

Genotypic frequencies for 23 SNPs of *OAS*-genes were estimated in samples of the nonimmunized tick-borne encephalitis patients with different clinical manifestations. Statistically significant differences of genotype frequencies for 5 *OAS3* and *OAS2* gene SNPs between patients with severe and mild forms of the disease were detected; we suggest that these SNPs may influence on the susceptibility to tick-borne encephalitis virus at Russians.

**БЛОШИЦЬКА А.В.,¹ ПІСКУН Р.П.,¹ ГОРБАТЮК С.М.,¹ МРИХ Н.М.,¹
БЛОШИЦЬКИЙ В.В.,² ПІСКУН І.І.,¹ РОМАШКІНА О.А.,¹ ЦИБА Л.О.,³ ШЕВЧУК
Т.І.¹**

*1- Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова
Україна, 21018, Вінниця, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru*

2- Інститут нейрохірургії АМН України

*3- Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150*

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

Загальновідомий тісний взаємозв'язок між розвитком серцево-судинних розладів, дисліпідемій і проявами змін у внутрішніх органах. Так, дисліпідемії та атеросклероз є важливими етіологічними факторами порушення мозкового кровотоку та причиною виникнення інсульту [2;7]; атеросклероз – ключовий елемент в розвитку ішемічної хвороби серця і окклюзивних захворювань судин, що є причиною порушення коронарного кровообігу та виникнення інфаркту міокарда [1;5]; дисліпідемії часто зустрічаються у хворих хронічною нирковою недостатністю, а ліпідний профіль сироватки крові в значній мірі залежить від рівня клубочкової фільтрації і ступеня протеїнурії [4]; ожиріння, артеріальна гіпертензія і дисліпідемії проявляються неалкогольною жировою хворобою печінки і в даний час розглядаються як печінкова маніфестація метаболічного синдрому [10]; дисліпідемія викликає ендотеліальну дисфункцію, що погіршує обмінні процеси в щитоподібній залозі, що проявляється зниженням її функціональної активності [11]. Профілактика атеросклерозу входить в загальнодержавні медичні рекомендації більшості країн, а програмою корекції дисліпідемій, прийнятою ВООЗ, керується весь світ. До арсеналу терапії дисліпідемій відносяться препарати різних фармакологічних груп: ентеросорбенти, статини, фібрати, похідні ксантинів тощо, але, на жаль, жоден з них не задовольняє потреби практичної медицини, бо кожен діє лише на одну певну ланку патогенезу дисліпідемій та атеросклерозу. При прояві клінічних ознак атеросклерозу можна загальмувати його прогресування, а в деяких випадках, і викликати зворотній розвиток атеросклеротичних змін. Для цього використовують засоби, які знижують вміст холестерину ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) і підвищують рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) сироватки крові.

Відомо, що атеросклероз відноситься до мультифакторіальної патології, до розвитку якої, поряд з впливом навколишнього середовища, призводить спадковість. Ось чому чисельні клінічні та експериментальні способи профілактики та лікування цієї хвороби при використанні фармакологічних препаратів, що знижують рівень холестеролу, тригліцеридів та ЛПНЩ у крові, виявили, що це лише тимчасовий ефект - тільки під час прийому ліків [9]. В той же час немає надійних засобів, що збільшували б рівень антиатерогенних ЛПВЩ [3].

Результати великої кількості популяційних, клінічних та експериментальних досліджень свідчать, що існує зв'язок між наявністю мутацій окремих генів та порушеннями ліпідного обміну. Завдяки успіхам молекулярної біології було доведено, що однією з причин порушень ліпопротеїдного обміну є мутації гена Апо-Е – гена головного

білка ЛПВЩ [6], які мають антиатеросклеротичні функції. Аполіпопротеїн Е – одноланцюговий білок, що складається з 299 амінокислотних залишків. Апо-Е входить до складу різноманітних класів ліпопротеїнів плазми. Апо-Е відіграє важливу роль в метаболізмі, транспорті та регуляції рівня холестеролу та тригліцеридів. Попередник Апо-Е підлягає внутрішньоклітинному протеолізу і глікозилюванню (сіалізації), а також позаклітинній десіалізації. Наслідком цих постраселяційних змін є утворення головної асіало-форми Апо-Е протеїну, яка циркулює в плазмі у складі ліпопротеїнових комплексів. В складі ліпопротеїнів, що містять високі рівні тригліцеридів, таких як ЛПНЩ та хіломікрони, Апо-Е виконує функцію ліганда, що забезпечує ефективне зв'язування ліпопротеїнів з рецепторами та захоплення клітинами печінки, внаслідок чого досягається видалення надлишку тригліцеридів з плазми. Результати досліджень вказують на значення цього білка в регуляції синтезу ЛПДНЩ-тригліцеридів в печінці [8]. Головне місце синтезу Апо-Е – печінка.

