



Новая модель оценки избирательной токсичности антибластомных средств на трансгенных мышах с генами *Nat1hom* человека

Н.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Петрова

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

Контактная информация: акад., д.м.н., проф. Каркищенко Николай Николаевич,
scbmt@yandex.ru

На трансгенных гуманизированных мышах с генами *Nat1hom* человека проведена оценка токсичности лекарственного препарата Цисплатин при внутрижелудочном введении. Оценка проводилась в сравнении с мышами линии C57BL6/Y («быстрый» тип ацетилирования) и линии SHK («медленный» тип ацетилирования). LD50 для линии мышей *Nat1hom* составила 56,3 мг/кг, для мышей линии C57BL6/Y – 35,1 мг/кг, для мышей линии SHK – 33,7 мг/кг. Гибель животных линий C57BL6/Y и SHK наблюдалась уже через 1-6 ч после введения, а мышей *Nat1hom* – спустя сутки после введения. В предлетальном состоянии у животных всех линий отмечалась выраженная заторможенность, гиподинамия, резкое снижение тонуса мышц с эпизодически возникающими генерализованными судорожными эпизодами, заваливание на бок. При вскрытии павших животных отмечались признаки застойного венозного полнокровия внутренних органов, отека мозговых оболочек с единичными кровоизлияниями под оболочки мозга. После введения Цисплатина в дозе 45-55 мг/кг в гистологическом исследовании обнаружены отек головного мозга с признаками острой энцефалопатии и изменения в миокарде, которые свидетельствуют о начале развития острой сердечной недостаточности. Венозное полнокровие проявлялось во всех внутренних органах, а также в головном мозге. Меньший уровень токсичности Цисплатина у мышей с генами *Nat1hom* человека авторы объясняют наличием гена человека с «быстрым» типом ацетилирования. Делается вывод о том, что в метаболизме и детоксикации Цисплатина, а также снижении его токсичности более 60% приходится на N-ацетилтрансферазные процессы. Создание трансгенных гуманизированных мышей может быть основано на использовании CRISPR/Cas9-технологии. Предложена новая модель трансгенных гуманизированных мышей с геном *Nat1hom* для доклинических исследований противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: токсичность антибластомных препаратов, Цисплатин, трансгенные гуманизированные мыши с геном *Nat1hom*, мыши линий C57BL6/Y и SHK, гистоморфология, ПЦР в реальном времени, CRISPR/Cas9-технология.

Введение

Аксиоматичным является тот факт, что различные группы химических веществ иначе влияют на животных, чем на людей. Фармакогенетические исследования получили очередной стимул

с использованием новых трансгенных биомоделей и гуманизированных животных [10], развитием фармакомоделирования [5] и альтернативных фармакотоксикологических подходов [4]. Использование принципов GLP в фар-

макологических исследованиях [10] и новых принципов в фундаментальных биомедицинских исследованиях открыло новый путь к познанию механизмов действия и созданию инновационных лекарств, оценки их безопасности. Трансфекция генов человека в организм мышей позволяет получить гуманизированных животных, фармакологические исследования на которых дают гораздо более полное приближение к пониманию процессов, происходящих в организме людей.

Химические канцерогены ответственны за возникновение абсолютного большинства злокачественных новообразований человека. Реакциям N-ацетилирования принадлежит особая роль не только на этапах детоксикации многих ксенобиотиков, но и участие в процессах канцерогенеза. Ацетилированные сложные эфиры химически лабильны и спонтанно превращаются в арилнитрониевые ионы, которые, в свою очередь, могут формировать ковалентные аддукты с ДНК и инициировать канцерогенез. В то же время, ряд металлонитрозильных соединений обладают противоопухолевым действием.

Успешное применение Цисплатина в клинике, с одной стороны, и высокая токсичность соединений платиновой группы, с другой стороны, послужили основой для проведения ряда работ, посвященных разработке платиновых комплексов и исследованию их противоопухолевых свойств [27].

К настоящему времени синтезированы тысячи платиновых комплексов различной структуры, однако из них только пять соединений внедрены в клиническую практику. Несколько соединений проходят клинические испытания, в т.ч.

первый платиновый комплекс перорального применения JM216 (сатраплатин).

Большинство антибластных средств метаболизируется и детоксицируется через ацетилтрансферазные механизмы. Наше внимание к выбору цисплатина как молекулы-ингибитора N-ацетилтрансферазы вызвано высоким сродством и реакционной способностью металлокомплексов к трансферазам с образованием дезактивированных белковых аддуктов. Сложность в понимании механизмов цисплатина определяется и тем, что наряду с выраженным антиканцерогенным действием, он способен вызывать возникновение папилломатозных и других видов опухолей.

Ранее нами были получены гуманизированные мыши, т.е. трансгенные животные, содержащие функционирующие гены *Nat1* и *Nat2* человека [7] с «быстрым» типом ацетилирования, а также определены условия их использования в фармакологических исследованиях [1]. Получены также высокоспецифичные праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных [6]. Поскольку цисплатин является субстратом и ингибитором NAT, мы сочли важным провести сравнительное исследование его эффектов на этих животных.

Цель работы – определить различия в токсичности Цисплатина при внутрижелудочном применении на мышах линий C57BL6/Y и SHK, а также на полученных нами трансгенных мышах, несущих гены *Nat1hom* человека. Эти исследования необходимы для более точной сравнительной оценки токсичности перспективных металлонитрозильных противоопухолевых препаратов и созда-

ния адекватных моделей экстраполяции полученных результатов доклинических исследований на человека.

Материалы и методы

Работа выполнена в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», в соответствии с нормативной документацией [12, 1, 11, 9, 8]. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией Центра.

Животные и их содержание

Эксперименты выполнялись на лабораторных аутбредных мышах линий C57BL6/Y («быстрые» ацетиляторы), SHK («медленные» ацетиляторы), а также мышах с геном *Nat1hom* человека. Мыши линии SHK характеризуются высокой частотой (18-20%) и скоростью роста спонтанных опухолей молочной железы. Источник получения животных – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Средняя начальная масса животных – 23-25 г.

Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» в вентилируемых клетках RairIsoSystem по 5 особей в клетке. В качестве корма использовали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный (экструдированный) для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам. Поение – *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 22-24°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – ес-

тественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

В период исследования каждое животное ежедневно осматривалось. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных. При введении препарата осмотр проводился примерно через 1 ч после введения.

Животные распределялись по группам случайным образом методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела ($\pm 10\%$).

Генотипирование мышей с генами *Nat1hom* человека

Наличие гена *Nat1hom* человека проверялось с помощью ПЦР-анализа. В нашей работе использован амплификатор BIO-RAD CFX 96 Real-Time System (США). Система ПЦР реального времени с флуоресцентной детекцией CFX 96 состоит из двух компонентов: оптической реакционной системы сбора данных флуоресценции и термоциклера. Для определения экспрессии генов *Nat1* и *Nat2* человека у трансгенных животных на уровне мРНК высокоспецифичной ПЦР в режиме реального времени и точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления созданы строго специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды.

Объектом исследований служили мыши созданных новых трансгенных линий, а также линии C57BL6/Y. Исследуемый материал – ткань хвостов животных. Из исследуемого материала выделяли тотальную РНК методом

аффинной сорбции и осуществляли синтез первой цепи кДНК. Амплификацию с последующим определением уровня экспрессии генов *Nat1* у мышей и *Nat1* человека у трансгенных мышей проводили методом ПЦР с помощью специфичных праймеров и зондов к генам *Nat1* мышей (далее – *Nat1mus*) и *Nat1* человека у трансгенных мышей (далее – *Nat1hom*).

Обоснование доз

В работе использован коммерческий препарат «Цисплатин-Тева» («Teva Pharmaceutical Industries LTD», Израиль) в виде 0,5% раствора в 0,9% NaCl (0,5 мг/мл), далее – Цисплатин.

Для определения летальных доз выбирали различные концентрации препарата по классической схеме. Первоначальные наивысшие дозы препарата, которые приводили 100% гибели животных, в отчете не описывались. Путем снижения/повышения дозировок были достигнуты искомые LD16, LD50, LD84 и LD100 препаратов.

Введение осуществляли через металлический атравматичный зонд в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксону. Для достижения необходимой дозы Цисплатина введение осуществляли разовым объемом 0,5 мл через каждые 30 мин.

Контрольным группам животных, уравненным по количеству с экспериментальными, внутрижелудочно вводили эквивалентные объемы дистиллированной воды.

Период наблюдения составлял 14 суток.

Регистрируемые показатели

Летальность, время гибели животных, симптоматика отравления, ежед-

невное наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание, потребление корма и воды, вскрытие и макроскопическое описание погибавших и всех выживших животных в конце исследования (эвтаназия осуществлялась передозировкой эфира), определение массовых коэффициентов внутренних органов.

Результаты и их обсуждение

В процессе исследований систематически осуществлялся контроль за трансгенными гуманизированными животными, у которых проводилась детекция наличия и функционирования гена *Nat1hom*.

Для выявления гена *Nat1hom* были подобраны специфичные праймеры и зонды. Нуклеотидные последовательности подобранных зондов и праймеров для мишеней зонда изучались на наличие вторичных структур, взаимокomплекментарных и самокомплекментарных участков в виде димеров и шпилек, что недопустимо для качественной ПЦР в режиме реального времени.

В результате подбора красителей и гасителей по свойствам флуоресценции и гашения флуоресценции для мечения зондов мишеней и зонда внутреннего контроля, с учетом мультиплексной ПЦР в реальном времени, была выбрана следующая комбинация (по схеме «флуорофор – олигонуклеотид – гаситель»):

FAM – зонд (мышь *Nat1*) – BHQ-1,
ROX – зонд (человек *Nat1*) – BHQ-2.

В данной комбинации достигается эффективное тушение за счет спектрального соответствия флуоресценции красителей и тушителей.

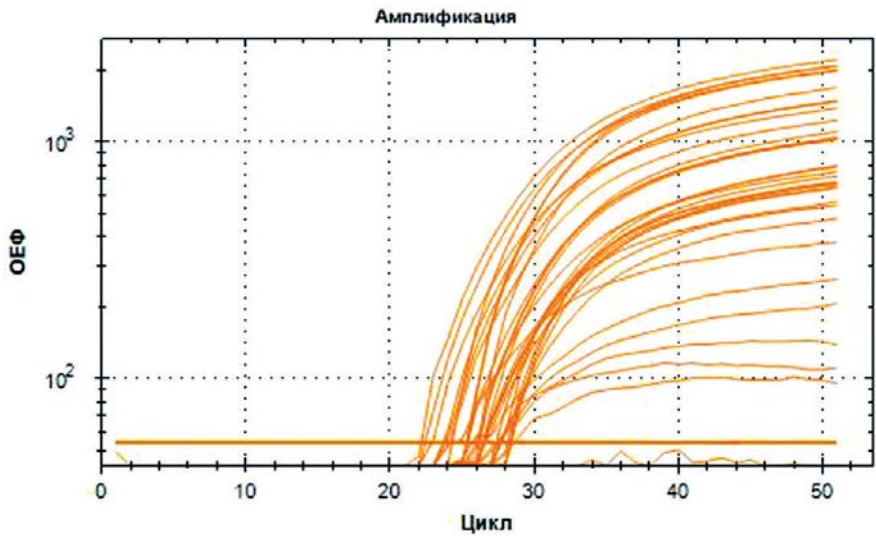


Рис. 1. Пример детекции гена *Nat1hom* у трансгенных животных.

На рис. 1 показаны графики накопления продуктов амплификации с помощью системы ПЦР в реальном времени, что свидетельствует о наличии положительных проб. У каждого исследуемого животного было выявлено наличие специфического участка гена *Nat1hom*.

