



Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы)

Н.Н. Каркищенко¹, В.П. Рябых², В.Н. Каркищенко¹, Е.М. Колоскова²

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

² – ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных, г. Боровск

Контактная информация: академик Каркищенко Николай Николаевич, scbmt@yandex.ru

На основе литературных данных и результатов собственных исследований проведен анализ успехов и неудач при получении трансгенных мышей с интегрированными генами *Nat* и *Cyp3A4* человека, для использования их в качестве биомodelей при испытании фармакологической эффективности и токсичности лекарственных веществ. Дан анализ возможных причин неудач при получении трансгенных мышей, обладающих повышенной экспрессией человеческих генов *Nat1*, *Nat2* и *Cyp3A4*, передающих трансген по наследству. Обсуждается важность роли промотора при создании генно-инженерных конструкций и гуманизированных мышей. Приводятся собственные данные о том, что для получения трансгенных животных методом микроинъекции генных конструкций в пронуклеусы зигот малопригодны разные варианты цитомегаловирусного промотора (*cmv*). Этот *cmv*-промотор начинает включать неконтролируемую экспрессию трансгена на очень ранних стадиях развития эмбриона, что зачастую приводит к гибели зародыша. Показаны пути получения гуманизированных мышей с интегрированными генами *CYP3A4*, а также генами *Nat1* и *Nat2* человека, с пониженным уровнем активности эндогенной *Nat2*, без использования мышей с нокаутом собственных генов *Nat1* и *Nat2* для скрещивания с трансгенными мышами. Анализ собственных результатов и причин неудач в создании трансгенных животных позволил получить нам гуманизированных мышей с интегрированными генами *NAT1* и *NAT2*, обеспечивающими специфическую экспрессию трансгенов, а также создать ДНК-конструкции для животных, несущих ген *CYP3A4*.

Ключевые слова: трансгенные мыши с интегрированными генами человека, гуманизированные мыши, химерные животные, *N*-ацетилтрансфераза (*Nat1* и *Nat2*), цитохром P450, гены *CYP3A4*, экспрессия генов *Nat1*, *Nat2* и *CYP3A4*, выбор и конструирование промоторов, биологические модели, экстраполяция на человека.

Введение

Генетический полиморфизм предопределяет индивидуальную чувствительность человека к лекарствам и ксенобиотикам. Информация о гене-

тических особенностях пациента позволяет персонифицировать препарат, его дозировку. Фармакогенетические исследования в популяционной фармакологии получили новый стимул с ис-

пользованием новых биомоделей [7], развитием фармакомоделирования [3] и альтернативных фармакотоксикологических подходов [5].

Использование принципов GLP в фармакологических исследованиях [7] и новых принципов в фундаментальных биомедицинских исследованиях открыло новый путь к познанию механизмов действия и создания инновационных таргетных лекарств. Безусловный прорыв в изучении биотрансформации лекарств наметился в использовании генно-модифицированных животных, наиболее удобными моделями из которых являются гибридные, инбредные, конгенные и другие мыши.

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.

В процессе эволюции в организме человека и животных возникли ферментативные системы биотрансформации ксенобиотиков. Эти системы принимают участие в метаболизме как экзогенных, так и эндогенных субстратов. В реакциях биотрансформации условно подразделяют на три фазы, из которых особая роль во второй фазе принадлежит цитохром-P450-зависимым реакциям и реакциям конъюгации, осуществляемыми целой группой ферментов, среди которых значительную роль играет N-ацетилтрансфераза (NAT).

Обобщая имеющуюся информацию, можно прийти к заключению, что все

семейство *цитохромов P450 (CYP450)*, отвечающих за метаболизм большинства лекарств и ксенобиотиков, регулируемое генами *CYP*, произошло два миллиарда лет назад от одного предшественника – гена, участвующего в утилизации энергии. *CYP*-гены (*CYP1*, *CYP2*, *CYP3*, *CYP4*) регулируют два конкурентных пути: метаболической детоксикации или активации. Полиморфизм генов *CYP* определяет различия (медленный, средний или быстрый) в метаболизме лекарств у разных индивидуумов. *CYP3A4* – основной цитохром печени и кишечника, где его количество более 60% от всех цитохромов, на его долю приходится около 60% всех метаболизируемых лекарств.

N-ацетилтрансфераза, один из ферментов второй фазы системы детоксикации, которая осуществляет N-ацетилирование (обычно дезактивация) ароматических и O-ацетилирование (обычно активация) гетероциклических аминов, к которым относятся многие канцерогены и некоторые лекарственные препараты. NAT является ферментом, которому принадлежит важная роль в метаболизме эндогенных и чужеродных соединений ариламидной природы, включая лекарственные препараты. Среди загрязнителей окружающей среды, являющихся субстратами NAT, широко распространены ариламины выхлопных газов двигателей, лакокрасочных производств, компоненты табачного дыма, компоненты пищи и некоторые другие промышленные загрязнители. NAT участвует также в катаболизме биогенных аминов.

В НЦБМТ ФМБА России активно исследуются особенности генетического регулирования NAT-системы [2, 4, 5, 6].

Однако до последнего времени механизмы нарушения и даже особенностей NAT-ацетилирования изучены относительно слабо, что связано, в первую очередь, с отсутствием соответствующих биологических моделей. Отсутствие реальных биологических моделей серьезно тормозит дальнейший прогресс в распознавании интимных процессов, протекающих при развитии онкологических заболеваний и других социально-значимых болезней.

Предпосылки создания гуманизированных животных

В настоящее время большая часть исследований по испытанию влияния лекарственных средств на человека проводится на животных. Несмотря на развитие компьютерного моделирования, субклеточных и клеточных технологий, отказаться от экспериментов на многоклеточных организмах вряд ли удастся. Организм млекопитающего чрезвычайно сложен, и надежно прогнозировать ответные реакции на воздействия различных веществ без экспериментальной проверки на животных пока невозможно.

Ферменты окислительного метаболизма работают практически у всех живых организмов. Наиболее универсальной является **СУР (цитохром P450)** – система, которую за ее мультигенные функции называют биологической «паяльной лампой». Важно, что пути метаболических превращений, как лекарств, так и токсикантов, носят однонаправленный характер, поэтому на путях метаболизма лекарственных средств и ксенобиотиков возможны реакции взаимодействия.

Открытие PXR (прегнан X рецептор) как первичного регулятора индук-

ции экспрессии *CYP3A*, а также SXR-рецептора [62] в печени и кишечнике обнаружило, что его ненамеренная активация у людей приводит к нежелательной интеракции лекарств и увеличению уровней токсических метаболитов.

У человека идентифицированы четыре формы *CYP3A* (3A4, 3A5, 3A7, 3A43), у кроликов – одна, тогда как в печени мышей присутствуют множественные его формы. Преобладающей формой у человека является *CYP3A4*, что нельзя сказать о таковой у мышей. Поэтому создание гуманизированных мышей по гену *CYP3A4* человека [48] является важной и актуальной для фармакогенетики и фармакокинетики задачей.

