

## Невирусная доставка гена *apoA1* человека в клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo*

Е. К. Топорова, С. Н. Новикова<sup>1</sup>, Л. И. Лихачева, Е. М. Сухорада, Т. А. Рубан, Ю. Н. Козел, Д. М. Иродов, В. А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

<sup>1</sup> Институт геронтологии АМН Украины  
Ул. Вышгородская, 67, Киев, 04114, Украина

---

*Исследованы подходы к генной терапии атеросклероза путем невирусного переноса гена аполиipoproteина A1 (apoA1) — основного белкового компонента антиатерогенных липопротеинов — в клетки печени. Сконструирован плазмидный вектор для экспрессии полноразмерного гена apoA1 человека в клетках млекопитающих. Конструкция содержит последовательности бактериальной плазмиды, позволяющие ей реплицироваться в клетках Escherichia coli, и касету для экспрессии гена apoA1, фланкированную инвертированными терминальными повторами аденоассоциированного вируса человека. Для доставки векторной ДНК использован синтетический полимер полиэтиленимин (ПЭИ, 25 кДа). Показано, что в результате ПЭИ-опосредованной трансфекции клеток в культуре аналогичным вектором, содержащим репортерный ген зеленого флуоресцирующего белка, 50–70 % клеток экспрессируют введенный ген. На экспериментальных животных, которым вводили конструкцию с геном apoA1 человека прямой инъекцией в печень, продемонстрировано, что белок ApoA1 человека тестируется в плазме крови в течение 15 сут после доставки гена. ПЦР-анализ суммарной ДНК печени подопытных животных показал наличие расчетного фрагмента гена apoA1 человека у крыс через 15 дней после введения гена.*

---

**Введение.** Генная терапия — новейшая биомедицинская технология, основанная на введении в клетки генных конструкций с лечебной целью [1, 2]. Терапевтический эффект подобных конструкций достигается за счет дополнительного синтеза целевых белков вследствие экспрессии введенных генов. При этом вводимый ген фактически является новым фармацевтическим препаратом для лечения не только моногенных, но и тяжелых мультифакторных заболеваний, таких как атеросклероз [3–6].

Одним из наиболее значимых факторов риска развития атеросклероза является повышенный уровень холестерина. Заболевание возникает при нарушении баланса его катаболизма. Доставка холе-

стерина в клетки осуществляется атерогенными липопротеинами низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП), а выведение из клеток — липопротеинами высокой плотности (ЛПВП), т. е. антиатерогенными. Основным белковым компонентом лиганда ЛПВП является ApoA1 [7]. Высокое содержание ЛПВП в крови человека, обусловленное повышенным уровнем ApoA1, коррелирует с незначительным риском развития атеросклероза [8]. Установлено, что у мышей с индуцированным атеросклерозом введение ApoA1 человека приводило к существенной регрессии атеросклеротических изменений аорты [9].

В соответствии с современными представлениями о роли нарушений липидного метаболизма в развитии атеросклероза многочисленные клинические и экспериментальные попытки профилактики

© Е. К. ТОПОРОВА, С. Н. НОВИКОВА, Л. И. ЛИХАЧЕВА,  
Е. М. СУХОРАДА, Т. А. РУБАН, Ю. Н. КОЗЕЛ,  
Д. М. ИРОДОВ, В. А. КОРДЮМ, 2004

и лечения этого заболевания основаны на использовании средств, снижающих уровень холестерина и атерогенных липопротеинов в крови, что дает эффект только на время приема лекарственных препаратов. В то же время не удается разработать надежные способы увеличения количества ЛПВП, что значительно снизило бы риск клинических проявлений болезни. Это определяет новые подходы к лечению атеросклероза с помощью клеточной и генной терапии.

Главной в генной терапии является проблема векторов, т. е. доставки необходимого гена в нужную клетку. До сегодняшнего дня эта проблема не решена и остается центральной во всех генотерапевтических проектах. При использовании вирусных векторов для доставки генов возник ряд вопросов, связанных с их безопасностью для человека. В первую очередь это касается токсичности и иммуногенности подобных векторов, а также возможной активации ими онкогенов или инактивации генов-супрессоров злокачественной трансформации в клетке-мишени. Получены сообщения о нескольких летальных случаях во время клинических испытаний разных генотерапевтических протоколов, включающих использование вирусных векторов, что привело к ограничению их применения.

