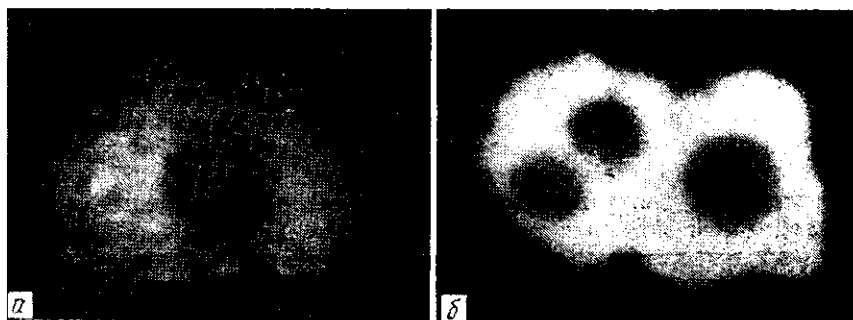


Рис. 1. Флуоресценция гепатоцитов: *a* — интактной мыши; *b* — через 24 ч после инъекции плазмиды *pGA293* в составе липосом

Fig. 1. Fluorescence of hepatocytes: *a* — of intact mouse, *b* — 24 h after injection of plasmid *pGA293* included into liposomes

реакция на введенный экзогенный материал. Интенсивность флуоресценции гепатоцитов была подобна таковой у интактных животных. Цитоплазма клеток проявляла слабос тусклое свечение, ядра не флуоресцировали. Распределение гепатоцитов по флуоресценции соответствовало нормальному распределению, что свидетельствует об отсутствии процессов, влияющих на интенсивность флуоресценции в клетках.

Гепатоциты животных, которым инъектировали в составе липосом плазмиду *pGA293Z<sup>A</sup>* (без *lacZ*-гена) через 24 ч также проявляли низкий уровень флуоресценции цитоплазмы. Но здесь уже наблюдается небольшое смещение максимума на кривой распределения в сторону большей интенсивности флуоресценции, а также намечаются отклонения от нормального распределения: часть клеток обладает более яркой, вы-

ходящей за пределы гауссовской кривой, флюоресценцией (рис. 2, а, б). Наибольшее смещение максимума на кривой распределения в сторону большей интенсивности флюоресценции отмечено при инъекции животным плазмиды *pGA293* (содержащей *lacZ*-ген), но без липосом. Опытной группе животных инъектировали плазмиду *pGA293* и в составе липосом.

Через 24 ч после инъекции в популяции гепатоцитов появляются клетки с ярко флюоресцирующей цитоплазмой (рис. 2, в). При разло-

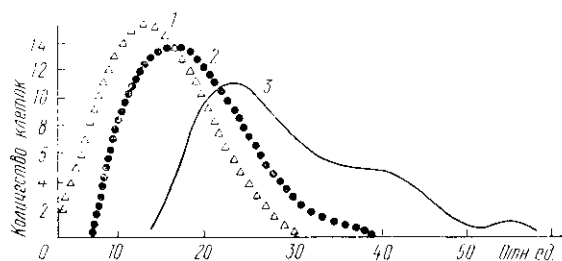
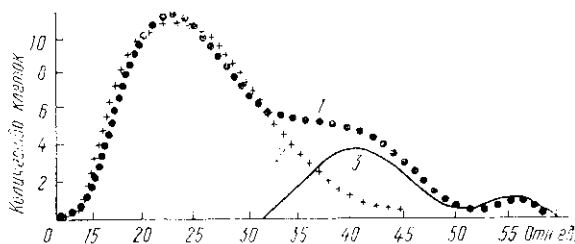


Рис. 2. Распределение гепатоцитов по интенсивности флюоресценции: 1 — интактное животное; через 24 ч после инъекции плазмид *pGA293Z<sup>Δ</sup>* (2) и *pGA293* (3) в составе липосом

Fig. 2. Distribution of hepatocytes by fluorescence intensity: 1 — intact animal, 2 — 24 h after injection of plasmid *pGA293Z<sup>Δ</sup>* included into liposomes, 3 — 24 h after injection of plasmid *pGA293* included into liposomes

Рис. 3. Математический анализ кривой распределения гепатоцитов (через 24 ч после введения плазмиды *pGA293* в составе липосом) по интенсивности флюоресценции (см. в тексте)

Fig. 3. Mathematical analysis of hepatocytes distribution curve (24 h after introduction of plasmid *pGA293* included into liposomes) by fluorescence intensity (see text)



жению кривой распределения опытного варианта на составляющие выявляются два основных пика, соответствующие различной интенсивности флюоресценции (рис. 1; рис. 3, 1), и группа клеток, составляющая около 5% общего числа с наиболее яркой флюоресценцией в диапазоне, в 2—3 раза превышающем общий уровень (рис. 3).