Метою нашого дослідження стало встановлення особливостей змін структури і функції серця, щитоподібної залози, печінки і нирок при експериментальному атеросклерозі під впливом генної терапії направленої на експресію гена Апо-Е.

Матеріал та методи

Експеримент проводився на білих лабораторних щурах-самцях з вихідною масою тіла 150-170 грамів, які утримувались на стандартному раціоні в умовах науково-експериментальної клініки ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Щурі були розділені на три групи: перша – інтактні, друга – тварини, яким моделювався атеросклероз, третя – щурі, яким з профілактичною метою в перший день моделювання атеросклерозу вводили ген апо-Е. Атеросклероз моделювався за методом Анічкова, шляхом згодовування щурам холестеролу в дозі 0,5г на кг з соняшниковою олією протягом 30 діб. По закінченню досліду евтаназію тваринам проводили під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Після розтину тіла кров для біохімічного дослідження забирали з черевної аорти, а щитоподібна залоза, серце, печінка і нирки забирались для морфологічного дослідження. Макрометричні параметри нирки (довжина, ширина, товщина) та воріт (висота, ширина) вимірювались за допомогою штангенциркуля. В серці вимірювали наступні макроморфометричні показники: абсолютну масу правого (ПШ) і лівого (ЛШ) шлуночків, площу стінок ЛШ і ПШ, а також площу правої та лівої стінок міжшлуночкової перегородки (МШП). Крім того розраховували планіметричний індекс, питому вагу міокарда ЛШ і ПШ, індекс питомої ваги, індекс Фултона, шлуночковий індекс. Проводились розрахунки індексів всіх органів.

Створення векторних конструкцій для генної терапії

В роботі були використані кДНК гена Апо-Е людини, субклонована в вектор pUC18, представлена професором G.Dickson і дослідником T.Athanasopoulos (факультет біохімії Королівського Лондонського університету, Великобританія) і вектор pCMV•SPORT6 («Invitrogen», США), який має цитомегаловірусний промотор і сигнал поліаденілування SV40, що дозволяє експресувати клоновану в ньому послідовність ДНК в еукаріотичних клітинах. кДНК гена Апо-Е переклонували у вектор pCMV•SPORT6, по сайтах рестриктаз SmaI і Sall, вектор обробляли рестриктазами HindIII і Sall, при цьому кінці ДНК після обробки рестриктазою HindIII затуплювали за допомогою фрагмента Кленова. Отриману конструкцію pCMV•SPORT6-Апо-Е виділяли в препаративних кількостях методом лужного лізису, використовуючи реактиви і колонки тір 500 фірми «Qiagen» (США).

Оцінка ефективності трансфекції

Ефективність трансфекції оцінювалась із застосуванням методу зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) в зразках тканини печінки, отриманих на 10 добу експерименту. Оскільки RT-PCR являється методом діагностики наявності відповідної мРНК, а присутність мРНК відображає експресію відповідного гена, то по наявності в тканині печінки Апо-Е-мРНК можна оцінити

ефективність його експресії в клітинах печінки перенесеного вектором гена аполіпротеїну Е. Підбір праймерів для ампліфікації гена, якого вивчали, проводився з обліком їх видової унікальності, тобто при забезпеченні мінімального співпадання послідовності ДНК людини і щура на ділянці гена, якого вивчали. Аполіпопротеїни людини і щура відрізняються послідовністю з приблизно 30% амінокислот з карбоксильного кінця. Нуклеотидні послідовності відповідної ділянки людського гена Апо-Е були відібрані як мішені для ампліфікації при проведенні ПЛР. Були використані дві пари праймерів для ампліфікації Апо-Е-гена з метою посилення специфічності реакції і виключення випадкової контамінації вивченими продуктами. Візуалізація продуктів ампліфікації (295 п.н. і 180 п.н. відповідно для першої в другій пари праймерів) проводилась за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Результати та обговорення

Отримані результати біохімічного дослідження ліпідного спектра крові сироватки щурів з експериментальним атеросклерозом без корекції, порівняно з показниками групи інтактних тварин (таблиця), показали зростання вмісту загального холестеролу – більше, ніж в 3 рази, холестеролу бета-ліпопротеїнів – в 10 разів, загальних ліпідів – майже в 2 рази, індексу атерогенності – майже в 8 разів; зниження величини холестеролу альфа-ліпопротеїнів на 26,1%, холестеролу пре-бета-ліпопротеїнів на 57,2%, тригліцеридів на 42,7%.