Нами выявлена наработка специфического продукта ПЦР гена *Nat1hom* человека, который был получен на основе матрицы кДНК в результате обратной транскрипции тотальной РНК. Данный продукт свидетельствует о потенциальной транскрипции гена *Nat1hom* человека у трансгенных животных на белковом уровне, а, следовательно, и о работе данного гена в организме мыши. Установлена экспрессия гена *Nat1hom* человека у использованной линии трансгенных мышей с помощью ПЦР, что также подтверждено в результате проведения секвенирования.

Данная модель животных оказалась, по нашим данным, адекватной биомоделью для экстраполяции ре-

зультатов исследований в отношении человека, в т.ч. для оценки эффектов Цисплатина и других средств, влияющих на процессы ацетилирования в организме.

Токсикометрия

Зависимые от доз летальные эффекты исследуемого препарата представлены в табл. 1.

Таблица 1
Летальные эффекты препаратов (пало/всего) при внутрижелудочном введении мышам-самцам

Линии мышей	Доза, мг/кг		
	20	30	40
C57BL6/Y	1/10	4/10	7/10
	Доза, мг/кг		
SHK	20	30	40
	2/10	4/10	6/10
с геном <i>Nat1hom</i>	Доза, мг/кг		
	50	55	60
	0/10	2/10	5/10

Таблица 2
Летальные дозы Цисплатина для разных линий мышей

Летальные дозы	Линии мышей		
	C57BL6/Y	SHK	с геном <i>Nat1hom</i>
LD16	16,7	22,4	46,1
LD50	35,1	33,7	56,3
LD84	53,5	44,9	66,4
LD100	62,7	50,5	71,5

В табл. 2 даны летальные дозы Цисплатина для разных линий мышей. LD50 Цисплатина для трансгенной линии мышей с геном *Nat1hom* человека составила 56,3 мг/кг, что превышает LD50 для мышей линий C57BL6/Y и SHK более чем на 60%. Можно предположить, что трансформация Цисплатина в печени гуманизированных мышей происходит более активно.

Клиническая картина интоксикации

Мыши линии C57BL6/Y

Признаки передозировки препарата на организм подопытных животных, получавших Цисплатин в дозах 20-40 мг/кг, развились сразу после введения и проявлялись в виде заторможенности, снижения двигательной активности. У всех животных практически сразу после введения наблюдалось (в течение 1-6 мин) затруднение, подавление дыхания, заваливание на бок. При дозе 20 мг/кг у одного животного – тремор, судороги, в результате – гибель через 1,5 ч после введения препарата. Применение Цисплатина в дозах 30 и 40 мг/кг приводило к гибели большинства животных (примерно 80%) в первые часы после введения. Гибель оставшихся 20% животных наблюдалась на вторые сутки. Гибели

всех животных предшествовали тремор, судороги, затруднение дыхания, дезориентация. При использовании дозы 40 мг/кг у выживших животных отмечалась пониженная физическая активность, затруднение дыхания. На пятые-шестые сутки состояние животных, которым вводили Цисплатин в дозе 40 мг/кг, приходило в норму.

Мыши линии SHK

Картина интоксикации мышей линии SHK была такая же, как и у животных линии C57BL6/Y. При применении дозы 20-40 мг/кг у всех животных практически сразу после введения препарата (в течение 1-5 мин) наблюдалось затруднение дыхания, заваливание на бок, у большинства животных – тремор, судороги. К концу первого дня выжившие животные находились в неподвижном состоянии, с затрудненным дыханием и закрытыми глазами. На вторые сутки погибла часть животных. У выживших животных наблюдалось тяжелое состояние, затрудненное дыхание, глаза были закрыты, животные лежали неподвижно. Гибели животных при дальнейшем наблюдении не регистрировали, через 4-5 дней после введения Цисплатина состояние всех выживших животных приходило в норму.

Трансгенные гуманизированные мыши с геном *Nat1hom*

Признаки передозировки препарата на организм подопытных животных развились примерно через 0,5-1 ч после введения и проявлялись в виде заторможенности, снижения двигательной активности. У всех животных практически сразу после введения наблюдалось затруднение, подавление дыхания, заваливание на бок. В отличие от животных линий C57BL6/Y и SHK, в первые сутки

погибали только 1-2 особи (на всех тестируемых дозах). На второй день (на всех дозах) животные находились в неподвижном состоянии, с затрудненным дыханием. Наблюдали гибель основной части животных. На третьи сутки пало по одному животному при использовании доз 55 и 60 мг/кг. На четвертые-пятые сутки состояние животных, которые подвергались интоксикации, нормализовалось.

Результаты измерения массы тела животных, усредненные по группам, представлены в табл. 3.

Анализ полученных данных показывает увеличение средней массы всех выживших животных, получавших Цисплатин. Динамика массы тела опытных животных во всех группах не отличалась друг от друга. Живот-

ные контрольной группы прибавили к 14-му дню примерно 5% от начальной массы, а животные опытных групп – примерно 4%.

В табл. 4 приведены массовые коэффициенты внутренних органов мышей, усредненные по группам.

Анализ величин массовых коэффициентов не выявил каких-либо достоверных отличий как между группами животных, получавшими препарат, так и по отношению к контрольной группе.

Гистологические исследования

Т.к. гистологическая картина органов и тканей для животных всех групп была идентичной, ниже приведены результаты гистологических исследований органов и тканей с патологиями по группе животных с геном *Nat1hom*.

