

Дослідження терапевтичних ефектів введення рекомбінантних молекул ДНК, що містять цільовий ген препроінсуліну людини, на моделях стрептозотоциніндукованого діабету в мишей і щурів

М.Д. Тронько¹,
Л.М. Калинська¹,
О.К. Топорова²,
О.І. Ковзун¹,
Т.П. Гулько²,
В.А. Кордюм²

¹ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

²Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

Резюме. Мета — дослідження терапевтичних ефектів генної терапії цукрового діабету 1-го типу за рахунок введення експериментальним тваринам рекомбінантних молекул ДНК, що містять цільовий ген препроінсуліну людини (ДНК-ЦГППЛ). **Методи.** Досліджено ефект введення ДНК-ЦГППЛ у паренхіму печінки мишей і щурів із різною тривалістю стрептозотоциніндукованого діабету (СТД) — 2 і 5 тижнів. Глюкозу у крові визначали глюкозооксидазним методом. Визначення інсуліну та С-пептиду в сироватці крові проводили імуноферментним методом. **Результати.** Дослідження ефекту введення різних концентрацій препаратів ДНК-ЦГППЛ у паренхіму печінки щурів (25-60 мкг) і мишей (10-15 мкг) дозволили визначити оптимальні дози ДНК, які приводять до суттєвого та тривалого (понад 2 місяці) зниження гіперглікемії у діабетичних тварин. Зниження глікемії у мишей зафіксовано через 2 тижні після одноразової ін'єкції ДНК-ЦГППЛ, воно тривало 5-9 тижнів. Найбільш виражене зниження глікемії після одноразового ін'єкційного введення ДНК-ЦГППЛ мало місце у щурів із нетривалим (2 тижні) СТД і нижчою вихідною глікемією. Експерименти на інтактних щурах свідчать про триваліше зниження рівня глюкози у крові після одноразового введення гена препроінсуліну (52 тижні). Ін'єкційне введення

* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: Luidmylakalynska@gmail.com

© М.Д. Тронько, Л.М. Калинська, О.К. Топорова, О.І. Ковзун,
Т.П. Гулько, В.А. Кордюм

Оригінальні дослідження

ДНК-ЦГППЛ щурів із СТД (2 тижні) приводить до появи в крові тварин значущих рівнів інсуліну людини в певні терміни після одноразової процедури генної терапії. Виявлено високу позитивну кореляцію між показниками інсуліну людини та С-пептиду в сироватці крові щурів із СТД у різні терміни після введення ДНК-ЦГППЛ.

Висновки. За результатами дослідження умов ефективної експресії гена препроінсуліну у мишей і щурів показано, що вираженість і тривалість зниження глікемії залежить від терміну стрептозототиніндукованого діабету, вихідної глікемії у діабетичних тварин і концентрації ДНК у трансфекційному препараті.

Ключові слова: експериментальна генна терапія, ген препроінсуліну людини, стрептозототиніндукований діабет у щурів і мишей, глюкоза крові, інсулін, С-пептид.

Цукровий діабет 1-го типу (ЦД1) — важлива медична та соціальна проблема сучасного суспільства, що обумовлено ранньою інвалідизацією, високою смертністю хворих на ЦД1 і значним поширенням цього захворювання у світі [1, 2].

Генна терапія, яка завдяки досягненням у царині молекулярної біології та проекту генома людини швидко розвивається, є найбільш обнадійливою технологією XXI століття [3, 4]. Технології генної терапії дозволяють вводити хворому на ЦД ген інсуліну у складі молекулярної конструкції, яка забезпечить його реалізацію у неспецифічних здорових клітинах, що не продукують ендогенний інсулін. Терапевтичний ефект генетичної конструкції, що вводиться в організм, досягається за рахунок додаткового синтезу білків у клітинах внаслідок експресії введеного гена. Застосування генної терапії в клінічній діабетології ускладнено проблемами фізіологічної регуляції секреції інсуліну, неефективністю доправлення гена та короткою тривалістю його експресії [5]. Одним із важливих аспектів застосування генної терапії ЦД1, що вимагає подальших поглиблених досліджень, є створення та доправлення в організм векторної молекулярної конструкції, яка містить цільовий ген препроінсуліну людини.

Мета роботи — дослідження терапевтичних ефектів генної терапії ЦД1 шляхом введення експериментальним тваринам молекулярної конструкції з функціонально активним геном препроінсуліну людини.

Матеріали та методи

Експериментальні дослідження проводили на самцях мишей лінії C57BL/6j з масою тіла 20-28 г і самцях щурів лінії Вістар із масою тіла

160-220 г. Модель ЦД1 типу отримували шляхом внутрішньочеревного введення стрептозототину (Sigma, США) мишам у дозі 45 мг/кг маси протягом 5 діб і щурів у дозі 50 мг/кг маси одноразово. Дослідження проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Наукові дослідження з верифікації цільового гена препроінсуліну людини у складі експресійної генетичної конструкції (в якій ген з'єднано з відповідними регуляторними елементами) та розробка засобів ефективного й безпечного доправлення гена в клітини-мішені проведено в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України. Векторна молекулярна конструкція складається з двох незалежних модулів: послідовності бактеріальної плазміди, що дозволяє їй реплікуватися у клітинах *Escherichia coli*, та касети для експресії цільового гена препроінсуліну, фланкованої інвертованими термінальними повторами аденоасоційованого вірусу людини. Для забезпечення конститутивної експресії гена препроінсуліну людини використано промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини. Як трансфекційний реагент використовували розгалужений поліетиленімін (25 кД). Препарат ДНК/поліетиленімін для ін'єкцій готували у ваговому еквіваленті 1:3 у стерильних умовах. Кількість ДНК у трансфекційному препараті становила 10 мкг і 15 мкг на 20 г живої ваги мишей і 25-60 мкг на 200 г живої ваги щурів. Препарат ДНК у комплексі з поліетиленіміном вводили безпосередньо в одну з часток печінки ін'єкційно після розтину черевної порожнини експериментальних тварин під етаміналовим наркозом.

