

11. Yang W.M., Inouye C., Zeng Y., Bearss D., Seto E. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – 93, N 23. – P. 12845–12850.
12. Oei S.L., Griesenbeck J., Schweiger M., Babich V., Kropotov A., Tomilin N. Interaction of the transcription factor YY1 with human poly (ADP-ribosyl) transferase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – 240, N 1. – P. 108–111.
13. Griesenbeck J., Ziegler M., Tomilin N., Schweiger M., Oei S.L. Stimulation of the catalytic activity of poly (ADP-ribosyl) transferase by transcription factor Yin Yang 1 // *FEBS Lett.* – 1999. – 443, N 1. – P. 20–24.
14. Kakizawa T., Miyamoto T., Ichikawa K., Kaneko A., Suzuki S., Hara M., Nagasawa T., Takeda T., Mori Ji., Kumagai M., Hashizume K. Functional interaction between Oct-1 and retinoid X receptor // *Biol. Chem.* – 1999. – 274, N 27. – P. 19103–19108.
15. Umesono K., Murakami K.K., Thompson C.C., Evans R.M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors // *Cell.* – 1991. – 65, N 7. – P. 1255–1266.
16. Mangelsdorf D.J., Evans R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors // *Cell.* – 1995. – 83, N 6. – P. 841–850.
17. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – 21, N 6. – P. 1973–1985.
18. Matlik K., Redik K., Speek M. L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2006. – N 1. – P. 71753.
19. Wheelan S.J., Aizawa Y., Han J.S., Boeke J.D. Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution // *Genome. Res.* – 2005. – 15, N 8. – P. 1073–1078.

PIDPALA O.V., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: pidpala@ukr.net

COMPOSITE CLUSTER STRUCTURE OF MOBILE GENETIC ELEMENTS IN THE *MGMT* GENE INTRON AS A SOURCE OF REGULATORY SEQUENCES

Aims. It was carried out analysis of the composite cluster structures MGE in intron 2 and 3 of human *MGMT* gene for the sequences homologous to binding sites of transcription factors. **Methods.** Searching and identifying MGE was realised by using CENSOR (<http://www.girinst.org>). Functional sites were defined by program TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). **Results.** Composite clusters in the introns 2 and 3 of human *MGMT* gene consist of Alu-repeat and fragments of LINE-elements. Both sequences are enriched promoterspecific elements including the TATA box, AP-1, Sp1, SREBP-1, Oct-1, HSF2 and others. Except that fragments of the LINE-elements have sites binding for the glucocorticoid receptor and orphan hormone nuclear receptor. **Conclusions.** The obtained results allow to consider analyzed intron clusters of MGE as potential alternative promoters.

Key words: human O⁶-methylguanin-DNA methyltransferase gene, mobile genetic elements, composite cluster structures.

УДК 611-018.5:616.1:616-018:616.13-004.6.005:1:575.191

ПІСКУН Р.П., БІЛОШИЦЬКА А.В., ГРИНЧАК Н.М., ШЕВЧУК Т.І., ГОРБАТЮК С.М., ПІСКУН І.І., РОМАШКІНА О.А., САВИЦЬКА А.А.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, Україна, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskun2006@mail.ru

ГЕННА ТЕРАПІЯ: ОСОБЛИВОСТІ ТА ДОСВІД ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

Рубіж другого й третього тисячоліть у медицині ознаменувався значним поширенням захворювань серцево-судинної системи, які за даними ВООЗ, посідають перше місце в структурі смертності населення планети [1].

В Україні хвороби системи кровообігу становлять 62 % у структурі загальної смертності. Інфаркт міокарда, ішемічна хвороба серця, мозковий інсульт – це клінічно маніфестовані форми атеросклерозу. Тому одними з

найбільш актуальних задач сучасної медицини є діагностика, лікування і профілактика атеросклерозу.

Відомо, що атеросклероз відноситься до мультифакторіальної патології, до розвитку якої поряд з впливом навколишнього середовища призводить спадковість. Ось чому чисельні клінічні та експериментальні спроби профілактики та лікування цієї хвороби при використанні фармакологічних препаратів, що знижують рівень холестеролу, тригліцеридів та ліпопротеїнів низької щільності у крові, виявили, що це лише тимчасовий ефект (тільки на час прийому ліків) [2]. В той же час немає надійних засобів, що збільшували б рівень антиатерогенних ліпопротеїнів високої щільності [3].