Одним из наиболее безопасных вирусов, используемых в качестве векторов, считается аденоассоциированный вирус человека (ААВ) [10] — непатогенный одноцепочечный (ДНК) парвовирус, дефектный по репликации и не способный самостоятельно поддерживать инфекционный цикл [11]. Для прохождения этого цикла ААВ требуется коинфекция вирусом-помощником, обычно аденовирусом или вирусом герпеса. При отсутствии вируса-помощника ААВ специфически интегрирует в хромосому 19q13.3-qter (AABS1 локус) человека и может оставаться в латентном состоянии неопределенно долгое время [12, 13]. Ключевыми элементами для интеграции ААВ в геном хозяина являются инвертированные терминальные повторы — ITRs (145 п. н.). Доказано, что наличие этих палиндромных последовательностей является достаточным для встраивания ДНК вируса в геном хозяина [14]. Анализ гомологии последовательностей ДНК грызунов показал, что в их геноме отсутствуют участки, гомологичные прединтеграционному AABS1 сайту генома человека, и встраивание ДНК ААВ не является сайт-специфическим [15]. Аденоассоциированный вирус способен инфицировать клетки широкого круга хозяев; заражение

им не требует пролиферации клеток и ААВ-векторы имеют тенденцию к персистированию в трансфицированных клетках в течение длительного времени без каких-либо неблагоприятных последствий для них. Эти уникальные свойства ААВ позволили использовать его для создания векторов экспрессии при разработке технологий генной терапии.

На основе ААВ созданы своеобразные молекулярные заготовки — транскрипционные кассеты, удобные для дальнейшего конструирования по конкретному заданию. Особенно удачным оказалось введение в такую кассету репортерного гена флуоресцирующего белка медузы (*gfp*), благодаря чему появилась возможность под люминесцентным микроскопом регистрировать живые трансформированные клетки, в которых функционирует рекомбинантная ДНК [16—18]. Именно такую заготовку мы избрали как основу для конструирования плазмидного вектора экспрессии гена аполипопротеина А1 человека. В работе представлены результаты невирусного переноса полноразмерного гена *apoA1* человека и исследования его экспрессии в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы.** Плаزمида *pEGFP-C1* получена из фирмы «ClonTech» (США); плазмиды *pTR-UF* — от С. Золотухина (Gene Therapy Center Vector Core Lab, США). Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса с депротеинизацией фенолом и хлороформом [19].

Все плазмидные ДНК, содержащие инвертированные терминальные повторы аденоассоциированного вируса, выделяли из клеток *Escherichia coli* штамма Sure2 («Stratagene», США).

Суммарную ДНК из печени крыс получали, используя стандартные методы, и анализировали методом электрофореза в 0,5 %-м агарозном геле.

Для экспериментов *in vitro* использовали клетки линии CHO-K1, полученные из российской коллекции клеточных культур (Санкт-Петербург). Клетки выращивали на питательной среде F10 («Sigma», США), содержащей 10 %-ю эмбриональную телячью сыворотку («Геном», Украина). В среду добавляли 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина («Київмедпрепарат», Украина). Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>.

Эксперименты *in vivo* проводили на самцах крыс линии Вистар массой 150—200 г. Все манипуляции с животными осуществляли с использованием седативных и анестезирующих препаратов в соответствии с ветеринарным законодательством.

На один показатель в эксперименте использовали образцы от трех животных.

Для выделения ЛПВП в 4 мл плазмы крови растворяли 2,2 моль NaBr (плотность полученного раствора  $d = 1,32$  г/мл) и вносили в центрифужную нитроцеллюлозную пробирку. Сверху наслаивали 4,5 мл раствора NaBr плотностью  $d = 1,30$  г/мл, затем — 6 мл дистиллированной воды. Пробирки центрифугировали на ультрацентрифуге L5-55 фирмы «Beckman» (США) в роторе SW27.1 при 26000 об/мин в течение 20 ч (17 °С). После завершения центрифугирования снимали фракции ЛПВП. Визуализацию проводили с помощью микроденситометра.

В полученных фракциях определяли содержание белка по методу Лоури. После диализа во фракциях определяли ApoA1 человека с помощью иммуноферментного метода ELISA. Для калибровки использовали стандартную сыворотку с содержанием ApoA1 человека 120—135 мг/дл. Исследуемые пробы ЛПВП крыс титровали в бикарбонатном буфере, начиная с разведения 1:100, и по 100 мкл каждого разведения вносили в лунки полистироловых планшетов («Nunc», Дания). После 2 ч инкубации при 37 °С планшеты трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, содержащем 0,05 %-й твин-20 (ФСБТ). Свободные места сорбции блокировали 10 %-й сывороткой крупного рогатого скота (КРС) и добавляли по 100 мкл специфических антител кроля в разведении 1:300. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и трижды отмывали ФСБТ. Связавшиеся антитела к ApoA1 насыщали антителами козла против IgG кролика, меченными пероксидазой хрена, которые добавляли в количестве 100 мкл в каждую лунку (разведение 1:20000). Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и пять раз отмывали ФСБТ. В лунки вносили 100 мкл субстрата — о-фенилендиамина в концентрации 40 мг в 100 мл в 0,1 М фосфатно-цитратном буфере, pH 5,0, содержащем 0,006 %  $H_2O_2$ . Через 15 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 н.  $H_2SO_4$  и измеряли экстинкцию при длине волны 492 нм на многоканальном фотометре. Негативным контролем служило значение оптической плотности в лунках, содержащих вместо антигена 100 мкл ФСБ.