Таблиця.

Показники ліпідного обміну сироватки крові щурів (M±m)

Показники	Групи тварин		
	Інтактні	Атеросклероз	Профілактика
Загальний холестерол, Ммоль/л	1,435±0,025	4,563±0,203	3,282±0,444
Холестерол α-ліпопротеїнів Ммоль/л	0,680±0,025	0,503±0,026	0,655±0,105
Холестерол пре-β-ліпопротеїнів Ммоль/л	0,451±0,029	0,193±0,008	0,226±0,025
Холестерол β-ліпопротеїнів, Ммоль/л	0,309±0,03	3,866±0,02	2,400±0,02
Індекс атерогенності	1,127±0,042	8,280±0,641	4,084±0,117
Тригліцериди, Ммоль/л	0,985±0,065	0,421±0,017	0,493±0,055
Загальні ліпіди, Ммоль/л	3,64±0,08	6,26±0,06	5,48±0,20

В групі щурів, яким проводилась корекція змодельованої патології, вміст холестеролу альфа-ліпопротеїнів тільки на 3,5% відрізнявся від аналогічного показника інтактних тварин, а всі інші показники ліпідного обміну сироватки крові, що вивчались, проявили тенденцію до нормалізації. Результати електрокардіографічних досліджень засвідчили, що у більшості щурів другої групи на електрокардіограмах переважають реакції тахікардічного типу: порівняно з інтактними тваринами збільшується на 5, 01% частота серцевих скорочень на 15,38% скорочується тривалість інтервалу PQ, на 16,0% - інтервалу QRS, на 5,6% - інтервалу R-R. Змінюється амплітуда зубців: збільшується на 1,53% у зубця R, на 2,9% у зубця T, та зменшується на 22,69% у зубця S. У щурів третьої групи дані електрокардіографії показали менше відхилень від аналогічних значень інтактних тварин. Знижувались біохімічні показники функціональної активності щитоподібної залози, печінки і нирок.

Органна макроморфометрія показала, що в серцях щурів другої групи збільшується абсолютна маса серця на 3,7%, абсолютна маса ЛШ – на 7,12%, ПШ – на 4,7%, зростає питома вага міокарду ЛШ, серцевого індексу, знижується планіметрично-ваговий індекс,

що свідчить про гіпертрофію. За умов генної терапії, направленої на індукцію синтезу аполіпропротеїну-Е в третій групі тварин більшість макрометричних показників серця проявляли тенденцію до нормалізації. Стереометричні дослідження нирок засвідчили зменшення більшості її параметрів у щурів другої експериментальної групи та тенденцію до нормалізації у щурів третьої групи. Аналогічна закономірність була виявлена у відношенні печінки і щитоподібної залози.

Висновки

При експериментальному холестеринівому атеросклерозі у щурів виявляються дисліпопротеїдемія сироватки крові та явища метаболічного синдрому: в серцевому м'язі виявлені порушення, що свідчать про наявність ішемії, гіпоксії, порушеннях коронарного кровообігу і структури кардіоміоцитів. В щитоподібній залозі, печінці та нирках наявні ознаки гіпофункції. Введення гена Апо-Е, викликаючи синтез відповідного продукту, забезпечує транспорт і регуляцію рівня холестеролу і ліпопротеїнів сироватки крові, і як наслідок тенденцію до нормалізації структури і функції вивчених органів.

