

2016

MEDICINE  
ISSN 2074-5982

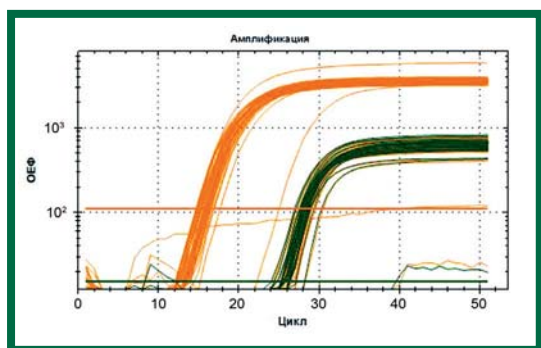
2016

1

# БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
БИОМЕДИЦИНСКИХ  
ТЕХНОЛОГИЙ  
ФМБА РОССИИ

## Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», которая будет проводиться 18-19 мая 2016 г. в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:

143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, владение 1,  
тел.: (495) 561-52-64, факс: (495) 561-52-73  
e-mail: scbmt@yandex.ru

### Предполагаемые темы для формирования программы Конференции:

1. *Лабораторные животные* (модели животных в биомедицинских исследованиях, биоэтические нормы и принципы в экспериментальной работе, новые методы оценки функциональных состояний животных, лабораторные животные в современных фармакологических и токсикологических исследованиях, животные-модели и модели животных в сравнительных биологических исследованиях, новые технологии содержания, требования GLP).

2. *Альтернативное и биологическое моделирование в биомедицинских исследованиях* (биологические и клеточные, математические, физико-химические модели, животные-модели).

3. *Биомедицинская безопасность* (безопасность нанобиотехнологических средств, клеточных технологий, иммунобиологических препаратов, лекарственная токсикология и безопасность фармакологических средств и фармацевтических субстанций).

4. *Новые биомедицинские технологии.*

5. *Методы биомедицинских исследований.*

6. *Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине.*

7. *Биомоделирование в интересах клинической фармакологии.*

Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин, на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов. Просьба к участникам выслать материалы докладов с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения, названия доклада, а также информации о необходимости бронирования места в гостинице до 1 мая 2016 года.

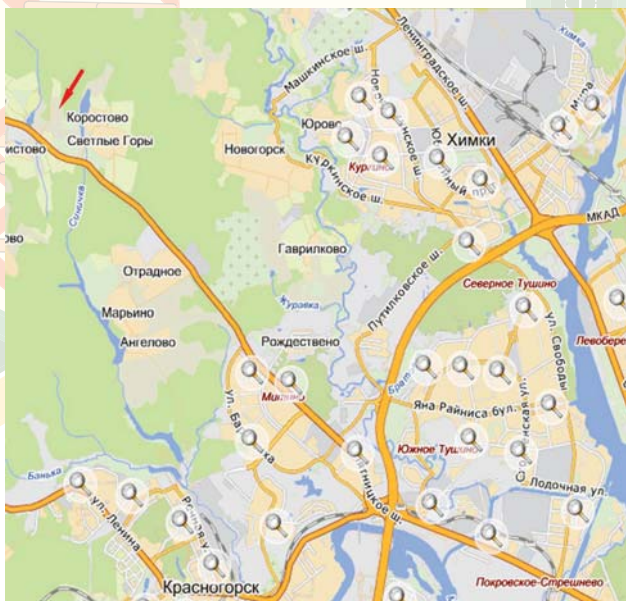
### СХЕМА ПРОЕЗДА:

Адрес: 143442, Московская область,  
Красногорский район, пос. Светлые горы, владение 1.

Проезд по Пятницкому шоссе от станции метро «Тушинская» на автобусе 575 или маршрутном такси 460 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

От станции метро «Митино» или «Пятницкое шоссе» на автобусе 575, маршрутном такси 575, 460, 707 до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через поселок.

На автомобиле: по Пятницкому шоссе (6 км от МКАД) до поворота на Светлые горы, мимо пруда, до магазина, после него поворот налево между двух прудов по дамбе прямо до Центра.



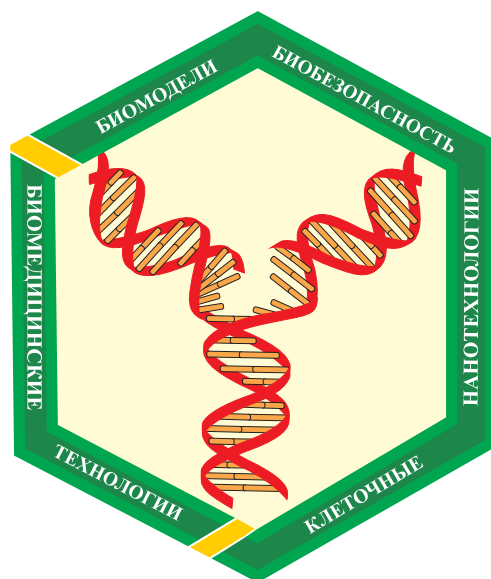
Научный журнал.

Основан в 2005 году ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 09.06.2005 г.

Подписной индекс 57995 в Каталоге «Издание органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук и кандидата наук (редакция – март 2016 года)



## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор академик **Н.Н. Каркищенко**  
Зам. гл. редактора **В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов**  
Отв. секретарь **Н.В. Станкова**

**Г.Д. Капанадзе**, Светлые горы МО, **С.Л. Люблинский**, Обнинск, Калужская область,  
**Е.Л. Матвеевко**, Светлые горы МО, **А.Н. Мурашѐв**, Пущино МО,  
**С.Ю. Пчелинцев**, Любучаны МО, **Г.В. Раменская**, Москва, **А.О. Ревякин**, Светлые горы МО,  
**В.П. Рябых**, Боровск МО, **Х.Х. Семѐнов**, Светлые горы МО, **Д.А. Сычѐв**, Москва,  
**Ю.В. Фокин**, Светлые горы МО, **Д.Б. Чайванов**, Москва, **Е.В. Ших**, Москва

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**К.В. Анохин**, Москва, **Е.Е. Ачкасов**, Москва, **В.М. Баранов**, Москва, **А.Т. Быков**, Сочи,  
**Е.Ю. Бонитенко**, Санкт-Петербург, **В. Влахов**, София, Болгария, **М.И. Воевода**, Новосибирск,  
**А.М. Дыгай**, Томск, **А.Л. Зефирѐв**, Казань, **Р.С. Кузденбаева**, Алматы, Казахстан,  
**В.Г. Кукес**, Москва, **Т.А. Лежава**, Тбилиси, Грузия, **Ю.С. Макляков**, Ростов-на-Дону,  
**А.И. Мирошников**, Пущино МО, **В.Б. Назаров**, Москва, **С.В. Оковитый**, Санкт-Петербург,  
**В.Р. Рембовский**, Санкт-Петербург, **В.П. Фисенко**, Москва, **Д.Ф. Хритинин**, Москва,  
**Б.Д. Цыганков**, Москва, **В.И. Цысь**, Смоленск

## Адрес редакции:

143442, Московская область,  
Красногорский р-н,  
пос. Светлые горы, владение 1  
Тел.: 8 (495) 561-52-64

Охраняется Законом Российской Федерации № 5351-1  
«Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 г. и иными  
нормативно-правовыми актами. Воспроизведение всего издания,  
а равно его части (частей) без письменного разрешения издателя  
влечет ответственность в порядке, предусмотренном действующим  
законодательством.

Отпечатано в типографии «Айсинг»  
199406, Санкт-Петербург, ул. Гаванская, д. 18.  
Подписано в печать 16.03.2016  
Тираж 3 000 экз.

©2016, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

## Содержание

### НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

<b>В.Н. Каркищенко, В.П. Рябых, Н.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, В.А. Езерский, Е.М. Колоскова, В.Н. Лазарев, С.В. Максименко, Н.В. Петрова, В.Н. Столярова, Т.П. Трубицина</b> Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы ( <i>NAT1</i> и <i>NAT2</i> ) человека.....	4
<b>В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, Ю.А. Чудина, А.Е. Емельянова, А.А. Николаев, Д.Б. Чайванов</b> Исследование влияния низкочастотной ритмической электростимуляции подкорковых структур головного мозга кролика на его способность к ультразвуковой вокализации .....	18
<b>Л.М. Межевикина, Е.В. Храмова, Т.И. Смолихина, И.В. Капралова, Г.Ю. Косовский</b> Использование метода микроинъекции для повышения эффективности выделения первичных колоний из бластоцист инбредных мышей в условиях культуры <i>in vitro</i> .....	25

### МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

<b>Е.Б. Шустов, И.А. Берзин, А.А. Благинин</b> Влияние ритмической транскраниальной электростимуляции структур головного мозга на процессы восстановления функционального состояния здоровых добровольцев после истощающих физических нагрузок.....	37
<b>Т.А. Родина, Е.С. Мельников, Н.А. Псарева, А.В. Соколов, В.В. Архипов, Д.Л. Поздняков, В.Г. Кулес</b> Метод одновременного определения кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС.....	43

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

<b>В.Н. Каркищенко, В.П. Рябых, Л.А. Болотских, Х.Х. Семенов, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Петрова, В.А. Езерский, О.Б. Жукова, Е.М. Колоскова, С.В. Максименко, В.Н. Столярова, Т.П. Трубицина</b> Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами <i>NAT1</i> и <i>NAT2</i> человека .....	52
<b>Е.Б. Шустов, Ю.В. Фокин, Г.Д. Капанадзе, И.А. Берзин, Н.В. Станкова, О.В. Алимкина, Е.Л. Матвеевко, Н.В. Петрова</b> Сезонная динамика показателей физической работоспособности лабораторных животных .....	66

### ГЕНЕТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

<b>В.Н. Каркищенко, Л.А. Болотских, Г.Д. Капанадзе, Н.Н. Каркищенко, Е.М. Колоскова, С.В. Максименко, Е.Л. Матвеевко, Н.В. Петрова, В.П. Рябых, А.О. Ревякин, Н.В. Станкова, Х.Х. Семёнов</b> Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека <i>NAT1</i> и <i>NAT2</i> .....	74
--	----

### РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

<b>Н.И. Баранова, А.В. Бурякина, Л.С. Гредягина, А.В. Москвин, Е.В. Федорова</b> Использование методов QSAR-моделирования для предсказания токсичности координационных соединений .....	85
--	----

### ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

<b>А.Ю. Жариков, В.Г. Луницын, В.В. Лампатов, Ю.Г. Мотин, О.С. Талалаева, Д.В. Елисеев, Г.В. Павляшик</b> Влияние новых средств из сырья пантовых оленей на биосинтетические процессы в клетках скелетной мускулатуры крыс в условиях длительной физической нагрузки .....	90
<b>С.В. Надеждин, М.Г. Ковалева, А.Я. Колпаков, Е.В. Зубарева, Е.Н. Хорольская</b> Оценка биосовместимости и биорезистентности заготовок имплантатов из никелида титана с модифицированными наноразмерными поверхностными слоями в опытах <i>in vivo</i> .....	95

### КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

<b>М.С. Застрожин, В.В. Смирнов, Д.А. Сычев, Л.М. Савченко, Е.А. Брюн</b> Влияние галоперидола на активность изофермента цитохрома P450 2D6 у больных алкоголизмом .....	102
<b>Л.М. Красных, В.В. Смирнов, О.А. Горошко, Е.А. Егоренков, Г.Ф. Василенко, Г.В. Раменская, А.Е. Петухов</b> Изучение сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих розувастатин .....	108

## Content

## NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- V.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, N.N. Karkischenko, M.S. Dulya, V.A. Ezerskiy, E.M. Koloskova, V.N. Lazarev, S.V. Maksimenko, N.V. Petrova, V.N. Stolyarova, T.P. Trubitsina  
Molecular and genetic aspects of technology of generation transgene mice with the integrated human of N-acetyltransferase genes (*NAT1* and *NAT2*).....4
- V.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, Yu.A. Chudina, A.E. Emeliyanova, A.A. Nikolaev, D.B. Chayvanov  
Research of influence of low-frequency rhythmic electro-stimulation of subcrustal structures of rabbit brain on its ability to ultrasonic vocalization.....18
- L.M. Mezhevnikina, E.V. Khramtsova, T.I. Smolikhina, I.V. Kapralova, G.Yu. Kosovsky  
Microinjection as a method to increase the efficiency of isolation of primary colonies from inbred mice blastocysts *in vitro* .....25

## BIOMEDICAL METHODS

- E.B. Shustov, I.A. Berzin, A.A. Blaginin  
The influence of rhythmic transcranial electro-stimulation of the brain structures in the processes of the functional healthy state regeneration of volunteers after exhausting physical loads.....37
- T.A. Rodina, E. S. Melnikov, N. A. Psareva, A.V. Sokolov, V.V. Arhipov, D.L. Pozdnyakov, V.G. Kukes  
Simultaneous determination of clomipramine and amitriptyline in human serum using HPLC-MS / MS ...43

## LABORATORY ANIMALS

- V.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, L.A. Bolotskikh, Kh.Kh. Semenov, G.D. Kapanadze, N.V. Petrova, V.A. Ezerskiy, O.B. Zhukova, E.M. Koloskova, S.V. Maksimenko, V.N. Stolyarova, T.P. Trubitsina  
Physiological and embryological aspects of generation transgenic mice with integrated human *NAT1* and *NAT2* genes.....52
- E.B. Shustov, Yu.V. Fokin, G.D. Kapanadze, I.A. Berzin, N.V. Stankova, O.V. Alimkina, E.L. Matveyenko, N.V. Petrova  
Seasonal dynamics of indicators of physical health of laboratory animals.....66

## GENETICS OF LABORATORY ANIMALS

- V.N. Karkischenko, L.A. Bolotskikh, G.D. Kapanadze, N.N. Karkischenko, E.M. Koloskova, S.V. Maksimenko, E.L. Matveyenko, N.V. Petrova, V.P. Ryabykh, A.O. Revyakin, N.V. Stankova, Kh.Kh. Semenov  
Generation of transgenic animal models with human genes *NAT1* and *NAT2* .....74

## RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- N.I. Baranova, A.V. Buryakina, L.S. Gredyagina, A.V. Moskvina, E.V. Fedorova  
Using QSAR-modeling for predicting the toxicity of coordination compounds.....85

## NON-CLINICAL RESEARCHES

- A.Yu. Zharikov, V.G. Lunitsyn, V.V. Lampatov, Yu.G. Motin, O.S. Talalaeva, D.V. Eliseev, G.V. Pavlyashik  
Influence of new agents from raw materials of fawn `s antlers on biosynthetic processes in rats skeletal muscles cells in conditions of long physical activity.....90
- S.V. Nadezhdin, M.G. Kovaleva, A.Ya. Kolpakov, E.V. Zubareva, E.N. Khorolskaya  
Evaluation of biocompatibility and bioresistance of the workpieces of the nickel-titanium implants with modified nanosized surface layers in the *in vivo* experiments .....95

## CLINICAL RESEARCHES

- M.S. Zastrozhin, V.V. Smirnov, D.A. Sychev, L.M. Savchenko, E.A. Bryun  
The effect of haloperidol on the activity of the isoenzyme of cytochrome P450 2D6 in patients with alcoholism ..... 102
- L.M. Krasnykh, V.V. Smirnov, O.A. Goroshko, E.A. Yegorenkov, G.F. Vasilenko, G.V. Ramenskaya, A.E. Petukhov  
The study of comparative pharmacokinetics of preparations containing rosuvastatin ..... 108



## Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (*NAT1* и *NAT2*) человека

В.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, В.П. Рябых<sup>2</sup>, Н.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, М.С. Дуля<sup>1</sup>,  
В.А. Езерский<sup>2</sup>, Е.М. Колоскова<sup>2</sup>, В.Н. Лазарев<sup>1</sup>, С.В. Максименко<sup>2</sup>,  
Н.В. Петрова<sup>1</sup>, В.Н. Столярова<sup>2</sup>, Т.П. Трубицина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных», Калужская область

Контактная информация: д.м.н. Каркищенко Владислав Николаевич, [vlad1672@ya.ru](mailto:vlad1672@ya.ru)

В ходе работы были созданы ДНК-конструкции, включающие нуклеотидные последовательности генов *NAT1* и *NAT2* человека и промоторно-энхансерную область гена альбумина мыши. Кодированные части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов *NAT1*-Not и *NAT1*-Xho в случае *NAT1* и *NAT2*-Not и *NAT2*-Xho – в случае *NAT2*. Плазмиды pSI-*NAT1* и pSI-*NAT2* расщепляли эндонуклеазами BamHI и EcoRV (сайт рестрикции EcoRV был введен в олигонуклеотид *enAlb-F*).

Параллельно осуществлялся синтез олигонуклеотидных праймеров и детекция экспрессии генов у людей и создаваемых трансгенных животных с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров.

На следующих этапах осуществлялось выделение ДНК/РНК из пробы плазмы крови, амплификация геномной ДНК, идентификация ПЦР-продуктов методом горизонтального электрофореза. Наличие в геле полосы ДНК соответствующего размера свидетельствовало о наличии в образце искомого гена.

Получены трансгенные мыши (F0) с интегрированными в их геном конструкциями, включающими нуклеотидные последовательности генов *NAT1* и *NAT2* человека под промотором гена альбумина мыши. Общая эффективность трансгеноза составила для гена *NAT1* – 1,1% и для *NAT2* – 0,6%. Анализ интеграции трансгенов в различных органах и тканях у потомков (F1) первичных трансгенных мышей (F0) показал, что встраивание генов *NAT1* и *NAT2* человека произошло во все три зародышевых листка.

**Ключевые слова:** ДНК-конструкции генов *NAT1* и *NAT2*, промоторно-энхансерная область гена, плазмиды, высокоспецифичные праймеры, детекция экспрессии генов, амплификация, трансгеноз.

### Введение

Ацетилирование в живых системах является фундаментальным процессом

генетических и эпигенетических механизмов, который, наряду с процессом метилирования, обеспечивает стабиль-

ность и оптимальное функционирование геномов. Огромное количество лекарственных препаратов и ксенобиотиков участвует в гистоновых модификациях через вовлечение ацетильных групп и ацетилирование, которые, не влияя на исходную последовательность генов, существенно изменяют их экспрессию.

Несмотря на важную роль в метаболизме экологических и синтетических химических веществ, ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, первоначально развивались, чтобы катализировать реакции эндогенного метаболизма [15]. Например, фаза I ферментов CYP450, как известно, действуют при широком диапазоне эндогенных субстратов, в т.ч. стероидов, жирных кислот, желчных кислот, простагландинов, лейкотриенов, ретиноидов и биогенных аминов [16, 20]. II фаза сульфотрансфераз и UDP-глюкуроносультрансфераз также играют ключевую роль в эндогенном метаболизме стероидов и билирубина [9, 11].

Дальнейший прогресс в направленном поиске лекарств определяется наличием адекватных биологических моделей в виде трансгенных или гуманизированных животных, несущих гены человека. Эндогенная роль человеческой NAT1 и ее мышинового гомолога NAT2 далее поддерживается повсеместной экспрессией двух изоферментов и тем, что они представлены в зародыше и ранних стадиях преимплантационных эмбрионов на протяжении всего развития. Работы прошлых лет с конгенными и рекомбинантными инбредными линиями подразумевали генетическую связь между фенотипами медленных ацетиляторов и высокой чувствительностью

к тератогенно-индуцированному орофациальному расщеплению [12, 13], в то время как последние исследования показывают взаимодействие человеческой NAT1 с транскрипцией фактора внутри клеточного ядра [6, 10].

В качестве средства, исследующего постулат эндогенной роли NAT, ученые предприняли попытку получения трансгенных мышей, лишенных или сверхэкспрессирующих NAT-изоферменты. Первые сообщения в литературе свидетельствуют о том, что NAT-ограниченные, NAT2-нокаутные [8] или NAT1/NAT2-нокаутные [19], мыши нормально развиваются и не страдают никакими очевидными фенотипическими дефектами. Корниш и др. [6] подтвердили, что уровни активности гена NAT2 строго дозозависимые, р-ABA N-ацетилирование у мышей NAT2 (+/+) примерно в два раза выше, чем у гетерозигот NAT2 (+/-). Р-АВА-ацетилирования не наблюдалось у гомозиготных «нулевых» мышей NAT2 (-/-), предполагая, что дефицит не компенсируется другими ферментами метаболизма ксенобиотиков.

Этот эффект «ген-доза» также отражается на уровнях иммунореактивности белка NAT2, обнаруженного в печени мышей NAT2 (+/+), NAT2 (+/-) и NAT2 (-/-) линий. Также стало возможным контролировать тканеспецифичную экспрессию NAT2 при помощи X-Gal-окрашивания нокаутных эмбрионов, т.к. кассета, используемая для прижигания NAT2 ORF, также содержит ген *LacZ* транскрипции, связанный с эндогенным NAT2-промотором через внутренний рибосомный сайт вступления (IRES).

Sugamori и др. [18] сделали еще один шаг вперед, нокаутировав гены NAT1 и NAT2 у мышей. Полное отсутствие ген-

ных продуктов было подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и анализа ферментативной активности. Было показано, что гомозиготные *NAT1/NAT2* (-/-) мыши «подрывают» возможность метаболизировать лекарственные средства в силу отсутствия N-ацетилированных производных п-AS и СМЗ в плазме *NAT1/NAT2*-дефицитных мышей.

Получение *NAT3*-нокаутных линий также было недавно проведено Sugamori и соавт. [16]. Эта линия является фенотипически нормальной и имеет ту же ариламинметаболизирующую способность, как и у дикого типа. Сверхэкспрессия *NAT3* случайно индуцируется у двойного нокаута *NAT1/NAT2*, как результат присутствия сильных элементов промотора в абляции кассеты, не имеющего никакого фенотипического воздействия.

Исследователи также попытались воспроизвести сверхэкспрессию *NAT2*-подобного белка у трансгенных мышей. Sim и др. [17] сообщают о грубых нарушениях, ведущих к смерти химерных эмбрионов мышей с избыточной экспрессией человеческой *NAT1*. Другие исследования обнаружили нормальное развитие мышей, несущих тот же трансген, но сообщают только о скромной (или об отсутствии увеличения) ферментативной активности, даже на сроках, где количество копий гена человеческой *NAT1* является высоким [7]. Различные вариации методик, используемых для генерации трансгенных линий, могут объяснить противоречивые результаты двух исследований.

В целом, исследование трансгенных моделей для NAT позволяет предпо-

ложить, что изоферменты не участвуют в решающей эндогенной функции организма. Это не абсолютно неожиданное открытие, поскольку в литературе есть несколько примеров фенотипически нормальных нокаутных мышей, которые испытывают дефицит ферментов фазы I и II метаболизма ксенобиотиков [3]. Тем не менее, эти мыши по-разному реагируют на применение канцерогенов, и их способности метаболизировать препараты могут быть также нарушены.

Предварительное исследование трансгенных мышей с гиперэкспрессией человеческого *NAT2*-изофермента в простате не выявило какого-либо влияния на локальную скорость биоактивации предканцерогенов, таких как PhIP [14]. Тем не менее, необходимы дальнейшие детальные исследования, чтобы определить, как NAT-дефицит или избыточная экспрессия могут модулировать восприимчивость к химической токсичности и раку. С этой целью NAT-нокаутные и трансгенные линии, доступные для научного сообщества, будут очень полезны.

Молекулярно-генетические аспекты получения трансгенных мышей основываются на генно-инженерных технологиях, к которым относятся:

- получение нуклеотидных последовательностей структурного гена, кодирующего тот или иной признак;
- получение нуклеотидных последовательностей регуляторных участков гена (промоторов, энхансеров и др.);
- создание генно-инженерных конструкций;
- анализ интеграции трансгена у эмбрионов и животных, полученных из зигот, микроинъектированных генно-инженерными конструкциями.



**Цель работы** – создание генетических конструкций с генами *NAT1* и *NAT2* человека и животных, несущих гены NAT.

### Материалы и методы

#### Создание генетической конструкции с генами *NAT1* и *NAT2* человека

Кодирующие части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов NAT1-Not и NAT1-Xho в случае *NAT1* и NAT2-Not и NAT2-Xho – в случае *NAT2*. Плазмиды pSI-NAT1 и pSI-NAT2 расщепляли эндонуклеазами BamHI и EcoRV (сайт рестрикции EcoRV был введен в олигонуклеотид enAlb-F).

ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный продукт очищали путем препаративного электрофореза в агарозном геле и выделяли с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

Препаративное выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Jet Star Plasmid Purification Maxi Kit (Genomed, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя.

Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полосу, соответствующую по подвижности ДНК-фрагменту размером 3,5 кБ, вырезали и выделяли из геля с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм.

Правильность структуры плазмид проверяли путем секвенирования по Сэнгеру с использованием олигонукле-

отидов pSI-F и pSI-R на капиллярном автоматическом секвенаторе.

#### ПЦР-анализ интеграции трансгенов в геном животных

Определение интеграции трансгена у потомства мышей, полученного из зигот, микроинъектированных генно-инженерной конструкцией, проводили с использованием ПЦР-амплификации.

Выделение геномной ДНК из тканей проводили по методу Блина и Стаффорда [4] с некоторыми модификациями.

ДНК из лизата выделяли гуанидиновым методом: сорбцией на стекле в высокосолевым растворе, с последующими несколькими промывками Трис-спиртовым (80%) буфером, испарением спирта и растворением ДНК, сорбированной на стекле, в ТЕ-буфере.

Для определения интеграции генно-инженерной конструкции в геном мыши использовали метод ПЦР с применением следующих пар праймеров:

для обнаружения конструкции Alb-NAT1 брали пару – prAlb-F (прямой) и NAT1-Not (обратный);

для обнаружения конструкции Alb-NAT2 брали пару – prAlb-F (прямой) и NAT2-Not (обратный).

В обоих случаях величина амплификата составляла 1504 пары нуклеотидов (п.н.).

Нуклеотидные последовательности используемых праймеров:

prAlb-F: GAC CCA TGG GGC ATG CTT CCA TGC CAA G - 5'-концевой на промотор (28 п.н.);

NAT1-Not: GAA GCG GCC GCC TAA ATA GTA AAA AAT CTA TCA CCA 3'-концевой на *NAT1* (36 п.н.);

NAT2-Not: GAA GCG GCC GCC TAA ATA GTA AGG GAA CCA TCA C - 3'-концевой на *NAT2* (34 п.н.).

Электрофорез проводили в 0,8% агарозном геле в 0,5xTBE. В каждую лунку вносили по 18-20 мкл ПЦР-смеси (окрашенная водная фаза) для ДНК из образцов тканей мышей или 6-10 мкл положительного контроля.

Для оценки размера амплификата одна из дорожек агарозного геля выделялась для ДНК-маркера (100-10000 п.н., Fermentas).

### Результаты и их обсуждение

#### Создание генно-инженерных конструкций, включающих нуклеотидные последовательности генов *NAT1* и *NAT2* человека

Плазмиды, содержащие участки ДНК, кодирующие *NAT1* и *NAT2*, под контролем промотора мышинового гена альбумина, были получены в три этапа, на основе плазмиды pSI (Promega). На первом этапе из плазмиды был удален промоторный участок и заменен на промотор мы-

шиного гена альбумина. На втором этапе в плазмиду ввели энхансерный участок мышинового гена альбумина. На последнем этапе в полученный вектор вводили кодирующие участки для белков *NAT1* и *NAT2*. Поэтапное конструирование регуляторной области объясняется тем, что в мышинном геноме промотор и энхансер гена альбумина физически удалены на большое расстояние (около 8 кБ).

Участки ДНК, соответствующие промотору и энхансеру мышинового гена альбумина, были получены с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовалась ДНК мыши. Для амплификации энхансерного участка применяли олигонуклеотиды enAlb-F и enAlb-R с введенными сайтами рестрикции BamHI и NcoI соответственно. Для амплификации промоторного участка применяли олигонуклеотиды prAlb-F и prAlb-R с введенными сайтами рестрикции NcoI и HindIII соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Структура олигонуклеотидов

Название	Структура 5'->3'
enAlb-F	TGGATCCGATATCTAGCTTCCTTAGCATGACGTTCC
enAlb-R	ATACCATGGGTCCCAAGCTGGAGAACGA
prAlb-F	GACCCATGGGGCATGCTTCCATGCCAAG
prAlb-R	AATCAAGCTTGGGGTTGATAGGAAAGGTGATC
NAT1-Not	GAAGCGGCCGCTAAATAGTAAAAATCTATCACCA
NAT1-Xho	AGCCTCGAGATGGACATTGAAGCATATCTTG
NAT2-Not	GAAGCGGCCGCTAAATAGTAAGGGAACCATCAC
NAT2-Xho	AGCCTCGAGATGGACATTGAAGCATATTTTG
pSI-F	GTTTCGCCACCTCTGACTTG
pSI-R	TCACTGCATTCTAGTTGTGGT
pSI-int	CCTATTGGTCTTACTGACATC
en-s1	GTGTCTCCTGCTCTGTGTCAG
en-s2	AGCAGATCTCTGAGTTCAAGA

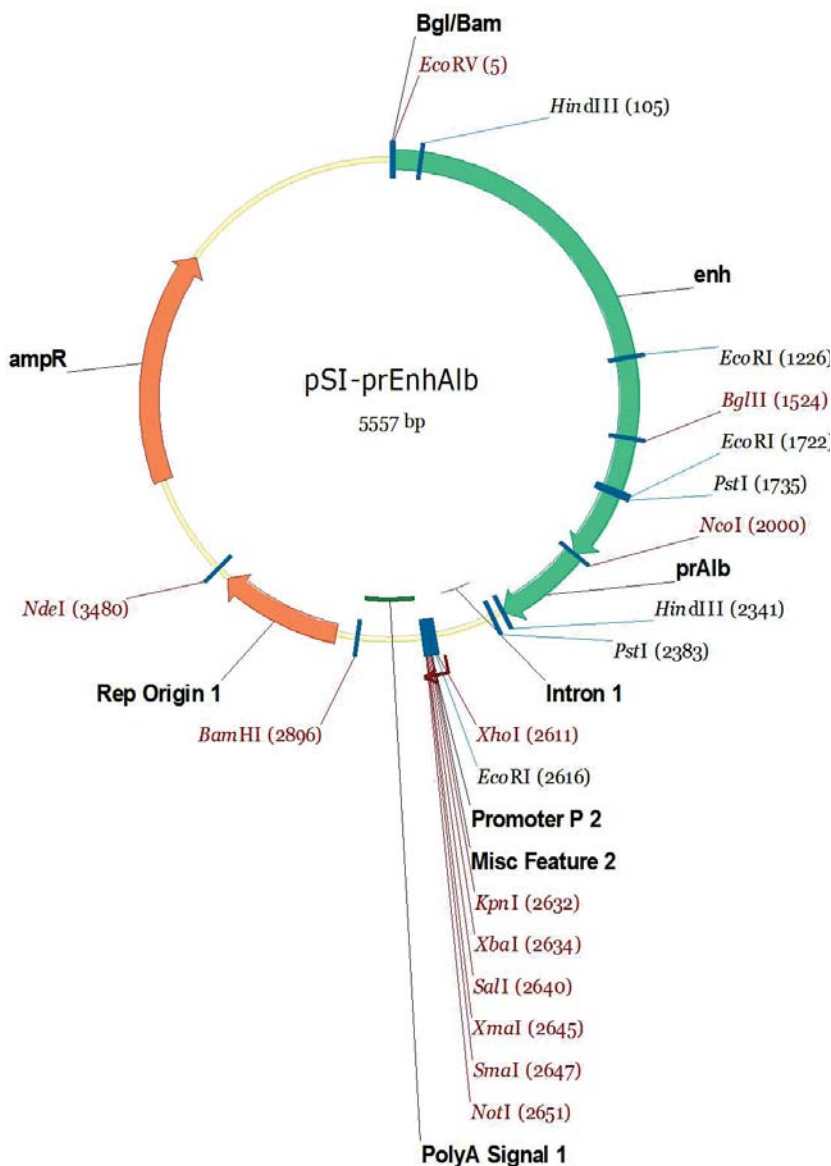


Рис. 1. Карта плазмиды pSI-prEnhAlb.

На следующем этапе плазмиду pSI-prAlb (рис. 1) обрабатывали эндонуклеазами BglIII и NcoI. Фрагмент ДНК, соответствующий энхансерной области гена альбумина, расщепляли с помощью эндонуклеаз BamHI и NcoI. Продукты расщепления объединяли и подвергали действию Т4-ДНК-лигазы.

Дальнейшие операции по трансформации, отбору целевых клонов и получению плазмидной ДНК проводились по аналогии с вышеописанным. При секвенировании использовали олигонуклеотиды pSI-F, pSI-R, enAlb-R, en-s1 и en-s2. В результате была получена плаزمида pSI-prEnhAlb.

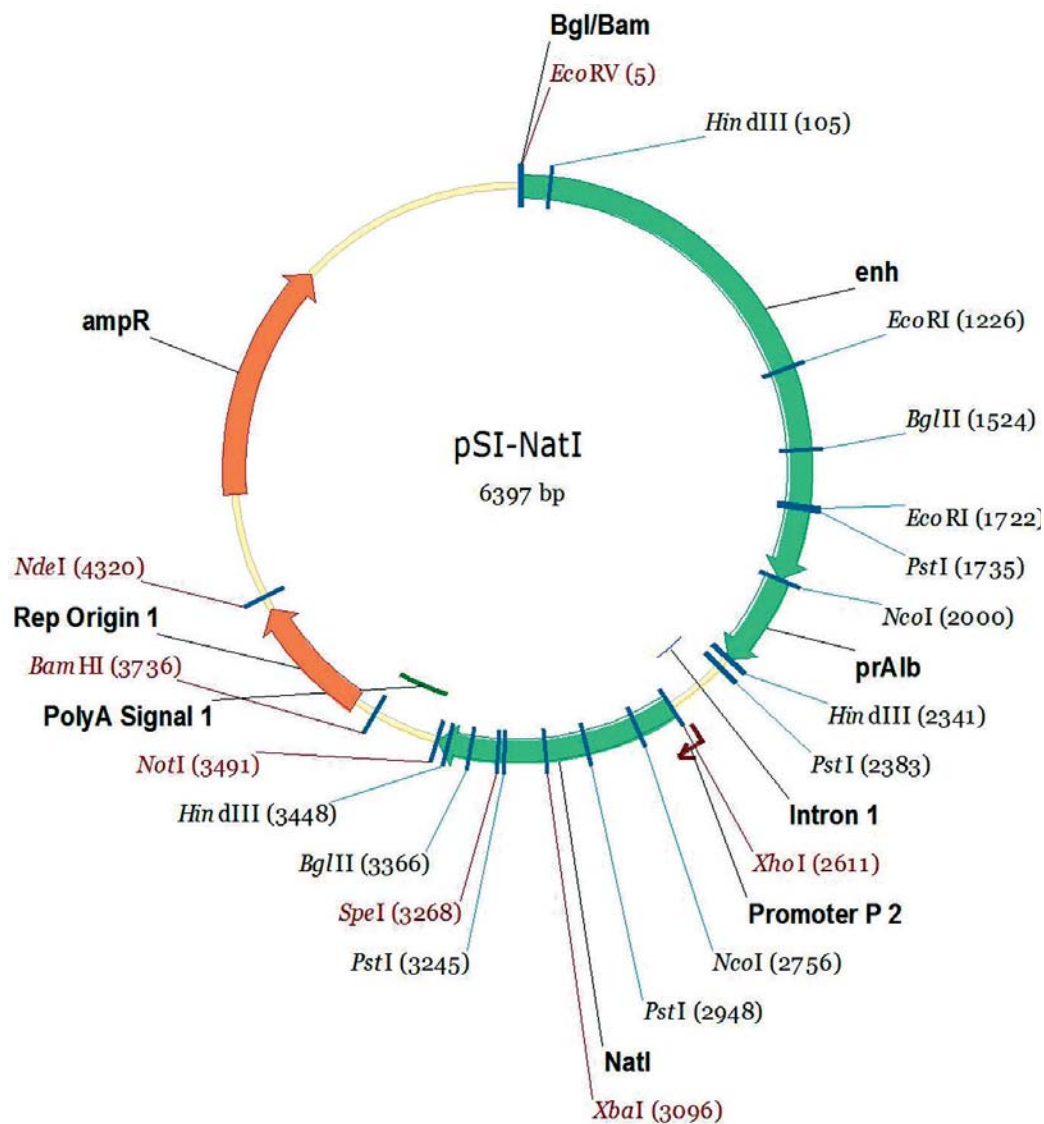


Рис. 2. Карта плазмиды pSI-NAT1.

Кодирующие части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов NAT1-Not и NAT1-Xho в случае *NAT1* и NAT2-Not и NAT2-Xho – в случае *NAT2*. Полученные ДНК-фрагменты обрабатывали эндонуклеазами NotI и XhoI и объединяли путем

лигирования с плазмидой pSI-prEnhAlb, расщепленной теми же ферментами. Дальнейшие операции проводили аналогично. Для ПЦР-анализа бактериальных колоний и секвенирования использовали олигонуклеотиды pSI-R и pSI-int. В результате получены плазмиды pSI-NAT1 (рис. 2) и pSI-NAT2 (рис. 3).

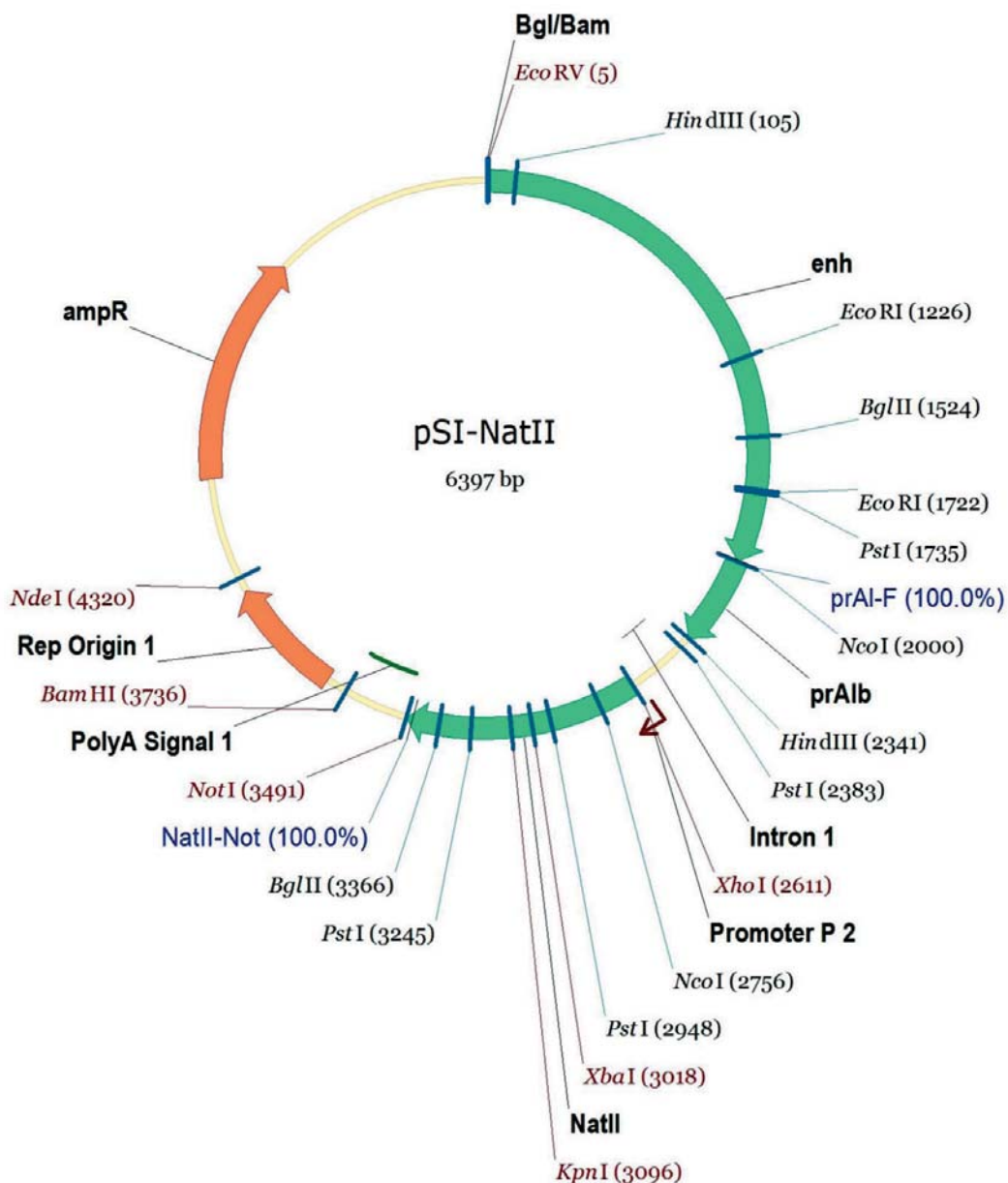


Рис. 3. Схема получения конструкции NAT2 под альбуминовым промотором.

**ПЦР-анализ интеграции транс-  
генов в органах и тканях потомков  
трансгенных мышей** показал, что  
встраивание трансгенов у потомков  
первичных трансгенных мышей (F1)

произошло во все исследуемые органы  
(рис. 4-6), а, следовательно, интегра-  
ция трансгенов у первичных животных  
(F0) произошла во все три зародышевых  
листка.

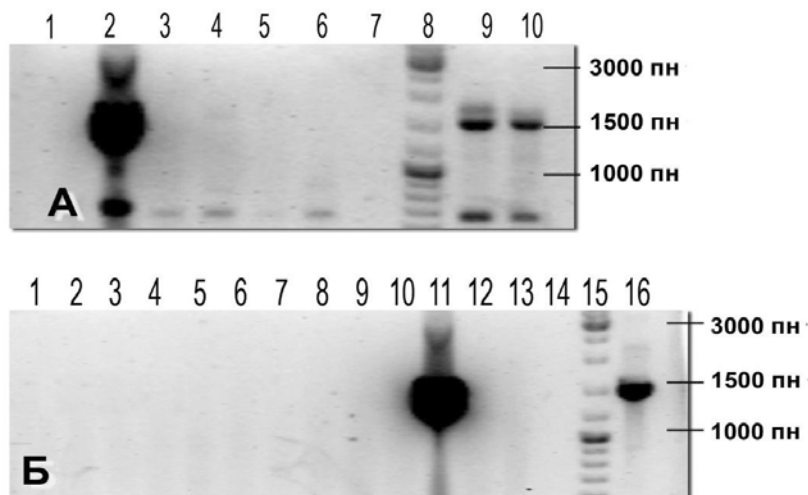


Рис. 4. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации ДНК, выделенной из хвостов мышей (F0), полученных в результате микроинъекции конструкций Alb-NAT2 (А) и Alb-NAT1 (Б). Амплификаты размером 1500 п.н. ограничены праймерами prAlb-F-NAT2 и prAlb-F-NAT1. 0,8% агарозный гель с 0,5хТБЕ.

