



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

В.Н. Каркищенко¹, В.П. Рябых², Л.А. Болотских¹, Х.Х. Семенов¹,
Г.Д. Капанадзе¹, Н.В. Петрова¹, В.А. Езерский², О.Б. Жукова²,
Е.М. Колоскова², С.В. Максименко², В.Н. Столярова², Т.П. Трубицина²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – 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-АВА, 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 ^v *	C3HA/Mv
DBA/2J	A/J	SHK
DBA/2JY	C57BL/10ScSn*	SHR
BALB/cJLac	C57BL/RsJ-db*	
BALB/cY-wal	C57BL/6-W ^v /+*	

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 ⁶⁴² →G	нет	Медленный
		G ⁶⁸⁴ →A	нет	
		A ⁶⁹⁵ →G	His ²³² →Arg	
		T ⁶⁹⁹ →C	нет	
		T ⁷⁹⁵ →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 ²⁹⁶ →T	Asn ⁹⁹ →Ile	Медленный
Мыши (<i>M. castaneus</i>)	NAT2*22	T ⁵³⁷ →C	нет	Быстрый
		C ⁷⁴⁷ →T	нет	
		A ⁸³⁴ →G	нет	
Мыши (<i>M. spretus</i>)	NAT2*23	A ⁷⁸ →T	Glu ²⁶ →Asp	Медленный
		T ¹¹⁷ →C	нет	
		C ²⁴⁴ →A	нет	
		C ⁴⁸⁰ →T	нет	
		T ⁵³⁷ →C	нет	
		A ⁶⁹⁰ →G	нет	
		T ⁸⁰⁷ →A	нет	
		A ⁶³³ →G	нет	
		C ⁷²⁷ →T	Arg ²⁴³ →stop	
Мыши (инбредных линий) [15, 16]	NAT3*1	нет ^h	нет ^h	Быстрый
Мыши (<i>M. castaneus</i>) [16]	NAT3*2	G ²³⁸ →A	Ala ⁸⁰ →Thr	Быстрый (Серотонин-мелатонин)
		T ⁶⁰⁷ →C	Trp ²⁰³ →Gln	
		C ⁶⁰⁸ →A		
Мыши (<i>M. spretus</i>) [16]	NAT3*3	A ¹⁴⁷ →G	нет	Медленный (Серотонин-мелатонин)
		C ¹⁶² →T	нет	
		G ²³⁸ →A	Ala ⁸⁰ →Thr	
		T ²⁹⁵ →C	Cys ⁹⁹ →Arg	
		C ⁴¹³ →T	Thr ¹³⁸ →Ile	
		T ⁵¹¹ →C	Ser ¹⁷¹ →Pro	
		T ⁶⁰⁷ →C	Trp ²⁰³ →Gln	
		G ⁶⁰⁸ →A		
		G ⁶⁰⁸ →A	Arg ²¹³ →Gln	
		G ⁷⁹⁶ →A	Val ²⁶⁶ →Ile	
		T ⁸⁵⁷ →C	Val ²⁸⁶ →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 8⁰⁰ до 20⁰⁰, темновой – с 20⁰⁰ до 8⁰⁰. 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 HE-PES-буфер. Культивирование эмбрионов проводили в среде M16 под газовой фазой, содержащей 5% CO₂ 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 ⁰⁰ -16 ⁰⁰	-
II.	-	-	-
III.	1. Введение ХГч (5-7 И.Е.).	16 ⁰⁰ -17 ⁰⁰	-
	2. Подсадка самок-доноров к самцу.	16 ⁰⁰ -17 ⁰⁰	-
	3. Подсадка самок-реципиентов к вазэктомированным самцам	-	16 ⁰⁰ -17 ⁰⁰
IV.	1. Получение зигот.	11 ⁰⁰ -13 ⁰⁰	-
	2. Микроинъекция зигот и краткосрочное культивирование.	14 ⁰⁰ -16 ⁰⁰	-
	3. Трансплантация зигот самкам-реципиентам	-	16 ⁰⁰ -18 ⁰⁰

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

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 введения 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.