Результати великої кількості популяційних, клінічних та експериментальних досліджень свідчать, що існує зв'язок між наявністю мутацій окремих генів та порушеннями ліпідного обміну [4]. Завдяки успіхам молекулярної біології було доведено, що однією з причин порушень ліпопротеїдного обміну є мутації гена Апо-Е – гена головного білка ліпопротеїнів високої щільності [5], які мають антиатеросклеротичні функції. Тому усунення порушень шляхом генної терапії – введення гена апоЕ- може бути значним внеском в вирішення проблеми виникнення, прогресування та корекції атеросклеротичних порушень в організмі.

Мета дослідження. Встановити морфофункціональні зміни в клітинах та кровоносних судинах органів при експериментальному атеросклерозі та його генній корекції в умовах профілактичного і лікувального введення гену Апо-Е.

Матеріали і методи

Досліди проведені на білих лабораторних щурах-самцях масою 180–200 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводилися у відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Тварини утримувались у науково-експериментальній клініці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова під постійним наглядом та регулярно зважувались.

Всі піддослідні тварини були розділені на 5 груп: 1 – інтактна; 2 група – щурі, яким щоденно

протягом 30 днів вводився 4 (6) – Метил-2-тіоурацил в дозі 12 мг/кг для пригнічення функції щитоподібної залози; 3 – щурі, яким моделювався атеросклероз за класичною методикою М.М. Анічкова; 4 група – «профілактика» – щурі, яким попередньо моделювання атеросклерозу вводився ген аполіпопротеїну Е (апоЕ); 5 група – «лікування» – щурі, яким на тлі моделювання атеросклерозу вводився ген апоЕ. Протягом 30 днів щоденно щурам 3, 4 і 5 груп внутрішньошлунково за допомогою зонду з оливою вводили холестерол, попередньо розчиняючи його в соняшниковій олії, в дозі 0,5 г/кг і 4(6) – метил-2-тіоурацил. Тваринам 4 профілактичної групи вводили ген апоЕ по 50 мкг на тварину внутрішньом'язово в перший день досліду. Тваринам 5 групи з лікувальною метою вводили ген апоЕ в тій же дозі на 15 день досліду. В ролі вектора використовували ліпосоми ДОТАР Methosulfate salt (Product Code: D 1163 0,4 ml 121,60 C₄₃H₈₃NO₈S FW 7774,2 фірми «SIGMA») з розрахунку 1 мкг ДНК апоЕ на 5 мг ДОТАР. Плазмиду, що несе ген ізоформи ε2 людини апоЕ, з'єднаний з цитомегаловірусним промотором, включали в структуру ліпосоми безпосередньо перед введенням щурам.

Результати та обговорення

Ефективність трансфекції оцінювалась із застосуванням методу зворотньо-транскрип-тазної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) в зразках тканини печінки та м'язів, отриманих на останню (30) добу експерименту. Візуалізація продуктів ампліфікації (295 пар нуклеотидів і 180 пар нуклеотидів відповідно для першої і другої пари праймерів) проводилась за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі (рис. 1).

Генетична (генна) терапія це один з провідних напрямків молекулярної медицини, яка найближчим часом буде мати значний вплив на здоров'я людства.

Основою генної терапії являється генна інженерія. Генетична (генна) інженерія – це прикладна галузь молекулярної біології, генетики та біохімії, яка розробляє методи перебудови геномів організмів вилученням або введенням окремих генів чи їхніх груп; синтезу генів поза організмом; виділення з клітин та перебудову окремих генів або їх частин; копіювання та розмноження виділених або синтезованих генів; введення генів чи їх груп у геном інших організмів; експериментальне поєднання різних геномів в одній клітині.