Обозначения: А: 1-6 – образцы №№ 1-6; Б: 1-13 – образцы №№ 7-19; 7 (А), 14 (Б) – вода (отрицательный контроль); 8 (А), 15 (Б) – маркеры размеров ДНК; 9 (А), 16 (Б) – положительный контроль (K+, конструкция Alb-NAT2 (1), 0,001 пг/мкл); 10 (А) – контроль ингибирования (K+, образец ДНК кролика). Мыши №№ 2 и 17 (дорожки 2А и 11Б соответственно) – трансгенные.

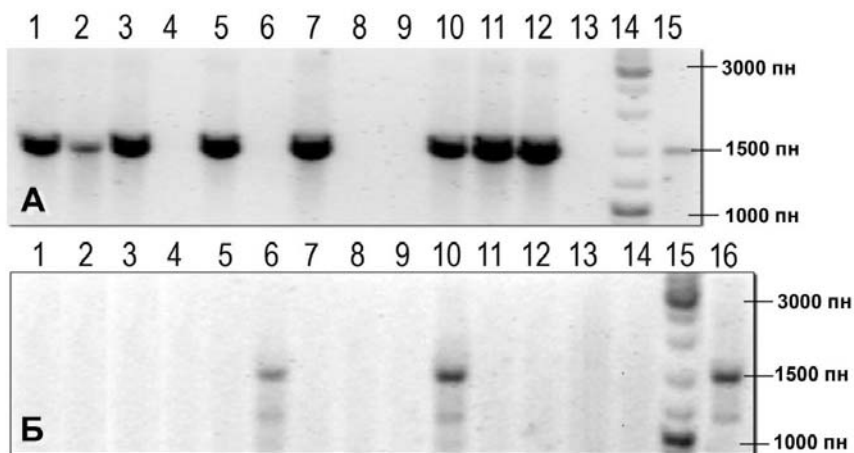


Рис. 5. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации ДНК, выделенной из хвостов мышей, потомков (F1) трансгенных основателей линий с генами человека: NAT1 (А) и NAT2 (Б). Амплификаты размером 1500 п.н. ограничены праймерами prAlb-F-NAT1 и prAlb-F-NAT3. 0,8% агарозный гель с 0,5хТБЕ.

Обозначения: А: 1-12 – образцы №№ 1-12; Б: 1-14 – образцы №№ 13-25; 13 (А) – вода (отрицательный контроль); 14 (А), 15 (Б) – маркеры размеров ДНК; 15 (А), 16 (Б) – положительный контроль (K+, мышь № 17 (А), мышь № 49 (Б) - F0). Мыши №№ 2 и 17 (дорожки 2А и 11Б) – трансгенные.

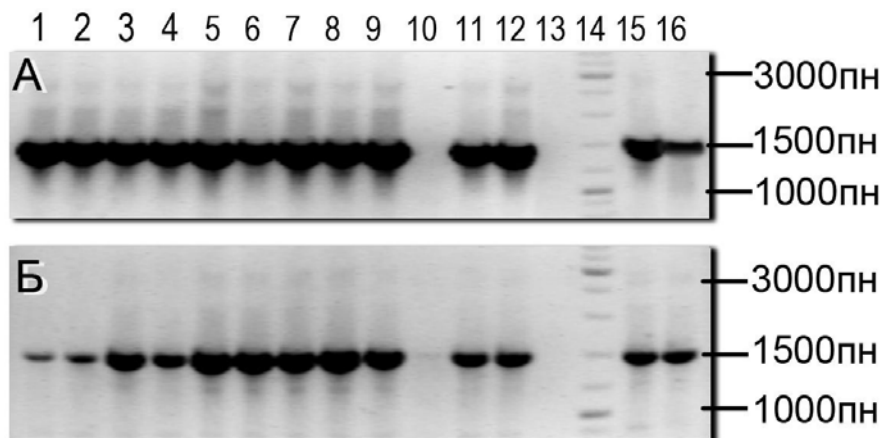


Рис. 6. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации ДНК, выделенной из органов и тканей мышей, трансгенных по N-ацетилтрансферазе-1 (*NAT1*) и N-ацетилтрансферазе-2 (*NAT2*) человека (снимки А и Б соответственно). Амплификаты ограничены праймерами Alb-NAT1 (2) (содержат фрагменты последовательности промотора гена альбумина мыши и гена N-ацетилтрансферазы человека), общий размер амплификата – 1500 п.н. 0,8% агарозный гель с 0,5хТБЕ.

Обозначения: 1, 2 – левый и правый яичники; 3 – матка; 4 – мышцы; 5 – кишечник; 6 – почка; 7 – печень; 8 – селезенка; 9 – желудок; 10 – отрицательный контроль (нетрансгенная мышь, хвост); 11 – сердце; 12 – тимус; 13 – вода; 14 – маркер размеров ДНК; 15 – положительный контроль (хвост трансгенной по *NAT1* (2) мыши, ранее тестированной как содержащей трансген); 16 – контроль ингибирования ( $K^+$ , один из образцов 1-9).

### Эффективность получения гуманизированных трансгенных мышей с интегрированными конструкциями *NAT1hom* и *NAT2hom* человека

Анализ методом ПЦР интеграции трансгена в геном рождённого потомства (табл. 2) показал, что из 66-ти мышат, полученных из зигот, микроинъектированных конструкцией *NAT1hom*, у пяти была обнаружена интеграция трансгена, что составило 7,6% от чи-

сла рождённых животных. Тогда как из зигот, микроинъектированных конструкцией *NAT2hom*, из 118-ти рождённых мышат интеграция трансгена была обнаружена только у трех потомков, что составило 2,5% от числа рождённых животных. Причина сравнительно низкого выхода трансгенных мышей с интегрированной конструкцией *NAT2hom* требует дальнейшего выяснения.

Таблица 2

№ группы	Конструкция	Число трансплант. эмбрионов	Родилось потомков			Общая эффективность трансгеноза (%)
			всего	из них трансгенных		
				N	N	
I	<i>NAT1hom</i>	434	66	5	7,6	1,1
II	<i>NAT2hom</i>	488	118	3	2,5	0,6

### Эффективность получения гуманизированных трансгенных мышей с интегрированными конструкциями *NAT1<sub>hom</sub>* и *NAT2<sub>hom</sub>* человека

Общая эффективность технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами *NAT1<sub>hom</sub>* и *NAT2<sub>hom</sub>*, т.е. отношение количества полученных трансгенных животных к числу трансплантированных эмбрионов, микроинъекцированных генной конструкцией, составила 1,1 и 0,6%, что соответствует среднему стандартному международному уровню (табл. 2).

### Заключение

Нами созданы ДНК-конструкции *NAT1* и *NAT2*, включавшие выделение плазмидной ДНК, удаление из клеток *E. coli* промоторного участка с его заменой на промотор мышинового гена альбумина. Плазмиду pSI-prAlb обрабатывали эндонуклеазами до получения плазмиды pSI-prEnhAlb. Кодирующие части генов *NAT1* и *NAT2* были амплифицированы с матрицы геномной ДНК человека с использованием олигонуклеотидов NAT1-Not и NAT1-Xho в случае *NAT1* и NAT2-Not и NAT2-Xho – в случае *NAT2*. Плазмиды pSI-NAT1 и pSI-NAT2 расщепляли эндонуклеазами BamHI и EcoRV (сайт рестрикции EcoRV был введен в олигонуклеотид enAlb-F). Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полосу, соответствующую по подвижности ДНК-фрагменту размером 3,5 кБ, вырезали и выделяли из геля с помощью набора Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм.

Микроинъекции генно-инженерных конструкций вводили в пронуклеусы зигот гибридных мышей. С целью проведения трансплантации ДНК-конструкций *NAT1* и *NAT2* были усовершенствованы или созданы новые методики ксенотрансплантации.

Учитывая результаты наших исследований об отрицательном влиянии слишком ранней экспрессии генно-инженерных конструкций под *cmv*-промотором на жизнеспособность предимплантационных эмбрионов млекопитающих [1, 2], нами при создании конструкций с нуклеотидными последовательностями генов *NAT1* и *NAT2* человека в качестве промоторно-энхансорной области была выбрана регуляторная область гена альбумина мыши (рис. 2). Этот выбор обусловлен тем, что ген альбумина в предимплантационных эмбрионах ещё не активен, и, по всей вероятности, альбуминовый промотор не должен запускать экспрессию чужеродных генов *NAT1* и *NAT2* человека и оказывать отрицательное влияние на их жизнеспособность.

В качестве доноров эмбрионов использовали самок гибридных мышей F1 CBA/lac \* C57BL/6 массой 16-18 г. На следующих этапах осуществлялось выделение ДНК/РНК из пробы плазмы крови, амплификация геномной ДНК, идентификация ПЦР-продуктов методом горизонтального электрофореза. Наличие в геле полосы ДНК соответствующего размера свидетельствовало о присутствии в образце искомого гена.

Параллельно осуществлялся синтез специфических олигонуклеотидных праймеров и детекция экспрессии генов у людей и создаваемых трансгенных животных. Гены *NAT1* и *NAT2* амплифицировались по стандартным методикам.



На основе выполненных работ были получены ДНК-конструкции *NAT1* и *NAT2* с соответствующими генами человека. С помощью генно-инженерных методов получены животные, несущие гены *NAT1* и *NAT2* человека, а также первая генерация соответствующих трансгенных животных. Ранее был проведен биоинформационный анализ последовательностей генов *NAT1* и *NAT2* мышей, крыс, кроликов для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей мишеней, с целью использования в синтезе видоспецифичных праймеров для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [3].

Результаты наших исследований приживаемости 2-клеточных мышинных эмбрионов, инъецированных генно-инженерными конструкциями *NAT1* и *NAT2* человека, в организме самок-реципиентов, свидетельствующих о достаточно высоком проценте приживаемости этих эмбрионов (как в пересчёте на всех реципиентов, так и на беременных), подтверждают это предположение.

Анализ интеграции трансгенов в органах и тканях потомков мышей, трансгенных как по гену *NAT1*, так и по *NAT2* человека, показал, что встраивание трансгенов у первичных трансгенных мышей (F0) произошло во все три зародышевых листка – эктодерму, энтодерму и мезодерму. Особенно важно, что встраивание трансгенов у самок произошло в оба яичника. Это должно позволить быстро размножить и создать линии трансгенных животных.

В нашей работе (так же, как и у исследователей из Аризонского университета [7]) было получено 5 первичных (F0) трансгенных мышей с интегри-

рованной конструкцией *hNAT1* и 3 – с *hNAT2* человека. Причина относительно более низкого выхода трансгенных мышей с интегрированной конструкцией *NAT2<sup>hom</sup>* требует своего дальнейшего выяснения.

Проведено исследование вариантов ацетилирования гена *NAT2* у различных линий мышей методом ПДРФ-анализа с применением эндонуклеаз рестрикции: KpnI, TagI, BamHI. Проведены молекулярно-генетические исследования экспрессии генов *NAT2* и *NAT1* человека и мыши на уровне мРНК у трансгенных животных методом ОТ-ПЦР с применением видоспецифичных праймеров.

Проведено сравнение видоспецифичных праймеров для ОТ-ПЦР у людей и лабораторных животных для последующей оптимизации экстраполяционных биомоделей ацетиляционного полиморфизма по *NAT1* и *NAT2*, а также для изучения механизмов сегрегации индивидуумов в медленные, быстрые или промежуточные ацетиляторные фенотипы, что будет представлено в последующих публикациях.

По результатам выполнения работы с помощью видоспецифичных праймеров подтверждено наличие генов *NAT1* и *NAT2* человека у создаваемых линий трансгенных мышей.

### Список литературы

1. *Езерский В.А., Тескин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Шишиморова М.С., Безбородова О.А., Якубовская Р.И., Рябых В.П.* Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов // Проблемы биологии продуктивных животных. 2013. № 4. С. 33-52.
2. *Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М.* Создание гумани-

- зированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы) // Биомедицина. 2014. № 3. С. 4-22.
3. **Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В.** Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *NAT1* и *NAT2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных // Биомедицина. 2014. № 2. С. 4- 17.
  4. **Blin N., Stafford D.W.** A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // *Nucleic acids res.* 1976. No. 3(9). Pp. 2303-8.
  5. **Boukouvola S., Fakis G.** Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes // *Drug metabolism reviews.* 2005. No. 37. Pp. 511-564.
  6. **Butcher N.J., Arulpragasam A., Goh H.L., Davey T., Minchin R.F.** Human arylamine N-acetyltransferase-1 interacts with EHZF, a multi-functional transcription co-factor // In: Third International Workshop on Arylamine N-acetyltransferases. - Vancouver, Canada. 2004.
  7. **Cao W., Chau B., Hunter R., Strnatka D., McQueen C.A., Erickson R.P.** Only low levels of exogenous N-acetyltransferase can be achieved in transgenic mice // *Pharmacogenetics J.* 2005. No. 5. Pp. 255-261.
  8. **Cornish V.A., Pinter K., Boukouvola S., Johnson N., Labrousse C., Payton M., Priddle H., Smith A.J., Sim E.** Generation and analysis of mice with a targeted disruption of the arylamine N-acetyltransferase type 2 gene // *Pharmacogenomics J.* 2003. No. 3. Pp. 169-177.
  9. **Coughtrie M.W.H., Sharp S., Maxwell K., Innes N.P.** Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases // *Chem.-biol. interact.* 2003. No. 109. Pp. 3-27.
  10. **Erickson R., Morgan C., McQueen C.A.** 2nd International NAT Workshop. - Eynsham, Oxford. 2000. Abstract. No. 1.
  11. **Green M.D., Tephly T.R.** Glucuronidation of amine substrates by purified and expressed UDP-glucuronosyltransferase proteins // *Drug metab. dispos.* 1998. No. 26. Pp. 860-867.
  12. **Karolyi J., Erickson R.P., Liu S.** Genetics of susceptibility to 6-aminonicotinamide-induced cleft palate in the mouse: studies in congenic and recombinant inbred strains // *Teratology.* 1988. No. 37. Pp. 283-287.
  13. **Karolyi J., Erickson R.P., Liu S., Killewald L.** Major effects on teratogen-induced facial clefting in mice determined by a single genetic region // *Genetics.* 1990. No. 126. Pp. 201-205.
  14. **Leff M.A., Epstein P.N., Doll M.A., Fretland A.J., Devanaboyina U.S., Rustan T.D., Hein D.W.** Prostate-specific human N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) expression in the mouse // *J. Pharmacol. exp. ther.* 1999. No. 290(1). Pp. 182-187.
  15. **Nebert D.W.** Polymorphisms in drug metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? // *Am. J. hum. genet.* 1997. No. 60. Pp. 265-271.
  16. **Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W.** P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature // *Pharmacogenetics.* 1996. No. 6. Pp. 1-42.
  17. **Sim E., Pinter K., Mushtaq A., Upton A., Sandy J., Bhakta S., Noble M.** Arylamine N-acetyltransferases: a pharmacogenomic approach to drug metabolism and endogenous function // *Biochem. soc. trans.* 2003. No. 31. Pp. 615-619.
  18. **Sugamori K.S., Wong S., Brenneman D., Lu X., Grant D.M.** *NAT3* knockout or over expression in mice has no influence on N-acetylation activity // *Drug metab. rev.* 2004. No. 36. 164 p.
  19. **Sugamori K.S., Wong S., Gaedigk A., Yu V., Abramovici H., Rozmahel R., Grant D.M.** Generation and functional characterization of arylamine N-acetyltransferase *Nat1/Nat2* double-knockout mice // *Mol. pharmacol.* 2003. No. 64. Pp. 170-179.
  20. **Wong L.-L.** Cytochrome P450 monooxygenases // *Curr. opin. chem. biol.* 1998. No. 2. Pp. 263-268.

## Molecular and genetic aspects of technology of generation transgene mice with the integrated human of N-acetyltransferase genes (*NAT1* and *NAT2*)

V.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, N.N. Karkischenko, M.S. Dulya,  
V.A. Ezerskiy, E.M. Koloskova, V.N. Lazarev, S.V. Maksimenko,  
N.V. Petrova, V.N. Stolyarova, T.P. Trubitsina

The DNA constructions with nucleotide sequences of human genes of *NAT1* and *NAT2* and promoter-enhanced region of a mice albumin gene were created. The coding parts of *NAT1* and *NAT2* genes were amplified from a matrix of genomic human DNA with use of *NAT1*-Not and *NAT1*-Xho oligonucleotides in case of *NAT1* and *NAT2*-Not and *NAT2*-Xho in case of *NAT2*. Plasmids of pSI-*NAT1* and pSI-*NAT2* split by BamHI and EcoRV endonuclease (the site of a restriction of EcoRV was entered in enAlb-F oligonucleotide).

Synthesis of the oligonucleotide primers and detection of human genes expression and the created transgene animals with the use of specific oligonucleotide primers was carried out in parallel.

At the following stages allocation of DNA/RNA from blood plasma test, amplification of genomic DNA, identification of PCR products was carried out by method of a horizontal electrophoresis. Existence in gel of DNA strip corresponding size testified to existence in a sample of a required gene.

Transgene mice (F0) with the designs integrated into their genome including nucleotide sequences of genes of human *NAT1* and *NAT2* under the albumin gene mice promoter were generated. Total effectiveness of a transgenesis for *NAT1* gene is 1,1% and for *NAT2* – 0,6%. The analysis of integration of transgenes in various descendants (F1) organs and tissues of primary transgene mice (F0) showed that human genes *NAT1* and *NAT2* was found in the cells of all three germinal leaves.

**Key words:** DNA constructions *NAT1* and *NAT2* genes, promoter-enhanced region of gene, plasmids, high-specific primers, detection of a genes expression, amplification, transgenesis.

## Исследование влияния низкочастотной ритмической электростимуляции подкорковых структур головного мозга кролика на его способность к ультразвуковой вокализации

В.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, Ю.В. Фокин<sup>1</sup>, Ю.А. Чудина<sup>2</sup>, А.Е. Емельянова<sup>1,2</sup>,  
А.А. Николаев<sup>1,2</sup>, Д.Б. Чайванов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, [fokin-yuri@ya.ru](mailto:fokin-yuri@ya.ru);  
к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, [chaivanov@ya.ru](mailto:chaivanov@ya.ru)

---

В работе на основе экспериментального исследования проведен сравнительный анализ ультразвуковой вокализации кролика в состоянии спокойного бодрствования и во время воздействия низкочастотной ритмической электростимуляции (электросна). Состояние покоя характеризуется типичной двухпиковой формой ультразвукового сигнала: первый пик УЗВ, с большей спектральной плотностью мощности, возникает в диапазоне частот 20-25 кГц, а второй пик – в диапазоне 33-38 кГц. В состоянии электросна способность генерировать ультразвук у кролика сохраняется, как и форма ультразвукового сигнала остается схожей с таковой в состоянии покоя. Низкочастотная ритмическая стимуляция приводит к смещению первого пика ультразвуковой вокализации по частоте и незначительному уменьшению спектральной плотности мощности второго пика.

**Ключевые слова:** ультразвуковая вокализация, электросон, низкочастотная ритмическая электрическая стимуляция, кролики.

---

### Введение

Обнаруженный у млекопитающих феномен ультразвуковой вокализации (УЗВ) в настоящее время широко исследуется в состоянии спокойного бодрствования [2] или в процессе активного социального взаимодействия между особями [7, 13-15]. В этих работах объектом исследования являлись разные животные: грызуны (крысы, мыши, хомяки, морские свинки), летучие мыши, кролики, мини-свиньи и обезьяны. Наибольшее количество исследований в этой области посвящено изучению УЗВ крыс и мышей, поиску ее поведенче-

ских коррелятов [8, 12, 15] и возможных физиологических механизмов [9-11].

Исследованию феномена УЗВ у других, более крупных животных было посвящено относительно немного работ. Кроме того, существует проблема выбора лабораторного животного, которое можно было бы использовать в качестве наиболее адекватной модели для изучения функционального состояния нервной системы человека, в частности, под воздействием электросна [2]. В результате тестовых экспериментальных проверок таких животных, как крысы, кролики, кошки, мини-свиньи и макаки, было

установлено, что наиболее удобными животными-моделями для исследования функциональных состояний являются мини-свиньи и кролики [6]. С учетом описанных обстоятельств, была исследована УЗВ у мини-свиней в состоянии спокойного бодрствования и во время электросна [4]. Результаты этой экспериментальной работы позволили утверждать, что способность мини-свиньи генерировать УЗВ во время электросна не утрачивается. Было установлено, что низкочастотное ритмическое электрическое воздействие, вызывающее состояние электросна, приводит к изменению спектральных характеристик ультразвукового сигнала, при этом не влияя на его частотные характеристики.

С целью продолжения изучения УЗВ животных было проведено настоящее экспериментальное исследование, направленное на сравнение способности кроликов генерировать УЗВ в состоянии спокойного бодрствования и в состоянии электросна. Выбор в качестве изучаемого животного кролика определили два обстоятельства, обнаруженные экспериментально [3]: во-первых, наличие у кролика феномена УЗВ в покое, во-вторых, сходство частотных характеристик УЗВ кролика и мини-свиньи. В этом смысле описанное здесь экспериментальное исследование является подобным исследованию, проведенному ранее на мини-свиньях [4] и повторяющему формально-методические его особенности, состоящие в общей организации экспериментальной процедуры.

### **Материалы и методы**

#### **Лабораторные животные**

Эксперименты с животными проводили на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА

России. Запись данных осуществлялась на самках кроликов породы советская шиншилла в возрасте 6-10 мес. Были обследованы 8 особей, из которых для анализа отобрали 4-х. Все животные содержались в индивидуальных клетках при температуре воздуха 18-22°C и относительной влажности 60-70%. В качестве пищи для кроликов использовали комбикорм ПК-90 и водопроводную очищенную воду.

#### **Регистрация УЗВ**

Волны ультразвукового диапазона записывали с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды), которые устанавливали на расстоянии 20-25 см от головы животного. Запись сигнала, частота дискретизации которого составляла 200 кГц, осуществляли в цифровом формате. Регистрацию УЗВ проводили в два этапа, продолжительность каждого из которых составляла 30 мин. На первом этапе запись УЗВ осуществляли у животного, находящегося в состоянии покоя (фоновые данные), затем следовал второй этап, на котором УЗВ фиксировали у животного, подвергавшегося воздействию электросна.

#### **Процедура электросна**

Состояние электросна у кроликов инициировали с помощью низкочастотной (6 Гц) ритмической электрической стимуляции, осуществлявшейся через глазные и затылочные электроды, по которым подавались импульсы прямоугольной формы [1]. Переход животного в состояние сна контролировали путем учета изменений его физиологических и поведенческих реакций. Ритмическую стимуляцию мозга проводили с помощью бытового прибора «Электросон – ЭГСАФ-01». В течение всего воз-

действия низкочастотной стимуляции (30 мин) осуществлялась запись УЗВ.

### Обработка данных

Полученные ультразвуковые данные обрабатывали путем первоначального удаления физических артефактов, представленных монотонными шумами, и последующего проведения спектрального анализа ультразвука путем быстрого преобразования Фурье (эпоха анализа составляла 10 мс, размерность преобразования – 2000 интервалов) в полосе частот 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча (функция `pwelch`). В результате были получены значения спектральной плотности мощности (СПМ) для всего выбранного диапазона частот, которые нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку изменений ультразвука, в котором

находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения изменяли пропорционально максимуму, после чего вычисляли медианы по каждой частоте.

### Результаты и их обсуждение

В результате усреднения данных отобранных для исследования животных получили два графика зависимости СПМ от частоты ультразвука, отражающие, соответственно, УЗВ кролика в состоянии спокойного бодрствования (рис. 1) и под воздействием низкочастотной ритмической стимуляции, вызывающей у животных состояние электросна (рис. 2). Полученные в этой работе данные указывают на способность кроликов генерировать сигналы в ультразвуковом диапазоне частот, которая проявляется как в состоянии покоя, так и в состоянии электросна.

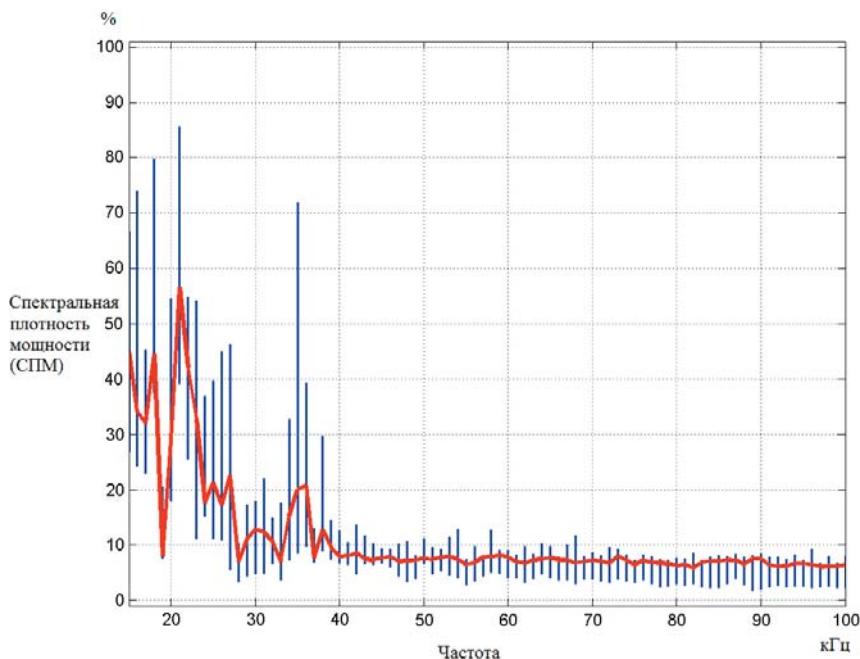


Рис. 1. График зависимости СПМ УЗВ мини-свиней от ее частоты в состоянии спокойного бодрствования. Красная кривая – медианы частот, синие вертикальные линии – 95% доверительный интервал. По оси абсцисс отложена частота (кГц), по оси ординат – СПМ УЗВ (%).

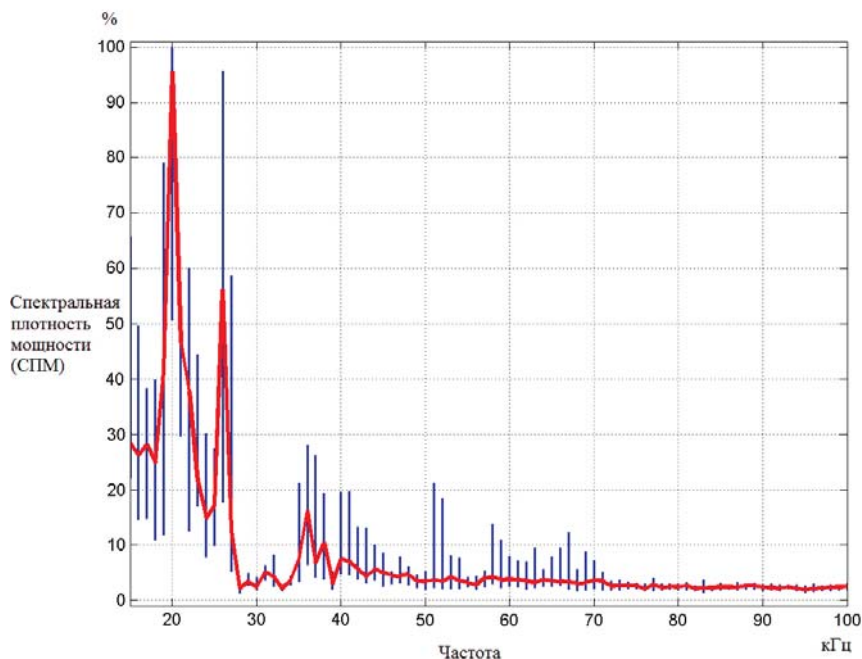


Рис. 2. График зависимости СПМ УЗВ мини-свиней от ее частоты в состоянии электросна. Обозначения – как на рис.1.

В состоянии покоя (рис. 1) УЗВ кроликов характеризуется наличием четко выделяющихся двух пиков, обнаруживающихся в диапазонах частот 20-25 и 33-38 кГц, максимальные значения СПМ для которых появляются на частоте, соответственно, 21 и 36 кГц. Этот результат согласуется с полученными ранее данными [3] о том, что для УЗВ кролика характерно появление двух пиков на частоте 23-24 и 35 кГц. Результаты настоящего исследования и работы [3] указывают на то, что первый пик характеризуется СПМ, превышающей более чем в два с половиной раза СПМ для второго пика. Следовательно, для УЗВ кролика в состоянии покоя типичным является своеобразный паттерн УЗВ, представленный двумя четко выделяющимися максимумами, среди которых

СПМ первого максимума превышает СПМ второго примерно в 2,5 раза.

В состоянии электросна УЗВ кролика (рис. 2) характеризуется схожим паттерном, в котором четко выделяются два диапазона частот, где обнаруживаются наибольшие значения СПМ. Один из экстремумов появляется в диапазоне 24-29 кГц с пиком на частоте 26 кГц, второй экстремум обнаруживается в диапазоне 32-39 кГц с пиком на 36 кГц. СПМ первого выделенного пика характеризуется величиной примерно в 3,5 раза большей, чем у второго пика.

Сравнительный анализ двух полученных графиков СПМ УЗВ кроликов в состоянии покоя и в состоянии электросна позволил выявить их сходства и различия. Сходства состоят в том, что УЗВ кролика в обоих состояниях харак-

теризуется ограниченным диапазоном частот от 20 до 40 кГц, одинаковой формой паттерна УЗВ, а также постепенным нарастанием значений СПМ. Различия УЗВ в состояниях покоя и электросна связаны с разными диапазонами частот, характерными для первого максимума СПМ. В состоянии покоя этот диапазон представлен областью 20-25 кГц с пиком на частоте около 21 кГц, а в состоянии электросна – он смещается примерно на 5 кГц и составляет 24-29 кГц с пиком на частоте 26 кГц. Также необходимо отметить некоторое уменьшение СПМ УЗВ второго пика в состоянии электросна по сравнению с состоянием покоя при неизменности значения СПМ первого экстремума.

Следовательно, на УЗВ кролика переход из состояния покоя в состояние электросна отражается, во-первых, в смещении частотного диапазона и пикового значения первого максимума примерно на 5 кГц, а, во-вторых, – в уменьшении значения СПМ второго максимума (примерно на 5%).

В предыдущих исследованиях было установлено, что типичным для УЗВ мини-свиньи, находящейся в состоянии покоя, является паттерн, представленный двумя максимумами в диапазонах частот 20-30 и 35-38 кГц [3], СПМ первого из которых примерно в 2 раза больше второго. В состоянии электросна типичный паттерн УЗВ мини-свиньи практически не меняется, происходит только относительное увеличение значений СПМ ее максимумов [4].

Проведение настоящего исследования позволило сравнить характеристики УЗВ кролика с УЗВ мини-свиньи в состоянии покоя и в состоянии электросна. Было обнаружено принципиальное

сходство паттернов УЗВ этих животных, проявляющееся в наличии двух максимумов, СПМ первого из которых является большим по сравнению со вторым. У обоих животных первый экстремум появляется в диапазоне частот 20-30 кГц, а второй – 32-39 кГц. Различия УЗВ кролика и мини-свиньи относятся к преобразованиям общей формы ультразвукового сигнала в состоянии электросна. Для мини-свиньи характерно увеличение СПМ ультразвукового сигнала под действием низкочастотной ритмической электростимуляции, а для кроликов – незначительное (на 5%) уменьшение СПМ. При этом, если у мини-свиней частотные характеристики УЗВ в покое и во время электросна остаются неизменными, то для кроликов характерно некоторое смещение (на 5 кГц) первого максимума в сторону увеличения частоты. Следовательно, воздействие низкочастотной ритмической электростимуляции приводит к различным изменениям паттернов УЗВ рассматриваемых животных.

Необходимо отметить, что кролики и мини-свиньи относятся к высшим млекопитающим, которые имеют общий план строения головного мозга с одинаковым набором его гомологичных образований [5]. Возможно, в состоянии покоя и у кроликов, и у мини-свиней мозговая активность протекает в т.н. «автоматизированном режиме», т.к. не требуется адаптивного поведения. Этим может объясняться сходство паттернов УЗВ в покое.

В отличие от состояния покоя, состояние электросна не является фоновой активностью мозга, а создается с помощью низкочастотной ритмической электростимуляции, которая воздействует



на корковые и подкорковые мозговые образования [2]. Мозг кролика от мозга мини-свиньи отличается различной долей структур новой коры от общей поверхности корковых образований: у кролика поверхность новой коры составляет примерно 56% от всей коры, у свиньи на новую кору приходится около 70% [1]. Кроме того, поверхность новой коры свиньи при визуальном анализе обнаруживает борозды и извилины, в то время как поверхность коры кролика – гладкая.

Важно отметить, что увеличение объема новой коры у млекопитающих происходит за счет усложнения структуры ее связей, уменьшения плотности нейронов и увеличения глиального индекса, вычисляемого как отношение количества глиальных клеток к числу нейронов в данном объеме мозгового вещества [1]. Приведенные данные позволяют нам предположить, что мозг мини-свиньи от мозга кролика отличается скорее не количественно, а качественно. Качественные изменения проявляются в том, что по мере усложнения новая кора берет на себя не только реализацию высшей нервной деятельности, но и выполняет многие функции, принадлежавшие ранее стволовым структурам мозга и базальным ядрам [5]. Следовательно, сравниваемые животные характеризуются не только разным вкладом образований новой коры в общую мозговую активность, но – главное – тем, как происходит реализация «корковых» и «подкорковых» функций.

Другими словами, доля функций, реализуемых корковыми образованиями, у мини-свиньи больше, чем у кролика. Низкочастотная ритмическая электро-

стимуляция оказывает различное действие на мозговую деятельность этих животных, которое, в частности, приводит к разным изменениям ультразвукового сигнала. У мини-свиньи происходит увеличение СПМ всего паттерна УЗВ, что может быть связано с уменьшением вклада корковой составляющей, приводящим к подавлению всех ее функций. У кролика происходит смещение первого максимума УЗВ и СПМ второго максимума. Это может быть связано с подавлением корковых отделов на фоне сохранения активности подкорковых структур, реализующих соответствующие функции.

### **Выводы**

На основе анализа полученных результатов проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

- 1) была экспериментально подтверждена способность кролика генерировать УЗВ не только в состоянии покоя, но и под воздействием низкочастотной ритмической электростимуляции (состояние электросна);
- 2) сравнительный анализ параметров и паттернов УЗВ кролика показал сходство общей формы УЗВ, ее частотных и спектральных характеристик в исследуемых состояниях;
- 3) смена состояния спокойного бодрствования состоянием электросна у кролика проявляется в смещении частотного диапазона и пикового значения первого экстремума примерно на 5 кГц и в уменьшении значения СПМ второго экстремума (примерно на 5%);
- 4) сравнение УЗВ кролика и мини-свиньи показало их принципиальное сходство в состоянии покоя и некоторые различия в состоянии электросна.

### Список литературы

1. *Блинков С.М., Глезер И.И.* Мозг человека в цифрах и таблицах. – Л.: Медицина, 1964.
2. *Гиляровский В.А., Ливенцев Н.М., Сегаль Ю.Е., Кириллова З.А.* Электросон. – М.: Медгиз, 1958. – 172 с.
3. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б.* Ультразвуковая вокализация и ее информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 4-23.
4. *Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Николаев А.А.* Влияние транскраниальной низкочастотной электро-стимуляции головного мозга на спектральные характеристики ультразвуковой вокализации мини-свиней светлогорской популяции // Биомедицина. – 2015. – № 3. – С. 20-26.
5. *Ромер А., Парсонс Т.* Анатомия позвоночных. Т. 2 / Пер. с англ. – М.: Мир, 1992. – С. 308-313.
6. *Чайванов Д.Б., Станкова Н.В.* Анализ ограничений моделирования на животных физических методов модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы человека с целью выбора животного-модели // Биомедицина. – 2013. – № 4. – С. 164-168.
7. *Brudzynski S.M., Neville H.* Fletcher Rat ultrasonic vocalization: short-range communication // Handbook of mammalian vocalization. – 2010. – No. 3. – Pp. 69-76.
8. *Burgdorf J., Kroes R.A., Moskal J.R., Pfau J.G., Brudzynski S.M., Panksepp J.* Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback // J. Comp. psychol. – 2008. – No. 122(4). – Pp. 357-67.
9. *Carruthers I.M., Natan R.G., Geffen M.N.* Encoding of ultrasonic vocalizations in the auditory cortex // J. Neurophysiol. – 2013. – No. 109. – Pp. 1912-1927.
10. *Ciucci M.R., Ahrens A.M., Ma S.T., Kane J.R., Windham E.B., Woodlee M.T., Schallert T.* Reduction of dopamine synaptic activity: Degradation of 50-kHz ultrasonic vocalization in rats // Behav. neurosci. – 2009. – No. 123(2). – Pp. 328-336.
11. *Hage S.R., Gavrilov N., Salomon F., Stein A.M.* Temporal vocal features suggest different call-pattern generating mechanisms in mice and bats // BMC Neuroscience. – 2013. – No. 14. – P. 99.
12. *Portfors C.V.* Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice // J. of the Am. Association for laboratory animal science. – 2007. – Vol. 46. – No. 1. – Pp. 28-34.
13. *Ramsier M.A., Cunningham A.J., Moritz G.L., Finneran J.J., Williams C.V., Ong P.S., Gursky-Doyen S.L., Dominy N.J.* Primate communication in the pure ultrasound // Biology Letters. – 2012. [Epub ahead of print].
14. *Schuh D., Hoy S.T., Selzer D.* Vocalization of rabbit pups in the mother-young relationship. // Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. – 2004. – Pp. 1266-1270.
15. *Sirotnin Y.B., Costa M.E., Laplagne D.A.* Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior // Frontiers in behavioral neuroscience. – 2014. – Vol. 8. – Article 399. – Pp. 1-12.

## Research of influence of low-frequency rhythmic electro-stimulation of subcrustal structures of rabbit brain on its ability to ultrasonic vocalization

V.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, Yu.A. Chudina, A.E. Emel'yanova,  
A.A. Nikolaev, D.B. Chayvanov

In work on the basis of experimental research, a comparative analysis of ultrasonic vocalizations of rabbits in a state of rest and during exposure to low-frequency rhythmic electrical stimulation (electric sleep) was carried out. The rest characterized typical two-peak shape of the ultrasonic signal: first peak of USV with greater power spectral density occurs in the frequency range of 20-25 kHz, while the second peak – in the range of 33-38 kHz. In the state of the ability to generate rabbit's ultrasound electric sleep stored as ultrasonic waveform is similar to that of the rest. Low-frequency repetitive stimulation leads to a shift of the first peak of ultrasonic vocalizations in frequency and a slight decrease of the power spectral density of the second peak.

**Key words:** ultrasonic vocalization, electric sleep, low-frequency rhythmic electrical stimulation, rabbits.

## Использование метода микроинъекции для повышения эффективности выделения первичных колоний из бластоцист инбредных мышей в условиях культуры *in vitro*

Л.М. Межевкина<sup>1,2</sup>, Е.В. Храмцова<sup>1</sup>, Т.И. Смолихина<sup>1</sup>,  
И.В. Капралова<sup>1</sup>, Г.Ю. Косовский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», Пущино

<sup>2</sup> – ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий», Москва

Контактная информация: д.б.н. Межевкина Людмила Михайловна, [mezhevikina@rambler.ru](mailto:mezhevikina@rambler.ru)

Оценены перспективы использования метода микроинъекции для выделения из бластоцист инбредных линий мышей клеток внутренней клеточной массы и трофобласта – источников новых линий стволовых клеток эмбрионального происхождения. Показано, что после микроинъекции в полость бластоцисты 10 нл модифицированной среды Виттена и/или витальных красителей (0,03% трипанового синего и 0,1% фенолового красного) повреждается не более 4-5% клеток по ходу прокола. При этом происходят видимые изменения морфологии бластоцисты, которые практически полностью нивелируются в течение первых 24 ч инкубирования в модифицированной среде Виттена. Показано, что процедура микроинъекции не влияет на последующее развитие инъецированных бластоцист до стадии формирования *in vitro* первичных колоний, представляющих собой единую популяцию взаимодействующих между собой клеток внутренней клеточной массы и трофобласта.

Показано также, что механический прокол блестящей оболочки (*zona pellucida*) и осмотический шок от введения избыточного количества жидкости во внутреннюю полость бластоцисты способствуют выходу бластоцисты из *z. pellucida* и колониеобразованию (для мышей линий NMRI и SHK – до 93 и 78%, против 47 и 44% в контроле, соответственно).

Таким образом, микроинъекция небольших объемов сбалансированных по солевному составу сред и/или растворов витальных красителей (не более 10 нл) может служить вспомогательным приемом для более эффективного выделения первичных колоний из бластоцист мышей с разным генотипом и создания на основе клеток внутренней клеточной массы и трофобласта новых экспериментальных моделей для медико-биологических исследований.

**Ключевые слова:** микроинъекция, стадия бластоцисты, клетки внутренней клеточной массы, трофобласт.

### Введение

Метод микроинъекции (МИ) широко используется в биомедицинских исследованиях для создания экспериментальных моделей химерных и трансгенных животных, изучения функций генов, факторов клеточной пролиферации и дифференцировки. Для этих целей широко используются

эмбрионы на стадии бластоцисты, характеризующиеся рядом морфологических особенностей – прежде всего, строгой локализацией недифференцированных плюрипотентных клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и полярных клеток трофобласта (ТБ), наличием внутренней полости и внешней оболочки – *zona pellucida*.

В условиях культуры *in vitro* на стадии бластоцисты возможна детерминация клеток ВКМ в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), либо в производные ТБ – трофобластические линии стволовых клеток [6, 11, 17, 18]. После извлечения из бластоцисты клетки ВКМ и ТБ обнаруживают способность к росту, пролиферации и спонтанным дифференцировкам *in vitro*. Однако их потенциал к дифференцировкам в разные типы клеток и ткани взрослого организма существенно различается. Хорошо известно, что после МИ только ЭСК встраиваются в развитие эмбриона и передают ему свои признаки по наследству [8, 11, 18, 19]. Потенциальные возможности трофобластических линий стволовых клеток несколько ниже, они могут дифференцироваться *in vitro* и *in vivo* только во внезародышевые ткани и органы. Тем не менее, все типы стволовых клеток эмбрионального происхождения представляют интерес как экспериментальные модели и как перспективные источники для клеточной терапии и трансплантологии.

Для реализации плюрипотентного потенциала стволовых клеток *in vitro* и после МИ в бластоцисту реципиента существенное значение имеет генотип эмбриона, из которого эти клеточные культуры были первоначально выделены. В частности, большинство генетически стабильных линий ЭСК мыши получены из эмбрионов мышей линии 129/Sv или же их потомков от скрещивания – 129/Sv x 129/Sv-CP [9, 13, 14]. Полагают, что генетическая стабильность ЭСК связана с предрасположенностью самцов 129/Sv к спонтанным тестикулярным тератокарциномам (каталоги линий мышей: <http://www.jax.org>

и <http://www.taconic.com>). Другим лимитирующим фактором на этапе выделения стабильных линий ЭСК является количество «доступных» бластоцист. В первую очередь, это касается редких и особо ценных видов животных, а также человека, от которых получить большое количество эмбрионов на стадии бластоцисты достаточно проблематично из-за непростого решения ряда технических и этических вопросов.

