

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print)
ISSN 2713-0428 (online)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 20

2024

2



Уважаемые читатели!

22–23 мая 2024 года в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России прошла юбилейная XX межрегиональная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование». На конференции было представлено 64 доклада, заслушанных на секциях «Методы и технологии в биомедицине», «Доклинические исследования в биомедицине», «Трансгеноз и критерии качества животных» (в НЦБМТ ФМБА России, Московская область), а также «Актуальные вопросы клинической и фундаментальной фармакологии» (в РГМУ Минздрава России, Ростов-на-Дону), «Современные проблемы фармакотоксикологии» (в СПХФУ Минздрава России, Санкт-Петербург).

Руководство НЦБМТ ФМБА России и редакционный совет журнала «Биомедицина» приняли решение опубликовать представленные работы в трех ближайших номерах журнала.

В этом выпуске представлены работы сотрудников НЦБМТ ФМБА России и коллег из других организаций, совместно работающих по общим направлениям.



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2024, Том 20, № 2

Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly

2024, Vol. 20, No. 2

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал «Биомедицина» основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий. Журнал издаётся на русском и английском языках. В журнале публикуются исследования по новым биомедицинским технологиям, моделям и методам исследований, конструированию новых линий животных-моделей (в том числе трансгенных, нокаутных, эпигеномных), эпигенетическим аспектам в биомедицине, экспериментальной и спортивной фармакологии, фармнутриентам, восстановительной медицине, биомедицинским аспектам клинической фармакологии. Журнал ориентирован на специалистов в области биологии, медицины, биомедицины и ветеринарии. В журнале опубликованы статьи авторов более чем из 200 различных организаций, география которых включает в себя практически всю Россию, а также Беларусь, Казахстан, Грузию, Украину, Нидерланды, Болгарию.

■ Главный редактор

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, акад. РАРАН и Международной академии астронавтики (Париж)

■ Заместители главного редактора

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф.
Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

Анохин Константин Владимирович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Ачкасов Евгений Евгеньевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)
Баранов Виктор Михайлович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Влахов Витан, д.м.н., проф., акад. Болгарской академии наук и искусств (София, Болгария)
Галенко-Ярошевский Павел Александрович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Краснодар, Россия)
Дубина Михаил Владимирович, д.м.н., акад. РАН (Москва, Россия)
Дыгай Александр Михайлович, д.м.н., проф., акад. РАН (Томск, Россия)
Еримбетов Кенес Тагаевич, д.б.н. (Боровск, Калужская обл., Россия)
Кит Олег Иванович, д.м.н., проф., акад. РАН (Ростов-на-Дону, Россия)
Коваленко Леонид Владимирович, д.х.н., проф. (Москва, Россия)
Кузнецов Александр Евгеньевич, д.т.н., проф. (Москва, Россия)
Мартиросян Владимир Викторович, д.т.н., проф. РАН (Москва, Россия)
Мирошников Анатолий Иванович, д.х.н., акад. РАН (Москва, Россия)
Мурашёв Аркадий Николаевич, д.б.н., проф. (Пушино, Московская обл., Россия)
Николенко Владимир Николаевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)
Оковитый Сергей Владимирович, д.м.н., проф. (Санкт-Петербург, Россия)
Остренко Константин Сергеевич, д.б.н. (Боровск, Калужская обл., Россия)
Пинелис Всеволод Григорьевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)
Пчелинцев Сергей Юрьевич, д.м.н., проф. (Любучаны, Московская обл., Россия)
Раменская Галина Владиславовна, д.фарм.н., проф. (Москва, Россия)
Рембовский Владимир Романович, д.м.н., проф. (Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия)
Решетов Игорь Владимирович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Сафроненко Андрей Владимирович, д.м.н., проф. (Ростов-на-Дону, Россия)
Сычёв Дмитрий Алексеевич, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Федулова Лилия Вячеславовна, д.т.н., проф. РАН (Москва, Россия)
Хритинин Дмитрий Фёдорович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)
Цыганков Борис Дмитриевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)
Ших Евгения Валерьевна, д.м.н., проф. (Москва, Россия)
Шустов Евгений Борисович, д.м.н., проф., акад. РАЕН (Санкт-Петербург, Россия)
Щастный Анатолий Тадеушевич, д.м.н., проф. (Витебск, Республика Беларусь)

БИОМЕДИЦИНА

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в объединенном каталоге «Пресса России»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1
Дата выхода в свет:	10.06.2024

The scientific journal “Journal Biomed” was founded in 2005 by the Scientific Center of Biomedical Technologies. The journal is published in Russian and English. The journal publishes research on new biomedical technologies, research models and methods, the construction of new lines of animal-models (including transgenic, knock-out, epigenomic), epigenetic aspects in biomedicine, experimental and sports pharmacology, pharmaceutical ingredients, rehabilitation medicine, biomedical aspects of clinical pharmacology. The journal is aimed at specialists in the field of biology, medicine, biomedicine and veterinary medicine. The journal published articles by authors from more than 200 different organizations, the geography of which includes almost all Russia, and Belarus, Kazakhstan, Georgia, Ukraine, Netherlands, Bulgaria.

■ Editor-in-Chief

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS, Acad. of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences and International Academy of Astronautics (Paris)

■ Deputy Editors-in-Chief

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.)

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina

■ Members of Editorial Council

Konstantin V. Anokhin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Evgeniy E. Achkasov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Viktor M. Baranov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Vitan Vlahov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Bulgarian Academy of Sciences and Arts (Sofia, Bulgaria)

Pavel A. Galenko-Yaroshevskiy, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Krasnodar, Russia)

Mikhail V. Dubina, Dr. Sci. (Med.), Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Aleksandr M. Dygay, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Tomsk, Russia)

Kenes T. Erimbetov, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)

Oleg I. Kit, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Rostov-on-Don, Russia)

Leonid V. Kovalenko, Dr. Sci. (Chem.), Prof. (Moscow, Russia)

Aleksandr E. Kuznetsov, Dr. Sci. (Tech.), Prof. (Moscow, Russia)

Vladimir V. Martirosyan, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, Russia)

Anatoliy I. Miroshnikov, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Arkadiy N. Murashev, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Pushchino, Moscow Region, Russia)

Vladimir N. Nikolenko, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Sergey V. Okovityy, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Saint Petersburg, Russia)

Konstantin S. Ostrenko, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)

Vsevolod G. Pinelis, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Sergey Yu. Pchelintsev, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Lyubuchany, Moscow Region, Russia)

Galina V. Ramenskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof. (Moscow, Russia)

Vladimir R. Rembovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Kuzmolovskiy, Leningrad Region, Russia)

Igor V. Reshetov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Rostov-on-Don, Russia)

Dmitriy A. Sychev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Liliya V. Fedulova, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, Russia)

Dmitriy F. Khritinin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Boris D. Tsygankov, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Moscow, Russia)

Evgenia V. Shikh, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Russian Academy of Natural Sciences (Saint Petersburg, Russia)

Anatoliy T. Shchastnyj, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Vitebsk, Republic of Belarus)

JOURNAL BIOMED

Biomeditsina

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Barrikad Street, 1
Publication date:	10.06.2024

■ ТРАНСГЕНОЗ И ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ ЖИВОТНЫЕ

- Н.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова, В.В. Слободенюк, Е.М. Колоскова, Н.А. Ларюшина, И.А. Васильева, Д.В. Петров, Л.А. Болотских, М.А. Савина**
Доказательства трансгенности и гуманизированности у мышей, полученных в НЦБМТ ФМБА России, методом секвенирования по Сэнгеру 8
- В.Н. Каркищенко, В.А. Езерский, Е.М. Колоскова, М.С. Нестеров**
Получение дифференцированных рекомбинантных белков β 2-микроглобулина человека и β 2-микроглобулина мыши для его детектирования в химерных молекулах HLA I класса . . 21
- В.Н. Каркищенко, А.Г. Берзина, Н.В. Петрова, И.А. Помыткин, Е.С. Глотова, Д.В. Петров, Л.А. Табоякова, Л.А. Болотских, Н.А. Ларюшина**
Доказательство наличия целевых белков — β 2m hom и HLA у гуманизированных трансгенных мышей линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02 32
- В.Н. Каркищенко, А.Г. Берзина, И.А. Помыткин, Е.С. Глотова, М.А. Савина, Д.В. Петров, Л.А. Табоякова, Л.А. Болотских, И.А. Васильева**
Изучение иммунного ответа у трансгенных гуманизированных мышей линии HLA-A*02:01 на введение антигена — IgG лошади 45
- Н.Н. Каркищенко, В.А. Езерский, О.Б. Жукова, Е.М. Колоскова, Н.В. Петрова**
Повышение специфичности поликлональных антител к β 2-микроглобулину человека и мыши как альтернатива использованию моноклональных антител в иммунологических методах анализа. 53
- ## ■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
- Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, С.Ю. Харитонов**
Системные нормированные гамма-осцилляции структур головного мозга: фармакологический анализ нейрхимических и метаболических процессов 66
- О.В. Алимкина, Н.В. Петрова, Н.В. Станкова, Ю.В. Фокин, Е.С. Глотова, Н.А. Ларюшина, И.А. Васильева**
Минипиг — предпочтительная линия лабораторных животных для эстраполяции биомедицинских исследований на человека 95
- Н.С. Огнева, М.С. Нестеров, Д.В. Хвостов, Н.В. Станкова, В.Н. Каркищенко**
Сравнительное изучение фармакокинетики пептидного препарата Лейтрагин в сыворотке крови светлогорских мини-пигов после однократного введения 110

■ TRANGENOSIS AND HUMANIZED ANIMALS

- Nikolay N. Karkischenko, Nataliya V. Petrova, Vladimir V. Slobodenyuk, Elena M. Koloskova, Nadezhda A. Laryushina, Irina A. Vasil'eva, Dmitriy V. Petrov, Lyubov' A. Bolotskih, Maria A. Savina**
Evidence of Trangenity and Humanization in Mice Obtained at the SCBMT of FMBA of Russia by Sanger Sequencing Method 8
- Nikolay N. Karkischenko, Vadim A. Ezerskiy, Elena M. Koloskova, Maxim S. Nesterov**
Preparation of Differentiated Recombinant Human β 2-Microglobulin and Mouse β 2-Microglobulin Proteins for its Detection in Class I HLA Chimeric Molecules 21
- Vladislav N. Karkischenko, Asya G. Berzina, Nataliya V. Petrova, Igor A. Pomytkin, Elena S. Glotova, Dmitriy V. Petrov, Lidiya A. Taboyakova, Lubov' A. Bolotskih, Nadezhda A. Laryushina**
Evidence for the Presence of β 2m hom Target Proteins and HLA in Humanized Transgenic Mice of HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, and HLA-C*07:02 Lines 32
- Vladislav N. Karkischenko, Asya G. Berzina, Igor A. Pomytkin, Elena S. Glotova, Maria A. Savina, Dmitriy V. Petrov, Lidiya A. Taboyakova, Lubov' A. Bolotskih, Irina A. Vasil'eva**
Immune Response in HLA-A*02:01 Transgenic Humanized Mice to the Introduction of Horse IgG Antigen 45
- Nikolay N. Karkischenko, Vadim A. Ezerskiy, Olga B. Zhukova, Elena M. Koloskova, Nataliya V. Petrova**
Increasing the Specificity of Polyclonal Antibodies to Human and Mouse β 2-Microglobulin as an Alternative to the Use of Monoclonal Antibodies in Immunological Analysis 53
- ## ■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH
- Nikolay N. Karkischenko, Yuriy V. Fokin, Sergey Yu. Kharitonov**
System Normalized Gamma Oscillations of Brain Structures: Pharmacological Analysis of Neurochemical and Metabolic Processes 66
- Oksana V. Alimkina, Nataliya V. Petrova, Nataliia V. Stankova, Yuriy V. Fokin, Elena S. Glotova, Nadezhda A. Laryushina, Irina A. Vasil'eva**
Minipigs as Preferred Laboratory Animals for Extrapolation of Biomedical Research Data to Humans 95
- Nastasya S. Ogneva, Maxim S. Nesterov, Daniil V. Khvostov, Nataliia V. Stankova, Vladislav N. Karkischenko**
Comparative Pharmacokinetics Study of the Leutragin Peptide Drug in Svetlogorsk Minipig Blood Serum after Single Administration 110

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ТРАНСГЕННОСТИ И ГУМАНИЗИРОВАННОСТИ У МЫШЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В НЦБМТ ФМБА РОССИИ, МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПО СЭНГЕРУ

Н.Н. Каркищенко¹, Н.В. Петрова^{1,*}, В.В. Слободенюк¹, Е.М. Колоскова²,
Н.А. Ларюшина¹, И.А. Васильева¹, Д.В. Петров¹, Л.А. Болотских¹, М.А. Савина¹

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных —
филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

В ФГБУН НЦБМТ ФМБА России были созданы несколько гуманизированных трансгенных линий мышей-биомоделей, содержащих интегрированный варибельный человеческий ген главного комплекса гистосовместимости (МНС): линия *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*. Животные получены методом микроинъекций линейного фрагмента генно-инженерной конструкции (ГИК) в мужской пронуклеус зигот с последующим переносом потенциально модифицированных эмбрионов в репродуктивный тракт псевдобеременным самкам-реципиентам. Созданная ГИК кодирует химерную молекулу МНС класса I на поверхности клеток, состоящую из $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов *HLA* человека и $\alpha 3$ -домена комплекса Н-2К мыши, стабилизированную $\beta 2$ -микроглобулином человека, соединённым глицин-сериновым линкером с $\alpha 1$ -доменом *HLA* [1–5]. Данные биомодели могут успешно применяться для решения широкого спектра задач, включая исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.

В данной статье представлены теоретические данные о генетическом полиморфизме исследуемого гена в человеческом геноме, а также практические данные о созданных нами трансгенных линиях мышей-биомоделей и результаты сравнения аллель-специфичного участка у полученных линий животных. Анализ проводился методом секвенирования по Сэнгеру на матрице кДНК.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, трансгеноз, *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, гуманизированные трансгенные мыши, кДНК, РНК, обратная транскрипция, секвенирование

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*рХ* человека и нокаут комплекса Н-2К мыши» (шифр: «Транскокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Колоскова Е.М., Ларюшина Н.А., Васильева И.А., Петров Д.В., Болотских Л.А., Савина М.А. Доказательства трансгенности и гуманизованности у мышей, полученных в НЦБМТ ФМБА России, методом секвенирования по Сэнгеру. *Биомедицина*. 2024;20(2):8–20. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-8-20>

Поступила 19.02.2024

Принята после доработки 15.05.2024

Опубликована 10.06.2024

EVIDENCE OF TRANGENCY AND HUMANIZATION IN MICE OBTAINED AT THE SCBMT OF FMBA OF RUSSIA BY SANGER SEQUENCING METHOD

Nikolay N. Karkischenko¹, Nataliya V. Petrova^{1,*}, Vladimir V. Slobodenyuk¹,
Elena M. Koloskova², Nadezhda A. Laryushina¹, Irina A. Vasil'eva¹,
Dmitriy V. Petrov¹, Lyubov' A. Bolotskih¹, Maria A. Savina¹

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

²All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute
of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

Several humanized transgenic lines of biomodel mice containing an integrated variable human gene of the main histocompatibility complex (MHC) have been created at the Federal State Budgetary Scientific and Scientific Research Institute of the FMBA of Russia. These include *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* and *HLA-C*07:02*. The lines were created by microinjection of a linear fragment of a genetically engineered structure (GES) into the male pronucleus of zygotes, followed by the transfer of potentially modified embryos into the reproductive tract to pseudo-pregnant female recipients. The created GES encodes a chimeric molecule of the MHC of class I on the cell surface, consisting of the $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -domains of human *HLA*, and the $\alpha 3$ -domain of the mouse H-2K complex, stabilized by human $\beta 2$ -microglobulin connected by a glycine serine linker with the $\alpha 1$ -domain of *HLA* [1–5]. The created biomodels can be successfully used to solve a wide range of research tasks, including studies of immune reactions, infectious, autoimmune and oncological diseases, as well as the development and testing of vaccines in the field of pharmacosafety and immunogenicity. This article presents theoretical information on the genetic polymorphism of the studied gene in the human genome, as well as experimental data on the transgenic lines of biomodels created by the authors and the results of comparing the allele-specific site in the obtained animal lines. The analysis was performed by Sanger sequencing on a cDNA matrix.

Keywords: real-time PCR, transgenesis, *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, humanized transgenic mice, cDNA, RNA, reverse transcription, sequencing

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research topic “Generation of a new line of humanized transgenic mice carrying the human *HLA-A*02:01* gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknockout-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko N.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Koloskova E.M., Laryushina N.A., Vasil'eva I.A., Petrov D.V., Bolotskih L.A., Savina M.A. Evidence of Transgency and Humanization in Mice Obtained at the SCBMT of FMBA of Russia by Sanger Sequencing Method. *Journal Biomed.* 2024;20(2):8–20. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-8-20>

Submitted 19.02.2024

Revised 15.05.2024

Published 10.06.2024

Введение

Структура, вариабельность и встречаемость полиморфного гена HLA

Главный комплекс гистосовместимости (МНС) в генотипе кодируется большой группой структурно и функционально отличных генов, подразделяющихся на три класса, два из которых, класс I и класс II, относятся к генам *HLA*, экспрессирующим белки клеточной мембраны, играющие основную роль в инициации гуморального иммунного ответа, особенно в «распознавании» антигена лимфоцитами, которые, в свою очередь, не реагируют на антиген, если он не образует комплекс с молекулой *HLA* на поверхности, содержащей антиген клетки. Гены *HLA* классов I и II — наиболее полиморфные в геноме человека, наибольшим полиморфизмом обладают *HLA* классов I (*HLA-A* — более 450 аллельных вариантов, *HLA-B* — более 780 и *HLA-C* — более 230). Гены класса I (*HLA-A*, *-B* и *-C*) кодируют поверхностные белки цитоплазматической мембраны всех ядерных клеток.

Белки *HLA* класса I состоят из двух полипептидных субъединиц (рис. 1): варибельной тяжелой цепи, кодируемой в пределах локусов МНС (хромосома 6 у человека, хромосома 17 у мыши), и неполиморфного полипептида, β_2 -микроглобулина, кодируемого геном, расположенным на хромосоме 15 человека (на хромосоме 2 у мыши).

Производные от внутриклеточных белков — пептиды образуются путем протеолитического расщепления большими многофункциональными протеолитическими ферментами; затем пептиды перемещаются на поверхность клетки и прикрепляются к молекулам класса I, формируя пептидный антиген для цитотоксических Т-клеток. Молекулы класса II представляют пептиды, производные от внеклеточных белков, которые захватываются лизосомами и перерабатываются в пептиды, узнаваемые Т-клетками. Классические антигены «трансплантации» I класса (*H-2K*, *H-2D*, и *H-2L* у мышей; *HLA-A*, *-B*, и *-C* — у человека) экспрессируются на поверхности

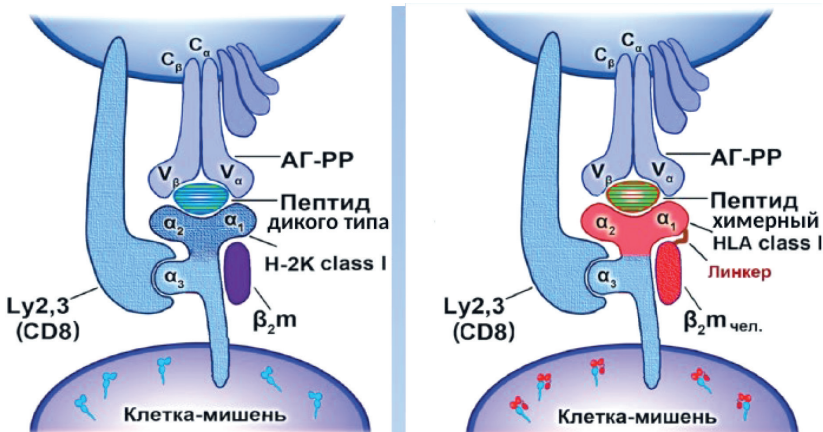


Рис. 1. Общая схема рецепторики HLA-комплексов полученных нами трансгенных мышей. Распознавание антигенных пептидов рецепторами CTL у мышей дикого типа (1) и у трансгенных мышей (2). Отличительной особенностью является создание химерного белка (2), содержащего гибридную тяжелую цепь МНС класса I, соединенную глицин-сериновым линкером (GS) с β_2 -микроглобулином человека.

Fig. 1. General scheme of the receptors of HLA complexes obtained by the authors in transgenic mice. Recognition of antigenic peptides by CTL receptors in wild-type (1) and transgenic mice (2). A distinctive feature is the creation of a chimeric protein (2) containing a hybrid heavy chain of MHC class I connected by a glycine-serine linker (GS) with human β_2 -microglobulin.

всех ядерных клеток как гетеродимеры — полиморфный гликопротеин, нековалентно связанный с $\beta 2$ -микроглобулином, кодируемым геном, находящимся на другой хромосоме. Молекулы МНС презентруют экзогенные антигенные пептиды (включая вирусные пептиды при их наличии) CD⁸⁺ цитотоксичным Т-лимфоцитам (CTL) и являются их главной целью для клеточного лизиса при отторжении аллогенных или ксеногенных трансплантатов тканей.

Существует три основных типа *HLA* класса I: *HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*. Каждый тип присутствует в двух аллельных вариантах, унаследованных от родителей. Существуют десятки вариантов каждого аллеля *HLA-I*; каждый аллель обладает индивидуальной способностью распознавать определенные чужеродные белки. Распределение аллелей зависит от популяции/страны. Индивидуальные комбинации *HLA* класса I существенно влияют на тяжесть множества инфекционных заболеваний, включая малярию [10], туберкулез [12], ВИЧ [9], вирусный гепатит и иммунотерапию рака [14].

Несмотря на высокий полиморфизм генов *HLA*, ряд *HLA*-аллелей стабилен для целых популяций и сохраняется в ряду поколений. Оценка частот встречаемости *HLA* гаплотипов необходима для изучения предрасположенности к заболеваниям среди населения, оценки вероятности обнаружения подходящего донора, может использоваться для различных популяционных исследований.

В настоящее время AFND (открытая сетевая база данных частот встречаемости аллелей (Allele Frequency Net Database — AFND, www.allelefrequencies.net)) содержит данные более 1600 популяций, полученных от более чем 10 млн человек [8]. Первая система классификации, которая ввела понятия common (C) — распространенные аллели и well-documented (WD) — хорошо документированные аллели, объединяемые в CWD-аллели (распространенные и хорошо документированные), была представлена

Американским обществом гистосовместимости и иммуногенетики (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics — ASHI). CWD-аллели — редкие. Согласно номенклатуре *HLA*-генов, группу аллелей, кодирующих одинаковую аминокислотную последовательность всей молекулы *HLA*, выявляет типирование на уровне 2-го поля, например *HLA-A*01:01* [16]. *HLA*-типирование на уровне 3-го поля определяет группу аллелей, кодирующих одинаковую нуклеотидную последовательность всех экзонов гена *HLA*. *HLA-A*02:01:02* отличается от *A*02:01:01* синонимичной, не приводящей к замене синтезируемого белка, нуклеотидной заменой.

Только *HLA*-типирование на уровне 4-го поля позволяет определить конкретный аллель *HLA*-гена с нуклеотидными заменами в кодирующих и не кодирующих регионах гена *HLA* [16].

Именно данными аллелями и вариабельны разработанные нами линии трансгенных мышей.

Впервые проведенное на уровне 4-го поля *HLA*-типирование у русских доноров нижегородцев позволило выявить как схожесть, так и некоторые отличия в частотах *HLA*-аллелей по сравнению с американцами европейского происхождения, которые нельзя выявить при рутинном типировании на уровне высокого разрешения. Например, в обеих популяциях *HLA-C*05:01:01:02* встречается чаще, чем *HLA-C*05:01:01:01*, а *HLA-C*07:02:01:03* — чаще, чем *HLA-C*07:02:01:01* [6].

В базе AFND в настоящее время увеличивается объем данных о взаимосвязи различных форм гена *HLA* и побочных реакций на действие лекарственных препаратов, демонстрирующих разный риск развития иммуноопосредованных побочных реакций на определенные лекарственные препараты, что имеет огромное значение для фармакогенетических исследований и клинической практики.

Генно-инженерные конструкции, строение и обоснования выбора компонентов

Общая схема генно-инженерной конструкции, разработанной в нашем Центре и встраиваемой в геном мышей-биомоделей, одинакова для всех линий на всех участках, кроме одного аллель-специфического HLA-участка, имеющего нативный полиморфизм в природе (рис. 2) [2, 4].