Перебіг експериментального ЦД різної тривалості та терапевтичні ефекти препаратів ДНК, що містять цільовий ген препроінсуліну людини (ДНК-ЦГППЛ), контролювали за показниками глюкозурії (тест-смужки, PLIVA-Lachema, Чехія) та глікемії натще. Через 2 і 5 тижнів після індукції стрептозотоцинового діабету (СТД) мишей із гіперглікемією понад 16,0 ммоль/л (від 16,7 ммоль/л до 23,6 ммоль/л) і щурів із гіперглікемією понад 23,0 ммоль/л (від 23,7 ммоль/л до 32,4 ммоль/л) рівномірно розподілили на декілька груп: контрольні групи тварин із СТД і групи тварин із СТД, яким вводили ген препроінсуліну в різних концентраціях. Контролем були миші з СТД, яким вводили плазмідну ДНК без гена препроінсуліну.

Терапевтичну дію препаратів ДНК-ЦГППЛ визначали за вмістом глюкози в крові мишей і щурів через 4 години після останнього приймання їжі. Рівень глюкози у крові, яку забирали капіляром із ретроорбітального венозного синуса мишей і з хвостової вени щурів, визначали глюкозооксидазним методом за допомогою глюкометра Accu-Chek Active (Німеччина) та на аналізаторі Super GL (Dr. Muller, Німеччина).

Кількісне визначення інсуліну людини та С-пептиду в сироватці крові щурів проводили імуноферментним методом із використанням наборів реактивів Insulin ELISA (DRG Instruments GmbH, Німеччина), С-Peptide (Monobind Inc., США) і С-Peptide ELISA (DRG Instruments GmbH, Німеччина) на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США).

Статистичну обробку результатів здійснювали за стандартним методом варіаційної статистики з використанням критеріїв t Стьюдента та χ^2 Пірсона.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що розвиток експериментального ЦД у мишей лінії C57 BL/6j після введення стрептозотину супроводжувався дисбалансом вуглеводного обміну, зокрема вираженим підвищенням базальної глікемії (рис. 1) і схудненням тварин. Одноразове введення ДНК-ЦГППЛ у дозі 10 мкг у паренхіму печінки мишей із СТД тривалістю 2 тижні приводило до зниження рівня глюкози у крові через 2, 3, 4, 5 і 6 тижнів після ін'єкції препарату на 26,1%, 47,9%, 28,2%, 27,0% і 62,8% відповідно (рис. 1 А).

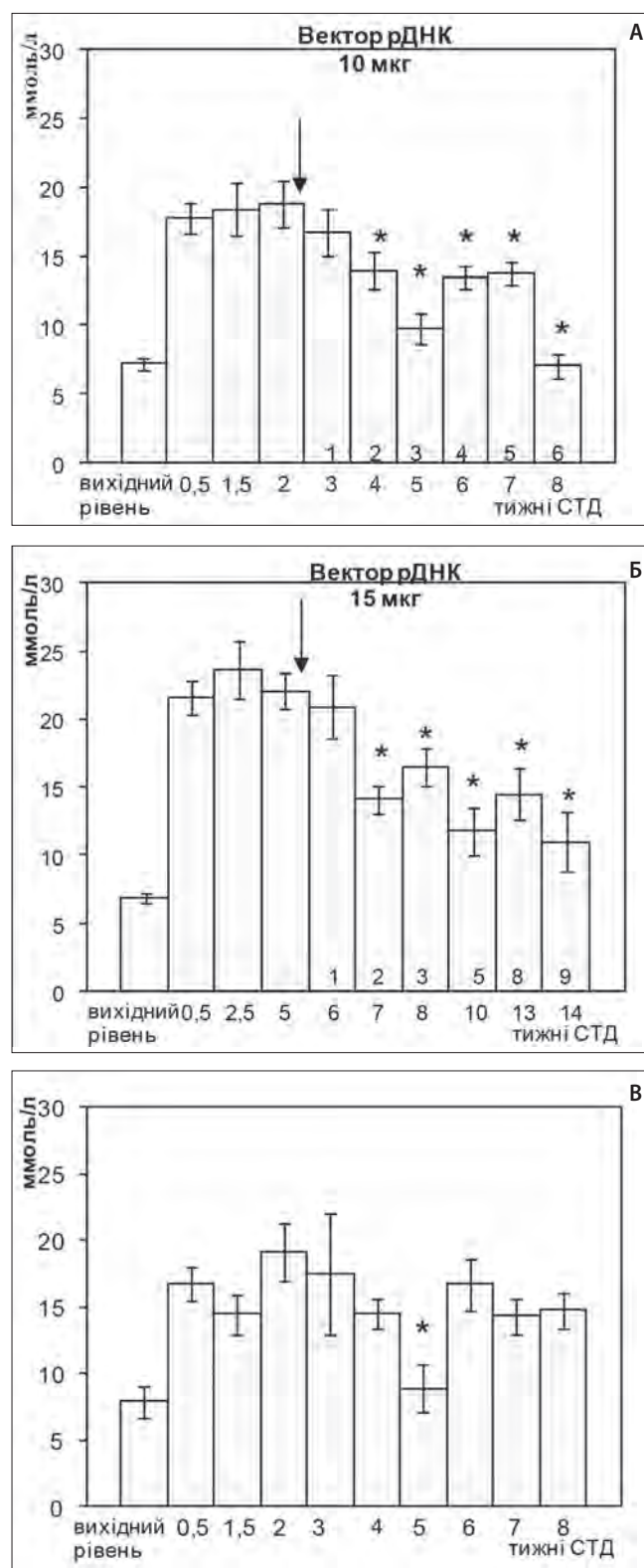


Рис. 1. Вплив рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППЛ на рівень глюкози у крові мишей із СТД: А — введення препарату ДНК у дозі 10 мкг мишам із тривалістю СТД 2 тижні; Б — введення препарату ДНК у дозі 15 мкг мишам із тривалістю СТД 5 тижнів; В — група контрольних тварин із СТД; * — вірогідна різниця з показником перед введенням конструкції ($p < 0,05$).

