

Розповсюдження по органах та експресія гена *apoA-1* людини у складі введеної плазмідної ДНК *in vivo*

Ю. М. Гільчук, Д. М. Іродов, П. Л. Старокадомський, І. М. Пішель¹,
О. К. Топорова, С. М. Новікова¹, В. А. Кордюм

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут геронтології АМН України
Вул. Вишгородська, 67, Київ, 04114, Україна

jukoze1@yahoo.com

*Розробка засобів доставки генів у соматичні клітини є фундаментальною основою розвитку генної терапії. Необхідність створення нових, більш ефективних векторів і відповідних методів доставки векторів до цільових тканин є актуальною і в наш час. Складовою частиною оцінювання зазначених генотерапевтичних методів є аналіз розповсюдження векторних молекул у тканинах та експресії трансгену. У цій роботі вивчено перенесення плазмідної ДНК, яка містить ген *apoA-1* людини, в складі комплексів з поліетиленіміном у паренхіму печінки щурів і кролів. Досліджено експресію гена *apoA-1 in vivo*.*

Ключові слова: аполіпопротеїн А-1, поліетиленімін, експресія трансгену, розповсюдження трансгену.

Вступ. Одним із факторів, який сприяє розвитку атеросклерозу (АС) та ішемічної хвороби серця, є гіперхолестеринемія, пов'язана із збільшенням вмісту в плазмі або сироватці крові холестерину. Зворотний транспорт холестерину (з клітин судинного русла до печінки) відбувається у складі ліпопротеїдів високої густини (ЛПВГ), основним білком яких є аполіпопротеїн А-1 (АпоА-1). Дослідженнями на трансгенних та «нокаутованих» мишах [1] і трансгенних кролях [2] підтверджено захисну (антиатерогенну) роль АпоА-1 у розвитку експериментально індукованих атеросклеротичних пошкоджень аорти. При розробці підходів генної терапії АС виконано низку вдалих експериментів з пере-

несення гена *apoA-1* у складі рекомбінантних аденовірусних векторів експресії в клітинах мишей *in vivo* [3–5]. Однак через значний недолік аденовірусних векторів — імунну відповідь організму на введення вірусного вектора — розробка невірусних засобів доставки цільової ДНК продовжується. Невірусні методи доставки, засновані на використанні катіонних носіїв ДНК, мають меншу ефективність порівняно з вірусними векторами, але дозволяють неодноразово вводити препарат та не мають недоліків, властивих вірусним векторам [6].

Важливим завданням при створенні підходів до генотерапевтичної корекції певних захворювань є аналіз ефективності перенесення генів, дослідження розповсюдження векторних молекул у тканинах та експресії трансгена *in vivo*. Мета цієї роботи полягала у вивченні перенесення плазмідної ДНК,

© Ю. М. ГІЛЬЧУК, Д. М. ІРОДОВ, П. Л. СТАРОКАДОМСЬКИЙ,
І. М. ПІШЕЛЬ, О. К. ТОПОРОВА, С. М. НОВІКОВА,
В. А. КОРДЮМ, 2006

що містить ген *apoA-1* людини, у складі комплексів ДНК/поліетиленімін (ПЕІ) в паренхіму печінки щурів і кролів, а також у дослідженні розповсюдження цільового гена в організмі тварин та експресії гена *apoA-1 in vivo*.

Матеріали і методи. У роботі використано плазмиду *pTRapo* [7] і штаб *Escherichia coli* Sure2 (*mcrA/CB recB/C/J sbcC umuC uvrC hsdSMR*) («Stratagene», США). Плазмідну кДНК виділяли, як описано [8]. Тотальну ДНК з клітин одержували за допомогою набору реактивів Genomic DNA Purification kit («Fermentas», Литва).

Для досліджень використовували мишей лінії ICR (масою 27—28 г, віком 2,5 місяця), щурів лінії «Вістар» (масою 150—200 г) та кролів породи «Шиншила» (2500—3000 г), а також лінію клітин СПЕВ (клітини нирки ембріона свині), одержану з Російської колекції клітинних культур (Санкт-Петербург).

Введення плазмідної ДНК. Комплекси плазмідної ДНК та ПЕІ (розгалужений, 25 Да, «Aldrich», США) (ДНК/ПЕІ) в масовому еквіваленті 1:2 готували за методом, описаним у роботі [8]. Препарат ДНК/ПЕІ вводили ін'єкцією в паренхіму печінки: по 100 і 240 мкг ДНК щурам і кролям відповідно. Усі процедури з тваринами проводили згідно із загальноприйнятими правилами поводження з тваринами та із застосуванням анестезії.