Препарат ДНК для инъекций готовили в стерильных условиях. Количество ДНК в трансфекционном препарате варьировало от 40 до 150 мкг на одно животное. Контрольным животным вводили

аналогичную плазмидную конструкцию без *apoA1* гена.

Животных умерщвляли в соответствии с общепринятыми правилами с использованием анестезирующих средств.

Иммуноблоттинг проводили по стандартной методике [20].

В работе использованы реактивы фирм «Sigma» (США), «Aldrich» (США), «Pharmacia» (Швеция) и реактивы отечественного производства квалификации ос. ч. и х. ч., ферменты для геноинженерных работ производства фирмы «Fermentas» (Литва).

**Результаты и обсуждение.** *Конструирование плазмидного вектора для экспрессии полноразмерного гена apoA1 человека в клетках млекопитающих.* Ген *apoA1* человека получен как *PstI-PstI* фрагмент геномной ДНК человека скринингом геномной библиотеки, сконструированной на основе вектора  $\lambda$  Харон 4А [21], и клонирован в плазмиде *pA401*. Фрагмент плазмиды *pA401* длиной 2200 п. н., содержащий полноразмерный ген *apoA1* человека, мы соединили с сильным нетканеспецифичным промотором раннего гена цитомегаловируса человека и сайтом полиаденилирования гена гормона роста быка в плазмиде *pTR-UF*, из которой был удален блок генов *gfp10-neoR* (рис. 1, см. вклейку). В полученной конструкции *pTR-apo* ген *apoA1* человека имеет все необходимые 5'/3'-концевые регуляторные элементы и расположен между ITR-последовательностями AAB.

*Трансфекция клеток СНО-К1 плазмидной ДНК в комплексе с полиэтиленимином (ПЭИ).* Для доставки плазмидных векторов с репортерными и целевыми генами в клетки млекопитающих мы применили химический метод, используя синтетический полимер ПЭИ.

Известно, что полимерные молекулы, несущие избыточный катионный заряд, могут существенно повышать эффективность трансфекции [22]. Для приготовления комплекса ДНК/ПЭИ был взят разветвленный ПЭИ размером 25 кДа «Aldrich». Препарат ДНК/ПЭИ для трансфекции *in vitro* или для инъекций в печень подопытных животных готовили в весовом эквиваленте 1:4 следующим образом: ДНК и ПЭИ растворяли в равных объемах 0,15 М NaCl и раствор ПЭИ по каплям добавляли к раствору ДНК. Образование комплексов ДНК с ПЭИ определяли по задержке миграции ДНК в 0,8 %-м агарозном геле при электрофорезе (метод гель-ретардации). Комплексы ДНК/ПЭИ образуются в результате электростатического взаимодей-

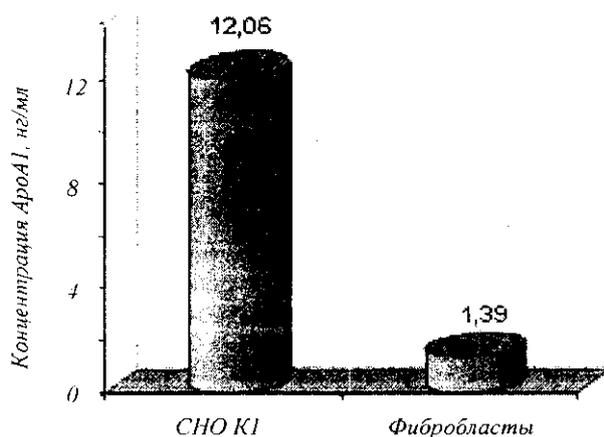


Рис. 3. Содержание белка AroA1 человека в культуральной среде после трансфекции клеток линии CHO-K1 и эмбриональных фибробластов мыши *pTR-aro*

ствия поликатиона ПЭИ и полианиона ДНК, что приводит к уменьшению негативного заряда ДНК и, таким образом, к снижению скорости миграции ДНК в геле при электрофорезе (задержка в геле). По данным литературы, ПЭИ полностью нейтрализует ДНК (что не дает ей возможности мигрировать в геле) при соотношении аминных групп ПЭИ к фосфатным остаткам ДНК (N/P) больше двух [23]. Эффективность системы введения ДНК с использованием ПЭИ оценивали, проводя мониторинг экспрессии репортерного гена флуоресцирующего белка EGFP (в ген *gfp* введены мутации, усиливающие («enhanced») флуоресценцию) [24—26]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что 50—70% клеток в культуре трансфицируются таким способом (рис. 2, см. вклейку).

