

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ПО ОРГАНИЗМУ МЫШИ ПРИ ДНК-ИММУНИЗАЦИИ

В настоящее время интенсивно разрабатываются технологии генотерапии и геновакцинации, связанные с применением рекомбинантной ДНК. Проблемами ДНК-технологии являются недостаточное время присутствия молекулы ДНК в организме и низкая эффективность трансфекции клеток *in vivo*. Важной является адресность доставки.

Таким образом, целью данной работы является изучение процессов доставки, трансформации клеток и синтеза антигена.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Используя организм мыши в качестве модели, охарактеризовать распределение плазмидной ДНК по различным органам.
2. Изучить экспрессию целевого белка в различных органах.
3. Сравнить эффективность доставки плазмидной ДНК при различных способах введения.

В работе использовали плазмидные ДНК рВМС*nef*, несущую ген *nef* ВИЧ-1 В субтипа, и рВМС*nef*IVS, также содержащую синтетический интрон. Наличие плазмидной ДНК тестировали PCR. Анализ экспрессии белка *nef* проводили, используя метод RT PCR. Анализировали различные органы: мозг, сердце, кровь (лейкоцитарную массу и сыворотку), легкое, печень, почку, селезенку, мышцу (место укола), на наличие в них плазмиды в зависимости от времени после иммунизации. Для визуализации трансформированных клеток использовали плазмиду рLacZHis, позволяющую экспрессировать последовательность гена бактериальной β-галактозидазы, слитого с доменом ядерной локализации белка.

В данной работе впервые был применен метод безинъекционного введения плазмиды в организм через кожу с помощью приложения импульсов электрического поля. Электропорацию проводили в икроножную мышцу задней лапы. Перед процедурой удалялся волосяной покров. Раствор плазмидной ДНК рLacZHis наносили на прокладку, зажатую между мышцей и отрицательным электродом. На электроды подавали комбинацию высоковольтных и низковольтных импульсов. Высоковольтный импульс обеспечивает пермеабиллизацию мембраны, а низковольтный — электрофорез внутри ткани.

В процессе эксперимента варьировали амплитуды высоко- и низковольтных импульсов, длительность импульсов, количество импульсов и интервал между импульсами. Контрольным животным плаزمида рLacZHis была введена внутримышечно инъекционным способом введения.

Было показано, что через 5 минут после введения плазмиды ДНК обнаруживается во всех анализируемых органах. При этом время, в течение которого ДНК выявляется, для разных органов различно. Плазмида детектируется в мышце в течение 14 суток, в мозге — в течение 21 суток, в печени — в течение 28 суток. Через 8 недель после иммунизации плазмиды не детектируется ни в одном из анализируемых органов.

Было также показано, что в месте инъекции, в мозге и печени происходит трансформация клеток и экспрессия гена *nef*. Экспрессия наблюдается на протяжении двух недель в мышце (месте инъекции), в мозге — в течение 21 дня, в печени — в течение 28 дней.

Опыты по электропорации продемонстрировали движение плазмидной ДНК сквозь ткань под действием приложенных электрических импульсов. Экспрессия β-галактозидазы наблюдалась в участке мышцы, находящемся на расстоянии 2 мм от поверхности кожи.

Выводы:

1. При внутримышечном введении плазмидной ДНК происходит быстрое распространение плазмиды по организму.
2. Происходит трансформация клеток различных органов и экспрессия антигена в различных компартментах организма.
3. Безинъекционная электропорация *in vivo* обеспечивает перенос пДНК с поверхности кожи в глубину мышечной ткани и трансформацию клеток.