Первый пик, соответствующий по форме распределению светимости гепатоцитов в варианте с инъекцией ДНК *pGA293Z<sup>Δ</sup>* (до 75% клеток), представляет, по-видимому, не трансформированные плазмидой клетки либо трансформанты, в которых плаزمида по каким-либо причинам не экспрессируется (рис. 3, 2).

Второй пик (около 22% гепатоцитов) соответствует интенсивно светящимся клеткам, яркая специфическая флюоресценция их цитоплазмы рассматривается как свидетельство присутствия продукта экспрессии — бактериальной β-галактозидазы. Появление 5% гепатоцитов с наиболее яркой флюоресценцией можно объяснить особенностями метаболического состояния некоторых клеток, обеспечивающего наиболее эффективную экспрессию *lacZ*-гена (рис. 3, 3).

При обработке препаратов неспецифической кроличьей сывороткой специфической люминесценции гепатоцитов мышей как опытной, так и контрольной групп животных не наблюдалось. Этот факт дает основание полагать, что второй пик на кривой распределения опытного варианта появляется именно из-за присутствия бактериальной β-галактозидазы.

Форма обоих пиков очень сходна. В каждом к форме гауссовской кривой добавляется небольшое правое плечо. Это можно объяснить иным физиологическим состоянием небольшой части клеток печени. Отсутствие такого плеча в распределениях, соответствующих всем контролям, где отсутствует плазмидная ДНК, свидетельствует о том, что

наблюдаемые изменения являются ответом на наличие экзогенной плазмидной ДНК.

Результаты обнаруженных закономерностей можно представить в виде данных по средней интенсивности флюоресценции гепатоцитов (отн. ед.) через 24 ч в зависимости от типа инъектированного материала (выборка для каждого варианта составила 220 клеток). Доверительные границы средних значений и достоверность разницы двух пиков на опытной кривой определяли для вероятности  $\beta=0,99$ . Популяция клеток с наиболее интенсивной флюоресценцией в наших данных отсутствует из-за ее малочисленности.

Интактные животные	14,5±4,2
После инъекции плазмиды	
<i>pGA293Z<sup>Δ</sup></i>	18,1±3,8
После инъекции плазмиды	
<i>pGA293</i>	
I пик клеток	25,7±3,8
II пик клеток	40,5±3,3

Через 48 ч после инъекции в печень мышей липосом, нагруженных *pGA293*, в гепатоцитах части животных продолжает тестироваться продукт экспрессии *lacZ*-гена. Однако и здесь сказываются индивидуальные особенности животных. Так, у одних интенсивность флюоресценции гепатоцитов снижается до уровня контроля (*pGA293Z<sup>Δ</sup>* в составе липосом), у других — продолжает оставаться на высоком уровне, но проявляется варьирование соотношения между клетками с разной интенсивностью флюоресценции. У гепатоцитов контрольной группы животных, которым инъектировалась плаزمида *pGA293Z<sup>Δ</sup>* в составе липосом, наблюдались незначительное увеличение флюоресценции по сравнению с интактными животными и типичная для этого варианта форма распределения.

Выбор ИФ метода для тестирования продуктов экспрессии чужеродного гена был не случаен. Большая чувствительность, относительная простота ИФ анализа, вероятность определения ничтожно малых концентраций веществ в отдельной клетке и специфичность являются его существенными преимуществами перед другими методами. Особым достоинством использованного метода является возможность обнаруживать наличие экспрессии не по суммарному продукту, а дифференцированно тестировать его в отдельных клетках и тканях органа. Этот метод в последнее время, судя по литературе, успешно используется рядом авторов для определения продукта экспрессии чужеродного генетического материала в культурах различных клеток млекопитающих. Таким образом была показана экспрессия эпидермальных кератиновых генов и локализация продукта в эпителиальных клетках, мышечных и человеческих фибробластах [18]; установлен продукт экспрессии генов оболочки вируса лейкемии мышей и его распределение на поверхности клеток *CV1* [19]; изучена локализация гибридного мембранного белка в *CV1*-клетках, являющегося продуктом экспрессии *SV40* рекомбинантного вектора [20]; продемонстрирована экспрессия вирусного *T*-антигена *SV40* в клетках костного мозга [21] и др.