Различные группы химических веществ иначе влияют на животных, чем на людей. Различия на уровне клеточного метаболизма существуют не только между животными и людьми, но и между полами и возрастными группами внутри видов. В настоящее время составление прогнозов для людей на основе данных, полученных на животных, всё больше вызывает вопросов и сомнений. Из-за межвидовых различий метаболизма существует значительная степень риска при экстраполяции результатов, полученных в экспериментах на животных, на физиолого-биохимические процессы, происходящие в организме человека.

Существуют явные видовые различия в NAT субстратной селективности и функциях у человека и разных животных [6, 22]. Даже модели дважды нокаутированных *Nat1/2* мышей имеют ограничения в интерпретации результатов по отношению к человеку [56]. Например, сульфаметазин (SMZ) – специфический субстрат для *Nat2* человека у мышей

метаболизируется плохо [19]. У мышей 4-аминобифенол (ABP) метаболизируется исключительно *Nat2* [35], тогда как у человека в N-ацетилировании ABP и O-ацетилировании N-hydroxy-ABP в печени, главным образом, участвует *Nat2* и, в меньшей степени, *Nat1*, который принято считать аналогом *Nat2* мыши [15].

В последнее время все большее значение при испытаниях фармакологической эффективности и токсичности новых лекарственных средств отводится трансгенным животным, в геноме которых интегрированы соответствующие гены человека – так называемые *гуманизированные животные* (рис. 1). Однако при получении гуманизированных

трансгенных животных возникает целый ряд проблем, без решения которых невозможно получение полноценных животных биомodelей.

Ключевые моменты получения гуманизированных мышей

При получении трансгенных животных любой направленности необходимо иметь ответы на шесть ключевых вопросов:

В каких органах и тканях в норме экспрессирует собственный ген животного-хозяина, аналогом которого будет являться трансген человека?

На какой стадии развития организма начинает экспрессировать этот ген животного?

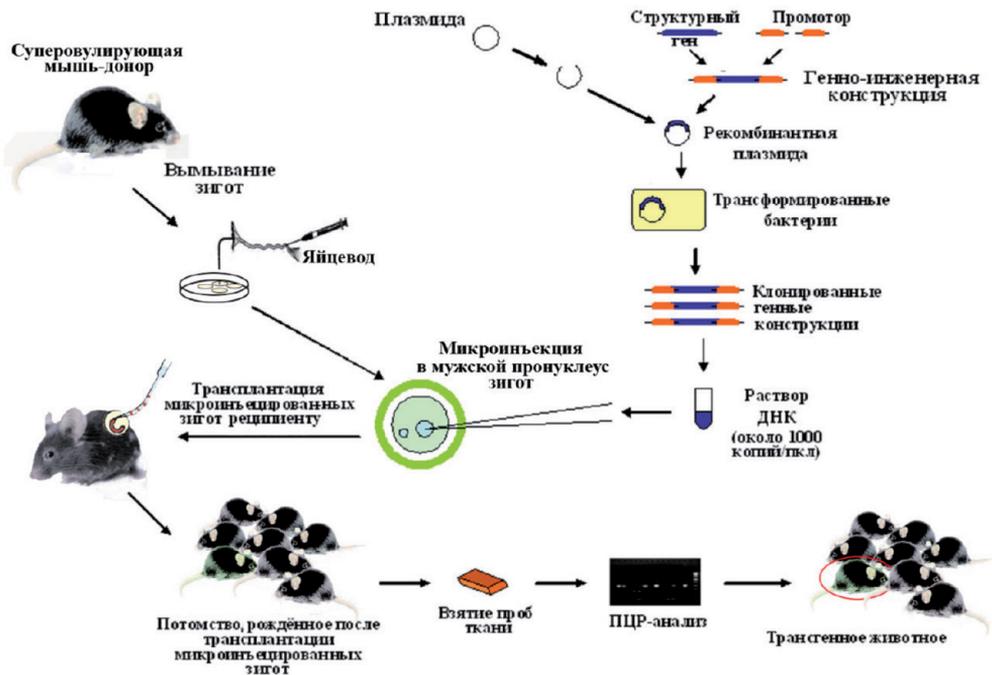


Рис. 1. Принципиальная схема получения трансгенных мышей с интегрированными генами человека.

В каких физиолого-биохимических процессах принимает участие продукт экспрессии собственного гена животного-хозяина, аналогом которого будет являться трансген человека?

В каких органах и тканях планируется вызывать экспрессию трансгена?

Как может повлиять повышенный уровень продукта экспрессии трансгена человека, попавшего в организм животного, на физиолого-биохимические процессы, происходящие в нём?

Насколько повлияет повышение уровня экспрессии трансгена на жизнеспособность гуманизированных мышей?

Приступая к работе по получению трансгенных мышей с интеграцией в их геном нуклеотидных последовательностей генов *Nat1* и *Nat2* человека, мы учитывали следующие моменты, дающие в определённой степени ответы на выше поставленные вопросы.

Исходя из современных представлений, *Nat2* человека, который является типичным ферментом, метаболизирующим ксенобиотики и лекарства, синтезируется в клетках печени и в кишечном эпителии [23, 24, 25, 61]. Небольшой уровень экспрессии *Nat2* был обнаружен у человека в молочной железе, в эпителии мочевого пузыря и предстательной железе [29, 34, 49]. Тогда как экспрессия гена *Nat1* у человека обнаружена почти во всех тканях, включая лейкоциты и эритроциты [14, 23, 43, 47]. Было отмечено, что ген *Nat1* начинает экспрессировать в ранний период развития человека [44]. В человеческой плаценте на ранних стадиях развития уровень экспрессии *Nat1* в 1000 выше уровня *Nat2* [53]. Позднее было показано, что этот ген

начинает экспрессировать уже в эмбрионах, находящихся на стадии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции [52], что является самым неприятным моментом при получении трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat1* человека.

Nat1 имеет оригинальный субстратноспецифичный профиль и в дополнение к метаболизму ксенобиотиков может участвовать в ацетилировании эндогенных метаболитов таких как *n*-аминосалицилата [19] и *n*-аминобензойной кислоты (*p*-АВА) [60]. Потенциальный эндогенный субстрат был идентифицирован как фолатный катаболит *n*-аминобензоилглутамат (*p*-АВGlu) [39, 59], который выделяется с мочой как *N*-ацетильная форма [37, 38]. Фолат имеет протективный эффект в развитии нервной трубки у зародышей, и является чувствительным к изменению экспрессии генов *Nat*, ответственных за ацетилирование *n*-аминобензоилглутамата у мышей.