Таблица 3

Сравнительные данные изменения массы тела (г) под влиянием Цисплатина при однократном введении

Время наблюдения	Группы животных			
	Контроль	C57BL6/Y	SHK	с геном <i>Nat1hom</i>
Фон	23,9±1,5	23,4±0,8	23,0±1,4	23,2±1,2
7-й день	24,5±1,0	24,0±1,7	24,1±1,1	23,9±1,5
14-й день	25,1±1,3	24,3±1,2	24,2±1,8	24,3±0,9

Таблица 4

Массовые коэффициенты (МК) органов мышей разных линий при однократном введении Цисплатина (г/кг веса тела)

Орган	Группы животных			
	Контроль	C57BL6/Y	SHK	с геном <i>Nat1hom</i>
Сердце	3,9±0,3	3,6±0,3	3,7±0,1	3,8±0,4
Легкие с трахеей	6,3±0,2	6,5±0,4	6,6±0,2	6,4±0,3
Печень	39,2±2,0	38,5±1,8	39,6±0,7	37,8±1,4
Селезенка	3,6±0,7	3,4±0,6	3,4±0,3	3,5±0,2
Почка (левая)	4,3±0,4	4,6±0,1	4,1±0,2	4,6±0,4
Головной мозг	16,1±0,6	15,9±0,6	16,3±0,4	16,2±0,8

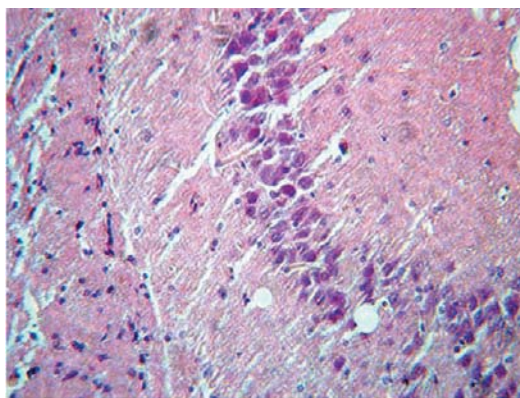


Рис. 2. Грушевидные клетки мозжечка. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

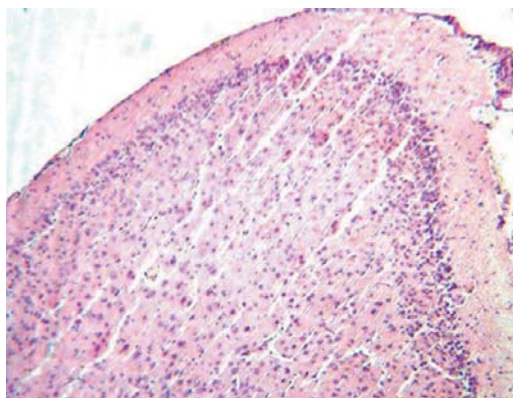


Рис. 3. Кора больших полушарий головного мозга. Дистрофические изменения единичных нейронов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x100.

Головной мозг (рис. 2, 3). Мягкая оболочка в виде мелких фрагментов с полнокровными сосудами. Умеренное полнокровие сосудов мелкого калибра. Сосуды среднего калибра в препаратах не представлены. Местами расширение периваскулярного пространства (в основном, вокруг глиальных клеток). Гистоархитектоника сохранена. Большинство нейронов окрашены бледно, округлой формы, набухание небольшого их количества, небольшое количество нейронов в виде клеток-теней. Клетки микроглии небольших размеров с гиперхромными, интенсивно окрашенными

ми ядрами. В единичных полях зрения сателлитоз. Нейронофагия не просматривается. Ядра грушевидных клеток коры мозжечка просматриваются плохо, единичные безъядерны.

Эти данные подтверждают клинические наблюдения о развитии под влиянием Цисплатина нейропатий преимущественно сенсорной природы. Отмечаются невриты зрительного нерва, корковая слепота, нарушения статокинетических функций.

Сердце (рис. 4-6). Неравномерное кровенаполнение с очагами ишемии. Неравномерное окрашивание кардиоми-

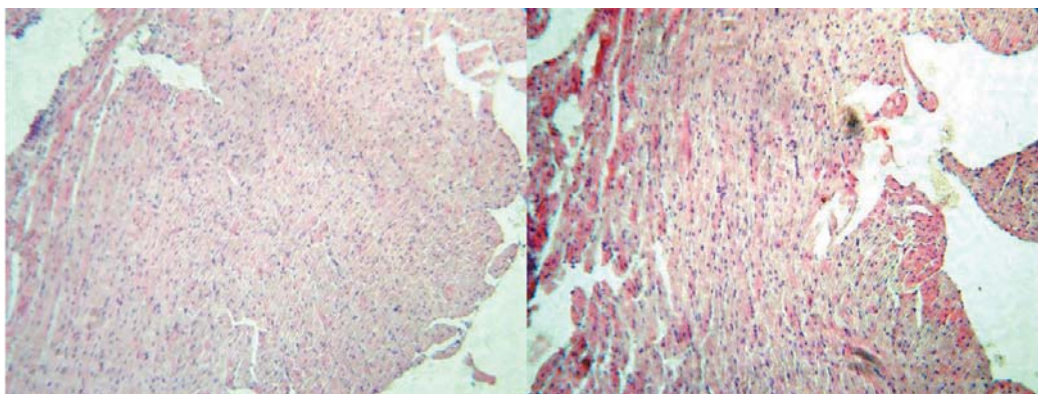


Рис. 4. Изменения тинкториальных свойств кардиомиоцитов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

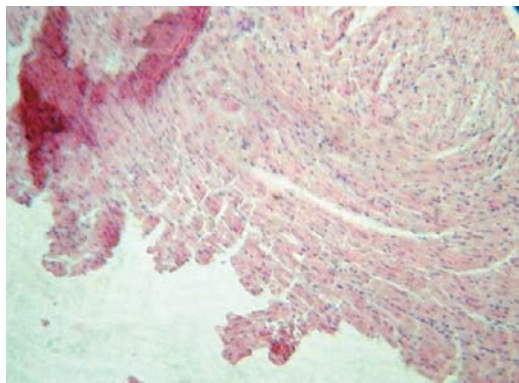


Рис. 5. Фрагментация кардиомиоцитов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

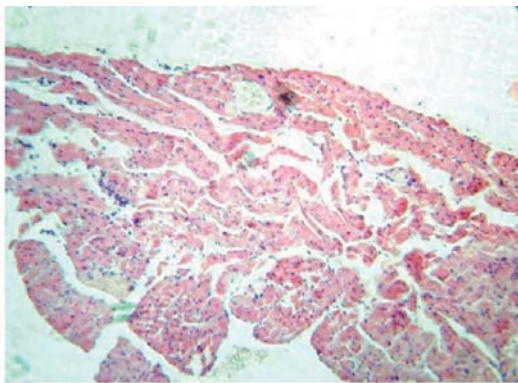


Рис. 6. Извитой ход волокон миокарда. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. х100.