Созданные генные конструкции содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие:

- СВН-промотор;
- структурную часть: κДНК гена β2-микροглобулина человека, соединенную глицин-сериновым линкером с α1-доменом молекулы HLA, α1- и α2-домены молекулы HLA класса I и α3-домен молекулы H2K;
- посттрансляционный регуляторный элемент WPRE;
- сигнал полиаденилирования ТК РА.

Мыши всех полученных линий имеют в своем геноме ДНК последовательность, кодирующую химерный белок. Конструкции отличаются друг от друга только HLA-последовательностью (540 п.н.).

Нашей **задачей** являлось сравнение аллель-специфических участков HLA человека в геномной ДНК тканей мышей полученных гуманизированных линий, определение

правильной нуклеотидной последовательности ГИК СВН-b2m-(A-02:01, B-07:02, C-07:02)-h2k у животных-биомоделей.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Для проведения исследования использовались самцы новых гуманизированных трансгенных линий мышей с интегрированным рекомбинантным геном СВН-b2m-(A*02:01, B*07:02, C*07:02)-h2k поколений F0–F3, полученные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в системе индивидуальных вентилируемых клеток при световом режиме 12/12 со свободным доступом к корму и воде. Для получения F1 трансгенные особи F0 скрещивались с половозрелыми гибридными животными CBA/lac × C57Bl/6 (F1), а для получения F2 и следующих поколений племенные ядра формировали из трансгенных особей предыдущего поколения по технологии инбредного скрещивания, подтверждённых методом ПЦР.

Биоматериал для генетического анализа

Для определения нуклеотидной последовательности HLA-фрагментов трансгена и степени химеризма использовали лейкоциты цельной крови, а также биоптаты внутренних органов 4-месячных животных трансгенных линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 — селезенки и печени.

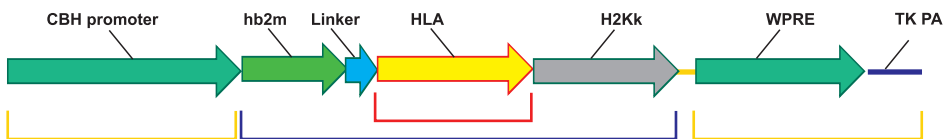


Рис. 2. Принципиальная схема генных конструкций для микроинъекций. В желтых рамках — регуляторные области рекомбинантного гена, в синей рамке — кодирующая химерный белок последовательность, в красной рамке — вариабельная часть генно-инженерной конструкции: высокополиморфный фрагмент κДНК HLA класса I, кодирующий антигенпрезентирующие домены α1 и α2.

Fig. 2. Schematic diagram of HLA gene constructs for microinjections. The yellow frame shows the regulatory regions of the recombinant gene; the blue frame shows the sequence encoding the chimeric protein; and the red frame shows the variable part of the genetically engineered structure: a highly polymorphic fragment of HLA class I cDNA encoding the antigen-presenting domains α1 and α2.

Выделение РНК

Получение препаратов РНК проводили с использованием набора реагентов РИБО сорб («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовые растворы РНК хранили при температуре не выше -16°C не более 1 мес.

Выделение лимфоцитов

Проводили с использованием набора фиколл-урографин (плотностью 1,077 г/мл) по инструкции производителя («ДНК-Технология», Россия).

Обратная транскрипция

Получение кДНК для последующего анализа методом ПЦР проводили с использованием комплекта реагентов РЕВЕРТА-Л («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовый препарат кДНК хранился при температуре не выше -16°C в течение 1 недели или при температуре не выше -68°C в течение года.

Подбор праймеров

Для подбора праймеров было использовано программное обеспечение Vector NTI («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез праймеров осуществлялся ООО «ДНК синтез» (Россия).

Классическая ПЦР

Реакцию проводили с использованием общих для ГИК праймеров (ООО «ДНК-синтез», Россия) на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Продукт ПЦР использовали в реакции секвенирования по Сэнгеру.

С использованием аллель-специфичных праймеров проводили ПЦР для идентификации принадлежности трансгенных мышей соответствующей трансгенной линии.

Секвенирование по Сэнгеру

Процедуру проводили с использованием прямых и обратных праймеров на секвенаторе Genetic Analyser 3500 («Applied Biosystems», США). Обработку полученных результатов, сравнение и выравнивание последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Vector

NTI («Thermo Fisher Scientific», США) и онлайн-модуля BLAST Align (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

Дизайн системы для ПЦР-детекции структурных фрагментов генной конструкции СВН-b2m-(A*02:01, B*07:02, C*07:02)-h2k у трансгенных мышей методом определения размеров амплификатов

С помощью ПЦР в реальном времени быстро и качественно определяется наличие трансгена в тканях и органах, однако данный метод позволяет получить достаточно короткие ампликоны (как правило, около 200 п.н.) и не позволяет определять достаточно протяжённые участки генома. Для определения точной первичной последовательности ГИК в геноме мышей была разработана методика получения ампликонов, кодирующих основные функциональные части трансгена, с применением метода классической ПЦР. В табл. 1 представлены праймеры, используемые для классической ПЦР, а на рис. 5 — схема основных функциональных частей ГИК.

Полученные таким образом ампликоны могут быть использованы в дальнейшем как для верификации наличия трансгена методами электрофоретического фракционирования ДНК и определения размера ампликонов, так и служат материалом для определения точной нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и их обсуждение

Подтверждение соответствия трансгена HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 заявленной ГИК методом секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование является одним из ключевых методов в арсенале молекулярной биологии, который позволяет точно установить первичную последовательность нуклеотидов в цепочке ДНК. Полученные при этом первичные данные с помощью специальных программ и анализа методами

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-детекции структурных фрагментов генной конструкции СВН-b2m-(A*02:01, B*07:02, C*07:02)-h2k*

Table 1. Primers for PCR detection of structural fragments of a SVN-b2m-(A*02:01, B*07:02, C*07:02)-h2k* gene design

№	Праймер	Последовательность 5'-3'	Соответствие ГИК	Размер, п.н.
1	hb2mF1	TCCAGCGTACTCCAAGATTCAAGT	b2m	572
	A02-R1	GTCAACTCTGTGGGTCTGACTGTGAGCT	HLA-A*02:01**	
	B07-R1	TTCTCTCGGTAAGTCTGTGTGTTGGTC	HLAB*07:02**	571
	C07-R1	AGACACTCTGTGGCTTGAGCTTGTCTC	HLAC*07:02**	572
2	b2mF	TGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACT	b2m	780
	m4ExR	AGCTCCTCCCCATCAACTGCCA	H2Kk	

Примечание: * — см. схему детекции, рис. 2; ** — праймеры, высокоспецифичные для HLA-аллеля соответствующей линии гуманизированных животных.

Note: * — see the detection scheme, Fig. 2; ** — primers highly specific for the HLA allele of the corresponding line of humanized animals.

биоинформатики могут быть использованы для картирования ДНК, поиска последовательностей и других целей. В нашем случае использование данного метода позволяет подтвердить правильность нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, её соответствие заявленной ГИК и соответствующему гену человека. При сравнении нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигенпрезентирующие домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, нами были подобраны обратные праймеры, соответствующие высокополиморфным фрагментам (рис. 3).

В качестве матрицы для секвенирования использовали кДНК, полученную из выделенного препарата мРНК образцов ткани

внутренних органов и лимфоцитов крови мышей, несущих гены *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*. Выбор кДНК обоснован тем, что данной процедурой мы подтверждаем не просто наличие гена в геноме животного, но и активную ГИК в клетках, т.е. транскрипционную активность трансгена, что может косвенно свидетельствовать о функциональной активности конечного продукта — гибридной молекулы МНС класса I на поверхности клеток.

Применение пар праймеров hb2mF1/A02-R1 (B07-R1, C07-R1) (табл. 1), где прямой праймер является общим для всех генных конструкций, а обратный — аллель-специфичным (рис. 2), позволяет однозначно определить принадлежность трансгенного животного одной из трех полученных

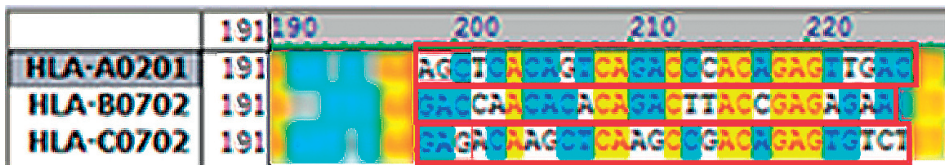


Рис. 3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагментов *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, входящих в состав генно-инженерных конструкций. Скриншот окна Vector NTI. В рамках — высокополиморфные последовательности, которым соответствуют аллель-специфичные обратные праймеры.

Fig. 3. Alignment of nucleotide sequences of *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02* fragments, which are part of genetically engineered structures. Screenshot of the Vector NTI window. Within the frames – highly polymorphic sequences, which correspond to allele-specific reverse primers.

линий классическим ПЦР и электрофорезом в агарозном геле.

С использованием пары праймеров b2mF/mEx4R получали ПЦР-ампликон размером 780 п.н., в состав которого входили 3'-фрагмент последовательности β 2-микροглобулина человека, последовательность линкера, *HLA*-фрагмент полностью (540 п.н.) и фрагмент H2 мыши (4-й экзон). Секвенирование выбранного участка позволяет нам определить не только нуклеотидную последовательность *HLA*-фрагмента, но и фланкирующие ее элементы генной конструкции.

Сравнение нуклеотидных последовательностей трансгена фрагментов *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07*, *HLA-C*07* из разных органов проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно заявленной нуклеотидной последовательности ГИК. Секвенирование проводили с использованием как прямого (b2mF), так и обратного (mEx4R) праймеров, что позволило более точно сопоставить и прочесть полученные нуклеотидные последовательности.

На рисунках представлены примеры сиквенсов с прямым праймером нуклеотидных последовательностей ПЦР-ампликонов трансгенов *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02* геномной ДНК, полученной из образцов иммунокомпетентных органов и тканей — лимфоцитов крови (рис. 4, 6),

печени и селезёнки. Сравнение проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно нуклеотидных последовательностей генных конструкций, соответствующих линиям трансгенных животных. В работе использовали программу Vector NTI, приложение Align.

В геномной кДНК исследуемых тканей трансгенных мышей гуманизированных линий подтверждено наличие фрагментов, соответствующих основным компонентам генной конструкции: *структурная часть гена β 2-микροглобулина человека, соединенная глицин-сериновым линкером с α 1- и α 2-доменами молекулы *HLA* соответствующего аллеля. Проведено сравнение полученных сиквенсов.*

1. Мыши трансгенной гуманизированной линии *HLA-A*02:01*. Результаты проверки представлены на рис. 4.

Сравнение полученной последовательности *HLA*-фрагмента (на рис. 4 выделено желтым) с последовательностью фрагмента *HLA-A*02:01* генетической конструкции СВН-b2m-A0201 -h2k в онлайн-приложении BLAST показало 100% совпадение (рис. 5).

Результат: амплифицированный и протетный в прямом и обратном направлениях фрагмент кДНК содержит полную последовательность *HLA-A*02:01* генной конструкции, фланкированную соответственно

```
GTGGGATCGAGACATGACCGGTGGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAGGCTCTGGTGGTGGAGGATCTCACAGCATGAGGTACTTCTTCACCAGCGTGTCCAGACSTGGCAGAGGTTGAACCCAGGTTCAATTCGCCGTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTCCGCTTCGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAGGAAGGTCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCCAGGAAAGGTGAAAGCTCACAGTFCAGACCCACAGAGTTGACCTTGGAAACACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCACACAGTGCAGAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCCSTGAGAGGCTACCATCAGTATGCSTACGATGGCAAGGACTACATTGCTSTGAAGGAGGACTTGAGAAGCTGGACAGCAGCTGACATGGCAGCACAGACCCCAAGCACAAGTGGGAAGCTGCTCATGTGCTGAGCAACTGAGAGCCTATCTGGAAGGCACSTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTATCTGGAGAATGGCAAGGAGACCTTGCAGAGAACCAGTATCCCAAGGCTCATGTGACCCGTCACAGCAG
```

Рис. 4. Фрагмент нуклеотидной последовательности секвенированного ампликона геномной ДНК мыши линии *HLA-A*02:01*, выделенной из лейкоцитов. Ампликон получен с использованием пары праймеров b2mF/mEx4R (табл. 1). Красным шрифтом выделен сайт для связывания аллельспецифичного праймера A02-R1.

Примечание: Hb2mg-Linker-A*02:01-H2, заливка блоков соответствует фрагменту генной конструкции.

Fig. 4. Fragment of the nucleotide sequence of the sequenced amplicon of the mouse genomic DNA of the *HLA-A*02:01* line isolated from leukocytes. The amplicon was obtained using a pair of b2mF/mEx4R primers (Table 1). The site for binding the allele-specific primer A02-R1 is highlighted in red font.

Note: Hb2mg-Linker-A*02:01-H2, the color of the blocks corresponds to the fragment of the gene construction.

<u>Query</u> 1	CACAGCATGAGGTTACTTCTTCCACCAGCGTGTCCAGACCTGGCAGAGGTGAACCCAGGTTC	60
<u>Sbjct</u> 1		60
<u>Query</u> 61	ATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCGCTTCGACAGCGATGCTGCAAGT	120
<u>Sbjct</u> 61		120
<u>Query</u> 121	CAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAGGAAGGTCTGAGTACTGGGATGGA	180
<u>Sbjct</u> 121		180
<u>Query</u> 181	GAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCCACAGAGTTGACCTTGGAACTACTGAGA	240
<u>Sbjct</u> 181		240
<u>Query</u> 241	GGTACTACAACCAAGTCTGAGGCAGGCAGCCACACAGTGCAGAGGATGTATGGTGTGAT	300
<u>Sbjct</u> 241		300
<u>Query</u> 301	GTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTGAGAGGCTACCATCAGTATGCCTACGATGGCAAGGAC	360
<u>Sbjct</u> 301		360
<u>Query</u> 361	TACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGCTGGACAGCAGCTGACATGGCAGCAGACACC	420
<u>Sbjct</u> 361		420
<u>Query</u> 421	ACCAAGCACAAAGTGGGAAGCTGCTCATGTTGCTGAGCAACTGAGAGCCTATCTGGAAGGC	480
<u>Sbjct</u> 421		480
<u>Query</u> 481	ACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTATCTGGAGAAATGGCAAGGAGACCTTGCAGAGAACC	540
<u>Sbjct</u> 481		540

Рис. 5. Выравнивание полученной при секвенировании нуклеотидной последовательности (Query) с последовательностью фрагмента HLA-A*02:01 генетической конструкции (Sbjct). Онлайн-приложение BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Fig. 5. Alignment of the nucleotide sequence (Query) obtained during sequencing with the sequence of the HLA-A*02:01 fragment of the genetic construct (Sbjct). The online BLAST app (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

конструкции. 100% совпадение с фрагментом интегрированного трансгена. Аналогичный результат получен при секвенировании ДНК, выделенной из селезенки и печени.

2. Мыши трансгенной гуманизированной линии HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02.

На рис. 6 представлены примеры сиквенса с прямым праймером нуклеотидной последовательности трансгена HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, полученной из образцов иммунокомпетентных органов и тканей — лимфоцитов крови, печени и селезенки. Сравнение проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно нуклеотидных последовательностей генных конструкций, соответствующих

линиям трансгенных животных. В работе использовали программу Vector NTI, приложение Align.

В геномной ДНК исследуемых тканей трансгенных мышей гуманизированных линий подтверждено наличие фрагментов, соответствующих основным компонентам генной конструкции: **структурная часть гена $\beta 2$ -микрोगлобулина человека, соединенная глицин-сериновым линкером с $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -доменами молекулы HLA соответствующего аллеля. Проведено сравнение полученных сиквенсов.**

Результат: амплифицированный и прочтенный в прямом и обратном направлениях фрагмент кДНК содержит полные после-

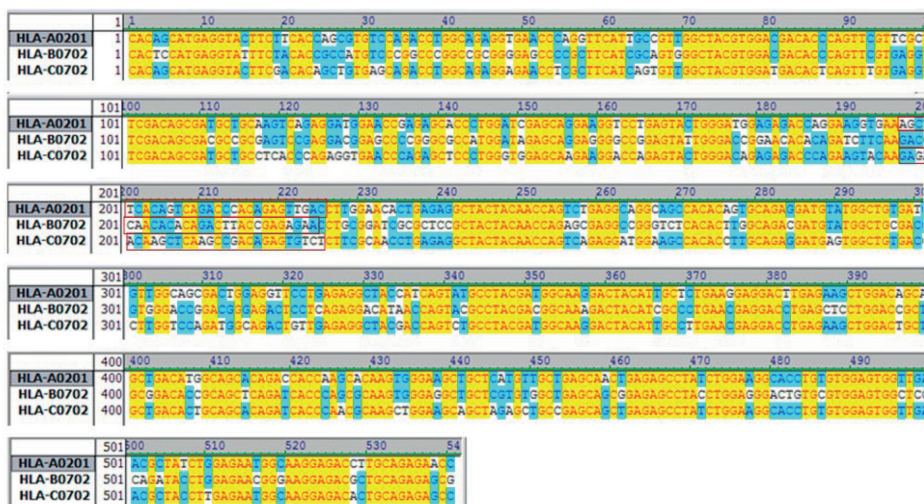


Рис. 6. Вываривание нуклеотидных последовательностей фрагментов HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, входящих в состав генно-инженерных конструкций. Скриншоты окна Vector NTI. В рамках – высокополиморфные последовательности, которым соответствуют аллель-специфичные обратные праймеры, прочие аллель-специфичные фрагменты для HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 – размыты.

Fig. 6. Alignment of nucleotide sequences of fragments of HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, which are part of genetically engineered structures. Screenshots of the Vector NTI window. Within the framework are highly polymorphic sequences, which correspond to allele-specific reverse primers, other allele-specific fragments for HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 are blurred.

довательности HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02, генных конструкций, фланкированных соответственно конструкциям. 100% совпадение с фрагментами интегрированных трансгенов. Аналогичный результат получен при секвенировании ДНК, выделенной из селезенки и печени.

Таким образом, полученные животные несут полный и транскрипционно активный трансген, целиком соответствующий заявленной генно-инженерной конструкции, и кодирующие $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -домены соответствующих аллелей гена HLA человека. Сравнение нуклеотидных последовательностей из разных органов расхождений в первичной структуре трансгена не выявлено.

Заключение

При создании новых линий трансгенных животных необходимо знать, каким образом будет осуществляться детекция трансгена в геноме организма и контроль качества новой линии. При использовании

генно-инженерных конструкций с механизмом случайного встраивания трансгена его интеграция в состав ДНК осуществляется, как правило, в транскрипционно активные участки генома, что может внести изменения в функциональную активность данного региона [11] вплоть до нарушения работы собственных генов организма [13] или активации онкогенов [7]. ДНК региона встраивания также может негативно влиять на работу трансгена, приводя к неконтролируемой экспрессии трансгена или, наоборот, его «замалчиванию» [15]. Постоянный генетический анализ поголовья животных необходим не только для контроля наличия гена интереса, но и для качественного отбора для размножения особей, которые максимально соответствуют задачам исследования. В качестве критериев могут выступать: плодовитость и репродуктивный потенциал, сила экспрессии трансгена, отсутствие физиологических и поведенческих побочных эффектов, наличие мутаций

и генетических перестроек. Контроль генетической чистоты и отбор наиболее перспективных особей и сублиний для размножения лежат в основе эффективной селекционно-генетической работы с новыми линиями мышей HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02.

При выведении мышей новых трансгенных линий, кроме верификации животных по целевым участкам ГИК (наличие β 2-микроглобулина человека и аллель-специфического участка HLA), мы проводим контроль на наличие других функционально значимых фрагментов:

- СВН-промотор;
- посттрансляционный регуляторный элемент WPRE;
- сигнал полиаденилирования ТК РА;
- Н2К.

Нами разработаны методики верификации трансгена у животных новых гуманизированных трансгенных линий мышей-биомоделей HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 методом ПЦР в реальном времени с применением флуоресцентных зондов. Это позволяет быстро и качественно идентифицировать трансгенных животных, а полученные результаты косвенно указывают на перспективность размножения животных отдельных сублиний на основании оценки уровня экспрессии целевого трансгена. Выбор метода обоснован

его точностью, наглядностью получаемых результатов и высокой специфичностью используемых праймеров и зондов при детекции модификаций генома.

Метод позволяет за достаточно короткий срок провести скрининг большого количества животных для их использования в селекционно-генетической работе или иных исследовательских целях.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что выполненная нами работа позволила получить доказательства наличия **структурной части гена β 2-микроглобулина человека, соединенной глицин-сериновым линкером с α 1-доменом молекулы HLA** соответствующего аллеля, на уровне мРНК молекулярно-генетическим методом секвенирования по Сэнгеру.

Центральная догма молекулярной биологии, сформулированная Ф. Криком в 1958 году, а именно передача генетической информации происходит последовательно от ДНК к РНК, затем к белку, — является универсальным процессом для всех без исключения клеточных организмов и лежит в основе биосинтеза макромолекул, что мы показали в этой работе и продолжили доказательства наличия трансгенного белка у мышей-биомоделей иммунологическими методами, которые будут представлены в следующей статье данного выпуска журнала «Биомедицина».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Sozdanie polnih gibritnih DNK konstrukcij s genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Chimeric Construct Engineering with Human Variant *HLA-A*02:01:01:01*]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(1):10–23. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-C*07:02:01:01*, как прообраз инновационных трансгенно-нокаутных биомоделей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with *HLA-C*07:02:01:01*, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout

- Biomodels. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-20-1-8-20.
- Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological research (successes, failures and prospects)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
 - Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):70–75. [Petrova N.V., Skripkina M.M. Osobennosti organizatsii sodержaniya i vyvedeniya transgennykh linij myshey v NCBMT FMBA Rossii [Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):70–75. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-70-75.
 - Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novoy gumanizirovannoy transgennoj linii myshey s integrirovannym genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Embryological aspects of creation a new humanized transgenic mice with integrated human *HLA-A*02:01:01:01* gene]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)].
 - Хамаганова Е.Г., Леонов Е.А., Абдрахимова А.Р., Хижинский С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA генетическое разнообразие русской популяции, выявленное методом секвенирования следующего поколения. *Медицинская иммунология*. 2021;23(3):509–522. [Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA genetical
 - eskoe raznoobrazie russkoj populyatsii, vyyavlennoe metodom sekvenirovaniya sleduyushchego pokoleniya [HLA genetic diversity of the Russian population revealed by next-generation sequencing]. *Medical Immunology*. 2021;23(3):509–522. DOI: 10.15789/1563-0625-HDI-2182.
 - Giraldo P., Rival-Gervier S., Houdebine L.M., Montoliu L. The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Res*. 2003;12:751–755.
 - Gonzalez-Galarza F.F., McCabe A., et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D783–D788. DOI: 10.1093/nar/gkz1029.
 - Goulder P.J.R., Walker B.D. HIV and HLA Class I: an evolving relationship. *Immunity*. 2012;37(3):426–440. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.005.
 - Lima-Junior J. da C., Pratt-Riccio L.R. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on Plasmodium vivax Infection. *Front Immunol*. 2016;7:13. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00013.
 - Ma L., Wang Y., Wang H., Hu Y., Chen J., Tan T., Hu M., Liu X., Zhang R., Xing Y., Zhao Y., Hu X., Li N. Screen and Verification for Transgene Integration Sites in Pigs. *Sci. Rep*. 2018;8(1):7433.
 - Mazzaccaro R.J., Gedde M., Jensen E.R., van Santen H.M., Ploegh H.L., Rock K.L., Bloom B.R. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996;93(21):11786–11791. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11786.
 - Schroder A.R.W., et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110:521–529.
 - Wang C., Xiong C., Hsu Y.-C., Wang X., Chen L. Human leukocyte antigen (HLA) and cancer immunotherapy: HLA-dependent and -independent adoptive immunotherapies. *Annals of Blood*. 2020;5:14. DOI: 10.21037/aob-20-27.
 - Yang D.S., et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum. Mol. Genet*. 2010;19:3983–3994.
 - <https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., acad. РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Петрова Наталья Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

Nataliya V. Petrova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Vladimir V. Slobodenyuk, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: kichi09@mail.ru

Nadezhda A. Laryushina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: kichi09@mail.ru

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: rozhstul@mail.ru

Irina A. Vasil'eva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: rozhstul@mail.ru

Петров Дмитрий Валерьевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: 1941-65@mail.ru

Dmitriy V. Petrov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: 1941-65@mail.ru

Болотских Любовь Александровна, к.с.-х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Lyubov' A. Bolotskih, Cand. Sci. (Agricult.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Савина Мария Анатольевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: graff22@mail.ru

Maria A. Savina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: graff22@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ПОЛУЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ β 2-МИКРОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА И β 2-МИКРОГЛОБУЛИНА МЫШИ ДЛЯ ЕГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В ХИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛАХ HLA I КЛАССА

В.Н. Каркищенко¹, В.А. Езерский^{2,*}, Е.М. Колоскова², М.С. Нестеров¹

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

Трансгенные гуманизированные животные всё более востребованы для биомедицинских исследований, фармакологических испытаний. Создается всё больше линий трансгенных животных, в т.ч. и с нокаутом собственных генов. Остро необходима доказательная база интеграции трансгена, его экспрессии, определение состояния нокаута собственного гена на молекулярно-генетическом уровне, детекция трансляции целевого белка в разных органах и тканях, доказательство отсутствия синтеза белка (или его нефункциональность), ген которого был модифицирован. Для этого требуются высокоспецифичные реагенты — в частности, белки и антитела к ним, в подавляющем большинстве своём представленные иностранными производителями. Была поставлена задача идентификации β 2-микроглобулина мыши и человека в белковых фракциях органов и тканей трансгенных и нокаутных мышей нескольких HLA-линий, созданных в последние годы в НЦБМТ ФМБА России. На первом этапе наших исследований были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных β 2-микроглобулина мыши m β 2mg и β 2-микроглобулина h β 2mg человека. Нуклеотидные последовательности генов были адаптированы для синтеза в бактериальной системе, рекомбинантные белки, m β 2mg и h β 2mg очищены и наработаны в количествах, необходимых для получения аффинных сорбентов и иммунизации животных.