Со стволовыми клетками эмбрионального происхождения в настоящее время сложилась парадоксальная ситуация, когда прикладные исследования значительно опережают фундаментальные знания о молекулярных механизмах их роста и дифференцировки. Несмотря на достигнутые успехи, многие вопросы в изучении ЭСК в системах *in vitro* и *in vivo* остаются нерешенными. Не определены факторы предварительного генотипирования эмбрионов для успешного выделения и создания генетически стабильных клеточных линий, не найдены универсальные индукторы дифференцировки ЭСК в одном направлении. Это создает проблемы на этапе получения монокультур для клеточной терапии и трансплантологии.

В связи с вышесказанным, разработка экспериментальных подходов для повышения эффективности выделения из доимплантационных эмбрионов клеток ВКМ и ТБ – предшественников ЭСК и трофобластических линий стволовых клеток – может иметь фундаментальное и прикладное значение для создания новых клеточных технологий для медицины и сельского хозяйства. Ранее нами было показано [1], что под влиянием цитокина LIF (leukemia inhibitory factor) у инбредных линий мышей повышается

эффективность выхода (hatching, «хетчинг») из *z. pellucida* с последующим формированием в культуре *in vitro* первичных колоний (ПК), представляющих собой единую популяцию клеток ВКМ и ТБ. Показано также, что ПК служат простой и адекватной моделью для изучения механизмов действия физических и химических факторов на процессы пролиферации, дифференцировки и гибели эмбриональных клеток *in vitro* [1, 3].

**Целью** настоящей работы явилась оценка перспектив использования метода МИ в качестве вспомогательного приема для повышения эффективности культивирования эмбрионов линейных мышей линий 129/Sv, NMRI и SHK. В связи с этим мы исследовали влияние процедуры МИ, сопряженной с механическим и осмотическим стрессом, на морфологию и жизнеспособность бластоцист до стадии хетчинга и образования ПК в зависимости от линейной принадлежности мышей.

### **Материалы и методы**

**Объекты исследования.** Для экспериментов использовали мышей инбредных линий 129/Sv и NMRI (коллекционный фонд ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) и SHK (питомник ФИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) средней массой 18-20 г в возрасте 6-8 недель. Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA). Для кормления использовали гранулированный пол-

норационный комбикорм для мышей (ООО «Лабораторкорм», Москва).

**Выделение эмбрионов на стадии бластоцисты.** Для выделения большого количества бластоцист применяли метод гормональной стимуляции самок гонадотропными гормонами: Фоллимаг, 10 ед. подкожно («Мосагроген», Россия), и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) (Московский эндокринный завод, Москва), 10 ед. внутривенно. Гормоны вводили с интервалом в 52 ч. Сразу после введения второго гормона (ХГЧ) самок подсаживали к самцам из расчета 1:1. Утром следующего дня отбирали животных с копулятивными пробками. День обнаружения пробки считали первым днем беременности.

Бластоцисты выделяли из рогов матки на 3,5 день беременности под контролем бинокулярной лупы Stemi DV4 (Zeiss, Германия). Эмбрионы отбирали без видимых признаков нарушения морфологии на стадиях средней и поздней бластоцисты. Для выделения и культивирования бластоцист использовали модифицированную среду Виттена (МСВ) с добавлением органического буфера NEPES.

**Микроинъекция (МИ).** Для МИ использовали микроманипулятор TransferMan NK (Eppendorf, Германия), оснащенный стандартными инъекционными капиллярами TransferTip-XR и VacuTip (Eppendorf, Германия). Все манипуляции проводили под инвертированным микроскопом IX-70 (Olympus, Япония) с объективами в модификации Хоффмана для лучшей визуализации прозрачных объектов. Во время проведения процедуры МИ поддерживали тургор на стадии бластоцисты путем разбавления МСВ дистиллированной

водой (10%). Для визуального контроля прокола внешней оболочки (*z. pellucida*) и плотного слоя клеток ТБ использовали витальные красители: 0,03% трипановый синий (Fluka, Швейцария) и 0,1% феноловый красный (Sigma, США). Растворы красителей и МСВ вводили во внутреннюю полость бластоцисты в объеме не более 10 нл.

**Оценка жизнеспособности.** Жизнеспособность бластоцист оценивали по изменению морфологии в ходе проведения процедуры МИ, а также по результатам культивирования инъецированных бластоцист *in vitro* до стадии хетчинга и последующего образования ПК. Внимание обращали на следующие характеристики: эффективность выхода бластоцист из *z. pellucida* (хетчинг), адгезия, количество и расположение в составе ПК клеток ВКМ и ТБ. Поврежденные клетки с нарушенными барьерными свойствами плазматических мембран выявляли с помощью 0,5% витального красителя трипанового синего (Fluka, Швейцария).

**Культивирование бластоцист.** Для культивирования бластоцист использовали 4-луночные эмбриологические чашки Петри (Nunc, Швейцария). В каждую лунку помещали по 5-6 бластоцист. Интактные бластоцисты, не подвергавшиеся МИ (контроль), и бластоцисты после МИ (опыт) культивировали в 200 мкл МСВ при 37°C и повышенной влажности в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе MC-15 (Sanyo, Япония). Через 48 ч культивирования в МСВ дополнительно вносили 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF мыши (Sigma, ICN) и 10% инактивированной фетальной сыворотки телят (Sigma, NuClone, США). Длительность культивирования бластоцист в опыте и контроле составляла 7 суток.

**Активность эндогенной щелочной фосфатазы (ЭЩФ).** Плюрипотентные клетки ВКМ выявляли в бластоцистах и в составе ПК по активности ЭЩФ. Для этого эмбрионы и колонии фиксировали охлажденным ацетоном, инкубировали в течение 1 ч с цитохимическим реагентом  $\alpha$ -нафтол-AS-фосфатом (ICN, США) и красителем ВВ синим прочным (ICN, США) при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Растворы цитохимических реагентов готовили перед началом фиксации эмбрионов и колоний из расчета: 5 мг субстрата  $\alpha$ -нафтол-AS-фосфата; 0,25 мл ДМСО; 25 мл деионизированной воды (milliQ); 25 мл буфера Трис-НСl (pH 8,5); 25 мг азокрасителя ВВ синего прочного. Перед использованием раствор цитохимических реагентов фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры.

Принцип метода ЭЩФ заключается в превращении субстрата  $\alpha$ -нафтол-AS-фосфата под действием ЭЩФ в нафтол-AS-В1, который после взаимодействия с солью азокрасителя ВВ синего прочного выпадает в осадок и дает нерастворимый пигмент. Плюрипотентные эмбриональные клетки с высокой активностью ЭЩФ после 1 ч инкубирования с цитохимическими реагентами окрашиваются в темно-синий цвет.

**Иммуноцитохимический анализ фактора плюрипотентных клеток Nanog.** ПК на стадии поздней бластоцисты фиксировали охлажденным ацетоном, затем инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными моноклональными антителами мыши против белка-маркера Nanog в разведении 1:500 (Sigma, США). После тщательной отмывки в растворе фосфатного буфера (pH 7,4) препараты в течение 2 ч инкубировали при комнатной температуре 20-22°C со

вторичными козьими антителами против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с флуоресцентным красителем FITC разведении 1:300 (ИМТЭК, Россия). Препараты заключали под покровное стекло в раствор глицерина и PBS (1:1) и анализировали под инвертированным микроскопом Axiovert 40CFL (Zeiss, Германия) при длине волны 488 нм.

**Статистическая обработка результатов.** Количество клеток в бластоцисте подсчитывали с помощью компьютерной программы анализа изображения для цитофотометрии PhotoM. Статистическую обработку результатов проводили путем вычисления средних арифметических значений и среднего квадратичного отклонения, используя компьютерные программы Sigma Plot и Microsoft Office Excel. Для оценки статистической значимости различий в группах сравнения использовали t-критерий Стьюдента.

### **Результаты и их обсуждение**

Для ответа на вопрос, влияет ли процедура МИ на развитие доимплантационных эмбрионов инбредных линий мышей *in vitro*, во внутреннюю полость бластоцисты вводили в небольшом объеме (10 нл) растворы витальных красителей и/или сбалансированную по химическому составу МСВ. Использование витальных красителей было обусловлено тем обстоятельством, что процедура МИ требует постоянного визуального контроля проникновения растворов и/или клеток во внутреннюю полость бластоцисты, поскольку на этой стадии развития *z. pellucida* обладает повышенной эластичностью [4, 16]. Это позволяет ей глубоко вытягиваться за инъекционным капилляром внутрь эмбриона без нарушения целостности структуры внешней

оболочки. Кроме того, во время прохождения капилляра через плотный слой клеток ТБ, окружающих полость бластоцисты, велика вероятность растяжения и залипания плазматической мембраны на кончике капилляра, что может препятствовать проникновению жидкости и/или клеток в полость бластоцисты.

Было показано, что на стадиях средней и поздней бластоцисты введение во внутреннюю полость 10 нл растворов витальных красителей с помощью микроманипулятора TransferMan NK и инъекционного капилляра типа TransferTip-XR сопровождается прокалыванием *z. pellucida* без значительного нарушения морфологии эмбриона (рис. 1а-г). При этом оба красителя, 0,03% трипановый синий (рис. 1а-б) и 0,1% феноловый красный (рис. 1в-г), обнаруживаются в полости бластоцисты. После удаления инъекционного капилляра из полости бластоцисты остаются хорошо различимыми наружный слой ТБ и компактно расположенная в полости бластоцисты группа мелких клеток ВКМ (рис. 1б, г). А это означает, что на стадии бластоцисты мышинные эмбрионы могут сами регулировать свой объем и поддерживать клеточную структуру. Избыток жидкости, который не вмещается в полости бластоцисты и/или является критичным для сохранения морфологии бластоцисты, выходит через отверстие в области прокола в перивителлиновое пространство, затем – в окружающую среду (рис. 1а, в). Можно предположить, что таким способом бластоцисты мышей уравнивают осмотическое давление во внутренней полости, перивителлиновом пространстве и во внешней среде, что является одним из условий поддержания морфологии во время проведения МИ.

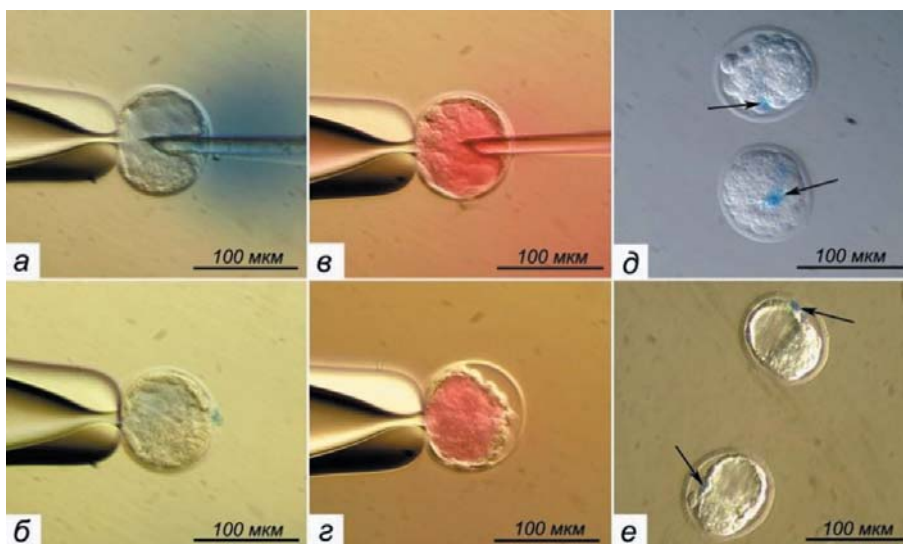


Рис. 1. Микроинъекция в полость бластоцисты витальных красителей (*a, б* – 0,03% трипанового синего; *в, з* – 0,1% фенолового красного); морфология бластоцисты сразу после микроинъекции 10 нл модифицированной среды Виттена (МСВ) (*д*) и через 24 ч культивирования (*е*) (тест с использованием 0,3% трипанового синего на выявление поврежденных клеток). Стрелками показаны нежизнеспособные клетки с поврежденными плазматическими мембранами по ходу прокола.

После снятия бластоцисты с фиксирующей присоски происходит резкое сокращение объема бластоцисты в результате быстрого выхода избытка жидкости из внутренней полости в перивителлиновое пространство. В этом случае наблюдаются структурные перестройки, сопровождающиеся исчезновением полости бластоцисты и перераспределением клеток ВКМ и ТБ относительно друг друга. На рис. 1д видно, что после МИ бластоцисты по своей морфологии соответствуют стадии компактной морулы: у них отсутствует полость, хорошо обозначено перивителлиновое пространство, отчетливо выделяются отдельные крупные клетки округлой формы – бластомеры. Аналогичные изменения происходят с бластоцистами после МИ в полость таких же объемов МСВ.

Наблюдаемые изменения морфологии после МИ растворов красителей (рис. 1д) нивелируются через 24 ч инкубирования в МСВ. В течение этого времени «компактные морулы» достигают стадии средней бластоцисты (рис. 1е). Восстанавливается полость, происходит разделение клеток на внешний слой ТБ и расположенную на одном из полюсов эмбриона группу клеток ВКМ. Было также установлено, что в ходе МИ повреждаются в основном клетки по ходу прокола (рис. 1д, обозначены стрелками). Другое, не менее важное, наблюдение касается автономной регуляции доимплантационного развития *in vitro*. Поврежденные и нежизнеспособные клетки, пропускающие витальный краситель трипановый синий, смещаются в направлении ТБ и через 24 ч инкубирования в МСВ обнаруживаются в перивителлиновом про-



странстве (рис. 1е). Они не принимают участия в дальнейшем развитии.

Изучение динамики восстановления морфологии инъецированных бластоцист путем их окрашивания трипановым синим свидетельствует о выходе этого красителя из полости бластоцисты в течение первых 3 ч инкубирования в МСВ (рис. 2). К этому времени в бластоцистах обнаруживается не более 10% поврежденных и нежизнеспособных клеток с нарушенными барьерными свойствами плазматических мембран. При увеличении длительности инкубирования их доля прогрессивно снижается, как мы полагаем, за счет отторжения в перивителлиновое пространство. При этом показано, что состав инъекционной среды (0,03% трипановый синий и/или МСВ) не влияет на физические характеристики восстановления морфологии бластоцист (рис. 2). В обоих вариантах МИ нежизнеспособные клетки обнаруживались только у 1/3 бластоцист ( $31,0 \pm 6,9\%$ ). Их количество из расчета на одну бластоцисту через сутки культивирования в МСВ составляет  $4,7 \pm 1,9\%$

от общей клеточной численности на этой стадии развития (рис. 2).

Динамика восстановления морфологии бластоцисты после МИ, место локализации поврежденных клеток по ходу прокола и последующее их отторжение в перивителлиновое пространство указывают на пластичность морфологии и устойчивость мышинных эмбрионов на стадии бластоцисты к осмотическому и механическому стрессу, вызванному этой процедурой. Компенсаторные механизмы позволяют бластоцистам восстанавливать после МИ не только морфологию, но и устранять поврежденные клетки из участия в процессах развития. Специфика этой стадии такова, что сама процедура введения дополнительного объема жидкости во внутреннюю полость (в т.ч. и 0,03% раствора трипанового синего) не приводит к снижению потенциала к последующему развитию до стадии выхода бластоцисты из *z. pellucida* и образования ПК *in vitro* (табл. 1).

Из результатов, представленных в табл. 1, становится очевидным, что после МИ 0,03% раствора трипанового синего

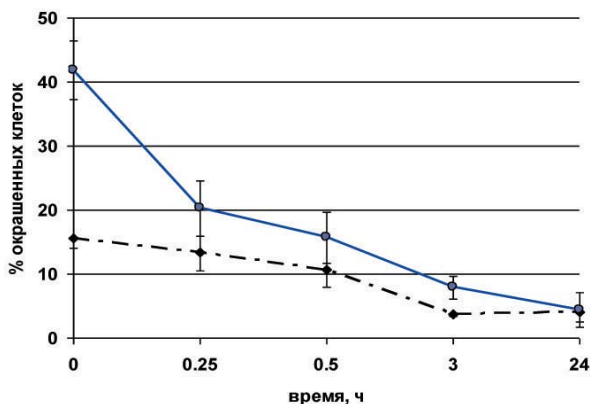


Рис. 2. Диффузия витального красителя трипанового синего и изменение количества окрашенных клеток после микроинъекции в полость бластоцисты среды Витгена (черная пунктирная линия) и 0,03% трипанового синего (синяя линия).

Таблица 1

Эффективность культивирования бластоцист мышей линии SHK после микроинъекции в полость 0,03% раствора трипанового синего

Группы	Количество бластоцист <i>in vitro</i>	% первичных колоний <i>in vitro</i>		
		48 ч	72 ч	96 ч
МИ, 0,03% трипановый синий (опыт)	56	65,5±1,7	70,1±1,9*	72,9±2,0*
Интактные бластоцисты (контроль)	38	61,2±3,7	45,8±2,1	43,8±3,1

Примечание: в полость каждой бластоцисты вводили 10 нл 0,03% раствора трипанового синего в модифицированной среде Виттена с органическим буфером Hepes (pH 7,2).

\* – различия между опытной и контрольной группами зародышей ( $t_s=2,6$ ;  $p<0,04$ ).

эффективность образования ПК повышается примерно в 2 раза по сравнению с интактными бластоцистами в контроле. Аналогичная картина выявляется у мышей линии NMRI после МИ в полость бластоцисты 10 нл МСВ (табл. 2).

Сравнительный анализ эмбрионов инбредных мышей линий NMRI, SHK и 129/Sv по их способности к хетчингу и продукции ПК в условиях *in vitro* (рис. 3А) свидетельствует о стимулирующем влиянии процедуры МИ на эти процессы (рис. 3Б). У разных

линий мышей механический прокол *z. pellucida* способствует выходу бластоцисты через поврежденную оболочку, в результате чего повышается вероятность образования ПК. Следует также отметить, что после МИ нивелируют межлинейные различия по способности бластоцист продуцировать ПК *in vitro*.

Обращает на себя внимание тот факт, что хетчинг у всех трех исследованных нами линий мышей в опыте и контроле происходит примерно в одно и то

Таблица 2

Эффективность культивирования *in vitro* бластоцист мышей линии NMRI после микроинъекции в полость модифицированной среды Виттена

Группы	Количество эксплантированных бластоцист в культуру	Доля бластоцист в виде первичных колоний <i>in vitro</i> , %		
		2 суток	3 суток	7 суток
Инъекция 10 нл МСВ (опыт)	147	97,6±2,4*	90,1±5,7*	88,7±7,0*
Интактные бластоцисты (контроль)	82	69,1±2,2	51,5±8,4	47,3±21,3

Примечание: МСВ – модифицированная среда Виттена.

\* – достоверность различий между бластоцистами в опытной и контрольной группах ( $t_s=2,0$ ;  $p<0,07$ ).

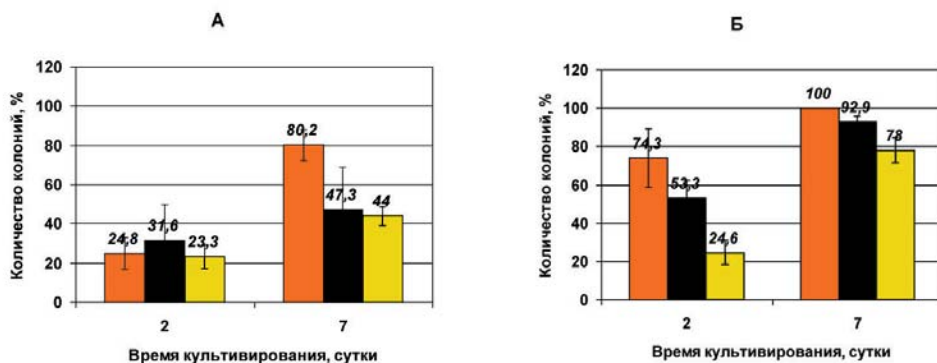


Рис. 3. Количество адгезивных бластоцист после выхода из *z. pellucida* и первичных колоний клеток ВКМ и ТБ на 2-е и 7-е сутки культивирования соответственно: А – интактные бластоцисты, Б – после микроинъекции в полость бластоцисты 10 нл модифицированной среды Виттена (МСВ).

■ – линия 129/Sv, ■ – NMRI, ■ – SHK.

же время – как правило, на 2-е сутки культивирования (рис. 3А, Б). К этому времени из оболочки выходит не более 20-30% интактных бластоцист, способных к адгезии и последующему росту в виде ПК. После МИ процессы хетчинга усиливаются у мышей 129/Sv и NMRI (74 и 53% соответственно). В контроле максимальное количество ПК обнаруживается на 7-е сутки культивирования у мышей 129/Sv (80,2±7,9%), что достоверно выше, чем у мышей линий NMRI и SHK ( $p < 0,01$ ). После МИ эффективность формирования ПК из бластоцист мышей линий NMRI и SHK достигает 93 и 78% соответственно, что близко к уровню колониеобразования (80-100%) у мышей линии 129/Sv (рис. 3Б).

Хетчинг и способность бластоцист инбредных линий мышей к адгезии и росту в виде ПК являются объективными характеристиками морфофункционального состояния *in vitro*. Оба показателя демонстрируют готовность эмбриона к имплантации. Согласно нашим наблюдениям, из адгезивных бластоцист, лишенных *z. pellucida* (рис. 4б), вначале мигрируют

клетки ТБ. Они создают фидерную подложку для клеток ВКМ, расположенных в центре ПК (рис. 4а-в). Результаты тестирования на выявление факторов стволовых клеток, ЭЩФ и Nanog, подтверждают гетерогенность ПК по клеточному составу (рис. 4в-е). Полярные клетки ТБ не обнаруживают активности ЭЩФ (рис. 4г), но они продуцируют транскрипционный фактор плюрипотентных клеток Nanog (рис. 4е), указывающий на способность дифференцироваться в составе химерного эмбриона [7, 10, 15].

В литературных данных есть свидетельства о дифференцировке клеток ТБ в гигантские трофобластические клетки [11]. На стадии бластоцисты выделяют трофобластические линии стволовых клеток [6, 11, 18, 23]. Более того, усиление продукции транскрипционного фактора Nanog используют в трансгенных конструкциях для получения генетически стабильных линий ЭСК мыши и человека [7, 15]. Высокая активность этого фактора сдвигает развитие клеток ВКМ в направлении внезародышевой энтодермы [15]. Схожие процессы про-

исходят с клетками ВКМ в составе целого эмбриона в зависимости от места их расположения и локальных взаимодействий с клетками ТБ [20].

Таким образом, с помощью техники МИ и последующего культивирования инъецированных бластоцист в МСВ, можно значительно повысить эффективность образования в культуре ПК – источников Nanog-позитивных клеток ВКМ и ТБ (рис. 4е). В этом плане перспективы метода МИ очевидны (рис. 3Б) как для

создания новых экспериментальных моделей, так и для успешного выделения Nanog-позитивных клеточных линий из мышей с разным генотипом. Сама процедура МИ, сопровождающаяся проколом внешней оболочки и кратковременным механическим/осмотическим стрессом, вызывает обратимые структурные перестройки и не приводит к остановке развития (табл. 1, 2). К настоящему времени установлено, что нарушение целостности *z. pellucida* или даже отсутствие та-

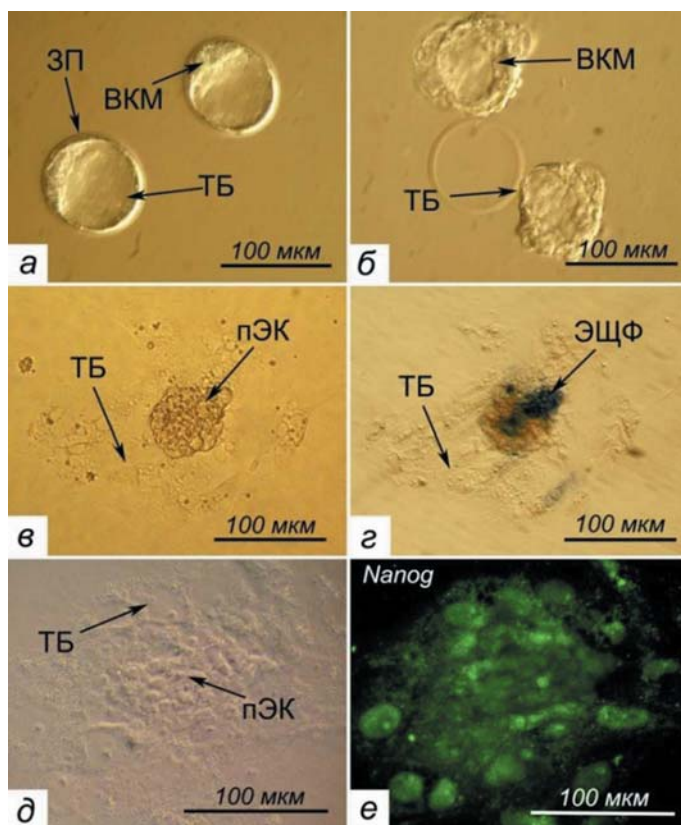


Рис. 4. Морфология эмбрионов мышей линии NMRI: а – интактные бластоцисты (стадия поздней бластоцисты); б – на 2-е и в, д – 7-е сутки культивирования в модифицированной среде Виттена с 10% фетальной сыворотки телят и 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF мыши; г – окрашивание ЭЩФ; е – иммуноцитохимическое выявление транскрипционного фактора стволовых клеток Nanog.

ЗП – зона пеллюцида (*zona pellucida*), ВКМ – клетки внутренней клеточной массы, ТБ – клетки трофобласта, пЭК – первичные эмбриональные клетки – производные клеток ВКМ, ЭЩФ – эндогенная щелочная фосфатаза.

ковой не являются препятствием для успешного развития бластоцист после трансплантации в матку приемным матерям [12, 22]. В репродуктивной медицине известны приемы для создания механических отверстий в *z. pellucida*, чтобы облегчить хетчинг эмбрионов с целью повышения их выживаемости после низкотемпературной консервации в жидком азоте и трансплантации [2].

Прокол *z. pellucida* во время проведения МИ делает бластоцисты инбредных линий NMRI и SHK более доступными для выделения клеток ТБ и ВКМ с высокой активностью фактора Nanog (табл. 1 и 2, рис. 4е). В условиях *in vivo* хетчинг происходит на стадии бластоцисты при участии клеток ТБ, контролирующими ионный транспорт и перенос воды в полость бластоцисты [5, 21, 24]. Они играют ключевую роль в регулировании объемного гомеостаза после МИ и кратковременного осмотического стресса [4], первыми мигрируют из *z. pellucida* и формируют фидерную подложку для клеток ВКМ в составе ПК (рис. 4в-е). Высокая пролиферативная активность и миграционная способность клеток ТБ необходимы как для поддержания и восстановления морфологии бластоцисты после МИ, так и для последующего развития бластоцист *in vitro*.

### **Заключение**

Таким образом, МИ небольших объемов сбалансированных по солевому составу сред и/или растворов витальных красителей (10 нл) может служить вспомогательным приемом для более эффективного выделения ПК из бластоцист мышей с разным генотипом, а также делает процедуру выделения клеток ВКМ и ТБ более доступной и эффективной.

Такой подход может иметь решающее значение для создания новых клеточных линий и технологий для медико-биологических исследований.

### **Список литературы**

1. **Межевкина Л.М., Федорова В.В., Капралова И.В., Фесенко Е.Е.** Повышение выживаемости доимплантационных зародышей мыши в среде с рекомбинантным цитокином LIF // *Онтогенез*. 2006. Т. 37. № 1. С. 55-62.
2. **Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я.** Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий // *Онтогенез*. 2012. Т. 43. № 5. С. 309-319.
3. **Сахарова Н.Ю., Межевкина Л.М., Смирнов А.А., Вихлянцева Е.Ф.** Анализ действия синего света на морфофункциональное состояние бластоцист при культивировании *in vitro* с использованием мышей, несущих ген улучшенного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2014. № 1. С. 52-56.
4. **Храмцова Е.А., Межевкина Л.М., Фесенко Е.Е.** Роль клеток трофобласта в регуляции выживаемости бластоцист мыши *in vitro* после микроинъекции и осмотического шока // *Биофизика*. 2014. Т. 49. Вып. 2. С. 314-321.
5. **Barcroft L.C., Offenberger H., Thomsen P., Watson A.J.** Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitations // *Dev. Biol.* 2003. V. 256. Pp. 342-254.
6. **Buecker C., Chen H.H., Polo J.M., Daheron L., Bu L., Barakat T.S., Okwieka P., Porter A., Gribnau J., Hochedlinger K., Geijsen N.** A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 6. № 6. Pp. 535-546.
7. **Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A.** Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell*. 2003. V. 113. Pp. 643-655.
8. **Fedorov L.M., Haegel-Kronenberger H., Hirschenthal J.** A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants // *Transgenic Research*. 1997. V. 6. Pp. 223-231.
9. **Gao S., McGarry M., Ferrier T., Pallante B., Gasparri B., Fletcher J., Harkness L., De Sousa P., McWhir J., Wilmut I.** Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line // *Biol. reprod.* 2003 V. 68. № 2. Pp. 595-603.
10. **Guo J., Jauch A., Holtgreve-Grez H., Schoell B., Erz D., Schrank M., Janssen J.W.G.** Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells *in vitro* // *Cell. devel. biol. animal*. 2005. V. 41. Pp. 278-283.

11. Hanna J., Chenga A.W., Saha K., Kim J., Lenger C.J., Soldner F., Cassidy J.P., Muffat J., Carey B.W., Jaenisch R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 20. Pp. 9222-9227.
12. Hwang W.S., Lee E., Chung Y., et al. Intactness of zona pellucida does not affect the secretion of a trypsin-like protease from mouse blastocyst // J. Korean. med. sci. 2000. V. 15. № 5. Pp. 529-532.
13. Kawase E., Suemori H., Takahashi N., Okazaki K., Hashimoto K., Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines // Int. J. dev. biol. 1994. V. 38. № 2. Pp. 385-390.
14. Kim H.S., Oh S.K., Park Y.B., Ahn H.S., Kim S.H., Kim D.-W., Moon S.Y. Methods for derivation of human embryonic stem cells // Stem cells. 2005. V. 23. Pp. 1228-1233.
15. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells // Cell. 2003. V. 113. Pp. 631-642.
16. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual // Cold spring harbor laboratory press. - New York. 2003.
17. Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor // Cell. 1998. V. 95. № 30. Pp. 379-391.
18. Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst // Stem Cells. 2001. V. 19. Pp. 477-482.
19. Suzuki H., Kamada N., Ueda O., Jishage K., Kurihara Y., Kurihara H., Terauchi Y., Azuma S., Kadowaki T., Kodama T., Yazaki Y., Toyoda Y. Germ-line contribution of embryonic stem cells in chimeric mice: influence of karyotype and *in vitro* differentiation ability // Exp. Anim. 1997. V. 46. № 1. Pp. 17-23.
20. Tam P.P., Zhou S.X. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo // Dev. biol. 1996. V. 178. № 1. Pp. 124-132.
21. Watson A.J., Barcroft L.C. Regulation of blastocyst formation // Frontiers in Bioscience. 2001. V. 6. Pp. 708-730.
22. Wiemer K.E., Garrisi J., Steuerwald N., et al. Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in vitro fertilization patients // Hum. reprod. 1996. V. 11. № 11. Pp. 2429-2433.
23. Yagi R., Kohn M.J., Karavanova I., Kaneko K.J., Vullhorst D., DePamphilis M.L., Buonanno A. Transcription factor TEAD4 specifies the trophoblast lineage at the beginning of mammalian development // Development. 2007. V. 134. Pp. 3827-3836.
24. Yamanaka Y., Ralston A., Stephenson R.O., Rossant J. Cell and molecular regulation of mouse blastocyst // Developmental dynamics. 2006. V. 235. № 9. Pp. 2301-2314.

## Microinjection as a method to increase the efficiency of isolation of primary colonies from inbred mice blastocysts *in vitro*

L.M. Mezhevikina, E.V. Khramtsova, T.I. Smolikhina, I.V. Kapralova, G.Yu. Kosovsky

We have estimated a perspective of the microinjection (MI) for isolation from blastocysts inbred mouse cells of the innercell mass (ICM) and trophoblast (TB) – sources of new stem cell lines of embryonic origin. It is shown that microinjection into the cavity of the blastocyst 10nl Witten's medium and/or vital dyes (0.03% trypan blue and 0.1% phenol red) leads to damage of not more than 4-5% of the cells. In the process there are visible changes in the morphology of the blastocyst, which are almost completely leveled out during the first 24 h of incubation in the Witten's medium.

It was revealed that microinjection procedure doesn't affect the subsequent development of the injected blastocyst to stage of primary colonies formation *in vitro* as a single population of interacting innercell mass and trophoblast. It's also shown that the mechanical puncture of shiny shell (zona pellucida) and osmotic shock from the introduction of excessive amounts of fluid into the internal blastocyst cavity contribute to blastocyst outputting from zona pellucida and to colony formation (for NMRI and SHK cell lines up to 93 and 78 to 47 and 44% in control, respectively).

Thus, microinjection small volumes of medium balanced by salt composition and/or solutions of vital dyes (less than 10 nl) can serve a sauxiliary method to increase the efficiency of isolation of primary colonies from inbred mice blastocysts with different genotype and to create new experimental models for biomedical research.

**Key words:** microinjection, stage of blastocyst, cells of the inner cell mass, trophoblast.



## Влияние ритмической транскраниальной электростимуляции структур головного мозга на процессы восстановления функционального состояния здоровых добровольцев после истощающих физических нагрузок

Е.Б. Шустов<sup>1</sup>, И.А. Берзин<sup>2</sup>, А.А. Благинин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – Федеральное медико-биологическое агентство России, Москва

<sup>3</sup> – ФГБОУ ВПО «Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина», Санкт-Петербург

Контактная информация: д.м.н. Шустов Евгений Борисович, [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

Исследовано влияние ритмической транскраниальной электростимуляции структур головного мозга на динамику процессов восстановления функционального состояния нервной, сердечно-сосудистой и дыхательной систем после шестичасовых физических нагрузок у здоровых добровольцев. Показано, что применение методов ритмической транскраниальной электростимуляции мозга для восстановления функционального состояния у людей с выраженным физическим утомлением обеспечивает формирование положительной динамики показателей субъективного состояния, центральной нервной, сердечно-сосудистой и мышечной систем, а также физиологических резервов.

**Ключевые слова:** функциональное состояние, восстановление, физическая нагрузка, ритмическая транскраниальная электростимуляция.

### Введение

В современных условиях эффективность деятельности различных специалистов напрямую связана с их уровнем саморегуляции и умением поддерживать оптимальное функциональное состояние, связанное с мобилизацией и распределением ресурсов организма и психики. В связи с этим повышение эффективности деятельности специалистов может быть обеспечено разработ-

кой новых эффективных технологий нейромодуляции, основанной на биоуправлении. Такие технологии, с одной стороны, являются средством увеличения профессиональной эффективности в условиях чрезмерных физических и психологических нагрузок, а, с другой стороны, – средством сверхбыстрой, экономичной и индивидуально-ориентированной тренировки и реабилитации.

Основной сложностью модуляции различных функциональных состояний является определение физических аналогов физиологических реакций, специфических для каждого из компонентов векторной модели: уровня возбуждения, фокуса первой сигнальной системы и фокуса второй сигнальной системы [10]. При этом уровень возбуждения нервной системы напрямую зависит от соотношения процессов возбуждения и торможения, осуществляющихся в нервной ткани, и потому рассматривается нами как интегральный показатель общей активации нервной системы, которая определяется по данным электроэнцефалограммы. Фокусы первой и второй сигнальных систем не удается соотнести с каким-либо измеряемым техническими методами физиологическим маркером. Это связано с подвижностью фокусов этих систем и их непрерывной динамикой.

Такие физиотерапевтические методы, как транскраниальная микрополяризация, транскраниальная магнитная стимуляция и электростимуляция, исследуются с точки зрения их применения в целях коррекции функциональных состояний [2]. Анализ безопасности и эффективности физиотерапевтических методов воздействия показал, что только некоторые методы электромагнитного воздействия могут применяться для коррекции функциональных состояний здоровых людей [3].

Показано, что максимум тока, проникающего внутрь черепа, соответствует расположению отделов, прилежащих к основанию черепа. Подача тока при височно-затылочном расположении каждой пары электродов в большей или меньшей степени охватывает весь го-

ловной мозг. Для токов низкой частоты среди образований ЦНС наибольшей электропроводностью обладает серое вещество мозга и цереброспинальная жидкость, т.е. более интенсивно их действие на подкорковые отделы головного мозга, прилежащие к основанию, где расположены главные питающие мозг артерии и пространства, заполненные ликвором. Ориентируясь на данные об относительном действии тока на различные образования в основании мозга, можно связать механизм электротранквилизации с преимущественным действием электрического тока на образования зрительного бугра, ретикулярной формации ствола головного мозга, гипоталамус, центральное серое вещество в окружности сильвиева водопровода [9]. При этом, в связи с развитием парабриоза в восходящей активирующей системе, приток афферентных импульсов в кору уменьшается, тонус падает. Вследствие деафферентации в коре создаются условия для развития процессов торможения. Анальгетическое действие электротранквилизации связано с возбуждением лимбических структур, которые, в свою очередь, блокируют восходящие активирующие влияния ретикулярной формации на кору головного мозга, что и ведет к окончательной деафферентации коры [7]. Центральное серое вещество окружности сильвиева водопровода – одно из образований, подвергающееся преимущественному действию тока, оказывает тормозное влияние на кору сенсомоторной области, блокируя на корковом уровне специфическую афферентацию. Возбуждением и постепенным развитием парабриотического торможения в области ретикулярной формации продолговатого мозга



и гипоталамуса объясняются сопровождающие электротранквилизацию вегетативные и эндокринные сдвиги [8].

Несмотря на то, что методы ритмической транскраниальной электростимуляции достаточно широко применяются в клинической практике для лечения различных невротических и астено-невротических состояний, в практике восстановительной медицины их применение после истощающих длительных физических нагрузок изучено явно недостаточно [4].

В связи с этим, **целью** настоящего исследования было выявление особенностей влияния ритмической транскраниальной электростимуляции на функциональное состояние здоровых добровольцев после истощающих физических нагрузок.

### **Материалы и методы**

Исследование динамики функционального состояния выполнено на группе из 50-ти здоровых добровольцев-мужчин в возрасте 18-24 лет, регулярно занимающихся спортом и не имеющих медицинских ограничений к выполнению физических нагрузок.

Физическая нагрузка задавалась последовательным циклическим выполнением работы на комплексе спортивных тренажеров. Каждый участник исследования работал с персонально подобранным утяжелением. Тяжесть нагрузки задавалась изменением груза на тренажере в ходе предварительного обследования так, чтобы на пределе возможностей человек мог выполнить 12-15 типичных для данного тренажера движений. Последовательность прохождения тренажеров обеспечивала рав-

номерное распределение нагрузки на все основные группы мышц. Интервал времени между прохождением тренажеров составлял 5 мин. Режим водопотребления был свободным.

Оценка функционального состояния добровольцев проводилась в ходе фонового обследования перед первым циклом нагрузок, после завершения последующего цикла работы на тренажерах и через 1 ч восстановительного периода.

Для оценки реактивной тревожности применялась шкала Ч.Д. Спилбергера в модификации Ю.Л. Ханина. Для оценки показателей субъективного состояния обследуемых использовался тест оценки самочувствия, активности и настроения (САН). Наряду с этим, обследуемые должны были оценить степень утомления (состояние усталости) по десяти-балльной шкале [1].

Для характеристики кардиореспираторной системы определялись ЧСС, проба  $PWC_{170}$  с использованием велоэргометра, форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1 с ( $ОФВ_1$ ) с помощью прибора КТД-8, пробы Штанге и Генча.

Исследование психофизиологических функций включало определение латентного периода простой сенсомоторной реакции (ПСМР), критической частоты слияния световых мельканий (КЧСМ), треморометрии, динамометрии. Для оценки статокINETической устойчивости проводилась шаговая проба, предложенная Фукудой (1959 г.), в модификации В.И. Копанева (1965 г.) [6].

По результатам фонового обследования участвующие в исследовании добровольцы были разделены на контрольную (36 чел.) и основную (14 чел., с применением в восстановительном пе-

риоде транскраниального электроцеребрального воздействия) группы. Неравноценность групп по численности была связана с техническими ограничениями по возможности одновременного выполнения транскраниального электроцеребрального воздействия большому числу добровольцев.

Транскраниальное электроцеребральное воздействие осуществлялось с помощью прибора ЭГСАФ-01 в режиме переменной скважности, частота следования импульсов: 900-1000 Гц, длительности импульса: 0,2 мс, сила тока: 0,6-1,5 мА при лобно-затылочном наложении парных электродов (экспозиция – 30 мин). В первые 15 мин воздействие прямоугольными импульсами сочеталось с дополнительной постоянной составляющей [5].

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью приложения «Пакет анализа» к процессору таблиц Microsoft Office Excel 2010,

достоверность различий между группами оценивалась методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

### Результаты и их обсуждение

Оценка восстановления функционального состояния после шестичасовой интенсивной физической нагрузки, которая вызывала развитие острого утомления, выявила различную динамику психофизиологических показателей в контрольной и основной группах (табл.).

Под воздействием ритмической транскраниальной электростимуляции субъективная оценка самочувствия, активности, настроения возросли соответственно на 8,3; 17,9 и 12,7%, в то время как в контрольной группе они увеличились на 3,2; 16,3 и 5,2% соответственно. В это же время показатель утомления снижался на 28,8 и 22,8% в основной и контрольной группах соответственно. Полученные данные сви-

Таблица  
Динамика показателей субъективного состояния и психофизиологических функций в процессе восстановления работоспособности после шестичасовой физической нагрузки

Показатель	Основная группа (n=14)		Контрольная группа (n=36)	
	после нагрузки	после восстановления	после нагрузки	после восстановления
Утомление, баллы	5,7±0,5	4,1±0,5	6,2±0,3	4,8±0,4
Самочувствие, баллы	6,7±0,4	7,4±0,4	6,9±0,2	7,2±0,3
Активность, баллы	6,0±0,4	7,1±0,4	5,7±0,4	6,6±0,3
Настроение, баллы	7,3±0,4	8,2±0,4	6,9±0,3	7,3±0,3
ФЖЕЛ, л	6,4±0,3	8,2±0,3*	6,4±0,2	8,0±0,3*
ОФВ <sub>1</sub> , л/с	5,5±0,3	6,9±0,3*	5,8±0,2	6,9±0,3*
ЧСС, уд./мин	93,1±4,2	84,3±3,7	95,2±2,5	91,5±2,5
Проба Штанге, с	63,0±5,2	65,3±0,4	72,8±4,3	71,0±3,1
PWC <sub>170</sub> , Вт	136±9	145±11	133±6	138±6
Шаговая проба, см	32,9±10,8	17,5±4,9	25,8±4,8	22,3±4,3

Примечание: \* – p<0,01.