Після одноразового введення препаратів ДНК-ЦГППІЛ у дозі 15 мкг мишам із тривалістю діабету 5 тижнів зниження глікемії відбувалося протягом більш тривалого часу — 9 тижнів. Рівень глюкози у крові через 2, 3, 5, 8 і 9 тижнів після введення препарату ДНК знижувався на 36,2%, 25,3%, 46,6%, 34,4% і 50,2% відповідно (рис. 1 Б). У групі контрольних мишей із СТД підвищений рівень глюкози у крові зберігався впродовж усього експерименту (8 тижнів), за винятком короточасного зниження на 5-му тижні діабету (рис. 1 В).

Отже, одноразове введення ДНК-ЦГППІЛ мишам із СТД приводило до вираженого та тривалого (понад 2 місяці) зниження гіперглікемії. За отриманими даними, найбільший відсоток виживання тварин був у групі мишей із СТД, яким вводили плазмиду з цільовим геном препроінсуліну в дозі 15 мкг. На 100-у добу розвитку діабету виживання тварин у цій групі становило 58,3% (7 мишей із 12). У двох контрольних групах (тварини з СТД і тварини з СТД, яким вводили плазмідну ДНК без цільового гена препроінсуліну) на цей термін розвитку діабету (100 діб) усі тварини загинули.

Дослідження впливу ін'єкційного препарату ДНК-ЦГППІЛ проведено також на щурах лінії Вістар із стрептозотоциніндукованим діабетом. У першій серії досліджень одноразову процедуру генної терапії проводили у щурів на пізніх термінах розвитку СТД — 5 тижнів. Аналіз результатів свідчить про зниження рівня глюкози у крові через 1, 2, 3 тижні після введення цільового гена препроінсуліну в дозі 40 мкг (тобто через 6, 7 і 8 тижнів після індукції діабету), після чого глікемія суттєво підвищувалась (рис. 2 А). У групі контрольних щурів із СТД зниження глікемії також встановлено на 6-8-му тижнях розвитку діабету (рис. 2 Б).

Отже, ми не виявили ефекту одноразового введення препарату ДНК-ЦГППІЛ на глікемію у щурів на пізніх термінах розвитку СТД — 5 тижнів. Крім того, виживання тварин в обох групах через 14 тижнів після індукції СТД становило 50%, тобто було однаковим.

Для продовження дослідження ми вважали доцільним вводити ДНК-ЦГППІЛ на більш ранніх стадіях розвитку СТД (2 тижні), а також провести експерименти з введенням у паренхіму печінки щурів різних концентрацій препарату ДНК. Після одноразового введення пре-

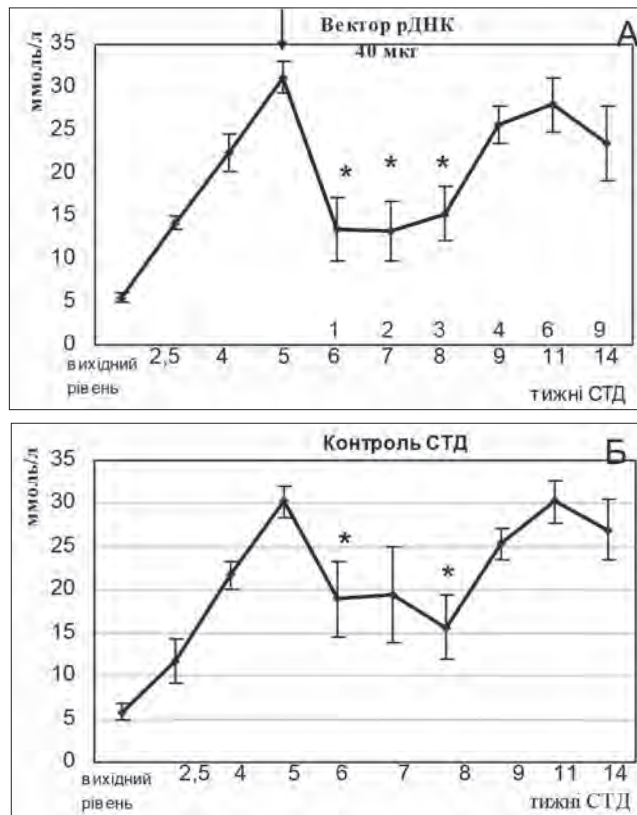


Рис. 2. Вплив рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППІЛ на рівень глюкози у крові щурів із СТД: А — введення препарату ДНК у дозі 40 мкг щурам із тривалістю СТД 5 тижнів; Б — контрольна група тварин із СТД; * — вірогідна різниця з показниками через 5 тижнів після введення стрептозотоцину ($p < 0,05$).

парату ДНК-ЦГППІЛ у дозах 25 мкг і 40 мкг відбувалося зниження рівня глюкози у крові щурів із СТД через 1, 2, 3 і 5 тижнів і тривало 5 тижнів (відсоток зниження становив 37,5-62,3% — рис. 3 А, Б). Виразне зниження глікемії у щурів із СТД зафіксовано після застосування препарату ДНК у дозі 50 мкг, причому рівень глюкози у крові досягав мінімального значення через 3 тижні після введення гена препроінсуліну: $5,87 \pm 0,71$ ммоль/л проти $32,4 \pm 1,60$ ммоль/л перед введенням препарату ($p < 0,01$). Зниження глікемії після введення ДНК-ЦГППІЛ у дозі 50 мкг також тривало 5 тижнів і становило 54,8-81,6% (рис. 3 В). Отже, зниження глікемії у щурів із СТД відбувалося через 1 тиждень після одноразової процедури генної терапії та тривало до 5 тижнів, після цього рівень глюкози підвищувався. Виживання тварин в усіх 3 групах було однаковим — через 5 тижнів після введення ДНК у дозах 25 мкг, 40 мкг і 50 мкг (тобто через 7 тижнів після індукції СТД) більшість тварин загинули.