Также было установлено, что мышинный *Nat2* является гомологом человеческого *Nat1* в отношении субстратной специфичности и тканевого распределения в организме и кодируется полиморфным локусом, который обуславливает быструю или медленную активность. Мышиный *Nat2*, подобно человеческому *Nat1*, метаболизирует *p*-АВGlu и экспрессирует во многих тканях [18, 27, 36, 45, 54]. Во время раннего развития мышей ген *Nat2* экспрессирует в эмбриональных стволовых клетках предимплантационных эмбрионов, также как и ген *Nat1* у человека [45]. В то время как другие гены *Nat* мыши и человека не экспрессируют на этой ранней стадии развития организма [9, 52]. Было показано,

что у мышей *Nat2* (гомолог человеческого *Nat1*) экспрессирует раньше, чем на 9-й день развития плода [54]. Изучение различных тканей от неонатальных мышей методом ПЦР в реальном времени показало, что в них преимущественно экспрессирует мышинный *Nat2* [40]. На 9,5; 11,5 и 13,5 дни беременности распределение мышинного *Nat2* в тканях было неравномерным. Он концентрировался преимущественно в развивающейся нервной трубке, что может быть важным фактором ввиду защитного эффекта фолата в предотвращении дефектов в процессе развития нервной трубки [41]. У взрослых мышей [54] и других грызунов [28] эквивалент человеческой *Nat1* экспрессирует в клетках Пуркинне мозжечка [54]. Исследования, проведенные на мозжечке взрослых людей, также показали аналогичную экспрессию *Nat1* в клетках Пуркинне [26].

Сравнение мышинного *Nat2* и человеческого *Nat1* в раннем развитии правомерно позволяет использовать мышь в качестве модели для изучения экспрессии этого гена у человека.

Проблемы, лимитирующие получение гуманизированных мышей

Получение трансгенных животных, продуцирующих биологически активные вещества (БАВ), у которых продукты экспрессии трансгена попадают в кровь, является весьма сложным мероприятием, т.к. обладая высокой активностью, эти вещества, попадая в кровь, чаще всего вызывают изменения в регуляции физиолого-биохимических процессов, что приводит к нарушению гомеостаза и существенным отклонениям в функционировании организма.

Первое краткое сообщение о получении трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat2* человека, продуцирующим NAT2-активность в кровь, было сделано группой исследователей из Оксфордского университета в 2000 г. на II Международном симпозиуме по NAT [16]. По сообщению авторов, им удалось получить мышей в результате случайной интеграции трансгена, которых можно было скрещивать между собой. Однако уровень экспрессии человеческого *Nat2* в организме трансгенных мышей оказался невысоким. После этого никаких сообщений от этой группы авторов по данной проблеме не поступало.

В последние годы существенно активизировались исследования по изучению генетической регуляции системы CYP3A4 [30, 31, 50], которые привели к созданию трансгенных и гуманизированных мышей, несущих этот ген человека. В то же время уровень экспрессии человеческого гена *CYP3A4* в организме трансгенных животных также оказался достаточно низким.

Наиболее надёжным направлением является получение трансгенных животных, продуцирующих БАВ белковой природы автономно отдельными органами на экспорт (молочная железа, мочевого пузырь, предстательная железа и др.), минуя попадание их в кровь. Принципиальная возможность получения трансгенных животных, продуцирующих биологически активные вещества белковой природы автономно в отдельных органах, обусловлена механизмом тканеспецифической экспрессии трансгенов, определяемой регуляторными последовательностями генов, используемых в качестве промоторов при создании генно-инженерных конструкций.

Например, при получении трансгенных животных, продуцирующих с молоком БАВ фармакологического назначения, в качестве промоторов в генно-инженерных конструкциях используют регуляторные участки генов основных белков молока, которые обеспечивают тканеспецифическую экспрессию трансгена только в клетках молочной железы. В связи с этим, синтезированный целевой белок выводится из организма животного с молоком, не попадая в кровоток и не оказывая влияния на организм животного, т.к. молочная железа является уникальной изолированной системой, производящей продукт на экспорт [1, 13, 46]. Аналогичным образом с использованием конструкции, содержащей пробазиновый промотор, тканеспецифичный для предстательной железы, были получены трансгенные мыши, у которых в 15 раз была увеличена активность *Nat2* человека (тест с сульфаметазинном) в предстательной железе, тогда как другие *Nat2*-активности (N-, O-, или N,O-ацетилтрансферазы) не были увеличены [34].

Таким образом, к настоящему времени известны следующие факты, которые мы учитывали при получении трансгенных мышей с интегрированными генами *Nat1* и *Nat2* человека:

- *Nat2* у человека синтезируется, главным образом, в клетках печени и в кишечном эпителии, и небольшой уровень экспрессии *Nat2* был обнаружен у человека в молочной железе, в эпителии мочевого пузыря и предстательной железе;

- экспрессия гена *Nat1* у человека обнаружена почти во всех тканях, включая лейкоциты и эритроциты;

- ген *Nat1* у человека начинает экспрессировать уже в эмбрионах, находящихся на стадии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции, что является самым неприятным моментом при получении трансгенных животных с интегрированным геном *Nat1* человека;

- мышинный *Nat2* является гомологом человеческого *Nat1* в отношении субстратной специфичности и тканевого распределения в организме;

- ген *Nat2* у мышей экспрессирует в эмбриональных стволовых клетках предимплантационных эмбрионов, также как и ген *Nat1* у человека.

Неудачи получения трансгенных мышей с интегрированными в их геном нуклеотидными последовательностями генов человека

В 2003 г. группа исследователей из Оксфордского университета [51] также сообщила о получении трансгенных мышей методом трансплантации в бластоцисты эмбриональных стволовых клеток, генетически трансформированных с использованием генно-инженерной конструкции, состоящей из кДНК гена *Nat1* человека под сильным многоцелевым цитомегаловирусным промотором (*cmv*), которая была целенаправленно интегрирована внутрь локуса мышинного гена *Nat2*.

Как и следовало ожидать, все первичные трансгенные мыши в этом эксперименте были химерами, но их было очень мало, т.к. наблюдалась резорбция многих эмбрионов и ненормальное развитие большей части плодов. Из небольшого числа химерных мышей, полученных в этом эксперименте, не-

которые особи имели узловатые хвосты. Ненормальности подобного типа наблюдались у животных, которые использовались в качестве моделей для изучения дефектов развития нервной трубки у плодов [42].

Авторам не удалось скрестить немногочисленное потомство живых химерных мышей, с целью получения гомозиготных линий трансгенных мышей, обладающих повышенной экспрессией человеческого *Nat1* и передающих трансген по наследству [51]. В связи с этим, было выдвинуто предположение, что повышенный уровень экспрессии трансгенов *Nat* человека приводит к продукции НАТ изоферментов, которые метаболизируют *p*-ABGlu у мышей, что является вредным фактором в раннем развитии, и в результате этого происходит резорбция эмбрионов или рождение дефектных детёнышей [51]. Это предположение авторов базировалось на более ранних работах, которыми было установлено, что одним из эндогенных субстратов *Nat1* является фолатный катаболит *p*-ABGlu [39, 59], а сам фолат обладает протективным эффектом при развитии нервной трубки у зародышей и является чувствительным к изменению экспрессии генов *Nat*, ответственных за ацетилирование *p*-ABGlu у мышей.

Результаты всех этих исследований привели авторов работы к заключению, что высокий уровень экспрессии *Nat1* человека у трансгенных мышей в период эмбрионального развития приводит к нарушению механизма защитного действия фолата на развитие нервной трубки и гибели большей части эмбрионов или к ненормальному развитию плодов [51]. После неудачных экспериментов

по получению трансгенных мышей с интегрированными в их геном генами *Nat* человека эта группа исследователей прекратила работы в данном направлении.