детельствуют о том, что однократный 30-минутный сеанс ритмической электростимуляции подкорковых структур мозга способствует более эффективно-му восстановлению самооценки состояния у людей с выраженным физическим утомлением.

В основной группе отмечалось более выраженное улучшение показателей внешнего дыхания. В частности, ФЖЕЛ и ОФВ здесь увеличились на 27,7 и 26,2% соответственно, тогда как в контрольной группе увеличение этих показателей после восстановления составило 24,7 и 19,1% соответственно. Время задержки дыхания при проведении пробы Штанге в основной группе увеличилось на 3,6%, в то время как в контрольной группе оно снизилось на 8%. Различная направленность в изменении времени задержки дыхания позволяет судить об эффективности ритмической транскраниальной электростимуляции для восстановления функциональных резервов кардиореспираторной системы.

У обследуемых основной группы ЧСС после восстановительной программы снизилась на 10%, а в контрольной группе – лишь на 4%, индекс  $PWC_{170}$  возрос в основной группе на 7%, а в контрольной – на 4%.

Восстановительные мероприятия обеспечили снижение линейного уклона при проведении шаговой пробы в основной и контрольной группах, но в первой – на 46,7%, а во второй – на 13,2%, что свидетельствует о лучшем восстановлении статокинетической устойчивости в основной группе.

В основной группе выявлена тенденция к снижению реактивной тревожности, о чем свидетельствует уменьшение показателя тревожности

на 5%, в то время как в контрольной группе этот показатель практически не изменялся.

По данным динамометрии, в периоде восстановления максимальное мышечное усилие представителей основной группы не ухудшалось, тогда как в контрольной группе – снижалось на 14%.

Важно отметить, что в состоянии острого физического утомления латентный период и устойчивость ПСМР, лабильность центрального звена зрительного анализатора сохранились на достаточно высоком уровне, чем, видимо, и объясняются незначительные сдвиги показателей этих функций.

Таким образом, в процессе восстановления всех обследуемых после острого физического утомления отмечалась положительная динамика психофизиологических показателей. Вместе с тем, использование ритмической транскраниальной электростимуляции у людей с острым физическим утомлением, по ряду показателей, характеризующих состояние дыхательной, сердечно-сосудистой, мышечной систем и субъективный статус, оказывало более выраженное положительное действие по сравнению с контрольной группой.

Сравнивая артериальное и пульсовое давления в основной и контрольной группах, значимых различий в их изменении не выявлено. Однако показатель среднего динамического давления в основной группе после восстановления не отличался от фонового, в то время как в контрольной группе – изменился на 6,3%, что свидетельствует о более быстром восстановлении нервно-гуморальной регуляции сердечно-сосудистой системы в основной группе.

## Заключение

Применение методов ритмической транскраниальной электростимуляции мозга для восстановления функционального состояния у людей с выраженным физическим утомлением обеспечивает формирование положительной динамики показателей субъективного состояния, центральной нервной, сердечно-сосудистой и мышечной систем, а также физиологических резервов.

## Список литературы

1. *Анастаси А.А.* Психологическое тестирование / пер. с англ. - М.: Педагогика, 1982. - Кн. 1. - 318 с.; кн. 2 - 295 с.
2. *Благинин А.А., Каптыгин М.В., Жильцова И.И.* Пограничные функциональные состояния организма операторов и методы их коррекции. - СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2014. - 172 с.
3. *Бобров А.А., Мизулина Е.В.* Применение центральной электроанальгезии в восстановительных мероприятиях спортивной медицины: методические рекомендации для врачей. - М., 1985. - 20 с.
4. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Чайванов Д.Б.* Релаксационная транскраниальная стимуляция головного моз-

га спортсменов: роль серотониновых механизмов // Биомедицина. - 2015. - № 2. - С. 4-14.

5. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А., Шустов Е.Б., Емельянов А.А., Емельянова А.Е.* Транскраниальная низкочастотная ритмическая электростимуляция структур головного мозга спортсменов для купирования гиперактивации нервной системы, модулируемой приемов больших доз кофеина в тренировочный и постсоревновательный периоды // Спортивная медицина: наука и практика. - 2015. - № 3. - С. 12-18.
6. *Копанев В.И.* Об упрощенных методах определения функционального состояния вестибулярного анализатора // Вопросы медицинского исследования и изучения летного состава. - М., 1965. - Вып. 23. - С. 32-36.
7. *Пинчук Д.Ю.* Транскраниальные микрополяризации головного мозга: клиника, физиология. - СПб: «Человек», 2007. - 496 с.
8. *Пономаренко Г.Н.* Физические методы лечения. - СПб. - 2002. - 306 с.
9. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации // Биомедицина. - 2011. - № 3. - С. 6-11.
10. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Трехмерная векторная модель функционального состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной стимуляции // Биомедицина. - 2013. - № 3. - С. 18-25.

## The influence of rhythmic transcranial electro-stimulation of the brain structures in the processes of the functional healthy state regeneration of volunteers after exhausting physical loads

E.B. Shustov, I.A. Berzin, A.A. Blaginin

The influence of rhythmic transcranial electrical stimulation of brain structures on the dynamics of processes of the functional state regeneration of the nervous, cardiovascular and respiratory systems after 6-hour physical activity in healthy volunteers was studied. It is shown that the application of methods of rhythmic transcranial electro-stimulation of the brain to restore functional status in individuals with determinate physical fatigue ensures the formation of positive dynamics of the subjective state indicators, the Central nervous, cardiovascular and muscular systems, and physiological reserves.

**Key words:** functional status, regeneration, physical exercise, rhythmic transcranial electro-stimulation.

## Метод одновременного определения кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Т.А. Родина<sup>1,2</sup>, Е.С. Мельников<sup>3</sup>, Н.А. Псарева<sup>3</sup>, А.В. Соколов<sup>1,3</sup>,  
В.В. Архипов<sup>1,2,3</sup>, Д.Л. Поздняков<sup>2</sup>, В.Г. Кукес<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> – ГБУЗ «ГКБ № 23 им. Медсантруд» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва

<sup>3</sup> – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.х.н. Родина Татьяна Александровна, rodina@front.ru

Разработана селективная, чувствительная и воспроизводимая методика количественного определения кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови человека методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с одновременным использованием электрораспыления (ESI) и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Пробоподготовка проводилась путём осаждения белков ацетонитрилом. Детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации путём мониторинга множественных реакций (MRM). Количественное определение проводили с использованием прометазина в качестве внутреннего стандарта. Калибровочная кривая носила линейный характер в диапазоне концентраций 5-1000 нг/мл для каждого препарата. Данная методика может быть использована для терапевтического лекарственного мониторинга.

**Ключевые слова:** кломипрамин, амитриптилин, прометазин, ВЭЖХ-МС/МС, персонализированная медицина, терапевтический лекарственный мониторинг.

### Введение

По данным ВОЗ, распространенность депрессий в развитых странах составила 28%. Около 121 млн чел. во всем мире страдают депрессивными расстройствами, теряя при этом трудоспособность [5].

Развитие соматоформных депрессий сопровождается целым рядом соматических заболеваний и является важной составляющей частью в патогенезе хронических болевых синдромов [1, 4].

Основные симптомы, позволяющие подтвердить диагноз депрессии, – такие как сниженное настроение, тревога, отсутствие интереса к окружающим

событиям, апатия, двигательная и идеаторная заторможенность, нарушение концентрации, заниженная самооценка, нарушение сна и отсутствие аппетита – подвергаются регрессу при лечении антидепрессантами – препаратами, влияющими на серотонинергическую и норадреналинергическую медиаторные системы [7, 10, 11].

Для лечения тяжелых депрессий и депрессий средней степени тяжести, как правило, применяются трициклические антидепрессанты (ТЦА) – амитриптилин, кломипрамин, имипрамин. Известно, что эти препараты обладают узким терапевтическим интервалом [6].

Часто при проведении терапии ТЦА возникают выраженные нежелательные лекарственные реакции (НЛР), такие как сонливость и слабость в течение дня, ортостатическая гипотензия, аритмии, сухость во рту, запоры, задержка мочеиспускания, нарушение аккомодации, увеличение массы тела, нарушения половой функции и др., вынуждая пациентов отказываться от применения ТЦА из-за их плохой переносимости. Известно, что выраженность НЛР может быть связана с дисфункцией ферментов системы цитохрома Р450, в результате которой нарушается метаболизм препаратов и происходит их кумуляция в крови [2, 12]. Следовательно, при лечении депрессий ТЦА необходимо учитывать индивидуальные особенности фармакокинетики назначаемых препаратов посредством проведения фармакокинетического анализа. Данный вид обследования позволит проводить терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) концентрации антидепрессантов в крови, контролировать режим дозирования препаратов, повышая при этом безопасность применения ТЦА.

Кломипрамин (рис. 1а) – 3-(3-хлоро-10,11-дигидро-5Н-дibenзо-[b, f]

азепин-5-ил)-N,N-диметилпропан-1-амин. Благодаря стимуляции адренергических и серотонинергических механизмов в ЦНС, оказывает антидепрессантный эффект при лечении навязчиво-компульсивных нарушений.

Амитриптилин (рис. 1б) – 5-(3-диметиламинопропилиден)-10,11-дигидродибензоциклогептен. Распространенный в нашей стране антидепрессант. Тимоаналептическое (антидепрессивное) действие сочетается у него с выраженным седативным, снотворным и анксиолитическим (противотревожным) эффектом, по причине не сильной холинолитической и антигистаминной активности. Является на сегодняшний день самым доступным и надёжным антидепрессантом.

От клинициста требуется, во-первых, добиться редукции и, во-вторых, определить минимальную дозу препарата, которая будет достаточна для контроля за депрессивной симптоматикой, но не будет вызывать дезадаптирующих побочных эффектов. Для решения этой задачи, особенно применительно к препаратам с узким терапевтическим диапазоном, необходимо проводить процедуру ТЛМ.

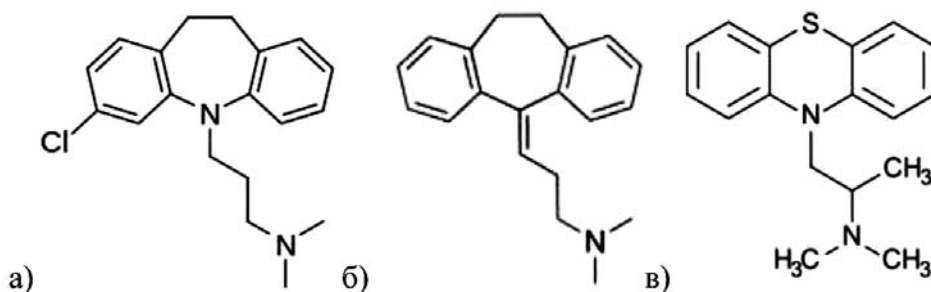


Рис. 1. Структурные формулы: а) кломипрамина, б) амитриптилина, в) прометазина.

**Целью** настоящего исследования явилась разработка методики одновременного количественного определения кломипрамина и amitриптилина при совместном присутствии в сыворотке крови человека с помощью ВЭЖХ-МС/МС для проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ).

### Материалы и методы

Жидкостный хромато-масс-спектрометр LCMS-8040 (система жидкостной хроматографии Nexera с тройным квадрупольным масс-спектрометром) фирмы Shimadzu (Япония), укомплектованный системой ионизации DUIS, т.е. одновременное использование двух методов ионизации (электрораспыление (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)) системой градиентного элюирования, УФ-спектрофотометрическим детектором SPD-M20A с диодной матрицей (диапазон длин волн 190-800 нм), термостатом колонок CTO-20AC с диапазоном температур 4-90°C.

Пробоподготовку и последующий ВЭЖХ МС/МС-анализ проводили с использованием реактивов: ацетонитрил LiChrosolv® Reag. Ph Eur (марки «gradient grade for liquid chromatography»), муравьиная кислота (Merck), деионизованная вода (удельное сопротивление – 18,2 МОм\*см). Для приготовления калибровочных растворов использовали: кломипрамин (Fluka), amitриптилин (Fluka), прометазин (внутренний стандарт) (Fluka), отвечающие требованиям USP. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор прометазина в ацетонитриле 1000 нг/мл.

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке ZORBAX Eclipse XDB-C18, 5 мкм, 150x4,6 мм (Agilent, США) при температуре 40°C. Подвижная фаза состояла из элюента А (0,1% муравьиной кислоты / деионизованная вода) и элюента В (0,1% муравьиной кислоты / ацетонитрил). Разделение проводилось в градиентном режиме элюирования (табл. 1). Скорость потока подвижной фазы – 0,8 мл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Таблица 1  
Градиент состава подвижной фазы

Время анализа, мин	Объемная доля элюента В, %
0,0 → 2,0	30 → 38
2,0 → 6,0	38 → 40
6,0 → 11,0	40 → 100
11,0 → 13,0	100
13,0 → 14,0	100 → 30

В режиме сканирования полного ионного тока (scan<sup>+</sup>) были выбраны ионы-предшественники: для кломипрамина – 315,10 m/z, amitриптилина – 278,10 m/z, прометазина – 285,10 m/z, что соответствует протонированным молекулярным ионам исследуемых веществ. Полученные ионы были обработаны в режиме сканирования фрагментных ионов (product scan<sup>+</sup>), после чего фрагментные ионы использовались для мониторинга множественных реакций (MRM<sup>+</sup>). Энергия соударений подбиралась экспериментально. В табл. 2 представлены параметры детектирования в режиме MRM<sup>+</sup>.

**Параметры детектирования амитриптилина, прометазина и кломипрамина  
в режиме MRM<sup>+</sup>**

№ п/п	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	Энергия соударений, В
Кломипрамина			
1	315,10	242,10	-28,0
2		227,10	-35,0
3		220,10	-35,0
4		192,10	-50,0
5		86,10	-20,0
Прометазина			
1	285,10	198,00	-30,0
2		86,00	-20,0
3		71,05	-50,0
Амитриптилина			
1	278,10	298,10	-25,0
2		191,10	-40,0
3		117,10	-35,0
4		105,10	-35,0

#### **Аналитическая методика**

К 200 мкл сыворотки крови пациента или 180 мкл чистой сыворотки с прибавлением 20 мкл стандартного раствора амитриптилина и кломипрамина добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор прометазина) с концентрацией 1000 нг/мл для получения в конечном образце концентрации прометазина 250 нг/мл, затем добавляли 550 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 1 мин на шейкере Vortex V-3 (Латвия), после чего центрифугировали 15 мин со скоростью 15000 об./мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5427. Надосадочную жидкость переносили в хроматографические флаконы и помещали в автосамплер. Объем ввода пробы – 10 мкл.

Учитывая данные о фармакокинетике кломипрамина и амитриптилина, количественное определение изучаемых

веществ проводили в диапазоне 5-1000 нг/мл.

#### **Валидация методики**

Валидация методики выполнена по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов [3, 8, 9].

Селективность методики оценивали при сравнении хроматограмм проб интактной («чистой») плазмы с прибавлением стандартных растворов кломипрамина, амитриптилина и прометазина с хроматограммами проб чистой плазмы. На хроматограмме пробы чистой плазмы не наблюдается пиков, соответствующих по временам удерживанию кломипрамину, амитриптилину и прометазину (рис. 2, 3).



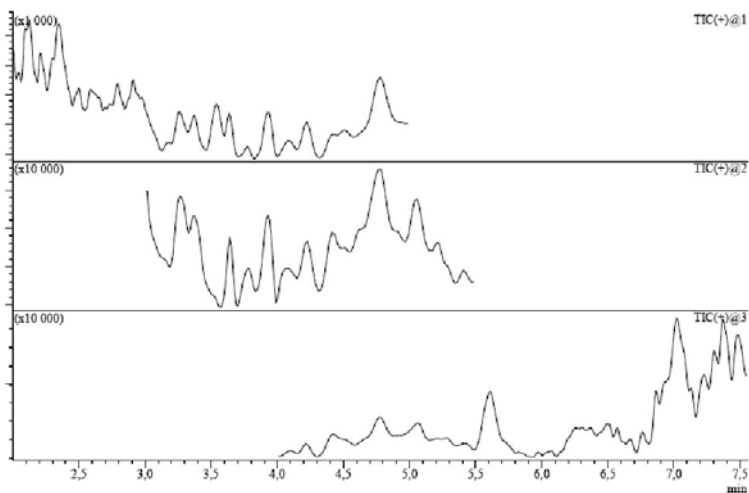


Рис. 2. Хроматограмма чистой сыворотки крови.

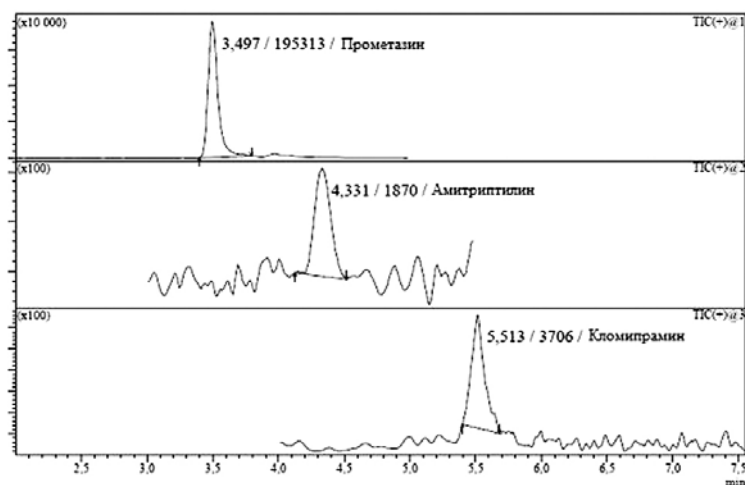


Рис. 3. Хроматограмма чистой сыворотки крови с прибавлением стандартного раствора кломипрамина и amitриптилина до концентрации 5,00 нг/мл в сыворотке крови.

При оценке линейности проводили анализ 7-ми проб чистой плазмы с добавлением стандартного раствора эналаприла и эналаприлата до получения концентраций 5, 50, 100, 250, 500, 750 и 1000 нг/мл. Построены калибровочные графики для amitриптилина (рис. 4) и кломипрамина (рис. 5). Уравнение калибровочной прямой для amitриптилина

имеет вид:

$$y = 0,411036 * x,$$

коэффициент корреляции (r) составляет 0,99406.

Уравнение калибровочной прямой для кломипрамина имеет вид:

$$y = 0,813638 * x,$$

коэффициент корреляции (r) составляет 0,99875.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанные по уравнениям линейной зависимости, укладываются в допустимые нормы отклонений ( $\pm 20\%$  для нижней точки аналитического диапазона и  $\pm 15\%$  для остальных точек).

При оценке правильности и прецизионности проводили анализ 4-х образцов чистой плазмы с прибавлением

стандартных растворов кломипрамина, амитриптилина до получения концентраций: 5, 50, 500, 1000 нг/мл. Анализ каждого раствора осуществляли по 5 раз в рамках двух аналитических циклов. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ( $\epsilon$ , %), приведенные в табл. 3 и 4.

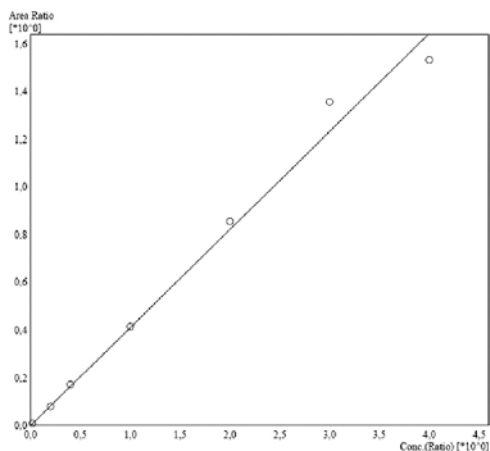


Рис. 4. Калибровочная прямая для амитриптилина.

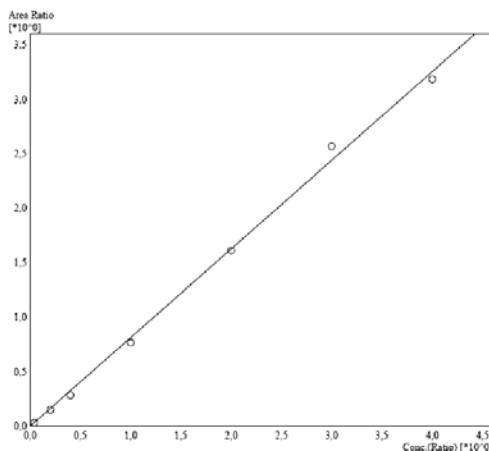


Рис. 5. Калибровочная прямая для кломипрамина.

Таблица 3

**Правильность и прецизионность методики внутри аналитического цикла**

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	$\epsilon$ , %
Кломипрамин				
5,00	4,60	0,30	6,58	-8,04
50,00	50,18	2,57	5,12	0,36
500,00	515,40	16,28	3,16	3,08
1000,00	1028,58	87,13	8,47	2,86
Амитриптилин				
5,00	4,79	0,46	9,59	-4,27
50,00	51,08	5,40	10,58	2,16
500,00	535,27	13,26	2,48	7,05
1000,00	1070,44	118,68	11,09	7,04

Таблица 4

Правильность и прецизионность методики между аналитическими циклами

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
Кломипрамин				
5,00	4,76	0,42	8,89	-4,88
50,00	49,68	2,43	4,89	-0,65
500,00	516,15	18,60	3,60	3,23
1000,00	1016,73	77,75	7,65	1,67
Амитриптилин				
5,00	4,95	0,40	8,12	-1,04
50,00	50,69	4,83	9,52	1,38
500,00	539,71	27,83	5,16	7,94
1000,00	1048,91	109,03	10,39	4,89

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация кломипрамина, amitриптилина в плазме, для которой возможно их количественное определение со значениями RSD и ε – не более 20% в диапазоне линейной зависимости. ПКО методики составил по 5 нг/мл для кломипрамина и amitриптилина.

Была подтверждена стабильность для стандартных растворов кломипрамина, amitриптилина и прометазина (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре 2-8°C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре 5°C), на уровнях концентраций 5 и 1000 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла замораживания/размораживания. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10%.

При последовательном анализе проб с концентрацией кломипрамина и amitриптилина 1000 нг/мл и чистой плазмы

на хроматограмме последней отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания кломипрамину, amitриптилину и прометазину. Таким образом, перенос пробы отсутствовал.

**Применение методики**

Разработанная методика была применена для определения концентраций кломипрамина и amitриптилина в сыворотке крови пациентов, госпитализированных в клинику психиатрии им. С.С. Корсакова ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России с депрессивными расстройствами и принимавших лекарственные препараты amitриптилина и/или кломипрамина.

Первый забор крови у пациентов производили непосредственно перед приёмом препаратов в клинике. Часть пациентов принимали amitриптилин и/или кломипрамин постоянно, ещё до поступления в клинику, что объясняет обнаружение их в исходных пробах. Повторно пробы отбирали через 2 недели непрерывного перорального приема amitриптилина и/или кломипрамина. Части пациентов в начале лечения была

назначена комбинированная терапия с использованием и кломипрамина, и амитриптилина, что объясняет обнаружение обоих препаратов в пробах.

### Результаты исследований

Полученные данные приведены в табл. 5, типичная хроматограмма представлена на рис. 6.

Таблица 5

**Индивидуальные концентрации кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови пациентов**

№ пациента	Концентрация кломипрамина в сыворотке крови, нг/мл	Концентрация амитриптилина в сыворотке крови, нг/мл
1	11,49	256,26
2	23,25	117,56
3	56,83	23,45
4	14,49	44,81
5	48,64	38,43
6	16,88	14,33

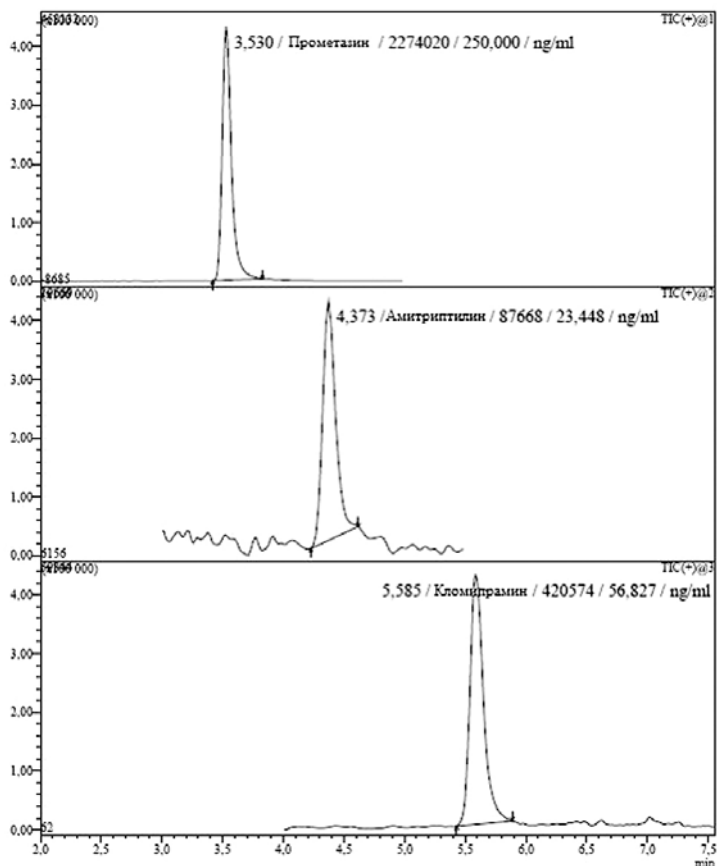


Рис. 6. Типичная хроматограмма пробы сыворотки крови (пациент № 3).

## Заключение

Разработана методика количественного определения кломипрамина и amitриптилина в сыворотке крови человека с использованием прометазина в качестве внутреннего стандарта. Методика селективна, имеет аналитический диапазон 5-1000 нг/мл для обоих определяемых веществ, относительное стандартное отклонение и относительная ошибка результатов измерений не превышают 11,09 и 8,04% соответственно. Настоящая методика позволяет одновременно определять кломипрамин и amitриптилин в сыворотке крови человека с целью проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

## Список литературы

1. *Акарачкова Е.С., Вершинина С.В.* Синдром вегетативной дистонии или депрессия? Депрессивные расстройства в общесоматической практике // РМЖ. - 2010. - Т. 1. - № 26.
2. *Кукес В.Г., Сычев Д.А., Гасанов Н.А.* Проблемы клинической фармакогенетики на современном этапе // Клиническая медицина. - 2007. - Т. 85. - № 2. - С. 58-63.
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств / под. ред. проф. А.Н. Миронова. Том I. - М.: Гриф и К, 2013. - 328 с.
4. *Смулевич А.Б., Дубницкая Э.Б., Дробизев М.Ю. и др.* Депрессии и возможности их лечения в общемедицинской практике (предварительные результаты программы ПАРУС) // Consilium-medicum. - 2007. - Т. 2. - № 2. - С. 23-25.
5. *Bromet E., Andrade L.H., Hwang I., Sampson N.A., Alonso J., de Girolamo G., de Graaf R., Demyttenaere K., Hu C., Iwata N., Karam A.N., Kaur J., Kostyuchenko S., Lepine J.-P., Levinson D., Matschinger H., Mora M.E.M., Browne M.O., Posada-Villa J., Viana M.C., Williams D.R., Kessler R.C.* Cross-National Epidemiology of DSM-IV Major Depressive Episode // BMC Medicine, 2011.
6. *Ciraulo D.A., Shader R.L., Greenblatt P.J.* Drug interactions in psychopharmacology. In: Manual of Psychiatric therapeutic. Ed. Shader R. Little Brown and Comp (Inc.). - 1994. No. 193. - P. 8.
7. *Coppen A.* The biochemistry of affective disorders // Brit. J. Psych. - 1967. - No. 113. - Pp. 1237-64.
8. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of health and human services, food and drug administration, Center for drug evolution and research (CDER). - Washington, DC: U.S. Government printing office, 2001.
9. Guideline on bioanalytical method validation, European medicines agency, committee for medicinal products for human use. - London, 2011.
10. *Hall H., Orgen S.O.* Effects of antidepressant drugs on different receptors in the brain // Eur. J. Pharmacol. - 1981. - No. 70. - Pp. 393-407.
11. *Lapin I.P., Oxenkrug G.F.* Intensification of the serotonergic processes as a possible determination of the thymoleptic effect // Lancet. - 1969. - No. I(7587). - Pp. 132-6.
12. *Murphy P.J.* The development of drug metabolism research as expressed in the publications of ASPET: Part 3, 1984-2008 // Drug metabolism and disposition. - 2008. - Vol. 36. - No. 10. - Pp. 1977-1982.

## Simultaneous determination of clomipramine and amitriptyline in human serum using HPLC-MS / MS

**T.A. Rodina, E.S. Melnikov, N.A. Psarev, A.V. Sokolov, V.V. Arhipov, D.L. Pozdnyakov, V.G. Kukes**

Selective, sensitive and reproducible method for the quantitative determination of amitriptyline and clomipramine in human serum by reversed-phase high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS / MS) using both electrospray (ESI) and chemical ionization at atmospheric pressure (APCI) was developed. Sample preparation was performed by protein precipitation with acetonitrile. Detection was performed in positive ionization mode by monitoring of multiple reactions (MRM). Quantification was performed using promethazine as internal standard. The analytical range of the method is 5-1000 ng / ml for each drug. This technique can be used for therapeutic drug monitoring.

**Key words:** clomipramine, amitriptyline, promethazine, HPLC-MS/MS, personalized medicine, therapeutic drug monitoring.



## Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами *NAT1* и *NAT2* человека

В.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, В.П. Рябых<sup>2</sup>, Л.А. Болотских<sup>1</sup>, Х.Х. Семенов<sup>1</sup>,  
Г.Д. Капанадзе<sup>1</sup>, Н.В. Петрова<sup>1</sup>, В.А. Езерский<sup>2</sup>, О.Б. Жукова<sup>2</sup>,  
Е.М. Колоскова<sup>2</sup>, С.В. Максименко<sup>2</sup>, В.Н. Столярова<sup>2</sup>, Т.П. Трубицина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных», Калужская область

Контактная информация: д.м.н. Каркищенко Владислав Николаевич, vlad1672@ya.ru

Усовершенствован способ вызывания суперовуляции у мышей-доноров, включающий синхронизацию половых циклов у самок-доноров, путём предварительной подсадки их к самцам через перегородку, который позволяет получать к определённому времени по 17 зигот на одного донора с хорошо видимыми пронуклеусами, пригодными для введения в них генно-инженерных конструкций.

Линейные фрагменты плазмидных генно-инженерных конструкций, включающих нуклеотидные последовательности генов *NAT1* и *NAT2* человека под промотором гена альбумина мыши (*hNAT1* и *hNAT2*), микроинъектировали в мужские пронуклеусы зигот, полученных от самок F1 гибридных мышей (СВА/лас \* C57BL/6).

При подготовке самок-реципиентов также был использован приём предварительной подсадки самок-реципиентов к вазэктомизированным самцам через перегородку, который способствовал стимуляции процесса фолликулогенеза и синхронизации половых циклов у самок-реципиентов. Это позволило получать большее количество псевдобеременных самок-реципиентов с копуляционными пробками к определённому времени, что является одним из критериев полноценности животного-реципиента и возможности успешной трансплантации ему эмбрионов, микроинъектированных генно-инженерными конструкциями. На основе этих приёмов разработан вариант модифицированной технологии получения трансгенных мышей с генами *NAT1* и *NAT2* человека.

**Ключевые слова:** трансгенные мыши *NAT1* и *NAT2*, трансплантация ДНК-конструкции, фолликулогенез, модификация технологии получения трансгенных мышей с генами человека.

### Введение

В наших предыдущих публикациях были представлены результаты исследований по поиску высокоспецифичных видовых праймеров к генам *NAT1* и *NAT2* для сравнительных исследо-

ваний у человека и лабораторных животных [2]. В других работах нами, на основе литературных данных и собственных исследований, проведен анализ успехов и неудач при получении трансгенных мышей с интегрирован-

ными генами NAT человека для использования их в качестве биомоделей при испытании фармакологической эффективности и токсичности лекарственных веществ [3].

Мышь является самой популярной моделью животных для изучения роли NAT. Изменчивость в активности N-ацетилирования среди некоторых линий мышей впервые наблюдалась более 20 лет назад [11], когда исследователи сообщили, что некоторые врожденные генетические деформации определяются для «медленных» ацетиляторов. Другие, часто используемые лабораторные штаммы (например, C57BL/6J, линии BALB/C, C3H/HeJ, CBA/J и DBA/J) показывали до 10-ти раз более высокую активность для субстратов NAT и были, таким образом, охарактеризованы как «быстрые» ацетиляторы. Скрещивания между «быстрыми» и «медленными» штаммами ацетиляторов давали пометы с промежуточным типом ацетилирования, предполагая наследование фенотипа ацетилирования на одном полиморфном аутомсомном локусе по ко-доминантному типу, как и у людей [11]. Ранние исследования также подтверждали присутствие мономорфного локуса, кодирующего второй NAT-изофермент с более высоким сродством к субстратам NAT [12].

Ферментативные свойства мышинных белков NAT и молекулярная основа полиморфизма ацетилирования были более понятны после клонирования NAT-генов от «быстрых» и «медленных» штаммов ацетиляторов [15, 16]. Были определены три гена с 870 bp безинтронным ORFs (обозначаются *NAT1*, *NAT2* и *NAT3*), кодирующие 290aa-полипептидные цепи

высоко гомологичных для человека NATs. Рекомбинантный продукт гена *NAT1* – N-ацетилированный изониазид, в то время как продукт *NAT2* имеет высокое сродство к p-ABA и p-анизидину (p-АНС). Оба рекомбинантных белка – N-ацетилированные 2-AF, но не SMZ [16]. В дополнение к их активности N-ацетилирования, NAT1- и NAT2-изоферменты также катализируют O- и N,O-ацетилтрансферазные реакции [10]. На сегодняшний день нет специфического субстрата или функции, которые бы были приписаны к мышинному NAT3-изоферменту, чья роль, таким образом, остается неясной [5, 8, 10, 15]. Однако, в отличие от «псевдогена» NATP1 у людей, ORF гена *NAT3* не прерывается нонсенс-мутациями [15, 16], предполагая, что он может кодировать функциональный белок.

Полиморфное ацетилирование ароматических аминов первоначально было связано с мышинным геном *NAT2*, который носит A296-T-бессмысленную мутацию у «медленных» ацетиляторов инбредных линий, таких как A/J [16]. Полученная Asn99-Иль-замена аминокислоты в белке NAT2 продемонстрировала снижение стабильности и, возможно, каталитической эффективности изофермента [7, 16]. Дополнительные полиморфизмы были недавно идентифицированы в гене *NAT2* дикого типа, получены инбредные линии, такие как *Muspretus* (MSP) и *M. musculus castaneus* (MCA), которые широко используются для генетического картирования [5]. MCA имеет три «молчашие» SNPs в кодирующем участке *NAT2*, в то время как MSP имеет семь SNPs, два из которых яв-

ляются неконсервативными (табл. 1). МСА производит нормальные уровни NAT2-активности, в то время как MSP – медленный ацетилятор р-ANS, р-ABA, р-AS и 5-AS. Кажется, что мутации в MSP NAT2 – это компромисс стабильности белка, что подтверждается снижением уровня печеночных белков NAT2, обнаруженных иммуноблоттингом.

Позднее, цитогенетическим и физическим картированием было установлено, что все три гена NAT у мышей совместно локализованы на хромосомной группе 8 В3.1-3.3, как и синтенные с человеком 8p22 [9]. После завершения проекта по геному мыши стало возможным определить точную организацию NAT-кластера генов у мышей.

Эндогенная роль человеческой NAT1 и ее мышинового гомолога NAT2 далее поддерживается повсеместной экспрессией двух изоферментов и тем, что они представлены в зародыше и ранних стадиях предимплантационных эмбрионов, на протяжении всего развития.

Ранняя работа с конгенными и рекомбинантными инбредными линиями подразумевала генетическую связь между фенотипами «медленных» ацетиляторов и высокой чувствительностью к тератогенно-индуцированному орофациальному расщеплению [13, 14], в то время как последние исследования показывают взаимодействие человеческой NAT1 с транскрипцией фактора внутри клеточного ядра [6].

В наших предварительных исследованиях [3] были изучены и ранжированы по типам ацетилирования инбредные линии мышей, а также их мутантные линии и стоки (табл. 1).

Поскольку фенотипы и генотипы процессов ацетилирования у животных предопределяются различными локусами и аллелями *NAT1* и *NAT2*, а также полиморфизмом одиночных нуклеотидов и изменениями аминокислотного состава, мы считаем важным привести также собственные и литературные данные о полиморфных особенностях различных линий мышей (табл. 2).

Таблица 1

Типы ацетилирования у инбредных линий мышей

«Быстрые» ацетиляторы	«Медленные» ацетиляторы	«Промежуточные» ацетиляторы
C57BL/6Y	A/HeJ	CC57BR/Mv
C57BL/6J	A/WySnKl	CC57W/Mv
C57BL/JY	AKR/J	C3H/HeDiSn
DBA/1J Lac	C57BL-go <sup>v</sup> *	C3HA/Mv
DBA/2J	A/J	SHK
DBA/2JY	C57BL/10ScSn*	SHR
BALB/cJLac	C57BL/RsJ-db*	
BALB/cY-wal	C57BL/6-W <sup>v</sup> /+*	

Примечание: \* – мутантные линии и стоки инбредных линий.



Полиморфизм локусов *NAT* у мышей

Вид	Наименование доминирующего аллеля	Полиморфизм одиночных нуклеотидов	Изменения аминокислот	Ацетиляторный фенотип
Локус <i>NAT1</i>				
Мыши (инбредные линии и группы)	NAT1*6	нет	нет	Быстрый
Мыши ( <i>M. spretus</i> )	NAT1*30	A <sup>642</sup> →G	нет	Медленный
		G <sup>684</sup> →A	нет	
		A <sup>695</sup> →G	His <sup>232</sup> →Arg	
		T <sup>699</sup> →C	нет	
		T <sup>795</sup> →C	нет	
Локус <i>NAT2</i>				
Мыши (инбредные линии, исключая А/Ј) [5, 16]	NAT2*8	нет	нет	Быстрый
Мыши (А/Ј) [16]	NAT2*9	A <sup>296</sup> →T	Asn <sup>99</sup> →Ile	Медленный
Мыши ( <i>M. castaneus</i> )	NAT2*22	T <sup>537</sup> →C	нет	Быстрый
		C <sup>747</sup> →T	нет	
		A <sup>834</sup> →G	нет	
Мыши ( <i>M. spretus</i> )	NAT2*23	A <sup>78</sup> →T	Glu <sup>26</sup> →Asp	Медленный
		T <sup>117</sup> →C	нет	
		C <sup>244</sup> →A	нет	
		C <sup>480</sup> →T	нет	
		T <sup>537</sup> →C	нет	
		A <sup>690</sup> →G	нет	
		T <sup>807</sup> →A	нет	
		A <sup>633</sup> →G	нет	
		C <sup>727</sup> →T	Arg <sup>243</sup> →stop	
Мыши (инбредных линий) [15, 16]	NAT3*1	нет <sup>h</sup>	нет <sup>h</sup>	Быстрый
Мыши ( <i>M. castaneus</i> ) [16]	NAT3*2	G <sup>238</sup> →A	Ala <sup>80</sup> →Thr	Быстрый (Серотонин-мелатонин)
		T <sup>607</sup> →C	Trp <sup>203</sup> →Gln	
		C <sup>608</sup> →A		
Мыши ( <i>M. spretus</i> ) [16]	NAT3*3	A <sup>147</sup> →G	нет	Медленный (Серотонин-мелатонин)
		C <sup>162</sup> →T	нет	
		G <sup>238</sup> →A	Ala <sup>80</sup> →Thr	
		T <sup>295</sup> →C	Cys <sup>99</sup> →Arg	
		C <sup>413</sup> →T	Thr <sup>138</sup> →Ile	
		T <sup>511</sup> →C	Ser <sup>171</sup> →Pro	
		T <sup>607</sup> →C	Trp <sup>203</sup> →Gln	
		G <sup>608</sup> →A		
		G <sup>608</sup> →A	Arg <sup>213</sup> →Gln	
		G <sup>796</sup> →A	Val <sup>266</sup> →Ile	
		T <sup>857</sup> →C	Val <sup>286</sup> →Ala	

Многочисленные данные и потребности биомедицинских исследований указывают на необходимость направленного создания трансгенных животных, несущих гены NAT человека, под конкретные задачи фармакологических и токсикологических исследований. Это определяется большим разнообразием и функциональной направленностью аллелей NAT у человека и животных, что и обозначило задачи наших исследований.

**Цель исследований** – совершенствование физиолого-эмбриологических технологий получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (*NAT1* и *NAT2*) человека для их использования в качестве биомоделей в фармакологии, токсикологии, а также фундаментальных и прикладных биомедицинских исследованиях.

### Материалы и методы

По настоящее время основным способом введения чужеродных генов в геном животных является метод микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот. В связи с этим технология получения трансгенных животных, основанная на микроинъекционном методе, включает в себя этапы двух видов: генно-инженерные и физиолого-эмбриологические.

Физиолого-эмбриологические этапы включают:

- вызывание высоко синхронизированной суперовуляции у животных-доноров с целью получения большого числа эмбрионов на стадии зиготы;
- хирургическое получение зигот из яйцеводов;

- визуализацию пронуклеусов в зиготах;
- микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот;
- кратковременное культивирование микроинъецированных эмбрионов *in vitro*;
- трансплантацию инъецированных эмбрионов синхронизированным животным-реципиентам.

### Получение мышинных зигот

Эксперименты были проведены на самках гибридных мышей линии СВА\*С57BL/6 (F1) в возрасте 4-7 недель, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались при следующем световом режиме: световой период – с 8<sup>00</sup> до 20<sup>00</sup>, темновой – с 20<sup>00</sup> до 8<sup>00</sup>. Для вызывания суперовуляции и синхронизации спаривания был использован метод гормональной стимуляции. Самкам мышей вводили по 7-8 И.Е. гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК), а через 48-56 ч – внутрибрюшинно 5-7 И.Е. хорионического гонадотропина человека (ХГч). После введения ХГч самок подсаживали к плодовитым самцам на ночь из расчета 1:1. Оплодотворение определяли по наличию копуляционной пробки. День обнаружения пробки считали первым днем беременности.