ПЛР аналіз. Використано такі праймери:

Ap-f: 5'-TGAAAGCTGCGGTGCTGACCTTGG-3';
 Ap-r: 5'-ATCTCCTCCTGCCACTTCTTCTGG-3';
 Ap(n)-f: 5'-CGAGTGAAGGACCTG-3';
 Ap(n)-r: 5'-GGCTGCACCTTGGC-3';
 Ap(h-Rab)-f: 5'-TCTTCTCCCGCTCTGTG-3';
 Ap(h-Rab)-r: 5'-GCAGAGGAGGTGGTGA-3';
 Ap(h-PigRab)-f: 5'-TCACCTGGCTGCAATGA-3';
 Ap(h-PigRab)-r: 5'-TCCTTTGCAGGGGACAT-3'.

Послідовності праймерів розраховували з використанням програми Vector NTI. Праймери синтезовано фірмою «Синтол» (РФ).

Для проведення ПЛР використовували Таq-полімераза («Амплісенс», РФ). Загальний об'єм реакційної суміші складав 25 мкл. Для здійснення другого раунду ПЛР відбирали 5 мкл реакційної суміші. ПЛР проводили на приладі Biometra Personal Cycler (США). Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,0 %-му агарозному гелі і візуалізували за допомогою бромистого етидію.

ЗТ-ПЛР. ДНК/РНК з клітин тканин і крові

тварин виділяли за допомогою набору реактивів Рибозоль А («Амплісенс») відповідно до протоколів виробника. ДНК в пробах гідролізували дезоксирибонуклеазою I («Sigma», США). кДНК синтезували, використовуючи набір реактивів «Реверта L-100» фірми «Амплісенс». ЗТ-ПЛР здійснювали за допомогою пари праймерів Ap-f/Ap-r, як описано вище. Продукти ампліфікації розділяли електрофоретично в 1,5 %-му агарозному гелі.

Вестерн-блот-аналіз. Перед внесенням у гель до проб білків додавали сечовину до концентрації 4 М. Електрофорез білків здійснювали в 12 %-му поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію. Для імунодетекції білки з геля переносили на PVDF мембрану («Amersham Biosciences», Швеція). Вільні місця посадки мембрани блокували 3 %-м розчином знежиреного сухого молока. Мембрану інкубували впродовж 1 год з моноклональними антитілами проти ApoA-1 людини. На наступному етапі блот інкубували протягом 1 год з антитілами проти імуноглобулінів G кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому (P-RAM 1/1000, «ИМТЕК», РФ).

Імунні комплекси візуалізували методом посиленої хемілюмінесценції (ECL), як субстрат використано люмінол («Sigma») [8]. Для реєстрації хемілюмінесценції використовували рентгенівську плівку Retina XBM («Лізоформ», Україна). Отримані зображення сканували і проводили кількісну оцінку інтенсивності сигналів програмою Total Lab («Amersham Biosciences»). Стандартом молекулярної маси та концентрації слугував білок ApoA-1 людини («Sigma»).

Результати і обговорення. Аналіз розповсюдження плазмідної ДНК в організмі. Для дослідження наявності трансгену в ДНК клітин тварин використовують саузерн-блот-аналіз та різні види ПЛР. Завдяки високій чутливості ПЛР дозволяє виявляти цільові послідовності у мінімальній кількості, крім того, цей метод простий у застосуванні. У цій роботі ген *apoA-1* людини *in vivo* виявляли з використанням видоспецифічних праймерів.

Дизайн праймерів проводили за гомологією до відомих ДНК-послідовностей гена *apoA-1* людини (Gene Bank Acession N AY422952), миші (Gene Bank Acession N U79572), щура (Gene Bank Acession N J02597), кроля (Gene Bank Acession N X06659) та свині (Gene Bank Acession N L00626). Для аналізу цільового гена за присутності у пробі ДНК миші та щура розраховано дві пари прай-

