

Вплив введення трансгену аполіпопротеїну А-1 людини на рівень холестерину та морфологію тканин у кролів, яких утримували на холестериновій дієті

Ю. М. Гільчук, О. К. Топорова, С. М. Новікова¹, В. А. Кордюм

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

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

jukozel@yahoo.com

Показано, що повторні ін'єкції плазмідної ДНК, що містить ген аполіпопротеїну А-1 (apoA-1) людини, у комплексі з поліетиленіміном в паренхіму печінки кролів, яких утримували на холестериновій дієті, впливають на рівень холестерину в крові тварин і стан тканин печінки та судин. Так, у піддослідних тварин, яким вводили ген apoA-1, не виявлено зростання рівня тотального холестерину в крові та патоморфологічних змін тканин печінки і аорти, характерних для індукованого холестериновою дієтою атеросклерозу. Одержані дані свідчать про те, що введення гена apoA-1 людини може запобігати розвитку експериментального атеросклерозу.

Ключові слова: аполіпопротеїн А-1, атеросклероз, трансген.

Вступ. Одним із факторів, який сприяє розвитку атеросклерозу, є підвищений рівень холестерину (ХС) в крові [1]. Транспорт ХС у клітини здійснюється в організмі ліпопротеїдами низької (ЛПНГ) та дуже низької густини (ЛПДНГ), а так званий зворотний транспорт ХС забезпечується ліпопротеїдами високої густини (ЛПВГ) [2]. Важливу антиатерогенну роль ЛПВГ підтверджено великою кількістю епідеміологічних досліджень [3–6]. Концентрація холестерину у складі ЛПВГ (ЛПВГ-ХС) має діагностичне значення при дослідженні порушень метаболізму ліпопротеїдів, її враховують при обрахунку коефіцієнта атерогенності ($K_{ХС}$):

$$K_{ХС} = (ХС_{заг} - ЛПВГ-ХС) / ЛПВГ-ХС.$$

Виходячи з цього перспективною виглядає спроба збільшення рівня ЛПВГ у плазмі крові лю-

дей з гіперхолестеринемією для зниження ризику розвитку атеросклерозу.

Основною білковою складовою ЛПВГ є аполіпопротеїн А-1 (АпоА-1) (70 %) [7]. Концентрація останнього прямо корелює з рівнем ЛПВГ-ХС. Для людей описано випадки дефекту гена *apoA-1* (дефіцит АпоА-1), що спричинює відсутність синтезу цього білка [8]. У плазмі крові таких людей концентрація ЛПВГ-ХС становить ~1 мг/дл при нормі більш ніж 35 мг/дл [9]. У деяких дослідженнях показано, що ін'єкція ендogenousного білка АпоА-1 викликає зростання вмісту ЛПВГ у крові людей [10] і кролів та запобігає розвитку індукованого холестериновою дієтою атеросклерозу у кролів [11].

З результатів експериментів на трансгенних тваринах відомо, що АпоА-1 людини здатний ефективно виконувати властиві ендogenousному білку функції в організмі тварин [12]. У роботах з вико-

ристанням нокаутованих за геном *anoE* [13–15] або рецептора ЛПНГ мишей [16, 17] і трансгенних кролів [1] показано захисний (антиатерогенний) ефект експресії трансгену *anoA-1* людини.

Синтез АпоА-1 людини клітинами кролів *in vivo* (1,6–20 мкг/мл) виявлено нами при введенні гена *anoA-1* у складі комплексів плазмідна ДНК/поліетиленімін (ПЕІ) в паренхіму печінки [19]. Важливим завданням при розробці підходів генно-терапевтичної корекції захворювань є вивчення терапевтичного ефекту, обумовленого експресією трансгену. Тому метою цієї роботи було дослідження впливу трансгену *anoA-1* людини, введеного у складі комплексів плазмідна ДНК/ПЕІ в паренхіму печінки кролів, яких утримували на холестериновій дієті, на рівень холестерину в крові та морфологію тканин органів тварин.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували кролів породи «Шиншила» масою 2500–3000 г.

Плазмідну ДНК виділяли, як описано в роботі [19]. Перенесення плазмідної ДНК у клітини ссавців здійснювали за допомогою катіонного полімеру – розгалуженого ПЕІ (25 кДа, «Aldrich», США). Комплекси плазмідної ДНК та ПЕІ готували за методом, описаним в роботі [19]. Препарат ДНК/ПЕІ ін'єктували в паренхіму печінки кролів у дозі 240 мкг ДНК на тварину. Всі процедури з тваринами проводили згідно з загальноприйнятими міжнародними правилами поводження з тваринами із використанням анестезуючих препаратів.