оцитов, ядра не увеличены, большинство из них имеют одинаковые размеры и окрашивание (нормохромность). У единичных кардиомиоцитов ядра с нечеткими контурами. Примерно в половине поля зрения мышечные волокна имеют извитой ход, в единичных полях зрения фрагментированы. Поперечная исчерченность мышечных волокон просматривается в некоторых полях зрения.

Эти гистологические изменения иллюстрируют описываемые клиницистами нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы: ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда,

застойная сердечная недостаточность, аритмии, ортостатическая гипотензия.

Легкие (рис. 7). Незначительное расширение просвета небольшого количества альвеол и альвеолярных ходов, в просвете мелких групп альвеол (2-4) отмечалось скопление гомогенной слабо эозинофильной жидкости, единичные мелкие очаги с рыхло расположенными эритроцитами в просвете альвеол (интраальвеолярные кровоизлияния). Сосуды (венозного типа) расширены, полнокровны. Преимущественное полнокровие капилляров межальвеолярных перегородок. Стен-

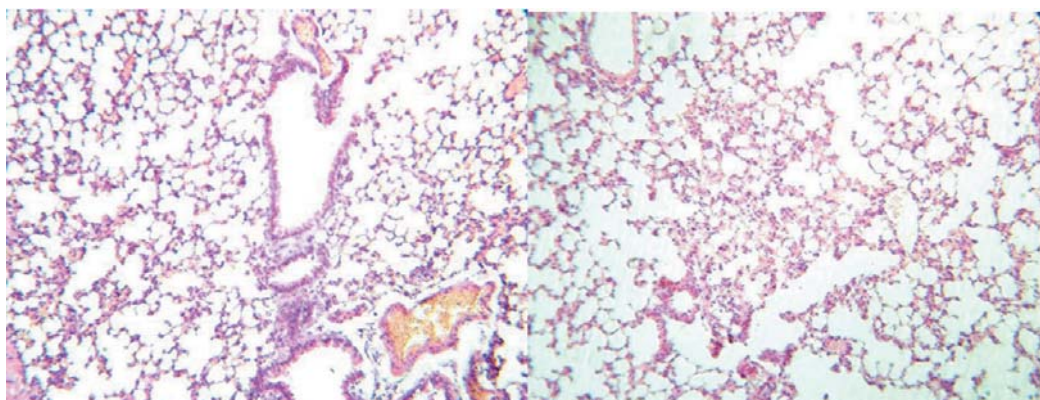


Рис. 7. Мелкоочаговые интраальвеолярные кровоизлияния. Полнокровие. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

ки крупных бронхиол практически во всех наблюдениях имели нормальное строение, без признаков воспаления и перибронхиолярного отека, выстланы респираторным эпителием без каких-либо патологических изменений. В некоторых полях зрения отмечается незначительная гиперплазия перибронхиальной лимфоидной ткани.

Клинические исследования отмечают нарушения объема вентиляции легких и изменения легочной гемодинамики.

Печень (рис. 8). Полнокровие порталных и центральных вен (в большей части поля зрения – с расширением их просвета). Гепатоциты всех отделов дольки имели нормальное строение с умеренно выраженными признаками белковой зернистой дистрофии.

В клинике транзиторные повышения уровня АСТ, АЛТ и билирубина в сыворотке крови и гепатозы также согласуются с полученными нами данными.

Почки (рис. 9). Преимущественное полнокровие обоих слоев с несколько большим кровенаполнением мозгового

вещества. Клубочки примерно одинакового размера без признаков патологических изменений, преимущественно полнокровны. Капсула Боумена-Шумлянского не изменена. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев сохранен, дистрофические изменения в нем не просматриваются.

Побочные эффекты Цисплатина в виде нефротоксичности являются основным токсическим фактором, ограничивающим дозу препарата. Однако в клинике отмечается, что нефротоксичность Цисплатина носит кумулятивный характер и выявляется на второй неделе после введения соответствующей дозы.

Наблюдаются повреждения почечных канальцев, повышение уровня креатинина, мочевины, мочевой кислоты. В нашем исследовании это не столь четко просматривается, поскольку используется однократное введение препаратов.

Селезенка (рис. 10). Полнокровие. Границы фолликулов нечеткие. Небольшое количество мегакариоцитов. Реактивные центры не просматриваются.

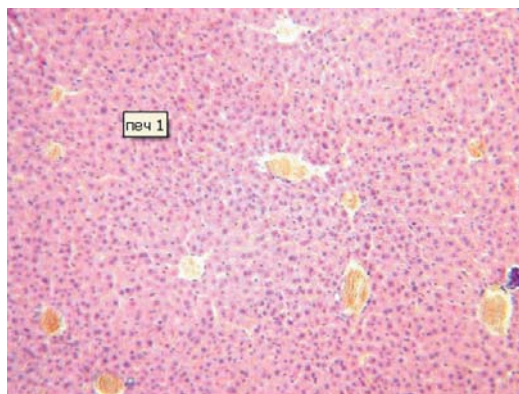


Рис. 8. Полнокровие порталных и центральных вен печени, умеренно выраженная белковая зернистая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x100.