Позднее группа исследователей из университета штата Аризона [10] на основе анализа результатов оксфордской группы [51] предприняла попытку получить трансгенных мышей с интегрированными в их геном генами *Nat1* и *Nat2* человека методом микроинъекции в пронуклеусы зигот генно-инженерных конструкций, включающих кДНК генов *Nat* человека под цитомегаловирусным промотором (*cmv*). На основании результатов своих исследований эта группа в 2005 г. опубликовала статью под названием «Только низкий уровень экзогенной *N*-ацетилтрансферазы может быть достигнут у трансгенных мышей» [10].

Авторами было получено 5 первичных (F0) трансгенных мышей-основателей линий с интегрированной конструкцией *cmv-hNat1*. Число копий трансгена варьировало от 1 до 17. Человеческая мРНК *Nat1* была определена в печени, лёгких, почках и мозге трансгенных мышей. Наличие функционального белка было определено при измерении НАТ с *n*-аминобензойной кислотой (ПАВА) как селективным субстратом для *Nat1* человека и *Nat2* мыши [17, 21, 45].

Несмотря на наличие большого числа копий трансгена у некоторых линий трансгенных мышей, у них было обнаружено только умеренное увеличение уровня ферментной активности в разных тканях или вообще не отмечено никакого её увеличения. Статистически значимые различия уровня фермент-

ной активности были отмечены только в печени, при увеличении в пределах 10-50%, по сравнению с контролем [10].

С конструкцией, в которой к *cmv*-промотору был добавлен промотор НААТ тканеспецифический для печени, были получены две первичные (F0) трансгенные мыши-основатели линий с 5-ю и 24-мя копиями трансгена. Однако, несмотря на большое число копий трансгена, увеличение активности *Nat2* в печени не произошло, по сравнению с контролем.

С конструкцией *cmv-Nat2* были получены 3 первичные (F0) трансгенные мыши-основатели линий, у которых число копий трансгена варьировало от 1 до 5. В печени этих мышей было найдено умеренное количество мРНК *Nat2* человека. Активность фермента в печени, измеренная с изониазидом (INH) – селективным субстратом для *Nat2* человека и *Nat1* мыши, была в 2 раза выше, по сравнению с контролем [10].

Попытки получения трансгенных мышей гомозиготных по гену *Nat1* оказались безуспешными. Авторы сделали предположение, что это обусловлено восприимчивостью трансгенных мышей к повышенному уровню продуктов экспрессии трансгена.

В этом исследовании [10] был обнаружен интересный факт. Присутствие трансгена *Nat1* человека вызывало в печени мышей увеличение *Nat1* мРНК в 2-3 раза, тогда как у трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat2* человека количество эндогенной мРНК *Nat1* незначительно изменялось в печени, лёгких, почках и мозге. В противоположность этому, у трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat2* человека синтез эндогенной мРНК *Nat2* в печени

и других тканях мышей был сильно подавлен (уменьшение в 6 раз).

Авторы этого исследования также приходят к выводу о трудности достижения значительного повышения уровня экспрессии трансгена у мышей трансгенных по генам *Nat*. Только животные с относительно низким уровнем экспрессии трансгена выживают. Однако в этом исследовании количество живых мышей с интегрированным геном *Nat1* человека и передающих трансген по наследству было выше, чем в исследованиях группы из Оксфордского университета [51]. Этот факт авторы [10] попытались объяснить различием линий мышей, используемых в работе этих двух групп.

На наш взгляд, различия в результатах исследований в этих группах связаны со способом получения трансгенных животных. Оксфордская группа [51] получала трансгенных животных методом введения генетически трансформированных клеток в бластоцисты, что изначально предполагает получение химерных животных, последовательное скрещивание которых в конечном итоге может привести к созданию животных, передающих трансген по наследству. Однако при таком способе получения химерных животных интеграция трансгена будет в высшей степени мозаичной, и только незначительная часть генетически трансформированных клеток может принять участие в формировании популяции гоноцитов, являющихся источниками генеративных клеток. В результате этого родившиеся живыми трансгенные животные в очень редких случаях будут передавать трансген по наследству.

Исследователи из Аризонского университета [10] получали трансгенных

животных методом микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот, при использовании которого мозаичность встраивания трансгена в геном хозяина значительно ниже, чем при использовании метода введения генетически трансформированных клеток в бластоцисты. Поэтому и передача трансгена потомству первичными трансгенными мышами, полученными этой группой, была выше.

Но самым неудачным моментом в исследовании аризонской группы, на наш взгляд, является использование при создании конструкций цитомегаловирусного промотора, который является мощным многоцелевым промотором, вызывающим экспрессию трансгена во многих клетках и тканях, включая бластомеры ранних эмбрионов. Этот промотор хорош для генетической трансформации культур клеток, которые содержат несколько сотен тысяч клеток, и поэтому гибель определённой части клеток с повышенной экспрессией трансгена не окажет существенного влияния на общие показатели эффективности трансформации клеток. Однако при введении конструкций с *cmv*-промотором в единичные одноклеточные зиготы в дальнейшем, чаще всего, будет приводить к гибели этих эмбрионов.

Необходим ли предварительный нокаут генов мышей?

Группой исследователей были получены мыши с нокаутом генов *Nat1* и *Nat2*, с целью изучения роли этих генов в жизнедеятельности организма [56]. Первичные исследования показали, что фенотипически эти мыши были меньше размером, но отсутствие у них экспрессии генов *Nat1* и *Nat2* не оказалось

критическим для развития и физиологического гомеостаза [56], несмотря на то, что мыши с отсутствующим геном *Nat2* не экскретировали *p*-ABGlu, который определяется в моче потомков мышей дикого типа [57].

Однако последующие дополнительные исследования показали, что у потомков этих мышей имеются врождённые пороки воспроизводительной системы и нарушение соотношения в половой принадлежности [57, 58]. Кроме того, по крайней мере, у потомков одного из прародителей с нокаутом гена *Nat2* наблюдались дефекты со зрением. Эти дефекты, по мнению авторов, могли быть связаны с изменением метаболизма фолиевой кислоты [58]. Известно, что недостаток фолиевой кислоты может быть тератогенной причиной миеломенингоцеле [33] и рассечения верхней губы с рассечением или без рассечения твёрдого нёба [32].

Позднее потомки трансгенной мыши с интегрированной конструкцией, состоящей из кДНК гена *Nat2* человека и энхансор/промоторной области гена альбумина мыши, были скрещены с мышами, имеющими двойной нокаут обоих генов *Nat1* и *Nat2*. Целью этого скрещивания являлось **исключение влияния** мышью эндогенной NAT-активности на процессы, происходящие в организме мышей под действием интегрированного чужеродного гена *Nat2* человека, чтобы использовать полученных мышей в качестве модели для предсказания ответа человеком на действие ариламинов или гетероциклических аминов.