*Перенос гена aroA1 человека в клетки млекопитающих in vitro и in vivo.* Для проведения иммуноферментного тестирования продукта экспрессии гена *aroA1* человека, введенного в клетки *in vitro* и *in vivo*, мы получили поликлональные антитела кроля к этому белку. Для иммунизации кролей белок AroA1 человека выделяли элюцией из геля после электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) фракции ЛПВП человека. Электрофорез проводили в 12 %-м ПААГ, не содержащем SDS. Препарат ЛПВП человека, предварительно диализированный, с глицерином, красителем и SDS наносили на гель. Полосу, соответствующую 28 кДа, вырезали и гомогенизировали в физиологическом растворе. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [20].

Для получения антисыворотки кролям подкож-

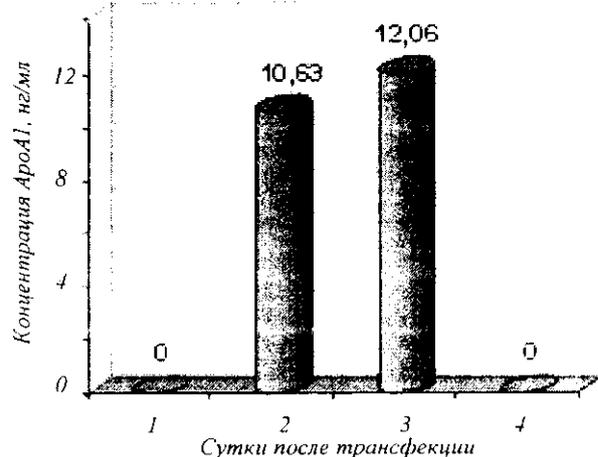


Рис. 4. Динамика синтеза AroA-1 человека клетками линии CHO-K1 после трансфекции *pTR-aro*

но вводили раствор AroA1 человека (1—2 мг) в 5—6 мест спины вдоль хребта 3 раза с интервалами в 7 сут. Через 7—10 дней после последнего введения белка отбирали кровь из ушной вены, получали сыворотку и в ней определяли титр специфических антител методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА), где антигеном служила сыворотка крови человека, вторичными антителами — мышинные антитела к гамма-глобулинам кроля, меченные пероксидазой хрена. При высоком титре антител в сыворотке крови кроля из нее получали глобулиновую фракцию 2—3-кратным осаждением 33 %-м раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . После диализа против 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,4, гамма-глобулины очищали на ионообменной колонке с ДЭАЭ-сефацелом («Pharmacia») в том же буфере. Очищенные антитела концентрировали высокомолекулярным полиэтиленгликолем до 2—4 мг/мл и хранили при температуре 20 °С в 50 %-м глицерине. Полученные поликлональные антитела использовали в иммуноферментном тестировании продукта экспрессии гена *aroA1* человека, доставленного в клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo* с помощью поликатионного трансфекционного реагента ПЭИ.

Проведенные исследования показали, что введение плазмиды *pTR-aro* как в клетки CHO-K1, так и в клетки первичной культуры эмбриональных фибробластов мыши приводит к появлению в культуральной среде белка AroA1 человека, определяемого с помощью ИФА (рис. 3).

Синтезированный AroA1 секретируется в культуральной среде благодаря наличию в своем соста-

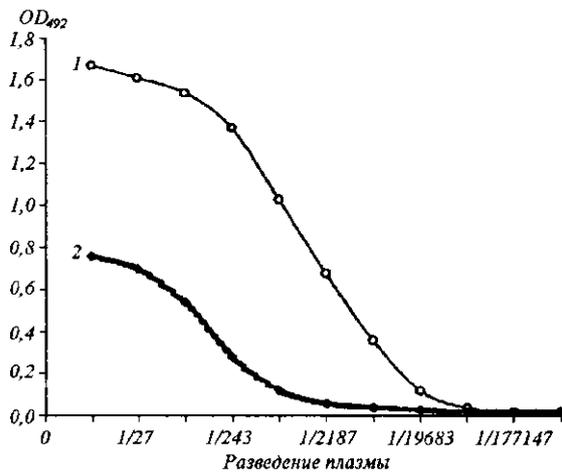


Рис. 5. Кривые титрования плазмы крови человека, содержащей 160,8 мг/дл белка ApoA1 (1), и ЛПВП крови контрольных крыс (2) при определении уровня неспецифического связывания кроличьих антител к ApoA-1 человека с компонентами плазмы крови крысы. Исходно плазму крови человека развели в 10000 раз