Ключевые слова: штамм-продуцент, рекомбинантный белок, β 2-микроглобулин мыши и β 2-микроглобулин человека

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*рХ человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Нестеров М.С. Получение дифференцированных рекомбинантных белков β 2-микроглобулина человека и β 2-микроглобулина мыши для его детектирования в химерных молекулах HLA I класса. *Биомедицина*. 2024;20(2):21–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-21-31>

Поступила 19.03.2024

Принята после доработки 29.04.2024

Опубликована 10.06.2024

PREPARATION OF DIFFERENTIATED RECOMBINANT HUMAN β 2-MICROGLOBULIN AND MOUSE β 2-MICROGLOBULIN PROTEINS FOR ITS DETECTION IN CLASS I HLA CHIMERIC MOLECULES

Nikolay N. Karkischenko¹, Vadim A. Ezerskiy^{2,*}, Elena M. Koloskova², Maxim S. Nesterov¹

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

²All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute
of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village

Transgenic humanized animals are increasingly in demand for biomedical research and pharmacological testing. More and more lines of transgenic animals are being created, including those with knockout of their own genes. There is an urgent need for an evidence base for the integration of a transgene, its expression, determination of the knockout state of its own gene at the molecular genetic level, detection of translation of the target protein in different organs and tissues, proof for the absence of protein synthesis (or its non-functionality), the gene of which has been modified. This requires highly specific reagents, proteins and antibodies to them in particular, the vast majority of which are presented by foreign manufacturers. The task was set to identify mouse and human β 2-microglobulin in protein fractions of organs and tissues of transgenic and knockout mice of several HLA lines created in recent years at the Scientific Center of Biomedical Technologies, Russia. At the first stage of our research, recombinant *E. coli* producing strains were obtained.

Keywords: producer strain, recombinant protein, mouse β 2-microglobulin and human β 2-microglobulin

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research topic “Generation of a new line of humanized transgenic mice carrying the human HLA-A* ρ X gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknockout-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko V.N., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Nesterov M.S. Preparation of Differentiated Recombinant Human β 2-Microglobulin and Mouse β 2-Microglobulin Proteins for its Detection in Class I HLA Chimeric Molecules. *Journal Biomed.* 2024;20(2):21–31. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-21-31>

Submitted 19.03.2024

Revised 29.04.2024

Published 10.06.2024

Введение

Получение трансгенных (ТГ) гуманизированных животных с интегрированными генами человека, экспрессирующими человеческие белки, стало неотъемлемой частью биомедицинских исследований, фармакологических испытаний во всем мире [4–6, 13]. Это направление научных исследований в последние годы активно развива-

ется и в России: создается всё больше линий трансгенных животных, в т.ч. и с нокаутом собственных генов [7, 8, 11]. В связи с этим становится остро необходимой доказательная база не только интеграции трансгена, его экспрессии, определение состояния нокаута собственного гена на молекулярно-генетическом уровне, но и детекция трансляции целевого белка в разных органах

и тканях, доказательство отсутствия синтеза белка (или его нефункциональность), ген которого был модифицирован.

В последние годы в НЦБМТ ФМБА России были созданы несколько линий трансгенных мышей с геном *HLA* I класса в той или иной форме: «нативной», «гибридной» (согласно определению, принятым в классической работе Боренштейна [10]), «химерной» [3, 8]. Первые линии наших трансгенных HLA-мышей были получены с использованием простых генетических конструкций: «нативная» генетическая конструкция (ГК) представляла собой непосредственно ген *HLA* I класса — с собственными фланкирующими последовательностями, со всеми экзонами и интронами; в «гибридной» ГК 3'-половина гена (кодирующая $\alpha 3$ -домен, трансмембранную и цитоплазматическую части белка HLA) была заменена соответствующей частью гена *H2* мыши (данные не опубликованы). В стабилизации кодируемого интегрированным трансгеном белка у этих линий мышей участвует эндогенный $\beta 2$ -микроглобулин. К настоящему времени нами получены ТГ мыши, позиционирующие на клеточных мембранах сложные «химерные» белки: к $\alpha 1$ -домену цепи «гибридного» белка гибким линкером «пришит» $\beta 2$ -микроглобулин человека, обеспечивающий дополнительную «человечность» антигенпрезентирующим иммунным механизмам. В виварии НЦБМТ ФМБА России успешно поддерживается линия HLA-A*02:01 [3, 7, 8], с использованием новой ГК HLA-C*07:02 [2] получена новая ТГ линия. У мышей новых линий необходимость присутствия собственного $\beta 2$ -микроглобулина мыши ($m\beta 2mg$) в комплексе с тяжелой химерной цепью обесценилась: место надёжно занято $\beta 2$ -микроглобулином человека ($h\beta 2mg$). Следующий логический шаг в создании HLA трансгенных мышей — обеспечить отсутствие эндогенного $m\beta 2mg$ — нами сделан: получены линии, обладающие вторым признаком — нокаутом гена $m\beta 2mg$

(материалы готовятся к печати). Поскольку $\beta 2$ -микроглобулину принадлежит очень важная роль в стабилизации антигенпрезентирующего комплекса на поверхности клеток, детекция присутствия $h\beta 2mg$ (в составе химерной молекулы), отсутствия синтеза эндогенного $m\beta 2mg$ для нокаутных по этому белку мышей является важным этапом верификации созданных и создаваемых линий.

Практически все высокочувствительные и точные методы обнаружения белков не обходятся без использования антител к ним. Разработано огромное количество тест-систем для обнаружения практически любого белка. Главной проблемой является то, что их подавляющее большинство — иностранного производства за соответственно высокую цену. Например, стоимость ИФА-набора (планшет на 96 лунок) для определения $\beta 2mg$ мыши производства CloudClone Corp. (США) составляет более 80000 руб., аналогичный набор для определения $b2mg$ человека стоит около 60000 руб. (информация сайта <https://belkiantitela.rf/product/SEA260Hu/> на апрель 2024 г.). В этих наборах используются рекомбинантные видоспецифичные $\beta 2mg$ и поликлональные антитела к ним. Стоимость: 1 мг $h\beta 2mg$ — 200000 руб., а поликлональных кроличьих антител к нему — 60000 руб.

Развитие отечественной науки невозможно без создания и развития собственного парка производства реактивов и субстанций для научных и прикладных задач. Разработка рекомбинантных белков (РБ), в т.ч. и с целью получения антител к ним, — одно из направлений комплексного решения научных задач с использованием таких высокочувствительных методов, как вестерн-блот, иммуногистохимия, иммуноцитохимия, иммунопреципитация.

Для идентификации $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ в белковых фракциях органов и тканей трансгенных и нокаутных мышей были поставлены следующие задачи:

1. Разработать рекомбинантные плазмиды для экспрессии $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ в бактериальном штамме-продуценте.

2. Получить штаммы-продуценты, подобрать условия их культивирования и полученных штаммов. Проверить эффективность индукции синтеза рекомбинантных белков $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$.

3. Подобрать условия очистки и наработать $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ в количествах, необходимых для иммунизации животных.

Материалы и методы

Плазида. Синтезированные нуклеотидные последовательности $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$, оптимизированные по коду для экспрессии в бактериальных системах (табл. 1), были клонированы в плазмиду-вектор pET-28a(+) (ООО «Евроген», Россия).

Штамм *E. coli* BL21 DE3, генотип: $fhuA2$ [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hds λ DE3 = λ sBamHI Δ EcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ in5 (New England Biolabs).

Трансформация. Полученными плазидами pET-28a(+)/ $h\beta 2mg$ и pET-28a(+)/ $m\beta 2mg$ трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) по методике производителя (New England Biolabs), клетки выращивали на среде LB с агаром (1,5%) и канамицином (60 мкг/мл) при 37°C.

ПЦР. Выросшие клоны проверяли на наличие плазмид методом ПЦР с использованием пар праймеров pET28-f/Humb2-r и pET28-f/Musb2-r, где pET28-f (5'-CCC GCGAAATTAATACGAC-3') — праймер, специфичный к плазмидному вектору, Humb2-r (5'-GACTCAAGGTGACATGGTTG-3') и Musb2-r (5'-CAGCCATGCTCGCATGTTTC-3') — праймеры, специфичные к вставке (нуклеотидная последовательность РБ).

Культивирование штаммов-продуцентов. Проверенные ПЦР колонии переносили в 5 мл жидкой среды LB (триптон, 10 г/л; экстракт дрожжей, 5 г/л; NaCl, 10 г/л) с канамицином (60 мкг/мл), инкубировали

в течение ночи при 37°C. По 1 мл ночной культуры вносили в 100 мл LB с антибиотиком, колбы помещали в термощейкер, выращивали в течение нескольких часов. При достижении суспензией оптической плотности (ОП) 0,1–0,6 о.е. (λ_{595}) индуцировали экспрессию РБ добавлением 0,25 М спиртового раствора изопропил- β -D-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до 1 мМ. Культивировали еще в течение нескольких часов. После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием, промывали р-ром ФБС, центрифугировали повторно и осадок замораживали до использования.

Очистка РБ. Суспензию центрифугировали. Осадок отбирали для проведения ПААГ электрофореза. Клетки ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH=8,0), охлаждали на льду, вносили лизозим до 1 мг/мл, инкубировали на льду 30 мин, суспензию обрабатывали ультразвуком, после чего центрифугировали при 10000 g, 10°C, 35 мин. Для электрофореза полиакриламидным гелем (ПААГ) отбирали пробу надосадочной жидкости.

Осадок ресуспендировали в буфере С-20 (20 мМ Трис-НСl, 0,5 М NaCl, 8 М мочевины, 20 мМ имидазол, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, pH=7,9), обрабатывали ультразвуком. Центрифугировали при 10000 g, 10°C, 35 мин. В колонку с Ni-сефарозой, уравновешенную буфером С-20, вносили осветленный лизат. Носитель со связанным белком промывали тем же буфером до выхода оптической плотности (ОП) на плато (280 нм). Связанный с носителем РБ снимали буфером С возрастающим содержанием имидазола 50, 200 и 500 мМ, собирали фракции с различной ОП до ее минимальных значений. На каждом этапе отбирали пробы для оценки качества РБ ПААГ электрофорезом.

Электрофорез (ЭФ) ПЦР-ампlicoнов осуществлялся в 0,8% агарозном геле в TBE (Трис-боратный ЭДТА, 0,5x) буфере. Полосы ДНК визуализовали с помощью

интеркалирующего красителя (бромистого этидия) в трансиллюминаторе при ультрафиолетовом свете (УФ).

Для проведения белкового ЭФ образцы нормализовали по содержанию белка. В зависимости от ОП меньший или больший объём пробы смешивали в соотношении 1:1 с 2х буфером для образцов (БО) (4% додецилсульфата натрия (SDS), 10% 2-меркаптоэтанол, 20% глицерин, 0,125 М Трис-HCl, pH=6,8, бромфеноловый синий 0,1%). Прогревали при 95°C. В лунку концентрирующего геля наносили по 15 мкл подготовленного образца. ЭФ проводили в ПААГ-SDS (12,5% — разделяющий и 4% — концентрирующий гель). Гель окрашивали (0,125% кумасси R250; уксусная кислота 10%; метанол 50%), последовательно отмывали (50% метанол, 10% уксусная кислота и 5% метанол, 7% уксусная кислота) (табл. 3, рис. 2). В качестве маркеров длин ДНК использовалась GeneRuler 1 kb DNA Ladder (“Invitrogen”, США), для оценки размера рекомбинантных белков использовали маркеры молекулярной массы Precision Plus Protein Unstained, 10–250 кДа (“Bio-Rad”, США).

Результаты и их обсуждение

Были получены плазмиды pET-28/m β 2mg и pET-28/h β 2mg для экспрессии РБ m β 2mg и h β 2mg в бактериальных культурах. Из кДНК эукариотических генов не всегда можно получить ГК, хорошо экспрессирующую в *E. coli*, что обусловлено различной частотой встречаемости тРНК для различных кодирующих триплетов у эукарит и прокариот. Поэтому для экспрессии эукариотических генов в прокариотах создают искусственный ген, в котором аминокислотная последовательность эукариотического белка (например, $\beta 2$ mg) будет кодироваться триплетами, предпочтительными для экспрессии в *E. coli*. Анализ синтетической последовательности кодонов РБ m β 2mg и h β 2mg в *E. coli* был выведе-

рен в программе Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>).

Описание нуклеотидных последовательностей и кодируемых ими РБ приведено в табл. 1. Схема плазмиды pET-28a(+)-hb2mg представлена на рис. 1.

Потенциальные физико-химические свойства РБ были вычислены с использованием программы PROTPARAM (<https://www.protparam.net/index.html>) (табл. 2).

Алифатический индекс белка связан с количеством и качеством гидрофобных аминокислотных (АК) остатков: чем он больше, тем выше термостабильность глобулярных белков. Значение GRAVY связано с гидрофобностью: положительная величина свидетельствует о более высокой гидрофобности [1].

Как следует из табл. 2, рекомбинантные m β 2mg и h β 2mg имеют некоторую разницу в физико-химических свойствах, обусловленную межвидовыми различиями АК

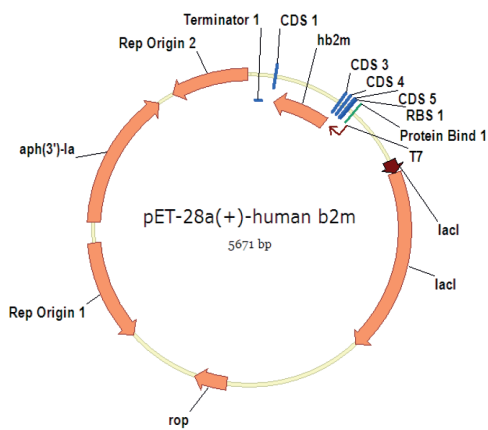


Рис. 1. Плазмида pET-28a (+)/hb2mg для экспрессии рекомбинантного h β 2mg в клетках *E. coli*. Структура плазмиды pET-28a (+)/m β 2mg для экспрессии рекомбинантного m β 2mg идентична.

Fig. 1. pET-28a (+)/hb2mg plasmid for the expression of recombinant h β 2mg in *E. coli* cells. The structure of the pET-28a (+)/m β 2mg plasmid for the expression of recombinant m β 2mg is identical.

Таблица 1. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности рекомбинантных $\beta 2$ -микроглобулинов мыши и человека

Table 1. Nucleotide and amino acid sequences of recombinant mouse and human $\beta 2$ -microglobulins

Параметр	pET-28/h $\beta 2$ mg	pET-28/m $\beta 2$ mg
Клонированная в pET-28a(+) синтетическая оптимизированная нуклеотидная последовательность	CATATGTCACGCAGTGTTCACATTTGCT GTGCTTGCGTTGTTGAGCTTGAGTGGCT TAGAAGCGATTCAACGCACTCCGAAGAT TCAGGTGTACAGCCGTCATCCTGCTGAGAAT GGCAAGAGCAACTTTCTGAACTGCTACGTA AGTGGCTTTCATCCGCTCGACATTGAAGT GGATCTTCTGAAAAATGGTGAACGCATT GAGAAAAGTGGAAACATAGTGATCTGAGCTTCTC CAAAGACTGGAGCTTCTATCTcTTGTA CACTGAGTTCACACCGACTGAGAAAAGATGAG TATGCGTGTCTGTcAACCATGTCACCTTGAGT CAACCGAAGATTGTGAAGTGGGATCGTGACAT GCATCACCACCATCATCACTAACCTCGAG	CATATGGCAGCCTCTGTGACCTTGGT GTTTCTTGTTAGTCACTGACTG GCTTGATGCGATTTCAGAAGACTCCT CAGATTCAAGGTGACAGTCGT CATCCTCCTGAGAATGGCAAC CGAACATTCGAACGCTACGTA CAGTTTCATCCTCCTCACATTGAGAT TCAGATGCTGAAGAATGGCAAGA TTCCGAAAGTGGAGATGAGTGACAT GTCCCTCAGCAAAGACTGGAGCTTC TACATCTTGCTCATAAGAGATTCACTC CGACTGAGACCGATACCTATGCGTGT GTGTGAAACATGGGAGCATGGCTGAAC CGAAGACCGTACTGGGATCGTGACAT GCATCACCACCATCATCACTAACCTCGAG
Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSRSLVALAV LALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSN FLNCYVSGFHPDIEVDLLKNGERIEKVEHS DLFSKDWFSFYLLYTFEPTTEKDEYACRVN HVTLSQPKIVKWDRDMHHHHHH	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMARSVTLV FLVLSLTGLYAIQKTPQIQVYSRHP PENGKPNILNCYVTFQHPHIEIQMLK NGKKIPKVEMSDMSFSKDWFSFYILA HTEFTPTEDTYACRVKHAASMAEPKTVY WDRDMHHHHHH
Соответствие последовательности белка $\beta 2$ mg базе NCBI	NP_004039.1	NP_033865.2

Примечание: курсивом в нуклеотидной последовательности выделены сайты рестрикции *NdeI* и *XhoI* для клонирования в плазмиду-вектор pET-28a(+); красным — триплет стоп-кодона; жёлтым выделены последовательности, соответствующие $\beta 2$ -микроглобулину; голубым — теги гексагистидина; зелёным — тромбиновый сайт.

Note: the restriction sites *NdeI* and *XhoI* for cloning into the plasmid vector pET-28a(+) are highlighted in italics in the nucleotide sequence; the stop codon triplet is highlighted in red; the sequences corresponding to $\beta 2$ microglobulin are highlighted in yellow; hexahistidine tags are highlighted in blue; the thrombin site is highlighted in green.

Таблица 2. Физико-химические свойства РБ m $\beta 2$ mg и h $\beta 2$ mg

Table 2. Physico-chemical properties of m $\beta 2$ mg and h $\beta 2$ mg recombinant proteins

Параметр	h $\beta 2$ M REC	m $\beta 2$ M REC
Aa	145	145
MW	16700.6895	16765.1035
pI	7.06 (7.14)	8.92(8.98)
aliphatic index	75.24	67.17
GRAVY	-0.606	-0.550
Extinction Coefficient	19940	19940
1mg/ml (59.878 uM) solution A280 nm	1.20	1.20

последовательностей $\beta 2$ -микроглобулина. Сравнение АК последовательностей (рис. 2) показывает довольно существенную разницу в АК составе (32% отличия), при этом имеются участки с очень высокой степенью несовпадения (например, фрагмент на С-конце молекулы). Это даёт нам весомые основания полагать, что спектры поликлональных антител, вырабатываемых

на m $\beta 2$ mg и h $\beta 2$ mg, как антигены при иммунизации животных будут иметь отличия благодаря несовпадающим эпитопам; в результате технологических манипуляций появляется возможность получения видоспецифических антител к $\beta 2$ mg.

Для наработки РБ в качестве штамма-продуцента использовали *E. coli* BL21 (DE3). Штаммы *E. coli* линии В (BL21

NW Score	Identities	Positives	Gaps
449	81/119(68%)	98/119(82%)	0/119(0%)
Query 1	MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSPDIEVDLL	60	
Sbjct 1	.A...T.VF.V.V..T..Y...K..Q.....P....P.I.....TQ...PH..IQM.	60	
Query 61	KNGERIEKVEHSDDLFSFKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHNHVTLSQPKIVKWRDRM	119	
Sbjct 61	...KK.P...M..M.....I.AH.....T.T.....K.ASMAE...T.Y.....	119	

Рис. 2. Сравнение АК последовательностей $\beta 2$ mg (sbjct) и $h\beta 2$ mg (query). Идентичность — 68%. Точки соответствуют совпадениям, красные буквы — отличия. Сравнения последовательностей выполнены в онлайн-приложении BLAST для нуклеиновых кислот и белков (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of mouse $\beta 2$ -microglobulin (sbjct) and human $\beta 2$ -microglobulin (query). Identity — 68%. The dots correspond to the matches; the red letters are the differences. Sequence comparisons were performed in the BLAST online application for nucleic acids and proteins (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

и др.) не обладают жгутиками, хорошо растут и дают большой выход биомассы клеток. Клетки этой линии лучше усваивают глюкозу из среды, при культивировании образуют меньше уксусной кислоты даже при высокой концентрации глюкозы в среде. Большой выход РБ также обусловлен меньшей деградацией экспрессируемых белков во время выделения и очистки из-за меньшего содержания в бактериях протеолитических ферментов (lon и ompT). *E. coli* BL21 (DE3) имеет интегрированный в хромосому лизоген DE3, λ -профаг, содержащий ген РНК-полимеразы фага T7, обладающей высокой скоростью транскрипции, под контролем промотора lacUV5. Экспрессирующие векторы серии pET содержат T7-промотор, ниже которого находится нуклеотидная последовательность белка. Транскрипция с промотора lac UV5 активируется IPTG (изопропил β -D-1 тио-галактопиранозидом [14, 15].

При работе с несколькими штаммами-продуцентами гомологичных белков возникает необходимость верификации продуцентов. Использование в составе пар праймеров при проведении ПЦР-анализа видоспецифического «белкового» праймера и праймера, специфичного к плазмидному вектору (пары pET28-f/Humb2-г и pET28-f/Musb2-г), позволяет надежно идентифицировать штамм-продуцент: в нашем случае ампликоны размером 482 п.н.

для каждой пары праймеров визуализируются в агарозном геле.

Одна из проблем получения рекомбинантных белков в клетках *E. coli* при интенсивном синтезе — образование нерастворимых телец включения, состоящих из агрегатов РБ и примеси бактериальных белков [9]. С другой стороны, при выделении РБ из телец включения в жестких денатурирующих условиях, например с использованием буферов с высоким содержанием мочевины (до 8 М), белок остается пригодным для иммунизации и получения антител [14]. Напротив, для использования РБ в качестве акцептора на сорбенте для аффинной хроматографии потребуется очистка белка, например диализом. Наличие в РБ полигистидиновой последовательности (6xHis) позволяет производить очистку белка с помощью Ni-сефарозы. Добавление небольшого количества имидазола, конкурента гистидина в связях с никелем, в связывающий и промывочный буферы снижает возможность неспецифического взаимодействия посторонних белков с Ni-сорбентом. Для снятия белка с сорбента используют буфер с возрастающей концентрацией имидазола — до 0,5М.