Принимая во внимание результаты исследований группы из Аризонского университета [10], которые свидетельствуют о том, что экспрессия трансгена

Nat2 человека значительно подавляет синтез эндогенной мышшиной мРНК *Nat2* (аналог *Nat1* человека) в печени и других тканях трансгенных мышей, можно предположить, что путём скрещивания между собой мышей трансгенных по *Nat1* и *Nat2* человека можно получить линии мышей, у которых будут экспрессировать одновременно трансгены *Nat1* и *Nat2* человека на фоне пониженного уровня мышшиного эндогенного *Nat2*, т.е. они будут иметь более «человеческий» профиль ацетилирования.

Эти линии гуманизированных мышей могут быть в определённой степени сходны с линиями мышей, полученными от скрещивания трансгенных мышей по *Nat2* человека с линией мышей с двойным нокаутом обоих генов *Nat1/2* [55]. Но если учесть, что у мышей нокаутных по генам *Nat* наблюдаются определённые физиолого-биохимические и морфологические нарушения, то вариант получения гуманизированных мышей путём скрещивания между собой линий мышей трансгенных по *Nat1* и *Nat2* человека без использования нокаутных животных может оказаться вполне приемлемым.

Таким образом, для получения гуманизированных трансгенных мышей с генами *Nat* человека и с минимальным влиянием эндогенных *Nat* мышши на процессы ацетилирования, можно обойтись без использования нокаутных животных. Можно предположить, что в результате такого скрещивания будут получены линии гуманизированных мышей, которые могут служить хорошими биомоделями в прогнозировании реакции человека на воздействие ариламинов или гетероциклических аминов.

Оптимизация и конструирование промоторов и перспективы создания гуманизированных мышей

Наши исследования, проведенные с использованием генно-инженерной конструкции, включающей ген гранулоцит-колониестимулирующего фактора под промотором гена *α S1*-казеина крупного рогатого скота и репортёрный ген зелёного белка под цитомегаловирусным промотором показали (рис. 1-3), что *cmv*-промотор включал экспрессию гена зелёного белка уже на стадии двух бластомеров, а в эмбрионах, погибших на ранних стадиях развития, наблюдалась сильная экспрессия гена зелёного белка [1]. Эти исследования наводят на мысль, что чрезмерная экспрессия гена зелёного белка, обусловленная действием *cmv*-промотора, приводит к резкому смещению синтетических процессов в сторону синтеза чужеродного зелёного белка, что приводит к гибели эмбриона.

По-видимому, при использовании для получения трансгенных животных конструкций, включающих ген *Nat1* человека под мощным *cmv*-промотором, на ранних стадиях развития эмбриона начинают действовать сразу 2 процесса, неблагоприятных для развития эмбриона.

Во-первых, при высоком уровне экспрессии трансгена происходит усиленное отвлечение аминокислот на синтез чужеродного белка под действием *cmv*-промотора, что само по себе может приводить к гибели эмбрионов (рис. 2-4).

Во-вторых, повышенный синтез фермента NAT1 человека, который вызывает снижение уровня фолиевой кислоты, и тем самым может способствовать нарушениям процесса формирования нервной трубки и ненормальному развитию плодов.

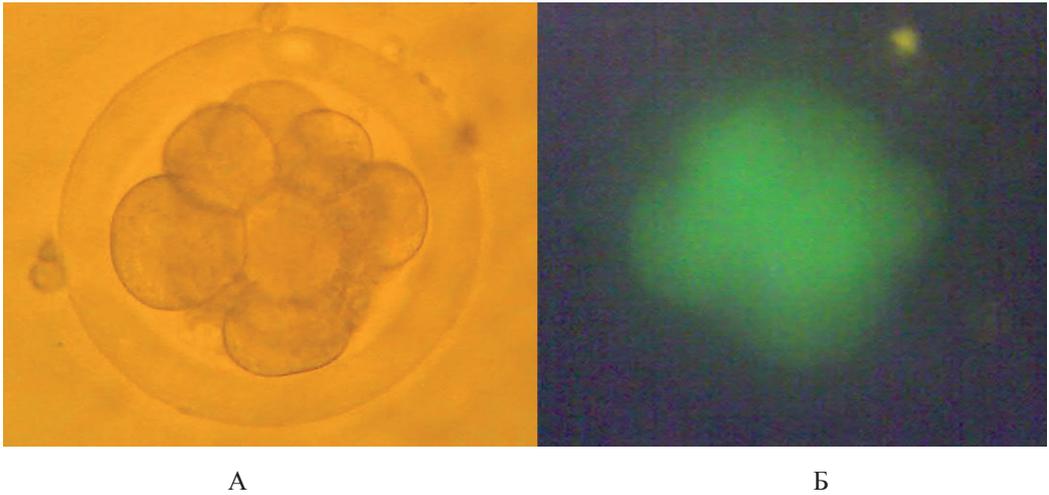


Рис. 2. Умеренная экспрессия маркерного гена зелёного белка под *stv*-промотором в развивающемся эмбрионе (А – микроскопия в обычном свете, Б – в синем свете).



Рис. 3. Мощная экспрессия маркерного гена зелёного белка под *stv*-промотором в одном из бластомеров (указан стрелкой) эмбриона, погибшего на стадии двух бластомеров (А – в синем свете, Б – в обычном свете).



Рис. 4. Эмбрионы, погибшие на ранних стадиях развития. Наблюдается сильная экспрессия маркерного гена зелёного белка под *stv*-промотором в бластомерах.

Анализ результатов исследования группы из Аризонского университета [10] наводит на мысль, что неудачи в получении трансгенных животных с интегрированными генами *Nat* человека обусловлены неудачным выбором *cmv*-промотора при создании генно-инженерных конструкций, использованных в этом эксперименте. Это предположение подтвердилось и в последующих исследованиях этой группы.

Принимая во внимание тот факт, что ген *Nat1* человека начинает экспрессировать уже на стадии эмбриона, а повышенный синтез фермента NAT1 человека может способствовать ненормальному развитию плодов, исследователи из Аризонского университета [11] попытались использовать при получении трансгенных мышей с интегрированным геном *Nat1* человека конструкцию с индуцибельным промотором. В качестве такого промотора был использован минимальный *cmv*-промотор с тетрациклиновой регуляторной системой.

Предполагалось, что эта конструкция не должна экспрессировать во время развития плода до его рождения и не оказывать на него вредного влияния, а начинать экспрессировать только после рождения в результате индукции доксициклином, который можно давать животному с кормом или водой. Были получены 4 первичные (F0) трансгенные мыши-основатели линий с интегрированной конструкцией *cmv-hNat1*. Однако и в этом эксперименте при индукции экспрессии трансгена наблюдалось лишь небольшое увеличение активности *Nat1* человека в почках трансгенных мышей.

Авторы не приводят данных об эмбриональной смертности и нарушении

ях в развитии плодов, но в заключении вновь возвращаются к положению, выдвинутому ими ранее [10], что повышенный уровень экспрессии трансгена (*Nat1* человека) в организме мышей вызывает критическое нарушение баланса в регуляции фолата с вытекающими из этого отрицательными последствиями [11]. Исходя из этого заключения авторов, можно сделать вывод, что индуцибельный *cmv*-промотор по каким-то невыясненным причинам не сработал и не дал ожидаемых результатов.