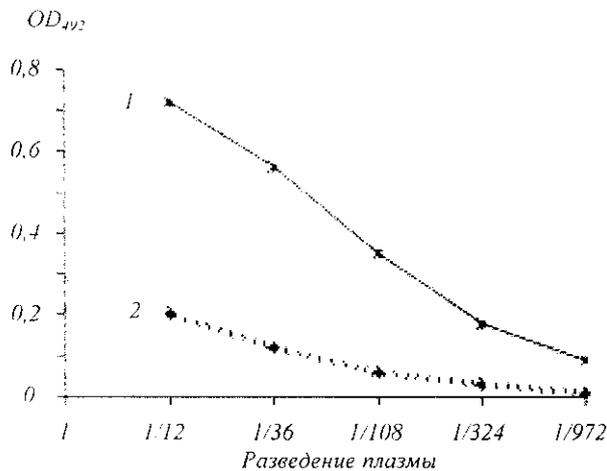


Рис. 6. Снижение уровня неспецифического связывания поликлональных антител кроля к ApoA1 человека с фракцией ЛПВП крови крыс с помощью предварительного истощения их фракцией ЛПВП крови интактных крыс: кривые титрования ЛПВП крови контрольных крыс с использованием поликлональных антител кроля к ApoA1 человека до (1) и после (2) истощения

ве сигнального пептида. Иммуноферментный анализ показал, что апопротеин A1 человека появляется в среде на 4-е сут после трансфекции. Количество обнаруженного белка ApoA-1 человека составляет 10,63 нг/мл на 4-е сут и 12,06 нг/мл — на 6-е. Векторная конструкция не содержит последовательностей, обеспечивающих ее репликацию в эукариотической клетке, поэтому наблюдалась

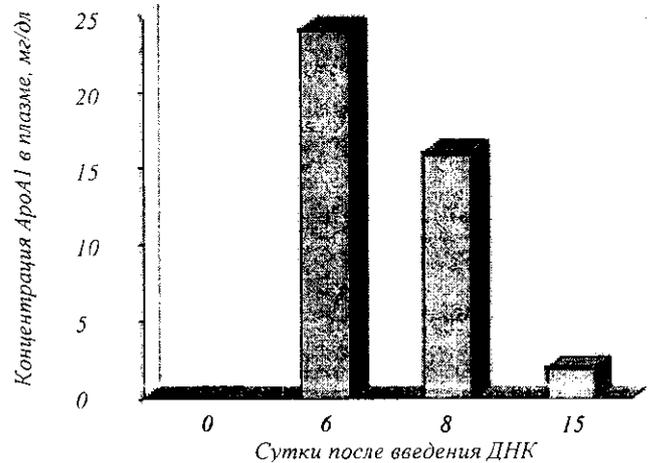


Рис. 7. Содержание ApoA1 человека в плазме крови крыс после инъекции ДНК *pTR-apo*. Концентрацию определяли методом ELISA во фракции ЛПВП крыс и пересчитывали на содержание данного белка в плазме крови. Нулевая точка — фракция ЛПВП крови крыс, взятая до введения плазмидной ДНК

именно транзиторная экспрессия гена *apoA1*, уровень которой уже на 8-е сут приближался к нулю (рис. 4).

Функциональную активность вектора экспрессии гена *apoA1* человека исследовали в экспериментах *in vivo*. Для количественного определения ApoA1 человека в крови крыс после инъекции плазмидной ДНК использовали твердофазный ИФА. Была проведена оптимизация метода, включающая идентификацию полученных поликлональных антител, выбор рабочих режимов, компонентов и конъюгатов, а также определение влияния предварительного делипидирования плазмы крови разными способами (данные не представлены) для более специфического выявления ApoA1 человека. При постановке ELISA с плазмой крови крыс мы столкнулись с проблемой высокого уровня неспецифического связывания поликлональных антител кроля к ApoA1 человека с компонентами плазмы крови крыс, в которой отсутствует ApoA1 человека, но есть собственные Apo-белки (рис. 5). Явление мультиспецифичности описано в литературе [27]. Для снижения уровня неспецифического связывания фракционировали плазму крови крыс и определяли ApoA1 во фракции ЛПВП, а также использовали метод истощения поликлональных антител. Метод заключается в обработке антител плазмой или ЛПВП крови интактных крыс. Эти приемы позволили значительно снизить неспецифичность связывания (рис. 6).