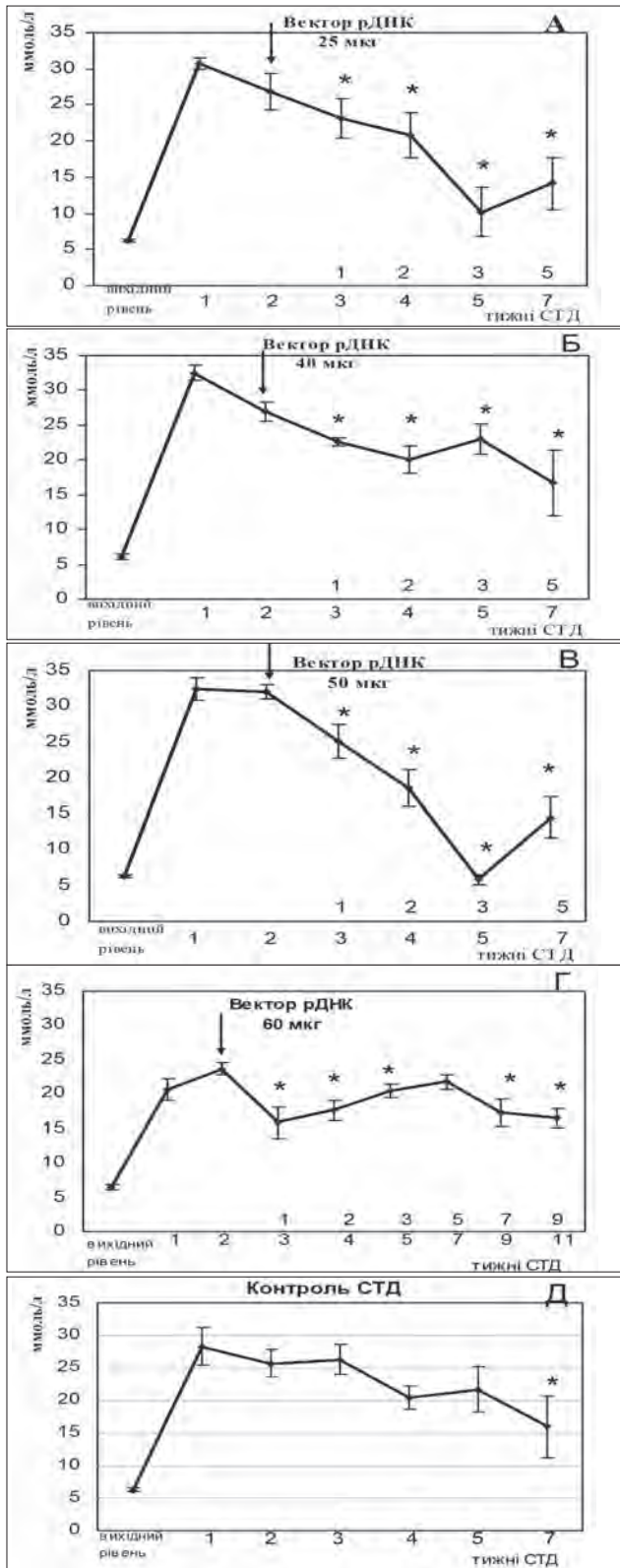


Рис. 3. Вплив рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППЛ на рівень глюкози у крові щурів на тлі розвитку СТД: А, Б, В, Г — введення препарату ДНК у дозах 25 мкг, 40 мкг, 50 мкг і 60 мкг відповідно щурам із тривалістю СТД 2 тижні; Д — контрольна група тварин із СТД; * — вірогідна різниця з показниками перед введенням препарату ($p < 0,05$).

Після введення щурам цієї серії дослідження препарату ДНК у дозі 60 мкг тенденція до зниження глікемії зберігалася протягом 9 тижнів експерименту. Більш тривале зниження глікемії в цій групі щурів може бути пов'язано з нижчою вихідною глікемією на початкових стадіях розвитку діабету ($23,7 \pm 1,9$ ммоль/л проти $32,4 \pm 1,6$ ммоль/л в інших групах). Зменшення показника становило 13,5–32,9% (рис. 3 Г). Крім того, в цій групі встановлено найбільшу тривалість життя тварин — 9 тижнів після введення препарату ДНК із цільовим геном препроінсуліну (11 тижнів після індукції СТД).

У групі контрольних щурів із СТД підвищений рівень глюкози у крові зберігався впродовж усього експерименту, крім короточасного зниження гіперглікемії через 7 тижнів після індукції СТД (рис. 3 Д).

Продовжуючи дослідження з визначення умов ефективної експресії гена інсуліну в клітинах печінки щурів, ми використовували тварин на ранній стадії СТД (2 тижні) із нижчим вихідним рівнем гіперглікемії — 23,15 ммоль/л і 23,60 ммоль/л порівняно з попередньою серією. У цих експериментах показано зниження глікемії у щурів із СТД через 1, 2, 3, 4, 6 і 9 тижнів після введення препарату ДНК у дозах 40 мкг і 45 мкг. Найбільше зниження глікемії у щурів, яким вводили ДНК-ЦГППЛ у цих дозах, виявлено через 2 і 4 тижні після ін'єкції препарату. Зниження рівня глюкози у крові тривало 9 тижнів після введення препарату ДНК-ЦГППЛ і становило 33,8–44,6% (рис. 4 А, Б). Підвищення глікемії в обох експериментальних групах встановлено через 11 тижнів після введення препарату ДНК в обох дозах, що зберігалася 5 тижнів (рис. 4 А, Б). У контрольній групі щурів із СТД зниження рівня глюкози у крові спостерігалася на 6-й і 8-й тижні розвитку діабету (рис. 4 В).

Отже, введення різних концентрацій ДНК-ЦГППЛ у паренхіму печінки щурів із СТД тривалістю 2 тижні дозволило визначити оптимальний для суттєвого зниження рівня глюкози у крові (на 33,8–62,3%) діапазон концентрацій препарату ДНК — 25–60 мкг.

Результати дослідження показали залежність ефекту генної терапії від терміну СТД і вихідного рівня гіперглікемії у щурів із СТД, яким одноразово вводили препарат ДНК.