ПААГ ЭФ белковых образцов показал отсутствие синтеза РБ в неиндуцированной ИПТГ культуре и интенсивную наработку белка после индукции: в белковом

Таблица 3. Образцы для ПААГ электрофореза
Table 3. Samples for PAAG electrophoresis

Дорожка		Образец	Дорожка		Образец
Рекомбинантный тβ2mg			Рекомбинантный hβ2mg		
1	Клон 1 — неиндуцированный		1	Неиндуцированный	
2	Клон 1 — после индукции IPTG		2	Лизат осадка тотальный, после центрифугирования	
3	Клон 2 — не индуцированный		3	Осадок, растворенный в буфере для нанесения на колонку	
4	Клон 2 — после индукции IPTG		4	Разные пики и «хвосты» после снятия с колонки	
5	Пик 1 — основной, связавшийся и смытый белок		5		
6–8	Фракции 2–4 (хвосты) пика 1		6–8		
9	Проскок		9	Проскок	
10	Маркер молекулярных масс		10	Маркер молекулярных масс	

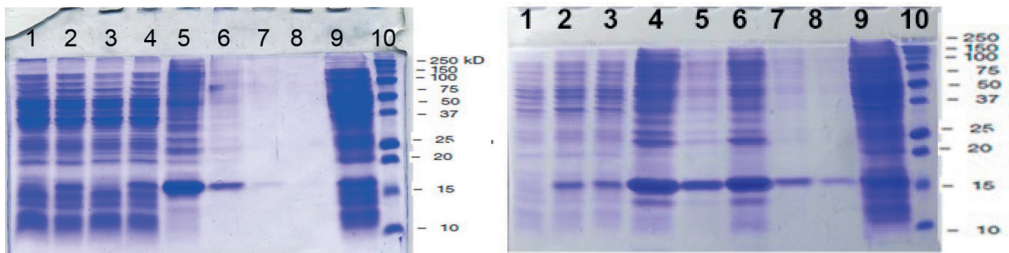


Рис. 3. Результаты ПААГ-электрофореза. 15% ПААГ-SDS. Оценка индукции экспрессии и очистки рекомбинантного тβ2mg (слева). Описание в табл. 3. Стадии наработки и очистки рекомбинантного hβ2mg (справа).
Fig. 3. Results of PAAG electrophoresis. 15% PAAG-SDS. Evaluation of the induction of expression and purification of recombinant тβ2mg (left). Description is given in Table 3. Stages of development and purification of recombinant hβ2mg (right).

ассортименте клеточного лизата хорошо заметна новая полоса размером около 16 кДа, соответствующая рассчитанной молекулярной массе РБ (табл. 3, рис. 3).

Фракции очищенного РБ собирали, концентрацию белка определяли методом Брэдфорд, растворы РБ хранили при +4–8°C до дальнейшего использования.

Заключение

Актуальность создания отечественной базы реактивов и компонентов для аналитических исследований в фундаментальной и прикладной молекулярной биологии, генетике, фармакологии не вызывает сомнений. Особенно остро это касается вери-

фикации функциональности всё большего разнообразия трансгенных гуманизированных животных, в т.ч. и с нокаутом собственных генов. С использованием молекулярно-генетических методов анализа требуется доказать интеграцию трансгена в геном животного, наличие полезных генетических модификаций целевого гена, наличие/отсутствие экспрессии мРНК в органах и тканях животного. В большинстве случаев даже положительные результаты ПЦР-анализа, генетического секвенирования, определение уровня экспрессии не являются окончательным вердиктом пригодности созданной линии трансгенных животных своему предназначению.

Именно подтверждение синтеза человеческих белков в соответствующих органах и тканях трансгенного гуманизированного животного, отсутствие целевого белка нокаутированного гена или, в ряде случаев, доказательство потери его функциональности является обоснованием «профпригодности» новой линии. Как правило, для такого рода исследований требуются методы с приставкой «иммуно»: иммуноферментный анализ, иммуноцитохимия, иммуногистология, иммуноблоттинг во всех его проявлениях.

Нами были созданы несколько линий трансгенных гуманизированных HLA-мышей, функциональность которых требует подтверждения наличия $\beta 2$ -микроглобулина человека в составе химерного белка (продукта синтеза трансгена — тяжелая монопептид, состоящая из цитоплазматической, трансмембранной части, $\alpha 3$ -домена мышинового H2, антигенпрезентирующих $\alpha 2$ - и $\alpha 1$ -доменов белка HLA, и $\beta 2$ -микроглобулина человека, гибкой цепью «пришитого» к $\alpha 1$). Это мыши линии HLA-A*02:01 [3, 7, 8], подтвержденной уже в нескольких поколениях, мыши новой создаваемой линии HLA-C*07:02 [2], ожидающей верификации, а также на их основе — линии с двумя генетическими признаками: HLA-трансген и нокаут $\beta 2$ -микроглобулина. Как у полученных мышей с одним только признаком трансгенности HLA/B2m^{+/+}, так и у мышей с двумя признаками HLA/B2m^{-/-} наличие/отсутствие $\beta 2$ -микро-

глобулина человека и мыши придётся подтверждать не только молекулярно-генетическими, но и специфическими методами вариаций иммунного анализа. Анализ коммерческих предложений импортного происхождения убедил нас в необходимости и возможности получения собственных компонентов для создания иммунологических методов исследования — гомологичных рекомбинантных белков и поликлональных антител к ним. Биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей m $\beta 2$ mg и h $\beta 2$ mg с использованием онлайн-приложений позволил предположить возможность получения видоспецифичных антител, обладающих минимальной перекрёстной реакцией при применении продуманных методов очистки поликлональных антител.

На первом, исходном этапе наших исследований в новом направлении — использовании собственных возможностей участия в создании насыщено необходимой и независимой отечественной базы реагентов для тонких биологических, иммунохимических, фармакологических исследований — были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных $\beta 2$ -микроглобулина мыши и человека. Нуклеотидные последовательности генов были адаптированы для синтеза в бактериальной системе, рекомбинантные белки — m $\beta 2$ mg и h $\beta 2$ mg — очищены и наработаны в количествах, необходимых для получения аффинных сорбентов и иммунизации животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Богомолова Т.Г., Добровольская О.А., Мировская А.А., Аль-Шехадат Р.И., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С. Разработка кандидатной субстанции рекомбинантного белка CRM197. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016;15(1):93–98. [Bogomolova T.G., Dobrovolskaya O.A., Mirovskaya A.A., Al-Shehadat R.I., Fedorova E.A., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S. Razrabotka kandidatnoj substancii rekombinantnogo belka CRM197 [Development of pharmacology grade substance of recombinant protein CRM197]. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika [Epidemiology and vaccinal prevention]*. 2016;15(1):93–98. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-1-93-98.
2. Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-C*07:02:01:01, как прообраз инновационных

- трансгенно-нокаутных биомоделей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya gumanizirovannykh transgennykh myshey, nesushchikh gen *HLA-C*07:02:01:01*, kak proobraz innovatsionnykh transgenno-nokautnykh biomodelej [Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with *HLA-C*07:02:01:01*, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-20-1-8-20.
3. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Sozdanie polnih gibritnih DNK-konstruktsij s genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Chimeric Construct Engineering with Human Variant HLA-A*02:01:01:01]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(1):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-1-10-23.
 4. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological research (successes, failures and prospects)]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
 5. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицына Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (*NAT1* и *NAT2*) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-atsetiltransferazy (*NAT1* i *NAT2*) cheloveka [Molecular and genetic aspects of the technology for producing transgenic mice with integrated genes of human N-acetyltransferase (*NAT1* and *NAT2*)]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
 6. Кит О.И., Максимов А.Ю., Протасова Т.П., Гончарова А.С., Кутилин Д.С., Лукбанова Е.А. Гумани-зированные мыши: методы получения, модели и использование в экспериментальной онкологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;15(4):67–81. [Kit O.I., Maksimov A.Yu., Protasova T.P., Goncharova A.S., Kutilin D.S., Lukbanova E.A. Gumanizirovannye myshi: metody polucheniya, modeli i ispol'zovanie v eksperimental'noj onkologii (obzor) [Humanized Mice: Creation, Models and Use in Experimental Oncology (Review)]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):67–81. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-67-81.
 7. Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):70–75. [Petrova N.V., Skripkina M.M. Osobennosti organizatsii soderzhaniya i vyvedeniya transgennykh linij myshey v NCzBMT FMBA Rossii [Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):70–75. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-70-75.
 8. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novej gumanizirovannoj transgennoj linii myshey s integrirovannym genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Embryological Aspects of Creation a New Humanized Transgenic Mice with Integrated Human *HLA-A*02:01:01:01* Gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-10-23.
 9. Baneyx F., Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 2004;22:1399–1408.
 10. Borenstein S.H., Graham J., Zhang X.L., Chamberlain J.W. CD⁸⁺ T cells are necessary for recognition of allelic, but not locus-mismatched or xeno-, HLA class I transplantation antigens. *J. Immunol.* 2000;165(5):2341–2353. DOI: 10.4049/jimmunol.165.5.2341.
 11. Korablev A., Lukyanchikova V., Serova I., Battulin N. On-Target CRISPR/Cas9 Activity Can Cause Undesigned Large Deletion in Mouse Zygotes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:3604. DOI: 10.3390/ijms21103604.
 12. Makrides S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 1996;60(3):512–538. DOI: 10.1128/mr.60.3.512–538.1996.
 13. Masemann D., Ludwig S., Boergeling Y. Advances in Transgenic Mouse Models to Study Infections by Human Pathogenic Viruses. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(23):9289. DOI: 10.3390/ijms21239289.
 14. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and chal-

lenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.

15. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level

expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology.* 1986;189(1):113–130. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Езерский Вадим Аркадьевич*, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Vadim A. Ezerskiy*, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-32-44>



ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НАЛИЧИЯ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ — β2m hom И HLA У ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИЙ HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 И HLA-C*07:02

В.Н. Каркищенко, А.Г. Берзина*, Н.В. Петрова, И.А. Помыткин, Е.С. Глотова,
Д.В. Петров, Л.А. Таболякова, Л.А. Болотских, Н.А. Ларюшина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Человеческий лейкоцитарный антиген играет первостепенное значение в формировании иммунного ответа и патогенезе заболеваний различной этиологии, в т.ч. при развитии негативных побочных эффектов на фармакологические препараты. Современные стандарты фармакобезопасности требуют совершенствования существующих тест-систем для проведения качественных доклинических исследований. В НЦБМТ ФМБА России был разработан и создан ряд гуманизированных трансгенных линий мышей, несущих гибридные молекулы HLA I класса на поверхности клеток, которые соответствуют аллельным вариантам человека *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* и *HLA-C*07:02*. В данной статье представлены экспериментальные данные по количественному определению белка β2-микроглобулина человека и результаты определения HLA «сэндвич»-методом ИФА у мышей, несущих разные аллели генов HLA I класса. Полученные данные подтверждают наличие целевых функциональных белков (трансгенность) у гуманизированных трансгенных мышей, что согласуется с данными, полученными нами при определении первичной последовательности трансгена методом секвенирования по Сэнгеру. Кроме того, в работе рассматривается научно-практическая значимость таких биомоделей и область их применения.

Ключевые слова: иммунопероксидазный конъюгат, ИФА, «сэндвич»-метод, гуманизированные трансгенные мыши, β2-микроглобулин, HLA A-, B-, C-

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*рХ человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Берзина А.Г., Петрова Н.В., Помыткин И.А., Глотова Е.С., Петров Д.В., Таболякова Л.А., Болотских Л.А., Ларюшина Н.А. Доказательство наличия целевых белков — β2m hom и HLA у гуманизированных трансгенных мышей линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. *Биомедицина*. 2024;20(2):32–44. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-32-44>

Поступила 04.03.2024

Принята после доработки 20.05.2024

Опубликована 10.06.2024

EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF β2m hom TARGET PROTEINS AND HLA IN HUMANIZED TRANSGENIC MICE OF HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, AND HLA-C*07:02 LINES

Vladislav N. Karkischenko, Asya G. Berzina*, Nataliya V. Petrova, Igor A. Pomytkin,
Elena S. Glotova, Dmitry V. Petrov, Lidiya A. Taboyakova,
Lubov' A. Bolotskih, Nadezhda A. Laryushina

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

Human leukocyte antigen plays a primary role in the formation of immune response and pathogenesis of diseases of various etiologies, including the development of negative side effects induced by pharmacological agents. Modern pharmacosafety standards require improvement of existing test systems to conduct high-quality preclinical studies. A number of humanized transgenic mouse lines with hybrid HLA I class molecules on the cell surface, which correspond to the human allelic variants *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, and *HLA-C*07:02*, were developed at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia. In this article, we present experimental data on quantitative determination of $\beta 2$ -microglobulin protein and HLA by the “sandwich” ELISA method in mice with different alleles of HLA I class genes. The results obtained confirm the presence of target functional proteins (transgenicity) in humanized transgenic mice, which is consistent with our previous data obtained when determining the primary sequence of the transgene using Sanger sequencing. We also discuss the scientific and practical significance of such biomodels, as well as the scope of their application.

Keywords: immunoperoxidase conjugate, ELISA, sandwich method, humanized transgenic mice, $\beta 2$ -microglobulin, HLA A-, B-, C-

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research topic “Generation of a new line of humanized transgenic mice carrying the human HLA-A*pX gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknockout-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko V.N., Berzina A.G., Petrova N.V., Pomytkin I.A., Glotova E.S., Petrov D.V., Tabolyakova L.A., Bolotskih L.A., Laryushina N.A. Evidence for the Presence of $\beta 2m$ hom Target Proteins and HLA in Humanized Transgenic Mice of HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, and HLA-C*07:02 Lines. *Journal Biomed.* 2024;20(2):32–44. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-32-44>

Submitted 04.03.2024

Revised 20.05.2024

Published 10.06.2024

Введение

С момента открытия технологии направленного редактирования генома исследователи получили мощный инструмент для решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач, начиная от исследований на молекулярно-генетическом уровне до создания живых организмов с заданными свойствами. Манипуляции с геномом позволили ученым выйти на новый уровень планирования и проведения исследований, что способствовало созданию биомоделей, удовлетворяющих условиям каждого отдельно взятого эксперимента. Особое место заняли т.н. гуманизированные модели — биомодели со встроенным в геном организма животного геном человека. Исследования, проведённые на гуманизированных организмах, позволяют получить

наиболее полное представление об особенностях нормального строения и работы отдельных генов, регуляции их экспрессии и сигнальных путях, проследить роль генов в филогенезе и онтогенезе, а также патогенезе заболеваний и пр. Использование гуманизированных биомоделей на сегодня — важный инструмент в арсенале трансляционной медицины, являясь кратчайшим и наиболее корректным способом экстраполяции результатов научных изысканий на человека.

Однако при создании трансгенных биомоделей необходима система контроля и валидации используемых методов. Манипуляции с генами могут приводить к возникновению многих побочных эффектов, в т.ч. таких, как встраивание трансгена в транскрипционно неактивную область,

утрата функциональных частей исходной генно-инженерной конструкции, нарушение транскрипции и сборка нефункционального продукта. Оценить активность трансгена на каждом уровне реализации генетической информации (ДНК, мРНК, белок) позволяют методы молекулярной биологии, биохимии, иммунологии и многие другие.

В НЦБМТ ФМБА России были созданы гуманизированные трансгенные линии мышей, несущих ген главного комплекса гистосовместимости (МНС) человека I класса (HLA I класса) на поверхности клеток. Данный комплекс стабилизируется молекулой β 2-микроглобулина человека, «сшитого» глицин-сериновым линкером с α 1-доменом HLA. Созданные биомодели демонстрируют аллельные варианты *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* и *HLA-C*07:02* человека.

Особую важность для многих исследований имеет необходимость не только качественно оценить наличие трансгена, но и количественно измерить генный продукт. Для каждой созданной линии мышей с геном *HLA (A*02:01, B*07:02, C*07:02)* в НЦБМТ ФМБА России были разработаны методики детекции целевого трансгена с помощью ПЦР в реальном времени, которые позволяют быстро произвести скрининг поголовья животных. Кроме того, методом секвенирования по Сэнгеру было показано отсутствие химеризма и полное соответствие трансгена заявленной генно-инженерной конструкции и исходному гену человека [2]. Однако отсутствие зависимости транскрипционной активности региона (т.е. количества мРНК) и содержания продуктов генов (в нашем случае, белка HLA и β 2-микроглобулина человека) не позволяет констатировать наличие искомым белков, что требует применения эффективных и высокочувствительных методов детекции.

Перспективным направлением работы в данной области является разработка иммунохимических методов, позволяющих

не только качественно показать наличие белкового продукта, но и количественно оценить его содержание в биологических образцах. На сегодня таким требованиям наиболее полно отвечает «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа (ИФА). При постановке данного метода на твердой фазе — поверхности лунок полистирольных планшетов — иммобилизуют первичные антитела с их последующей блокировкой. Далее в лунки вносят исследуемое вещество, содержащее антиген, и инкубируют. Образовавшийся на твердой фазе комплекс антиген-антитело отмывают от несвязавшегося антигена и добавляют меченные ферментом антитела, специфичные к определяемому антигену. Затем вносят субстрат и проводят детекцию путем измерения оптической плотности окрашенного продукта ферментативной реакции. «Сэндвич»-вариант ИФА позволяет с высокой точностью определить наличие целевых молекул в различных биологических жидкостях и экстрактах из клеток и тканей. Измерение оптической плотности в результате реакции позволяет произвести расчет количества определяемого белка в пробах, поскольку его концентрация прямо пропорциональна количеству фермента, присутствующего в лунке. Для выполнения таких расчетов в эксперимент необходимо включать калибровочную кривую, которая создается путем сопоставления измеряемой оптической плотности (ОП) с известными концентрациями целевого белка [13].

Стадия «узнавания» анализируемого соединения специфическим к нему антителом происходит в строго количественном соотношении, которое зависит от аффинности, концентрации компонентов и условий проведения реакции. Для доказательства наличия белков β 2m hom и HLA в биоматериале, полученном от трансгенных мышей, нами были разработаны тест-системы для определения этих белков «сэндвич»-методом ИФА. С применением коммерческого препарата рекомбинантного белка β 2m hom удалось количественно опреде-

лить искомый белок в сыворотках крови трансенных мышей по калибровочной кривой. Использование в работе коммерческих препаратов моноклональных антител к HLA ABC дало возможность достоверно идентифицировать эти белки в экстрактах селезенки гуманизированных мышей.

Обнаружение искомых белков в биоматериале, полученном от животных линий, несущих гены человека — ген *HLA* и ген $\beta 2$ -микροглобулина человека, является прямым доказательством не только экспрессии трансгена и трансляции целевых белков (т.е. трансгенности), но и их соответствия по антигенным свойствам исходным белкам человека (т.е. гуманизированности).

Целью настоящей **работы** явилось определение белков HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 в экстрактах селезенки трансенных мышей и количественное определение белка $\beta 2m$ hom в сыворотках крови соответствующих трансенных линий, полученных в НЦБМТ ФМБА России, с применением «сэндвич»-метода ИФА.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В работе использовались мыши трёх гуманизированных трансенных линий с интегрированными генами *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* и *HLA-C*07:02*, представляющих аллели человеческого MHC I класса *HLA A*-, *B*- и *C*- соответственно, полученные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [1, 3, 4], а также гибриды F1 CBA/лас \times C57BL/6, полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, которые являются генетическим фоном для всех анализируемых в данной работе трансенных линий (для удобства чтения в тексте обозначены как WT или F1). Для получения F2 и следующих поколений племядра формировали из подтверждённых особей предыдущего поколения по технологии инбредного скрещивания. Животные соот-

ветствовали категории улучшенных конвенциональных. Группы формировались методом пар-аналогов, по 6 особей в каждой. Сформированные группы содержались в системе индивидуальных вентилируемых клеток при световом режиме 12/12, со свободным доступом к пище и воде, по 2 мыши в клетке. Условия содержания соответствовали стандартным зоотехническим нормам, применяемым для лабораторных мышей.

Биоматериал для анализа

В качестве источника антигенов использовали сыворотку крови, а также биопат селезенки экспериментальных животных — подтверждённых (по данным ПЦР-РВ) носителей трансгена HLA A-, B-, и C-.

«Сэндвич»-вариант ИФА для определения HLA A-, B-, C-

Разработку тест-системы («сэндвич»-вариант ИФА) для определения HLA A-, B-, C- проводили с использованием коммерческих моноклональных антител — mAb to HLA Class I к HLA ABC ab 155381 («Abscam», Китай), а также набора для определения MHC методом ИФА (человек) («Cloud-Clone Corp.», Китай). Конъюгацию антител с пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich», США) проводили периодатным методом [18].

«Сэндвич»-вариант ИФА для количественного определения

$\beta 2$ -микροглобулина человека ($\beta 2m$ hom)

Тест-систему для количественного определения $\beta 2m$ hom разрабатывали с применением поликлональных антител к $\beta 2m$ hom, полученных от морских свинок, иммунизированных коммерческим препаратом рекомбинантного белка $\beta 2m$ hom («Cloud-Clone Corp.», Китай) по схеме, представленной в работе [28]. Титр антител к $\beta 2m$ hom в сыворотках крови морских свинок определяли непрямой метод ИФА с применением антивидового иммунопероксидазного конъюгата Anti-Guinea Pig+Ph («Sigma-Aldrich», США).

Получение иммунопероксидазного конъюгата осуществлялось периодатным методом.

Оптимизация условий постановки ИФА

Определение оптимальных концентраций раствора антител, применяющегося для сенсибилизации полистирольных планшетов, а также для оптимального разведения конъюгатов антител с ферментом осуществлялось в каждом конкретном случае экспериментально методом «шахматного» титрования. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови неиммунных мышей, а также экстракт селезенки контрольных мышей WT (F1). С целью исключения ложноположительной реакции в ИФА осуществлялась экспериментальная подборка разведений экстрактов и сывороток крови. Блокировка неспецифической реакции осуществлялась раствором 0,3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатно-солевом буфере с Твин-20 (PBST) в стандартных условиях.

Регистрация результатов анализа ИФА

В качестве субстрата пероксидазы использовали р-р тетраметилбензидина (ТМБ, ООО «Абисенс», Россия). Оптическую плотность окрашенного продукта ферментативной реакции измеряли на планшетном мультимодальном ридере Feyond-A400 («Allsheng», Китай) при длине волны 450 нм. Полученные значения оптической плотности (OP_{450}) представлены в оптических единицах (о.е.). Стандартизацию разработанных иммуноферментных тест-систем для определения $\beta 2m$ hom и HLA (A-, B-, C-) проводили с использованием тестов для проверки надежности, точности, специфичности и воспроизводимости, используя критерии, принятые для иммуноферментного анализа [17].

Иммунизации трансгенных мышей

В эксперименте участвовали 4 группы (n=6) мышей в возрасте 2 мес.: I (HLA-A*02:01), II (HLA-B*07:02), III

(HLA-C*07:02) группы — трансгенные мыши, IV группа — контроль (WT, гибриды F1 CBA/lac × C57BL/6, генетический фон для всех анализируемых в данной работе трансгенных линий). Животные содержались в одинаковых условиях по 2 особи в каждой клетке. С целью активации иммунной системы мыши получали одну подкожную инъекцию антигена — коммерческого препарата IgG horse («Sigma-Aldrich», США) в дозе 25 мкг на мышь. Антиген вводили в физ. р-ре в смеси 1:1 с полным адъювантом Фрейнда («Sigma Aldrich», США). Объем инъекции суммарно составил 0,1 мл. На 7-й день после иммунизации у всех животных производился прижизненный забор крови из ретроорбитального сплетения в объеме 0,2 мл.

Образцы сыворотки крови

Кровь брали в пробирку с активатором свёртывания, затем выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Сыворотку крови для определения $\beta 2$ -микροглобулина человека «сэндвич»-методом ИФА у мышей отделяли центрифугированием при 3000 об./мин в течение 15 мин, после чего супернатанты использовали немедленно: в двукратном разведении вносили в лунки полистирольных планшетов («Dynatech», Швейцария) для проведения ИФА.

Экстракты ткани селезенки для определения HLA A-, B-, C-

Перед анализом ткань селезенки промывали ледяным р-ром PBS для тщательного удаления крови. 100–150 мг ткани измельчали на стекле лезвием на мелкие кусочки и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с добавлением PBS в соотношении 1:5. Полученную суспензию подвергали двум циклам замораживания оттаивания для дальнейшего разрушения клеточных мембран, затем гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g (или 5000 об./мин). Супернатант немедленно использовали для анализа или делали аликваты для длительного хранения при -80°C.

Обработка данных

Статистический анализ результатов проводили параметрическими и непараметрическими методами с использованием пакета программ ANOVA.

Результаты и обсуждение

Содержание $\beta 2m$ hom в сыворотке крови

Иммунизация морских свинок коммерческим препаратом $\beta 2m$ hom позволила получить моноспецифическую антисыворотку с титром антител 1:200 000 (по данным непрямого метода ИФА). На основе поликлональных антител морской свинки к $\beta 2m$ hom был получен иммунопероксидазный конъюгат для количественного определения $\beta 2m$ hom с помощью «сэндвич»-метода ИФА.