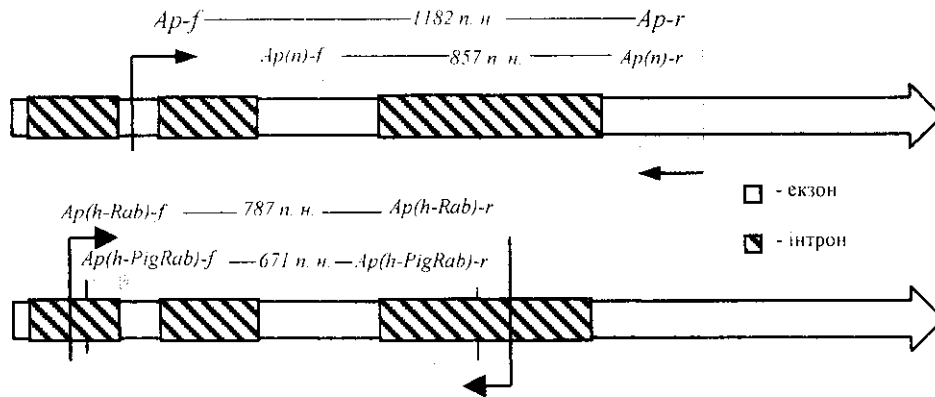


Рис. 1. Схема розташування праймерів на послідовності гена *apoA-1* людини

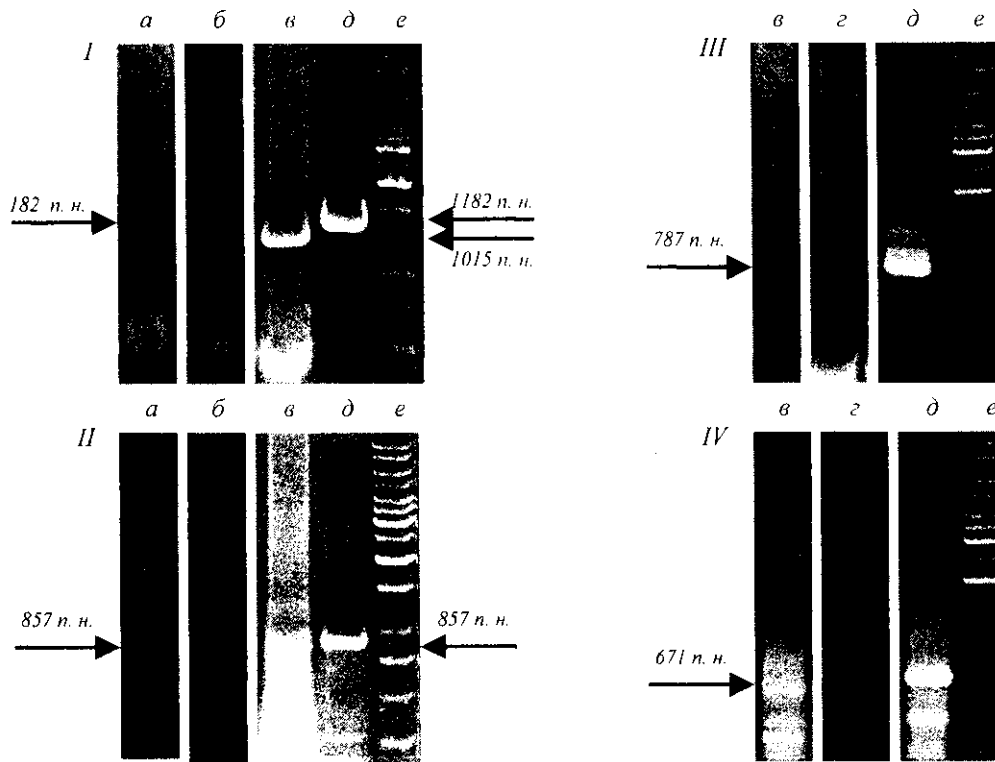


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР. Аналіз специфічності зв'язування праймерів: I — *Ap-f/Ap-r*; II — *Ap(n)-f/Ap(n)-r*; III — *Ap(h-Rab)-f/Ap(h-Rab)-r*; IV — *Ap(h-PigRab)-f/Ap(h-PigRab)-r* з цільовою ДНК (а — тотальна ДНК клітин печінки миші; б — щура; в — кроля; г — тотальна ДНК культури клітин СПЕВ; д — ДНК *pTKapo*; е — маркер молекулярної маси ДНК)

мерів: *Ap-f/Ap-r* та *Ap(n)-f/Ap(n)-r*, які відповідно специфічні до 2-го, 4-го та 3-го, 4-го екзонів гена *apoA-1* людини [9]. Для аналізу наявності трансгену за присутності у пробі ДНК кроля та свині через високу гомологію послідовностей екзонів гена людини та цих тварин (з використанням праймерів *Ap-f/Ap-r* на матриці *apoA-1* кроля синтезується амплікон розміром 1015 п. н.) застосовано дві інші пари праймерів: *Ap(h-Rab)-f/Ap(h-Rab)-r* та *Ap(h-PigRab)-f/Ap(h-PigRab)-r* (рис. 1), специфічні до інтронів 1 і 3 [9].