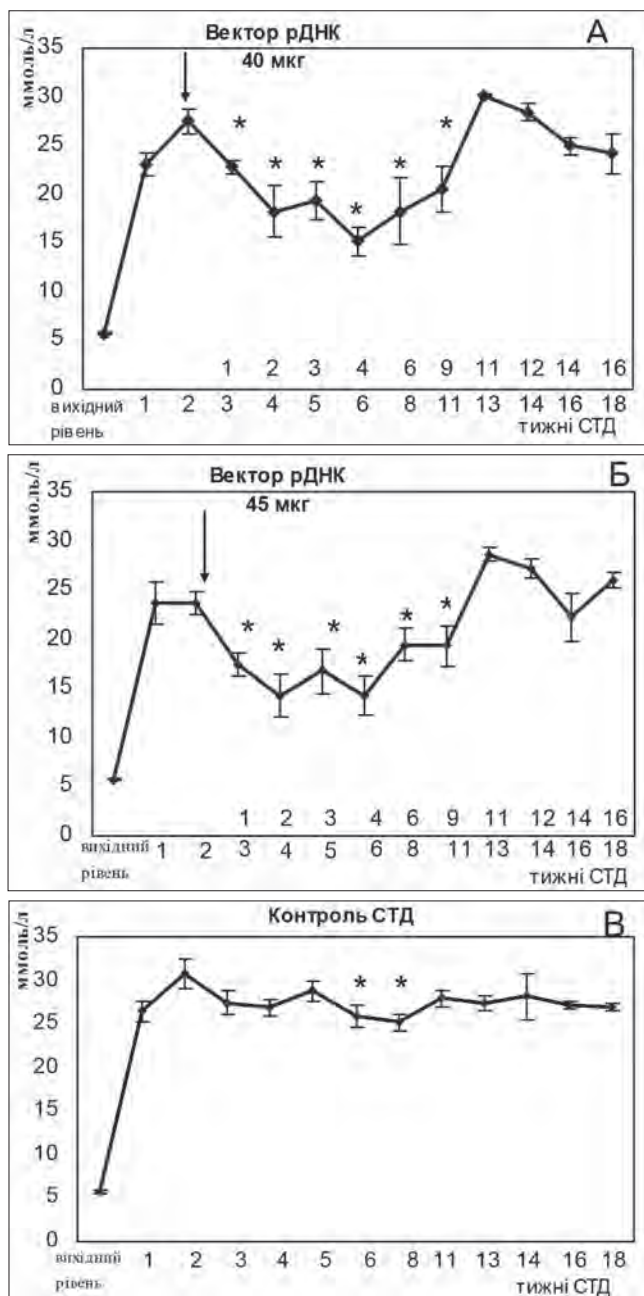


Рис. 4. Вплив введення рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППІЛ на рівень глюкози крові щурів із СТД. А, Б — введення препарату ДНК у дозах 40, 45 мкг (відповідно) щурам із тривалістю СТД 2 тижні; В — контрольна група тварин із СТД. * $P < 0,05$ — вірогідність різниці порівняно з показниками глікемії у щурів із СТД перед введенням препарату.

Найбільш тривале зниження глікемії (9 тижнів СТД) спостерігалось в експериментах з одноразовим введенням гена препроінсуліну щурам із СТД тривалістю 2 тижні та нижчою глікемією на початкових стадіях розвитку діабету ($23,15 \pm 1,19$ ммоль/л проти $32,53 \pm 1,09$ ммоль/л). Це, очевидно, пов'язано з більш вираженими патологічними процесами

ми в гепатоцитах печінки та інших органах і тканинах діабетичних тварин із глікемією понад 25 ммоль/л [6].

Необхідно підкреслити, що ефект генної терапії виявлено на тлі короткочасного та менше вираженого компенсаторного зниження глікемії у контрольних щурів із СТД в усіх серіях експерименту (див. рис. 2-4). Ймовірно, зниження рівня глюкози у крові контрольних щурів і мишей із СТД у певні терміни розвитку діабету є наслідком дії компенсаторних механізмів і часткової регенерації острівцевої тканини підшлункової залози внаслідок реагування адаптивних систем організму. Відомо, що антидіабетичну дію справляють різні нейрогуморальні системи, зокрема регуляторні нейропептиди, які беруть участь у регуляції та модулюванні ендокринної функції, секреції гормонів та їх периферичних ефектів [7-9].

В окремій серії дослідження проведено вивчення впливу введення рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППІЛ у паренхіму печінки інтактних щурів лінії Вістар. Ін'єкції препарату ДНК проводили в дозі 40 мкг. Протягом 12 місяців експерименту глікемія у щурів контрольної групи суттєво не змінювалася (рис. 5 Б). На відміну від діабетичних щурів, зниження глікемії під впливом генної терапії в інтактних тварин спостерігали впродовж 52 тижнів (одного року) експерименту, причому рівень глюкози у крові знижувався в середньому на 16,88%. Зокрема, через 48 тижнів після введення препарату ДНК глікемія знизилася від $6,37 \pm 0,03$ ммоль/л на початку експерименту до $4,63 \pm 0,20$ ммоль/л ($p < 0,05$) по його закінченні (рис. 5 А).

Зниження глікемії під впливом генної терапії в інтактних щурів відбувалось пізніше — через 15 діб. Це може бути пов'язано з тим, що посилення синтезу та секреції інсуліну на тлі нормального або низького рівня глюкози у крові є повільним процесом [10].