В результате подбора условий для проведения эксперимента была выбрана оптимальная концентрация антител для сенсibilизации полистирольных планшетов — 2 мкг/мл и оптимальная концентрация меченных ферментом антител — 2,5 мкг/мл. На рис. 1 представлена калибровочная кривая для ИФА определения $\beta 2m$ hom в коммерче-

ском препарате $\beta 2m$ hom. Чувствительность теста составила 10 нг/мл.

По калибровочной кривой (рис. 1) на основе полученных данных в результате анализа сывороток крови экспериментальных мышей была определена концентрация $\beta 2m$ hom (средняя для каждой группы). Так, для группы I (HLA-A*02:01) эта величина составила 1750 нг/мл, в группах II (HLA-B*07:02) и III (HLA-C*07:02) — 1000 и 1500 нг/мл соответственно. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений показал статистически значимое отличие для всех указанных трансгенных линий ($p < 0,001-0,0001$) по сравнению с контрольными мышами во всем диапазоне разведений сыворотки крови мышей. Полученные данные явно показывают наличие функционально активного белка $\beta 2$ -микроглобулина человека в сыворотке крови у анализируемых линий гуманизированных трансгенных мышей HLA-A*02:01 (рис. 2А), HLA-B*07:02 (рис. 2Б) и HLA-C*07:02 (рис. 2В), т.е., трансгенность.

Специфичность реакции с полученными нами антителами к коммерческому

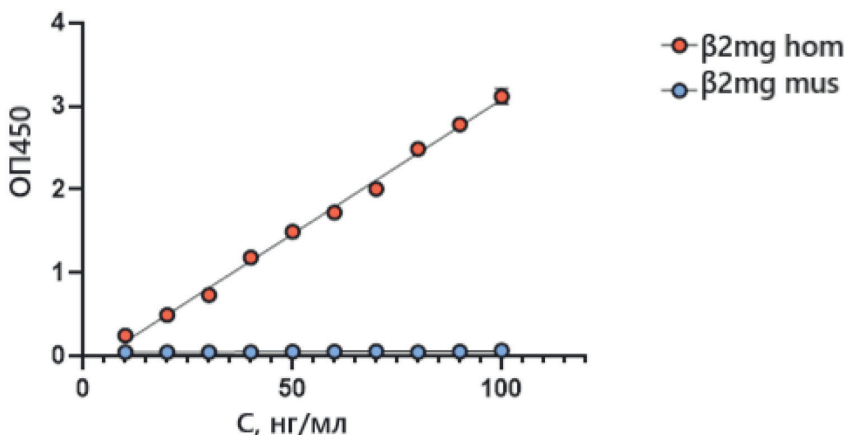


Рис. 1. Калибровочная кривая для ИФА определения «сэндвич»-методом белка $\beta 2m$ hom в коммерческом препарате $\beta 2m$ hom. Контроль — $\beta 2$ -микроглобулин мыши $\beta 2m$ mus.

Fig. 1. Calibration curve for determination of $\beta 2m$ hom protein using the ELISA sandwich method in a commercial $\beta 2m$ hom preparation. Control — mouse $\beta 2$ -microglobulin $\beta 2m$ mus.

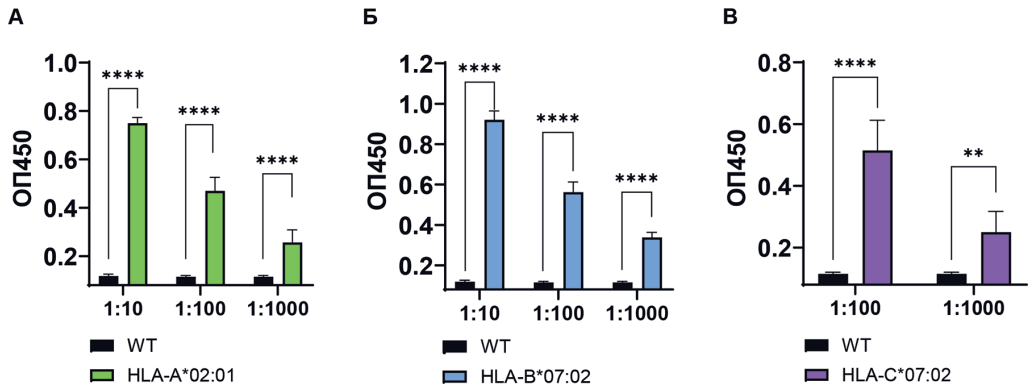


Рис. 2. Определение $\beta 2$ -микροглобулина человека в сыворотке крови «сэндвич»-методом ИФА у мышей линий HLA-A*02:01 (А), HLA-B*07:02 (Б) и HLA-C*07:02 (В). Среднее \pm стандартное отклонение (n=6). ** — $p < 0,01$, **** — $p < 0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения сыворотки крови.

Fig. 2. Determination of human $\beta 2$ -microglobulin in the blood serum of mice of the HLA-A*02:01 (A), HLA-B*07:02 (B), and HLA-C*07:02 (B) lines by the “sandwich” ELISA method. Mean \pm standard deviation (n=6). ** — $p < 0,01$, **** — $p < 0,0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows blood serum dilutions.

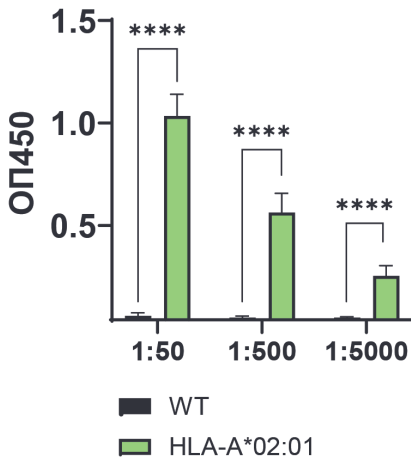


Рис. 3. Определение HLA-A в экстрактах селезенки трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 «сэндвич»-методом ИФА. Среднее \pm стандартное отклонение (n=6). **** — $p < 0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения экстракта селезенки.

Fig. 3. Determination of HLA-A in spleen extracts of HLA-A*02:01 transgenic mice by the “sandwich” ELISA method. Mean \pm standard deviation (n=6).

**** — $p < 0,0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows the dilutions of spleen extract.

$\beta 2m$ hom доказывает полное соответствие трансгена $\beta 2m$ hom по антигенным свойствам исходному гену $\beta 2$ -микροглобулина человека, т.е. гуманизированность животных по гену $\beta 2m$ hom.

Содержание HLA (A-, B-, C-) в экстрактах селезёнки

Для определения HLA (A-, B-, C-) был получен иммунопероксидазный конъюгат на основе моноклональных антител к соответствующему типу HLA.

На рис. 3 представлены результаты количественного определения содержания белка HLA A- у трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 в сравнении с мышами F1 (WT). Из полученных данных следует, что OP_{450} в опытных образцах существенно превышает аналогичные показатели в контроле — селезенке мышей дикого типа. Так, при разведении экстракта 1:50, OP_{450} у трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 составила 1,10 о.е., в то время как в контроле средние значения OP_{450} составили 0,05 о.е., что соответствует фоновым значениям для данного метода.

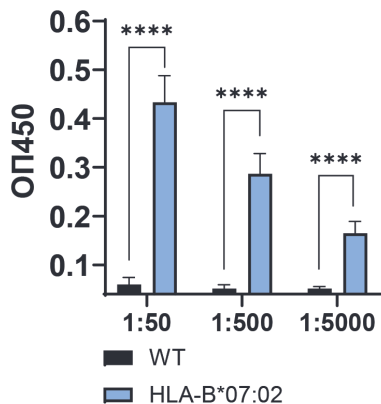


Рис. 4. Определение HLA-B в экстрактах селезенки трансгенных мышей линии HLA-B*07:02 «сэндвич»-методом ИФА. Среднее \pm стандартное отклонение ($n=6$). **** — $p<0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения экстракта селезенки.

Fig. 4. Determination of HLA-B in spleen extracts of HLA-B*07:02 transgenic mice by the “sandwich” ELISA method. Mean \pm standard deviation ($n=6$).

**** — $p<0.0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows the dilutions of spleen extract.

Аналогичные данные были получены при исследовании образцов селезенки, полученных от мышей линии HLA-B*07:02: при разведении гомогената 1:50 ОП₄₅₀ у трансгенных мышей линии HLA-B*07:02 составила 0,45 о.е., в то время как в контроле средние значения ОП₄₅₀ оставались на уровне фона — 0,05 о.е. (рис. 4). Достоверность полученных результатов подтверждается двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA с достоверностью $p<0,0001$.

При исследовании образцов селезенки, полученных от гуманизированных трансгенных животных линии HLA-C*07:02, экспериментальные данные также подтвердили высокое содержание белка HLA-C и его отсутствие у особей WT (рис. 5), ОП₄₅₀ в опытных образцах существенно превышает аналогичные показатели в контроле: при разведении гомогената 1:50 ОП₄₅₀

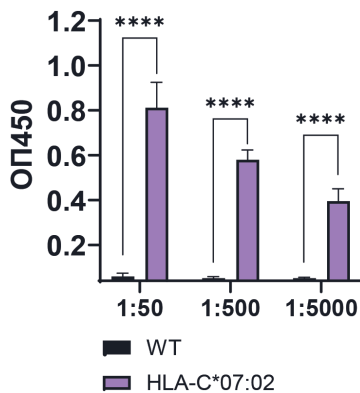


Рис. 5. Определение HLA-C в экстрактах селезенки трансгенных мышей линии HLA-C*07:02 «сэндвич»-методом ИФА. Среднее \pm стандартное отклонение ($n=6$). **** — $p<0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения экстракта селезенки.

Fig. 5. Determination of HLA-C in spleen extracts of HLA-C*07:02 transgenic mice by the “sandwich” ELISA method. Mean \pm standard deviation ($n=6$).

**** — $p<0.0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows the dilutions of spleen extract.

у трансгенных мышей линии HLA-C*07:02 составила 0,80 о.е. против 0,05 о.е.

Проведённые нами исследования наглядно подтверждают наличие линии специфических белков HLA у мышей новых гуманизированных трансгенных линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений показал статистически значимое отличие для всех указанных трансгенных линий ($p<0,0001$) по сравнению с мышами WT во всем диапазоне разведений экстрактов селезенки. Использование качественных коммерческих моноклональных антител к аллелям HLA при разработке тест-системы ИФА, а также подбор оптимальных условий для постановки реакции позволили с высокой степенью надёжности и достоверности доказать наличие у экспериментальных животных заявленных ха-

рактистик — трансгена *HLA* и его полное соответствие по антигенным свойствам исходному гену человека, т.е. трансгенность и гуманизованность по соответствующему линии гену *HLA*.

Заключение

Биомоделирование является неотъемлемой частью прогресса во многих областях, включая фармакологию, изучение иммунных реакций и исследования в области токсичности и безопасности. Адекватный выбор биомодели определяет возможность получения интересующих данных, а также их корректность и транслируемость на другие биологические виды, включая человека. Несмотря на существенный прогресс в использовании альтернативных методов, ни один из них не позволяет даже приблизиться к результатам, которые можно получить на живых организмах. Рациональный подход и грамотный подбор биомодели определяют ход всего исследования, возможность использования инструментальных методов и тестов.

Потребности различных отраслей науки в биомоделях всё расширяются, а экспертам нужны биомодели нового уровня — максимально воспроизводящие особенности патологии, заболевания и пр., но при этом экономически эффективные и простые в поддержании. Наиболее популярным объектом в лабораториях всего мира является мышь: физиолого-анатомически и биохимически близка к человеку, быстро размножается и даёт до 6–10 поколений за год, удобна для содержания и исследования. Однако с открытием процесса гомологичной рекомбинации и получением первых нокаутных и трансгенных животных возможности учёных в плане биомоделирования существенно возросли. Более того, исследования в области популяционной медицины и появление фармакогенетики обосновали необходимость использования гуманизированных биомоделей, воспроизводящих особенности генотипов различных групп населения при исследова-

ниях в области фармакобезопасности и тестировании эффективности новых препаратов. Особую роль играют гены главного комплекса гистосовместимости, которые определяют возможности иммунного ответа организма и участвуют в формировании ответа организма на лекарственные агенты.

Полиморфизм системы *HLA*, свойственный конкретной популяции, служит отправным моментом в комплексном изучении многих заболеваний. У людей гены *HLA* I класса играют решающую роль в реакции отторжения трансплантата органа и реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [25, 31]. Также была показана связь между *HLA* I класса и различными аутоиммунными заболеваниями [7, 9, 21, 24], а также инфекционными заболеваниями [26] и развитием негативных побочных эффектов на приём лекарственных препаратов [12, 16]. Помимо первостепенной роли *HLA* в формировании адаптивного иммунного ответа, была показана роль МНС класса I в качестве регулятора при поддержании беременности, выборе партнера и распознавании родственников [30], а также при выборе полового партнёра и предотвращении инбридинга [14]. Кроме того, гены *HLA* I класса оказывают влияние на развитие и пластичность центральной нервной системы [6, 8, 11, 19, 29], взаимодействие нервных клеток [15, 22], синаптические функции и поведение [10, 27], в т.ч. формирование некоторых неврологических и психических расстройств [5, 20, 23]. Эти особенности *HLA* I класса показывают особое положение этих генов и необходимость детального их изучения, что приводит нас к актуальности создания и поддержания биомоделей, несущих аллельные варианты классических и неклассических генов *HLA* I класса.

В связи с нестабильной геополитической обстановкой возможность получения интересующих линий животных из зарубежных источников сильно ограничена как слож-

ностями в логистике, так и за пределами высокой стоимостью генно-модифицированных животных, что приводит нас к необходимости обеспечения технологического суверенитета и развитию собственных центров получения и поддержания животных биомоделей.

В ФГБУН НЦБМТ ФМБА России был создан ряд линий мышей, гуманизированных и трансгенных по генам классического *HLA* I класса (*A*-, *B*- и *C*-). Данные животные несут в геноме генетическую конструкцию, кодирующую химерную молекулу главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I на поверхности клеток, состоящую из $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов *HLA* человека и $\alpha 3$ -домена комплекса *H-2K* мыши, стабилизированную $\beta 2$ -микроглобулином человека, соединённым глицин сериновым линкером с $\alpha 1$ -доменом *HLA*.

В данной работе нами проведены исследования, доказывающие состоятельность созданных биомоделей и их соответствие заявленным характеристикам по наличию функционально активного *HLA* I класса, стабилизированного $\beta 2$ -микроглобулином человека. Определение $\beta 2m$ hom в сыворотках крови трансгенных мышей, предварительно иммунизированных иммуноглобулином лошади с целью активации иммунной системы, показало наличие $\beta 2m$ hom в концентрациях от 1000 до 1750 нг/мл, а результаты определения *HLA A*-, *B*- и *C*- в селезенке трансгенных мы-

шей линий *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02* соответственно методом «сэндвич» ИФА наглядно подтвердили наличие белка *HLA* (*A*-, *B*- или *C*-) в экстрактах селезенки всех трех групп экспериментальных животных. Полученные нами данные согласуются с результатами определения первичной последовательности трансгена, полученными методом секвенирования по Сэнгеру (см. статью «Доказательства трансгенности и гуманизованности у мышей, полученных в НЦБМТ ФМБА России, методом секвенирования по Сэнгеру» в этом номере журнала), т.е. доказывают наличие функционально активного трансгена не только на уровне транскрипции (мРНК), но и на уровне целевого белка.

Таким образом, созданные на базе НЦБМТ ФМБА России гуманизированные трансгенные линии мышей *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02* отвечают заявленным характеристикам и могут быть использованы для исследований, направленных на решение широкого спектра научно-практических задач, включая исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, разработку и тестирование вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности, а также для создания мультитрансгенных животных, несущих несколько разных аллелей *HLA* I класса, для обеспечения качественных исследований на новом уровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвейенко Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревакин А.О., Станкова Н.В., Семёнов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека *NAT1* и *NAT2*. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskih L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabih V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov H.H. Sozdanie linij transgennoj zhivotnyh-modelej s genami cheloveka *NAT1* i *NAT2* [Creation of lines of transgenic animal models with human *NAT1* and *NAT2* genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
2. Каркищенко Н.Н., Глотова Е.С., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А., Петров Д.В., Васильева И.А., Дерябин К.Е. Генетический скрининг новой трансгенной гуманизированной по *HLA-A*02:01:01:01* и $\beta 2m$ линии мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3E):10–24. [Karkischenko N.N., Glotova E.S., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A., Petrov D.V., Vasil'eva I.A., Deryabin K.E. Geneticheskij skringing novej transgennoj gumanizirovan-

- noj po *HLA-A*02:01:01:01* i h β 2m linii myshej [Genetic Screening of a New Transgenic Mouse Line Humanized for *HLA-A*02:01:01:01* and h β 2m]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2023;19(3E):10–24. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-C*07:02:01:01*, как прообраз инновационных трансгенно-нокаутных биомоделей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya gumaniizirovannykh transgennykh myshej, nesushchih gen *HLA-S*07:02:01:01*, kak proobraz innovatsionnykh transgenno-nokautnykh biomodelej [Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with *HLA-C*07:02:01:01*, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)].
 4. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novoj gumaniizirovannoj transgennoj linii myshej s integrirovannym genomom cheloveka *HLA A*02:01:01:01* [Embryological Aspects of Creation of a New Humanized Transgenic Mice with Integrated human *HLA A*02:01:01:01* gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)].
 5. Bailey S.L., Carpentier P.A., McMahon E.J., Begolka W.S., Miller S.D. Innate and Adaptive Immune Responses of the Central Nervous System. *CRI*. 2006;26(2). DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v26.i2.40.
 6. Boulanger L.M., Shatz C.J. Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004;5(7):521–531. DOI: 10.1038/nrn1428.
 7. Cotsapas C., Voight B.F., Rossin E., et al. Pervasive Sharing of Genetic Effects in Autoimmune Disease. *PLoS Genet.* 2011;7(8):e1002254. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002254.
 8. Cullheim S., Thams S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Research Reviews*. 2007;55(1):89–96. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.03.012.
 9. Fernando M.M.A., Stevens C.R., Walsh E.C., et al. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. Fisher EMC, ed. *PLoS Genet.* 2008;4(4):e1000024. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000024.
 10. Goddard C.A., Butts D.A., Shatz C.J. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(16):6828–6833. DOI: 10.1073/pnas.0702023104.
 11. Huh G.S., Boulanger L.M., Du H., Riquelme P.A., Brotz T.M., Shatz C.J. Functional Requirement for Class I MHC in CNS Development and Plasticity. *Science*. 2000;290(5499):2155–2159. DOI: 10.1126/science.290.5499.2155.
 12. Illing P.T., Vivian J.P., Dudek N.L., et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature*. 2012;486(7404):554–558. DOI: 10.1038/nature11147.
 13. Jagarlamudi K.K., Moreau L., Westberg S., Rönnerberg H., Eriksson S. A New Sandwich ELISA for Quantification of Thymidine Kinase 1 Protein Levels in Sera from Dogs with Different Malignancies Can Aid in Disease Management. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0137871. DOI: 10.1371/journal.pone.0137871.
 14. Jones J.S., Partridge L. Population genetics: Tissue rejection: the price of sexual acceptance? *Nature*. 1983;304(5926):484–485. DOI: 10.1038/304484a0.
 15. Matsuo R., Asada A., Fujitani K., Inokuchi K. LIRF, a Gene Induced during Hippocampal Long-Term Potentiation as an Immediate-Early Gene, Encodes a Novel RING Finger Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289(2):479–484. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5975.
 16. McCormack M., Alfirevic A., Bourgeois S., et al. *HLA-A*3101* and Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions in Europeans. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(12):1134–1143. DOI: 10.1056/NEJMoa1013297.
 17. Nagami K., Matsumoto H., Maki E., et al. Experimental methods for immunization and challenge in antigenicity studies in guinea pigs. *J. Toxicol. Sci.* 1995;20(5):579–594. DOI: 10.2131/jts.20.5.579.
 18. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974;22(12):1084–1091. DOI: 10.1177/22.12.1084.
 19. Ohtsuka M., Inoko H., Kulski J.K., Yoshimura S. Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC Genomics*. 2008;9(1):178. DOI: 10.1186/1471-2164-9-178.
 20. O’Keefe G.M., Nguyen V.T., Benveniste E.N. Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *Journal of NeuroVirology*. 2002;8(6):496–512. DOI: 10.1080/13550280290100941.
 21. Pandit L., Ban M., Sawcer S., et al. Evaluation of the established non-MHC multiple sclerosis loci in an Indian population. *Mult. Scler.* 2011;17(2):139–143. DOI: 10.1177/1352458510384011.
 22. Patiño-Lopez G., Hevezi P., Lee J., et al. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8⁺ T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 2006;171(1–2):145–155. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.09.017.

23. Raha-Chowdhury R., Andrews S.R., Gruen J.R. CAT 53: A protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit encoded in the MHC Class I region strongly expressed in regions of the brain involved in memory, learning, and Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research*. 2005;138(1):70–83. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2005.04.001.
24. Raychaudhuri S., Sandor C., Stahl E.A., et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2012;44(3):291–296. DOI: 10.1038/ng.1076.
25. Sasazuki T., Juji T., Morishima Y., et al. Effect of Matching of Class I HLA Alleles on Clinical Outcome after Transplantation of Hematopoietic Stem Cells from an Unrelated Donor. *N. Engl. J. Med.* 1998;339(17):1177–1185. DOI: 10.1056/NEJM 199810223391701.
26. The International HIV Controllers Study. The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation. *Science*. 2010;330(6010):1551–1557. DOI: 10.1126/science. 1195271.
27. Tonelli L.H., Postolache T.T., Sternberg E.M. Inflammatory genes and neural activity: involvement of immune genes in synaptic function and behavior. *FBL*. 2005;10(1):675–680. DOI: 10.2741/1562.
28. Wright P.F., Nilsson E., Van Rooij E.M.A., Lelenta M., Jeggo M.H. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis: -EN- -FR- -ES-. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 1993;12(2):435–450. DOI: 10.20506/rst.12.2.691.
29. Xiao B.G., Link H. Immune regulation within the central nervous system. *Journal of the Neurological Sciences*. 1998;157(1):1–12. DOI: 10.1016/S0022-510X(98)00049-5.
30. Ziegler A., Kentenich H., Uchanska-Ziegler B. Female choice and the MHC. *Trends in Immunology*. 2005;26(9):496–502. DOI: 10.1016/j.it.2005.07.003.
31. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. The discovery of MHC restriction. *Immunology Today*. 1997;18(1):14–17. DOI: 10.1016/S0167-5699(97) 80008-4.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: berzina07@mail.ru

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: berzina07@mail.ru

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Nataliya V. Petrova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Глотова Елена Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Elena S. Glotova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Петров Дмитрий Валерьевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Dmitry V. Petrov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Болотских Любовь Александровна, к.с.-х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Lubov' A. Bolotskih, Cand. Sci. (Agricult.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: kichi09@mail.ru

Nadezhda A. Laryushina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kichi09@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ИЗУЧЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА У ТРАНСГЕННЫХ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ HLA-A*02:01 НА ВВЕДЕНИЕ АНТИГЕНА — IgG ЛОШАДИ

В.Н. Каркищенко, А.Г. Берзина*, И.А. Помыткин, Е.С. Глотова, М.А. Савина,
Д.В. Петров, Л.А. Таболякова, Л.А. Болотских, И.А. Васильева

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Введение трансгена может иметь негативное влияние на функционирование жизненно важных систем организма биомодели. Нами был проведён сравнительный анализ иммунного ответа мышей гуманизированной трансгенной линии HLA-A*02:01 и мышей, нокаутных по гену $\beta 2$ -микроглобулина мыши, полученных в НЦБМТ ФМБА России, в сравнении с мышами дикого типа в ответ на введение антигена — иммуноглобулина лошади. У животных линии HLA-A*02:01 и мышей дикого типа был получен максимальный иммунный ответ, который был достигнут на 30-й день от начала иммунизации. Титры антител у данных групп резко увеличились и стали близки — 1:8000000 и 1:4000000 соответственно — это показывает, что модификация генома у трансгенных гуманизированных мышей линии HLA-A*02:01 не повлияла на функционирование иммунной системы. У мышей, нокаутных по гену $\beta 2$ -микроглобулина мыши, подобной динамики увеличения титров антител не наблюдалось. На 7-й день титр антител в этой группе увеличился до значения 1:400 и к 30-му дню составил 1:6400. Слабый иммунный ответ у мышей с нокаутом по гену $\beta 2$ -микроглобулина мыши подтверждает неоспоримо важную роль этого белка в формировании иммунного ответа.