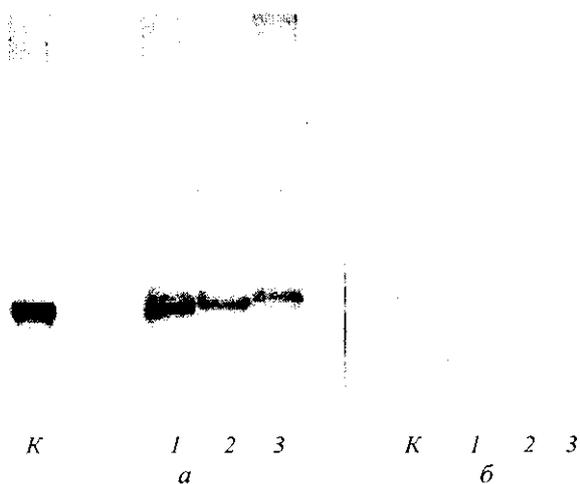


Рис. 8. Нативный гель-электрофорез ЛПВП (а) и иммуноблотинг АроА1 человека (б): К — ЛПВП человека (положительный контроль); 1 — ЛПВП крыс через 6 сут после введения *pTR-aro*; 2 — ЛПВП крыс через 15 сут после введения *pTR-aro*; 3 — ЛПВП интактных крыс (негативный контроль)

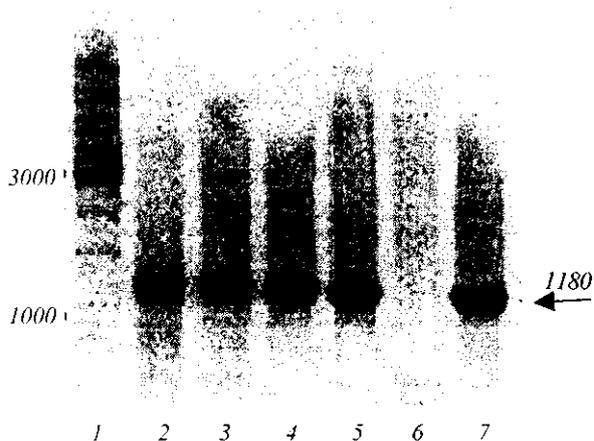


Рис. 9. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа суммарной ДНК печени крыс: 1 — маркер молекулярной массы ДНК; 2—5 — ДНК печени опытных животных через 15 сут после введения плазмидной ДНК; 6 — ДНК печени контрольных животных; 7 — ДНК интактной крысы + плазмидная ДНК (положительный контроль)

Иммуноферментное определение АроА1 человека, синтезированного в печени экспериментальных животных после инъекции плазмидной ДНК с геном *aroA1* человека, проводили с использованием истощенных антител (рис. 7). Уровень АроА1 человека в ЛПВП крыс через 2 недели после инъекции препарата ДНК составил 240 мкг/дл.

Результаты, полученные методом ELISA, под-

тверждены иммуноблотингом ЛПВП крови опытных и контрольных животных (рис. 8).

Анализ введенных нуклеотидных последовательностей в составе суммарной ДНК печени экспериментальных животных проводили с помощью ПЦР. Последовательность праймеров выбирали таким образом, чтобы избежать перекрестного ответа со стороны «хозяйской» ДНК подопытных животных. Далее анализировали последовательности генов *aroA1* человека, крысы, мыши, кролика и китайского хомячка. Обнаружены консервативные и переменные участки для этой группы последовательностей. Участки последовательностей ДНК, наиболее отличающиеся у названных животных, анализировали для выявления возможности подбора пары праймеров с наиболее близкими характеристиками. Была выбрана пара таких праймеров (Ap-f и Ap-r):

прямой праймер Ap-f — 5'-TGAAAGCTGCG-GTGCTGACCTTGG;

обратный праймер Ap-r — 5'-ATCTCCTCCTG-SSACTTCTTCTGG.

С помощью рассчитанных праймеров показано, что при введении гена *aroA1* в составе плазмидного вектора *pTR-aro* инъекцией в печень, ген сохраняется в клетках печени не менее 15 сут, о чем свидетельствует расчетная полоса в геле длиной 1180 н. п. (рис. 9).

Результаты, полученные с помощью ПЦР, подтверждены гибридизационным анализом суммарных ДНК, выделенных из печени опытных животных после окончания экспериментов разной продолжительности (данные не представлены).

В предыдущих работах нами доказана принципиальная возможность переноса гена *aroA1* человека под регуляцией собственного промотора в составе плазмидной конструкции в печень крыс и кроликов [28]. Представленный в работе вектор позволяет получить не только более высокий уровень синтеза АроА1, но и пролонгировать экспрессию введенного гена.