После этих неудачных попыток получения полноценных трансгенных мышей, экспрессирующих высокий уровень *Nat1* и *Nat2* человека, и передающих трансген по наследству, в 2011 г. группа канадских исследователей из университета г. Торонто опубликовала статью, в которой сообщалось о получении одной первичной (F0) трансгенной мыши с интегрированным геном *Nat2* человека – основательницы линии [55]. Эта мышь была получена методом микроинъекции в пронуклеус зиготы конструкции, состоящей из кДНК гена *Nat2* человека и энхансор/промоторной области гена альбумина мыши, которая была использована с целью вызывания экспрессии трансгена целенаправленно в печени. В геном этой мыши встроилась только одна копия трансгена.

О частоте интеграции трансгена в геном хозяина и об общей эффективности технологии трансгеноза авторы этой работы не сообщают. Поэтому сложно судить о влиянии экспрессии трансгена на развитие эмбрионов, эмбриональную смертность, жизнеспособность рожденного потомства и нарушения постнатального развития. Но, судя по тому, что была получена только одна мышь, от-

рицательное влияние повышенной экспрессии трансгена было значительным. В обсуждении результатов авторы также придерживаются версии исследователей из Аризонского университета [10] об отрицательном влиянии повышенного уровня экспрессии *Nat* человека в организме трансгенных мышей на эмбриональное развитие и жизнеспособность потомства [55].

В этом исследовании [55] основателем линии послужила только одна мышь, в геном которой интегрировалась только одна копия трансгена, которая создавала не очень высокий уровень продукта экспрессии трансгена, и, как полагают авторы, благодаря этому мышь родилась живой и способной передавать трансген потомству.

Если признать эту версию об одной копии трансгена корректной, то можно предположить, что для получения трансгенных животных (мышей) с генами *Nat1* и *Nat2* человека целесообразно использовать генно-инженерные конструкции, созданные на основе ретровирусных векторов, потому что эти конструкции интегрируются в геном хозяина только в количестве одной копии [8, 12, 20].

В дальнейшем эта мышь была скрещена с мышами дикого типа *B6* и передавала трансген по наследству. Трансмиссия трансгена потомкам составляла около 50%, что свидетельствует о встраивании трансгена во всю популяцию гомозигот. Эта мышь послужила основателем трансгенной линии, которая была получена в результате скрещивания на протяжении 10-ти генераций.

Активность фермента NAT2 человека в печёночном цитозоле трансгенных мышей этой линии, измеренная с ис-

пользованием сульфаметазина (SMZ) – селективного субстрата для *Nat2* человека, была в 40-80 раз выше чем у мышей *B6* дикого типа. При этом активность фермента была в 2 раза выше у самцов, чем у самок. В плазме крови у трансгенных мышей также был повышенный уровень активности *Nat2* человека.

Заключение

Значительным ограничением в использовании животных моделей для изучения метаболизма лекарств и оценки риска их применения для человека является экстраполяция результатов, полученных в экспериментах на животных, на физиолого-биохимические процессы, происходящие в организме человека, если имеются заметные межвидовые различия в ферментах метаболизма ксенобиотиков. Для снятия этого ограничения необходимо получать трансгенных животных с человеческими генами, чтобы создать более прогнозируемые модели изучения ферментов биотрансформации ксенобиотиков. Такие трансгенные биомодели будут иметь каталитическую активность, в большей степени сравнимую с таковой в клетках человека, и могут дать более точный ответ организма человека на тот или иной ксенобиотик.

Анализ литературных данных и результатов собственных исследований свидетельствует, что при получении полноценных трансгенных мышей, экспрессирующих высокий уровень *Nat1*, *Nat2* и *Cyp3A4* человека и передающих трансген по наследству, возникают определённые трудности.

Эти трудности связаны с тем, что ген *Nat1* человека начинает экспрессировать в эмбрионах, находящихся на ста-

дии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции [52], а повышенный уровень экспрессии трансгенов *Nat* человека приводит к снижению уровня фолиевой кислоты в эмбрионах и плодах мышей, что вызывает резорбцию эмбрионов или рождение детёнышей со значительными дефектами [11, 51]. По мнению исследователей, занимавшихся получением трансгенных мышей с генами *Nat1* и *Nat2* человека, выживают только потомки с невысоким уровнем экспрессии трансгена, имеющие, чаще всего, 1 копию трансгена [10, 51, 55].

Если признать версию о достаточности одной копии трансгена корректной, то можно предположить, что для получения трансгенных мышей с генами *Nat1*, *Nat2* и *Cyp3A4* человека целесообразно использовать генно-инженерные конструкции, созданные на основе ретровирусных векторов, потому что эти конструкции интегрируются в геном хозяина только в количестве одной копии [8, 20, 46].

Существенным моментом, на который следует обратить внимание при получении трансгенных животных, и в частности мышей с интегрированными генами *Nat1* и *Nat2* человека, является подбор промоторов для генно-инженерных конструкций. Как показали наши исследования [1], для получения трансгенных животных малоприспособны разные варианты цитомегаловирусного промотора, т.к. этот промотор начинает включать экспрессию трансгена на очень ранних стадиях развития эмбриона, что, чаще всего, приводит к гибели эмбриона или плода.

По нашим данным, чрезмерная экспрессия трансгена на ранних стади-

ях развития эмбриона, обусловленная действием *cmv*-промотора, приводит к резкому смещению синтетических процессов в сторону синтеза чужеродного белка, что вызывает усиленное отвлечение аминокислот на синтез этого белка и гибель эмбриона [1].

Для исключения влияния мышечной эндогенной NAT-активности на процессы, происходящие в организме трансгенных мышей под действием интегрированного чужеродного гена *Nat1* человека, этих мышей скрещивают с мышами, имеющими двойной нокаут обоих генов *Nat1* и *Nat2*.

Нами показано, что экспрессия трансгена *Nat2* человека значительно подавляет синтез эндогенной мышечной мРНК *Nat2* (аналог *Nat1* человека) в печени и других тканях трансгенных мышей [10].

Можно предположить, что путём скрещивания между собой мышей трансгенных по *Nat1* и *Nat2* человека можно получить линии мышей, у которых будут экспрессировать одновременно трансгены *Nat1* и *Nat2* человека на фоне пониженного уровня мышечного эндогенного *Nat2*.

В результате такого скрещивания нами получены гуманизированные мыши, которые могут служить хорошими биомоделями в прогнозировании реакции человека на воздействие ариламинов или гетероциклических аминов, как ксенобиотиков, так и многочисленных лекарств.