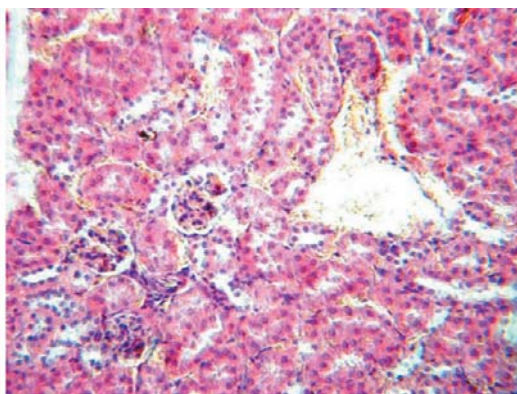


Рис. 9. Венозное полнокровие коры почки. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

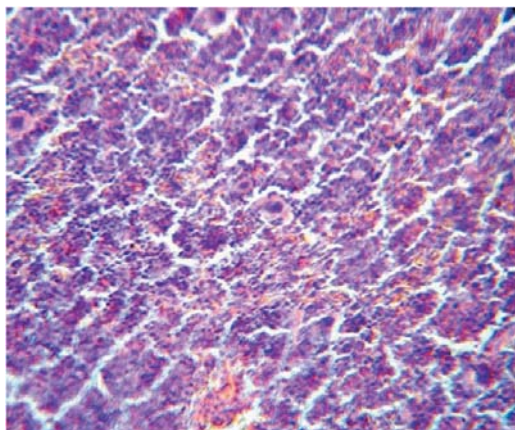


Рис. 10. Единичные мегакарициты в селезенке. Полнокровие. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

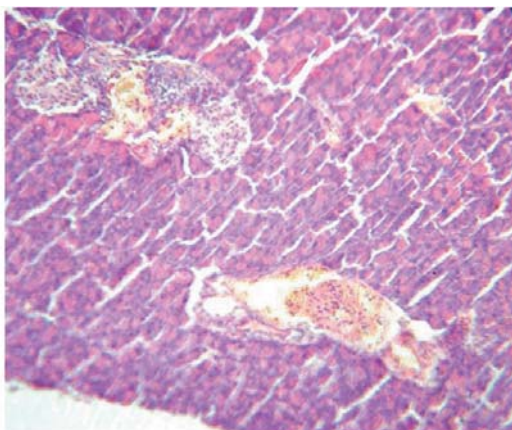


Рис. 11. Венозное полнокровие поджелудочной железы с умеренным лейкоцитозом. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

Поджелудочная железа (рис. 11). Венозное полнокровие (с умеренным лейкоцитозом у животного № 2). Инсулиновые островки просматриваются хорошо. Строма не изменена.

Тонкая кишка (рис. 12). Неравномерное кровенаполнение сосудов подслизистого слоя с преимущественным полнокровием вен. Круглоклеточная инфильтрация стромы слизистой оболочки и соединительной ткани ворсин, отек стромы последних. Незначительная круглоклеточная инфильтрация под-

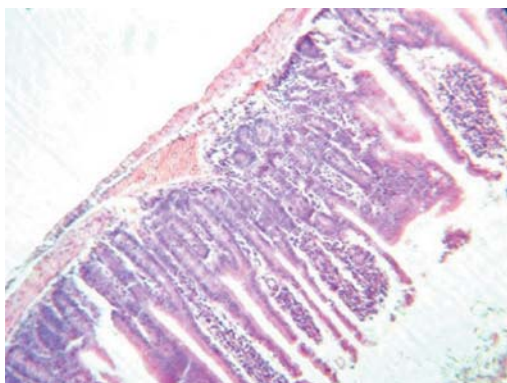


Рис. 12. Серозный энтерит. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х100.

слизистого слоя с невыраженным его отеком. Единичный мелкий фрагмент растительной клетчатки в просвете. Умеренное кровенаполнение прилежащей жировой клетчатки.

Клинические исследования указывают на достаточно тяжелое проявление токсического действия Цисплатинана со стороны ЖКТ в виде абдоминальных болей, диареи, запоров, тошноты и рвоты.

Заключение

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, в частности процессы ацетилирования.

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 большинство антибластных лекарственных препаратов. NAT является ферментом, которому принадлежит важная роль в метаболизме эндогенных и чужеродных соединений ариламидной природы, включая противоопухолевые препараты.

Показано, что ген *Nat2* локализуется и экспрессируется преимущественно в печени, тогда как экспрессия гена *Nat1* у человека обнаружена почти во всех тканях, включая лейкоциты и эритроциты [15, 16, 20, 22]. Было отмечено, что ген *Nat1* начинает экспрессировать в ранний период развития человека [21]. В человеческой плаценте на ранних стадиях развития уровень экспрессии *Nat1* в 1000 раз выше уровня *Nat2* [24]. Позднее было показано, что этот ген начинает экспрессировать уже в эмбрионах, находящихся на стадии бластоцисты, т.е. ещё до момента имплантации и нейруляции [23].

В течение многих десятилетий NAT1-изофермент был представлен в научной литературе как «мономорфный», поскольку биомодальность не была определена при активности N-ацетилирования в человеческих популяциях. Тем не менее, после клонирования генов NAT человека, было показано, что локус NAT1 является полиморфным [26], и на сегодняшний день в общей сложности 26 различных аллелей были зарегистрированы в NAT-номенклатуре базы данных. Из первых NAT1-аллелей, которые были описаны, NAT1*4 дикого типа отвечает за фенотип быстрого ацетилирования, и мутантный NAT1*10 [26]. Эти две аллели имеют одинаковые кодирующие области, но NAT1*10 содержит две

мутации в нетранслируемой области 3' (UTR), одна из которых (T1088-A) отменяет полиаденилирование сигнала гена. Первоначально сообщалось, что NAT1*10 связан с увеличением активности ацетилирования [13, 14].

Многочисленная литература указывает на субстратные свойства цисплатина в отношении фермента NAT. В дальнейшем было показано, что цисплатин является ингибитором NAT1. Нами было подтверждено это свойство цисплатина, но установлено его ингибирующее действие и на систему NAT2. NAT1 имеет оригинальный субстратно-специфичный профиль и в дополнение к метаболизму ксенобиотиков, включая цисплатин, который может участвовать в процессе ацетилирования эндогенных метаболитов [19, 27].