Для дослідження специфічності праймерів використовували плазмідну ДНК, яка містить ген *apoA-1* людини, тотальну ДНК, виділену з тканин

печінки миші, щура, кроля та культури клітин СПЕВ. Показано, що всі пари праймерів проявили специфічність до гена *apoA-1* людини і були неспецифічними до відповідного гена тварин (рис. 2).

Для детекції трансгену в тканинах підслідних тварин ми використали двостадійну ПЛР («nested» ПЛР), що дозволяє значно підвищити чутливість, а застосування внутрішньої пари праймерів забезпечує високу специфічність аналізу.

«Nested» ПЛР здійснено у двох варіантах з використанням наступних наборів праймерів:

1) *Ap-f/Ap-r* — зовнішня пара праймерів, *Ap(n)-f/Ap(n)-r* — внутрішня пара праймерів;

2) *Ap(h-Rab)-f/Ap(h-Rab)-r* — зовнішня пара

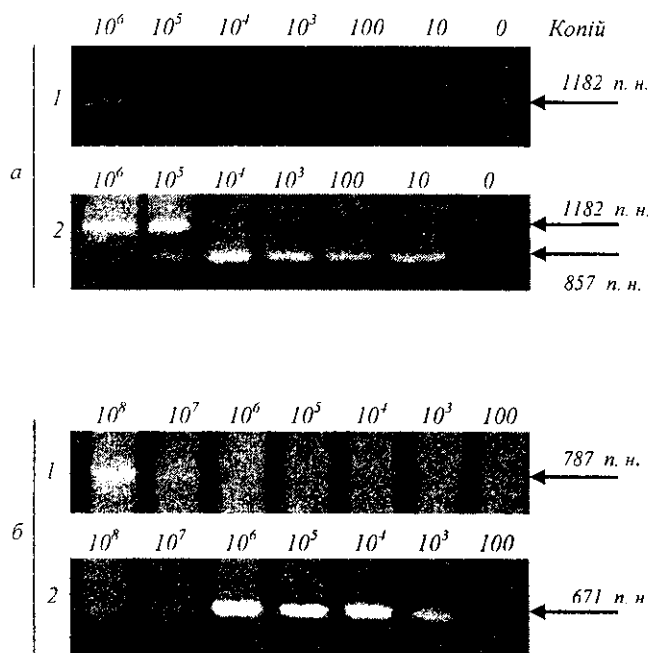


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР. Аналіз чутливості «nested» ПЛР з використанням пар праймерів: а — Ap-f/Ap-r та Ap(n)-f/Ap(n)-r; б — Ap(h-Rab)-f/Ap(h-Rab)-r та Ap(h-PigRab)-f/Ap(h-PigRab)-r (1 — перший раунд; 2 — другий раунд «nested» ПЛР)

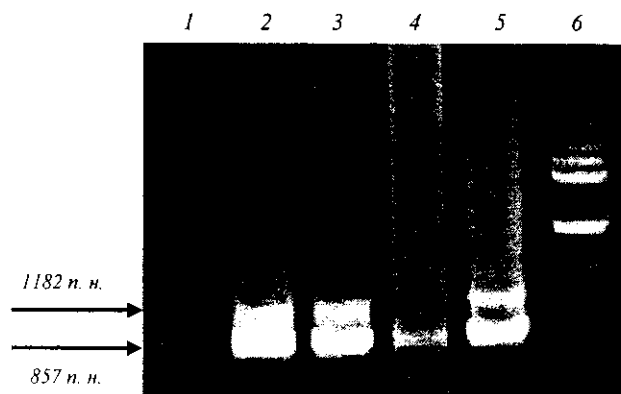


Рис. 4. Електрофореграма аналізу наявності трансгену у тотальній ДНК клітин печінки шурів методом ПЛР: 1 — тварина, якій не вводили ДНК/ПЕІ; 2–5 — тварини, яким ввели комплекси ДНК/ПЕІ; 6 — маркер молекулярної маси ДНК

праймерів, Ap(h-PigRab)-f/Ap(h-PigRab)-r — внутрішня пара праймерів.