Також окремо проводили кількісне визначення рівня інсуліну людини та С-пептиду в сироватці крові щурів із СТД у різні терміни після ін'єкційного введення ДНК-ЦГППІЛ у паренхіму печінки цих тварин. Зокрема, показано, що рівень інсуліну людини в крові щурів із СТД через 2 і 4 тижні після введення ДНК-ЦГППІЛ (у дозі 40 мкг) становив $1,93 \pm 0,17$ мкОд/мл

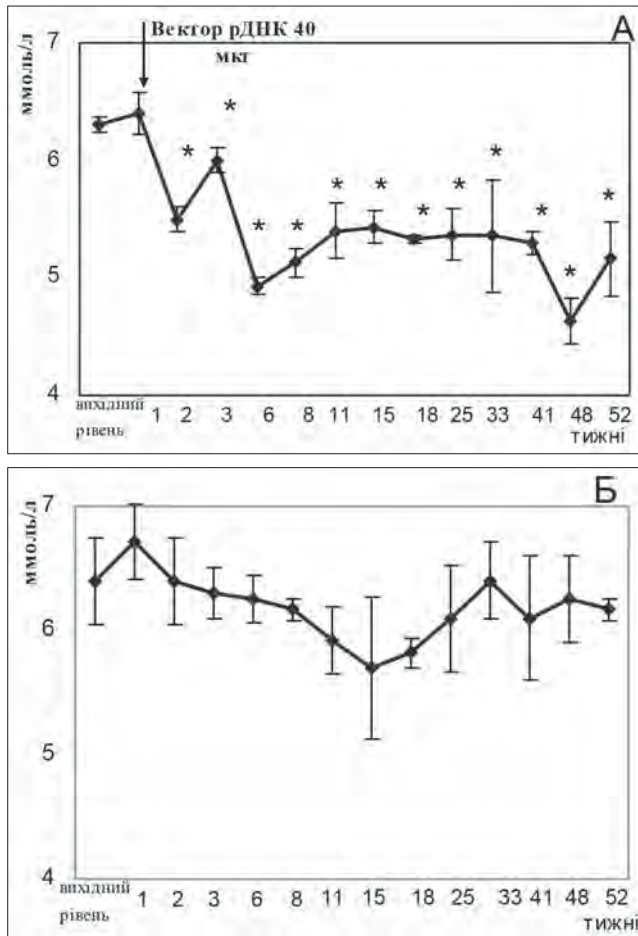


Рис. 5. Вплив рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППІЛ на рівень глюкози у крові інтактних щурів: А — введення препарату ДНК у дозі 40 мкг інтактним щурам; Б — контрольна група інтактних щурів; * — вірогідна різниця з вихідною глікемією ($p < 0,05$).

і $2,03 \pm 0,20$ мкОд/мл відповідно, С-пептиду — $6,72 \pm 0,19$ нг/мл і $5,87 \pm 0,38$ нг/мл відповідно ($n=3-7$).

Виявлено високу позитивну кореляцію ($r=0,71$, $k=12$, $p < 0,01$) між показниками інсуліну людини та С-пептиду в сироватці крові щурів із СТД після ін'єкційного введення ДНК-ЦГППІЛ (**рис. 6**). З огляду на абсолютну видову специфічність антитіл (перехресна реакція з інсуліном щура — 0%), визначення інсуліну людини в сироватці крові щурів після ін'єкційного введення ДНК-ЦГППІЛ у паренхіму печінки є незаперечним підтвердженням функціонування запропонованої конструкції.

Більшість публікацій із генної терапії ЦД присвячено розробці методів перенесення генів у клітини та питанням доправлення модифікованого гена інсуліну в клітини печінки [10-12]. Відомо, що печінка є доступним

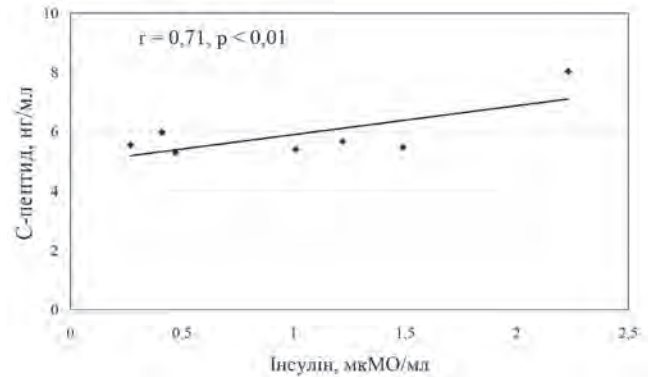


Рис. 6. Кореляція між рівнями інсуліну людини та С-пептиду в сироватці крові щурів із СТД після введення препарату ДНК-ЦГППІЛ.

і привабливим органом-мішенню для експресії гена інсуліну за ЦД1, оскільки в ній працюють клітинні механізми регуляції експресії гена у відповідь на зміни вмісту глюкози й інсуліну в крові [13].

В експериментах із використанням альтернативного підходу до перенесення соматичних генів — одноразової внутрішньом'язової ін'єкції векторної плазмідної ДНК, яка кодує ЦГППІЛ, мишам лінії C57BL/6j із СТД зниження рівня глюкози (~ на 6 ммоль/л) і підвищення рівня інсуліну в плазмі крові тривало від 1 до 5 тижнів [14].

У досліджах із трансфекцією вектора інсуліну людини в кров мишей із СТД через хвостову вену також показано зниження базальної глікемії. Крім того, встановлено, що, на відміну від одноразових, повторні щотижневі внутрішньовенні ін'єкції вектора інсуліну людини приводять до тривалішого зниження рівня глюкози в сироватці крові. Це супроводжувалось виявленням інсуліну людини в печінці та селезінці мишей і фрагментів С-пептиду [15].

У даній роботі продемонстровано можливість використання печінки як органа-мішені та здатність ін'єкції ДНК-ЦГППІЛ у паренхіму печінки гризунів із СТД суттєво знижувати глікемію (~ на 5-20 ммоль/л). Зниження базальної глікемії в інтактних щурів і мишей із СТД після одноразової процедури генної терапії протягом тривалого часу (12 місяців у інтактних тварин та до 2,5 місяців у гризунів із СТД) дозволяє дійти висновку про функціональну активність гена інсуліну людини в клітинах печінки та перспективність розробки цього методу.