Извлечение эмбрионов и манипуляции, связанные с микроинъекцией в них генно-инженерных конструкций, проводили в среде M2, содержащей NE-PES-буфер. Культивирование эмбрионов проводили в среде M16 под газовой фазой, содержащей 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. Среды M2 и M16 обогащали бычьим сывороточным альбумином (БСА).

**Микроинъекцию генно-инженерных конструкций в зиготы** проводили на установке, включающей инвертированный микроскоп с оптикой Номарского (фирмы «Nikon», Япония) и комплект манипуляторов и микроинъекторов (фирмы «Narishiga», Япония).

Линейные фрагменты плазмидной генно-инженерной конструкции размером от 5 до 7 тыс. пар оснований были инъецированы в мужской пронуклеус зигот через микроиглу с внешним диаметром 1,5-2 мкм, в объеме 1-2 пкл, с концентрацией 7-8 мкг/мл.

Зиготы, не разрушавшиеся в течение одного часа после микроинъекции генно-инженерной конструкции, были поставлены на культивирование на 16-22 ч до следующего утра. Эмбрионы, которые за время культивирования достигали стадии 2-х бластомеров, трансплантировали синхронизированным самкам-реципиентам по 8-12 шт. в один яйцевод с помощью стеклянной микропипетки. Часть микроинъецированных зигот была поставлена на культивирование до стадии бластоцисты.

Трансплантация микроинъецированных эмбрионов псевдобеременным самкам, полученным в результате гормональной обработки и спаривания с вазэктомированными самцами, была проведена через 1-2 ч после микроинъекции или после культивирования в течение 24 ч.

На начальном этапе исследований получения трансгенных мышей проводили **по классической схеме** [1, 4], которая в общем виде представлена в табл. 3.

### Результаты и их обсуждение

**Результаты вызывания суперовуляции у мышей-доноров разными гонадотропными препаратами (по классической схеме)**

При получении трансгенных мышей путём введения генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот необходимо иметь достаточное количество зигот с хорошо видимыми пронуклеусами. Для получения большого количества зигот от самок-доноров у них вызывают суперовуляцию с помощью различных ГСЖК. На начальном этапе исследо-

Таблица 3  
Схема технологии получения трансгенных мышей (*классическая*, по [4])

Дни п/п	Мероприятия	Время	
		Доноры	Реципиенты
I.	Введение ГСЖК (7-8 И.Е.)	15 <sup>00</sup> -16 <sup>00</sup>	-
II.	-	-	-
III.	1. Введение ХГч (5-7 И.Е.).	16 <sup>00</sup> -17 <sup>00</sup>	-
	2. Подсадка самок-доноров к самцу.	16 <sup>00</sup> -17 <sup>00</sup>	-
	3. Подсадка самок-реципиентов к вазэктомированным самцам	-	16 <sup>00</sup> -17 <sup>00</sup>
IV.	1. Получение зигот.	11 <sup>00</sup> -13 <sup>00</sup>	-
	2. Микроинъекция зигот и краткосрочное культивирование.	14 <sup>00</sup> -16 <sup>00</sup>	-
	3. Трансплантация зигот самкам-реципиентам	-	16 <sup>00</sup> -18 <sup>00</sup>

ваний для вызывания суперовуляции у самок-доноров нами были испытаны 2 препарата ГСЖК:

I гр. – Фоллигон («Intervet», Голландия);

II гр. – Фоллимаг («Мосагроген», Россия).

Гормональную обработку самок-доноров в этой серии экспериментов проводили по классической схеме, представленной в разделе «Материалы и методы». Согласно этой схеме, самок-доноров подсаживают в клетку к самцу через 46-48 ч после введения им ГСЖК и одновременно с введением ХГч, который должен вызывать овуляцию фолликулов, развившихся под действием ГСЖК.

Анализ результатов этого эксперимента (табл. 4) показал, что количество яйцеклеток с видимыми пронуклеусами, извлечённых через 19-20 ч после подсадки самок к самцу, было очень низким (27-31%). Тогда как принято считать, что этого времени достаточно для того, чтобы произошла овуляция фолликулов, осеменение самок и развитие оплодотворённых яйцеклеток до стадии двух пронуклеусов. Из яйцеклеток, из-

влечённых без видимых пронуклеусов, после дополнительного культивирования в течение 6-7 ч только у 9-14% появились пронуклеусы.

Таким образом, количество яйцеклеток с пронуклеусами в общей сложности составило только 37% от общего количества полученных яйцеклеток. На одну самку-донора было получено по 5,6 зигот с видимыми пронуклеусами, т.е. пригодных для микроинъекции в них генно-инженерной конструкции. При этом, при использовании Фоллигона и Фоллимага были получены одинаковые результаты (табл. 4).

#### Результаты вызывания суперовуляции у мышей-доноров с синхронизацией половых циклов (модифицированная схема)

Одной из основных причин низкого выхода яйцеклеток с видимыми пронуклеусами к определённому времени, на наш взгляд, является разное состояние яичников у самок-доноров в момент введения им препарата ГСЖК. Если принять во внимание тот факт, что продолжительность полового цикла у самок мышей составляет 4-5 дней, то ежедневно в фолликуляр-

Таблица 4  
Результаты вызывания суперовуляции у мышей-доноров разными гонадотропными препаратами (*по классической схеме*)

№№ гр.	Число самок-доноров	Число извлечённых яйцеклеток						Количество зигот с пронуклеусами		
		с видимыми пронуклеусами		без видимых пронуклеусов		с пронуклеусами после культивирования		всего		на одного донора
		N	%	N	%	N	%	N	%	
I	51	241	31,1	533	68,9	48	9,0	289	37,3	5,6
II	33	134	26,6	370	73,4	51	14,0	185	36,7	5,6

ной фазе цикла, т.е. наиболее подходящей для вызывания суперовуляции, будет находиться одна из 4-5-ти самок, взятых произвольно для вызывания суперовуляции. Исходя из этого факта, было сделано предположение, что для эффективного вызывания суперовуляции у мышей-доноров необходимо синхронизировать половой цикл у самок таким образом, чтобы на момент введения им ГСЖК яичники у них находились в фолликулярной фазе полового цикла.

Ранее, при обычном размножении мышей, было замечено, что если самок на несколько часов подсаживать к самцу в клетку, разделённую перегородкой (через перегородку), то половой цикл у некоторой части самок синхронизируется, и после снятия перегородки и покрытия самцом потомство у них рождается с разницей в несколько часов или в течение 1-2-х дней, т.е. более уплотнённо. Принимая во внимание этот факт, мы решили применить принцип предварительной подсадки самок к самцу через перегородку при вызывании суперовуляции у мышей-доноров. Были испытаны два варианта подсадки самок к самцу:

а) одновременно с началом гормональной обработки, т.е. с введением ГСЖК (II гр.);

б) за 24 ч до начала гормональной обработки ГСЖК (III гр.).

Контролем служили самки, взятые для вызывания суперовуляции произвольно, без учёта полового цикла и без предварительной подсадки к самцам (I гр.).

Результаты этого эксперимента продемонстрировали (табл. 5), что предварительная подсадка самок к самцу через перегородку оказывает положительный эффект на синхронизацию половых циклов у самок-доноров. В результате этого большая часть самок-доноров к моменту введения им препарата ГСЖК находилась в фолликулярной фазе цикла. Это привело к увеличению количества яйцеклеток с видимыми пронуклеусами через 19-20 ч после введения ХГч и снятия перегородки (53,2 и 61,9% во II и III группах соответственно, против 31,2% в контрольной I-й группе). Ещё более выражено это положительное влияние проявилось на яйцеклетках, в которых через 19-20 ч после введения ХГч не было обнаружено видимых пронуклеусов.

Таблица 5

Результаты суперовуляции у мышей-доноров при разных вариантах её вызывания

№№ гр.	Число самок-доноров	Число извлечённых яйцеклеток						Количество зигот с пронуклеусами		
		с видимыми пронуклеусами		без видимых пронуклеусов		с пронуклеусами после культивирования		всего		на одного донора
		N	%	N	%	N	%	N	%	
I	51	241	31,2	533	68,8	48	8,7	289	37,3	5,6
II	265	2430	53,2	2138	46,8	979	45,8	3409	74,6	12,8
III	100	1192	61,9	733	38,1	582	80,0	1774	92,2	17,7

При последующем культивировании этих яйцеклеток в течение шести часов в них появились пронуклеусы (у 45,8% во II группе, у 80,0% – в III группе, против 8,7% в контрольной группе). Таким образом, общее количество яйцеклеток с видимыми пронуклеусами, полученных на одну самку-донора, составило 12,8 во II группе и 17,7 – в III группе, против 5,6 – в контроле, что соответственно составило 74,6 и 92,2% против 37,3% от общего количества извлечённых яйцеклеток. При этом лучшие результаты вызывания суперовуляции у самок-доноров были получены в варианте с предварительной подсадкой самок к самцу через перегородку за 24 ч до введения ГСЖК. В этом варианте введение ХГч производится через 72 ч после подсадки самок-доноров к самцу через перегородку. Можно предположить, что за это время происходит синхронизация половых циклов у большинства самок, и яичники к моменту введения ГСЖК у них находятся в фолликулярной фазе цикла.

#### **Результаты разных вариантов подготовки мышей-реципиентов**

Одним из важнейших этапов технологии получения трансгенных мышей является подготовка самок-реципиентов, которым будут трансплантированы эмбрионы, микроинъекцированные генно-инженерными конструкциями. Приживаемость трансплантированных эмбрионов зависит от синхронности половых циклов самок-доноров и самок-реципиентов, а также от количества фолликулов, овулировавших в яичниках самок-реципиентов. Если фолликулов овулирует очень мало, то развившихся из них жёлтых тел может оказаться недостаточно для поддержания беремен-

ности и развития трансплантированных эмбрионов. Кроме того, при малом числе фолликулов в яичниках, по-видимому, охота у самок проявляется невыраженно, и самцы могут не реагировать на этих самок. В результате этого мы наблюдаем самок без копуляционных пробок, хотя овуляция небольшого числа фолликулов у них произошла, о чём свидетельствует наличие яйцеклеток и кровяных сгустков в яйцеводах. В качестве животных-реципиентов обычно используют псевдобеременных самок с половым циклом, синхронным половому циклу животных-доноров. Псевдобеременность индуцируется путём спаривания самок, находящихся в фолликулярной стадии естественного цикла, с вазэктомированным самцом. Если спаривание прошло нормально, то у самок во влагалище образуется копуляционная пробка, по наличию которой и отбирают самок для использования в качестве реципиентов.

Для индукции псевдобеременности, с целью получения самок-реципиентов, нами были испытаны разные варианты подготовки животных. Анализ результатов этой серии экспериментов показал (табл. 6), что большее число самок с копуляционными пробками наблюдалось в группах с предварительной подсадкой самок к вазэктомированным самцам через перегородку (II и III гр.). При этом лучший результат наблюдали у самок III группы, которых предварительно подсаживали к вазэктомированным самцам через перегородку в тот же день, когда самкам-донорам вводили ГСЖК, и они находились с самцами в течение 72-х ч (68,4% – с признаками овуляции; 61,3% из них – с копуляционными пробками).

Таблица 6

Результаты разных вариантов подготовки мышей-реципиентов

№№ гр.	Число самок	Время предварительной подсадки самцов (от момента обработки самок-доноров ГСЖК)	Число самок-реципиентов с овуляцией					
			всего		с копуляционными пробками		без копуляционных пробок	
			N	%	N	%	N	%
I	83	Без предварительной подсадки	32	40,0	9	28,0	23	72,0
II	334	Через 24 ч после обработки доноров ГСЖК	182	54,5	92	50,6	90	49,4
III	136	Одновременно с обработкой доноров ГСЖК	93	68,4	57	61,3	36	38,7

Более низкий результат наблюдали у самок II группы, которые находились через перегородку с самцами в течение 48 ч (54,5% – с признаками овуляции; 50,6% из них – с копуляционными пробками). В то время как среди самок-реципиентов, которых предварительно не подсаживали к самцам, – только у 40,0% произошла овуляция, и 9,0% были с копуляционными пробками.

Таким образом, результаты этой серии экспериментов показали, что предварительная подсадка самок-реципиентов в клетку к вазэктомированным самцам через перегородку способствует синхронизации половых циклов у этих самок и успешному покрытию их самцами с образованием копуляционных пробок, что является одним из критериев полноценности животного-реципиента и возможности успешной трансплантации ему эмбрионов, микроинъекцированных генно-инженерными конструкциями.

**Развитие *in vitro* мышинных зигот, микроинъекцированных генно-инженерными конструкциями**

При получении трансгенных мышей существуют две стратегии транспланта-

ции микроинъекцированных эмбрионов:

а) трансплантировать зиготы самкам-реципиентам через 1-2 ч после микроинъекции в пронуклеусы генной конструкции (на одноклеточной стадии);

б) культивировать микроинъекцированные зиготы в течение ночи и трансплантировать на другой день эмбрионы, достигшие стадии двух бластомеров.

Нами был выбран второй вариант стратегии трансплантации. Мы культивировали микроинъекцированные зиготы в течение ночи до стадии двух бластомеров, а затем трансплантировали в яйцевод самкам-реципиентам. На наш взгляд, этот вариант имеет определённые преимущества, т.к. позволяет отбраковать эмбрионы, не вступившие в деление дробления, т.е. оставшиеся на одноклеточной стадии, и, кроме того, данный вариант значительно снижает нагрузку на оператора микроинъекции и трансплантации, т.к. выполнение этих двух процессов в один день неблагоприятно влияет на качество работ.

Анализ результатов культивирования зигот после микроинъекции генно-инженерными конструкциями *hNAT1*

и *hNAT2* (табл. 7) показал, что около 18-19% зигот, инъецированных этими конструкциями, останавливаются в развитии на одноклеточной стадии. При этом на данном этапе технологии не наблюдается разницы в жизнеспособности зигот, инъецированных конструкциями *hNAT1* и *hNAT2*.

**Приживаемость 2-клеточных мышинных эмбрионов, инъецированных генно-инженерными конструкциями *NAT1* и *NAT2* человека, в организме самок-реципиентов**

После культивирования зигот, инъецированных конструкциями *hNAT1* и *hNAT2*, в течение 12-22 ч эмбрионы, достигшие 2-клеточной стадии, были трансплантированы по 8-12 шт. в один

из яйцеводов самок-реципиентов. Результаты этой серии экспериментов (табл. 8) показали, что приживаемость – как в пересчёте на беременных, так и на всех реципиентов – была выше у эмбрионов, развившихся из зигот, микроинъецированных генно-инженерной конструкцией *hNAT2* (62,6 и 24,2% соответственно), по сравнению с приживаемостью эмбрионов, развившихся из зигот, микроинъецированных конструкцией *hNAT1* (42,3 и 15,2% соответственно).

В этой серии экспериментов результаты по проценту беременности самок-реципиентов и по приживаемости трансплантированных эмбрионов соответствуют международным стандартам.

Таблица 7

**Развитие *in vitro* мышинных зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями**

№№ группы	Конструкция	Число зигот, инъецированных конструкцией	Развилось до стадии двух бластомеров	
			N	%
I	<i>hNAT1</i>	1824	1488	81,6
II	<i>hNAT2</i>	3714	2987	80,5

Примечание: время культивирования – 12-22 ч.

Таблица 8

**Приживаемость 2-клеточных мышинных эмбрионов, инъецированных генно-инженерными конструкциями *NAT1* и *NAT2* человека, в организме самок-реципиентов**

№№ гр.	Конструкция	Число реципиентов	Трансплантировано эмбрионов	Беременных реципиентов		Родилось потомков	Приживаемость эмбрионов (%)	
				N	%		на беременных	на всех реципиентов
I	<i>hNAT1</i>	43	434	15	35,0	66	42,3	15,2
II	<i>hNAT2</i>	47	488	19	40,4	118	62,6	24,2



В результате проведенных исследований улучшены основные этапы технологии получения трансгенных мышей:

- а) вызывание суперовуляции у мышей-доноров;
- б) подготовка псевдобеременных самок-реципиентов.

Синхронизация половых циклов самок-доноров позволяет получать большее количество зигот на стадии хорошо видимых пронуклеусов, а синхронизация половых циклов самок-реципиентов – большее количество псевдобеременных самок с копуляционными пробками.

Вариант модифицированной нами технологии получения трансгенных мышей представлен в табл. 9.

### Заключение

В связи с тем, что при вызывании суперовуляции у самок-доноров по классической схеме получение к определенному часу достаточного количества мышинных зигот не всегда бывает удачным, ведётся поиск новых схем вызывания суперовуляции. Некоторые группы исследователей, чтобы получить к определенному сроку достаточное количество мышинных зигот, пригодных для микроинъекции в них генно-инженерных конструкций (ГИК), пошли по пути искусственного оплодотворения ооцитов *in vitro* [17, 18], что является достаточно сложной и громоздкой процедурой, связанной с дополнительными этапами технологии – получением семе-

Таблица 9

Схема технологии получения трансгенных мышей (модифицированная)

Дни п/п	Мероприятия	Время	
		Доноры	Реципиенты
I	Подсадка самок-доноров к самцам <u>через перегородку</u>	15 <sup>00</sup> -16 <sup>00</sup>	
II	1. Введение самкам-донорам ГСЖК (7-8 И.Е.). 2. Подсадка самок-реципиентов к вазэктомированным самцам <u>через перегородку</u>	15 <sup>00</sup> -16 <sup>00</sup> -	- 15 <sup>00</sup> -16 <sup>00</sup>
III	-	-	-
IV	1. Введение самкам-донорам ХГч (5-7 И.Е.). 2. Подсадка к самцам ( <u>снятие перегородки</u> )	16 <sup>00</sup> -17 <sup>00</sup> 16 <sup>00</sup> -17 <sup>00</sup>	- -
V	1. Получение оплодотворённых яйцеклеток.	11 <sup>00</sup> -13 <sup>00</sup>	-
	2. Микроинъекция зигот конструкцией и постановка на культивирование.	14 <sup>00</sup> -16 <sup>00</sup>	-
	3. Культивирование яйцеклеток без пронуклеусов до стадии зиготы.	13 <sup>00</sup> -19 <sup>00</sup>	-
	4. Микроинъекция этих развившихся зигот и постановка на культивирование.	19 <sup>00</sup> -21 <sup>00</sup>	-
	5. Подсадка самок-реципиентов к вазэктомированным самцам ( <u>снятие перегородки</u> )		16 <sup>00</sup> -17 <sup>00</sup>
VI	1. Отбор реципиентов с копуляционными пробками.	-	9 <sup>00</sup> -10 <sup>00</sup>
	2. Трансплантация 2-клеточных эмбрионов самкам-реципиентам	-	10 <sup>00</sup> -13 <sup>00</sup>

ни от самцов, её капациацией и оплодотворением ооцитов *in vitro*. Кроме того, считается, что зиготы, полученные в результате оплодотворения яйцеклеток *in vitro*, чаще всего имеют более низкое качество по сравнению с эмбрионами, полученными в результате оплодотворения яйцеклеток *in vivo*. Однако, несмотря на это, исследователи вынуждены идти на дополнительные усложнения технологии, чтобы получить к определённому сроку достаточное количество зигот, пригодных для микроинъекции в них генно-инженерных конструкций.

Предложенный нами способ вызывания суперовуляции, включающий синхронизацию половых циклов у самок-доноров путём предварительной подсадки их к самцам через перегородку, позволяет получать на одного донора по 17,7 зигот с хорошо видимыми пронуклеусами. Это составляет 92,2% от общего количества извлечённых яйцеклеток. При этом у 61,9% зигот пронуклеусы были видны сразу после извлечения из яйцевода, которое производилось через 19-20 ч после введения ХГч, и у 30,3% зигот пронуклеусы появлялись после культивирования извлечённых яйцеклеток в течение последующих шести часов.

При этом лучшие результаты вызывания суперовуляции у самок-доноров были получены в варианте с предварительной подсадкой самок к самцу через перегородку за 24 ч до ведения им препарата ГСЖК. Можно предположить, что за это время происходит синхронизация половых циклов у большей части самок, и к моменту введения ГСЖК яичники у них находятся в фолликулярной фазе полового цикла. В этом варианте гормональной обработки введение ХГч производится через 72 ч после подсадки самок-доноров к самцу

через перегородку. Предложенная нами схема вызывания суперовуляции у мышей - доноров зигот не вносит никаких дополнительных этапов, усложняющих эту технологию, кроме установки временной перегородки в клетках у самцов.

При подготовке самок-реципиентов нами также был использован приём предварительной подсадки самок к самцам через перегородку, который позволяет стимулировать процесс фолликулогенеза и синхронизировать половые циклы самок-реципиентов. В результате этого, у самок-реципиентов в яичниках развивается большее число фолликулов, поэтому охота у них проявляется более выражено, и вазэктомированные самцы покрывают их с образованием чётко видимых копуляционных пробок, что является показателем хорошей самки-реципиента и возможности успешной трансплантации ей эмбрионов, микроинъекцированных генно-инженерными конструкциями.

### Список литературы

1. Аллен Н. и др. Получение трансгенных мышей // Биология развития млекопитающих. Методы / под ред. М. Манк. - М.: Мир. 1990. С. 278-298.
2. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *NAT1* и *NAT2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных // Биомедицина. 2014. № 2. С. 4-17.
3. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы) // Биомедицина. 2014. № 3. С. 4-24.
4. Мерфи Д., Хенсон Дж. Получение трансгенных мышей путём микроинъекции клонированной ДНК в оплодотворённые яйцеклетки // Новое в клонировании ДНК. Методы / под ред. Д. Гловера. - М.: Мир. 1989. 386 с.
5. Boukouvava S., Price N., Sim E. Identification and functional characterization of novel polymorphisms associated with the genes for arylamine N-acetyltransferases in mice // Pharmacogenetics. 2002. No. 12. Pp. 385-394.
6. Butcher N.J., Arulpragasam A., Goh H.L., Davey T., Minchin R.F. Human arylamine N-

- acetyltransferase-1 interacts with EHZF, a multi-functional transcription co-factor // In: Third International Workshop on Arylamine N-acetyltransferases. -Vancouver, Canada. 2004.
7. **De Leon J.H., Vatsis K.P., Weber W.W.** Characterisation of naturally occurring and recombinant human N-actyltransferase variants encoded by *NAT1\** // Mol. pharmacol. 2000. No. 58. Pp. 288-299.
  8. **Estrada-Rodgers L., Levy G.N., Weber W.W.** Substrate selectivity of mouse N-acetyltransferase 1, 2, and 3 expressed in COS-1 cells // Drug metab. dispos. 1998. No. 26. Pp. 502-505.
  9. **Fakis G., Boukouvala S., Buckle V., Payton M., Denning C., Sim E.** Chromosomal localisation and mapping of the genes for murine arylamine N-acetyltransferases (NATs), enzymes involved in the metabolism of carcinogens: identification of a novel upstream non-coding exon for murine *Nat2* // Cytogenet. cell genet. 2000. No. 90. Pp. 134-138.
  10. **Fretland A., Doll M.A., Gray K., Fen Y., Hein D.** Cloning, sequencing and recombinant expression of *NAT1*, *NAT2* and *NAT3* derived from the C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: functional characterisation of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens // Toxicol. appl. pharmacol. 1997. No. 142. Pp. 360-366.
  11. **Glowinski I.B., Weber W.W.** Biochemical characterisation of genetically variant aromatic amine N-acetyltransferases in A/J and C57BL/6J mice // J. biol. chem. 1982. No. 257. Pp. 1431-1437.
  12. **Hein D.W., Trinidad A., Yerokun T., Ferguson R.J., Kirilin W.G., Weber W.W.** Genetic control of acetyl coenzyme A-dependent arylamine N-acetyltransferase, hydrazine N-acetyltransferase, and N-hydroxy-arylamine O-acetyltransferase enzymes in C57BL/6J, A/J, AC57F1, and the rapid and slow acetylator A.B6 and B6.A congenic inbred mouse // Drug metab. dispos. 1988. No. 16. Pp. 341-347.
  13. **Karolyi J., Erickson R.P., Liu S.** Genetics of susceptibility to 6-aminonicotinamide-induced cleft palate in the mouse: studies in congenic and recombinant inbred strains // Teratology. 1988. No. 37. Pp. 283-287.
  14. **Karolyi J., Erickson R.P., Liu S., Killewald L.** Major effects on teratogen-induced facial clefting in mice determined by a single genetic region // Genetics. 1990. No. 126. Pp. 201-205.
  15. **Kelly S.L., Sim E.** Arylamine N-acetyltransferase in Balb/c mice: identification of a novel mouse isoenzyme by cloning and expression in vitro // Biochem. J. 1994. No. 302. Pp. 347-353.
  16. **Martell K.J., Levy G.N., Weber W.W.** Cloned mouse N-acetyltransferases: enzymatic properties of expressed *Nat-1* and *Nat-2* gene products // Mol. pharmacol. 1992. No. 42. Pp. 265-272.
  17. **Sakurai T., Kimura M., Sato M.** Temporary developmental arrest after storage of fertilized mouse oocytes at 4C: effects on embryonic development, maternal mRNA processing and cell cycle // Molecular human reproduction. 2005. Vol. 11. No. 5. Pp. 325-333.
  18. **Sakurai T., Watanabe S., Kamiyoshi A., Sato M., Shindo T.** A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice // BMC Biotechnology. 2014. No. 14. Pp. 69-79.

## **Physiological and embryological aspects of generation transgenic mice with integrated human *NAT1* and *NAT2* genes**

**V.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, L.A. Bolotskikh, Kh.Kh. Semenov, G.D. Kapanadze, N.V. Petrova, VA. Ezerskiy, O.B. Zhukova, E.M. Koloskova, S.V. Maksimenko, V.N. Stolyarova, T.P. Trubitsina**

The method to induce superovulation in mice-donors, including the synchronization of sexual cycles of the female donor by pre-infusion to males through the partition, which allows you to get to determine time up to 17 zygotes per donor with highly visible pronucleus, suitable for introduction in them of genetically engineered structures was improved.

Linear fragments of plasmid gene-engineering constructions comprising the nucleotide sequence of the human *NAT1* and *NAT2* genes under the promoter of the mouse albumin (*hNAT1* и *hNAT2*), microinjection into the male pronucleus of zygotes collected from the female F1 hybrid mice (CBA/lac \* C57BL/6).

In the preparation of the female recipients were also used taking prereplanting female recipients to vasectomy penis males through the partition, which contributed to the stimulation of the process of folliculogenesis and synchronization of sexual cycles in females-recipients. It is possible to obtain a greater number of female pseudoharmonic-recipients with copulation wads to determine time, which is one of the criteria of usefulness of the animal recipient and the possibility of successful transplantation of the embryos to it, microinjection genetically engineered constructs. Based on these techniques, developed variant of a modified technology for producing transgenic mice with the genes *NAT1* and human *NAT2*.

**Key words:** transgenic mouse *NAT1* and *NAT2*, transplantation DNA constructs, folliculogenesis, modification of the technology for generation transgenic mice with human genes.

## Сезонная динамика показателей физической работоспособности лабораторных животных

Е.Б. Шустов<sup>1</sup>, Ю.В. Фокин<sup>1</sup>, Г.Д. Капанадзе<sup>1</sup>, И.А. Берзин<sup>2</sup>,  
Н.В. Станкова<sup>1</sup>, О.В. Алимкина<sup>1</sup>, Е.Л. Матвеев<sup>1</sup>, Н.В. Петрова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – Федеральное медико-биологическое агентство России, Москва

Контактная информация: д.м.н. Шустов Евгений Борисович, [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

Исследование выполнено как ретроспективный анализ результатов ранее выполненных исследований по доклиническому изучению новых химических соединений, перспективных в качестве средств повышения работоспособности. Анализировались показатели контрольных групп животных, полученных в ходе выполнения кинезогидродинамического исследования, теста вынужденного плавания с грузом, ротарода – на крысах, бега до отказа на тредбане – на мини-свиньях. Показано, что влияние фактора «сезонность» на все анализируемые показатели было статистически достоверным. Наиболее существенным оно было для показателя теста на ротароде, выносливости и максимальной скорости плавания в кинезогидродинамическом исследовании. Умеренная значимость фактора сезонности была установлена для показателя средней скорости плавания, показателей работоспособности и утомляемости в кинезогидродинамическом исследовании. Фактор сезонности практически не оказывал влияния на показатель времени предельного плавания животных с грузом и времени бега мини-свиней на тредбане до отказа. Таким образом, чем экстремальнее тестовое воздействие на животных, тем менее значимым является фактор сезонности. Полученные результаты необходимо учитывать при планировании доклинических исследований, направленных на оценку физической работоспособности животных.

**Ключевые слова:** лабораторные животные, биомоделирование, физическая работоспособность, факторный анализ.

### Введение

Одной из нерешенных методических проблем биомедицинских исследований в области спортивной медицины и доклинического изучения фармакологических средств, влияющих на физическую работоспособность, является несопоставимость результатов, полученных разными исследователями, в силу методических вариаций и расхождений в условиях проведения исследований [6]. Стандартизации условий выполнения тестов доклинического изучения физической работоспособности лабораторных животных в настоящее время

уделяется пристальное внимание [1, 4, 6]. Одним из факторов, способных оказывать влияние на результаты исследования физической работоспособности животных, является сезонность, т.к. животные (особенно грызуны) весьма подвержены природным сезонным биоритмам.

### Материалы и методы

Исследование выполнено как ретроспективный анализ результатов ранее выполненных исследований по доклиническому изучению новых химических соединений, перспективных в качестве

средств повышения работоспособности. Анализировались показатели контрольных групп животных, полученные в ходе выполнения кинезогидродинамического исследования, теста вынужденного плавания с грузом, ротарода – на крысах, бега до отказа на тредбане – на мини-свиньях.

**Регулирующие стандарты.** Исследования, результаты которых включены в анализ, были выполнены согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [7]. Протоколы исследований были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

**Тестируемые животные.** Исследования, результаты которых были включены в анализ, проводились на белых лабораторных крысах-самках линии WAG/GY конвенционального статуса

в возрасте 1,5-3,5 мес. средней массой 160-240 г, а также на мини-свиньях светлогорской популяции обоего пола массой 16-20 кг.

**Условия кормления и содержания.** Крыс содержали в микроизоляторной системе «RairIsoSystem». Животные соответствовали категории конвенциональных. Мини-свиньи содержались в стационарных клетках, индивидуально. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) (для крыс – ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5, для мини-свиней – ПК 58). Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность воздуха 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

**Методики доклинического исследования физической работоспособности лабораторных животных**

*Кинезогидродинамическая модель плавания* [4, 5, 6, 8]. Исследование проводилось в специальном гидроканале с изменяющимся встречным потоком жидкости, который должно преодолевать лабораторное животное. Гидроканал построен из прозрачного пластика прямоугольной и равнобокой трапециевидной формы в поперечном сечении (0,4x0,2x0,4 м). Длина канала составляет 1,2 м. Высота уровня жидкости равна 0,2 м. Он оснащен с торцевых

сторон водосборниками, обеспечивающими ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощностью прокачки, теплообменниками для нагрева или охлаждения прокачиваемой жидкости. После включения циркулярного насоса система стабилизировалась на скорости квазиламинарного потока воды не ниже 5 м/мин и температуре воды  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . «Правильное» направление движения в гидроканале у животных вырабатывалось в ходе предварительного обучения с использованием в конце маршрута домика-приманки (плавучий плотик, который по ходу обучения можно отодвигать дальше к торцу гидроканала) или имитации домика-норки (типа «скворечник»). В процессе эксперимента регистрировались время прохождения рабочей дистанции (1,2 м) и количество выполненных заплывов, до отказа животного от плавания. Скорость встречного потока – 0,25 м/с. Расчетными показателями модели являлись:

- максимальная скорость плавания ( $V_{\max}$ , м/с)

$$V_{\max} = V_p + L / T_{\min}$$

где  $V_p$  – скорость потока,  $L$  – длина мерного участка (1,2 м),  $T_{\min}$  – минимальное время проплыва мерного участка;

- выносливость ( $Z$ , ед) – количество выполненных заплывов;

- работоспособность ( $L_{\text{sum}}$ , м) – суммарное преодоленное расстояние;

$$L_{\text{sum}} = L * Z + V_p * T_{\text{sum}}$$

где  $L$  – длина мерного участка (1,2 м),  $Z$  – количество выполненных заплывов,  $V_p$  – скорость потока,  $T_{\text{sum}}$  – суммарное время плавания по всем заплывам;

- утомляемость ( $U$ , ед) – тангенс угла наклона эргографической кривой (определяется как угловой коэффициент

линейной регрессии зависимости продолжительности заплывов от их количества);

- средняя скорость плавания ( $V_s = R / T_{\text{sum}}$ , м/с).

*Тест вынужденного плавания лабораторных животных с грузом.* Классическая методика теста Порсолта (вынужденного плавания) предназначена для оценки депрессивного поведения (в частности, «отчаяния»), но после модификации – широко используется для оценки эффектов стимуляторов работоспособности в условиях стресса. Тест принудительного плавания представляет собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты [2, 3, 6, 9]. В анализируемых исследованиях применялся груз, составляющий 10% от массы тела и прикрепляемый у основания хвоста животного. Регистрируемый показатель – предельное время плавания ( $T_p$ ).

*Тест на ротароде.* Прибор предназначен для оценки чувства равновесия, способности удерживаться на вращающемся барабане [3, 6, 10]. Каждое животное помещалось в закрытую камеру (30x30x40 см) с отверстиями для воздухообмена. Пол камеры состоял из стальных стержней, на которые подавалось постоянное напряжение 35-40 В (ток 1 А без учёта сопротивления кожи животных). Это вынуждало крысу запрыгивать на вращающийся вал, поднятый на высоту 15 см от пола и покрытый мягким пористым материалом (диаметр вала – 7 см, скорость вращения – 1,5 об./сек) и в течение эксперимента передвигаться на нем. Регистрируемый показатель – время удержания на вращающемся валу ( $T_u$ ).

*Тест бега мини-свиней на тредбане до отказа.* Данный тест относится к жестким видам теста и служит для оценки выносливости и работоспособности животных [2, 3, 6]. Данные, полученные после проведения теста, можно экстраполировать в дальнейшем на человека. Животные предварительно специально отбираются по способности к бегу (обычно пригодны не более 30% животных из общего поголовья стада) и обучаются бегу на тредбане. Скорость движения беговой дорожки во время тестирования работоспособности – 6 км/ч. Для создания у животных стимула к бегу используется электрическое раздражение. Регистрируемый показатель – время бега ( $T_t$ ).

**Процедура ретроспективного анализа.** Группировка данных осуществлялась по двухмесячным интервалам (февраль-март, апрель-май, июнь-июль, август-сентябрь, октябрь-ноябрь, декабрь-январь). Для построения сезонного графика данные нормировались в Т-бальной системе по отношению суммарного годового цикла по следующей формуле:

$$T(X_i) = 50 + 10 \times \frac{x_i - x_m}{\delta},$$

где  $T(X_i)$  – Т-бальная оценка  $X_i$  значения,  $x_m$  – среднее значение годового вариационного ряда,  $\delta$  – среднеквадратичное отклонение значений в годовом цикле.

**Статистическая обработка.** Обработка данных осуществлялась методами описательной статистики. Значимость влияния фактора сезонности оценивалась методом однофакторного дисперсионного анализа (прикладной пакет

«Анализ данных» процессора таблиц Microsoft Excel 2010).

### Результаты и их обсуждение

Всего было проанализировано 528 результатов кинезогидродинамических исследований, 437 результатов теста вынужденного плавания с грузом 10% от массы тела, 186 исследований на ротароде, 178 забегов мини-свиней на тредбане. Анализируемые показатели: для кинезогидродинамического исследования – максимальная скорость плавания ( $V_{max}$ , м/с), средняя скорость плавания ( $V_s$ , м/с), суммарная длительность плавания ( $T_{sum}$ , с), суммарная дистанция пропыва ( $L_{sum}$ , м), количество заплывов ( $Z$ , ед.), утомляемость ( $U$ , отн.ед.); для теста вынужденного плавания – время плавания ( $T_p$ ), для теста на ротароде – время удержания ( $T_u$ ), для бега на тредбане – время бега ( $T_t$ ).

Статистические характеристики анализируемого массива в годовом цикле представлены в табл. 1.

Общей особенностью практически всех показателей физической работоспособности животных (кроме скоростных показателей в кинезогидродинамическом исследовании) является то, что их статистическое распределение отличается от нормального. Это отражает факт предварительного отбора, обучения и тренировки животных, в силу чего анализируемые показатели закономерно перестают играть роль случайной величины.

При анализе табл. 1 обращает на себя внимание очень высокая вариабельность показателя теста на ротароде ( $KB=0,71$ ), а также показателей выносливости и утомляемости животных в кинезогидродинамическом исследовании ( $KB$  равен 0,6 и 0,67 соответственно). Можно пред-

Таблица 1

Статистические характеристики массива показателей физической работоспособности лабораторных животных

Животные	Крысы								Мини-свиньи
	Кинезогидродинамическое исследование						Плав. с грузом	Ротарод	Тред-бан
Методика	Vmax	Vs	Tsum	Lsum	Z	U	Tr	Tu	Tt
Среднее	21,8	19,9	43,2	14,1	3,6	23,6	127	95,2	21,3
Стандартная ошибка	0,1	0,1	0,9	0,3	0,1	0,71	2	4,9	0,3
Медиана	21,5	19,4	40,3	13,4	3,0	20,0	120	70,5	20
Мода	25,5	16,4	34,0	6,8	3,0	20,0	120	28,0	20
Стандартное отклонение	3,8	2,7	20,5	6,7	2,1	15,8	38	67,6	15,6
Экссесс	-0,72	-0,15	0,50	2,4	6,2	0,91	3,75	0,55	2,58
Асимметричность	0,34	0,63	0,73	1,0	1,7	1,41	1,23	0,98	25
Минимум	15,7	15,7	5,8	2,5	1	3,3	32	13	15
Максимум	34,2	30,0	133,9	51,9	18	60	343	373	40
Коэффициент вариации (КВ)	0,17	0,14	0,48	0,48	0,6	0,67	0,30	0,71	0,19

положить, что эти показатели, в большей степени по сравнению с другими, отражают индивидуальные особенности функционального состояния животных. Наименее вариативными являются показатели скоростных характеристик крыс в кинезогидродинамической моде-

ли и время бега мини-свиней на тредбане до отказа. Можно предположить, что эти показатели в большей степени отражают видовые особенности животных.

Результаты однофакторного (внешний фактор – сезонность) дисперсионного анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты дисперсионного анализа влияния фактора «сезонность» на показатели физической работоспособности лабораторных животных

Показатель	Центроиды групп по периодам						D	p
	февраль-март	апрель-май	июнь-июль	август-сентябрь	октябрь-ноябрь	декабрь-январь		
Vmax	20,2	24,8	21,3	24,9	21,0	23,0	0,24	4*10 <sup>-29</sup>
Vs	19,1	21,3	19,8	21,5	19,5	21,4	0,12	2*10 <sup>-12</sup>
Tsum	39,8	52,5	43,6	50,9	37,5	21,5	0,12	2*10 <sup>-12</sup>
Lsum	12,2	18,1	14,4	17,9	12,1	7,6	0,17	5*10 <sup>-20</sup>
Z	2,7	5,2	3,8	5,3	3,0	2,3	0,26	2*10 <sup>-31</sup>
U	29,7	12,7	24,8	15,8	24,9	31,9	0,15	4*10 <sup>-17</sup>
Tr	115,3	141,3	127,0	107,3	125,3	120,2	0,04	0,001
Tu	40	89	56	173	133	104	0,41	5*10 <sup>-20</sup>
Tt	23,0	26,4	20,2	21,2	20,3	39,7	0,43	6*10 <sup>-18</sup>

Примечание: D – коэффициент детерминации модели (показывает, какая часть общей вариативности показателя может быть отнесена к влиянию анализируемого фактора); p – уровень значимости.



Анализ табл. 2 показывает, что, в силу большого числа наблюдений, влияние фактора «сезонность» на все анализируемые показатели было статистически достоверным. Однако существенным оно является для показателя теста на ротароде (объясняет 41% варибельности времени удержания животных на вращающемся валу), выносливости и максимальной скорости плавания в кинезогидродинамическом исследовании (26 и 24% общей варибельности соответственно). Умеренная значимость фактора сезонности была зафиксирована для показателя средней скорости плавания (12%), обоих показателей работоспособности ( $T_{sum}$  – 12%,  $L_{sum}$  – 17%), утомляемости (15%). Фактор сезонности практически не оказывал влияния на показатель времени предельного плавания животных с грузом ( $T_r$  – 4% общей варибельности показателя). В отношении времени бега мини-

свиней на тредбане до отказа ( $T_t$ ) только в одном периоде (декабрь) результаты теста существенно отличаются от среднегодового уровня, однако это может быть отнесено не к сезонным изменениям работоспособности животных, а к их взрослению к этому времени и большему уровню тренированности.

В графическом варианте сезонная динамика показателей кинезогидродинамической модели отражена на рис. 1, других тестов работоспособности животных – на рис. 2.

Анализ рис. 1 показывает, что у крыс в кинезогидродинамическом исследовании выделяется 2 периода повышенной (более 55 Т-баллов) работоспособности – апрель-май и август-сентябрь. В остальное время года показатели работоспособности находятся в пределах естественного разброса ( $\pm 5$  Т-баллов) по отношению к среднегодовому уровню (50 Т-баллов).

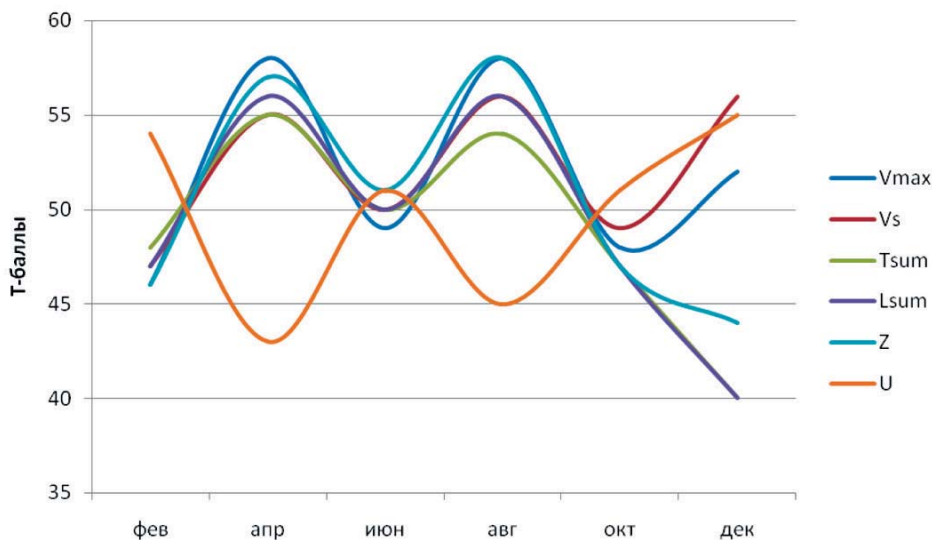


Рис. 1. Сезонная динамика показателей физической работоспособности крыс в кинезогидродинамическом исследовании.