Встановлено, що оптимальними умовами проведення ПЛР для пари Ap-f/Ap-r є такі температурні та часові режими: денатурація — 94 °С, 20 с; гібридизація з матрицею — 62 °С, 30 с; елонгація — 72 °С, 30 с, 30 циклів; для пари Ap(n)-f/Ap(n)-r: денатурація — 94 °С, 20 с; гібридизація з матрицею — 50 °С, 30 с; елонгація — 72 °С, 30 с,

30 циклів; для пари Ap(h-Rab)-f/Ap(h-Rab)-r: денатурація — 94 °С, 20 с; гібридизація з матрицею — 46 °С, 30 с; елонгація — 72 °С, 30 с, 30 циклів та для Ap(h-PigRab)-f/Ap(h-PigRab)-r: денатурація — 94 °С, 20 с; гібридизація з матрицею — 48 °С, 30 с; елонгація — 72 °С, 30 с, 30 циклів.

Чутливість методу ПЛР визначали, використовуючи як матрицю 500 нг тотальної ДНК тварин з додаванням різної кількості плазмиди *pTRapo*. Для праймерів Ap-f/Ap-r за вищевказаних умов чутливість ПЛР була достатньою при використанні ~10 пг плазмідної ДНК, що відповідає ~10⁹ копій цільового гена на реакцію. Це тоді, як після «nested» ПЛР з використанням у другому раунді реакції праймерів Ap(n)-f/Ap(n)-r чутливість була значно вищою, що відповідало ~10 копій гена на реакцію. Для двох інших пар праймерів чутливість методу визначалась використанням: у першому раунді з праймерами Ap(h-Rab)-f/Ap(h-Rab)-r — ~10⁷ копіями, «nested» ПЛР (другий раунд з праймерами Ap(h-PigRab)-f/Ap(h-PigRab)-r) — ~10³ копіями (рис. 3). Слід зазначити, що тотальну ДНК зазвичай виділяли з ~25 мг ліофілізованої тканини печінки, що відповідає приблизно 10⁷ клітин [10], при цьому отримували ~12,5 мкг тотальної ДНК. Таким чином, нами оптимізовано метод ПЛР для детекції гена *apoA-1* людини в тотальній ДНК таких тварин, як миша, шур, кроль і свиня.

За допомогою підібраних наборів праймерів було проведено ПЛР на наявність гена *apoA-1* людини у тканинах шурів і кролів. Аналіз тотальної ДНК клітин печінки шурів на 6-ту добу після введення плазмиди *pTRapo* виявив присутність трансгену (рис. 4), що свідчить про ефективність доставки плазмідної ДНК ін'єкцією *in vivo* у складі комплексів ПЕІ/ДНК. На 6-ту та 85-ту добу після введення генетичного матеріалу практично в усіх органах піддослідних тварин (кролів), тканини яких підлягали аналізу (печінка, серце, легені, нирки, лімфовузли), виявлено ген *apoA-1* людини (рис. 5). Цей результат може свідчити про нецільоспрямований характер перенесення ДНК і пояснюватися тим, що частина плазмідної ДНК, введеної у печінку, потрапляє з міжклітинною рідиною та лімфою або через капіляри з венозною кров'ю у кровотік та розповсюджується по організму. В нашому випадку важко визначити, чи потрапляє плазмідна ДНК у клітини тканин інших органів

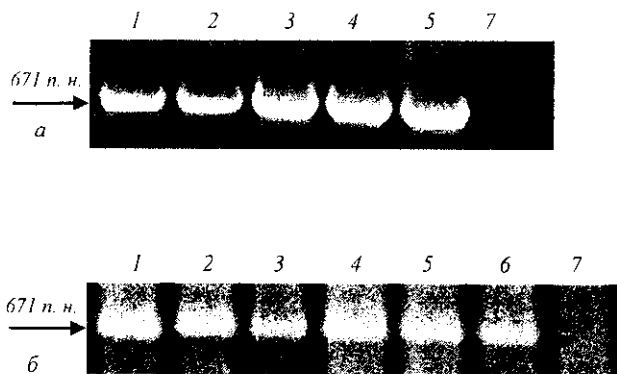


Рис. 5. Електрофореграма аналізу розповсюдження плазмідної ДНК по органах кролів методом ПЛР: 1 — лімфовузол; 2 — печінка; 3 — легені; 4 — серце; 5 — нирки; 6 — стінки аорти; 7 — печінка кроля, якому не вводили ДНК/ПЕІ (а — на 6-ту; б — 85-ту добу після введення комплексів ДНК/ПЕІ). Представлено типовий результат трьох незалежних експериментів