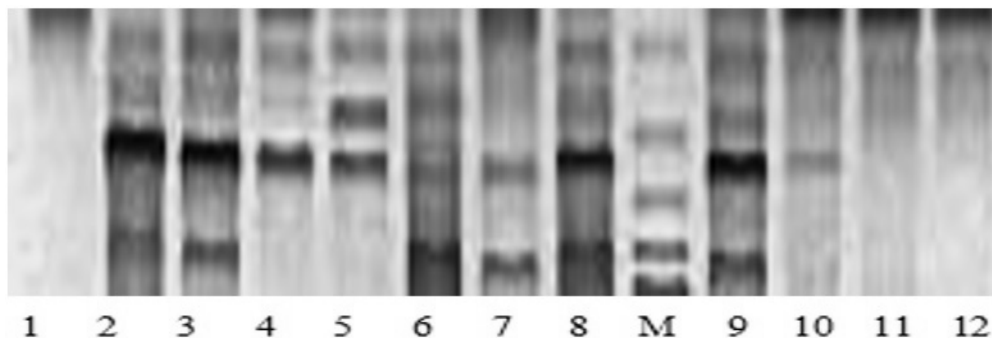


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації РНК apoE-гена (230 п.н.):
 № 1 – «-» – контроль;
 №№2–9 – зразки тканин шурів, яким вводилась плазміда, що несе apoE-ген людини;
 № 10 – «+» – контроль;
 №№ 11–12 – зразки тканин контрольних тварин (без введення плазмідної ДНК)

Експериментальне перенесення генів в інший геном називають трансгенезом. Він базується на технології рекомбінантної ДНК. Організми, які мають у складі свого геному чужорідні гени інших організмів, називаються трансгенними.

У зв'язку з недостатньо вивченими наслідками втручання в геном людини – генна інженерія статевих клітин у більшості країн заборонена.

Як правило, експериментують перенесення генів еукаріотів у клітини бактерій. У геном бактерій вводять гени, які кодують інсулін пацюка або людини, гени рРНК дрозофіли або жаби тощо. Вбудовані гени у нормі «зчитують» інформацію в клітині бактерії, завдяки чому вона синтезує відповідні сполуки (гормон інсулін, рРНК тощо).

Успішний розвиток генного аналізу робить можливим застосування генних методів лікуванні хвороб – генної терапії. Медичні генетики отримують можливість змінювати гени, відповідальні за деякі спадкові захворювання і порушення, вставляти замість дефектних (мутантних) генів – нормальні. Нові гени дозволяють задіяним клітинам функціонувати правильно.

З розшифровкою людського геному (Human Genome Project – HGP – 2003 р.) ДНК-технології, які з'являються і вдосконалюються, досягли сьогодні нових висот. Обширні знання про повний набір генів людини і їх хромосому організацію вже використовуються на практиці в діагностичних лабораторіях, що дозволяє вченим і клініцистам досліджувати вроджені генетичні помилки і надавати більш точні

генетичні рекомендації постраждалим сім'ям.

По суті ж, генна терапія – це ремонт генів, або точніше реконструкція генів і геномів. У прямому сенсі слова генна терапія означає лікування шляхом введення в тканини або в клітини смислових (або антисмислової) послідовностей ДНК (або РНК).

Концепція генної терапії існує впродовж декількох десятиліть. Суть її зводиться до того, що найбільш радикальним способом боротьби з різними генетичними захворюваннями є діяльність, спрямована на виправлення або знищення самої генетичної причини захворювання, а не її наслідків.

Тобто генна терапія це етіологічне лікування, яке ґрунтується на корекції первинного генетичного дефекту шляхом зміни генотипу. По суті, генна терапія – це виправлення специфічного спадкового захворювання шляхом введення в клітину-мішень функціонуючої нормальної генетичної конструкції.

Позитивна генотерапія направлена на введення нормального гена для заміщення неактивного мутантного гена.

Негативна генотерапія направлена на пригнічення функції гіперекспресованого гена. Генотерапія може проводитися *ex vivo* і *in vivo*.

Генотерапія *ex vivo* – виправлення генетичного дефекту в ізольованих з органа соматичних клітинах. Вона складається з таких етапів: 1) отримання клітин від хворого; 2) виправлення генетичного дефекту за допомогою перенесення потрібного гена; 3) відбір і збільшення кількості генетично виправлених клітин; 4) введення цих клітин пацієнту.

Для введення гена запропоновано

ретровірусні й аденовірусні вектори, ліпосоми, фізичні методи (електропорація, ультразвук, лазерні мікроін'єкції, генні пістолети – мікрочастинки золота, вкриті ДНК, вистрілюються в тканини).