Анализ собственных результатов и причин неудач в создании трансгенных животных позволил получить нам гуманизированных мышей с интегрированными генами *Nat1* и *Nat2*, обеспечивающими специфическую экспрессию

трансгенов, а также создать ДНК-конструкции для животных, несущих ген *CYP3A4*. Для получения гуманизированных трансгенных мышей с генами *Nat* и *CYP* человека и с минимальным влиянием эндогенных *Nat* мыши на процессы ацетилирования можно обойтись без использования нокаутных животных, у которых наблюдаются определённые физиолого-биохимические и морфологические нарушения.

Список литературы

1. *Езерский В.А., Тевкин 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. 4:33-52.
2. *Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.* Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина, № 4, 2006, с. 85.
3. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. – М.: Межакадемическое изд-во ВПК, 2004, 607 с.
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., 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.
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. *Рябых В.П., Шишиморова М.С., Трубицина Т.П., Фаткулина О.Б., Тевкин С.И., Сметанина И.Г.* Исследование физиолого-эмбриологических и молекулярно-биологических процессов, лежащих в основе трансгеноза у сельскохозяйственных животных. // Труды регионального конкурса научных проектов РФФИ в области естественных наук. 2007. Вып. 11. С. 451-471.
9. *Boukouvava S. and Sim E.* Expression of murine NAT genes in early development // IUBS, Birmingham, 2000. July.
10. *Cao W., Chau B., Hunter R., Strnatka D., McQueen C.A., Erickson R.P.* Only low levels of exogenous Nacetyltransferase can be achieved in transgenic mice // Pharmacogenomics J. 2005, 5 :255–261.
11. *Cao W., Strnatka D., McQueen C.A., Hunter R.J., Erickson R.P.* N-Acetyltransferase 2 activity and folate levels // *Life Sci.* 2010. 86 :103–106.
12. *Chan A.W.S., Homan E.J., Ballou L.U., Burns J.C., Bremel R.D.* Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes // *Prod. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 95 :14028–14033.
13. *Clark A.J., Simons J.P., Wilmut I., Lathe R.* Pharmaceuticals from transgenic livestock // *Trends Biotech.* 1987. 5 :20-24.
14. *Cribb A.E., Grant D.M., Millar M.A., Spielberg S.P.* Expression of monomorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1991. 259 :1241-1246.
15. *Doll M.A., Zang Y., Moeller T., and Hein D.W.* Codominant expression of N-acetylation and O-acetylation activities catalyzed by N-acetyltransferase 2 in human hepatocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010. 334 :540–544.
16. *Erickson R., Morgan C., McQueen C.A.* 2nd International NAT workshop, Eynsham, Oxford, 2000 abstract no. 1 (цит. по Sim E. 2003).
17. *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 Dispo.* 1998. 26 :502–505.
18. *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 characterisation of the activation and deactivation of aromatic amine carcinogens // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997. 142 :360-366.

19. **Glowinski I.B., Weber W.W.** Genetic regulation of aromatic amine *N*-acetylation in inbred mice // *J. Biol. Chem.* 1982. **257** :1424–1430.
20. **Haskell R.E., Bowen R.A.** Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. **40**:386–390.
21. **Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb S.J., Xio G.H.** Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000. **9** :29–42.
22. **Hickman D., Pope J., Juchau M.R., Namkung M.J., Berry D.L., Zachariah P.K.** Oxidative biotransformations of 2-acetylaminofluorene fetal and placental tissues of humans and monkeys: correlation with arylhydro-carbon hydroxylase activities // *Drug Metab. Dispos.*, 1975. **3**:494-501.
23. **Hickman D., Pope J., Patil S.D., Fakis G., Smelt V.M., Stanley L.A., Payton M.A., Unadkat J.D., Sim E.** Expression of arylamine *N*-acetyltransferase in human intestine. *Gut*, 1998. **42**:402-409.
24. **Ilett K.F., Ingram D.M., Carpenter D.S., Teitel C.H., Lang N.P., Kadlubar F.F., Minchin R.F.** Expression of monomorphic and polymorphic *N*-acetyltransferases in human colon // *Biochem. Pharmacol.*, 1994. **47**:914-917.
25. **Jenne J.W.** Partial purification and properties of the isoniazid transacetylase in human liver: its relationship to the acetylation of *p*-aminosalicylic acid // *Clin. Invest.*, 1965. **44**:1992-2002.
26. **Johnson N., Troen A., Fernando S., Warren D., Nagy Z., Smith A.D., Sim E.** Investigation of *W*-acetyltransferase (NAT1) in Alzheimer's disease: identification of a novel NAT1 allelic variant // *Eurotox.* 2000. London. September.
27. **Kawamura A., Westwood I., Wakefield L., Long H., Zhang N., Redfield C., Sim E.** Mouse *N*-acetyltransferase type 2, the homologue of human *N*-acetyltransferase type 1 // *Biochem. Pharmacol.* 2008. **75**:1550–1560.
28. **King C.M., Land S.J., Jones R.F., Debiec-Rychter M., Lee M.S., Wang C.Y.** Role of acetyltransferases in the metabolism and carcinogenicity of aromatic amines // *Mutat. Res.*, 1997. **376**:123-128.
29. **Kloth M.T., Gee R.L., Messing E.M., Swaminathan S.** Expression of *N*-acetyltransferase (NAT) in cultured human uroepithelial cells // *Carcinogenesis*, 1994. **15**:2781-2787.
30. **Koch I., Weil R., Wolbold R., Brockmoller J., Hustert E., Burk O., Nuessler A., Neuhaus P., Eichelbaum M., Zanger U., et al.** (2002) Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome p450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* **30**:1108-1114.
31. **Lamba J.K., Lin Y.S., Thummel K., Daly A., Watkins P.B., Strom S., Zhang J., Schuetz E.G.** (2002) Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* **12**:121-132.
32. **Lammer E.J., Shaw G.M., Iovannisci D.M., Finnell R.H.** Periconceptional multivitamin intake during early pregnancy, genetic variation of acetyl-*N*-transferase 1 (NAT1), and risk for orofacial clefts // *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2004. **70**:846–852.
33. **Laurence K.M., James N., Miller M.H., Tennant G.B., Campbell H.** Double-blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects // *Br. Med. J. (Clin Res Ed)*. 1981. **282**:1509–1511.
34. **Leff M.A., Fretland A.J., Doll M.A., Hein D.W.** Novel *N*-acetyltransferase 2 alleles that differ in mechanism for slow acetylator phenotype // *Biol. Chem.*, 1999. **274**:34519-34522.
35. **Loehle J.A., Cornish V., Wakefield L., Doll M.A., Neale J.R., Zang Y., Sim E., Hein D.W.**
36. **Martell K.J., Vatsis K.P., Weber W.W.** Molecular genetic basis of rapid and slow acetylation in mice // *Mol. Pharmacol.*, 1991. **40**:218-227.
37. **McNulty, H., McPartlin, J., Weir, D. and Scott, J.** Folate catabolism is increased during pregnancy in rats. // *Nutr.*, 1993. **123** :1089-1093.
38. **McPartlin, J., Halligan, A., Scott, J.M., Darling, M. and Weir, D.G.** Accelerated folate breakdown in pregnancy // *Lancet*, 1993. **341** :148-149.
39. **Minchin R.F.** Acetylation of *p*-aminobenzoyl-glutamate, a folic acid catabolite, by recombinant human arylamine *N*-acetyltransferase and U937 cells // *Biochemistry*. 1995. **307**:1–3.
40. **Mitchell M.K., Futscher B.W., McQueen C.A.** Developmental expression of *JV*-acetyltransferases in C57Bl/6 mice // *Drug Metab. Dupo.* 1999. **v.**, **27**:261-264.
41. **MRC Vitamin Study Research Group.** Prevention of neural tube defects: results of the MRC vitamin study. *Lancet*, 1991. **338**:131-137.
42. **Murdoch J.N., Henderson D.J., Doudney K., Gaston-Massuet C., Phillips H.M., Pater-**