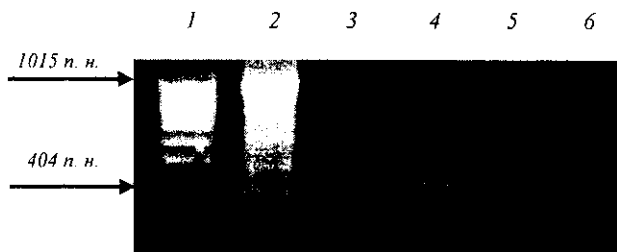


Рис. 6. Електрофореграма аналізу наявності мРНК *apoA-1* людини методом ЗТ-ПЛР: 1 — маркер молекулярної маси ДНК; 2—4 — зразки печінки кроля, якому вводили ДНК/ПЕІ; 5, 6 — зразки печінки кроля, якому не вводили ДНК/ПЕІ; 2 — ПЛР зразка ДНК/РНК, виділеного з клітин печінки кроля (аналіз успішності виділення РНК); 3, 5 — ПЛР обробленого ДНКазою зразка ДНК/РНК без проведення реакції зворотної транскрипції (аналіз ефективності обробки зразка ДНКазою); 4, 6 — ПЛР обробленого ДНКазою зразка ДНК/РНК після проведення реакції зворотної транскрипції (аналіз наявності специфічної мРНК). Представлено типовий результат трьох незалежних експериментів

(серце, легені, нирки, лімфовузли), або ж детектується лише плазміда, яка знаходиться з кров'ю в капілярах. Але, за даними літератури, при внутрішньовенному введенні ПЕІ/ДНК комплекси потрапляють та здатні забезпечувати експресію маркерних генів у клітинах таких органів, як серце, селезінка, печінка, нирки та в найбільшій мірі у клітинах бронхів та ендотелію судин легенів [11]. Збереження цільової ДНК у тканинах печінки кролів спостерігалось нами протягом не менше, як через 85 днів після введення плазмідної ДНК.

Аналіз експресії *ApoA-1* in vivo. Пари праймерів Ap-f/Ap-r та Ap(n)-f/Ap(n)-r, специфічних до екзонів гену *apoA-1* людини, можуть бути використані при проведенні для ЗТ-ПЛР для аналізу експресії трансгену не лише в клітинах печінки миші та щура, а й кроля. Це зумовлено тим, що транскрипція власного гену *apoA-1* кроля відбувається тільки в клітинах кишечника [12, 13]. У результаті ЗТ-ПЛР синтезується специфічний амплікон 404 п. н., що за розміром значно відрізняється від ампліконів, які утворюються на матриці генів *apoA-1* людини (1182 п. н.) та кроля (1015 п. н.) з використанням праймерів Ap-f/Ap-r. Аналіз тотальної РНК клітин печінки піддослідних кролів на 85-ту добу після введення *pTRapo* за допомогою ЗТ-ПЛР виявив наявність мРНК *apoA-1* людини (рис. 6).

Основними методами, які використовують для детекції білка АпоА-1 у плазмі крові трансгенних або трансформованих тварин, є ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA) або вестерн-блот-аналіз. Амінокислотна послідовність АпоА-1 досліджуваних тварин має високий ступінь гомології з АпоА-1 людини [14]. Той факт, що в плазмі крові тварин власний АпоА-1 знаходиться в достатньо високій концентрації, а молекулярна маса АпоА-1 різних видів майже не відрізняється, ще більше ускладнює аналіз.

Першим етапом роботи був підбір системи реагентів для імунохімічної детекції білка АпоА-1 людини в плазмі крові піддослідних кролів. Для цього використано вестерн-блот-аналіз та метод ELISA. Моноклональні антитіла проти АпоА-1 людини (3F10, в розведенні 1:300) («ICN Biomedicals, Inc.», США) та MGH Laa (в розведенні 1:500, «ИМТЕК») перевіряли на специфічність зв'язування з АпоА-1 людини за присутності білків плазми крові кролів, зокрема АпоА-1 кроля. Встановлено, що лише антитіла 3F10 придатні для досліджень, які коректно проводити тільки методом вестерн-блот-аналізу. Це зумовлено тим, що використані нами антитіла зв'язувались з компонентами плазми крові кролів. Таким чином, нами оптимізовано метод імунохімічної детекції АпоА-1 людини в плазмі кролів.