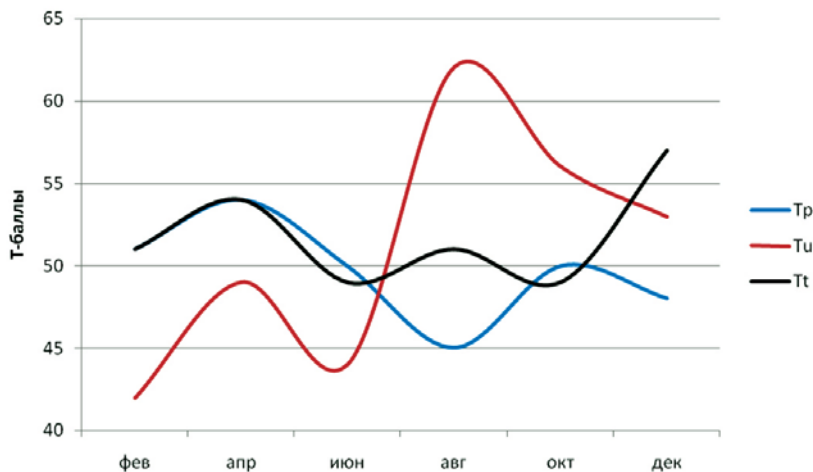


Рис. 2. Сезонная динамика показателей работоспособности крыс в тестах предельного плавания с грузом (Tr) и на ротороде (Tu), а также мини-свиней – в тесте бега на тредбане до отказа (Tt).

Анализ рис. 2 показывает, что время предельного плавания крыс с грузом 10% от массы тела в годовом цикле исследований не имеет выраженных сезонных пиков или провалов (отмечается лишь умеренное повышение в апреле-мае и также умеренное снижение в августе-сентябре).

В тесте на ротороде отмечается выраженная сезонная динамика показателей: низкие значения – в феврале-марте, высокие значения – в августе-ноябре. И только в период апреля-июля и декабря-января значения этого показателя соответствуют среднегодовому уровню.

Время бега мини-свиней до отказа на тредбане фактически не имеет отчетливой сезонной динамики (за исключением периода декабрь-январь). В это время, вероятно, для некоторых животных начинает сказываться не столько фактор сезонности, сколько фактор их взросления, роста, переход в более тренированную к бегу категорию.

## Выводы

При планировании доклинических исследований, направленных на оценку физической работоспособности, необходимо учитывать влияние фактора сезонности на крыс.

В кинезогидродинамическом исследовании повышенная работоспособность животных контрольной группы будет отмечаться в апреле-мае и в августе-сентябре.

В тесте предельного плавания крыс с грузом 10% от массы тела незначительное повышение по сравнению со среднегодовым уровнем времени выполнения теста будет отмечаться в апреле-мае, а некоторое снижение – в августе-сентябре.

В связи с выраженными сезонными колебаниями значений показателя работоспособности крыс в тесте на ротороде, подобные исследования целесообразно планировать на период с апреля по июль, т.к. именно в это время результаты теста являются более стабильными.

При планировании доклинических исследований работоспособности на мини-свиньях необходимо особенно четко контролировать однородность групп по возрасту и уровню тренированности. По возможности, для исключения влияния сезонного фактора, целесообразно их планировать на декабрь-январь месяцы.

### Список литературы

1. *Зайцева М.С., Иванов Д.Г., Александровская Н.В.* Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины ее вариабельности // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 30-42.
2. *Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н.* Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. – 2013. – № 1. – С. 7-17.
3. *Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В.* Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 15-21.
4. *Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Алимкина О.В., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д.* Факторы, влияющие на физическую работоспособность лабораторных животных в кинезогидродинамическом исследовании // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 23-29.
5. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н.* Кинезогидродинамическая модель для оценки выносливости и работоспособности лабораторных животных // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 6-14.
6. *Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б.* Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. - М., СПб.: Айсинг. – 2013. – 288 с.
7. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. – 2010. – 358 с.*
8. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Касинская Н.В.* Кинезогидродинамическая оценка скоростных характеристик физической работоспособности животных в фармакологических исследованиях // Биомедицина. – 2013. – № 3. – С. 6-17.
9. *Dawson C., Horvath S.* Swimming in small laboratory animals // Med. sci. sports. – 1970 – V. 2. – P. 51-78.
10. *Dunham N.W., Miya T.S.* A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rate and mice // J. Amer. pharm. assoc. sci. ed. – 1957. – V. 46. – P. 208-209.

## Seasonal dynamics of indicators of physical health of laboratory animals

**E.B. Shustov, Yu.V. Fokin, G.D. Kapanadze, I.A. Berzin, N.V. Stankova, O.V. Alimkina, E.L. Matveyenko, N.V. Petrova**

The study was performed as a retrospective analysis of the results of previous studies on preclinical researches of new chemical compounds promising as a means of improving efficiency. We analyzed the control group of animals received in the course of the kinezohydrodynamic study, forced swimming test with a load, test on rota-rod with rats, running on a treadmill to failure with mini-pigs. It is shown that the influence of the factor “season” for all analyzed parameters was statistically significant. The most important it was for the index test on rota-rod, endurance and maximum swimming speed in kinezohydrodynamic study. Moderate importance of seasonality factor has been set for the index average swimming speed, performance indicators and fatigue in kinezohydrodynamic study. Seasonality hardly has any effect on the time limit of swimming animals with load and mini-pigs running on a treadmill to failure. Thus, the more extreme impact test animal, the less significant is the seasonal factor. The results need to be considered when planning preclinical studies aimed at assessing the physical performance of animals.

**Key words:** laboratory animals, biomodeling, physical performance, factor analysis.



## Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека *NAT1* и *NAT2*

В.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, Л.А. Болотских<sup>1</sup>, Г.Д. Капанадзе<sup>1</sup>, Н.Н. Каркищенко<sup>1</sup>,  
Е.М. Колоскова<sup>2</sup>, С.В. Максименко<sup>2</sup>, Е.Л. Матвеевко<sup>1</sup>, Н.В. Петрова<sup>1</sup>,  
В.П. Рябых<sup>2</sup>, А.О. Ревякин<sup>1</sup>, Н.В. Станкова<sup>1</sup>, Х.Х. Семёнов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

<sup>2</sup> – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных», Калужская область

Контактная информация: д.м.н. Каркищенко Владислав Николаевич, [vlad1672@ya.ru](mailto:vlad1672@ya.ru)

Работа посвящена получению устойчивых линий трансгенных мышей, несущих гены человека *NAT1* и *NAT2*. В качестве исходных линий для получения мышей с генами человека *NAT1* и *NAT2* использовали гибридных мышей СВА/лас x С57BL/6. Методом микроинъекции генных конструкций в пронуклеусы были получены родоначальники трансгенных мышей с генами человека *NAT1* и *NAT2*. Трансгенных животных в поколениях F1 и F2 спаривали с нетрансгенными животными противоположного пола. Полученное потомство, после проверки на наличие гена, разводили в условиях, исключающих генную контаминацию. С третьего поколения осуществлялся инбридинг мышей.

При получении каждого нового поколения от трансгенных родителей животных подвергали проверке на наличие человеческих генов *NAT1* и *NAT2* методом ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). Были созданы 4 ПЦР-системы видоспецифических праймеров и флуоресцентных зондов для Real-Time PCR с целью верификации генов *NAT1* и *NAT2* человека у трансгенных животных.

Численность поголовья трансгенных животных, полученных к 6-му поколению, составила для животных с геном *NAT1* человека – 860 особей, а численность животных с геном *NAT2* человека – 680 особей.

**Ключевые слова:** трансгенные мыши, гены человека *NAT1* и *NAT2*, биомодель, разведение, содержание, верификация, ПЦР в реальном времени, флуоресцентные зонды.

### Введение

Процесс биологического ацетилирования широко распространен в живой природе, а соединения, имеющие гидроксильные и сульфгидрильные группы, служат субстратами действия N-ацетилтрансфераз. Реакции ацетилирования осуществляются в гепатоцитах, селезенке, легких, пищеварительном

тракте животных, а также микрофлорой и форменными элементами крови [1, 2]. Важность NAT-изоформ в биотрансформации природных веществ и лекарственных препаратов хорошо известна [17]. У человека выделено два изофермента N-ацетилтрансферазы: NAT1 и NAT2. Ген *NAT2* расположен в 8-й хромосоме, локусе 8p23.1-p21.3. У человека основным

ферментом ацетилирования ряда лекарственных препаратов – в частности, изониазида и сульфаниламидов – является *NAT2*, а *NAT1* ацетилирует ариламины. Субстратами *NAT2* являются все лекарственные средства, содержащие аминогруппу, или те, у которых нитрогруппа в реакции восстановления трансформируется в аминогруппу. К прямым субстратам относятся: гидралазин, прокаинамид, сульфадиазин, аминоглутетемид, изониазид, ПАСК, ПАБК, к опосредованным – нитразепам, клоназепам и др. [10, 23]. Оба изофермента генетически полиморфны, т.е. имеют несколько аллелей. Присутствие того или иного аллеля в генотипе влияет на скорость метаболизма лекарственных средств и может быть причиной различных нежелательных эффектов. Поэтому аллельный состав генов *NAT* необходимо учитывать при проведении доклинических испытаний новых препаратов на животных-моделях.

Два гена, *NAT1* и *NAT2*, были выделены и охарактеризованы у людей и нескольких видов животных, т.ч. мыши [18, 19]. Геном мыши на 95% совпадает с человеческим. Мыши являются наиболее оптимизированным объектом для межвидовой ксенотрансплантации. Наибольший научный интерес представляют гуманизированные мыши, т.е. трансгенные животные, содержащие функционирующие гены, клетки, ткани или иные органоиды человеческого организма. Мыши имеют три функциональных *NAT*-гена: *NAT1*, *NAT2*, *NAT3*. Ген *NAT3* не отличается последовательностью нуклеотидов у быстрых и медленных аллелей ацетиляторов [16]. Все три изоформы *NAT* у мышей закодированы в трех локусах, которые расположены на хромосоме 8 [15].

Основываясь на аминокислотной последовательности и субстратной специфичности, мышиный *NAT2* кодирует *NAT*-изоформы, что является функциональным эквивалентом человеческого *NAT1*, в то время как мышиный *NAT1* напоминает *NAT2* человека [12, 13, 16-18, 20-22]. Существует также доказательство генетического сходства между некодирующими экзонами человеческого *NAT2* и мышинного *NAT2* [15].

Профиль экспрессии развития, субстратная специфичность и распределение в тканях организма фермента *NAT2* делает мышь прекрасной моделью для изучения роли *NAT1* человека. С точки зрения способности метаболизировать ксенобиотики и предполагаемой роли в метаболизме фолиевой кислоты, фермент *NAT1* мыши позволяет изучать роль фермента *NAT2* человека в биотрансформации лекарственных и иных средств.

В НЦБМТ ФМБА России активно исследуются особенности генетического регулирования *NAT*-системы у лабораторных животных [2-9]. В нашем Центре была поставлена задача получения трансгенных мышей, обладающих повышенной экспрессией человеческих генов *NAT1* и *NAT2*, передающих трансген по наследству. Были получены мыши с генами *NAT1* и *NAT2* человека. Получению трансгенных животных предшествовала разработка генно-инженерных конструкций.

К генно-инженерным этапам относятся:

- получение нуклеотидных последовательностей структурного гена, кодирующего тот или иной признак;
- получение нуклеотидных последовательностей регуляторных участков гена (промоторов, энхансеров и др.);

- создание генно-инженерных конструкций;
- анализ интеграции трансгена у эмбрионов и животных, полученных из зигот, микроинъекцированных генно-инженерными конструкциями.

После получения первой генерации трансгенных животных предстояла не менее ответственная и трудоемкая работа – разведение полученных животных по соответствующим зоотехническим принципам, наращивание поголовья с постоянным контролем наличия у полученного потомства генов человека *NAT1* и *NAT2*. Еще совсем недавно для идентификации генов-мишеней использовали электрофоретические методы детекции. В настоящее время наиболее точным и быстрым методом визуализации генов-мишеней является метод флуоресцирующих зондов, который позволяет проводить экспрессию искомым генов в режиме «реального времени». Именно он и был использован нами.

**Целью** работы было создание устойчивых гуманизированных линий трансгенных мышей, несущих функционирующие гены *NAT1* и *NAT2* человека, осуществление контроля носительства генов человека в ряду поколений полученных мышей, изучение экспрессии генов *NAT1* и *NAT2* человека у трансгенов для дальнейшего использования в исследовании фармако-токсикологических свойств и эффективности препаратов, а также для высокочувствительных молекулярно-эпигенетических методов исследования.

### **Материалы и методы**

#### **Животные и их содержание**

В качестве исходных форм для получения мышей с генами человека *NAT1* и *NAT2* использовали гибридных мышей

F1 CBA/lac x C57BL/6. Получали гибридов из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Гибриды служили как в качестве доноров эмбрионов, так и в качестве реципиентов.

Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» [11]. Животные содержались в вентилируемых клетках индивидуально или попарно. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-20°C и относительная влажность 60-65%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

#### **Методы контроля носительства генов человека у трансгенных мышей**

При получении каждого нового поколения от трансгенных родителей животные подвергались проверке на наличие человеческих генов *NAT1* и *NAT2*. Для идентификации трансгенных животных проводились молекулярно-генетические исследования экспрессии гена *NAT2* человека и гена *NAT1* человека на уровне мРНК методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с применением видоспецифичных праймеров.

В работе использован амплификатор Bio-Rad CFX 96 Real-Time System (США). Прибор позволяет проводить амплификацию с детекцией генетических продуктов флуорометрическим методом. Для этого, кроме необходимых компонентов смеси, введен зонд, позволяющий с большей точностью определить наличие гена мишени. Выделение ДНК и РНК для исследований осуществлялись на автоматическом процессоре магнитных частиц для очистки нуклеиновых кислот, клеток и белков «Thermo Scientific King Fisher DUO» (Финляндия). Использование технологии магнитной сепарации позволило обрабатывать любые образцы, включая кровь, клеточные культуры, тканевые лизаты, с гарантированной сохранностью образцов. Применение указанной автоматизированной системы позволило провести высокоскоростное выделение и очистку нуклеиновых кислот из биологического материала. Благодаря использованию запатентованной технологии магнитной сепарации система обрабатывает образцы с гарантированной сохранностью качества с невероятно высокой скоростью. Скорость и чистота образцов позволяет провести требуемые геномные исследования, гарантируя абсолютное удаление примесей, являющихся причиной ингибирования реакций ПЦР в режиме реального времени.

Концентрация ДНК и РНК в пробе проверялись с помощью флуориметра Qubit 3.0 (США).

Нами были созданы ПЦР-системы для идентификации искомым генов *NAT1mus*, *NAT2mus*, *NAT1hom*, *NAT2hom*, а также система идентификации гена домашнего хозяйства (*Gapdh*). Разработанные методики дают возможность более точного определения нали-

чия искомого гена в образце и позволяют сократить время исследования.

Для подтверждения специфичности выявляемых участков генов *NAT1* и *NAT2* человека у трансгенных линий мышей было проведено секвенирование продуктов амплификации. Полученные данные свидетельствуют о 100% принадлежности последовательностей к генам *NAT1* и *NAT2* человека в образцах.

Разработаны и описаны методики молекулярно-генетического исследования по выявлению количественной экспрессии генов *NAT1* и *NAT2mus* и *NAT1* и *NAT2hom* у трансгенных животных с применением флуоресцентных зондов и праймеров для проведения ПЦР в режиме реального времени в сравнении с мышами линии C57BL/6. Эти методики и ПЦР-системы позволяют нам описывать поведение гена, изменение его количественной характеристики во времени при введении трансгенным животным различных интересующих нас веществ.

**Разработка высокоспецифичных праймеров и флуоресцентных зондов экспресс-оценки, детекции и верификации генов *NAT1* и *NAT2mus*, *NAT1* и *NAT2hom***

Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля согласно протоколу производителя к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПраймМагно-сорб» («ИнтерЛабСервис», Москва). Синтез первой цепи кДНК проводили согласно указаниям инструкции «Комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК РЕВЕРТА-Л» («ИнтерЛабСервис», Москва). Амплификацию проводили методом ПЦР с детекцией накопления

продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) с помощью детектирующего амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) и специфических праймеров и зондов к генам *NAT2* мышей (далее – *NAT2<sub>mus</sub>*) и *NAT2* человека у трансгенных мышей (далее – *NAT2<sub>hom</sub>*) («Синтол», Россия). Праймеры для последовательностей к *NAT1<sub>mus</sub>*, *NAT1<sub>hom</sub>* были подобраны с помощью программы Vector NTI.

### Результаты и их обсуждение

#### Получение первых поколений трансгенных животных

Методом микроинъекции генных конструкций в пронуклеусы мышей нами был получен первый трансгенный самец с геном человека *NAT1*. В результате спаривания самца с нетрансгенными гибридными самками в первом поколении получили 12 мышат, 8 из которых оказались трансгенными (рис. 1). В дальнейшем полученное трансгенное потомство при достижении возраста физиологической зрелости спаривали с

нетрансгенными животными противоположного пола. В третьем поколении трансгенных животных начали скрещивать между собой, в результате инбридинга доля полученного трансгенного потомства выросла.

После получения самца гибридной мыши с геном человека *NAT2* (поколение F<sub>0</sub>) его спаривали с нетрансгенными самками-гибридами (рис. 2). Из полученного потомства только две самки оказались трансгенными. После спаривания этих животных с нетрансгенными самцами во втором поколении получено 7 трансгенных самцов и 3 трансгенные самки.

В результате разведения животных «в себе» было получено третье поколение мышей.

В табл. 1 представлены данные, наглядно показывающие процент наследования трансгена N-ацетилтрансферазы человека (*NAT1* и *NAT2*) у мышей в поколениях F<sub>1</sub>-F<sub>3</sub>. Так, ген человека *NAT1* в первом поколении наследовался у 67% животных, во втором поколении доля наследования составила 53%, а в третьем – 70%.

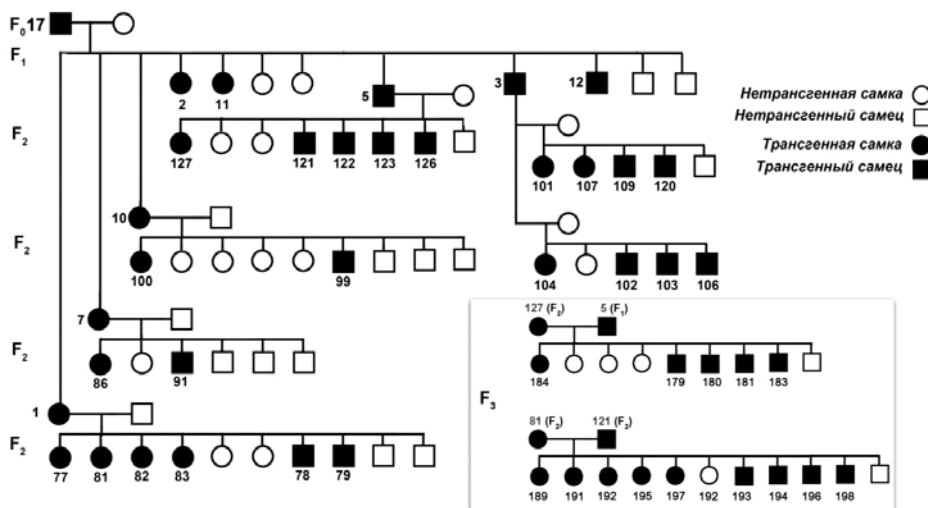


Рис. 1. Наследование трансгена N-ацетилтрансферазы-1 человека (*NAT1*) у трансгенных мышей (F<sub>0</sub>-F<sub>3</sub>, F<sub>3</sub> - вставка). На дальнейшее размножение брали мышей №№ 78, 81, 104, 106, 121, 126, 127. Органы и ткани мыши №189 проверяли на мозаичность.



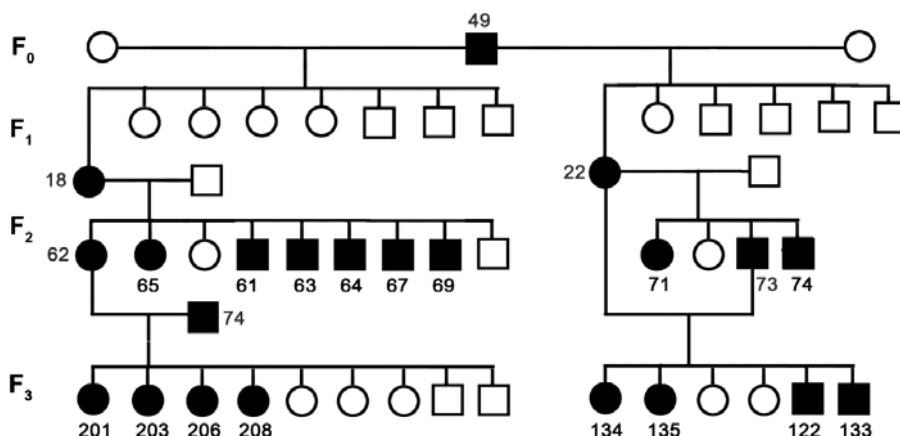


Рис. 2. Наследование трансгена N-ацетилтрансферазы-2 человека (*NAT2*) у трансгенных мышей ( $F_0$ - $F_3$ ). На дальнейшее размножение брали мышей №№ 18, 62, 74. Органы и ткани мыши № 206 проверяли на мозаичность.

Таблица 1  
Наследование трансгена N-ацетилтрансферазы человека (NAT) у трансгенных мышей (F1-F3)

Поколение	Родители	Всего	Самки, кол-во		Самцы, кол-во	
			трансген	всего	трансген	всего
NAT1-потомки основателя линии № 17						
F1	♂№17 x ♀нтг	12	5	7	3	5
Итого в F1		12	5	7 (71%*)	3	5 (60%*)
% трансгенных		8 (67%)	42%		25%	
F2	♂нтг x ♀№1	10	4	6	2	4
F2	♂нтг x ♀№7	6	1	2	1	4
F2	♂нтг x ♀№10	9	1	5	1	4
F2	♂3 x ♀нтг	6	1	2	4	4
F2	♂3 x ♀нтг	4	1	1	2	3
F2	♂5 x ♀нтг	8	1	3	4	5
Итого в F2		43	9	19 (47%*)	14	24 (58%)
% трансгенных		23 (53%)	21%		32%	
F3	♂5 x ♀127	9	1	4	4	5
F3	♂121 x ♀81	11	5	6	4	5
Итого в F3		20	6	10 (60%)	8	10 (80%)
% трансгенных		14 (70%)	30%		40%	
NAT2-потомки основателя линии № 49						
F1	♂№49 x ♀нтг	8	1	5	0	1
F1	♂№49 x ♀нтг	6	1	2	0	4
Итого в F1		14	2	7 (29%)	0	5
% трансгенных		2 (14%)	14%			
F2	♂нтг x ♀№18	9	2	3	5	6
F2	♂нтг x ♀№22	4	1	2	2	2
Итого в F2		13	3	5 (60%)	7	8 (88%)
% трансгенных		10 (77%)	23%		54%	
F3	♂73 x ♀22	6	2	4	2	2
F3	♂74 x ♀62	9	4	7	0	2
Итого в F3		15	6	11 (55%)	2	4 (50%)
% трансгенных		8 (53%)	40%		13%	

Ген человека *NAT2* у мышей наследовался в первом поколении у 14% животных, во втором поколении – у 77% и в третьем – у 53%.

Каких-либо признаков, связанных с гендерными принадлежностями животных при наследовании человеческих генов, не наблюдали.

При дальнейшем разведении трансгенных животных прибегали к классическим схемам, используемым в зоотехнической науке. 4-е и 5-е поколения разводили в условиях, исключающих генную контаминацию, прибегая к инбридингу. В настоящее время получены 5-е и 6-е поколения трансгенных животных с генами *NAT1* и *NAT2*.

Численность поголовья трансгенных животных, полученных к 6-му поколению, составляет для животных с геном человека *NAT1* – 860 особей, а численность животных с геном человека *NAT2* – 680 особей. Доля наследования человеческого гена *NAT1* у животных составляет примерно 60%, а доля наследования человеческого гена *NAT2* – около 50%. К началу 2016 г. нами получено 5-е поколение трансгенных животных. В результате, стремясь получить чистую линию, можно достичь выведения 2-2,5 поколений трансгенных мышей в год.

Внешне полученные нами трансгенные животные практически не отличаются от исходных форм – мышей линий СВА/лас и С57BL/6. Окрас – от агути до черного цвета. По физиологическим и анатомическим характеристикам они идентичны с исходными родительскими формами (рис. 3).

Для формирования полноценной чистой линии животных с генами *NAT1* и *NAT2* человека необходимо введение чистопородного скрещивания до 18-20-го поколения.

#### Верификация животных с генами человека *NAT1* и *NAT2*

В возрасте 10-ти суток у всех полученных животных забирался биоматериал (кончик хвоста). Для подтверждения наличия человеческих генов *NAT1* и *NAT2* у создаваемых трансгенных животных использовались видоспецифические праймеры, позволяющие идентифицировать ген человека (табл. 2).

Последовательности мРНК *NAT2mus*, *NAT2hom* и мРНК *NAT1mus*, *NAT1hom* были взяты в базе данных NCBI GenBank и синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). Праймеры для последовательностей к *NAT1mus*, *NAT1hom* были подобраны с помощью программы VectorNTI [6].

Стадию амплификации кДНК *NAT2* мышей в режиме реального времени



А



Б

Рис. 3. Трансгенные мыши с генами человека *NAT1* (А) и *NAT2* (Б).

## Праймеры и зонды для Real-Time PCR

Исследуемая мишень	Олигонуклеотидные праймеры и зонды
Ген <i>NAT2mus</i>	N2musF 5-TTGTGAGGAAGAAGCGGGGT-3 N2musR 5-TGTCAAACGGAAGATGGCAG-3 ZN2musFAM-GTTAATCATCTGCTGTACTGGGCTC -BHQ-1
Ген <i>NAT2hom</i>	N2hF 5-TGTTTGGTGGGCTTCATCCT-3 N2hR 5-GGTTTGGGCACGAGATTCT-3 ZN2homTAMRA -TCACTGAGGAAGAGGTTGAAGAAGT -BHQ-2
Ген <i>NAT1mus</i>	N1musF 5-GTCTGCTTTTCATTCTGTTT-3 N1musR 5-CACCATCCACCTCTCTTCT-3 ZN1musFAM-ACAAGAAGTCACTGTAATAAATTGGA-BHQ-1
Ген <i>NAT1hom</i>	N1homF 5-AAGTTGTGAGAAGAAATCGG-3 N1homR 5-ACTGTTCCCTTCTGATTTGG-3 ZN1homROX -TGTCTCCAGGTCAATCATCTTCTGT -BHQ-2

проводили в 25 мкл смеси: ПЦР-буфер ( $\times 10$ ): 700 mM Трис-НСl, pH 8,6 / 25°C, 166 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, Таq-полимераза, на детектирующем амплификаторе CFX-96. Условия проведения амплификации кДНК *NAT2mus* с праймерами N2musF/N2musR и зонда ZN2mus: 95°C – 15 мин, затем 50 циклов: 94°C – 30 сек., 59°C – 30 сек., 72°C – 30 сек.

Стадию амплификации кДНК *NAT2hom* у трансгенных животных в Real-Time PCR проводили в 25 мкл сме-

си: ПЦР-буфер ( $\times 10$ ): 700 mM Трис-НСl, pH 8,6 / 25°C, 166 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, Таq-полимераза, на детектирующем амплификаторе CFX-96. Условия проведения амплификации кДНК *NAT2hom* у трансгенных животных с праймерами N2hF/N2hR и зонда ZN2hom: 95°C – 15 мин, затем 50 циклов: 94°C – 30 сек., 59°C – 30 сек., 72°C – 30 сек.

На рис. 4 показаны графики накопления продуктов амплификации с помощью системы Real-Time PCR, которые

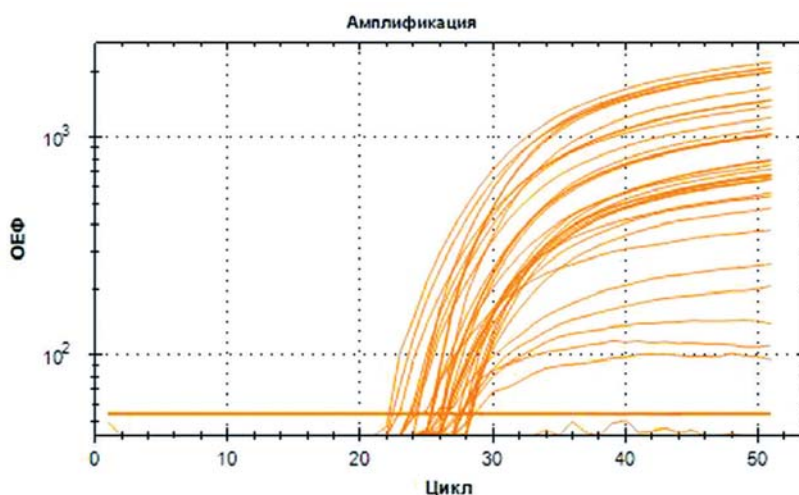


Рис. 4. Детекция гена *NAT1hom* у трансгенных животных. Каждая кривая показывает характер экспрессии гена у индивидуальных животных.

свидетельствуют о наличии положительных проб. В качестве внутреннего контроля специфичности при дальнейших проведениях ПЦР в режиме реального времени и для изучения уровня экспрессии изучаемых генов NAT был выбран ген «домашнего хозяйства» *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) мышей, уровень экспрессии которого одинаков во всех клетках организма мышей.

На рис. 5 представлен график экспрессии генов *NAT2hom* и *GAPDH* при использовании ПЦР-системы у мышей-трансгенов.

Работа по контролю и идентификации трансгенных животных, несущих в своем геноме гены *NAT1hom* и *NAT2hom*, продолжается.

### Заключение

Методом микроинъекции генных конструкций в пронуклеусы был получен первый трансгенный самец мыши

с геном *NAT1* человека и трансгенная самка мыши с геном *NAT2* человека. После получения родоначальников с генами человека начался второй, не менее важный этап по сохранению, разведению животных с целью получения в дальнейшем чистых линий трансгенных мышей. После спаривания сначала с нетрансгенными, а начиная со второго поколения – с трансгенными животными, через два года была получена устойчивая популяция трансгенных животных в шестом поколении. На период работы, в результате постоянной отбраковки непригодных для разведения трансгенных животных, а также удаления из процесса закладки линии нетрансгенных животных, численность животных с геном человека *NAT1* составила 860 особей, а численность животных с геном человека *NAT2* – 680 особей. За время всей работы для получения такого поголовья трансгенных животных было использовано более 7000 мышей.

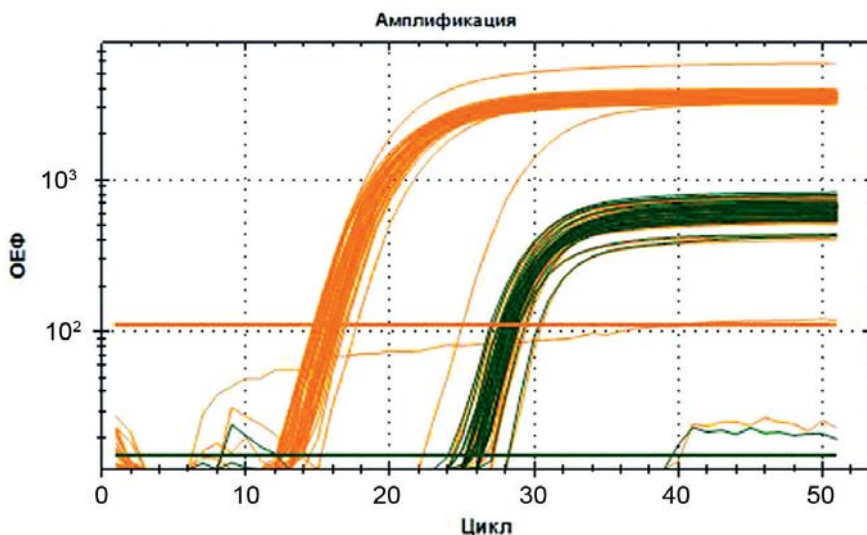


Рис. 5. Детекция генов *NAT2hom* и *GAPDH* у трансгенных животных. Каждая кривая отражает характер экспрессии гена у индивидуальных животных. Оранжевым цветом показано накопление гена *GAPDH*, зеленым – гена *NAT2hom*.

Примерная доля наследования человеческого гена *NAT1* у животных составляет 60%, а доля наследования человеческого гена *NAT2* – 50%.

При получении каждого нового поколения от трансгенных родителей животных подвергали рутинной проверке на наличие человеческих генов *NAT1* и *NAT2* методом ПЦР в реальном времени.

Созданные системы праймеров и флуоресцентных зондов для ПЦР в режиме реального времени позволяют осуществлять контроль наличия генов *NAT1* и *NAT2* человека у трансгенных животных и проводить исследование экспрессии генов-мишеней высокоточным и быстрым способом. Созданные линии трансгенных животных *NAT1* и *NAT2<sup>hom</sup>* могут служить адекватной моделью для исследования свойств препаратов *in vivo*, метаболизирующихся через ацетилтрансферазные механизмы детоксикации. Ввиду неоднородности стандартных линий лабораторных животных, применение новых созданных трансгенных линий *NAT1* и *NAT2<sup>hom</sup>* для доклинических исследований позволяет наиболее адекватно моделировать и изучать механизмы действия лекарственных препаратов и токсикантов.

Предложенная новая биомодель трансгенных гуманизированных мышей с генами *NAT1<sup>hom</sup>* и *NAT2<sup>hom</sup>* оптимальна для доклинических исследований перспективных биологически активных веществ.

### Список литературы

1. Головенко Н.Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. - К.: Наукова думка. 1981. 290 с.
2. Головенко Н.Я., Карасева Т.Л., Курушин А.А. Ацетилирование 7-аминопроизводного нитразепама субклеточными фракциями

некоторых органов и кровью белых крыс // Вопр. мед. хим. 1978. № 1. С. 17-19.

3. Каркищенко В.Н., Мартынов В.В. Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина. 2006. № 4. С. 85.
4. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 320 с.
5. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 448 с.
6. Каркищенко Н.Н., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В. Новая модель оценки избирательной токсичности антибластных средств на трансгенных мышах с генами *Nat1<sup>hom</sup>* человека // Биомедицина. 2015. № 3. С. 4-19.
7. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Петрова Н.В. Тест-система для обнаружения экспрессии генов *NAT2* у человека. Заявка на патент № 2014 14 86 66/10 (078234), дата подачи: 03.12.2014 г.
8. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *NAT1* и *NAT2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных // Биомедицина. 2014. № 2. С. 4-16.
9. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы // Биомедицина. 2014. № 3. С. 4-22.
10. Кулес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. - М., 2004.
11. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
12. Estrada L., Kanelakis K.C., Levy G.N., Weber W.W. Tissue- and gender-specific expression of N-acetyltransferase 2 (*Nat2\**) during development of the outbred mouse strain CD-1 // Drug metab. dispos. 2000. No. 28. Pp. 139-146.
13. Estrada-Rodgers L., Levy G.N., Weber W.W. Substrate selectivity of mouse N-acetyltransferases 1, 2 and 3 expressed in COS-1 cell // Drug metab. dispos. 1998. No. 26. Pp. 502-505.
14. Evans D.A. N-acetyltransferase // Pharmacol. ther. 1989. No. 42. Pp. 157-172.
15. Fakis G., Boukouvala S., Buckle V., Payton M., Denning C., Sim E. Chromosome mapping of

- the genes for murine arylamine N-acetyltransferases (NATs), enzymes involved in the metabolism of carcinogens: identification of a novel upstream noncoding exon for murine Nat2 // *Cytogenet. cell genet.* 2000. No. 90. Pp. 134-138.
16. **Fretland A.J., Doll M.A., Gray K., Feng Y., Hein D.W.** Cloning, sequencing, and recombinant expression of NAT1, NAT2, and NAT3 derived from the C3H/HeJ (rapid) and A/HeJ (slow) acetylator inbred mouse: functional characterization of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens // *Toxic and appl. pharm.* 1997. No. 142. Pp. 360-366.
17. **Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb S.J., Xio G.H., Devanaboyina U.-S., Nangju N.A., Feng Y.** Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms // *9 Cancer epidemiol. Biomarkers prev.* 2000. Pp. 29-42.
18. **Hein D.W., Trinidad A., Yerokun T., Ferguson R.J., Kirlin W.G., Weber W.W.** Genetic control of acetyl coenzyme A-dependent arylamine N-acetyltransferase, hydrazine N-acetyltransferase, and N-hydroxy-arylamine O-acetyltransferase enzymes in C57Bl/6, A/J, AC57F1 and the rapid and slow acetylator A.B6 and B6.A congenic inbred mouse // *Drug metab. dispo.* 1988. No. 16. Pp. 341-347.
19. **Hein D.W.** Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis // *Mutat. res.* 2002. No. 506/507. Pp. 65-77.
20. **Kawamura A., Westwood I., Wakefield L., Long H., Zhang N., Walters K., Redfield C., Sim E.** Mouse N-acetyltransferase type 2, the homologue of human N-acetyltransferase type 1 // *Biochem. pharmacol.* 2008. No. 75. Pp. 1550-1560.
21. **Martell K.J., Levy G.N., Weber W.W.** Cloned mouse N-acetyltransferases: enzymatic properties of expressed Nat-1 and Nat-2 gene products // *Mol. pharmacol.* 1992. No. 42. Pp. 265-272.
22. **Payton M., Smelt V., Upton A., Sim E.** A method for genotyping murine arylamine N-acetyltransferase type 2 (NAT2): a gene expressed in pre-implantation embryonic stem cells encoding an enzyme acetylating the folatecatabolite p-aminobenzoyleglutamate // *Biochem. pharmacol.* 1999. No. 58. Pp. 779-785.
23. **Vatsis K., Weber W., Bell D., et al.** Nomenclature of N-acetyltransferases // *Pharmacogenetics.* 1995. No. 5. Pp. 1-27.

## **Generation of transgenic animal models with human genes *NAT1* and *NAT2***

**V.N. Karkischenko, L.A. Bolotskikh, G.D. Kapanadze, N.N. Karkischenko, E.M. Koloskova, S.V. Maksimenko, E.L. Matveyenko, N.V. Petrova, V.P. Ryabykh, A.O. Revyakin, N.V. Stankova, Kh.Kh. Semenov**

The work is dedicated to the generation of resistant lines of transgenic mice with human genes *NAT1* and *NAT2*. The initial lines for generation of transgenic mice with human genes *NAT1* and *NAT2* used hybrid mice CBA/lac x C57BL/6. Using the method of microinjection of gene constructs into the pronucleus first transgenic mouse were obtained first generation of mice with the human gene *NAT1* and *NAT2*. F1 and F2 generation of transgenic animals are interbred with non-transgenic animals of the opposite gender. The resulting offspring, after checking for the presence of gene are bred without genetic contamination. Inbreeding was carried out on mice of the third generation.

Upon receipt of each new generation of transgenic animals were check for the presence of human genes *NAT1* and *NAT2* by real-time PCR. For this created a system of four species-specific PCR primers and fluorescent probes for Real-Time PCR human genes *NAT1* and *NAT2* in transgenic animals.

The number of population of transgenic animals obtained by the 6th generation of the animal with the human gene *NAT1* – 860 mice, and the number of animals with a human gene *NAT2* – 680 mice.

**Key words:** transgenic mice, human genes *NAT1* and *NAT2*, biomodel, generation, maintenance, verification, real-time PCR, fluorescent probes.



## Использование методов QSAR-моделирования для предсказания токсичности координационных соединений

Н.И. Баранова, А.В. Бурякина, Л.С. Гредягина, А.В. Москвин,  
Е.В. Федорова

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия», Санкт-Петербург

Контактная информация: Баранова Надежда Игоревна, [nadezhda.baranova@pharminnotech.com](mailto:nadezhda.baranova@pharminnotech.com); д.х.н. Москвин Андрей Вадимович, [andrei.moskvin@pharminnotech.com](mailto:andrei.moskvin@pharminnotech.com)

Осуществлена попытка разработать подход к QSAR-моделированию свойств координационных соединений. На примере комплексов ванадия показаны трудности, возникающие при предсказании значения полуметаллической дозы ( $LD_{50}$ ) с использованием современных хемоинформатических программ. Установлено, что в малых выборках требуется введение поправочного коэффициента, связывающего величины предсказанной  $LD_{50}$  с экспериментальной  $LD_{50}$ . На большей выборке соединений показано наличие корреляции между значением коэффициента распределения «н-октанол/вода» ( $\log P$ ) лиганда и  $LD_{50}$  комплекса.

**Ключевые слова:** QSAR, CADD, компьютерное моделирование, острая токсичность,  $LD_{50}$ , комплексные соединения, ванадий,  $\log P$ .

### Введение

Проблема поиска химических веществ с определенной биологической активностью и другими заданными свойствами – одна из важнейших задач био- и хемоинформатики. В современной химической науке уделяется значительное внимание разработке методов, позволяющих осуществлять априорную оценку свойств химических соединений, исходя из структурной формулы, еще до их синтеза [1, 7].

Для поиска и конструирования лекарств, а также для оценки безопасности химических веществ широко приме-

няются методы анализа количественных взаимосвязей структура-активность (quantitative structure-activity relationship – QSAR). В основе QSAR лежит предположение, что свойства химического соединения определяются его структурой. Для описания структуры химического соединения в QSAR используют т.н. дескрипторы – разнообразные характеристики молекул вещества. Однако для координационных соединений, по своей многочисленности среди лекарственных препаратов занимающих второе место после органических соединений, до сих пор не существует разработанных

QSAR-методов. В связи с этим поиск новых потенциальных лекарственных препаратов из группы комплексных соединений остаётся ненаправленным и нерациональным. Существует ряд работ, описывающих корреляционные отношения между структурой комплексов и их биологической активностью [4], однако работ по QSAR-моделированию и предсказанию токсичности координационных соединений нет.

Таким образом, **целью** данного исследования была разработка подхода к QSAR-моделированию комплексов на примере координационных соединений ванадия.

### Материалы и методы

#### Определение полудетальной дозы

Оценка острой пероральной токсичности и установление величины  $LD_{50}$  тестируемых веществ проводили экспресс-методом Прозоровского на белых беспородных крысах-самцах массой 200-220 г и на белых беспородных мышках-самцах массой 18-20 г [2]. Устанавливали  $LD_{50}$  при испытании 4-х соседних доз воздействия по 3 наблюдения. Дозы веществ для введения готовили непосредственно перед введением животным. Порошок суспендировали в очищенной воде и вводили внутривентриально натошак в первой половине дня. Смертность регистрировали в течение первых трёх суток после введения.