При работе с гепатоцитами обращает на себя внимание фоновое свечение их цитоплазмы (аутолюминесценция) в зеленой области спектра, где тестируется продукт экспрессии *lacZ*-гена —  $\beta$ -галактозидаза, что может, на первый взгляд, исказить конечный результат. На рис. 4 приведены результаты измерений собственной люминесценции из печени интактных животных и аутолюминесценции гепатоцитов после введения в печень чистых липосом и плазмиды *pGA293* в составе липосом. Аутолюминесценция гепатоцитов у интактных животных после инъекции липосом и плазмидной ДНК в составе липосом была слабой и по значениям интенсивности свечений различий между этими вариантами не отмечалось, она также была ниже, чем у гепатоцитов интактных животных после окраски ИФ методом (см. рис. 2, а). При измерении слабофлюоресцирующих клеток в последнем случае (в нашем исследова-

нии это, например, гепатоциты интактных животных после инъекций липосом, чистой плазмиды *pGA293* или физиологического раствора) вклад аутолюминесценции в значения интенсивности свечения значительно больше, чем при работе с ярко флюоресцирующими препаратами (*pGA293* в составе липосом). Однако, исходя из того, что аутолюминесценция при 520 нм у гепатоцитов исследованных вариантов практически одинакова, она не является фактором, способным влиять на корректность измерений.

В проведенных исследованиях для введения генетического материала непосредственно в заданный орган использовали липосомы, хорошо

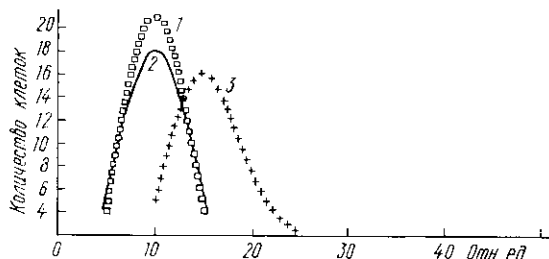


Рис. 4. Аутолюминесценция гепатоцитов: 1 — интактное животное; 2, 3 — через 24 ч после инъекции липосом и плазмиды *pGA293* в составе липосом соответственно

Fig. 4. Autoluminescence of hepatocytes: 1 — intact animal, 2, 3 — 24 h after injection of liposomes and plasmid *pGA293* included into liposomes, respectively

взаимодействующие с клетками и облегчающие доставку в них плазмидных ДНК. В пользу этого свидетельствуют полученные результаты — эффективная экспрессия бактериального *lacZ*-гена в гепатоцитах при введении животным *pGA293* в составе липосом, и отрицательные — при использовании в опытах плазмидной ДНК без липосом. Незначительные отличия в светимости гепатоцитов в последнем варианте инъекций по сравнению с люминесценцией гепатоцитов других контрольных вариантов доказывают низкую трансформирующую способность плазмидной ДНК без липосом. Причиной этого может являться, в частности, деградация плазмидной ДНК, не защищенной липосомами, что подтверждается данными литературы. Так, описана деградация и элиминация свободной ДНК при введении ее интраперитонеально новорожденным крысам [6] — через 48 ч большая часть инъекционной ДНК, содержащая низкомолекулярные продукты, обнаруживалась в мочевом пузыре. Предполагается также [5], что деградация ДНК в печени может быть связана с индукцией эндогенной эндонуклеазной активности; кроме того, интактная ДНК плохо проникает в клетки.