Учитывая тот факт, что перенос гена *aroA1* в организм млекопитающих с атеросклеротическими поражениями кровяных сосудов приводит к регрессии этих поражений, изучение безопасных невирусных способов доставки гена антиатерогенного АроА1 в клетки млекопитающих *in vivo* может быть основой для разработки подходов к генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

O. K. Toporova, S. N. Novikova, L. I. Lihacheva, O. M. Suhorada, T. A. Ruban, J. A. Kozel, D. M. Irodov, V. A. Kordium

Non-viral gene delivery of human apoA1 into mammalian cells in vitro and in vivo

#### Summary

Some approaches to the gene therapy of atherosclerosis by non-viral transfer of human apoA1 gene, encoding the main protein component of antiatherogenic lipoproteins, into liver cells are being studied. The plasmid vector for the expression of the human genomic apoA1 gene in mammalian cells has been constructed. The construction contains bacterial plasmid sequences for its replication in *Escherichia coli* and expression cassette for human apoA1 gene flanked by inverted terminal repeats of human adeno-associated virus. The cationic polymer polyethylenimine of 25 kD (PEI) has been used for gene delivery. It has been shown, that 50–70 % of cells express transgene after PEI-mediated in vitro transfection with analogical vector containing reporter green fluorescence protein gene. The experiments on animals have demonstrated, that the human protein ApoA1 is being tested in animal plasma during 15 days after apoA1 gene injection in the liver. PCR-analysis of total liver DNA of experimental animal has shown the presence of expected fragment of apoA1 gene in rat liver in 15 days after the gene delivery.