Ключевые слова: антитела, антиген, иммунный ответ, иммуноферментный анализ, трансгенные мыши, нокаутные мыши, HLA-A*02:01, $\beta 2$ -микроглобулин

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Берзина А.Г., Помыткин И.А., Глотова Е.С., Савина М.А., Петров Д.В., Таболякова Л.А., Болотских Л.А., Васильева И.А. Изучение иммунного ответа у трансгенных гуманизированных мышей линии HLA-A*02:01 на введение антигена — IgG лошади. *Биомедицина*. 2024;20(2):45–52. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-45-52>

Поступила 01.04.2024

Принята после доработки 21.05.2024

Опубликована 10.06.2024

IMMUNE RESPONSE IN HLA-A*02:01 TRANSGENIC HUMANIZED MICE TO THE INTRODUCTION OF HORSE IgG ANTIGEN

Vladislav N. Karkischenko, Asya G. Berzina*, Igor A. Pomytкин, Elena S. Glotova,
Maria A. Savina, Dmitry V. Petrov, Lidiya A. Taboyakova,
Lubov' A. Bolotskih, Irina A. Vasil'eva

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

The introduction of a transgene can impact negatively the functioning of vital systems in biomodels. We carried out a comparative analysis of the immune response of mice of the HLA-A*02:01 humanized transgenic line, mice with mouse β 2-microglobulin gene knockout, and wild-type mice to the introduction of horse immunoglobulin as an antigen. The biomodel lines were created at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia. The maximum immune response was achieved on the 30th day from the onset of immunization in animals of the HLA-A*02:01 line and wild-type mice. Antibody titers in these groups increased sharply and approached 1:8,000,000 and 1:4,000,000, respectively. This indicates that genome modification in HLA-A*02:01 transgenic humanized mice did not affect functioning of the immune system. No similar dynamics of the increase in antibody titers was observed in the mice line with mouse β 2-microglobulin gene knockout. On the 7th and 30th day, the antibody titer in this group increased to a value of 1:400 and 1:6,400, respectively. The weak immune response in mice with mouse β 2-microglobulin gene knockout confirms the undeniably important role of this protein in immune response formation.

Keywords: antibodies, antigen, immune response, enzyme-linked immunosorbent assay, transgenic mice, knockout mice, HLA-A*02:01, β 2-microglobulin

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Karkischenko V.N., Berzina A.G., Pomytkin I.A., Glotova E.S., Savina M.A., Petrov D.V., Taboyakova L.A., Bolotskih L.A., Vasil'eva I.A. Immune Response in HLA-A*02:01 Transgenic Humanized Mice to the Introduction of Horse IgG Antigen. *Journal Biomed.* 2024;20(2):45–52. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-45-52>

Submitted 01.04.2024

Revised 21.05.2024

Published 10.06.2024

Введение

Реактивность иммунной системы экспериментальных животных, используемых при разработке новых лекарственных препаратов, играет важную роль в выборе адекватной биомодели и планировании доклинических исследований, интерпретации полученных результатов, а также понимании механизмов биологического ответа до начала клинических испытаний.

В настоящее время в медицинской практике широко используются моноклональные антитела (МКАТ) для лечения различных заболеваний и патологических состояний человека. Однако подобная иммунотерапия может приводить к опасным осложнениям, т.к. иммунная система человека способна вырабатывать антитела против таких терапевтических препаратов, а предсказать теоретически их влияние на эффективность препарата и побочные эффекты таких антилекарственных антител очень трудно. Проведение доклинических

испытаний *in vivo* позволяет прогнозировать вероятность появления осложнений, однако такие исследования осложняются тем, что у животных дикого типа любой человеческий белок вызывает иммунную реакцию, что приводит нас к необходимости тщательного подбора адекватной и релевантной биомодели.

На сегодня питомники предлагают большой выбор экспериментальных животных для различных исследований. Развитие технологий направленного активного редактирования генома позволило исследователям создавать уникальные биомодели, наиболее точно отражающие патологические состояния. Переход от выбора среди существующих к возможности создания биомодели под конкретный эксперимент позволяет наиболее детально исследовать поставленный вопрос.

Повсеместное применение трансгенных и/или нокаутных животных породило лавину научных и прикладных сведений,

которые ранее невозможно было получить при использовании стандартных подходов. Создание биомоделей, отражающих этнические, географические особенности различных групп населения, позволяет минимизировать возможные побочные эффекты терапии, делая её более безопасной и эффективной, что является важным этапом на пути к персонализированной медицине будущего.

В НЦБМТ ФМБА России был создан ряд биомоделей [1–4], отражающих биохимические и популяционные аспекты населения. В частности, нами была создана линия гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*02:01* [4]. Данная биомодель отражает особенности иммунного ответа, ассоциированного с аллелью главного комплекса гистосовместимости (МНС) человека I класса HLA-A*02:01. Такие животные могут быть использованы в различных исследованиях как фундаментальной, так и научно-прикладной направленности, например тестировании вакцин нового поколения, фармакобезопасности и иммуногенности лекарственных препаратов, исследованиях в области онкологии и трансплантологии и многих других.

Использование трансгенных гуманизированных животных, которые экспрессируют человеческие молекулы МНС I класса, позволяет проводить тестирование препаратов в условиях, наиболее приближенных к реальным, т.к. предполагается, что иммунный ответ у таких гуманизированных животных должен быть аналогичен таковому у человека. В свою очередь, исследователи и разработчики трансгенных животных должны быть уверены, что встраиваемые гены работают корректно и не наносят вреда иммунной системе экспериментальных животных, а эффекторные иммунные клетки таких генно-модифицированных особей способны взаимодействовать с модифицированным рецептором МНС I класса и формировать адекватный иммунный ответ.

Целью настоящей работы стало изучение иммунного ответа у гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*02:01*, по сравнению с особями дикого типа и мышами с нокаутом гена $\beta 2$ -микроглобулина, в ответ на иммунизацию коммерческим препаратом иммуноглобулина лошади.

Для оценки уровня антител к различным антигенам как у человека, так и у животных широко используются иммунохимические методы, в частности, иммуноферментный анализ (ИФА) широко применяется в медицинской практике для выявления различных антител. Непрямой вариант ИФА позволяет с высокой точностью определить титр антител в сыворотках крови испытуемых. Полученные показатели позволяют получить представление о реактивности иммунной системы организма, что играет важную роль в понимании механизмов и прогнозировании развития иммунного ответа.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В работе использовались следующие линии мышей: гуманизированной трансгенной линии с интегрированным геном *HLA-A*02:01*, представляющей аллель человеческого МНС I класса HLA-A-, линии, нокаутной по гену $\beta 2$ -микроглобулина мыши ($\beta 2m$ mus ko), полученные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [4], а также гибриды F1 CBA/lac \times C57BL/6, полученные из филиала «Столбовая», которые являются генетическим фоном для анализируемых в данной работе трансгенной и нокаутной линий (для удобства чтения в тексте обозначены как WT или F1). Для получения F2 и следующих поколений плеядра формировали из подтверждённых особей предыдущего поколения по технологии инбредного скрещивания. Животные соответствовали категории улучшенных конвенциональных. Группы формировались методом пар-аналогов, по 6 особей в группе.

Сформированные группы содержались в системе индивидуальных вентилируемых клеток при световом режиме 12/12 со свободным доступом к корму и воде, по 2 особи в клетке. Условия содержания соответствовали стандартным зоотехническим нормам, применяемым для лабораторных мышей.

Схема эксперимента

Исследование по определению иммунного ответа на вводимый антиген — коммерческий препарат γ -глобулина лошади (IgG horse, “Sigma-Aldrich”, США) проводили на 18 взрослых мышах в возрасте 2 мес., разделённых на 3 группы (n=6): I группа — трансгенные мыши линии HLA-A*02:01, II группа — мыши линии, нокаутной по гену β 2-микроглобулина мыши (β 2m mus ko), III группа — F1 (CBA/lac \times C57BL/6, WT). Всем животным вводили антиген в дозе 25 мкг/мышь по схеме, которая включала две подкожные инъекции с интервалом 14 дней. Антиген вводили в одну точку в объёме 0,1 мл. Препарат для иммунизации с концентрацией 0,25 мг IgG horse готовили на физ. р-ре в смеси 1:1 с полным адьювантом Фрейнда (“Sigma-Aldrich”, США). Полный адьювант Фрейнда (ПАФ) использовали только при первой инъекции, далее вводили антиген в той же концентрации в физ. р-ре без адьюванта. Заборы крови у мышей осуществляли прижизненно стеклянным капилляром по 0,2 мл из ретроорбитально-го сплетения на 7, 14, 21 и 30-й день от начала иммунизации.

Биоматериал для анализа

Для анализа иммунного ответа использовали сыворотку крови. Кровь брали в пробирки с активатором свёртывания, затем выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови мышей получали путем центрифугирования крови при 3000 об./мин в течение 15 мин. Хранение осуществляли при -20°C.

Непрямой иммуноферментный анализ

Анализ индивидуальных сывороток крови мышей на наличие специфических антител к иммуноглобулину лошади проводили с помощью непрямого метода ИФА по стандартной методике [8]. Адсорбцию антигена (с=5 мкг/мл) в лунках полистирольных 96-луночных планшетов (“Dynatech”, Швейцария) проводили в 0,05 М Na-карбонатном буфере (pH=9,5) при +4°C в течение ночи. Для блокировки неспецифической реакции в буфер (PBST) добавляли 0,3% бычьего сывороточного альбумина (BSA). После стадии отмывки в лунки планшетов вносили сыворотки крови испытуемых мышей, используя двукратные разведения в буфере PBST. Инкубацию проводили в течение 1 ч при 37°C. Для выявления реакции антиген-антитело использовали иммунопероксидазный антивидовой конъюгат Anti-Mouse IgG+Ph (“Sigma-Aldrich”, США) в разведении 1:4000. Инкубацию проводили при +37°C 45 мин. В качестве субстрата пероксидазы использовали р-р тетраметилбензидина (ТМБ, ООО «Абисенс», Россия). Оптическую плотность окрашенного продукта ферментативной реакции измеряли на планшетном мультимодальном ридере Feyond-A400 (“Allsheng”, Китай) при длине волны 450 нм. За величину титра принимали максимальное разведение сыворотки крови мышей, при котором оптическая плотность (OP_{450}) окрашенного продукта ферментативной реакции превышала значения в контроле в 3 раза. Отрицательным контролем в реакции ИФА служила сыворотка крови неиммунной мыши.

Обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ GraphPad Prism.

Результаты и их обсуждение

В настоящей работе было проведено сравнение гуморального иммунного ответа

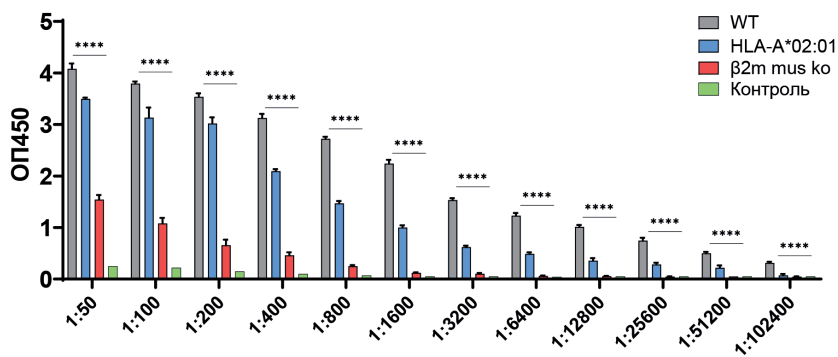


Рис. Сравнение гуморального иммунного ответа на вводимый антиген у экспериментальных групп на 7-й день после начала иммунизации. Среднее ± стандартное отклонение (n=6). **** — $p < 0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, множественные сравнения Тьюки).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения сыворотки крови.

Fig. Comparison of the humoral immune response to the administered antigen in the experimental groups on the 7th day after the onset of immunization. Mean ± standard deviation (n=6). **** — $p < 0,0001$ (two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons).

Note: the x-axis shows blood serum dilutions.

у трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 по показателям титров специфических антител к вводимому антигену — иммуноглобулину лошади, с аналогичным ответом у мышей WT и мышей, нокаутных по гену β2-микроглобулина мыши (β2m mus ko). Было выявлено, что развитие иммунной реакции на гетероантиген у групп HLA-A*02:01 и WT в значительной мере совпадает. На рисунке представлены результаты тестирования сывороток крови экспериментальных мышей непрямым методом ИФА на 7-й день от начала иммунизации.

Титры антител в группах трансгенных мышей и мышей WT различались в 4 раза: 1:25600 и 1:102400 соответственно. Как видно из рисунка, у мышей, нокаут-

ных по гену β2-микроглобулина мыши (β2m mus ko), выработка антител была резко снижена, титр антител составил 1:400, что свидетельствует о нарушениях в работе клеток, ответственных за синтез иммуноглобулинов, и подчеркивает важность белка β2-микроглобулина в развитии иммунного ответа.

Увеличение нагрузки на иммунную систему путем дополнительных инъекций антигена оказалось эффективным приемом и позволило оценить динамику функциональной активности иммунокомпетентных клеток. В таблице представлены результаты изучения динамики иммунного ответа мышей 3-х экспериментальных групп по результатам определения титров специфиче-

Таблица. Продукция специфических антител к IgG лошади у мышей экспериментальных групп на 7-й, 14-й, 21-й и 30-й день от начала иммунизации

Table. Production of specific antibodies to horse IgG in mice of experimental groups on the 7th, 14th, 21th, and 30th day from the onset of immunization

Группа	Титр антител			
	7-й день	14-й день	21-й день	30-й день
HLA-A*02:01	1:25600	1:51200	1:819200	1:8000000
β2m mus ko	1:400	1:800	1:3200	1:6400
WT	1:102400	1:204800	1:409600	1:4000000

ских антител к иммуноглобулину лошади в сыворотках крови на 7, 14, 21 и 30-й день от начала иммунизации методом непрямо-го ИФА.

Максимальные показатели иммунного ответа у животных групп HLA-A*02:01 и WT были достигнуты на 30-й день от начала иммунизации. При этом титры антител в данных группах стали близки по значениям — 1:8000000 и 1:4000000 соответственно. Развитие иммунного ответа у нокаутных мышей шло медленными темпами от 1:400 до 1:6400 к 30-му дню от начала иммунизации. Следует отметить, что наличие высоких титров антител к IgG лошади в сыворотках крови трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 никоим образом не повлияло на их физиологическое состояние и поведение. Морфология органов иммунной системы (селезенки и лимфоузлов) не имела патологических изменений по окончании эксперимента.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными по изучению иммунного ответа у трансгенных животных. Так, в литературе имеются данные об изучении иммунного ответа к различным антигенам у трансгенных животных — мышей [5, 7] и мини-пигов [6]. Авторами работы [6] было показано, что у гуманизированных мини-пигов иммунный ответ не нарушался при выработке антител к рекомбинантным терапевтическим антителам, используемым в медицинской практике. Авторы проверили, как наличие трансгена повлияло на иммунную систему: мини-пиги не страдали от повышенной инфекционной нагрузки, морфология селезенки, костного мозга и лимфоузлов осталась прежней. Реакция на модельный антиген — гемоцианин улитки — оказалась нормальной.

В наших исследованиях модельным антигеном был выбран иммуноглобулин лошади, поскольку в медицинской практике широкое применение нашли вакцинные препараты — антирабический и антимоцитарный лошадиный иммуноглобулин. Реакция трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 на иммунизацию иммуноглобулином лошади оказалась нормальной, что свидетельствует о возможности применения данной линии для выполнения исследований широкого профиля, в т.ч. в области фармакобезопасности, онкологии и при тестировании вакцин и лекарственных препаратов.

Выводы

Таким образом, на основании проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Мыши трансгенной гуманизированной линии HLA-A*02:01 в экспериментах по иммунизации препаратом IgG лошади показали способность синтезировать специфические IgG-антитела в высоких титрах (1:8000000).
2. В группе WT иммунный ответ был несколько ниже, титр антител к вводимому антигену составил 1:4000000.
3. Иммунизация мышей, нокаутных по гену $\beta 2$ -микроглобулина мыши, приводила к низкому уровню титра специфических IgG-антител (1:6400) на 30-й день от начала иммунизации.
4. Количественная оценка гуморального звена иммунитета по величине титра образующихся специфических антител к IgG лошади после иммунизации мышей позволяет сделать вывод о том, что модификация генома у трансгенных гуманизированных мышей линии HLA-A*02:01 не повлияла на функционирование иммунной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семёнов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека *NAT1* и *NAT2*. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskih L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabih V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov N.N. Sozdaniye liniy transgennykh zhivotnykh-modelej s genami cheloveka *NAT1* i *NAT2* [Creation of lines of transgenic animal models with human *NAT1* and *NAT2* genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами *NAT1* и *NAT2* человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabih V.P., Bolotskih L.A., Semenov N.N., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami *NAT1* i *NAT2* cheloveka [Physiological and Embryological Aspects of Creation of Transgenic Mice with Integrated Human *NAT1* and *NAT2* Genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:52–65. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-C*07:02:01:01*, как прообраз инновационных трансгенно-нокаутных биомоделей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya humanizirovannykh transgennykh myshej, nesushchih gen *HLA-C*07:02:01:01*, kak proobraz innovatsionnykh transgenno-nokautnykh biomodelej [Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with *HLA-C*07:02:01:01*, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)].
4. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novoy humanizirovannoy transgennoj linii myshej s integrirovannym genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Embryological Aspects of Creation a New Humanized Transgenic Mice with Integrated human *HLA-A*02:01:01:01* gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)].
5. Chuprin J., Buettner H., Seedhom M.O., et al. Humanized mouse models for immuno-oncology research. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2023;20(3):192–206. DOI: 10.1038/s41571-022-00721-2.
6. Flisikowska T., Egli J., Flisikowski K., et al. A humanized minipig model for the toxicological testing of therapeutic recombinant antibodies. *Nat. Biomed. Eng.* 2022;6(11):1248–1256. DOI: 10.1038/s41551-022-00921-2.
7. Scardino A., Correale P., Firat H., et al. In vivo study of the GC90/IRIV vaccine for immune response and autoimmunity into a novel humanized transgenic mouse. *Br. J. Cancer.* 2003;89(1):199–205. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601028.
8. Wright P.F. International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests for antibody detection. *Rev. Sci. Tech.* 1998;17(2):527–549. DOI: 10.20506/rst.17.2.1118.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: berzina07@mail.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: berzina07@mail.ru

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: ipomytkin@mail.ru

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: ipomytkin@mail.ru

Глотова Елена Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: savelaine@gmail.com

Elena S. Glotova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: savelaine@gmail.com

Савина Мария Анатольевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: graff22@mail.ru

Maria A. Savina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: graff22@mail.ru

Петров Дмитрий Валерьевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: 1941-65@mail.ru

Dmitry V. Petrov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: 1941-65@mail.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Болотских Любовь Александровна, к.с.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Lubov' A. Bolotskih, Cand. Sci. (Agric.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: rozhtstul@mail.ru

Irina A. Vasil'eva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: rozhtstul@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ПОВЫШЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К β 2-МИКРОГЛОБУЛИНУ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДАХ АНАЛИЗА

Н.Н. Каркищенко¹, В.А. Езерский², О.Б. Жукова², Е.М. Колоскова^{2*}, Н.В. Петрова¹

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных —
филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

Высокоспецифичные реагенты — белки и антитела к ним — необходимые компоненты систем верификации эффективности функционирования трансгенных/нокаутных животных биомоделей. В частности, идентификация β 2-микроглобулина мыши и человека в белковых фракциях органов и тканей трансгенных и нокаутных по гену β 2-микроглобулина мышей нескольких HLA-линий, созданных в последние годы в НЦБМТ ФМБА России, является важнейшим этапом их паспортизации. На первом этапе наших исследований были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных β 2-микроглобулина мыши и человека (m β 2mg и h β 2mg), белки выделены и очищены. На следующем этапе работы получены аффинные сорбенты с иммобилизованными m β 2mg и h β 2mg. Для повышения видовой специфичности сыворотки «кролик-анти-h β 2mg» были истощены против рекомбинантного белка m β 2mg, и, напротив, «кролик-анти-m β 2mg» истощали против рекомбинантного белка h β 2mg. Высокоспецифичные антитела были очищены из истощенных сывороток на аффинных сорбентах. Методами дот- и вестерн-блоттинга на примере истощенных и аффинно-очищенных антител «кролик-анти-h β 2mg» было показано значительное повышение их специфичности относительно h β 2mg.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, β 2-микроглобулин мыши и человека, антиген, антитела, истощение антител, иммунизация

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*рХ человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Петрова Н.В. Повышение специфичности поликлональных антител к β 2-микроглобулину человека и мыши как альтернатива использованию моноклональных антител в иммунологических методах анализа. *Биомедицина*. 2024;20(2):53–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-53-65>

Поступила 20.03.2024

Принята после доработки 25.04.2024

Опубликована 10.06.2024

INCREASING THE SPECIFICITY OF POLYCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN AND MOUSE β 2-MICROGLOBULIN AS AN ALTERNATIVE TO THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNOLOGICAL ANALYSIS

Nikolay N. Karkischenko¹, Vadim A. Ezerskiy², Olga B. Zhukova²,
Elena M. Koloskova^{2,*}, Nataliya V. Petrova¹

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

²All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry —
All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

Highly specific reagents, i.e., proteins and antibodies to them, are the necessary components of systems for verifying the effectiveness of transgenic/knockout animal biomodels. In particular, the identification of mouse and human β 2-microglobulin in the protein fractions of organs and tissues of transgenic and β 2m knockout mice of several HLA lines, which have been created in recent years at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia, is the most important stage of their certification. At the first stage of our research, *E. coli* producing strains of recombinant mouse and human β 2-microglobulin (m β 2mg and h β 2mg) were obtained, the proteins were isolated and purified. At the next stage of the work, affine sorbents with immobilized m β 2mg and h β 2mg were obtained. To increase the species specificity of the serum, “rabbit-anti-h β 2mg” were depleted against the recombinant protein m β 2mg, and, conversely, “rabbit-anti-m β 2mg” were depleted against the recombinant protein h β 2mg. Highly specific antibodies were purified from depleted sera using affinity sorbents. Using dot- and western-blotting methods on the example of depleted and affinity-purified rabbit-anti-h β 2mg antibodies, a significant increase in their specificity relative to h β 2mg was shown.

Keywords: recombinant protein, mouse and human β 2-microglobulin, antigen, antibodies, antibody depletion, immunization

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research topic “Generation of a new line of humanized transgenic mice carrying the human HLA-A*pX gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknockout-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko N.N., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Petrova N.V. Increasing the Specificity of Polyclonal Antibodies to Human and Mouse β 2-Microglobulin as an Alternative to the Use of Monoclonal Antibodies in Immunological Analysis. *Journal Biomed.* 2024;20(2):53–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-53-65>

Submitted 20.03.2024

Revised 25.04.2024

Published 10.06.2024

Введение

Трансгенные гуманизированные животные, в т.ч. и с нокаутом собственных генов, находят все большее применение для биомедицинских исследований, фармакологических испытаний. Доказательная база интеграции трансгена, детекция трансляции

целевого белка в разных органах и тканях, доказательство отсутствия синтеза белка (или его нефункциональность) нокаутированного гена невозможна без высокоспецифичных реагентов — белков-антигенов и антител к ним.

В последние годы в НЦБМТ ФМБА России были созданы несколько HLA-линий трансгенных и нокаутных по гену $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2mg$) мышей [1–5], в связи с чем поставлена задача идентификации $\beta 2mg$ мыши и человека ($m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ соответственно) не только на уровне ДНК-мРНК, но и в белковых фракциях органов и тканей животных полученных линий. Аминокислотный анализ $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ показал 32% несовпадений у белков-предшественников (119 аминокислот (АК), из них 20 АК — сигнальный пептид). Это дает основания полагать, что спектры поликлональных антител, вырабатываемых на $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$, как антигены при иммунизации животных будут иметь отличия благодаря несовпадающим эпитопам: в результате технологических манипуляций появляется возможность получения видоспецифических антител к $\beta 2mg$.

На первом этапе наших исследований были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$. Нуклеотидные последовательности генов были адаптированы для синтеза в бактериальной системе, рекомбинантные белки, $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$, очищены и наработаны в количествах, необходимых для получения аффинных сорбентов и иммунизации животных.