Как отмечено выше, инъекционное исследование материала проводилось нами в нижнюю большую долю печени. Было проанализировано (по измерению содержания продукта экспрессии *lacZ*-гена) распространение введенного материала в каждой доле органа. Как оказалось, различий в интенсивности люминесценции между гепатоцитами разных препаратов установлено не было, т. е. ДНК, заключенная в липосомы, распределялась по всем долям печени. Однако Бенвенисти и др. [6], изучая распределение в печеночной ткани Са-фосфатного преципитата ДНК при интраперитонеальном введении его новорожденным крысам, получили неоднозначные результаты. У одного животного распределение ДНК по четырем долям печени было одинаковым, у второго — отмечены вариации в содержании ДНК по трем долям печени. В связи с этим, учитывая возможность неравномерного распределения материала по органу, а также для унифицирования проводимых нами исследований препараты гепатоцитов готовили из той доли печени, в которую инъекцировали материал. В наших опытах отмечалась также четкая индивидуальная реакция животных на вводимый материал. В пределах одного опыта среди выбранной группы мышей встречались экземпляры, которые практически не проявляли либо проявляли очень слабую реакцию на инъекционный материал, и особи с ярко выраженной ответной реакцией. Положительный ответ — появление в гепатоцитах бактериальной  $\beta$ -галактозидазы — был получен в 50 % случаев. Индивидуальная реакция животных на введенный материал отмечалась также

при интраперитонеальном введении Са-фосфатного преципитата плазмидной ДНК [6], при этом наряду с высокой частотой экспрессии отмечено неравномерное распределение генов по гепатоцитам. Для снижения вариабельности в содержании продукта экспрессии при инъекции в печень мышей были удачно использованы одновременно с Са-фосфатным преципитатом плазмидной ДНК гидролитические ферменты — гиалуронидаза и коллагеназа [5]. При таком сочетании вводимого материала был достигнут положительный эффект в более однородном поступлении экзогенной ДНК в трансформированный орган и в большее количество клеток.

Таким образом, на примере бактериального *lacZ*-гена показано, что локальное введение в печень чужеродного генетического материала обеспечивает его функционирование в органе, что достаточно корректно определяется иммунофлюоресцентным анализом. Прямая инъекция липосомной суспензии непосредственно в печень представляется в ряде случаев предпочтительнее внутривенной, так как в этом случае липосомы непосредственно контактируют с гепатоцитами, обеспечивая доставку экзогенной ДНК в эти клетки. Высокий процент трансформации клеток, где тестируется продукт экспрессии гена бактериальной  $\beta$ -галактозидазы через 24 ч после инъекции, вряд ли связан с интеграцией плазмид в геном и объясняется, по-видимому, функционированием плазмид в свободном состоянии.

#### EXPRESSION OF *ESCHERICHIA COLI* $\beta$ -GALACTOSIDASE IN MURINE HEPATOCYTES

*I. E. Kostetsky, S. P. Shpilevaya, L. I. Likhacheva,  
L. G. Zharova, D. M. Irodov, V. S. Kirillova, V. A. Kordium*

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

#### Summary

The expression of the bacterial  $\beta$ -galactosidase gene as a part of plasmid *pGA293* in the mouse liver hepatocytes has been demonstrated 24 h after direct injection of the above plasmid enclosed into liposomes into the liver.

1. *Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice* / K. E. Mercola, D. S. Howard, J. Browne et al. // *Science*.— 1980.—208, N 4447.— P. 1033—1035.
2. *Генетическая трансформация соматических клеток. 2. Анализ состояния плазмидных последовательностей в хромосомных ДНК и активность тимидинкиназы в клетках трансформированных клонов* / Н. В. Томили, О. И. Подгорная, Д. С. Абрамян, О. К. Глебов // *Цитология*.— 1985.—27, № 5.— С. 554—564.
3. *St. Louis D., Verma I. M.* Whole animal gene transfer // *Gene transfer vectors mammalian cells*.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1987.— P. 94—102.
4. *Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy* / R. F. Selden, M. J. Skoskiewicz, K. B. Howie et al. // *Science*.— 1987.—236, N 4802.— P. 714—718.
5. *Dubensky T. W., Campbell B. A., Villarreal L. P.* Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1984.—81, N 23.— P. 7529—7533.
6. *Benvenisty N., Reshef L.* Direct introduction of genes into rats and expression of the genes // *Ibid.*— 1986.—83, N 24.— P. 3551—3555.
7. *Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д.* Липосомы и их взаимодействие с клетками.— М.: Наука, 1986.—240 с.
8. *Захарян Р. А.* Перенос и транзитная экспрессия гена тимидинкиназы *HSV-1* в составе реконструированных вирусоподобных и нуклеопротеидных комплексов в клетках печени // *Биополимеры и клетка*.— 1987.—3, № 4.— С. 215—220.
9. *Stavridis I. C., Psallidopoulos M.* Use of transferrin as a gene-carrier to the erythroid cells of the marrow // *Cell and Mol. Biol.*— 1982.—28, N 1.— P. 15—18.
10. *Price J., Turner D., Cepko C.* Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1987.—84, N 1.— P. 156—160.
11. *Manning E. J., Millson G. C.* Infectivity of liposomally encapsulated nucleic acids isolated from EMC virus and scrapie-infected mouse brain // *Intervirology*.— 1983.—20, N 2—3.— P. 164—168.