Після введення плазмідної ДНК тварин утримували на холестериновій дієті: кожен день їм орально вводили холестерин (1,5 %-й розчин ХС в розчинній олії) з розрахунку 1 мг ХС на 1 кг маси.

Концентрацію тотального ХС у плазмі крові тварин визначали за допомогою набору реактивів фірм «Sentinel Diagnostics» (Італія) та «Elitech Diagnostics» (Франція) на фотометрі 5010 («Boehringer Mannheim», Німеччина), застосовуючи контрольну сироватку крові («Sentinel Diagnostics»).

Препарати тканин органів кролів готували згідно з методами, описаними в роботі [21]. Зразки тканин фіксували 10 %-м розчином нейтрального формаліну та заливали в парафін. Зрізи тканин фарбували розчинами гематоксиліну та еозину

[21]. Для дослідження препаратів використовували мікроскоп МЛ-2 (ЛОМО, РФ). При проведенні морфологічного аналізу для кожної тварини піддослідної та контрольної груп готували по 10–16 зрізів тканин.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0.

Результати і обговорення. Очікуваний терапевтичний ефект від введення трансгену *anoA-1* людини *in vivo* вивчали на експериментальній моделі атеросклерозу, яку ініціювали, утримуючи кролів на холестериновій дієті. При дослідженні прогнозованого терапевтичного ефекту корекції дефіциту АпоА-1 за рахунок введення рекомбінантних векторів, що містять трансген *anoA-1* людини, використовують також мишей, нокаутованих за геном *anoE* [13–15], або рецептор ЛПНГ [16, 17]. Однак відомо, що метаболізм ліпопротеїдів кролів більше подібний до такого людини порівняно з метаболізмом мишей і щурів [22]. Це робить саме кролів найпридатнішою моделлю для аналізу ефекту експресії трансгенів людини на розвиток атеросклерозу [23]. За даними літератури, при утриманні кролів на холестериновій дієті вже на другому тижні спостерігається зростання вмісту холестерину в крові піддослідних тварин, і таке зростання продовжується щонайменше 4 місяці [24]. Перебування тварин на дієті призводить до гістологічних і морфологічних змін тканин органів, зокрема, печінки, легенів, нирок, серця, стінок судин та ін. [24]. Гістологічні атеросклеротичні зміни печінки, яка відіграє ключову роль у метаболізмі ліпідів, починають проявлятися вже через декілька тижнів після початку введення холестерину та передують пошкодженню інших органів і ліпоїдозу аорти, а з моменту появи останнього розвиваються паралельно з ним.

Виходячи з вищезазначеного аналіз впливу синтезу АпоА-1 людини *in vivo* на розвиток експериментального атеросклерозу проводили комплексно, здійснюючи патоморфологічне дослідження тканин печінки, стінки аорти та визначаючи вміст тотального ХС у крові кролів.

Тварин розділили на дві групи. Кролям першої групи (піддослідна) ($n = 4$) вводили ген *anoA-1* людини у складі плазміді *pTRapo* тричі з інтервалом в

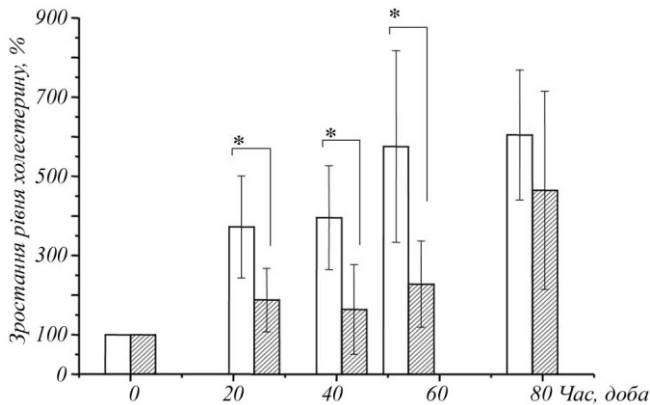


Рис. 1. Порівняння зростання рівня холестерину в плазмі крові кролів, яких утримували на холестериновій дієті: 1 – контрольна група ($n = 4$), якій вводили плазмиду *pTR*; 2 – піддослідна група ($n = 4$), якій вводили плазмиду *pTRapo*. Статистичний аналіз проводили за допомогою непараметричного критерію Манн-Уїтні (U); * $p < 0,05$ (Mean \pm SD)

місяць. Для нівелювання впливу на рівень тотального холестерину самого факту введення плазмідної ДНК у складі комплексів з ПЕІ, ми ін'єктували препарат *pTR/ПЕІ* тваринам другої (контрольної, $n = 4$) групи тварин. Після першого введення плазмідної ДНК всіх кролів утримували на холестериновій дієті. Для аналізу концентрації тотального холестерину кров у тварин відбирали на шосту добу (вранці) після кожного введення препарату плазмідної ДНК. На шосту добу після останньої (третьої) ін'єкції препарату плазмідної ДНК тварин забивали і відбирали зразки тканин печінки та аорти для патоморфологічного аналізу.