Висновки

1. За результатами дослідження умов експресії гена препроінсуліну у мишей лінії C57BL/6j та щурів лінії Вістар показано, що ступінь і тривалість зниження глікемії залежить від терміну стрептозоточиніндукованого діабету, вихідного показника глікемії та концентрації ДНК у трансфекційному препараті.
2. Введення рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППІЛ у паренхіму печінки мишей приводить до суттєвого зниження рівня глюкози у крові тварин із СТД тривалістю 2 і 5 тижнів. Зниження глікемії у мишей зафіксовано через 2 тижні після одноразової ін'єкції препарату ДНК у дозах 10 мкг і 15 мкг і тривалого 5-9 тижнів. Більш виражене та тривале зниження рівня глюкози у крові, а також більший відсоток виживання мишей зафіксовано після застосування препарату ДНК у дозі 15 мкг.
3. У щурів із різними термінами СТД (2 і 5 тижнів) найбільш виражене та тривале зниження рівня глюкози у крові відзначено в експериментах із введенням ДНК-ЦГППІЛ щурам із нетривалим СТД (2 тижні) та нижчою вихідною глікемією. Зниження глікемії відбувалося через 1 тиждень після одноразової процедури генної терапії та тривало 8-9 тижнів. Оптимальним діапазоном доз препарату ДНК є 25-60 мкг, він забезпечує суттєве зниження рівня глюкози у крові — на 33,8-62,3%.
4. Введення рекомбінантних молекул ДНК-ЦГППІЛ інтактним щурам приводить до зниження рівня глюкози у крові через 2 тижні після процедури генної терапії, яке зберігається у цих тварин протягом 12 місяців (52 тижнів) експерименту. Рівень глюкози у крові знижується в середньому на 16,88%.
5. Ін'єкційне введення ДНК-ЦГППІЛ у паренхіму печінки щурів із СТД під час лапароскопічної операції приводить до появи в їх крові значущих рівнів інсуліну людини через 2-4 тижні після маніпуляції. Виявлено високу позитивну кореляцію між показниками інсуліну людини та С-пептиду в сироватці крові щурів із СТД у різні терміни після ін'єкційного введення ДНК-ЦГППІЛ.

Список використаної літератури

1. Тронько Н.Д., Соколова Л.К., Ковзун Е.И., Пастер И.П. Инсулинотерапия: вчера, сегодня, завтра. — К.: Медкнига, 2014. — 192 с. (Tron'ko N.D., Sokolova L.K., Kovzun Ye.I., Paster I.P. Insulin therapy: yesterday, today and tomorrow. — K.: Medkniga, 2014. — 192 p.).
2. Diabetes Atlas. 6th ed. International Diabetes Federation. — 2015.
3. Xu R., Li H., Tse L.Y., Kung H.F., Lu H., Lam K.S. Diabetes gene therapy: potential and challenges // *Curr. Gene Ther.* — 2003. — Vol. 3, № 1. — p. 65-82.
4. Handorf A.M., Sollinger H.W., Alam T. Insulin gene therapy for type 1 diabetes mellitus // *Exp. Clin. Transplant.* — 2015. — Vol. 13, № 1. — p. 37-45.
5. Kim Y.D., Park K.G., Morishita R., Kaneda Y., Kim S.Y., Song D.K., Kim H.S., Nam C.W., Lee H.C., Lee K.U., Park J.Y., Kim B.W., Kim J.G., Lee I.K. Liver-directed gene therapy of diabetic rats using an HVJ-E vector containing EBV plasmids expressing insulin and GLUT 2 transporter // *Gene Ther.* — 2006. — Vol. 13, № 3. — p. 216-224.
6. Гулько Т.П., Топорова Е.К., Шпилева С.П., Бойченко Ю.В., Кордюм В.А. Моделирование инсулинзависимого сахарного диабета у мышей // *Журнал АМН України.* — 2010. — Т. 16 (додаток). — С. 48-49. (Gulko T.P., Toporova Ye.K., Shpilevaya S.P., Boychenko Yu.V., Kordyum V.A. Modelling of insulin-dependent diabetes in mice // *Zhurnal AMN Ukrayiny.* — 2010. — Vol. 16 (dodatok). — p. 48-49).
7. Benoit S.C., Tracy A.L., Davis J.F. Novel functions of orexigenic hypothalamic peptides: from genes to behavior // *Nutrition.* — 2008. — Vol. 24, № 9. — p. 843-847.
8. Калинская Л.М., Єфімов А.С. Динаміка компонентів ангіотензинової і калікреїн-кінінової систем та їх взаємодія в структурах гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи за умов розвитку стрептозоточинового діабету // *Ендокринологія.* — 2011. — Т. 16, № 1. — С. 67-75. (Kalynska L.M., Yefimov A.S. Dynamics of components of angiotensin and kallikrein-kinin systems and their interaction in the structures of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system under conditions of streptozotocin-induced diabetes development // *Endokrynolohiya.* — 2011. — Vol. 16, № 1. — p. 67-75).
9. Тржещинський С.Д. Вплив екзогенних нейропептидів на ендокринну функцію підшлункової залози та асоційовані метаболічні процеси в нормі і при цукровому діабеті: автореф. дис. ... докт. біол. наук: Запорізький державний медичний університет МОЗ України. — Харків, 2011. — 36 с. (Trzhetsynskiy S.D. Effect of exogenous neuropeptide on the pancreatic endocrine function and associated metabolism processes in norm and in diabetes mellitus: authoref. Dis. ... Doctor. Biol. Sciences: Zaporozhye State Medical University, Ministry of Health of Ukraine. — Kharkiv, 2011. — 36 p.).
10. Bagley J., Paez-Cortez J., Tian C., Iacomini J. Gene therapy in type 1 diabetes // *Crit. Rev. Immunol.* — 2008. — Vol. 28, № 4. — p. 301-324.
11. Harrison P.T. Application of gene therapy in diabetes care // *Infect. Disord Drug Targets.* — 2008. — Vol. 8, № 2. — p. 129-133.
12. Zhang J.A., Jia D., Olson D.E., Campbell A.G., Thul P.M. Hepatic insulin gene therapy diminishes liver glycogen despite insulin responsive transcriptional effects in diabetic CD-1 mice // *J. Gene Med.* — 2009. — Vol. 11, № 7. — p. 588-597.
13. Chen R., Meseck M., VcEvoy R.C., Woo S.I. Glucose-stimulated and self-limiting insulin production by glucose 6-phosphatase promoter driven insulin expression in hepatoma cells // *Gene Ther.* — 2000. — Vol. 7, № 21. — p. 1802-1809.
14. Wang L.Y., Sun W., Chen M.Z., Wang X. Intramuscular injection of naked plasmid DNA encoding human preproinsulin gene in streptozotocin-diabetic mice results in a significant reduction of blood glucose level // *Sheng Li Xue Bao.* — 2003. — Vol. 55, № 6. — p. 641-647.
15. Morishita R., Gibbons G.H., Kaneda Y., Ogihara T., Dzau V.J. Systemic administration of HVJ viral coat-liposome complex containing human insulin vector decreases glucose level in diabetic mouse: A model of gene therapy // *Biochem. Biophys. Commun.* — 2000. — Vol. 273, № 2. — p. 666-674.