$\beta 2mg$ представляет собой белок с молекулярной массой 11,8 кДа, состоящий из 99 аминокислотных остатков (119 АК — вместе с сигнальным белком). Он синтезируется во всех ядродержащих клетках организма и играет важную роль в образовании комплекса МНС I класса (МНС-I), клеточном иммунитете. Тяжелая цепь МНС-I представлена доменами $\alpha 1$, $\alpha 2$ (образующими антигенсвязывающую часть комплекса) и $\alpha 3$. Домен $\alpha 3$ имеет иммуноглобулиновую укладку, такую же как соседний $\beta 2mg$, который синтезируется отдельно и стабилизирует комплекс. Химерная молекула, продукт трансгена, использованного

при получении наших трансгенных гуманизированных линий мышей, имеет нативный, мышинный домен $\alpha 3$, человеческие домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ а также $h\beta 2mg$, связанный с $\alpha 1$ глицин-сериновым линкером [2, 3].

Имуноглобулинподобные рецепторы киллерных клеток (KIR), экспрессирующиеся на мембране цитотоксических клеток, регулируют функцию уничтожения зараженных или трансформированных клеток путем взаимодействия с комплексами МНС-I, экспрессирующихся на всех типах клеток с ядрами. Конформационные изменения, происходящие в дистальной, пептидсвязывающей области молекулы МНС-I при замене $m\beta 2mg$ на $h\beta 2mg$, влияют на способность KIR взаимодействовать с МНС-I [7]. Сохранение топологической структуры, присущей пептидпрезентирующей части HLA-молекулы, обеспечивается в химерных молекулах наших трансгенных мышей $h\beta 2mg$ в их составе.

Если на поверхности клеток будут присутствовать оба варианта молекул, определить это можно с помощью вестерн-блотгибридизации. С использованием антител (АТ), специфичных к молекулам HLA (например, моноклональных антител ab23755 или ab70328, «Abcam», США), можно обнаружить присутствие химерных молекул (молекул, содержащих тяжелую цепь HLA класса I) на поверхности клеток. С помощью **поликлональных** АТ к молекулам $\beta 2mg$ при наличии кросс-реактивности способны обнаруживаться как химерная молекула (56 кДа), так и нативный $m\beta 2mg$ (12 кДа). Если использовать АТ, специфичные к $\alpha 3$ -домену комплекса H2, возможно определить присутствие/отсутствие как нативных молекул H2, так и химерных молекул b2m-HLA-H2, и отличить их друг от друга за счёт разницы в молекулярной массе (44 и 56 кДа) (рис. 1).

Если применение поликлональных АТ к $m\beta 2mg$ или $h\beta 2mg$ в методе вестерн-блоттинга дает нам однозначный ответ о нали-

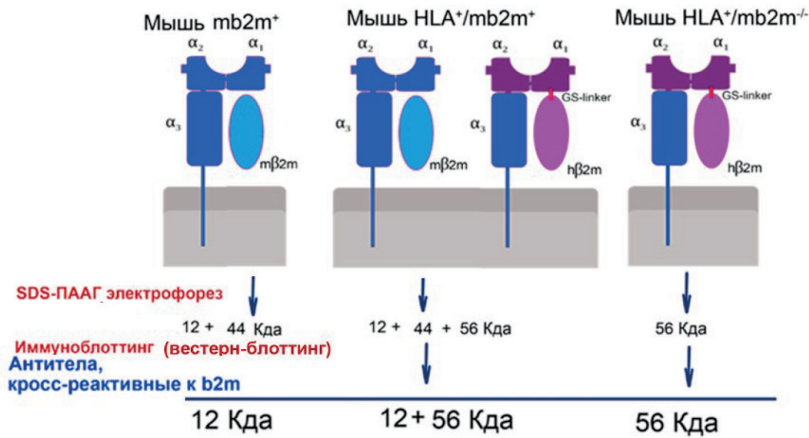


Рис. 1. Варианты вестерн-блоттинга с использованием поликлональных антител при детекции белка β₂m в органах и тканях мышей дикого типа и HLA-TG линий: 1) мыши дикого типа (B₂m⁺) — полоса 12 кДа (неслитый mb₂m); 2) HLA/B₂m⁺ — две полосы — 12 кДа (mb₂m), 56 кДа — слитый hb₂m в составе химерного белка; 3) HLA/B₂m⁻ — 56 кДа — слитый hb₂m в составе химерного белка.

Fig. 1. Western blotting variants using polyclonal antibodies for detection of β₂m protein in organs and tissues of wild-type mice and HLA-TG lines: 1) wild-type mice (B₂m⁺) — a 12 kDa band (not fused mb₂m); 2) HLA/B₂m⁺ — two bands — 12 kDa (mb₂m), 56 kDa — fused hb₂m as part of a chimeric protein; 3) HLA/B₂m⁻ — 56 kDa — fused hb₂m as part of a chimeric protein.

чии/отсутствии химерного белка и mβ₂m, для более тонких иммунных методов — иммуногистохимии, иммуноцитохимии, не требующих выделения белковой фракции и разделения молекул по размерам, необходимо использование более специфичных антител, позволяющих считать присутствие mβ₂m и/или hβ₂m в месте их «прописки».

Целью нашей работы было получение на основе поликлональных кроличьих АТ, кросс-реактивных к mβ₂m и hβ₂m, видоспецифичных антител, по эффективности приближенным к моноклональным. Нам ранее были получены штаммы-продуценты рекомбинантных mβ₂m и hβ₂m, рекомбинантные белки (РБ) наработаны и очищены. Для достижения новой поставленной цели требовалось выполнить следующие задачи:

1. Иммунизировать кроликов РБ mβ₂m и hβ₂m, получить антисыворотки с поликлональными АТ «кролик-анти-hb₂m» и «кролик-анти-mb₂m».

2. Получить сорбенты с иммобилизованными РБ mβ₂m и hβ₂m.

3. Получить кроличьи антитела, специфичные к hβ₂m (истощенные против эпитопов mβ₂m).

4. Получить кроличьи антитела, специфичные к mβ₂m (истощенные против эпитопов hβ₂m).

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 4 кроликах калифорнийской породы в возрасте 8–10 мес., массой 4–5 кг. В исследованиях придерживались требований, утвержденных протоколами исследования и стандартными операционными процедурами ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Маркировка клетки содержала данные о дате начала эксперимента, пол и номер животного. Кроликов маркировали с помощью ушных выщипов.

Содержание животных. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы

надлежащей лабораторной практики (GLP)». Кролики были размещены в индивидуальных клетках. Брикетированные комбикорма для лабораторных животных давались *ad libitum* в кормушки. Данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории. Животным давалась очищенная вода *ad libitum*.

Подготовка антигенов для иммунизации. Антигены для иммунизации: рекомбинантные белки $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$, продукты штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3): *E. coli* BL21/pET-28/ $m\beta 2mg$ и *E. coli* BL21/pET-28/ $h\beta 2mg$ (отражены в предыдущей публикации). Для иммунизации кроликов брали объединенные фракции рекомбинантного белка, снятые с колонки Ni-сефароза. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд. Для получения эмульсии 1 мг антигена доводили до объема 1,5 мл стерильным физ. р-ром и смешивали с 4,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) в 50 мл пробирках типа фалкон. С помощью ультразвукового гомогенизатора МЭФ 93.Т получали стабильную эмульсию обработкой ультразвуком 5 раз по 20 сек. с охлаждением на снегу между циклами.

Методика проведения инъекций животным. Кроликов иммунизировали внутрикожно, инъекции осуществляли в 50–60 точек вдоль хребта с обеих сторон, вводя препарат в объеме 50–100 мкл на точку. Каждым антигеном (АГ) иммунизировали по два кролика.

Забор крови у экспериментальных животных. Забор крови осуществляли у кроликов из краевой ушной вены на 62, 82 и 103-й день после инъекции, при убое животных.

Получение и хранение антисывороток. Полученную кровь инкубировали 1 ч при 37°C, далее выдерживали на холоде при 4°C в течение ночи и отделяли образовавшуюся сыворотку центрифугированием при 3000 g. К сывороткам добавляли насыщенный раствор сульфата аммония

(1:1 в объемном соотношении), получали сульфатный осадок (СО). Аликвоты сывороток по 200 мкл хранили при -20°C, СО — при 2–8°C.

Очистку рекомбинантных белков от компонентов буфера С (20 мМ Трис-HCl, 0,5 М NaCl, 8 М мочевины, 50–500 мМ имидазол, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, pH=7,9) проводили диализом против фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (20 мМ NaH_2PO_4 , 150 мМ NaCl, pH=7,4) или 0,1 М Na-бикарбонатного буфера, pH=9,5, с использованием целлюлозных мембранных мешков с порами 12000 Да. Диализ проводили при 4–8°C, при постоянном перемешивании буфера в емкости, на протяжении 14–24 ч. Буфер меняли дважды. Раствор РБ концентрировали, помещая диализный мешок на сухой Sephadex G-200.

Получение сорбента с иммобилизованным РБ. К 4 мл промытой водой сефарозы-CL-4В добавляли 8 мл 0,7 М перидата натрия. Суспензию в течение 1 ч мягко перемешивали при комнатной температуре, добавляли 4 мл 2М этиленгликоля. Через 1 ч сорбент последовательно промывали водой, 0,1 М бикарбонатным буфером, pH=9,5, вносили 4 мл концентрированного после диализа РБ ($h\beta 2mg$ или $m\beta 2mg$, 15–20 мг/мл). Реакцию продолжали при 4°C при мягком перемешивании в течение 48 ч. Сорбент с конъюгированным рекомбинантным белком промывали 0,1 М бикарбонатным буфером, pH=9,5, затем ФСБ. Оставшиеся реакционноспособные группы инактивировали р-ром боргидрида натрия в ФСБ (2 мг/мл). Реакцию продолжали при 4°C при мягком перемешивании в течение 1 ч. Сорбент промывали ФСБ, затем 5 мл 100 мМ лимонной кислоты и ФСБ с 0,1% азидом натрия. Готовый сорбент хранили при 4–8°C до использования.

Получение антивидовых конъюгатов, меченых пероксидазой хрена (ПХ). Антитела «коза-анти-кролик» были выделены из полученных ранее антисывороток

аффинной очисткой на сорбенте сефароза-IgG кролика. Антитела конъюгировали с ПХ по методу Nakane [8] с нашими модификациями. Приготовленный конъюгат хранили в 33% глицерине в трис-солевом буфере (ТСБ) в конечной концентрации 1 мг/мл при температуре -18°C. В предварительных экспериментах оценивали рабочий титр конъюгата, готовили рабочий концентрат конъюгата в «Иммуностаб плюс» производства ЗАО «Иммунотех» (Россия). Хранили при 4°C.

ИФА-анализ сывороток. В работе использовались: комплект оборудования для хроматографии производства фирмы LKB, вертикальный фотометр «Униплан» производства ЗАО «Пикон», 96-луночные полистироловые планшеты «Dunattech», ProteinA Sepharose Fast Flow «Pharmacia Biotech», 3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлорид (ТМБ) «Amresko».

Антиген (РБ hβ2mg) сорбировали в концентрации 5 мкг/мл в сорбодочном буфере (100 мМ натрий бикарбонатный буфер, рН=9,5), отмывали с этим же буфером и деионизированной водой. Блокировку проводили блокирующим раствором ООО «Иммункулус» (Россия), по окончании инкубации планшеты отмывали отмывочным буфером и деионизированной водой.

Для ИФА-анализа использовали сыворотки в разведениях, кратных двум, начиная с разведения в 4000 раз и заканчивая разведением в 512000 раз. Планшет с сыворотками после окончания инкубации отмывали, вносили конъюгат ПХ с антителами козы против иммуноглобулинов кролика (рабочее разведение 5000 раз), инкубировали при 37°C 1,5 ч, после чего планшет отмывали и вносили субстратный буфер (ТМБ с перекисью водорода) для проявления реакции. Через 15 мин при появлении голубой окраски реакцию останавливали внесением стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм

на фотометре вертикального сканирования сразу после остановки реакции.

Истощение антисывороток. Ресуспендированный сульфатный осадок сыворотки «кролик-анти-hβ2mg» центрифугировали при 10000 об./мин 10 мин при 10°C. Осадок растворяли в 20 мл трис-солевого буфера с азидом натрия (ТСБ-азид: 20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, рН=7,4, 0,1% азид натрия) и диализовали против ТСБ-азид в течение ночи при 4–8°C. Содержимое диализного мешка центрифугировали, для избавления от не растворившихся частиц супернатант пропускали через сорбент сефароза-CL4В/mb2mg, предварительно уравновешенный буфером ТСБ-азид. Сорбент промывали ТСБ-азидом до выхода на базовую линию, проскок собирали. Связавшиеся антитела снимали 0,1 М Na-цитратным буфером с рН=2,8, затем ТСБ-азидом. Процедуру повторяли еще 3 раза, последовательно избавляя антисыворотку «кролик-анти-hβ2mg» от перекрестно реагирующих АТ с mβ2mg и АТ к остаточным белкам *E. coli*. На последнем цикле истощения сорбент смешивали во флаконе с собранным проскоком и сорбцию продолжали при мягком перемешивании в течение ночи при 4°C. Сорбент вносили в колонку и проводили последний цикл истощения антисыворотки, как описано выше.

Для финальной очистки и концентрирования белка проводили аффинную хроматографию истощенной сыворотки «кролик-анти-hβ2mg» на колонке сефароза-CL-4В-hβ2mg. Сорбированные АТ снимали 0,1 М Na-цитратным буфером с рН=2,8. Фракцию, содержащую АТ, диализовали против ФСБ-азид, дважды меняя буфер. Содержимое диализного мешка центрифугировали, определяли концентрацию белка по ОП при λ_{280} . Раствор АТ «кролик-анти-hβ2mg» концентрировали с использованием колонок с размером пор 30 кДа до 2,8 мг/мл.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), дот-гибридизация, вестерн-блот. Лейкоциты крови человека и мыши

лизировали в 2% SDS, инкубировали 5 мин при 95°C и центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об./мин. К образцам РБ и лейкоцитов, нормализованных по содержанию белка, добавляли x2 буфер для образцов (4% SDS, 10% 2-меркаптоэтанол, 20% глицерин, 0,125 М Трис-НCl, pH=6,8, бромфеноловый синий 0,1%). Прогревали при 95°C.

Для дот-блоттинга подготовленные образцы r-h β 2mg и r-m β 2mg в количестве 1,5 мкл в виде пятен наносили на нитроцеллюлозную (НЦ) мембрану (Hybond-C, «Amersham Biosciences», США) с 5-кратными разведениями 1xBO. Проводили блокировку мембраны, отмывку, посадку первых истощенных АТ в разведении 1:1000, отмывку, посадку вторых АТ-ПХ, отмывку и проявку с использованием в качестве хромогенов хлорнафтола (ХН) и диаминобензидина (ДАБ).

ПААГ-SDS электрофорез проводили в 12,5% — разделяющем и 4% — концентрирующем геле. В лунку концентрирующего геля вносили 15 мкл подготовленного образца. Образцы разделяли в трис-глициновом буфере для электрофореза белков (25 мМ Tris-OH, 250 мМ глицин, 0,1% SDS). Для оценки размера белков использовали маркеры молекулярной массы Precision Plus Protein Unstained, 10–250 кДа («Bio-Rad», США). Гель после электропереноса белков окрашивали (0,125% кумасси R250; уксусная кислота 10%; метанол 50%), последовательно отмывали (50% метанол, 10% уксусная кислота и 5% метанол, 7% уксусная кислота).

После проведения электрофореза проводили полусухой перенос белков на НЦ мембрану при постоянном напряжении 25 В, продолжительностью 30 мин. Буфер для переноса — 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% v/v метанол, pH=8,3). Половину мембраны обрабатывали блокирующим р-ром, содержащим поливинилпирролидон (ООО «МБФ», Россия), вторую половину — 1% BSA в ФСБ. Инкубировали 1 ч при комнат-

ной температуре. Мембрану отмывали 2 раза по 5–10 мин в ФСБ; 0,05% Tween 20; 0,1% азид натрия (W-раствор, отмывочный раствор).

В качестве первичных АТ использовали сульфатные осадки сывороток иммунизированных кроликов в разведении 1:1000. Отмывали мембрану 3 раза по 10 мин W-раствором. Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными АТ «коза-анти-кролик-ПХ» в разведении 1:2000–1:5000. Мембрану отмывали. Проявляли с использованием 4-хлор-1-нафтола (ХН) или ДАБ в ТСБ с перекисью водорода.

Результаты и их обсуждение

Получение антисывороток. Для иммунизации кроликов была выбрана схема однократной внутрикожной иммунизации. При проведении подкожных и/или внутрикожных инъекций в несколько мест инъекции небольших объемов иммуногена/адьюванта позволяют распределить иммуноген/адьювант на большей площади поверхности. АГ медленно всасывается в кровотоки, но быстро поступает к иммунным клеткам лимфатической системы. Такая схема иммунизации приводит к более высоким титрам антител, снижает частоту возникновения тяжелой местной воспалительной реакции и абсцессов [9].

В среднем от каждого иммунизированного кролика нами было получено около 120 мл сыворотки или 240 мл сульфатного осадка.

Из **результатов ИФА-анализа** антисывороток, представленных на рис. 2, следует, что примененная нами схема иммунизации оказалась эффективной: высокий титр антител у кроликов 1 и 2 (антиген h β 2mg) сохранялся на протяжении 40 сут после иммунизации до убоя. Однако иммунный ответ у животных был индивидуален. Так, например, у кролика 1 он был практически постоянным, тогда как у кролика 2 постепенно снижался (оба кролика были иммунизированы РБ h β 2mg).

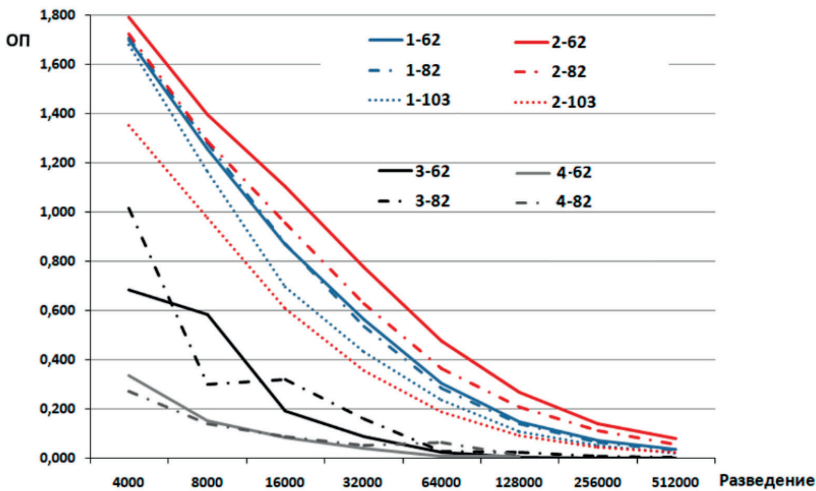


Рис. 2. Динамика титров антисывороток иммунизированных $r\text{-h}\beta 2\text{mg}$ (1, 2) и $r\text{-m}\beta 2\text{mg}$ (3, 4) кроликов в реакции с иммобилизованным антигеном $r\text{-h}\beta 2\text{mg}$. Обозначения: 1-62 — номер кролика-сутки после иммунизации.
Fig. 2. Dynamics of antiserum titers of immunized $r\text{-}\beta 2\text{m}$ (1, 2) and $r\text{m}\beta 2\text{ mg}$ (3, 4) rabbits in reaction with immobilized $r\text{-h}\beta 2\text{mg}$ antigen. Designations: 1-62 — rabbit number-day post-immunization.

Неожиданно высокой оказалась видоспецифичность неистощенных антисывороток к антигенам: ОП продуктов ИФА-реакции сывороток «кролик-анти- $m\beta 2\text{mg}$ » (кролики 3 и 4 на рис. 2) при разведениях 4000–8000 была в 3–4 раза ниже, чем у «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ ».

Истощение антисывороток. АГ для иммунизации кроликов представляет собой РБ $h\beta 2\text{mg}$ ($m\beta 2\text{mg}$) с примесями белков штамма-продуцента *E. coli* (рис. 3). Известно, что продукты контаминации *E. coli* в рекомбинантных белках влияют на иммунный ответ [6]. При иммунизации кроликов образуются антитела как к рекомбинантным, так и бактериальным белкам. Поскольку сходство РБ $h\beta 2\text{mg}$ и $m\beta 2\text{mg}$ составляет более 68% (за счет полигистидиновых тэгов, тромбинового сайта и нескольких дополнительных АК на N-конце), спектры поликлональных АТ для наших АГ будут практически одинаковы. Для повышения видоспецифичности антисыворотки должны пройти существенное истощение: избавиться от большей части идентичных антител (рис. 4).

После истощения на сорбенте с $m\beta 2\text{mg}$ оставшиеся АТ «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ » сорбировали на аффинной колонке сефароза- $h\beta 2\text{mg}$, что позволяло сконцентрировать раствор антител.

Эффективность процедуры истощения зависит от целого ряда факторов: емкость «аффинной» колонки и первоначальный объем взятой для истощения антисыворотки в нашем случае стали причиной трехкратного цикла «посадка – элюция – промывка».

В результате истощения 160 мл сульфатного осадка антисыворотки «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ » через стадии «истощение» было получено около 110 мл разбавленного р-ра антител, после аффинной хроматографии на сефарозе- $h\beta 2\text{mg}$ сняли 6 мл элюата. В результате диализа и концентрирования было получено 1,4 мл р-ра АТ «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ » с концентрацией 2,8 мг/мл.

Для зрелого $h\beta 2\text{mg}$ (99 АК) с использованием девяти анти- $\beta 2\text{mg}$ моноклональных антител были обнаружены две основные антигенные детерминанты: по остаткам 57-63 SKDWSFY и 87-97 LSQPKIVKWDR.

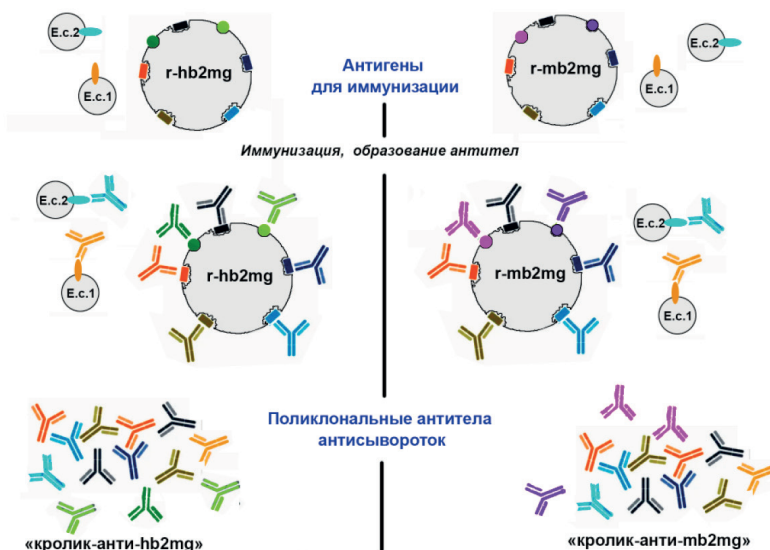


Рис. 3. Схема антигенных детерминант антигенов и их примесей, спектров поликлональных антител антисывороток «кролик-анти-hb2mg» и «кролик-анти-mb2mg». E.c.1,2 — условное обозначение белков штамма-продуцента, r-hb2mg и r-mb2mg — РБ, основные белки-антигены. На белках обозначены условные эпитопы, как общие (прямоугольные), так и специфические (кружки). Эпитопы и АТ к ним имеют общую окраску.

Fig. 3. Scheme of antigenic determinants of antigens and their impurities, spectra of polyclonal antibodies of antisera "rabbit-anti-hb2mg" and "rabbit-anti-mb2mg". E.c.1,2 is the symbol of proteins of the producer strain, r-hb2mg and r-mb2mg — RP, the main proteins are antigens. Conditional epitopes are indicated on the proteins, both general (rectangular) and specific (circles). Epitopes and their AB have a common color.

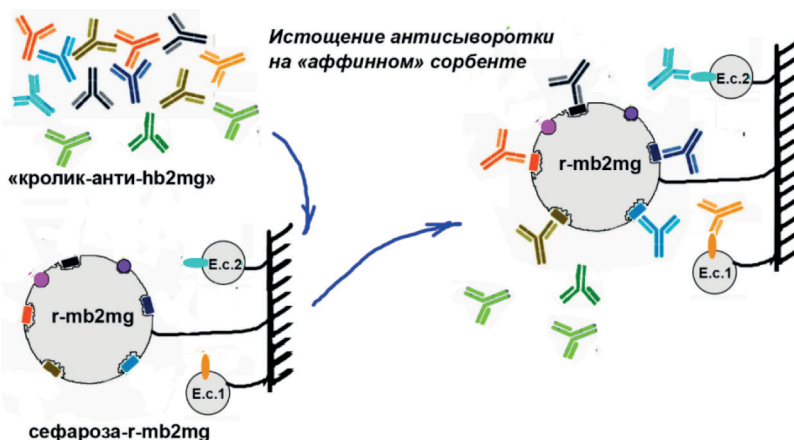


Рис. 4. Схема истощения против антигенных детерминант mb2mg и белков E. coli: антисыворотка «кролик-анти-hb2mg» подвергается очистке аффинной хроматографией на сорбенте сефароза-mb2mg, на которой, кроме РБ mb2mg, иммобилизованы и контаминирующие бактериальные белки. Антитела к видоспецифичным эпитопам hb2mg не связываются, остаются в проскоке.