У попередній статті [25], де описано результати введення плазмиди *pTRapo* кролям з експериментальним атеросклерозом, нами зроблено аналіз як тотального холестерину, так і ЛПВГ-ХС, а також визначено коефіцієнт атерогенності. За результатами зазначеного дослідження, значне зростання тотального холестерину в контрольній групі тварин відбувалося через підвищення вмісту (ЛПНГ-ХС + ЛПДНГ-ХС). Тому в даному експерименті ми проаналізували зростання рівня лише тотального холестерину в плазмі крові тварин. Оскільки вибірка тварин була невеликою, статистичну обробку даних ми здійснили за допомогою непараметричного критерію Манн-Уїтні (U) та виявили достовірні розбіжності між контрольною та

піддослідною групою тварин (рис. 1). В результаті аналізу вмісту холестерину в крові тварин, повторювані введення терапевтичного гена *apoA-1* людини запобігають зростанню тотального рівня холестерину в крові кролів упродовж 50 діб.

Аналіз тільки вмісту тотального холестерину в крові є недостатнім для висновку щодо впливу введення трансгену на запобігання розвитку атеросклерозу, саме тому ми провели і морфологічне дослідження тканин органів кролів. Результати останнього виявили, що в двох з чотирьох кролів контрольної групи знайдено потовщення інтими в районі дуги аорти (рис. 2, див. уклейку). У тканинах печінки тварин контрольної групи визначено інфільтрацію ліпідами різного ступеню в центральних та периферичних зонах печінки. У той же час аналіз тканин кролів, яким вводили плазмиду *pTRapo*, не виявив атеросклеротичних змін аорти, а зміни в тканинах печінки, незважаючи на певну індивідуальну варіабельність, зустрічалися рідше.

Таким чином, результати морфологічного аналізу тканин підтверджують дані, отримані при вивченні вмісту тотального холестерину, і разом можуть бути свідченням позитивного (антиатерогенного) ефекту введення трансгену *apoA-1* людини при індукованому дієтою атеросклерозі у кролів.

Висновки. Введення гена *apoA-1* людини у складі комплексів плазмідна ДНК/ПЕІ в паренхіму печінки кролів може запобігати розвитку експериментального атеросклерозу.

Iu. M. Gilchuk, O. K. Toporova, S. M. Novikova, V. A. Kordium

Influence of human apolipoprotein A-1 transgene injection on level of cholesterol and morphology of tissues of rabbits on cholesterol diet

Summary

It has been shown that repetitive injection of plasmid DNA, containing human apolipoprotein A-1 (apoA-1) gene, in the complex with polyethylenimine into the liver parenchyma of cholesterol-rich diet rabbits influenced cholesterol concentration in animal blood and liver and morphology of vessel tissues. Thus, apoA-1 injected animals were shown not to reveal the increase in total cholesterol concentration in blood and morphology alteration of liver and vessel tissues, specific for atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. The data obtained reveal that human apoA-1 transgene injection might suppress experimental atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.

Keywords: apolipoprotein A-1, atherosclerosis, transgene.

Ю. Н. Гильчук, Е. К. Топорова, С. Н. Новикова, В. А. Кордюм

Влияние введения трансгена аполипопротеина А-1 человека на уровень холестерина и морфологию тканей у кроликов, содержащихся на холестериновой диете

Резюме

Показано, что повторные инъекции плазмидной ДНК, включающей ген аполипопротеина А-1 (apoA-1) человека, в комплексе с полиэтиленгликолем в паренхиму печени кроликов, содержащихся на холестериновой диете, влияют на уровень тотального холестерина в крови животных и состояние тканей печени и сосудов. Так, у исследуемых животных, которым вводили ген apoA-1, не выявлено увеличения уровня тотального холестерина в крови и патоморфологических изменений тканей печени и аорты, характерных для индуцированного холестериновой диетой атеросклероза. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение гена apoA-1 человека может предупреждать развитие экспериментального атеросклероза.