- notte C., Arkell R., Stanier P., Copp A.J.* // Hum. Mol. Genet. 2003. 12. :87–98 (цит. по Sim E. 2003).
43. *Ohsako S., Deguchi T.* Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases of human liver // J. Biol. Chem., 1990. 265 :4630-4634.
44. *Pacific I., Benicini C., Rane A.* Acetyltransferases in humans: development and tissue distribution // Pharmacology, 1986. 32:283-291.
45. *Payton M., Smelt V., Upton A. and Sim E.* A method for genotyping murine arylamine / V-acetyltransferase type 2 (NAT2): a gene expressed in preimplantation embryonic stem cells encoding an enzyme acetylating the folate catabolite p-aminobenzoylglutamate // Biochem. Pharmacol., 1999. 58:779-785.
46. *Pursel V.G., Pinkert C., Miller K., Campbell R.G., Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E.* Genetic engineering of livestock // Science. 1989. 244:1281-1288.
47. *Risch A., Smelt V., Lane D., Stanley L.A., van der Slot W., Ward A., Sim E.* Arylamine N-acetyltransferase in erythrocytes of cystic fibrosis patients // Pharmacol. Toxicol., 1996. 78:235-240.
48. *Robertson G.R., Field J., Goodwin B., Bicerach S., Tran M., Lehnert A., Liddle C.* Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation // Mol. Pharmacol. 2003 Jul; 64(1):42-50.
49. *Sadrieh N., Davis C.D., Snyderwine E.G.* N-acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland // Cancer Res., 1996. 56:2683-2687.
50. *Sakuma T., Takai M., Endo Y., Kuroiwa M., Ohara A., Jarukamjorn K., Honma R., Nemoto N.* (2000) A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver. Arch Biochem Biophys 377: 153-162.
51. *Sim E., Pinter K., Mushtaq A., Upton A., Sandy J., Bhakta S.* Arylamine N-acetyltransferases: a pharmacogenomics approach to drug metabolism and endogenous function // Biochem. Soc. Trans. 2003. 31:615–619.
52. *Smelt V.A., Upton A., Adjaye J., Payton M.A., Boukouvala S., Johnson S., Mardon H.J. and Sim E.* Expression of arylamine /V-acetyltransferases in pre-term placentas and in human pre-implantation embryos // Hum. Mol Genet., 2000. 9:1101-1107.
53. *Smelt V.A., Mardon H.J., Sim E.* Placental expression of arylamine N-acetyltransferases: evidence for linkage disequilibrium between NAT1*10 and NAT2*4 alleles of the two human arylamine N-acetyltransferase loci NAT1 and NAT2 // Pharmacol. Toxicol., 1999. 83:149-157.
54. *Stanley L.A., Mills I.G., Sim E.* Localization of polymorphic A'-acetyltransferase (NAT2) in tissues of inbred mice. //Pharmacogenetics.. 1997. 7:121-130.
55. *Sugamori K., Brennehan D., Grant D.M.* Liver-Selective Expression of Human Arylamine N-Acetyltransferase NAT2 in Transgenic Mice // Drug metabolism and disposition. 2011. 39:882–890.
56. *Sugamori K., Wong S., Gaednigk A., Abramovici H., Rozmahel R., Grant D.* Generation and functional characterization of arylamine N-acetyltransferase Nat1/Nat2 double knockout mice // Mol. Pharmacol. 2003. 64:170–179.
57. *Wakefield L., Cornish V., Long H., Griffiths W.J., Sim E.* Deletion of a xenobiotic metabolizing gene in mice affects folate metabolism // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. 364:556–560.
58. *Wakefield L., Long H., Lack N., Sim E.* Ocular defects associated with a null mutation in the mouse arylamine N-acetyltransferase 2 gene // Mamm. Genome. 2007. 18:270–27.
59. *Ward A., Summers M.E., Sim E.* Purification of recombinant human N-acetyltransferase type 1 expressed in *E.coli* and characterisation of its potential role in folate metabolism // Biochem. Pharmacol., 1995. 49:1759-1767.
60. *Weber W.W., Vatsis K.P.* Individual variability in p-amino-benzoic acid acetylation by human N-acetyltransferase (NAT1) of peripheral blood. Pharmacogenetics, 1993. 3:209-212.
61. *Windmill K.F., McKinnon R.A., Zhu X.Y., Gaedigk A., Grant D.M., McManus M.E.* The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies // Mutat. Res., 1997. 376:153-160.
62. *Xie W., Barwick J.L., Downes M., Blumberg B., Simon C.M., Nelson M.C., Neuschwander-Tetri B.A., Brunt E., Guzelian P.S., Evans R.M.* (2000a) Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. Nature (Lond) 406:435-439.

Creation of humanized mice for pharmacological and toxicological research (progress, failures and prospects)

N.N. Karkischenko, V.P. Ryabykh, V.N. Karkischenko, E.M. Koloskova

Analysis of successes and failures in obtaining transgenic mice with integrated human *Nat* genes and *CYP3A4*, based on the literature data and the results of our own research to use them as biomodels when tested pharmacological efficacy and toxicity of drugs. The analysis of possible causes of failure in obtaining transgenic mice with increased expression of human genes *Nat1*, *Nat2*, and *CYP3A4*, transmitting the transgene inheritance and humanized mice were done. The importance of the role of the promoter in the creation of genetically engineered structures discusses. Its own evidence that to obtain transgenic animals by microinjection method gene constructs into the zygotes pronucleus little different variants cytomegalovirus promoter (*cmv*). This *cmv*-promoter starts to include uncontrolled transgene expression at very early stages of embryo development, which often leads to his death provides. The possibility to obtain lines of humanized mice with integrated human genes *Nat1* and *Nat2* and a very low level of activity of endogenous *Nat2* without using mice with knockout genes, *Nat1* and *Nat2* for crossing with transgenic mice. The analysis of our own results and causes of failures in obtaining of transgenic animals helped to get us humanized mice with integrated *Nat1* and *Nat2* genes, providing specific transgenes expression and create DNA-construction for animals with *CYP3A4* gene.

Key words: transgenic mice with integrated human genes, humanized mice, chimera animals, *N*-acetyltransferase (*Nat1* and *Nat2*), cytochrome P450, *Cyp3A4* genes, expression of *Nat1*, *Nat2*, and *Cyp3A4* genes, choice and construction of promoters, biomodels, extrapolation to human population.