#### Предсказание значения полудетальной дозы

Для предсказания значения  $LD_{50}$  был использован онлайн-сервис GUSAR [5]. Структуры исследуемых веществ были представлены в формате mol-файлов с использованием программы CHEM

Sketch и загружены в диалоговое окно программы. Результаты предсказания выводились в виде значений  $LD_{50}$  при разных путях введения: пероральном, внутривенном, внутрибрюшинном, подкожном и ингаляционном. Значения приводились в виде  $\lg LD_{50}$  (ммоль/кг) и  $LD_{50}$  (мг/кг).

### Результаты и их обсуждение

Трудности при установлении корреляционных взаимодействий между структурой и биологической активностью координационных соединений обусловлены особенностями их строения. Так, в структуре комплексного соединения выделяют центральный атом – комплексообразователь, который обычно представлен ионом d-, p- или f-элемента; и лиганды, которые могут быть как анионами, так и нейтральными молекулами, и представлять собой органические или неорганические соединения. Связь между центральным атомом и лигандами относится к особому типу химической связи – координационной, которая является ковалентной связью, однако реализуется по донорно-акцепторному механизму. Прочность и полярность связи определяются химическим строением лигандов и центрального атома. Программное обеспечение, используемое для проведения хемоинформатических исследований, не учитывает особенности координационной связи (длину и прочность), что приводит к присвоению неверных значений дескрипторов и, как следствие, – к созданию неверного молекулярного графа. К тому же, координационное число обычно превышает валентность центрального атома, что воспринимается некорректно многими файловыми форматами. Сложности при переводе



химических данных в математические возникают и в случае смешанных комплексов и пространственных изомеров. У заряженных комплексов присутствуют противоионы внешней координационной сферы, практически не связанные с комплексной частицей, которые также приводят к ошибкам при создании молекулярного графа координационного соединения.

На первом этапе исследования был предложен подход к предсказанию острой токсичности для малой однородной выборки молекул (11 соединений): комплексов ванадия (IV) с производными 1, 3, 4-оксадиазола в качестве лигандов, имеющих общую формулу  $[\text{VOL}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  и координационное окружение  $\text{VO}(\text{S}_2\text{O}_2)$  [5]. Были использованы данные  $\text{LD}_{50}$  для крыс при пероральном введении. Для указанных соединений также было предсказано значение  $\text{LD}_{50}$  с использованием программного продукта GUSAR. Обнаружено, что предсказанные значения коррелируют с экспериментально уста-

новленными, однако превышают их в 4,72 раза. В связи с этим было высказано предположение, что для малой выборки возможно использование поправочного коэффициента на основании значения  $a$  уравнения прямой (рис. 1).  $R^2$  составляет 0,79, что означает пригодность данного подхода для предсказания токсичности в малой выборке сходных по структуре соединений.

Для внешней валидации было выбрано 8 соединений, сходных по структуре с исследуемыми, в результате чего установлено, что  $Q^2$  составляет 0,73, т.е. позволяет считать такую модель устойчивой и точной. Недостатком данного подхода является тот факт, что для каждой новой выборки соединений требуется построение своей зависимости и расчёт значения углового коэффициента.

На следующем этапе была создана большая выборка соединений, включающая комплексы ванадия (IV) и ванадия (V). Были отобраны как нейтральные, так и отрицательно заряженные комплексы с

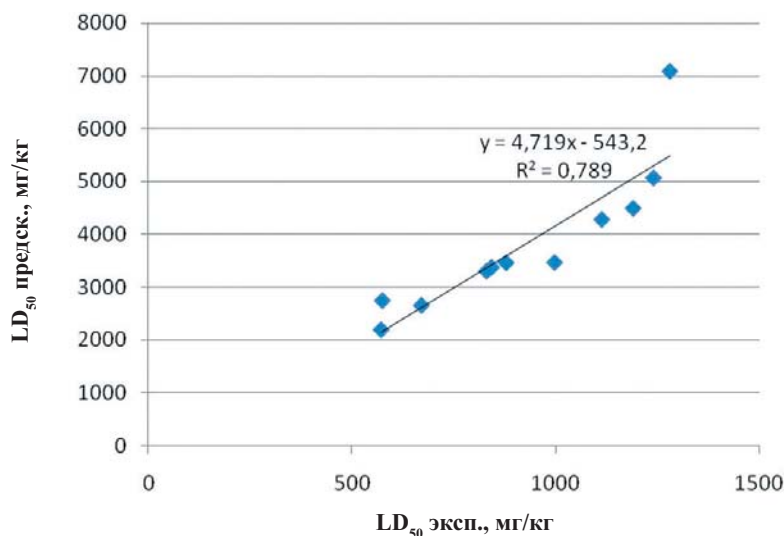


Рис. 1. Соотношение между экспериментально установленными и предсказанными значениями токсичности.

лигандами различного строения. В выборке были использованы только гомолигандные или гетеролигандные комплексы, в которых, кроме органического лиганда, могут присутствовать только молекулы воды (рис. 2). Все молекулы относятся к классическим вернеровским комплексам. На основании того, что свойства координационной связи определяются лигандом и центральным атомом, а в нашем случае центральный атом представлен одним химическим элементом, характер связи будет определяться в большей степени строением лиганда. В связи с этим было высказано предположение, что свойства комплекса могут находиться в непосредственной зависимости от свойств и строения лиганда.

Одной из важнейших характеристик молекулы является коэффициент распределения «н-октанол/вода» –  $\log P$ . Гидрофильно-липофильный баланс молекулы, который численно выражается значением  $\log P$ , отражает способность молекул растворяться в биожидкостях, проникать через биологические мембраны и, как следствие, определяет биологические

свойства вещества [6, 8]. В связи с этим нами была предпринята попытка установить зависимость между  $\log P$  лигандов и  $\log LD_{50}$  комплексов ванадия.

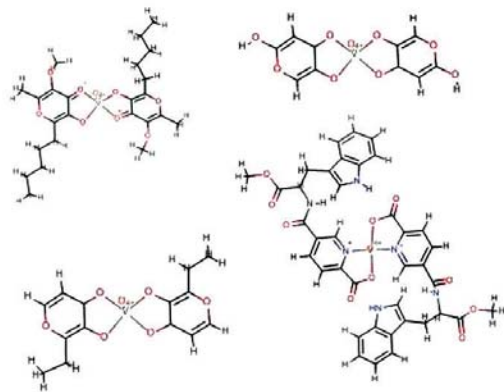


Рис. 2. Примеры структур, использованных при создании модели.

Для этого были отобраны 15 соединений с различной токсичностью. Установлена прямая зависимость, описываемая уравнением:

$$y = 0,2001x + 2,3593;$$

коэффициент Спирмэна (выборка распределена ненормально)  $r_s = 0,625$  ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

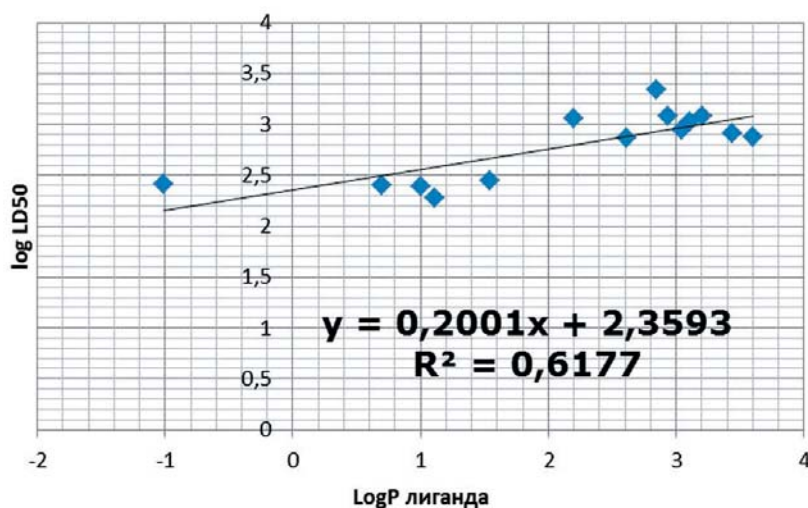


Рис. 3. Корреляция между значением  $\log P$  лиганда и токсичностью комплекса.

Для валидации модели были использованы данные по острой пероральной токсичности 11-ти новых комплексных соединений ванадия (IV) [3], имеющих  $\log P$  лигандов от 0,8 до 3,8, и значение  $LD_{50}$  – от 950 до 1500 мг/кг. При сопоставлении экспериментальных данных с предсказанными было установлено, что точность предсказания составила более 75%, что свидетельствует о возможности использования данной модели. Таким образом, гипотеза о связи свойств и строения лиганда с активностью комплекса была подтверждена.

### Выводы

1. Методы количественного соотношения структура-активность для комплексных соединений до настоящего времени остаются недостаточно разработанными. Системного подхода к решению данной проблемы нет, однако нами была предпринята успешная попытка создания математической модели предсказания биологических свойств координационных соединений.

2. Было разработано два подхода к предсказанию величины  $LD_{50}$  комплексов ванадия: для малых выборок с использованием поправочного коэффициента и для больших выборок с использованием значения  $\log P$  лиганда. Точность указанных моделей подтверждена внешней валидацией.

3. Впервые показано, что свойства комплексной частицы могут быть определены строением её части (лиганда).

### Список литературы

1. *Авенирова Е.Л., Алексеева П.А., Баранова Н.И., Басс М.С., Буракина А.В., Питухина Н.Н., Федорова Е.В.* Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства // Биомедицина. 2014. - № 1. - С. 4-10.
2. *Прозоровский В.В.* Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. - 2007. - Т. 7. - № 3-4. - С. 2090-2120.
3. *Федорова Е.В., Воробьева Н.М., Баранова Н.И.* QSAR-Моделирование и экспериментальный скрининг комплексов ванадия с 5-замещенными 1,3,4-оксадиазол-2-тиолами // Сб. мат-лов XX Конгресса «Человек и лекарство». - 450 с.
4. *Fedorova E.V., Buryakina A.V., Zakharov A.V., Filimonov D.A., Lagunin A.A., Poroikov V.V.* Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Vanadium-Containing Complexes as Antidiabetic Agents // PLoS ONE, 9(7): e100386. – 2014. doi:10.1371/journal.pone.0100386.
5. GUSAR ONLINE [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.pharmacexpert.ru/Gusar/acutoxpredict.html>, свободный. - Загл. с экрана. - Яз. англ.
6. *Hansch C., Maloney P.P., Fujita T., Muir R.M.* The correlation of the biological activity of phenoxycetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients // Nature. - 1962. - No. 194. - Pp. 178-180.
7. *Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V.* QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction // Mol. informatics / - 2011. - No. 30(2-3). - Pp. 241-250.
8. *Lipinski C.A.* Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution Drug Discovery // Today Technol. - 2004. - No. 1(4). - Pp. 337-341.

## Using QSAR-modeling for predicting the toxicity of coordination compounds

N.I. Baranova, A.V. Buryakina, L.S. Gretyagina, A.V. Moskvina, E.V. Fedorova

An attempt to develop an approach to QSAR-modeling properties of coordination compounds was made. Using complexes of vanadium as an example the difficulties in predicting the value of half-lethal dose ( $LD_{50}$ ) using modern chemoinformatical programs were shown. It was found that small samples require a correction factor linking the predicted and experimental value of  $LD_{50}$ . A correlation between the value of the distribution coefficient “n-octanol / water” ( $\log P$ ) of ligands and complexes’  $LD_{50}$  values was shown on a large sample of compounds.

**Key words:** QSAR, CADD, computer modeling, acute toxicity,  $LD_{50}$ , complex compounds, vanadium,  $\log P$ .



## Влияние новых средств из сырья пантовых оленей на биосинтетические процессы в клетках скелетной мускулатуры крыс в условиях длительной физической нагрузки

А.Ю. Жариков, В.Г. Луницын, В.В. Лампатов, Ю.Г. Мотин,  
О.С. Талалаева, Д.В. Елисеев, Г.В. Павляшик

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», Барнаул

Контактная информация: Жариков Александр Юрьевич, [zharikov\\_a\\_y@mail.ru](mailto:zharikov_a_y@mail.ru)

В статье приведены результаты исследования влияния пяти средств, полученных из сырья пантовых оленей, на биосинтетические процессы в клетках мускулатуры крыс. Изучение проводилось по запатентованной методике, включающей гистологическое, гистохимическое и морфометрическое исследования. Наиболее существенные изменения в структуре и клеточной активности скелетной мускулатуры подопытных животных относительно аналогичных показателей контрольной группы зафиксированы при применении средств из половых органов самцов, сухожилий, хвостов, эмбрионов, пант. Полученные данные позволяют судить о способности новых средств из сырья пантовых оленей стимулировать биосинтетическую активность в клетках скелетной мускулатуры крыс, а также проявлять выраженную тонизирующую активность.

**Ключевые слова:** панты оленя, биосинтетические процессы, тонизирующая активность, ядрышковый организатор.

### Введение

Тонизирующее действие средств из сырья пантовых оленей достаточно хорошо известно [2, 6]. Однако поиск новых, более активных и безопасных средств пантолечения продолжается.

В рамках долгосрочной целевой программы «Развитие комплексной переработки продуктов пантового оленеводства в Алтайском крае», реализуемой под эгидой Губернатора Алтайского края А.Б. Карлина, в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства» были раз-

работаны 5 новых средств из различных органов и тканей маралов. Разработка проводилась на основе новых технологических приемов, позволяющих значительно повысить выход биологически активных веществ. Это дало основание предположить, что потенциальное влияние указанных средств на организм может иметь довольно обширный характер, включая воздействие на клеточные процессы.

В связи с этим мы решили попытаться установить наличие и характер влияния новых средств из сырья пантовых

оленей на биосинтетические процессы в клетке, что и явилось **целью** настоящего исследования.

### **Материалы и методы**

Учитывая, что основной целью практического применения средств из сырья пантовых оленей является повышение физической активности и выносливости, эксперимент проводился в условиях длительной физической нагрузки [1]. По этой же причине мишенью для оценки клеточного действия стали миоциты скелетной мускулатуры.

Эксперименты проводились на 50-ти крысах популяции линий Wistar обоих полов (в равном соотношении) массой 220-250 г, которые в течение всего эксперимента находились в индивидуальных метаболических клетках на стандартном лабораторном пищевом рационе. Содержание и уход за животными соответствовали нормативам, приведенным в Руководствах [5, 7].

Животные были разделены на 6 групп: из них 5 – опытных (крысы получали новые средства из сырья пантовых оленей (ССПО)), и 1 – контрольная группа (эквивалентное количество физиологического раствора).

Использовались новые средства из сырья пантовых оленей, полученные из половых органов самцов (ССПО 1), сухожилий (ССПО 2), хвостов (ССПО 3), эмбрионов (ССПО 4), пант (ССПО 5). Указанные средства были синтезированы методом ферментативного гидролиза сырья при ультразвуковой обработке. Выделенный гидролизат подвергался концентрированию и сушке в вакуумной сушилке. В результате были получены порошкообразные субстанции изучаемых средств без вкуса и запаха.

Введение всех 5-ти ССПО осуществлялось ежедневно на протяжении 10-ти дней внутривенно с помощью атравматичного зонда в дозе 25 мг/кг. Физическая нагрузка для крыс задавалась с помощью проведения теста ежедневного вынужденного плавания с грузом (10 г) до полного прекращения плавания (утомления) в бассейне с температурой воды 22-24°C.

По истечении 10-ти дней эксперимента у крыс под эфирным наркозом хирургическим путем извлекался фрагмент мышцы из задней левой конечности, после чего животные подвергались эвтаназии.

Морфологическая оценка биосинтетических процессов в клетках осуществлялась по следующей методике. Извлеченные фрагменты мышцы освобождались от соединительной и жировой тканей, после чего из их центральной части вырезались кусочки размером 0,5x0,3 см и помещались в 10% раствор забуференного формалина. Гистологический материал фиксировался 24 ч. Использовалась проводка с изопропанолом и заливка в парафин [4]. Срезы тканей толщиной 6-8 мкм изготавливались на ротационном микротоме. Гистологические препараты окрашивались гематоксилин-эозином и AgNORs на ядрышко-вые организаторы.

Оценка степени гипертрофии мышечных волокон осуществлялась путем измерения их поперечного сечения. Для этого препараты, окрашенные гематоксилин-эозином, рассматривались в светооптическом микроскопе ЛОМО Микмед-6 при увеличении x400. Изготавливались снимки гистологических препаратов с использованием цифровой камеры Canon PS A520. Препараты ана-

лизировались на фотографиях с помощью программного пакета AxioVision 3.4LE.

Определение биосинтетической активности ядер миосимпластов производилось путем подсчета среднего количества гранул серебра на одно ядро и определения процентного содержания ядер с одним, двумя, тремя и более гранулами на увеличении х400 светоптического микроскопа.

Полученные результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов с использованием критерия Вилкоксона. Все расчеты велись по общепринятым формулам. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – выборочное среднее,  $m$  – ошибка среднего.

### Результаты и их обсуждение

Комплексное гистологическое, гистохимическое и морфометрическое исследование, проведенное по завершению курса назначения ССПО, позволило обнаружить довольно примечательные изменения в структуре и клеточной

активности скелетной мускулатуры подопытных животных относительно аналогичных показателей в контрольной группе при введении изучаемых ССПО (табл.).

Наиболее значимые изменения были зафиксированы в группе ССПО 1. Средняя толщина мышечного волокна у крыс этой группы в 1,55 раза превышала показатель контрольной группы, что свидетельствует о выраженном приросте мышечной массы. Эти данные хорошо согласуются с результатами анализа биосинтетической активности в ядре клеток. После курса введения ССПО 1 количество ядер с двумя ядрышковыми организаторами увеличилось относительно контроля в 1,57 раза, а с тремя ядрышковыми организаторами – и вовсе в 9,5 раза.

Как известно, ядрышковый организатор – это участок хромосомы, кодирующий синтез иРНК, которая впоследствии определяет интенсивность синтеза белка на рибосомах [3]. Поэтому столь выраженный рост количества ядер с

Таблица  
Результаты комплекса гистологического, гистохимического и морфометрического исследований

Группа	Толщина мышечного волокна (мкм)	Количество и процент ядер с ядрышковыми организаторами		
		с одним ядрышковым организатором	с двумя ядрышковыми организаторами	с тремя ядрышковыми организаторами
Контроль	15,7±0,50	37 (61,7%)	21 (35,0%)	2 (3,3%)
ССПО 1	24,4±0,49*	23 (30,7%)*	33 (44,0%)	19 (25,3%)
ССПО 2	20,7±0,58*	31 (41,3%)*	32 (42,7%)	12 (16,0%)
ССПО 3	18,1±0,32*	21 (28,0%)*	33 (44,0%)	21 (28,0%)
ССПО 4	17,5±0,36*	17 (28,3%)*	25 (41,7%)	18 (30,0%)
ССПО 5	15,1±0,35	31 (51,7%)	19 (31,7%)	10 (16,6%)

Примечание: \* – достоверные изменения относительно контроля ( $p < 0,05$ ).

большим числом ядрышковых организаторов свидетельствует о существенном росте биосинтетической активности в клетках на фоне применения ССПО 1.

Было установлено, что у крыс группы ССПО 2 также фиксировались характерные изменения клеточной активности, которые, однако, были выражены в меньшей степени. Так, средняя толщина мышечного волокна увеличилась относительно контроля в 1,32 раза, а количество ядер с двумя и тремя ядрышковыми организаторами – в 1,52 и 6,0 раза соответственно. Учитывая это, можно предположить, что ССПО 2 обладает менее выраженной активностью, для проявления которой необходим более длительный период применения, либо более высокая доза.

10-дневный курс применения ССПО 3 также охарактеризовался увеличением средней толщины мышечного волокна относительно контроля. Правда, оно было еще менее выражено, чем у ССПО 2, но оставалось статистически значимым в сравнении с контролем. С другой стороны, особое внимание обращает на себя явно выраженный рост количества ядер с двумя и тремя ядрышковыми организаторами – в 1,57 и 10,5 раза соответственно.

Изучение клеточного действия ССПО 4 показало, что средняя толщина мышечного волокна в этой группе превышала значения контрольной группы на 15,6%, что заметно уступало показателям ССПО 1-3, но являлось статистически значимым. В то же время, влияние ССПО 4 на биосинтетические процессы в клетке оказалось одним из самых выраженных среди тестируемых ССПО: количество ядер с двумя ядрышковыми организаторами увеличилось

относительно контроля в 1,19 раза, а с тремя ядрышковыми организаторами – в 9,0 раза. По совокупности фактов можно предположить, что клеточное действие ССПО 4 носит отсроченный характер и проявляется в более длительный период времени.

В отношении ССПО 5 было выявлено, что его влияние на биосинтетические процессы в мышечной ткани крыс сравнительно мало и проявляется только в пятикратном росте количества ядер с тремя ядрышковыми организаторами. Это позволяет судить о самом слабом клеточном действии ССПО 5 среди тестируемых средств.

### **Заключение**

Суммируя вышесказанное, отметим, что по результатам эксперимента все 5 новых ССПО обладают способностью стимулировать биосинтетическую активность в клетках скелетной мускулатуры крыс, но с разной степенью интенсивности. Не исключено, что такое различие в силе эффекта было обусловлено особенностями композиций биологически активных веществ в каждом из средств. Изучение этих особенностей и идентификация биологически активных веществ нам представляется задачей следующего этапа исследования, здесь же можно предположить, что механизмы возникновения обнаруженных эффектов отличаются по скорости их реализации. Возможно, механизмы, обеспечивающие эффект разработанного средства из половых органов самцов, были достаточно мощными (не исключено, что причиной этого явились андрогены), в связи с чем обнаруженное действие отчетливо проявилось в период 10-дневного экс-

перимента. Остальные средства, имея иной состав биологически активных веществ, видимо, способны оказывать влияния в средне- или долгосрочном периоде применения.

Результаты проведенного исследования позволяют небезосновательно предполагать, что изученные ССПО могут обладать довольно выраженной тонизирующей активностью, изучению которой и будут посвящены дальнейшие исследования.

### Список литературы

1. *Земцова Н.П., Зверев Я.Ф., Турецкова В.Ф.* Сравнительная общетонизирующая активность измельченных пантов марала // Фун-

даментальные исследования. - 2014. - № 6. - С. 100-103.

2. *Луницын В.Г.* Пантовое оленеводство и его научное обоснование // Ветеринарная газета. - 2002. - № 20 (237). - С. 7.
3. *Льюин Б.* Гены // Мир. - 1987. - С. 528.
4. *Пешков М.В., Дыгало И.И.* Метод гистологической проводки тканей с использованием изопропанола и минерального масла // Архив патологии. - 2009. - № 3. - С.39-41.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
6. *Юдин А.М.* Панты и антлеры: рога как лекарственное сырье. - Новосибирск: Наука, 1993. - 120 с.
7. Guide for the care and use of laboratory animals. - Washington, DC: The National Academies Press, 1996. doi:10.17226/5140.

## Influence of new agents from raw materials of fawn`s antlers on biosynthetic processes in rats skeletal muscles cells in conditions of long physical activity

A.Yu. Zharikov, V.G. Lunitsyn, V.V. Lampatov, Yu.G. Motin,  
O.S. Talalaeva, D.V. Eliseyev, G.V. Pavlyashik

In the article test research results of influence of new agents from raw materials of fawn`s antlers on biosynthetic processes in rats skeletal muscles cells in conditions of long physical activity are described. The trial was led patented technique, which includes histologic, histochemical and morphometric researches. The most changes in structure and skeletal muscles cytology of test animals relatively similar to the control group are recorded in the application of funds from the genitals of males, tendons, tails, embryos punt. The obtained data make assertions about the ability of new agents from raw materials of fawn`s antlers to stimulate biosynthetic activity in rats skeletal muscles cells and to exhibit significant the tonic activity.

**Key words:** fawn`s antlers, biosynthetic processes, significant tonic activity, nucleolar organizer.



## Оценка биосовместимости и биорезистентности заготовок имплантатов из никелида титана с модифицированными наноразмерными поверхностными слоями в опытах *in vivo*

С.В. Надеждин, М.Г. Ковалева, А.Я. Колпаков, Е.В. Зубарева,  
Е.Н. Хорольская

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород

Контактная информация: Зубарева Екатерина Владимировна, zubareva-e@yandex.ru

Исследована способность имплантатов, изготовленных из никелида титана с модифицированными титаном и углеродом наноразмерными поверхностными слоями, поддерживать регенераторный процесс и противостоять комплексу воздействий организма. Исследование биосовместимости и биорезистентности имплантатов из никелида титана было выполнено на 32-х беспородных белых мышах. Установлено, что все имплантаты являются биосовместимыми и по истечении 14-ти дней не оказывают отрицательного влияния на гистотипическую дифференцировку клеток в зоне дефекта. Выявленные следы никеля в плазме крови подопытных животных свидетельствуют о высокой биоактивности имплантатов из исходного *TiNi* с немодифицированной поверхностью. Нанесение на поверхность *TiNi*-имплантатов алмазоподобного углеродного покрытия позволяет снизить биоактивность материала и обеспечить полноценную репаративную регенерацию ткани.

**Ключевые слова:** имплантат, никелид титана, биосовместимость, биорезистентность.

### Введение

На сегодняшний день в травматологии и ортопедии для устранения дефектов костных тканей используют имплантаты, изготовленные из различных металлов и их сплавов, среди которых выделяется сплав никелида титана (*TiNi*). Данный сплав обладает уникальными свойствами – сверхэластичностью и памятью формы [2, 3, 9], однако наличие высокотоксичного никеля (~50 ат.%) не позволяет широко применять данный материал в клинической медицине. Решением этой проблемы является создание защитного слоя – биосовместимого покрытия, которое ограничивало бы выход

никеля в окружающие имплантат ткани [13]. Среди существующих видов покрытий хорошо себя зарекомендовало алмазоподобное углеродное покрытие [12], которое позволяет эффективно решать несколько проблем: выхода ионов никеля из имплантатов [7] и повышения их износ- и коррозионной стойкости [10].

**Цель работы** – исследование способности имплантатов из никелида титана с модифицированными титаном и углеродом наноразмерными поверхностными слоями поддерживать регенераторный процесс и противостоять комплексу воздействий организма.

## Материалы и методы

Имплантаты из никелида титана (*TiNi*-имплантаты) были изготовлены из сплава состава  $Ti - 50,5 \text{ ат.}\% Ni$  и представляли собой круглые диски диаметром 5 мм. В работе были использованы четыре вида *TiNi*-имплантатов: 1 – исходный никелид титана – *TiNi*; 2 – никелид титана, модифицированный титаном – *TiNi-Ti*; 3 – никелид титана, модифицированный наноразмерными алмазоподобными углеродными покрытиями – *TiNi - DLC*; 4 – никелид титана, модифицированный наноразмерными алмазоподобными углеродными покрытиями, легированными азотом – *TiNi-DLC-N*. *TiNi*-имплантаты первого вида изготавливали электроэрозионной резкой с помощью проволочно-вырезного станка AQ300L, все грани механически шлифовали до зеркального блеска с помощью комплекса оборудования для подготовки образцов Struers. На поверхность *TiNi*-имплантатов второго вида после шлифовки наносили слой биотолерантного титана вакуумно-дуговым методом на установке УВНИПА-1-001. Для образцов третьего вида формирование наноразмерных алмазоподобных углеродных покрытий проводили на установке УВНИПА-1-001 по способу, описанному в работе [6], который позволяет снизить величину возникающих в покрытии внутренних напряжений сжатия. Предварительно обработку поверхности *TiNi*-имплантатов проводили ионами азота и ионами титана [4]. Нанесение наноразмерного алмазоподобного углеродного покрытия проводили с использованием импульсного источника углеродной плазмы, подробно описанного в работе [5]. Толщина наноразмерного алмазоподобного углеродного

покрытия составила 180 нм. Наноразмерные алмазоподобные углеродные покрытия, легированные азотом, были получены путем напуска в вакуумную камеру установки УВНИПА-1-001 азота до давления 0,1 Па (*TiNi*-имплантаты 4-го вида) [6].

Исследование биосовместимости и биорезистентности имплантатов из никелида титана было выполнено на 32-х беспородных белых мышах-самцах (ICR) массой 20-25 г в возрасте 2-х мес. Животные получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Мышей содержали в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и Приказом Минздрава РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные содержались в стационарных клетках, не более 10 особей в клетке, в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 21-25°C; освещение в помещениях – естественно-искусственное, 12-часовой световой цикл). В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из хвойных пород деревьев. В качестве корма применялся полнорационный гранулированный комбикорм для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода давалась в поилках *ad libitum* [8].

Животные случайным образом были поделены на 4 группы по 8 особей в каждой. Первой группе животных инокулировали под кожу *TiNi*-имплантаты первого вида, второй группе – имплантаты *TiNi-Ti*, третьей – имплантаты *TiNi-DLC*, четвертой группе – имплантаты *TiNi-DLC-N*. Экспериментальные исследо-

вания с использованием лабораторных животных проводили в соответствии с международными требованиями [11] и согласно ГОСТу Р ИСО 10993-6-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными». Оценку биорезистентности и биосовместимости осуществляли по ГОСТу Р ИСО 10993-6-2009. *TiNi*-имплантаты вводили под кожу в соединительную ткань со стороны спины подопытного животного. Разрезали кожу и тупым рассечением делали один карман. Основание кармана располагали на расстоянии 10 мм от линии разреза. В карман помещали один *TiNi*-имплантат, затем накладывали швы для предотвращения движения и выпадения заготовки имплантата. Продолжительность эксперимента составила 14 суток. После истечения установленного срока эксперимента макро- и микроскопически оценивали местную реакцию соединительных тканей. Фотографирование зоны дефекта проводили при помощи стереоскопического микроскопа Leica EZ 4D. Извлеченные из-под кожи *TiNi*-имплантаты исследовали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 3D в режиме низкого вакуума. Степень реакции на инокуляцию определяли измерением расстояния от поверхности соприкосновения *TiNi*-имплантата с тканью до участков, имеющих характеристики нормальной ткани с нормальным кровообращением. Гистологические препараты соединительных тканей зоны дефекта готовили общепринятыми методами. При исследовании местного действия после имплантации *TiNi*-имплантатов оценивали следующие параметры: степень фиброза и воспаления; дегенерацию окружающих

тканей; клеточный состав зоны дефекта; наличие некроза; степень интеграции материала имплантата с соединительной тканью инокуляционной зоны. Объем регенераторного процесса (в %) определяли при помощи сетки со 100 точками (81 квадрат = 100%), вставленной в окуляр стереомикроскопа Leica EZ4D [1]. Гистологические препараты изучали при помощи аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (микроскоп Ахиоплан plus фирмы «Zeiss»).

Для оценки биорезистентности *TiNi*-имплантатов применяли рентгеноспектральный микроанализ и рентгеновский спектрохимический анализ. Пробоподготовку для рентгеноспектрального микроанализа осуществляли следующим образом: извлеченные из зоны дефекта участки соединительной ткани, контактировавшей с *TiNi*-имплантатами, фиксировали в 10% растворе формалина и подвергали обезвоживанию в спиртах. Затем образцы ткани исследовали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 3D в режиме высокого вакуума с использованием приставки спектрального рентгеновского анализа EDAX Genesis.

При помощи рентгеновского спектрохимического анализа определяли содержание никеля в плазме крови, которую получали из образцов крови, взятой от экспериментальных животных перед забором гистологического материала. Плазму переносили в кюветы, предназначенные для определения макро- и микроэлементов при помощи рентгенофлуоресцентного спектрометра ARL Optim X. Т.к. концентрация элемента слишком мала, для проведения анализа применяли специальные методики повышения концентрации до предела чувствительности спектрометра. Жидкую

плазму крови отстаивали (упаривали) в кюветках на пленке 3,6 мкм «Mylar», предварительно измерив объем и массу жидкой плазмы. В результате испарения на поверхности майларовой пленки образовывалась тонкая пленка исследуемого вещества. Измерения состава производили в атмосфере гелия, при рабочем напряжении 25-50 кВ, токе на трубке 1-1,36 мА. Были исследованы 4 группы образцов, разбитых на 5 подгрупп, количество определений в каждой подгруппе составило 3 пробы. В качестве контрольной пробы была использована плазма крови, полученная от животного без *TiNi*-имплантата. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

В ходе оценки биологической реакции организма на инокуляцию

*TiNi*-имплантатов во всех экспериментальных группах признаков местной воспалительной реакции в зоне дефекта обнаружено не было. Вокруг имплантатов сформировалась соединительнотканная прослойка, покрывающая экспериментальный образец со всех сторон. В зоне дефекта отсутствовали признаки некроза и нарушения васкуляризации окружающих тканей. Макро- и микроскопически поверхность *TiNi*-имплантатов была без видимых изменений.

Изучение электронограмм *TiNi*-имплантатов показало, что во всех экспериментальных группах соединительнотканные компоненты непосредственно контактируют с поверхностью образцов. Образцы покрыты фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью, полностью покрывающей имплантат в виде капсулы (рис. 1).

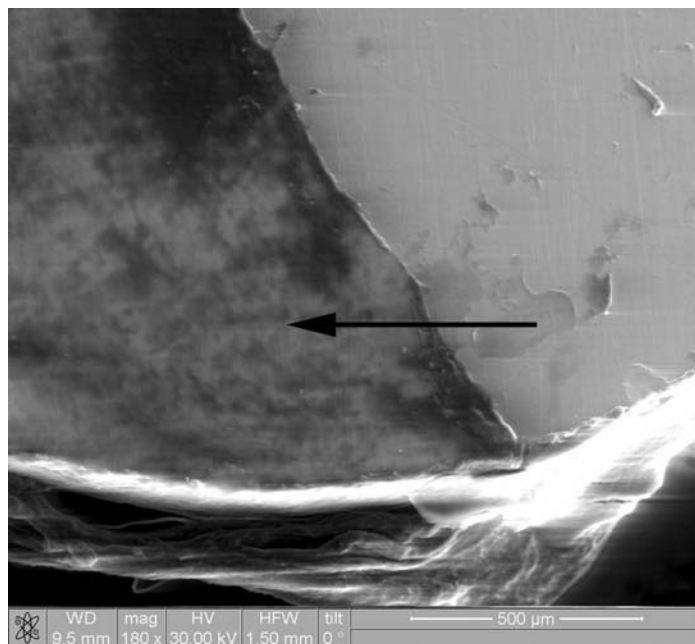


Рис. 1. Фиброзная соединительнотканная капсула вокруг *TiNi*-имплантата (обозначено стрелкой). Электронограмма.

На поверхности имплантатов выявляются отдельные коллагеновые волокна, которые, используя микрорельеф поверхности (царапины и каверны), интегрируются с ней. В ходе изучения области инокуляции *TiNi*-имплантатов во всех экспериментальных группах было установлено, что в месте соприкосновения соединительных тканей с *TiNi*-имплантатами отсутствуют признаки дегенерации и некроза тканей. При изучении гистологических препаратов патологических изменений в соединительнотканном компоненте регенерационной зоны не выявлено (рис. 2).

На 14-е сутки после оперативного вмешательства выявлялись зрелые коллагеновые волокна и плотные слои фибробластов, составляющие соединительнотканый каркас капсул. Степень реакции ткани на инокуляцию образцов имплантатов исходного *TiNi* и *TiNi-Ti*

была умеренной, площадь зоны регенерации составила 8 мм<sup>2</sup>. Слабая реакция тканей на инокуляцию отмечалась при внедрении имплантатов *TiNi-DLC* и *TiNi-DLC-N*, площадь зоны регенерации составила около 6 мм<sup>2</sup>.

Таким образом, все *TiNi*-имплантаты являлись биосовместимыми и по истечении 14-ти дней не оказывали отрицательного влияния на гистотипическую дифференцировку клеток в зоне инокуляции. Высокую биологическую активность показали имплантаты – исходный *TiNi* и *TiNi-Ti*, объем регенераторного процесса составил 70% площади области дефекта. Имплантаты *TiNi-DLC* и *TiNi-DLC-N* продемонстрировали биоинертность, объем регенераторного процесса был равен 40% площади области дефекта.

Рентгеноспектральный микроанализ соединительной ткани, непосредствен-

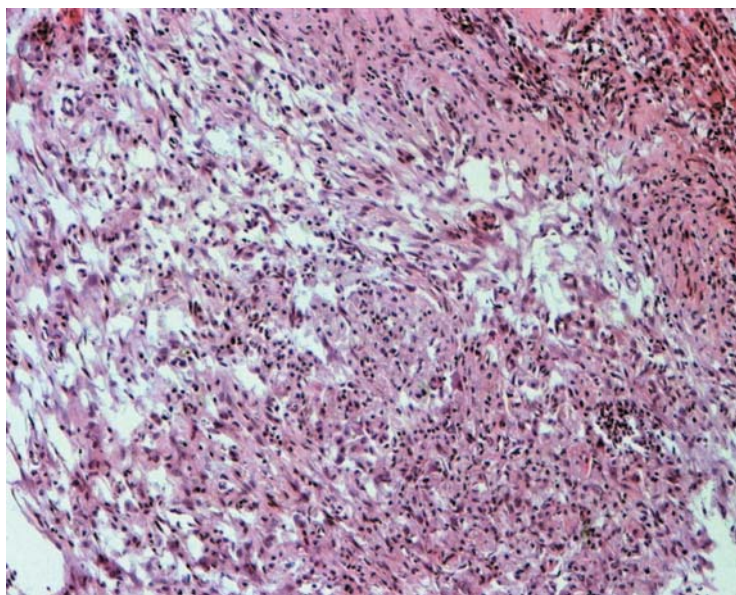


Рис. 2. Микрофотограмма соединительной ткани, непосредственно контактирующей с поверхностью *TiNi*-имплантата. Рыхлая (слева) и плотная (справа в верхнем углу) волокнистая соединительная ткань без признаков некроза и дегенерации. Окраска гематоксилин-эозином, ув. x200.

но прилегающей к *TiNi*-имплантатам, показал, что в спектре характеристического рентгеновского излучения отсутствуют пики, соответствующие никелю, во всех экспериментальных группах. В ходе рентгеновского спектроскопического анализа плазмы крови в опытных группах были выявлены крайне низкие концентрации никеля, которые находились на нижней границе чувствительности метода, а в контрольной пробе значения были равны нулю. Так, в 1-й и 2-й группах среднее значение концентрации никеля составило по 0,01 мг/мл, в 3-й группе – 0,008 мг/мл, в 4-й группе – 0,007 мг/мл. Полученные значения концентрации никеля, выявленные в плазме крови животных опытных групп, не обладают токсическим эффектом [14], однако могут влиять на характер регенераторного процесса.

### Выводы

Исследование показало, что все имплантаты являются биосовместимыми и по истечении 14-ти дней не оказывают отрицательного влияния на гистотипическую дифференцировку клеток в зоне дефекта. Рентгеноспектральный микроанализ не выявил наличия никеля в окружающих имплантат тканях, что свидетельствует о биорезистентности инокулированных материалов. Обнаруженные следы никеля в плазме крови подопытных животных свидетельствуют о высокой биоактивности имплантатов из исходного *TiNi* с немодифицированной поверхностью. Нанесение на поверхность *TiNi*-имплантатов алмазоподобного углеродного покрытия позволяет снизить биоактивность материала и обеспечить полноценную репаративную регенерацию ткани.

### Список литературы

1. Автандилов Г.Г., Яблчанский Н.И., Губенко В.Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса. – М.: Медицина. 1981. 192 с.
2. Гюнтер В.Э., Итин В.И., Манасевич Л.А. и др. Физико-механические критерии разработки материалов с памятью формы для медицины // Известия вузов. Физика. 1989. № 3. С. 97-100.
3. Гюнтер В.Э., Ходоренко В.Н., Котенко В.В. и др. О коррозионной стойкости и биологической совместимости металлических материалов // Имплантаты с памятью формы. 1993. № 1. С. 1-5.
4. Камышанченко Н.В., Ковалева М.Г., Колпаков А.Я., Маслов А.И., Поплавский А.И. Влияние дозы облучения ионами титана на износостойкость углеродного покрытия // Упрочняющие технологии и покрытия. – М.: Машиностроение. 2006. № 3. С. 29-30.
5. Маслов А.И., Дмитриев Г.К., Чистяков Ю.Д. Импульсный источник углеродной плазмы для технологических целей // Приборы и техника эксперимента. 1985. № 3. С. 146-149.
6. Москвитин А.А., Маслов А.И., Колпаков А.Я., Поплавский А.И. Способ формирования сверхтвердого аморфного углеродного покрытия в вакууме: Пат. РФ 2430986.
7. Надеждин С.В., Ковалева М.Г., Колпаков А.Я., Поплавский А.И., Москаленко М.И., Яржомбек И.О. Оценка токсичности заготовок для имплантатов из никелида титана в опытах *in vitro* // Научные ведомости БелГУ. Естественные науки. 2011. Вып. 14. № 3 (98). С. 163-166.
8. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
9. Эффекты памяти формы и их применение в медицине // Под ред. А.А. Манасевича. – Новосибирск: Наука. 1993. 744 с.
10. Cui F.Z., Li D.J. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films // Surface and Coatings Technology. 2000. Vol. 131. P. 481-487.

11. Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition. URL: [http://www.aaalac.org/resources/Guide\\_2010.pdf](http://www.aaalac.org/resources/Guide_2010.pdf). – 2011.
12. **Hauert R.** A review of modified DLC coatings for biological applications // Diamond and related materials. 2003. Vol. 12. P. 583-589.
13. **Lightfoot A., Martin J., Amendola A.** Fluorescent viability stains overestimate chondrocyte viability in osteoarticular allografts // Am. J. of Sports medicine. 2007. Vol. 35. No. 11. P. 1817-1823.
14. Toxicological profile for nickel / U.S. Department of health and human services public health service. Agency for toxic substances and disease registry. 2005. P. 377.

## Evaluation of biocompatibility and bioresistance of the workpieces of the nickel-titanium implants with modified nanosized surface layers in the *in vivo* experiments

**S.V. Nadezhdin, M.G. Kovaleva, A.Ya. Kolpakov, E.V. Zubareva, E.N. Khorolskaya**

The ability of nickel-titanium implants with nanosized surface layers modified by titanium and carbon to support the regenerative process and to resist to the complex organism influences. Investigation of the biocompatibility and bioresistance of the *TiNi* implants was carried out on 32 outbred white mice. It was found that all implants were biocompatible and did not make a negative impact on histotypic cellular differentiation in the area of the defect at the end of 14 days. The identified traces of nickel in the blood plasma of experimental animals showed high bioactivity of the initial *TiNi* implants with unmodified surfaces. Application of *TiNi*-diamond-like carbon coatings on the surfaces of the implants reduced the bioactivity of the material and provided valuable reparative tissue regeneration.