Перша успішна спроба генотерапії *ex vivo* була проведена в США 14 вересня 1990 р. у 4-х річної дівчинки з рідкісною спадковою хворобою – тяжким комбінованим первинним імунodefіцитом, обумовленим мутацією в гені аденозиндезамінази А (АДА). Цей день вважають датою народження генної терапії. У хворої було виділено Т-лімфоцити, в які *in vitro* за допомогою ретровірусного вектора ввели ген АДА. Модифіковані таким чином лімфоцити культивували і протягом двох років із певною періодичністю вводили хворій. У пацієнтки спостерігалася експресія гена АДА і клінічне поліпшення. Лікування виявилось ефективним, пацієнтка жива і досі, але введення лімфоцитів їй необхідно повторювати кожні 3–6 міс.

Довгострокова генотерапія була вперше успішно проведена при спадковій сімейній гіперхолестеринемії у жінки 29 років. Хворій була зроблена часткова (близько 15 %) гепатоектомія. За допомогою ретровірусного вектора в отриману культуру клітин печінки був введений ген рецептора ліпопротеїнів низької густини. Трансгенні гепатоцити були повернені пацієнтці через катетер у ворітну вену і досягли печінки. В результаті вміст ліпопротеїнів низької густини у крові хворої зменшився на 15–30 %, що значно поліпшило її стан.

Водночас, генотерапія соматичних клітин – один із найбільш передових напрямів лікування як спадкових так і неспадкових хвороб. Її розвиток тісно пов'язаний із розшифровкою будови генів, здійснений програмою «Геном людини». На 2003 р. було запропоновано більше 600 протоколів генної терапії різних захворювань, із них на моногенні хвороби припадає тільки 12 %. Більша частина досліджень стосується генотерапії онкологічних, терапевтичних, інфекційних захворювань та генних вакцин.

На жаль, не у кожному випадку можливе виділення клітин у пацієнта для генетичної модифікації з подальшим поверненням їх в організм. Тому застосовується генотерапія *in vivo* – генетична модифікація клітин безпосередньо в організмі хворого. Основна проблема генотерапії *in vivo* – доставка гена в необхідну тканину і забезпечення його експресії.

Так, генотерапія муковісцидозу можлива тільки *in vivo*. Проте більше 20 клінічних спроб

генотерапії муковісцидозу закінчилися невдачею через погане включення гена в клітини, що не діляться, і короткочасну експресію введеного гена. Крім того, можливий розвиток імунної відповіді на вірусний вектор, провокація пухлини і непередбачуваний вплив на геном клітини при вбудовуванні вектора в невідповідну ділянку ДНК.

Таким чином, програми генної терапії для клінічних випробувань включають наступні розділи:

- вибір нозології для проведення курсу генної терапії;
- обґрунтоване визначення типу клітин, які підлягають генетичній модифікації;
- конструювання екзогенної ДНК;
- біологічна безпека генної конструкції, яка вводиться, що включає досліди на культурах клітин і на модельних (трансгенних) тваринах;
- аналіз експресії введених генів;
- оцінка клінічного (терапевтичного) ефекту;
- можливі побічні наслідки і способи їх попередження.

Найбільш істотним елементом в програмі генної терапії є аналіз наслідків проведених процедур. Він включає:

- пошук модифікованих клітин в організмі пацієнта після перенесення гена і відстеження динаміки цих клітин в певних тканинах. Цей пошук полегшується при наявності маркерного гена в конструкції;
- аналіз експресії введених генів шляхом ідентифікації і кількісної оцінки відповідного РНК-транскрипту або білкового продукту гена;
- аналіз корекції первинного біохімічного дефекту;
- зіставлення отриманих даних з результатами комплексного медичного обстеження;
- внесення необхідних виправлень і доповнень у проведenu схему лікування.

Враховуючи вищевикладене, генна терапія на сучасному етапі – це лікування спадкових, онкологічних, деяких інфекційних та інших захворювань.