При дослідженні синтезу АпоА-1 людини *in vivo* піддослідні кролі було розділено на дві групи. Першій групі тварин вводили ген *apoA-1* людини у складі вектора *pTRapo*, другій (контрольній) — плазмиду *pTR*, що не містить цільового гену. На

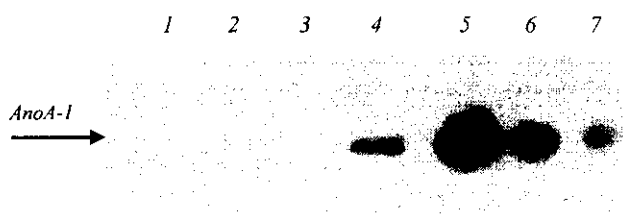


Рис. 7. Імуноблот-аналіз плазми крові кролів, яким вводили комплекси ДНК/ПЕІ з плазмідною: 1—3 — *pTR*; 5—7 — *pTRapo*; 4 — білок АпоА-1 людини (~1,7 нг). Кількість матеріалу, нанесеного на доріжки 1—3 та 5—7, відповідає 1,25 мкл плазми крові кролів

6-ту добу після ін'єкції в плазмі крові тварин першої групи методом вестерн-блот-аналізу детектовано білок АпоА-1 людини, тоді як у плазмі тварин контрольної групи його не виявлено (чутливість вестерн-блот-аналізу була достатньою при використанні ~670 нг білка людини/мл плазми крові тварини).

Після проведення кількісної оцінки експресії трансгена показано, що концентрація АпоА-1 людини в плазмі крові відрізнялась від тварини до тварини і становила 1,6—20,2 мкг/мл (рис. 7). Для порівняння, власний білок АпоА-1 людини кроля присутній у плазмі крові тварин у концентрації ~800 мкг/мл [2]. Такий рівень експресії трансгену можна пояснити особливостями вектора або/і недостатньою ефективністю трансфекції комплексами ДНК/ПЕІ для досягнення фізіологічного рівня синтезу білка, а також, можливо, меншим часом напівжиття АпоА-1 людини порівняно з АпоА-1 кроля в крові цієї тварини. З іншого боку, даний підхід може виявитися перспективним для вивчення терапевтичних ефектів, зумовлених введенням таких комплексів за подальшої оптимізації методу.

Висновки. Аналіз наявності цільового гена та синтезу мРНК у тканинах піддослідних тварин з використанням запропонованих праймерів та умов проведення ПЛР та ЗТ-ПЛР є адекватним щодо поставленої задачі і може бути використаний для дослідження перенесення, розповсюдження та експресії трансгену *in vivo*.

Одержані результати з вивчення тривалості збереження введеної плазмідної *pTRapo* та її розповсюдження в органах піддослідних тварин свідчать про успішне перенесення цільової ДНК при ін'єкції комплексів ДНК/ПЕІ в паренхіму печінки, збереження трансгену в клітинах печінки кролів та синтез мРНК цільового гена впродовж щонайменше 85 діб після введення плазмідної. Оптимізовано

імунохімічний метод детекції білка АпоА-1 людини в плазмі крові кролів, що дозволяє детектувати не менш ніж 670 нг АпоА-1 людини в 1 мл плазми.

За результатами дослідження плазми крові кролів, яким вводили *pTRapo*, показано експресію *apoA-1* людини.

Yu. M. Gilchuk, D. M. Irodov, P. L. Starokadomskyy, I. M. Pishel, O. K. Toporova, S. M. Novikova, V. A. Kordium

The distribution of injected plasmid DNA throughout the organs and the expression of human *apoA-1* gene *in vivo*

Summary

The elaboration of methods of gene delivery into somatic cells is the foundation of gene therapy development. There is necessity to develop new and more effective vectors as well as corresponding methods of gene delivery into the target tissues. The analysis of distribution of vector molecules in tissues and transgene expression are the constituent parts of evaluation of effectiveness of gene therapy methods for a target gene delivery. The study on the transfer of the plasmid DNA, containing human *apoA-1* gene, in complex with polyethylenimine (PEI) into rat and rabbit liver parenchyma has been performed. The expression of human *apoA-1* gene *in vivo* has been examined.

Keywords: apolipoprotein A-1, polyethylenimine, transgene expression, transgene distribution.