**Key words:** implant, titanium nickelide, biocompatibility, bioresistance.



## Влияние галоперидола на активность изофермента цитохрома P450 2D6 у больных алкоголизмом

М.С. Застрожин<sup>1,2</sup>, В.В. Смирнов<sup>3</sup>, Д.А. Сычев<sup>1</sup>, Л.М. Савченко<sup>1</sup>,  
Е.А. Брюн<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

<sup>2</sup> – Московский научно-практический центр наркологии, Москва

<sup>3</sup> – ГНЦ Институт иммунологии, Москва

Контактная информация: д.м.н. Сычев Дмитрий Алексеевич, [dimasychev@mail.ru](mailto:dimasychev@mail.ru)

На сегодняшний день имеются данные, что в биотрансформации галоперидола принимает участие изофермент цитохрома P450 – CYP2D6. В то же время, есть данные, демонстрирующие влияние самого галоперидола на активность CYP2D6. Целью работы была попытка оценить степень влияния галоперидола на активность CYP2D6. Исследование выполнено на 25-ти мужчинах, страдающих алкогольной зависимостью и получающих галоперидол в период актуализации патологического влечения. Активность CYP2D6 оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией по отношению 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболин / пинолин. В результате исследования получена модель логарифмической регрессии, отражающей зависимость активности CYP2D6 от дозы галоперидола:  $y = 7,916 - 7,096 * \lg(x)$ . Статистически значимо показано влияние галоперидола на активность изофермента CYP2D6 у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью.

**Ключевые слова:** галоперидол, биотрансформация, CYP2D6, нежелательные лекарственные реакции, патологическое влечение к алкоголю.

### Введение

Галоперидол – один из наиболее часто используемых «типичных» антипсихотических препаратов, обладающий мощным антипсихотическим действием посредством блокады постсинаптических дофаминергических рецепторов, расположенных в мезолимбической системе. Для купирования обострения первичного патологического влечения к алкоголю применяют нейролепти-

ческие препараты с выраженными антипсихотическими свойствами, в т.ч. галоперидол [1]. Прием галоперидола может сопровождаться рядом нежелательных лекарственных реакций (НЛР): головная боль, дискинезия, дистония, снижение артериального давления, ортостатическая гипотензия, аритмия, периферические отеки и др., взаимодействие его с дофаминергическими структурами экстрапирамидной системы не-



редко приводит к экстрапирамидным нарушениям, развитию нейролептического синдрома. В связи с этим галоперидол вызывает неоднозначное и, часто, крайне негативное отношение у больных алкоголизмом, что в определенной мере ограничивает его применение в наркологической практике [2].

Изофермент CYP2D6 представляет собой белок массой 55 кДа, в структуру которого входит 497 аминокислотных остатков. В печени взрослого человека CYP2D6 составляет около 2-4% от общего количества изоферментов группы цитохрома P450 [10]. CYP2D6 участвует в метаболизме около 25% всех известных на сегодняшний день лекарственных средств (ЛС), в т.ч. антипсихотиков, антидепрессантов,  $\beta$ -адреноблокаторов и др.

Галоперидол под действием цитоплазматической карбонилредуктазы преобразуется в метаболит, имеющий 10-20% активности от исходной молекулы, подвергающийся дальнейшему метаболизму при участии CYP2D6 с преобразованием в тетрагидропиридин и конъюгированную с глюкуронатом или сульфатом формы. Восстановленный галоперидол обратно окисляется в галоперидол, преимущественно при участии CYP2D6. Галоперидол подвергается N-деалкилированию при участии CYP2D6, преобразуясь в 4-хлорофенил-4-гидроксиперидин и p-фторбензоилпропионовую кислоту. Связь активности CYP2D6 со скоростью биотрансформации галоперидола была показана в ряде исследований на больных шизофренией [3, 4, 8]. В то же время, некоторые работы опровергают наличие данной связи [9]. Также имеются данные об ингибирующем влиянии галоперидола на активность

CYP2D6 [5, 7], что может регулировать не только скорость биотрансформации самого галоперидола, замедляя ее, но и скорость метаболизма других ЛС, применяемых в качестве сопутствующей терапии.

**Целью** данной работы было изучить влияние галоперидола на активность изофермента цитохрома P450 2D6 у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью, в период актуализации патологического влечения.

### Материалы и методы

В исследовании принимали участие 25 пациентов мужского пола в возрасте  $36,7 \pm 6,8$  лет, страдающих алкогольной зависимостью, находящихся на стационарном лечении в МНПЦ наркологии, получающих галоперидол в таблетированной форме (производитель – ООО «Озон») в дозе 1,5 мг 2-8 раз в сутки (среднесуточная доза – 5,87 мг/сут, 95% доверительный интервал: 4,53-7,22) в период актуализации патологического влечения. Критериями отбора в эксперимент были терапия, включающая галоперидол длительностью 5 дней, и отсутствие в анамнезе сопутствующего психического заболевания. Критерии исключения из эксперимента: применение в терапии иных антипсихотических препаратов, помимо галоперидола; клиренс креатинина  $< 50$  мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови  $\geq 1,5$  мг/дл ( $133$  мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие противопоказаний к применению галоперидола.

Оценка активности изофермента CYP2D6 производилась с использованием метода высокоэффективной жидкост-

ной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ с МС/МС) по содержанию в моче эндогенного субстрата данного изофермента и его метаболита – отношение 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидробета-карболин(6-НО-ТНВС) / пинолин [6]. Результаты оценки активности изофермента представлены в усл. ед.

Оценка эффективности галоперидола осуществлялась с помощью международных психометрических шкал: шкала патологического влечения (The Scale of Pathological Addiction – SoPA), шкала тревоги Гамильтона (Hamilton Anxiety Rating Scale – HARS), шкала тревоги Бека (The Beck Anxiety Inventory – BARS), шкала тревоги Кови (Covy Anxiety Scale – CARS), шкала самооценки тревоги Цунга (The Zung Self-rating Anxiety Scale – ZARS), шкала тревоги Шихана (Sheehan Clinical Anxiety Rating Scale – SARS), шкала депрессии Гамильтона (Hamilton Rating Scale for Depression – HDRS).

Профиль безопасности определялся с помощью шкалы оценки побочного действия (UKU Side-Effect Rating Scale – UKU) и шкалы Симпсона-Ангуса для оценки экстрапирамидных побочных эффектов (Simpson-Angus Scale for Extrapyramidal Symptoms – SAS). Шкалы отражают клиническую картину патологического влечения. Результат исследования оценивается по высоте балла: чем выше балл, тем влечение более выражено. Шкалирование пациентов производили за день до начала терапии, включающей галоперидол, и через 5 дней терапии. Результат оценивался по разнице в баллах: чем больше разница в баллах, тем более выраженные изменения в клинической картине, и тем выше эффективность терапии.

Статистический анализ результатов

исследования производили методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ «Statsoft Statistica v. 10.0». При выборе метода брали во внимание нормальность распределения выборок, которую оценивали с помощью W-теста Шапиро-Уилка. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  (при статистической мощности свыше 80%).

Для определения степени влияния галоперидола на активность изофермента (отношение 6-НО-ТНВС / пинолин) использовали модель нелинейной логарифмической регрессии (модуль Nonlinear Estimation), при разработке которой действовали алгоритм Левенберга-Марквардта (Levenberg-Marquardt estimation method), представляющий из себя метод оптимизации решения задач о наименьших квадратах Гаусса-Ньютона в комбинации с методом градиентного спуска.

### Результаты исследований

По результатам проведения ВЭЖХ с МС/МС получены следующие данные:

- 1) медиана показателя концентрации пинолина в моче составила 1582 пг/мл (межквартильный интервал: 913–2549);
- 2) медиана показателя концентрации 6-НО-ТНВС в моче составила 1703 пг/мл (межквартильный интервал: 1056–2297);
- 3) медиана показателя отношения концентрации 6-НО-ТНВС к концентрации пинолина – 1,23 (межквартильный интервал: 0,71–1,81).

По результатам построения степенной нелинейной регрессии вида

$$y = a - b * \lg(x)$$

по алгоритму Левенберга-Марквардта были получены следующие коэффициенты регрессии:  $a = 7,91$  ( $p < 0,001$ ) и  $b = 7,09$  ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, уравнение нелинейной регрессии приняло вид:

$$y = 7,916 - 7,096 * \lg(x),$$

где  $x$  – гипотетическая равновесная концентрация галоперидола в плазме крови пациентов (нг/мл),  $y$  – отношение концентрации 6-НО-ТНВС к концентрации пинолина (усл. ед.), полученные по

результатам фенотипирования CYP2D6 методом ВЭЖХ с МС/МС.

Графическое отображение модели нелинейной регрессии показано на рисунке.

Результаты анализа данных психометрических шкал и шкал оценки выраженности НЛР представлены в табл. 1.

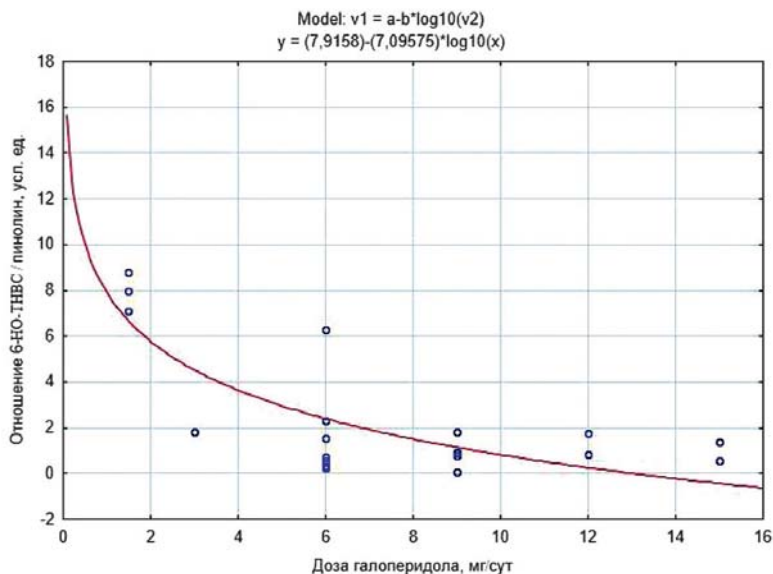


Рис. Зависимость изменения показателя отношения концентрации 6-НО-ТНВС к концентрации пинолина в моче у пациентов после 5-дневной терапии галоперидолом.

Таблица 1  
 Данные психометрических шкал и шкал оценки выраженности НЛР (баллы)

Наименование шкалы	Значение шкалы до терапии	Значение шкалы через 5 дней после начала терапии	Разность значений
SoPA	24,35±2,96	10,3±2,79*	14,00±0,73
HARS	41,7±4,50	25,05±4,77*	16,65±0,88
BAI	33,85±4,48	10,95±4,58*	23,05±0,89
CARS	8,65±1,14	3,45±1,23*	5,05±0,22
ZARS	39,45±3,86	16,55±4,02*	23,00±1,08
SARS	76,05±4,32	31,55±4,81*	44,35±2,13
HDRS	21,65±3,25	8,60±3,03*	12,95±0,51
UKU	12,45±3,82	31,65±3,90*	-19,10±1,02
SAS	1,15±1,53	13,90±1,45*	-12,90±0,72

Примечание: \* –  $p < 0,001$  при сравнении с соответствующим значением шкалы до терапии (U-тест Манна-Уитни).

Расчет коэффициентов корреляций Спирмена показал наличие статистически значимой отрицательной умеренной связи между активностью CYP2D6 и динамикой изменения количества баллов по шкалам SoPA, HARS, BARS, ZARS, SARS, HDRS и положительной умеренной связи с динамикой по шкалам UKU и SAS. По шкале CARS статистически значимая связь отсутствовала (табл. 2).

Таблица 2

**Коэффициенты корреляции Спирмена, отражающие взаимосвязь между активностью изофермента CYP2D6 и разностью величин изучаемых шкал до и после терапии галоперидолом**

Наименование шкалы	rs	p
SoPA	-0,487	<0,05
HARS	-0,573	<0,05
BAI	-0,647	<0,01
CARS	-0,259	>0,05
ZARS	-0,619	<0,05
SARS	-0,586	<0,05
HDRS	-0,573	<0,05
UKU	0,557	<0,05
SAS	0,579	<0,05

### Обсуждение результатов

В ходе исследования статистически значимо показано, что галоперидол обладает существенным ингибирующим влиянием на активность изофермента CYP2D6. Как видно из полученного уравнения функции зависимости, чем больше суточная доза галоперидола, тем меньше показатель отношения концентрации 6-НО-ТНВС к концентрации пинолина в моче у пациентов, получающих в качестве терапии галоперидол. Данный факт необходимо учитывать при назначении как галоперидола,

так и иных ЛС, в биотрансформации которых принимает участие CYP2D6, ввиду снижения скорости элиминации этих ЛС и повышения вероятности развития у пациента НЛР, при определении терапевтической дозы препарата.

Также в ходе исследования показано наличие корреляционной связи между результатами фенотипирования CYP2D6 по отношению к концентрации пинолина и его метаболита в моче и профилем эффективности и безопасности галоперидола. Исходя из направления корреляционной связи, можно сделать следующий вывод: чем выше активность CYP2D6, тем ниже показатели эффективности и выше показатели безопасности, что, вероятно, связано с более активной биотрансформацией галоперидола и снижением уровня его концентрации в плазме крови у пациентов. Причиной отсутствия статистически значимой связи по шкале CARS мы считаем низкую чувствительность шкалы. Дополнительным фактором, влияющим на статистическую значимость, является небольшая выборка исследования, поэтому для повышения уровня достоверности требуется увеличение ее объема.

Таким образом, пациентам, страдающим алкогольной зависимостью, перед назначением антипсихотиков, антидепрессантов,  $\beta$ -адреноблокаторов, в метаболизме которых принимает участие CYP2D6, а также самого галоперидола с целью купирования обострения патологического влечения, рекомендовано определение активности изоферментов микросомальной цепи цитохрома P450 2D6 (с помощью пинолинового теста), либо фармакогенетическое исследование для определения генотипа CYP2D6

по полиморфному маркеру 1846G>A с целью снижения риска развития НЛР у пациентов, являющихся носителями данного полиморфизма.

### Заключение

Галоперидол обладает ингибирующим влиянием на активность изофермента цитохрома P450 2D6 также и у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью.

### Список литературы

1. *Иванец Н.Н.* Наркология: национальное руководство / под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 496 с.
2. *Сиволоп Ю.П.* Рациональные подходы к применению нейролептиков в наркологической практике // Здоровая Украина. 2008. № 7/1. С. 83-84.
3. *Butwicka A., Retka W., Wolańczyk T.* Neuroleptic malignant syndrome in an adolescent with CYP2D6 deficiency // Eur. J. Pediatr. 2014. No. 173(12). Pp. 1639-42. doi: 10.1007/s00431-013-2208-z.
4. *Gasso P., Papagianni K., Bobadilla R.F., Arnaiz J.A., Lafuente A.* Relationship between CYP2D6 genotype and haloperidol pharmacokinetics and extrapyramidal symptoms in healthy volunteers // Pharmacogenomics. 2013. No. 14(13): Pp. 1551-63. doi: 10.2217/pgs.13.150.
5. *Goff D.C., Baldessarini R.J.* Drug interactions with antipsychotic agents // J. Clin. psychopharmacol. 1993. No. 13. Pp. 57-67.
6. *Jiang X.L., Shen H.W., Yu A.M.* Pinoline may be used as a probe for CYP2D6 activity // Drug metab. dispos. 2009. No. 37(3). Pp. 443-6.
7. *Mihara K., Otani K., Ishida M., et al.* Increase of plasma concentration of m-chlorophenylpiperazine, but not trazodon, with low-dose haloperidol // Ther. drug monit. 1997. No. 19. Pp. 43-45.
8. *Nakamura A., Mihara K., Nemoto K., Nagai G., Kagawa S., Suzuki T., Kondo T.* Lack of correlation between the steady-state plasma concentrations of aripiprazole and haloperidol in Japanese patients with schizophrenia // Ther. drug monit. 2014. No. 36(6). Pp. 815-8.
9. *Van der Weide K., Van der Weide J.* The influence of the CYP3A4\*22 polymorphism and CYP2D6 polymorphisms on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, pimozone, and risperidone in psychiatric patients // J. Clin. psychopharmacol. 2015. No. 35(3). Pp. 228-36. doi: 10.1097/JCP.0000000000000319.
10. *Zhou S.F.* Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I // Clin. pharmacokinet. 2009. Vol. 48(11). Pp. 689-723.

## The effect of haloperidol on the activity of the isoenzyme of cytochrome P450 2D6 in patients with alcoholism

M.S. Zastrozhin, V.V. Smirnov, D.A. Sychev, L.M. Savchenko, E.A. Bryun

Today, there is an evidence that haloperidol biotransformation is involved isoenzyme cytochrome P450 – CYP2D6. At the same time, there is data demonstrating the effect of haloperidol on CYP2D6 activity. The aim of the work was an attempt to evaluate the effect of haloperidol on CYP2D6 activity. The study was performed on 25 men suffering from alcohol dependence and receiving haloperidol during the actualization of a pathological inclination. CYP2D6 activity was assessed by high performance liquid chromatography with mass spectrometry in respect of 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline / pinoline. The study produced a model of the logarithmic regression, reflecting the dependence of CYP2D6 activity on the dose of haloperidol:  $y = 7,916 - 7,096 * \lg(x)$ . Statistically significant shows the effect of haloperidol on the CYP2D6 isoenzyme activity in patients with alcohol dependence.

**Key words:** haloperidol, biotransformation, CYP2D6, adverse drug reactions, abnormal craving for alcohol.

## Изучение сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих розувастатин

Л.М. Красных<sup>1</sup>, В.В. Смирнов<sup>1,2</sup>, О.А. Горошко<sup>1</sup>, Е.А. Егоренков<sup>2</sup>,  
Г.Ф. Василенко<sup>1</sup>, Г.В. Раменская<sup>1,2</sup>, А.Е. Петухов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.фарм.н. Горошко Ольга Александровна, [olga\\_goroshko@mail.ru](mailto:olga_goroshko@mail.ru)

Проведено исследование сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих розувастатин в дозе 20 мг. Определение концентрации розувастатина в плазме крови добровольцев осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Подобраны условия хроматографического разделения, условия экстракции и количественного определения розувастатина в плазме крови. Для исследуемых препаратов рассчитаны основные фармакокинетические параметры:  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $C_{max}/AUC$ . 90% доверительный интервал для логарифмически преобразованных значений  $AUC_{0-\infty}$  составил 81,5-106,0 и для  $C_{max}$  – 86,3-106,1. По результатам исследования был сделан вывод о биоэквивалентности сравниваемых препаратов.

**Ключевые слова:** розувастатин, фармакокинетика, биоэквивалентность.

### Введение

Известно, что гиперхолестеринемия является важным фактором риска развития ишемической болезни сердца (ИБС). Основной группой препаратов для коррекции и снижения риска сердечно-сосудистых осложнений являются статины [2, 6]. Актуальность проблемы гиперхолестеринемии подтверждает тот факт, что у лиц старше 50-ти лет частота ее встречаемости составляет около 75% [4, 5].

На международном рынке имеется множество препаратов группы статинов. В последнее время повышенный интерес исследователей привлекает розувастатин, что сделало его одним из наиболее изученных статинов [9]. Данный препарат, являющийся гиполипидемическим средством IV поколения, реализуется на фармацевтическом рынке с

2003 г. В отличие от ловастатина, симвастатина и аторвастатина, он подвергается минимальному метаболизму в печени. В настоящее время розувастатин имеет наилучший профиль безопасности среди статинов. Гиполипидемическое действие прямо пропорционально величине назначенной дозы. Терапевтический эффект появляется в течение 1-й недели после назначения терапии, через 2 недели достигает 90% от максимального. Максимальный эффект обычно достигается к 4-й неделе и после этого остается постоянным [7, 8].

**Цель работы** – исследование сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих розувастатин.

Оценка биоэквивалентности проводилась путем определения концентрации розувастатина в плазме крови

добровольцев с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием.

## **Материалы и методы**

### **Исследуемые препараты**

Для настоящего исследования были выбраны препараты розувастатина – таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, в дозе 20 мг. В качестве референтного препарата (РП) использован препарат розувастатина компании-оригинатора. Исследуемый препарат: воспроизведенное лекарственное средство (ВЛС).

### **Дизайн исследования**

Дизайн исследования соответствовал утвержденному протоколу и требованиям «Надлежащей клинической практики» [1]. Данное исследование проведено по открытой рандомизированной перекрестной схеме в два этапа с двумя последовательностями приема исследуемого препарата (ВЛС) и препарата сравнения (РП), натошак, в условиях клинического центра на 28-ми здоровых добровольцах в возрасте 18-45 лет, включенных в исследование после подписания информированного согласия и проведения медицинского обследования. Скрининговое обследование включало получение демографических данных, данных медицинского и медикаментозного анамнеза, проведение физического осмотра, включающего измерение роста и массы тела, основных жизненных показателей (артериального давления, частоты сердечных сокращений), регистрацию электрокардиограммы, общие анализы крови и мочи, биохимический анализ крови с определением концентраций глюкозы, общего

билирубина, креатинина, активности печеночных аминотрансфераз (АЛТ, АСТ) и щелочной фосфатазы. Все участники были проверены на наличие в организме наркотических веществ и алкоголя, кроме того, волонтерам-женщинам был проведен тест на беременность. Вопрос о включении добровольцев в исследование решался на основе собранной информации с учетом критериев включения и невключения. Все клинически значимые отклонения определяемых параметров безопасности от диапазона нормальных значений регистрировались как нежелательные явления.

Исследование состояло из двух равнозначных этапов. Перед приемом препарата на I этапе исследования добровольцы распределялись на две группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. Добровольцы, вошедшие в первую группу, принимали ВЛС; вошедшие во вторую группу – РП. На II этапе исследования схема была представлена наоборот.

### **Приготовление образцов для анализа**

Отбор образцов крови на каждом этапе исследования осуществлялся до приема препаратов и через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 48 и 72 ч после приема препаратов. Образцы крови помещали в пробирки с гепарином и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования (3000 об./мин в течение 10 мин) отделенную плазму помещали в маркированные пробирки. До момента анализа все образцы хранились при температуре -35°C.

Для приготовления стандартного раствора розувастатина с помощью аналитических весов с точностью до 0,0001 г брали навеску, содержащую 10

мг розувастатина, количественно переносили ее в мерную колбу и растворяли в деионизированной воде, доводя объем раствора до метки 100 мл. Концентрация розувастатина в полученном растворе составляла 100 мкг/мл. Из данного раствора путем дальнейшего разведения получали растворы с концентрациями розувастатина 1 мкг/мл, 100 нг/мл и 10 нг/мл, которые в дальнейшем использовали для приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества.

Калибровочные образцы готовили путем смешивания плазмы с соответствующими стандартными растворами розувастатина. Образцы контроля качества готовили в четырех концентрациях: LLOQ (нижний предел количественного определения – 1 нг/мл), LQC (образец контроля качества с низкой концентрацией – 2,5 нг/мл), MQC (образец контроля качества со средней концентрацией – 10 нг/мл), HQC (образец контроля качества с высокой концентрацией – 50 нг/мл).

#### **Экстракция розувастатина из плазмы крови**

Подготовка проб для хроматографического исследования осуществлялась методом жидкость-жидкостной экстракции. Были определены оптимальные условия, позволяющие добиться максимальной степени извлечения с минимальным уровнем фона и достаточной стабильностью получаемых результатов.

В чистую микропробирку типа Eppendorf на 1,5 мл вносили 500 мкл исследуемого образца плазмы, затем к нему добавляли 50 мкл смеси метанола и воды деионизированной (1:1), 200 мкл натрий-фосфатного буферного

раствора (pH=5) и затем перемешивали на вихревой мешалке типа Vortex. К полученной смеси добавляли 800 мкл этилацетата, после чего микропробирки встряхивали на шейкере в течение 10 мин. Далее пробы центрифугировали в течение 1 мин со скоростью 13200 об./мин. Верхний органический слой с экстрагированным исследуемым веществом отделяли путем заморозки, помещая пробу в холодильник при температуре -64°C на 5 мин. Далее пробы анализировались на ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией. Степень извлечения розувастатина из плазмы крови составила, в среднем, 82%.

#### **ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием**

Анализ проб с целью определения розувастатина в плазме крови проводился на жидкостном хроматографе Surveyor («Thermo scientific») с tandemным масс-спектрометром. Детектирование проводили в режиме ионизации при атмосферном давлении по основному иону  $m/z$  482,2 и дочернему иону  $m/z$  446. Для хроматографического разделения была использована хроматографическая колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 длиной 150×4,6 с размером частиц 5 мкм в градиентном режиме элюирования. В качестве подвижной фазы использовали 0,1% муравьиную кислоту и ацетонитрил.

#### **Количественное определение**

Для расчета концентраций розувастатина использовали метод абсолютной калибровки по площади пика. Площадь пиков оценивались с помощью программы XCalibur (ver. 2.5.6., «Thermo scientific», США) в режиме автоматического интегрирования.



Для оценки линейности методики осуществлялось построение калибровочного графика: готовили калибровочные модельные смеси путем внесения в интактную плазму крови соответствующих стандартных растворов розувастатина.

Представленные данные свидетельствуют о том, что для определяемого вещества калибровочный график (рис. 1) описывается линейной функцией с высоким показателем достоверности аппроксимации. Коэффициент корреляции составил 0,9985.

Правильность и прецизионность методики соответствовала критериям приемлемости (не более 20% для нижней точки, не более 15% – для остальных).

#### Статистическая обработка полученных результатов

На основании полученных результатов измерения концентрации розувастатина в плазме крови добровольцев с помощью программы R Statistics 3.0.2

(Package ‘bear’ 2.6.1) определялись и/или вычислялись следующие фармакокинетические параметры розувастатина:  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $MRT$ ,  $Kel$ ,  $T_{1/2}$ . Для каждого из вышеперечисленных параметров рассчитывались значения описательной статистики: среднее арифметическое (Mean), среднее геометрическое (Gmean), стандартное отклонение (SD), медиана (Median), коэффициент вариации (CV).

Также рассчитывали параметры относительной биодоступности тестового препарата по сравнению с референтным препаратом ( $f'_{0-t}$ ,  $f'_{0-\infty}$  и  $f''$ ).

#### Результаты и их обсуждение

На рис. 2 представлены усредненные фармакокинетические кривые розувастатина в плазме крови добровольцев после однократного приема препаратов ВЛС и РП (20 мг), где анализируемое вещество определялось в течение 72 ч.

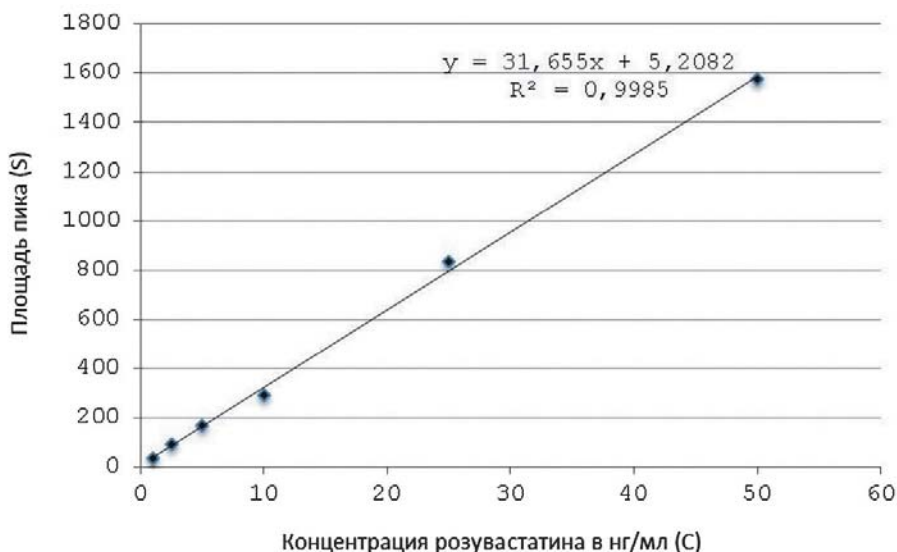


Рис. 1. Калибровочный график зависимости концентрации розувастатина от площади пика.

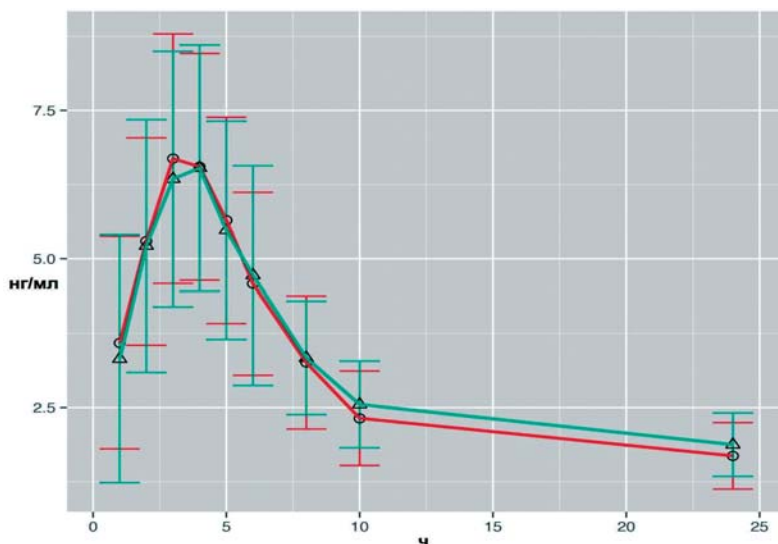


Рис. 2. Средние фармакокинетические кривые розувастатина в плазме крови добровольцев после приема ВЛС (голубая кривая) и РП (розовая кривая). «Усы» – 90% доверительный интервал. N=28.

Анализ усредненных фармакокинетических кривых показал, что после приема как препарата сравнения, так и испытуемого препарата розувастатин достаточно быстро всасывается в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Характер зависимости «концентрация – время» розувастатина у сравниваемых препаратов практически не отличается друг от друга (рис. 2).

Для индивидуальных значений концентраций розувастатина характерен значительный разброс данных внутри группы, который можно объяснить индивидуальной вариабельностью.

Все фармакокинетические параметры по каждому добровольцу в отношении каждого лекарственного препарата представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1  
Фармакокинетические параметры препаратов ВЛС и РП после однократного приема добровольцами внутрь (20 мг)

Показатель	Параметр								
	$T_{max}^1$ ч	$C_{max}^1$ нг/мл	MRT, ч	$T_{1/2}^1$ ч	$K_{el}^1$ ч <sup>-1</sup>	$AUC_{0-\infty}^1$ нг·ч/мл	$AUC_{0-t}^1$ нг·ч/мл	$C_{max}/AUC_{0-\infty}^1$ ч <sup>-1</sup>	$C_{max}/AUC_{0-t}^1$ ч <sup>-1</sup>
ВЛС									
Mean	3,75	7,48	26,41	17,81	0,09	116,71	64,07	0,08	0,13
Gmean	3,56	7,24	19,7	12,2	0,06	101,08	60,24	0,07	0,12
SD	1,21	1,76	19,47	14,33	0,08	62,17	19,42	0,05	0,05
CV	32,15	23,52	73,73	80,49	94,78	53,27	30,31	56,75	36,55
Median	4	7,16	19,96	12,93	0,05	105,13	68,32	0,07	0,11
РП									
Mean	3,64	7,73	26,41	23,1	0,08	124,01	62,94	0,08	0,13
Gmean	3,52	7,55	19,7	14,78	0,05	108,18	60,87	0,07	0,12
SD	0,95	1,60	19,47	22,04	0,1	75,04	16,47	0,04	0,03
CV	26,11	20,75	73,73	95,37	123,66	60,51	26,16	53,27	26,32
Median	3,5	7,77	19,96	14,13	0,05	104,07	59,67	0,07	0,13

Таблица 2  
**Параметры относительной биодоступности ВЛС по отношению к РП**

Показатель	$f'_{0-\infty}$	$f'_{0-t}$	$f''$
Mean	1,009	1,050	1,005
Gmean	0,934	0,989	0,959
SD	0,414	0,350	0,321
CV	41,0	33,3	31,9
Median	0,963	1,018	0,972

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров (табл. 1) розувастатина после однократного приема 20 мг РП и ВЛС показал, что изучаемые препараты почти с одинаковой скоростью всасываются из ЖКТ (параметр  $C_{\max}/AUC_{0-t}$  для ВЛС составил  $0,13 \pm 0,05$  ч, для РП –  $0,13 \pm 0,03$  ч). Время достижения максимальной концентрации ( $T_{\max}$ ) составило, в среднем, для ВЛС –  $3,75 \pm 1,21$  ч и для РП –  $3,64 \pm 0,95$  ч. При этом средняя максимальная концентрация розувастатина, определяемая в плазме крови добровольцев ( $C_{\max}$ ), составила для ВЛС –  $7,48 \pm 1,76$  нг/мл, а для РП –  $7,73 \pm 1,60$  нг/мл. Среднее время удерживания (MRT) розувастатина в плазме крови после приема ВЛС и РП составило  $26,01 \pm 19,25$  ч и  $26,41 \pm 19,47$  ч соответственно. Период полуэлиминации ( $T_{1/2}$ ) составил  $17,81 \pm 14,33$  ч для препарата ВЛС и  $23,1 \pm 22,0$  – для препарата РП.

Относительная биодоступность ВЛС по отношению к РП (табл. 2), определяемая отношением соответствующих значений  $AUC_{0-\infty}$  и  $AUC_{0-t}$ , составила, в среднем,  $1,009 \pm 0,414$  и  $1,050 \pm 0,350$  ( $f'_{0-\infty}$  и  $f'_{0-t}$ ) соответственно. Степень биодоступности, определяемая отношением соответствующих значений  $C_{\max}$ , составила  $1,005 \pm 0,321$ .

Из приведенных данных видно, что среднее значение относительной степени всасывания (относительная биодоступность –  $f'$ ) и величина отношения максимальных концентраций после приема исследуемых препаратов не выходят за допустимые пределы [3].

Анализ фармакокинетических данных проводили исходя из предположения о лог-нормальном распределении параметров  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{\max}$  и  $C_{\max}/AUC_{0-\infty}$  и нормальном распределении остальных параметров, за исключением  $T_{\max}$ . Статистический анализ различий  $T_{\max}$  проводился с помощью непараметрического T-критерия Вилкоксона для парных выборок (нетрансформированные данные, двусторонний тест). Статистический анализ различий параметров MRT,  $T_{1/2}$ ,  $K_{el}$  проводился с помощью параметрического двухстороннего t-критерия Стьюдента для парных выборок (нетрансформированные данные).

Применение параметрической и непараметрической статистики показало, что различия сравниваемых препаратов по показателям  $T_{\max}$ , MRT,  $K_{el}$ ,  $T_{1/2}$  статистически не значимы. Достигнутый уровень значимости  $p > 0,05$  для  $T_{\max}$  розувастатина позволяет принять нулевую гипотезу об отсутствии различий между средними значениями  $T_{\max}$  двух связанных выборок, т.е. по данному показателю различия между ВЛС и РП статистически не значимы. Также отсутствовали статистически значимые различия между средними значениями показателей MRT,  $T_{1/2}$ ,  $K_{el}$ . Во всех случаях при проверке нулевой гипотезы достигнутый уровень значимости ( $p$ ) был больше критического уровня 0,05.

Таким образом, между исследуемыми препаратами ВЛС и РП не выявлено статистически достоверных различий в процессе всасывания – как по полноте, так и по скорости данного процесса.

Результаты дисперсионного анализа логарифмически преобразованных фармакокинетических параметров  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $C_{max}/AUC_{0-\infty}$  розувастатина после приема ВЛС и РП добровольцами (20 мг однократно) представлены в табл. 3.

Результаты дисперсионного анализа сравниваемых параметров позволили принять нулевую гипотезу о том, что различия в средних значениях основных фармакокинетических параметров не вызваны различиями между исследуемыми препаратами: все факторы, кроме индивидуальной варибельности, вносят статистически незначительный вклад в общую вариацию фармакокинетических параметров  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$  и  $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ .

Таблица 3

**Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров розувастатина (логарифмически преобразованные значения). Оценка эффектов межгрупповых факторов**

Источник вариации	Число степеней свободы	Сумма квадратов отклонений	Средний квадрат отклонений	F-критерий Фишера	Значимость критерия Фишера
$AUC_{0-\infty}$					
Препарат	1	0,05	0,048	0,58	0,45
Период	1	0,07	0,073	0,88	0,36
Добровольцы	26	12,65	0,486	5,88	$1,2e^{-05}$
Остаточная дисперсия	26	2,15	0,083		
$C_{max}$					
Препарат	1	0,015	0,0146	0,29	0,60
Период	1	0,027	0,0270	0,53	0,47
Добровольцы	26	2,015	0,0775	1,52	0,15
Остаточная дисперсия	26	1,327	0,0551		
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$					
Препарат	1	0,01	0,010	0,10	0,75
Период	1	0,01	0,011	0,12	0,73
Добровольцы	26	14,08	0,542	5,67	$1,7e^{-05}$
Остаточная дисперсия	26	2,49	0,096		

90% доверительные интервалы для отношений средних значений параметров  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$  и  $C_{max}/AUC_{0-\infty}$ , %

Параметр	Отношение средних значений	Коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности	90% доверительные интервалы	Критерий биоэквивалентности
$AUC_{0-\infty}$	98,7	29,3	81,5 – 106,0	80-125
$C_{max}$	97,9	22,8	86,3 – 106,1	75-133
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$	99,9	31,6	89,3 – 118,4	75-133

Рассчитанные 90% доверительные интервалы для отношений средних логарифмически преобразованных значений фармакокинетических параметров  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$  и  $C_{max}/AUC_{0-\infty}$  розувастатина, а также коэффициенты внутрииндивидуальной вариабельности этих параметров представлены в табл. 4.

Как видно из представленных данных, средние значения и доверительные интервалы основных фармакокинетических параметров не выходят за допустимые пределы [3].

### Заключение

Таким образом, настоящее исследование сравнительной фармакокинетики двух лекарственных средств показало, что препарат ВЛС (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг) и препарат сравнения РП (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 20 мг) являются биоэквивалентными.

### Список литературы

1. Национальный стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р ИСО 14155 – 2014. Клинические исследования. Надлежащая клиническая практика. – М.: Стандартинформ, 2015, 46 с.

2. Недогода С.В. Выбор статина для гиполлипидемической терапии с позиций клинической фармакологии и доказательной медицины // Кардиоваск. терапия и профилактика. – 2008. – № 7. – С. 112-115.
3. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: Методические указания. – 2008, 32 с.
4. Харченко В.И., Какорина Е.П., Корякин М.В. и др. Смертность от болезней системы кровообращения в России и в экономически развитых странах. Необходимость усиления кардиологической службы и модернизации медицинской статистики в Российской Федерации // Рос. кардиол. журнал. – 2005. – № 2. – С. 3-9.
5. Boitsov S., Khomitskaya Y.U.V. Centralized pan-Russian Survey on the undertreatment of hypercholesterolemia (CERHEUS) // Eur. Heart J. – 2012. – Vol. 33 (Abstract Suppl.). – P. 451.
6. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) // Eur. Heart J. – 2011. – Vol. 32 (14). – P. 1769-1818.
7. Kasliwal R., Wilton L.V., Cornelius V., et al. Safety profile of rosuvastatin: results of a prescription-event monitoring study of 11,680 patients // Drug saf. – 2007. – Vol. 30 (2). – P. 157-170.

8. McAfee A.T., Ming E.E., Seeger J.D., et al. The comparative safety of rosuvastatin: a retrospective matched cohort study in over 48,000 initiators of statin therapy // *Pharmacoepidemiol. drug saf.* – 2006. – Vol. 15 (7). – P. 444-453.
9. McTaggart F., Buckett L., Davidson R., et al. Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin A new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor // *Am. J. Cardiol.* – 2001. – Vol. 87 (5A). – P. 28B-32B.

## **The study of comparative pharmacokinetics of preparations containing rosuvastatin**

**L.M. Krasnykh, V.V. Smirnov, O.A. Goroshko, E.A. Yegorenkov,  
G.F. Vasilenko, G.V. Ramenskaya, A.E. Petukhov**

The study of comparative pharmacokinetics of preparations containing rosuvastatin, 20 mg was carried out. Determination of the rosuvastatin concentration in the blood plasma of volunteers was performed by HPLC with mass spectrometric detection. Conditions for the chromatographic separation, conditions of extraction and quantitative determination of the plasma rosuvastatin levels were selected. For the study preparations to calculate the main pharmacokinetic parameters:  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $C_{max}/AUC$ . 90% confidence interval for the log-transformed values  $AUC_{0-\infty}$  was 81,5-106,0 and  $C_{max}$  – 86,3-106,1. The study concluded compared bioequivalence of drugs.

**Key words:** rosuvastatin, pharmacokinetics, bioequivalence.

# Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным **комбикормом для лабораторных животных** научные медицинские и учебные учреждения России.

## Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень;
- ✓ Премиксы.



**НАШИ КОРМА**  
полнорационные,  
сбалансированные по  
аминокислотному составу,  
минералам и витаминам

Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 9 (Виварий)  
ООО "Лабораторкорм"

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 648-42-39;

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

[www.laboratorkorm.ru](http://www.laboratorkorm.ru), e-mail: [info@laboratorkorm.ru](mailto:info@laboratorkorm.ru)

на правах рекламы



## БИОМЕДИЦИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»  
Филиал «Андреевка»

Филиал «Андреевка» образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году.

Постановлением Совета Министров СССР основной задачей Филиала является получение и выращивание лабораторных животных. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируруемыми по генетическим, физиологическим, морфологическим показате-

лям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С Филиалом сотрудничает более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАМН, РАН, Минздравсоцразвития, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

### Филиал «Андреевка» предлагает следующих животных:

**I. Морские свинки:** альбиносы и пестрые.

**II. Генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крыс;** мыши SHK-самки подвержены раку молочных желез (частота заболевания выше 50%).

**III. Линейные мыши и крысы:**

– мыши линии **DBA** – имеют светло-коричневый окрас шерсти, используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях, для изучения нарушений вестибулярного и слухового аппаратов;

– мыши линии **BALB/C** – белого окраса, альбиносы, используются во всех медико-биологических исследованиях. Высокая частота опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком;

– мыши линии **C57BL/6** – черного окраса. Используются в изучении скелетных аномалий, дефектов развития головы и

глаз. Стандартная линия для поддержания мутаций. Чувствительны к действию канцерогенов, стафилококков, сальмонелл;

– мыши линии **CBA** – серого окраса, используются в радиологии, медико-биологических геронтологических исследованиях, для изучения спонтанных опухолей печени;

– крысы **W1STAR** – белого окраса, альбиносы. Используются для онкологических исследований, для изучения поведенческих реакций.

**IV. Межлинейные гибриды мышей:**

– **F1 CBA x C57BL/6** – шерсть серого окраса;

– **F1 C57BL/6 x DBA** – шерсть черного окраса. Гибриды F1 используются для онкологических и радиационных исследований.



141551, М.О., Солнечногорский р-н, п/о Андреевка, д. 49

Тел.: 8(495)536-09-18; 8(495)536-37-58

Факс: 8(495)536-28-33

E-mail: andreevka-kv@rambler.ru