(Надійшла до редакції 24.07.2016)

Исследование терапевтических эффектов введения рекомбинантных молекул ДНК, содержащих целевой ген препроинсулина человека, на моделях стрептозототининдуцированного диабета у мышей и крыс

Н.Д. Тронько¹, Л.Н. Калинская¹, Е.К. Топорова²,
Е.И. Ковзун¹, Т.П. Гулько², В.А. Кордюм²

¹ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Резюме. Цель — изучение терапевтических эффектов генной терапии сахарного диабета 1-го типа за счет введения экспериментальным животным рекомбинантных молекул ДНК, содержащих целевой ген препроинсулина человека (ДНК-ЦГППИЧ). **Методы.** Исследован эффект введения ДНК-ЦГППИЧ в паренхиму печени мышей и крыс с разной продолжительностью стрептозототининдуцированного диабета (СТД) — 2 и 5 недель. Глюкозу в крови определяли глюкозооксидазным методом. Определение инсулина и С-пептида в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом. **Результаты.** Исследования эффекта введения различных концентраций препаратов ДНК-ЦГППИЧ в паренхиму печени крыс (25-60 мкг) и мышей (10-15 мкг) позволили определить оптимальные дозы ДНК, которые приводят к существенному и продолжительному (более 2 месяцев) снижению гипергликемии у диабетических животных. Снижение гликемии у мышей зафиксировано через 2 недели после однократной инъекции ДНК-ЦГППИЧ, и оно сохранялось 5-9 недель. Наиболее выраженное снижение гликемии после однократного инъекционного введения ДНК-ЦГППИЧ установлено у крыс с непродолжительным (2 недели) СТД и более низкой исходной гликемией. Опыты на интактных крысах свидетельствуют о более длительном снижении уровня глюкозы в крови после однократного введения гена препроинсулина (52 недели). Инъекционное введение ДНК-ЦГППИЧ крысам с двухнедельным СТД приводит к появлению в крови животных значимых уровней инсулина человека в определенные сроки после однократной процедуры генной терапии. Выявлена высокая позитивная корреляция между показателями инсулина человека и С-пептида в сыворотке крови крыс с СТД в различные сроки после введения ДНК-ЦГППИЧ. **Выводы.** При исследовании условий эффективной экспрессии гена препроинсулина у мышей и крыс показано, что выраженность и продолжительность снижения уровня гликемии зависит от срока диабета, исходной гликемии у животных с СТД и концентрации ДНК в трансфекционном препарате.

Ключевые слова: экспериментальная генная терапия, ген препроинсулина человека, стрептозототининдуцированный диабет у крыс и мышей, глюкоза крови, инсулин, С-пептид.

Study of the therapeutic effects of administration of recombinant DNA molecules containing the target gene of human preproinsulin on models of streptozotocin-induced diabetes in mice and rats

M.D. Tronko¹, L.M. Kalynska¹, O.K. Toporova²,
O.I. Kovzun¹, T.P. Hulko², V.A. Kordyum²

¹State Institution «V.P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine»

²Institute of Molecular Biology and Genetics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine

Abstract. **Aim** is to study the therapeutic effects of gene therapy for type 1 diabetes mellitus by the administration of recombinant DNA molecules containing the target gene of human preproinsulin (DNA-TGHPPI) to experimental animals. **Methods.** The effect of administration of recombinant DNA molecules containing the target gene of human preproinsulin (DNA-TGHPPI) into the liver parenchyma of C57BL/6j mice and Wistar rats with different duration (two and five weeks) of streptozotocin-induced diabetes (STD) was studied. Blood glucose was tested using glucose oxidase method, serum insulin and C-peptide — by immunoenzymic method. **Results.** The studies of the effect of administration of different concentrations of DNA-TGHPPI into rats (25 to 60 mcg) and mice (10 to 15 mcg) liver parenchyma allowed to determine the optimal doses of DNA that led to a significant and prolonged (more than two months) decrease in hyperglycemia in diabetic animals. A decrease in glycemia in mice was noted two weeks after a single injection of DNA-TGHPPI, and this decrease lasted 5-9 weeks. The most marked decrease in glycemia after a single DNA-TGHPPI injection was established in rats with a short (two-weeks) STD and lower baseline glycemia. Experiments on intact rats suggest a more prolonged decrease in blood glucose after a single injection of preproinsulin gene (for 52 weeks). The administration of DNA-TGHPPI to rats with two-weeks STD results in the appearance of significant levels of human insulin in the animal blood within a specified time after a single procedure of gene therapy. A strong positive correlation was found between the indicators of human insulin and C-peptide levels in blood serum of rats with STD at different periods after DNA-TGHPPI administration. **Conclusions.** A study of the conditions of effective expression of preproinsulin gene in C57BL/6j mice and Wistar rats shows that expression and duration of the decrease in glycemia depend on streptozotocin diabetes duration, baseline glycemia in animals with STD and DNA concentration in transfection preparation.

Keywords: experimental gene therapy, human preproinsulin gene, streptozotocin-induced diabetes in rats and mice, blood glucose, insulin, C-peptide.