Література

1. *Akishita M.* Artherosclerosis and hyperlipidemia // *JMAJ: Jap. Med. Assoc. J.* - 2004. - Vol. 47, № 4. - P. 175 - 178.
2. *Коваленко В.М., Дорогой А.П.* Смертність та інвалідність населення внаслідок серцево-судинних та серцево-мозкових захворювань - проблеми сучасності // *Укр. кардіол. журн.* - 2003. - №6. - С.9 - 13.
3. *Кордюм В.А.* Генотерапія атеросклерозу//*Теоретична медицина*, 10, 2, 2004. – С.121.
4. *Курята А.В., Фролова Е.А.* Влияние омега-3 ПНЖК на липидный обмен и функцию эндотелия сосудов у пациентов с хронической болезнью почек. // *Здоров'я України.* – 2009. - № 3(208). – С.35.
5. *Лутай М.И.* Нарушения липидного спектра: клиническое значение // *Doctor.* - 2004. - №1. - С. 54 - 58.
6. *Machlej R.W.* Apolipoprotein E cholesterol transport protein with expanding role in cell biology // *Science.* – 1988. – V. 240, № 4852. – P.622-630.
7. *Stegmayr B., Asplund R.* Stroke in Northern Sweden. *Scand // Public Health Supple.* - 2003. - Vol. 61, № 7. - P. 60 – 69
8. *Teusink B., Mensenkamp A.R., van der Boom H.* et al. Stimulation of the in vivo production of very low density lipoproteins by apolipoprotein E is independent of the presence of the low density lipoprotein receptor // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276, №44. – P. 10693-40697.
9. *Терещенко О.С.* Крестор – нова ера в лікуванні атеросклерозу//*Українська Медичинська Газета*, №5, 2006, с. 28-29.
10. *Ткач С.М.* Распространенность, течение, диагностика и стратегии лечения неалкогольной жировой болезни печени// *Здоров'я України.* – 2009. - № 1-2 (206-207). – С.63-65.
11. *Федченко Н.Н., Бондаренко А.А., Гарец В.И.* Современные аспекты структурно-Функциональной организации щитовидной железы.// *Український морфологічний альманах.* – 2008. – Том 6, №1. – С. 161-164.

Резюме

В роботі представлені результати біохімічного дослідження ліпідного спектру крові, електрокардіографії та макроморфометричного вивчення серця, щитоподібної залози, печінки та нирок при експериментальному холестеринівому атеросклерозі у щурів-самців в умовах генної корекції. Виявлено, що корекція дає позитивні результати.

В работе представлены результаты биохимического исследования липидного спектра крови, электрокардиографии и макроморфометрического изучения сердца, щитовидной железы, печени и почек при экспериментальном холестеринивом атеросклерозе у крыс-самцов в условиях генной коррекции. Обнаружено, что коррекция дает положительные результаты.

The results of the biochemical study of lipid spectrum of blood, thyroid gland, liver and kidneys in the male-mice in the experimental cholesterol atherosclerosis under the conditions of the gene correction are evaluated in this article. This correction is discovered to have the positive results.

БОДНАР Л.С., ГОРБУЛІНСЬКА С.М., ЩЕРБАКОВ С.М., БОДНАР І.В.

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського 4, e-mail: Gorbulinska@mail.ru

ДОЦІЛЬНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ПРИРОДНИХ СОРБЕНТІВ ДЛЯ ЗНЯТТЯ МУТАГЕННИХ ФОНІВ ВОДНИХ ЗРАЗКІВ, ВІДБРАНИХ ПОБЛИЗУ СМТ.СОСНІВКА ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Забруднення мутагенами ґрунтових і поверхневих вод, які є джерелами водопостачання, не може не впливати на якість питної води. Об'єктом дослідження були водні стоки породних відвалів Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ), яка знаходиться приблизно в 3-х км від смт. Соснівка Сокальського району Львівської області. На ЦЗФ збагачується бідне вугілля з усіх шахт району, тому в породі представлені практично всі елементи таблиці Менделєєва, причому в різних формах. Ситуація ускладнена великою наявністю піриту (біля 1%) і сильною кислотністю стоків (рН 3,4 – 4,6). В зв'язку з цим спостерігається досить різкий сплеск захворювання серед населення смт. Соснівка та оточуючих сіл, зокрема на флюороз, гіпоплазію та ін.[1].

В роботі проаналізовані такі зразки водних стоків породних відвалів ЦЗФ:

- стік з терикону ;
- вода з дренажної каналу ;
- вода з ставку біля терикону ;
- вода з озера біля с. Межиріччя ;
- питна вода смт. Соснівка;
- технічна вода;

Генотоксичне забруднення зразків вивчали в тесті Еймса на *Salmonella typhimurium* для виявлення індукції генних мутацій[4], методом соматичних мутацій та рекомбінацій на *Drosophilla melanogaster* [3] та методом домінуючих летальних мутацій на *Drosophilla melanogaster*[5].

При обстеженні води з території смт. Соснівка виявлено індукцію мутагенної активності на різних штаммах *Salmonella typhimurium* в тесті Еймса. Результати подані у таблиці 1.

Таблиця 1.

Індукція генних мутацій в тесті Еймса на штамі TA-98 *Salmonella typhimurium*

Зразки	Кількість колоній ревертантів			\bar{X}	$\frac{\bar{X}_g}{\bar{X}_k}$	Мутагенність, бали
	X1	X2	X3			
Стік з терикону	389	365	310	354,7	10,7	2
Ставок біля терикону	180	211	223	205	4,2	1