Ю. Н. Гильчук, Д. М. Иродов, П. Л. Старокадомский, И. Н. Пишель, Е. К. Топорова, С. Н. Новикова, В. А. Кордюм

Распространение по органам введенной плазмидной ДНК и экспрессия гена *apoA-1* человека *in vivo*

Резюме

Разработка способов доставки генов в соматические клетки является фундаментальной основой развития генной терапии. Необходимость создания новых, более эффективных векторов и соответствующих методов доставки векторов в целевые ткани актуальна и в настоящее время. Анализ распределения векторных молекул в тканях и экспрессия трансгена являются составной частью оценки эффективности генотерапевтических методов доставки целевых генов. В данной работе изучен перенос плазмидной ДНК, содержащей ген *apoA-1* человека, в составе комплексов с полиэтиленимином в паренхиме печени крыс и кроликов. Исследована экспрессия гена *apoA-1* *in vivo*.

Ключевые слова: аполипопротеин А-1, полиэтиленимин, экспрессия трансгена, распределение трансгена.

PERELIK LITERATURY

- Rubin E. M., Ishida B. Y., Clift S. M., Krauss R. M. Expression of human apolipoprotein A-1 in transgenic mice results in reduced plasma levels of murine apolipoprotein A-1 and the appearance of two new high density lipoprotein size subclasses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 434—438.
- Duverterger N., Kruth H., Emmanuel F., Caillaud J.-M., Viglietta C., Castro G., Tailleux A., Fievet C., Fruchart J. C., Houdebine L. M., Deneffe P. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-1-transgenic rabbits // Circulation.—1996.—94.—P. 713—717.

3. Belalcazar L. V., Merched A., Carr B., Oka K., Chen K.-H., Pastore L., Beaudet A., Chan L. Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia // *Circulation*.—2003.—107.—P. 2726—2732.
4. Linthout S. V., Collen D., De Geest B. Effect of promoters and enhancers on expression, transgene DNA persistence, and hepatotoxicity after adenoviral gene transfer of human apolipoprotein A-I // *Hum. Gene Ther.*—2002.—13.—P. 829—840.
5. Benoit P., Emmanuel F., Caillaud J. M., Bassinet L., Castro G., Gallix P., Fruchart J. C., Branellec D., Deneffe P., Duverger N. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models // *Circulation*.—1999.—99.—P. 105—110.
6. Богданенко Е. В., Свиридов Ю. В., Московцев А. А., Жданов Р. И. Невирусный перенос генов *in vivo* в генной терапии // *Вопр. мед. химии*.—2000.—46, № 3.—С. 226—246.
7. Топорова Е. К., Новикова С. Н., Лихачева Л. И., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Козел Ю. Н., Иродов Д. М., Кордюм В. А. Невирусная доставка гена *apoA-1* человека в клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo* // *Биополімери і клітина*.—2004.—20, № 1—2.—С. 25—32.
8. Гільчук Ю. М., Сухорада О. М., Рубан Т. А., Топорова Е. К., Кордюм В. А. Вивчення транзиторної експресії гена *apoA-1* людини під регуляцією різних гібридних послідовностей у клітинах СНОК1 // *Биополімери і клітина*.—2006.—22, № 3.—С. 210—217.
9. Breslow J. L. Apolipoprotein genetic variation and human disease // *Physiol. Rev.*—1988.—68.—P. 85—132.
10. Гулак П. В., Дудченко А. М., Зайцев В. В., Лукьянова Л. Д., Новиков К. Н., Орлов С. Н., Покудин Н. И., Попова О. А., Уголев А. Т. Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства.—М.: Наука, 1985.—270 с.
11. Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Gopferich A. Polyethyleneimine-based non-viral gene delivery systems // *Eur. J. Pharm. Biopharm.*—2005.—60.—P. 247—266.
12. Chao Y., Yamin T., Thompson G. M., Kroon P. A. Tissue-specific expression of genes encoding apolipoprotein E and AI in rabbits // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 5306—5309.
13. Pan T., Hao Q., Yamin T., Dai P., Chen B., Chen S., Kroonand P. A., Chao Y. Rabbit apolipoprotein A-I mRNA and gene: evidence that rabbit apolipoprotein A-I is synthesized in the intestine but not in the liver // *Eur. J. Biochem.*—1987.—170.—P. 99—104.
14. Frank P. G., Marcel Y. L. Apolipoprotein A-1: structure-function relationships // *J. Lipid Res.*—2000.—41.—P. 853—872.

УДК 577.213.3 + 577.215 + 577.217
Надійшла до редакції 18.09.06