Ключевые слова: аполипопротеин А-1, атеросклероз, трансген.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kruth H. S. Lipoprotein cholesterol and atherosclerosis // *Curr. Mol. Med.*—2001.—**1**, N 6.—P. 633–653.
2. Von Eckardstein A., Nofer J. R., Assmann G. High density lipoproteins and atherosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*—2001.—**21**, N 1.—P. 13–27.
3. Gordon D. J., Rifkind B. M. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies // *N. Engl. J. Med.*—1989.—**321**, N 19.—P. 1311–1316.
4. Castelli W. P., Anderson K., Wilson P. W., Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease: The framingham study // *Ann. Epidemiol.*—1992.—**2**.—P. 23–28.
5. Criqui M. H. Epidemiology of atherosclerosis: an updated overview // *Amer. J. Cardiol.*—1986.—**57**, N 5.—P. 18C–23C.
6. Zemel P. C., Sowers J. R. Relation between lipids and atherosclerosis: epidemiologic evidence and clinical implications // *Amer. J. Cardiol.*—1990.—**66**, N 21.—P. 71–121.
7. Frank P. G., Marcel Y. L. Apolipoprotein A-I: structure–function relationships // *J. Lipid Res.*—2000.—**41**, N 6.—P. 853–872.
8. Schaefer E. J., Heaton W. H., Wetzel M. G., Brewer H. B., Jr. Plasma apolipoprotein A-1 absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease // *Arteriosclerosis.*—1982.—**2**, N 1.—P. 16–26.
9. *Норма в медицинской практике: Справочное пособие / Сост.: В. А. Милягин.*—М.: МЕДпресс-информ, 2006.—144 с.
10. Nanjee M. N., Crouse J. R., King J. M., Hovorka R., Rees S. E., Carson E. R., Morgenthaler J. J., Lerch P., Miller N. E. Effects of intravenous infusion of lipid-free ApoA-1 in humans // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*—1996.—**16**, N 9.—P. 1203–1214.
11. Miyazaki A., Sakuma S., Morikawa W., Takiue T., Miake F., Terano T., Sakai M., Hakamata H., Sakamoto Y., Naito M., Ruan Y., Takahashi K., Ohta T., Horiuchi S. Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression

- of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*—1995.—**15**, N 11.—P. 1882–1888.
12. Brousseau M. E., Hoeg J. M. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research // *J. Lipid Res.*—1999.—**40**, N 3.—P. 365–375.
 13. Plump A., Scott C., Breslow J. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—**91**, N 20.—P. 9607–9611.
 14. Paszty C., Maeda N., Verstuyft J., Rubin E. M. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice // *J. Clin. Invest.*—1994.—**94**, N 2.—P. 899–903.
 15. Geest D. B., Zhao Z., Collen D., Holvoet P. Effects of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer on neointima formation after endothelial denudation in apo E-deficient mice // *Circulation.*—1997.—**96**, N 12.—P. 4349–4356.
 16. 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.
 17. Belalcazar L. M., 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**, N 21.—P. 2726–2732.
 18. Duverger 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-I-transgenic rabbits // *Circulation.*—1996.—**94**, N 4.—P. 713–717.
 19. Гильчук Ю. М., Іродов Д. М., Старокадомський П. Л., Пішель І. М., Топорова О. К., Новікова С. М., Кордюм В. А. Розповсюдження по органах та експресія гена apoA-1 людини у складі введеної плазмідної ДНК *in vivo* // Біополімери і клітина.—2006.—**22**, № 6.—С. 439–445.
 20. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—625 p.
 21. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Пер. с англ.—М.: Мир, 1969.—645 с.
 22. Moghadsian M. N., frohlich J. J., McManus B. M. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis // *Lab. Invest.*—2001.—**81**, N 9.—P. 1173–1183.
 23. Мясников А. Л. Атеросклероз.—М.: Медгиз, 1960.—443 с.
 24. Циццядзе К. И. Течение экспериментального атеросклероза у молодых, зрелых и старых кроликов // Тематический сб.: Геронтология и гериатрия.—Тбилиси, 1981.—С. 65–73.
 25. Новікова С. М., Топорова О. К., Ліхачова Л. І., Козел Ю. М., Кордюм В. А. Уведення та експресія гена apoA-1 людини в клітинах печінки кролів з експериментальним атеросклерозом // Буковин. мед. вісн.—2005.—**9**, № 2.—С. 175–177.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 23.10.07