



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

В.Н. Каркищенко¹, Л.А. Болотских¹, Г.Д. Капанадзе¹, Н.Н. Каркищенко¹,
Е.М. Колоскова², С.В. Максименко², Е.Л. Матвеевко¹, Н.В. Петрова¹,
В.П. Рябых², А.О. Ревякин¹, Н.В. Станкова¹, Х.Х. Семёнов¹

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

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 подстилки 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_{mus}*) и *NAT2* человека у трансгенных мышей (далее – *NAT2_{hom}*) («Синтол», Россия). Праймеры для последовательностей к *NAT1_{mus}*, *NAT1_{hom}* 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 F₀) 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 F₁-F₃. Так, ген человека *NAT1* в первом поколении наследовался у 67% животных, во втором поколении доля наследования составила 53%, а в третьем – 70%.

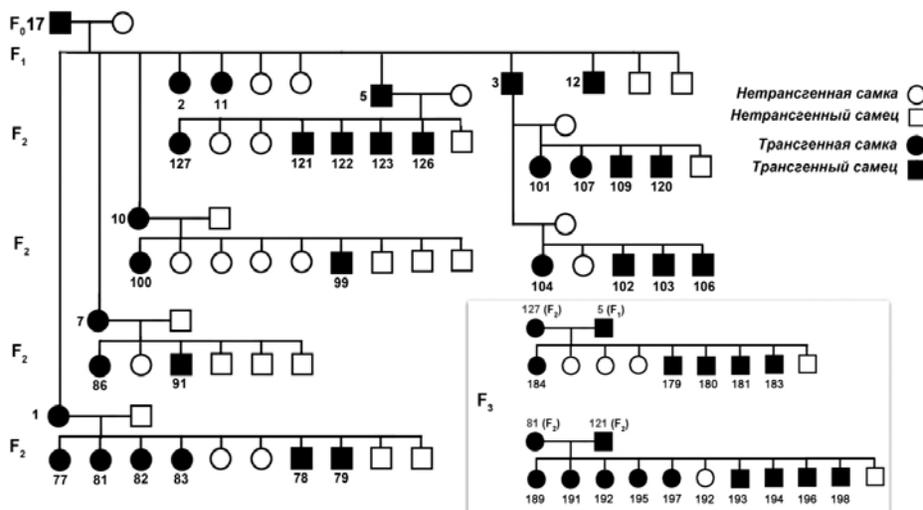


Рис. 1. Наследование трансгена N-ацетилтрансферазы-1 человека (*NAT1*) у трансгенных мышей (F₀-F₃, F₃ - вставка). На дальнейшее размножение брали мышей №№ 78, 81, 104, 106, 121, 126, 127. Органы и ткани мыши №189 проверяли на мозаичность.

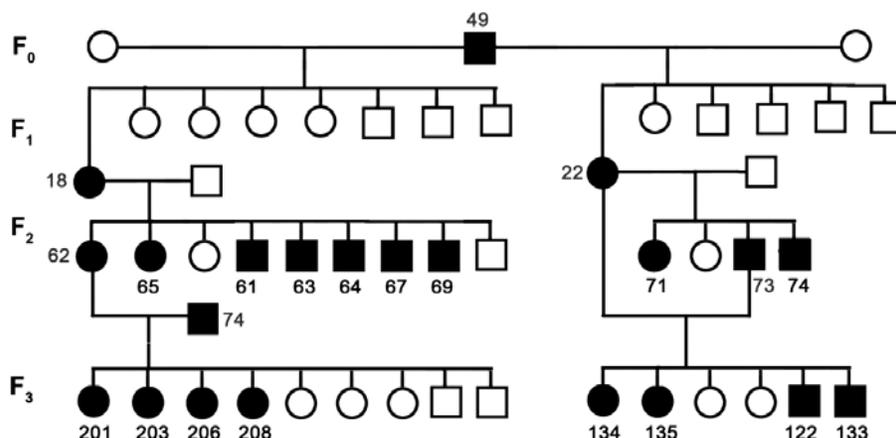


Рис. 2. Наследование трансгена N-ацетилтрансферазы-2 человека (*NAT2*) у трансгенных мышей (F_0 - F_3). На дальнейшее размножение брали мышей №№ 18, 62, 74. Органы и ткани мыши № 206 проверяли на мозаичность.