O. K. Toporova, S. M. Novikova, L. I. Lihacheva, O. M. Suhorada, T. A. Ruban, J. A. Kozel, D. M. Irodov, V. A. Kordium

Невірусна доставка гена apoA1 людини в клітини ссавців in vitro та in vivo

#### Резюме

Досліджували підходи до генної терапії атеросклерозу невірусного переносу гена аполіпопротеїну A1 (apoA1) — основного білкового компонента антиатерогенних ліпопротеїнів — у клітини печінки. Сконструйовано плазмідний вектор для експресії повнорозмірного гена apoA1 людини в клітини ссавців. Конструкція містить послідовності бактеріальної плазміди, які дозволяють їй реплікуватися в клітинах *Escherichia coli*, і касету для експресії гена apoA1, фланковану інвертованими термінальними повторами аденоасоційованого вірусу людини. Для доставки векторної ДНК використано синтетичний полімер поліетиленімін 25 кДа (ПЕІ). Показано, що в результаті ПЕІ-опосередкованої трансфекції клітин у культурі аналогічним вектором, який містить репортерний ген зеленого флуоресцентного білка, 50–70 % клітин експресують введений ген. На експериментальних тваринах, яким вводили конструкцію з геном apoA1 людини прямою ін'єкцією в печінку, продемонстровано, що білок ApoA1 людини тестується в плазмі крові протягом 15 діб після доставки гена. ПЛР-аналіз сумарної ДНК печінки підслідних тварин показав наявність розрахованого фрагмента гена apoA1 людини у шурів через 15 днів після введення гена.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Strauss M., Barranger J. A. Concepts in gene therapy.—Berlin: DeGruyter, 1997.—553 p.
2. Xanthopoulos K. G. Gene Therapy // NATO ASI Series: H: Cell Biology.—Berlin; Heidelberg: Springer, 1998.—238 p.
3. Chong P. H., Bachenheimer B. S. Current, new and future treatments in dyslipidaemia and atherosclerosis // *Drugs*.—2000.—60, N 1.—P. 55—93.
4. O'Brien T., Simari R. D. Gene therapy for atherosclerotic cardiovascular disease: a time for optimism and caution // *M. Clin. Proc.*—2000.—75, N 8.—P. 831—834.
5. Sinnaeve P., Varenne O., Collen D., Janssens S. Gene therapy in the cardiovascular system: an update // *Cardiovasc. Res.*—1999.—44, N 3.—P. 498—506.
6. Belalcazar M., Chan L. Somatic gene therapy for dyslipidemias // *J. Lab. Clin. Med.*—1999.—134, N 3.—P. 194—214.
7. Лутай М. И. К вопросу о клинической классификации дислипопротеинемии // *Укр. кардіол. журн.*—2003.—3, № 4.—С. 9—16.
8. Климов А. Н., Никульчева Н. Г. Липопротеиды, дислипопротеидемии и атеросклероз.—Ленинград: Медицина, 1984.—166 с.
9. Tangirala R. K., Tsukamoto K., Chun S. H., Usher D., Pure E., Rader D. J. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice // *Circulation*.—1999.—100, N 17.—P. 1816—1822.
10. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*—1992.—158.—P. 97—129.
11. Conway J. E., Zolotukhin S., Muzyczka N., Hayward G. S., Byrne B. J. Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by a herpes simplex virus type 1 amplicon expressing Rep and Cap // *J. Virol.*—1997.—71, N 11.—P. 8780—8789.
12. Rayfield M., Michaels G. S., Feldmann R., Muzyczka N. Comparison of the DNA sequence and secondary structure of the herpes simplex virus L/S junction and the adeno-associated virus terminal repeat // *J. Theor. Biol.*—1985.—21, N 115 (4).—P. 477—494.
13. Kotin R. M., Siniscalco M., Samulski R. J., Zhu X. D., Hunter L., Laughlin C. A., McLaughlin S., Muzyczka N., Rocchi M., Berns K. J. Site-specific integration by adeno-associated virus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 6.—P. 2211—2215.
14. Yang C. C., Xiao X., Zhu X., Ansardi D. C., Epstein N. D., Frey M. R., Matera A. G., Samulski R. J. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro // *J. Virol.*—1997.—71, N 12.—P. 9231—9247.
15. Rizzuto G., Gorgoni B., Cappelletti M. Development of animal models for adeno-associated virus site-specific integration // *J. Virol.*—1999.—73, N 3.—P. 2517—2526.
16. Lalwani A. K., Han J. J., Walsh B. J., Zolotukhin S., Muzyczka N., Mhatre A. N. Green fluorescent protein as a reporter for gene transfer studies in the cochlea // *Hear. Res.*—1997.—114, N 1—2.—P. 139—147.
17. Peel A. L., Zolotukhin S., Schrimsher G. W., Muzyczka N., Reier P. J. Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters // *Gene Ther.*—1997.—4, N 1.—P. 16—24.
18. Toporova E. K., Irodov D. M., Suhorada E. M., Ruban T. A., Kozel J. A., Андриенко В. И., Новикова С. Н., Кордюм В. А. Использование генов флуоресцирующих белков для визуализации экспрессии генов в живых клетках in vitro и in vivo // X Юбилейная междунар. конф.: Новые информационные технологии в медицине и экологии.—Ялта; Гурузф, 2002.—С. 301—303.
19. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—358 с.
20. Bollag D. M., Rozycki D. M., Edelstein S. J. Protein methods.—New York, 1996.—415 p.
21. Шульженко В. Н., Лукаш Л. Л., Кордюм В. А. Клонирование гена apoA1 человека и его экспрессия в фибро-

- бластах мыши // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 5.—С. 105—107.
22. *Thomas M., Klibanov A. M.* Non-viral gene therapy: polica-tion-mediated DNA delivery // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*—2003.—62.—Р. 27—34.
  23. *Erbacher P., Bettinger T., Belguise-Valladier P., Zou S., Goll J. L., Behr J. P., Remy J. S.* Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI) // *J. Gene Med.*—1999.—1.—Р. 210—222.
  24. Шпильова С. П., Андриенко В. І., Єлиссєва Г. С., Аджаміян Ф., Жарова Л. Г., Лихачова Л. І., Топорова О. К., Кордюм В. А. Експресія плазміді рEGFP у гепатоцитах мишей *in vivo* // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 3.—С. 241—246.
  25. *Kozel Y., Suhorada H., Ruban T., Shpylevaya S., Titok T., Andrienko V., Irodov D., Toporova H.* Monitoring of gene expression with the use of marker GFP and DsRed genes in mammalian cells // *Abstr. book Conf. for Students, PhD students and Young Scientist on Mol. Biol. and Genet.*—Kyiv, 2001.—Р.
  26. *Kozel Y., Suhorada H., Ruban T., Shpylevaya S., Titok T., Andrienko V., Irodov D., Toporova H.* Visualization of gene delivery systems // Тези доповідей III Укр. конф. молодих вчених, присвяченої пам'яті акад. В. В. Фролькіса.—Київ, 2002.—С. 93.
  27. *Кэтти Д.* Антитела.—М.: Мир, 1991.—287 с.
  28. *Фролькіс В. В., Кордюм В. А., Новикова С. Н., Богацкая Л. Н., Иродов Д. М., Лихачева Л. И., Потапенко Р. И., Мозжухина Т. Г., Битнер М. К.* Влияние имплантации клонированного гена *aroA1* человека на развитие гиперхолестеринемии у кроликов // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 6.—С. 98—102.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 09.02.04