12. *In vivo* expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I / C. Nicolau, C. le Pape, Ph. Soriano et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 4.—P. 1068—1072.
13. *Gynheung An., Hidaka K., Siminovitsh L.* Expression of bacterial  $\beta$ -galactosidase in animal cells // Mol. and Cell. Biol.—1982.—2, N 12.—P. 1628—1632.
14. *Зильбер А.* Иммунологический анализ.—М.: Медицина, 1968.—185 с.
15. *Seglen P. O.* Effects of amino acids, ammonia and leupeptin on protein synthesis and degradation in isolated rat hepatocytes // Biochem. J.—1978.—174, N 3.—P. 469—474.
16. *Coons A. H., Ledis E. M., Connolly J. M.* Studies on antibody production. 1. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit // J. Exp. Med.—1955.—102, N 1.—P. 49—59.
17. *Грегориадис Г., Аллис Н. А.* Липосомы в биологических системах.—М.: Медицина, 1983.—384 с.
18. *Giudice G. J., Fuchs E.* The transfection of epidermal keratin genes into fibroblasts and simple epithelial cells: evidence for inducing a type I keratin by a type II // Gene Cell.—1987.—48, N 3.—P. 453—463.
19. *T-lymphocyte* priming and protection against Friend leukemia by vaccina-retrovirus *env* gene recombinant / P. L. Earl, B. Moss, R. P. Morrison et al. // Science.—1986.—234, N 4777.—P. 728—731.
20. *Peterson R. G., Lamb R. A.* Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a paramyxovirus F. protein to act as a membrane anchor // Cell.—1987.—48, N 3.—P. 441—452.
21. *Трансформация* клеток костного мозга грызунов рекомбинантной плазмидой *pBRSV* / Т. Б. Казакова, В. А. Шатов, И. А. Вербина и др. // Цитология.—1986.—28, № 12.—С. 1345—1350.

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

Получено 09.09.88

УДК 577.21:579.25.5

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОГЕННОГО ГЕНА ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, Б. М. Трояновский,  
И. С. Варзанова, Т. И. Бужневская, В. А. Кордюм**

Во всем мире наблюдается рост заболеваемости диабетом. По некоторым оценкам он занимает третье место среди причин смертности в развитых странах мира. Разработка методов лечения этой патологии является одной из первоочередных задач биотехнологии в медицине [1]. Биотехнология в западных странах добилась значительных успехов в производстве инсулина человека генноинженерным путем. В то же время единственным радикальным мероприятием, способным устранить молекулярную основу инсулинзависимого диабета, является перенос гена инсулина человека пациентам в такой молекулярной конструкции, которая обеспечивает его экспрессию в клетках больных, в том числе в неспециализированных.

Экспрессия гена инсулина у взрослых животных происходит в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, составляющих лишь 1% общего числа ее клеток. У эмбрионов млекопитающих инсулин синтезируется также в печени [2], нервной ткани (мозге) [2—5], желточном мешке [6]. Клетки мозга обладают более слабой системой процессирования этого гормона, чем клетки поджелудочной железы: проинсулин в первом случае значительно превышает содержание инсулина [5]. У человека ген, кодирующий инсулин, расположен в 11-й хромосоме. Его структурная часть состоит из трех экзонов и двух интронов. Регуляция экспрессии обеспечивается 5'-фланкирующей областью, включающей уникальные последовательности и тандемные повторы [7]. Эта область обеспечивает ту высокую тканеспецифичность, которая и отмечалась выше. Поэтому для экспрессии гена инсулина в клетках, в которых он в норме не работает, обычно используют стандартный прием присоеди-