У наших дослідженнях об'єктом були патологічні зміни, що виникають в клітинах та тканинах органів на тлі атеросклерозу та його генної корекції. Проведено макроморфометричну оцінку структурних компонентів та особливостей паренхіми серця, нирок, легень, печінки і щитоподібної залози в нормі, при експериментальному атеросклерозі та при його корекції. Визначено структурні особливості кровоносних судин органів, що проявляються

збільшенням площі поперечного перерізу артерії на 60,09 %, зовнішнього діаметру – на 91,1 %, товщини стінки судин – на 60,9 %, площі стінки судин – на 46,8 % та індексу Вогенворта – у 3 рази, а також зменшенням площі просвіту на 14,8 % і внутрішнього діаметру артерій на 66,9 % порівняно з групою інтактних тварин. Проведено порівняльне вивчення особливостей біохімічних показників ліпідного обміну сироватки крові, цитолітичних ферментів печінки та гормонів щитоподібної залози. З комплексним урахуванням морфофункціональних змін вивчених структур органів співставлено отримані результати для оцінки впливу профілактичного та лікувального введення гену ароЕ.

Висновки

1. Встановлено, що експериментальний атеросклероз проявляється порушеннями ліпідного спектру сироватки крові, про що свідчить зростання рівнів загального холестерину, загальних ліпідів, ліпопротеїнів низької щільності індексу атерогенності та

зниження концентрації ліпопротеїнів високої щільності. У досліджених внутрішніх органах виявлено структурну перебудову у вигляді ліпідної дистрофії, деструкції та осередкового некрозу клітинних елементів паренхіми і явищ фіброзу строми, що виникають в результаті зниження пропускної здатності артеріальних судин і дисфункції мікроциркуляторного русла.

2. Застосування гену аполіпопротеїну Е як з метою профілактики, так і з метою лікування атеросклерозу в експерименті призводить до зменшення патологічних змін в артеріях та судинах мікроциркуляторного русла, що супроводжується покращенням кровопостачання в вивчених органах і ремоделювання їх клітинних компонентів в напрямку структурно-функціональної нормалізації.

3. Отримані дані можуть слугувати експериментальним обґрунтуванням доцільності застосування гену аполіпопротеїну Е в клінічних випробовуваннях при відповідних патологічних станах.

Література

1. Коркушко О.В. Лишневакая В.Ю., Дужак Г.В. Возрастные особенности функционального состояния эндотелия микрососудов // Кровообіг та гемостаз. – 2007. – № 4. – С. 5–10.
2. Терещенко О.С. Крестор – нова ера в лікуванні атеросклерозу // Українська Медичинська Газета. – 2006. – № 5. – С. 28–29.
3. Кордюм В.А. Генотерапія атеросклерозу // Теоретична медицина. – 2004. – № 10, № 2. – С. 121.
4. Akishita M. Artherosclerosis and hyperlipidemia // JMAJ: Jap. Med. Assoc. J. – 2004. – 47, N 4. – P. 175–178.
5. Machlej R.W. Apolipoprotein E cholesterol transport protein with expanding role in cell biology // Science. – 1988. – 240, N 4852. – P. 622–630.

PISKUN R.P., BILOSHITSKA A.V., GRYNCHAK N.M., SHEVCHUK T.I., GORBATYUK S.M., PISKUN I.I., ROMASHKINA O.A., SAVYTSKA A.A.

*Vinnitskyi national medical university named after M.I. Pirogov,
Ukraine, 21018, Vinnitsya, Pirogova str., 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru*

GENE THERAPY, ITS PECULIARITIES AND THE EXPERIENCE OF ITS APPLICATION IN CASE OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

Aim. Defining the structural peculiarities of parenchyma as well as blood vessels of heart, liver, kidneys, lungs, thyroid gland in their norm, in condition of the designed pathology and in the case of its gene correction. Comparing the obtained results in order to evaluate the influence of the preventing effect as well as the medicinal one in the condition of Apo-E gene injection taking into account the morphological and functional changes of studied structures of organs. **Methods.** Modeling, macromorphometrical, histological, histochemical, micrometrical, electronic microscopic, biochemical and statistic methods. **Results.** Atherosclerosis was determined to reproduce the lipid spectrum changes of blood serum as well as the localized necrosis of the parenchyma's cell elements and the stroma's fibrosis as a result of the reduced arterial vessels capacity and due to the disfunction of the microvasculature. **Conclusions.** Preventive usage of Apo-E gene as well as its medicinal application in the condition of the experimental atherosclerosis results the reduced pathological changes in the arteries and in the vessels of the microvasculature, and it improves the blood supply in the organs which have been studied.

Key words: experimental atherosclerosis, gene therapy, morphology.