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 *NAT2_{mus}*, *NAT2_{hom}* и мРНК *NAT1_{mus}*, *NAT1_{hom}* были взяты в базе данных NCBI GenBank и синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). Праймеры для последовательностей к *NAT1_{mus}*, *NAT1_{hom}* 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-ACAAGAAGCTCAGTGAATAAATTGGA-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 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 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

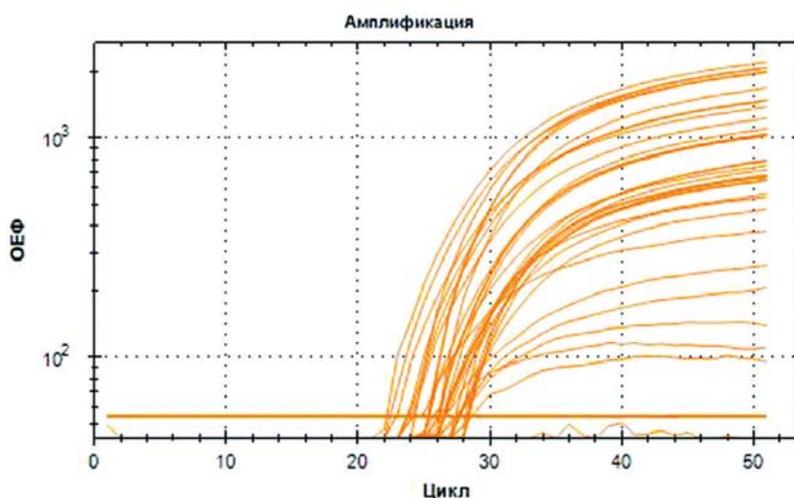


Рис. 4. Детекция гена *NAT1hom* у трансгенных животных. Каждая кривая показывает характер экспрессии гена у индивидуальных животных.

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.

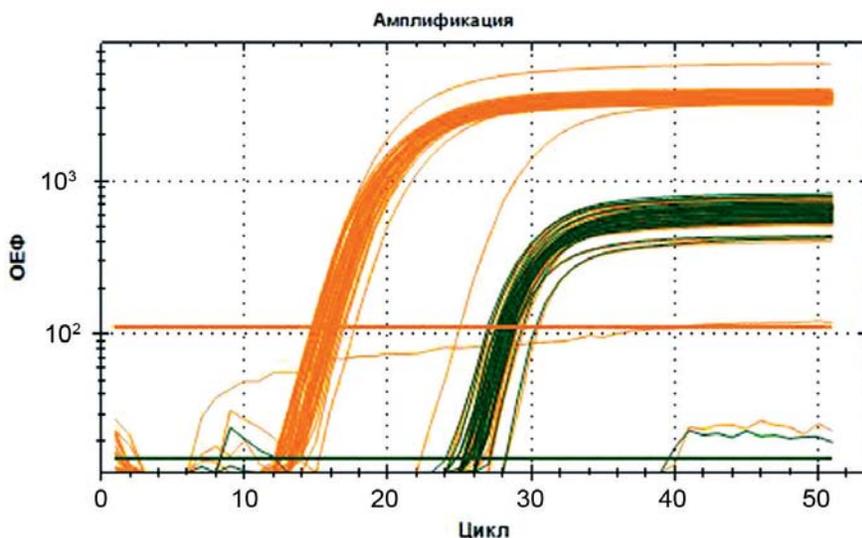


Рис. 5. Детекция генов *NAT2hom* и *GAPDH* у трансгенных животных. Каждая кривая отражает характер экспрессии гена у индивидуальных животных. Оранжевым цветом показано накопление гена *GAPDH*, зеленым – гена *NAT2hom*.

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^{hom}* 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^{hom}* для доклинических исследований позволяет наиболее адекватно моделировать и изучать механизмы действия лекарственных препаратов и токсикантов.

Предложенная новая биомодель трансгенных гуманизированных мышей с генами *NAT1^{hom}* и *NAT2^{hom}* 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 фармако-токсикологии. - 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^{hom}* 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.