У взрослых мышей [25] и других грызунов [18] эквивалент человеческой *Nat1* экспрессируется в клетках Пуркинье мозжечка [25]. Исследования, проведенные на мозжечке взрослых людей, также показали аналогичную экспрессию *Nat1* в клетках Пуркинье [17]. 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* не значительно изменялось в печени, лёгких, почках и мозге. Эти данные определили выбор нами для исследования цисплатина: биомодель трансгенных мышей, несущих ген *Nat1hom*.

Было изучено влияние одноразового внутрижелудочного введения препарата Цисплатин в разных дозах на организм лабораторных мышей линий C57BL6/Y, SHK и мышей с геном *Nat1hom*.

Результаты острой токсикометрии выявили ЛД₅₀ для каждой линии мышей. Для мышей линий C57BL/6/Y и SHK LD₅₀ составила 35,1 и 33,7 мг/кг соответственно. Для мышей с геном *Nat1hom* LD₅₀ составила 56,3 мг/кг.

Картина интоксикации для всех изученных доз препарата была схожей: предположительно, животные умирали от остановки дыхания. У животных линий C57BL/6/Y и SHK гибель наступала быстрее (в первые сутки после введения препарата), чем у животных с геном *Nat1hom*. Все выжившие животные через 4-5 дней приходили в норму. Анализ величин массовых коэффициентов не выявил каких-либо достоверных отличий как между группами животных, получавшими препарат, так и по отношению к контрольной группе.

Средняя масса тела всех выживших животных, получавших Цисплатин, равномерно увеличивалась. Динамика массы всех опытных групп животных не отличалась друг от друга, а также от контроля.

При гистологическом исследовании животных после внутрижелудочного введения Цисплатина в дозе 45 мг/кг обнаружены отек головного мозга с признаками острой энцефалопатии, что свидетельствует о преимущественном поражении центральной регуляции вегетативных стволовых центров (сосудодвигательного и дыхательного).

Обнаруженные изменения в миокарде (его неравномерное кровенаполнение с очагами ишемии, изменение тинкториальных свойств кардиомиоцитов, очаги фрагментации и извитого хода мышечных волокон) свидетельствуют о начале развития острой сердечной недостаточности, в пользу чего говорит наличие

венозного полнокровия внутренних органов (мозг, легкие, печень, почка, селезенка, поджелудочная железа), очаговые острые расстройства гемодинамики в легких.

Изменения, возникшие в тонкой кишке, могли бы быть объяснены результатом прямого либо резорбтивного действия перорального вводимого препарата, если бы не многочисленные клинические данные о серьезных и грубых нарушениях в ЖКТ после парентерального или инфузионного введения Цисплатина.

Следует также отметить, что по данным клинических исследований у пациентов, принимающих Цисплатин, обнаруживается нарушение электролитного баланса в виде гипомagneмии, гипокальциемии, гипонатриемии и гипофосфатемии. Гипомagneмия и/или гипокальциемия могут проявляться клинически повышенной мышечной чувствительностью или судорогами, тремором, карпопедальным спазмом (судороги в кистях и стопах) и/или тетанией. Гипонатриемия обычно обусловлена синдромом неадекватной продукции антидиуретического гормона. В наших исследованиях при введении трансгенным мышам линии *Nat1hom* субтоксических доз препарата это проявлялось в выраженной заторможенности, гиподинамией, резком снижении тонуса мышц с эпизодически возникающими генерализованными судорогами, заваливанием на бок.

По данным клинических исследований Цисплатина [19], максимальная терапевтическая (переносимая) доза для человека составляет 200 мг/м², что ориентировочно соответствует дозе 5 мг/кг. По данным наших исследований, макси-

мально переносимой дозой для мышей с геном *Nat1hom* является доза 37,5 мг/кг, при которой ни одно животное не погибло. Использование таксономических расчетов и аллометрического масштабирования [3] соответствующих субтоксичных доз пересчета в системе «мышь-человек» составляет примерно 4,5 мг/кг. Повышенная устойчивость мышей с геном *Nat1hom* в сравнении с мышами линии C57Bl6/Y и SHK к токсическим эффектам Цисплатина дает основание предположить, что мыши с геном *Nat1hom* являются наиболее адекватными объектами для оценки безопасности антибластных препаратов.

Базируясь на концепции А. Альберта [1] о том, что избирательная токсичность – это способность лекарств воздействовать на специфичные клетки или метаболические звенья и не влиять на другие, мы подтвердили, что действие Цисплатина ориентировано на одну из мишеней – NAT, как по своим эффектам, так и по токсичности. Эффекты Цисплатина – как позитивные, так и негативные – проявляются в тех органах, где наиболее презентативна NAT-система. У трансгенных мышей, несущих ген *Nat1hom*, его экспрессия наиболее выражена и может быть количественно и качественно оценена при действии Цисплатина.

Представляет интерес сравнить приведенные данные с ранее полученными нами спектрофотометрическим кинетическим методом (по Эллману) результатами *in vitro* на экстрактах печени мышей линии C57BL6/Y об ингибиторной активности цисплатина. Оценивалась функциональная активность (IC_{50}) ингибитора цисплатина в дозе 45 мг/кг на фоне специфического субстрата сульфа-

метазин в дозах 5-20 мг/кг. Факторный анализ результатов эксперимента показал, что специфический субстрат снижал показатели летальности цисплатина на 20-35%.

Использование трансгенных гуманизированных животных, несущих ген *Nat1hom*, позволило нам не только уточнить параметры токсического действия препарата, но и выяснить некоторые доселе неизвестные механизмы их действия. Так, Цисплатин, согласно полученным данным, осуществляет свое фармакологическое действие на треть за счет вовлечения в него реакций N-ацетилирования и/или их ингибирования. Более того, в токсическом действии Цисплатина более 60% принадлежит ацетилтрансферазным процессам.

Трансгенные гуманизированные и химерные животные позволяют моделировать определенные механизмы генетического полиморфизма человека и его патологий для детальной оценки его индивидуальной чувствительности. Несмотря на известные проблемы и трудоемкость создания гуманизированных животных под задачи эксперимента, конечные результаты окупают финансовые и трудовые затраты. Новые горизонты в создании генетических и эпигенетических биомodelей открывает используемая нами CRISPR/Cas9-технология. Эта технология основана на использовании регулярно расположенных групп коротких палиндромных повторов, применяемых для создания принципиально новых генетических конструкций человека. CRISPR/Cas9-технология позволяет совершить прорыв в переходе от методов традиционной геной инженерии и модификации генома к замене генных конструкций животных на человеческие

и быстрому созданию животных моделей не только болезней человека, но и биомоделей под задачи фармакологического эксперимента.

Благодарности

Авторы выражают свою признательность доценту О.В. Барановой за помощь в интерпретации результатов патморфологических исследований.

Список литературы

1. **Альберт А.** Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии. Т. 1. - М.: Медицина. 1989. 400 с.
2. ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».
3. **Каркищенко В.Н., Мартынов В.В.** Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // Биомедицина. 2006. № 4. С. 85.
4. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 320 с.
5. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. - М.: Межакадемическое изд-во ВПК. 2007. 448 с.
6. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. - М.: Межакадемическое изд-во ВПК. 2004. 607 с.
7. **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.
8. **Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М.** Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы) // Биомедицина. 2014. № 4. С. 4-23.
9. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ: В кн. «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М.: Медицина. 2005. С. 41-53.
10. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP). - РД 31,5-126-91. - М., 1992.
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. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. Миронова А.Н. - М.: Гриф и К. 2012.
13. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
14. **Badawi A.F., Hirvonen A., Bell D.A., Lang N.P., Kadlubar F.F.** Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder // CancerRes. 1995. N. 15. P. 5230-5237.
15. **Bell D.A., Badawi A.F., Lang N.P., Ilett K.F., Hirvonen A.** Polymorphism in the N-acetyltransferase (NAT1) polyadenylation signal: association of the NAT1*10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue // CancerRes. 1995a. N. 55. P. 5226-5229.
16. **Cribb A.E., Grant D.M., Millar M.A., Speilberg S.P.** Expression of monomorphic arylamine N-acetyltransferase (NAT1) in human leukocytes // J. Pharmacol. exp. ther. 1991. N. 259. P. 1241-1246.
17. **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. N. 42. P. 402-409.
18. **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. London. 2000.
19. **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. N. 376. P. 123-128.
20. **Markman M., D'Acquisto R., Iannotti N., et al.** Phase-1 trial of high-dose intravenous cisplatin with simultaneous intravenous sodium thiosulfate // J. Cancer Research and Clinical Oncology. 1991. Vol. 117. Iss. 2. P. 151-155.
21. **Ohsako S., Deguchi T.** Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases of human liver // J. Biol. chem. 1990. N. 265. P. 4630-4634.
22. **Pacific I.G.M., Benicini C., Rane A.** Acetyltransferases in humans: development and tissue distribution // Pharmacology. 1986. N. 32. P. 283-291.

23. 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. N. 78. P. 235-240.
24. Smelt V.A., Upton A., Adjaye J., Payton M.A., Boukouvala S., Johnson S., Mardon H.J., Sim E. Expression of arylamine/V-acetyltransferases in pre-term placentas and in human pre-implantation embryos // Hum. mol. genet. 2000. N. 9. P. 1101-1107.
25. 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. N. 83. P. 149-157.
26. Stanley L.A., Mills I.G., Sim E. Localization of polymorphic A'-acetyltransferase (NAT2) in tissues of inbred mice // Pharmacogenetics. 1997. N. 7. P. 121-130.
27. Vatsis K.P., Weber W.W. Structural heterogeneity of Caucasian N-acetyltransferase at the *NAT1* gene locus // Arch. biochem. biophys. 1993. N. 301. P. 71-76.
28. Weber W.W., Vatsis K.P. Individual variability in p-amino-benzoic acid acetylation by human N-acetyltransferase (*NAT1*) of peripheral blood // Pharmacogenetics. 1993. N. 3. P. 209-212.

A new model for the evaluation of selective toxicity of antineoplastic funds in transgenic mice with human genes *Nat1hom*

N.N. Karkischenko, G.D. Kapanadze, N.V. Petrova

The toxicity of the drug Cisplatin after intragastric administration was assessed on humanized transgenic mice with human genes *Nat1hom*. The evaluation was conducted in comparison with mice lines C57BL6/Y ("fast" type of acetylation) and line SHK ("slow" type of acetylation). LD50 for mice *Nat1hom* amounted to 56,3 mg/kg, for mice of the C57BL6/Y – 35,1 mg/kg, for mice line SHK – 33,7 mg/kg. The death of animals C57BL6/Y and SHK line was observed within 1-6 hours after administration and in mice *Nat1hom* – a day after the introduction. There were lethargy, lack of exercise, a sharp decline in muscle tone with episodic generalized convulsive episodes, collapsing on its side in animals of all lines closely to lethal condition. The autopsy of the dead animals showed signs of congestive venous plethora of internal organs, edema of the meninges with a single bleeding under the lining of the brain. After administration of Cisplatin at a dose of 45-55 mg/kg in histological research there were detected cerebral edema with signs of acute encephalopathy and changes in the myocardium, which indicate the early development of acute heart failure. Venous plethora manifested in all internal organs and in the brain. Lower level of toxicity of Cisplatin in mice with human genes *Nat1hom*, authors explain the presence of the human gene with the "fast" type of acetylation. It is concluded that in the metabolism and detoxification of Cisplatin, as well as reducing its toxicity, more than 60% N-acetyltransferase processes. The creation of transgenic humanized mice can be based on the use of CRISPR/Cas9 technology. Proposed a new model of humanized transgenic mice with the gene *Nat1hom* for preclinical researches of anticancer drugs.

Key words: toxicity of antineoplastic drugs, Cisplatin, humanized transgenic mice with the gene *Nat1hom*, mouse C57BL6/Y and SHK lines, histomorphology, real-time PCR, CRISPR/Cas9 technology.