Fig. 4. Depletion scheme against antigenic determinants of mb2mg and E. coli proteins: rabbit-anti-hb2mg antiserum is purified by affinity chromatography on sepharose-mb2mg sorbent, on which, in addition to RP mb2mg, contaminating bacterial proteins are immobilized. Antibodies to species-specific epitopes of hb2mg, do not bind, remain in the gap.

Эти последовательности в hβ2mg являются основными реактивными антигенными сайтами для моноклональных, а также поликлональных антител [10]. Однако при сравнении АК последовательностей зрелого белка hβ2mg и mβ2mg оказалось, что первый иммуногенный эпитоп не является видоспецифичным, у второго эпитопа 5 несовпадений из 11-ти АК, в целом идентичность зрелых белков оказалась 70% по сравнению с 68% предшественника β2mg (рис. 5). Это обстоятельство усложнило задачу: истощение антисывороток оказалось достаточно трудоемким процессом с относительно невысоким выходом высокоспецифичного продукта.

Проверка истощенных против сепароза- mβ2mg кроличьих антител к hβ2mg. В качестве первых АТ использовали сульфатные осадки «кролик-анти-hβ2mg», «кролик-анти-mβ2mg» и истощенные сыворотки «кролик-анти-hβ2mg», разведенные 1:1000, в качестве вторых антител — «коза-анти-кролик-ПХ» в разведении 1:5000 (рис. 6).

Окраска оставшихся в ПААГ после электропереноса белков массой выше 30 кДа свидетельствует об эффективном переносе из 15% геля белков с массой менее 25 кДа, но не высокомолекулярных белков. Специфичность истощенных АТ «кролик-анти-hβ2mg» (рис. 6А) выше, чем у сульфатной антисыворотки (рис. 6В), при этом

предпочтительно полученные истощенные АТ использовать в разведении более чем 1:1000. Антитела сульфатной сыворотки «кролик-анти-mβ2mg», с РБ mβ2mg реагировали заметно лучше (рис. 6С), что соответствует результатам ИФА (рис. 2).

При проверке белковой фракции лейкоцитов, выделенной из крови человека и мыши истощенные АТ «кролик-анти-hβ2mg» применяли в разведении 1:5000, 1:10000, в качестве хромогена использовали ХН, ДАБ и смесь ХН+ДАБ (рис. 7).

В выбранных условиях и разведениях наши истощенные АТ показали высокую видовую специфичность: при равном нанесении белковой фракции лейкоцитов мыши и человека для ПААГ ЭФ (дорожки остаточных белков) перекрестной реакции с β2mg мыши при выбранных разведениях не обнаружено.

Дот-блоттинг, проверка чувствительности. Подготовленные для электрофореза образцы g-hβ2mg и g-mβ2mg в количестве 1,5 мкл в виде пятен наносили на НЦ мембрану с 5-кратными разведениями 1хБО. Истощенные АТ «кролик-анти-hβ2mg» использовали в разведении 1:1000, вторые конъюгированные АТ — в разведении 1:5000. Проявляли разными хромогенами (рис. 8).

Использование ДАБ в качестве хромогена позволило повысить чувствительность детек-

Alignment statistics for match #1

NW Score	Identities	Positives	Gaps
397	69/99 (70%)	83/99 (83%)	0/99 (0%)
<u>Query 1</u>	IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSF SKDW	60	
<u>Sbjct 1</u>	..K..Q.....P...P.I....TQ...PH..IQM....KK.P...M..M.....	60	
<u>Query 61</u>	SFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWRD RM	99	
<u>Sbjct 61</u>	...I.AH.....T.T.....K.A SMAE ..T.Y.....	99	

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей зрелого белка (99 АК) β2-микроглобулина мыши (sbjct) и человека (query). Идентичность — 70%, точки соответствуют совпадениям, красные буквы — отличия. Выделены и подчеркнуты антигенные детерминанты hβ2mg, описанные в работе Уильямса и коллег [10]. Сравнения последовательностей выполнены в онлайн приложении BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Fig. 5. Comparison of amino acid sequences of mature protein (99 amino acids) of mouse β2-microglobulin (sbjct) and human (query). Identity – 70%, the dots correspond to the matches, the red letters are the differences. The antigenic determinants of hβ2mg described in the work of Williams, et al. [10] are highlighted and emphasized. Sequence comparisons are performed in the BLAST online application. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

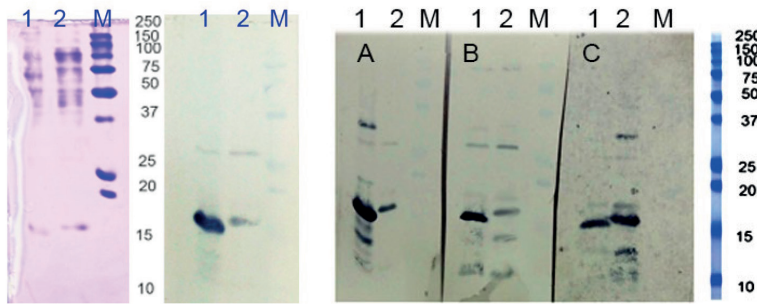


Рис. 6. ПААГ и НЦ: слева — электрофорез и вестерн-блоттинг РБ $h\beta 2mg$ (1) и $m\beta 2mg$ (2), первые антитела — истощенная сыворотка «кролик-анти- $h\beta 2mg$ ». ПААГ окрашен кумасси после электротрансфера. Справа: А) первые антитела — истощенная сыворотка «кролик-анти- $h\beta 2mg$ » в разведении 1:1000, В) первые АТ — СО «кролик-анти- $h\beta 2mg$ », С) первые АТ — СО «кролик-анти- $m\beta 2mg$ ». НЦ — окраска хлорнафтолом.

Fig. 6. PAAG and NC: on the left — electrophoresis and Western blotting RB $h\beta 2mg$ (1) and $m\beta 2mg$ (2), the first antibodies — depleted serum “rabbit-anti- $h\beta 2mg$ ”. PAAG is painted with coomassie after the electrotransfer. On the right: A) the first antibodies — depleted serum “rabbit-anti- $h\beta 2mg$ ” in a dilution of 1:1000, B) the first AB-SP — “rabbit-anti- $h\beta 2mg$ ”, C) the first AB-SP — “rabbit-anti- $m\beta 2mg$ ”. NC — chlorophthol staining.

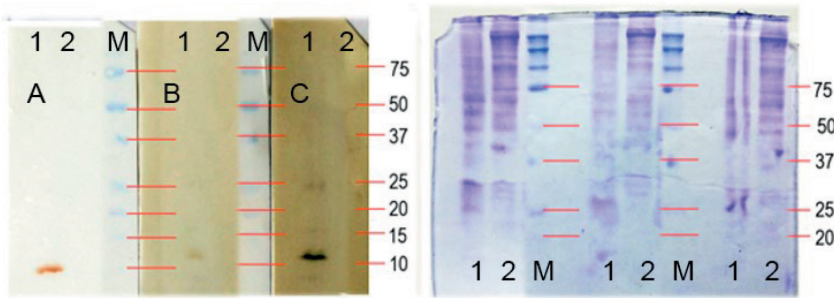


Рис. 7. НЦ и ПААГ: слева — вестерн-блоттинг белков лейкоцитов, разделенных ПААГ ЭФ. 1 — из лейкоцитов человека, 2 — из лейкоцитов мыши. А, С — разведение первых АТ 1:5000, В — 1:10000. А — окраска ДАБ; В, С — ДАБ+ХН. Справа — ПААГ, окрашенный после электропереноса.

Fig. 7. NC and PAAG: on the left — Western blotting of leukocyte proteins separated by PAAG electrophoresis. 1 — from human leukocytes, 2 — from mouse leukocytes. A, C — dilution of the first AB 1:5000, B — 1:10000. A — coloring DAB; B, C — DAB+CN. On the right — a PAAG painted after electric transfer.

ции в 25 раз. Незначительная неспецифическая реакция истощенных АТ (анти- $h\beta 2mg$) против $g-m\beta 2mg$ при выбранных разведениях образцов и первых антител сохранилась.

Заключение

На основании представленных результатов можно сделать заключение, что выполненная нами работа позволила получить кроличьи антитела, высокоспецифичные к $\beta 2mg$ человека; подобрать условия, при которых определяется только $h\beta 2mg$. Истощенные антитела «кролик-анти- $h\beta 2mg$ » работа-

ют при хорошем разведении (1:3000–6000). Антивидовые конъюгаты «коза-анти-кролик-ПХ», полученные нами, видоспецифично взаимодействуют с кроличьи антителами и работают в разведении 1:5000. Кроме того, нами были получены аффинные сорбенты с иммобилизованными рекомбинантными белками $\beta 2mg$ мыши и человека, т.е. практически создан необходимый инструментарий для иммунных методов детекции $\beta 2$ -микроглобулина мыши и человека в разнообразных прикладных исследованиях. Поликлональные

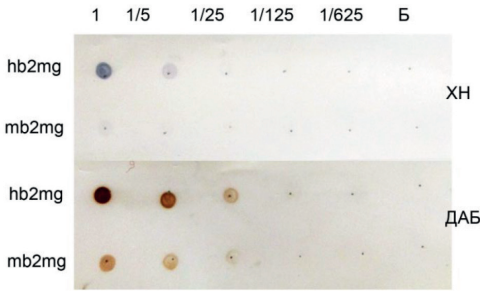


Рис. 8. Дот-блоттинг. Вверху — окраска хлор-нафтолом (ХН). Внизу — окраска диаминобензидином (ДАБ). Б — отрицательный контроль 1x БО.
Fig. 8. Dot-blotting. At the top — a chloro-naphthol (ХН) stain. Below — a diaminobenzidine stain (DAB). Б — negative control of 1x sample buffer.

кросс-реактивные к $\beta 2\text{mg}$ мыши и человека кроличьи антитела могут быть использованы в задачах, связанных с вестерн-блот-

тингом $\beta 2\text{mg}$ различных молекулярных масс: нативным зрелым белком (12 кДа), рекомбинантным белком (16 кДа), $\beta 2\text{mg}$ человека в составе химерной HLA-молекулы (56 кДа) трансгенных мышей.

На примере метода получения истощенных антител «кролик-анти-h $\beta 2\text{mg}$ » осуществляется истощение антител «кролик-анти-m $\beta 2\text{mg}$ », тем самым расширяется палитра высокоспецифичных реактивов в первую очередь для наших собственных исследований. Не исключено, что при создании новых линий трансгенных животных при необходимости верификации синтеза новых белков или подтверждении отсутствия синтеза белков нокаутированными генами нам придется создавать собственные наборы доказательной реактивной базы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumaniizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological research (successes, failures and prospects)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
- Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Sozdanie polnih gibritnih DNK-konstruktsij s genom cheloveka HLA-A*02:01:01:01 [Chimeric Construct Engineering with Human Variant HLA-A*02:01:01:01]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(1):10–23. (In Russian)].
- Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-C*07:02:01:01, как прообраз инновационных трансгенно-нокаутных биомоделей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya gumaniizirovannykh transgennykh myshey, nesushchih gen HLA-S*07:02:01:01, kak proobraz innovatsionnykh transgenno-nokautnykh biomodelej [Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with HLA-C*07:02:01:01, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)]. doi: 10.33647/2074-5982-20-1-8-20.
- Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):70–75. [Petrova N.V., Skripkina M.M. Osobennosti organizatsii sodержaniya i vyvedeniya transgennykh linij myshey v NCBMT FMBA Rossii [Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):70–75. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-70-75.
- Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie

- aspekty sozdaniya novoj gumanizirovannoj transgennoj linii myshej s integrirovannym genom cheloveka HLA-A*02:01:01:01 [Embryological aspects of creation a new humanized transgenic mice with integrated human HLA-A*02:01:01:01 gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-10-23.
6. Faber E., Tshilwane S.I., Van Kleef M., Pretorius A. The impact of Escherichia coli contamination products present in recombinant African horse sickness virus serotype 4 proteins on the innate and humoral immune responses, *Molecular Immunology*. 2022;152:1–13. DOI: 10.1016/j.molimm.2022.09.013.
 7. Loralyn A.B., Rusung T. Xenogeneic β 2-Microglobulin Substitution Affects Functional Binding of MHC Class I Molecules by CD⁸⁺ T Cells. *J. Immunol.* 2007;179(6):3588–3595. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.3588.
 8. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974;22(12):1084–1091. DOI: 10.1177/22.12.1084.
 9. Vaitukaitis J.L. Production of antisera with small doses of immunogen: Multiple intradermal injections. *Methods in Enzymology*. 198;73:46–52.
 10. Williams R.C. Jr., Malone C.C. Antigenic epitopes on beta 2-microglobulin reacting with monoclonal antibodies. *J. Lab. Clin. Med.* 1993;121(6):805–820.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., акад. РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Езерский Вадим Аркадьевич, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;

e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Жукова Ольга Борисовна, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;

e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Vadim A. Ezerskiy, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;

e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Olga B. Zhukova, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;

e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Elena M. Koloskova*, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Nataliya V. Petrova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СИСТЕМНЫЕ НОРМИРОВАННЫЕ ГАММА-ОСЦИЛЛЯЦИИ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА: ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Н.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин*, С.Ю. Харитонов

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Системное изучение γ -осцилляций выполнено на крысах с хронически имплантированными электродами в прореальную извилину, соматосенсорную кору, дорзальный гиппокамп и гипоталамус. Регистрация и детекция электрограмм головного мозга (ЭГМ) осуществлялась с помощью оригинального программно-аппаратного модуля. Линейные диаграммы строились с помощью устройства QMS17 в частотной полосе 60–250 Гц и более. Математический анализ, нормализация и нормирование рядов γ -ритмов при действии гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), ацетилхолина (АЦХ) и инсулина относительно аналогичных фоновых рядов были выполнены двойным дискретно-временным преобразованием Фурье и функцией арктангенса двойного угла, которые позволяют извлечь релевантную информацию из крайне малых (1–2 μV) значений γ -осцилляций. Накопление исследуемых веществ — введением фармакологических средств Аминалон (ГАМК), Галантамин (АЦХ), Инсулин липосомированный. Верификация плазменной концентрации исследованных средств осуществлялась методом ВЭЖХ и математическим моделированием. Нормированные ЭГМ (НЭМ) отражали интрацентральные механизмы действия тестируемых средств, характеризующиеся стабильностью картины в состоянии покоя животных и при действии Аминалона, Галантамина и Инсулина на пике их плазменной концентрации (по параметрам фармакокинетики). γ -активность головного мозга поддерживается на системном уровне. Блокада γ -осцилляций в лобном полюсе приводит к их активации в сопряжённых структурах головного мозга: гипоталамусе, ретикулярной формации, хвостатом ядре и др. При действии Аминалона наблюдались тотальные депримирующие эффекты на всём анализируемом диапазоне в заднем ядре гипоталамуса и прореальной извилине, а также активирующие эффекты на частотном диапазоне 60–75 Гц в передней супрасильвиевой извилине; при действии Галантамина — частичные депримирующие эффекты в гиппокампе и гипоталамусе на частотах около 60–65, 95–105 и 150 Гц; при действии Инсулина липосомированного — частичные активирующие эффекты в передней супрасильвиевой извилине и в дорзальном гиппокампе на частотном диапазоне 60–85 Гц.

Ключевые слова: электрограммы головного мозга, гамма-ритмы, нормализация, нормирование, нейромедиаторы, гормоны, гамма-аминомасляная кислота, ацетилхолин, инсулин, фармако-ЭЭГ анализ, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Установление роли гамма-диапазона нормированных электрограмм головного мозга животных в интрацентральных механизмах ноотропных эффектов» (шифр: «Ноотроп-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Харитонов С.Ю. Системные нормированные гамма-осцилляции структур головного мозга: фармакологический анализ нейрохимических и метаболических процессов. *Биомедицина*. 2024;20(2):66–94. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-66-94>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 24.05.2024

Опубликована 10.06.2024

SYSTEM NORMALIZED GAMMA OSCILLATIONS OF BRAIN STRUCTURES: PHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF NEUROCHEMICAL AND METABOLIC PROCESSES

Nikolay N. Karkischenko, Yuriy V. Fokin*, Sergey Yu. Kharitonov

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

A systematic study of γ -oscillations was carried out using rats with chronically implanted electrodes in the preoral gyrus, somatosensory cortex, dorsal hippocampus, and hypothalamus. Brain electrograms (BE) were recorded and investigated using an original software and hardware module. Linear diagrams were constructed using a QMS17 device in a frequency range of 60–250 Hz or greater. A mathematical analysis, normalization, and rationing of the series of γ -rhythms under the action of gamma-aminobutyric acid (GABA), acetylcholine (ACC), and insulin relative to similar background series were performed by double discrete-time Fourier transform and double angle arctangent function, which allowed us to extract relevant information from extremely small (1–2 μ V) values of γ -oscillations. The accumulation of the substances under study was achieved by introducing the Aminalon (GABA), Galantamine (ACC), and liposomal Insulin pharmaceuticals. The plasma concentrations of the studied drugs were verified by HPLC and mathematical modeling. The normalized BE (NBE) reflected the intracentral mechanisms of action of the tested drugs, which were characterized by a stable picture in the resting state of the animals and under the action of Aminalon, Galantamine, and Insulin at the peak of their plasma concentrations (according to pharmacokinetic parameters). The γ -activity of the brain is maintained at the systemic level. Blockade of γ -oscillations in the frontal pole leads to their activation in the associated brain structures: the hypothalamus, reticular formation, caudate nucleus, etc. Under the influence of Aminalon, the total depressive effects were observed over the entire analyzed range in the posterior nucleus of the hypothalamus and preoral gyrus, as well as activating effects in the frequency range 60–75 Hz in the anterior suprasylvian gyrus. Under the action of Galantamine, partial depressive effects in the hippocampus and hypothalamus were observed at frequencies of about 60–65, 95–105, and 150 Hz. Under the action of liposomal Insulin, partial activating effects were noted in the anterior suprasylvian gyrus and in the dorsal hippocampus in the frequency range of 60–85 Hz.

Keywords: brain electrograms, gamma rhythms, normalization, rationing, neurotransmitters, hormones, gamma-aminobutyric acid, acetylcholine, insulin, pharmaco-EEG analysis, rats

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research topic “Establishing the role of the gamma range of normalized electrograms of the animal brain in the intracentral mechanisms of nootropic effects” (code: “Nootropic-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Kharitonov S.Yu. System Normalized Gamma Oscillations of Brain Structures: Pharmacological Analysis of Neurochemical and Metabolic Processes. *Journal Biomed.* 2024;20(2):66–94. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-66-94>

Submitted 10.04.2024

Revised 24.05.2024

Published 10.06.2024

Введение

Мозг млекопитающих демонстрирует сложную ритмическую динамику, охватывающую широкий диапазон частот. Ритмы мозга представляют собой периодические колебания амплитуды в электрофизиоло-

гических записях, которые возникают в результате синхронной активации больших популяций нейронов. Колебания в различных частотных диапазонах связаны с различными функциями мозга и физиологическими состояниями. В их основе лежат

рецепторные, синаптические и метаболические процессы и механизмы.

В клинической практике, по данным ряда исследователей, выделяются следующие основные ритмы электроэнцефалограмм (ЭЭГ):

- дельта-ритм (δ -ритм), с частотой от 1 до 4 Гц, 40–300 μV ;
- тета-ритм (θ -ритм), с частотой от 4 до 8 Гц, 40–300 μV ;
- альфа-ритм (α -ритм), с частотой от 8 до 14 Гц, до 100 μV ;
- бета-ритм (β -ритм), с частотой от 14 до 35 Гц, до 15 μV ;
- гамма-ритм (γ -ритм), с частотой от 35 Гц и выше, до 10 μV .

В предыдущих исследованиях γ -ритма в диапазоне 30–60 Гц нами изучено действие на высокочастотные ритмы электрограмм головного мозга (ЭГМ) ряда нейро- и психотропных средств: Ноотропила, Аминалона, Прегабалина, Фенибуты, Семакса, Накома, Кетамина, Стимулотона, Донормила, Кофеина, Фенотропила, Ксилазина, Глутамата, Ацетилхолина, Инсулина, Лейтрагина [12–15, 29–31]. В процессе анализа полученных результатов возник ряд вопросов об эффектах психотропных средств на более высокие составляющие — γ -осцилляции, соотношения высокочастотных и стандартных ритмов электрограмм мозга, а также выяснение их рецепторно-синаптических механизмов и метаболического контроля [22] на системном уровне функционирования целостного мозга. Крайне слабые значения мощности γ -колебаний (от долей до 10 μV) заставили нас искать новый путь извлечений полезной информации и создать программно-конструктивный комплекс для анализа ЭГМ для лабораторных животных.

Несмотря на использование аппаратных и математических методов фильтрации 50-герцовых составляющих, их влияние (сетевая электрическая наводка) оставалось достаточно заметным ввиду низкого воль-

тажа γ -осцилляций, для анализа которых нами был выбран диапазон 60–250 Гц.

О механизмах генерации γ -осцилляций

Гамма-ритм — высокочастотная активность мозга, регистрируемая у человека в составе ЭЭГ, все больше и больше привлекает внимание исследователей. Повышенный интерес к γ -ритму обусловлен тем, что различные виды когнитивных процессов сопровождаются усилением активности в частотном диапазоне γ -ритма, который простирается от 30 до 200 Гц, а по некоторым данным, и до 600 Гц [3, 11, 42].

γ -колебания были обнаружены во многих областях мозга млекопитающих, включая гиппокамп и неокортекс. Они характеризуются ритмичными и синхронными колебаниями мембранного потенциала большинства или всех нейронов в нейронной сети с характерной частотной областью. Эти подпороговые колебания генерируются сложным взаимодействием между возбуждающими пирамидальными клетками и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК-ергическими) тормозными интернейронами. Функционально γ -колебания в нейронных сетях связывают нейроны в общий временной режим во время выполнения головным мозгом высших функций, таких как двигательное поведение, сенсорное восприятие или формирование памяти. Синхронизирующий эффект γ -колебаний обеспечивает скоординированную активацию определенных наборов нейронов, которые составляют функциональные ансамбли — предполагаемые многоклеточные подмножества нейронных сетей, несущие информацию. Кроме того, точное время возникновения потенциалов действия является центральным для зависящей от использования синаптической пластичности и, таким образом, поддерживает обучение и формирование памяти [66].

Механизмы генерации γ -осцилляций и способы, которыми синхронизированный γ -ритм включается в самые разнообразные

мозговые операции, не установлены. Факт появления γ -осцилляций в различных частотных диапазонах не прояснен. Работ, фиксирующих внимание на связи частоты осцилляций со структурами и функциями мозга, практически нет, что порождает массу спекуляций [3].

Отмечена связь γ -ритма с восприятием и опознанием стимула, возникновением иллюзий. Усиление γ -ритма наблюдали при работе не только с сенсорной, но и семантической информацией.

Использование условных вызванных потенциалов (УВП) с последующей частотной фильтрацией в полосе γ -ритма [64] выявляет разные типы синхронизации γ -активности. Вызванный УВП γ -ритм по фазе не синхронизирован со стимулом, т.к., по-видимому, инициируется другими, внутренними факторами, которые по времени не совпадают с предъявлением внешних стимулов [56]. При изучении вызванного γ -ритма методом дипольного анализа учитывается информация от нескольких электродов, а его дополнение методом УВП позволяет учитывать пространственную синхронизацию γ -осцилляций и их фазовую привязку к стимулу. Дипольный анализ ЭЭГ в комплексе с УВП является, по мнению авторов, перспективным направлением изучения функций γ -осцилляций в интегративной деятельности мозга [5].

γ -ритм связан с выполнением двигательных реакций, появляется в моторной и премоторной коре и имеет отношение к торможению двигательной реакции на нецелевой стимул [75, 87].

Продемонстрирована частотная селективность γ -ритма к формированию двигательного навыка [8]. На основе исследования высокочастотных составляющих электрокортикограммы (30–200 Гц) в процессе выработки инструментального двигательного навыка у собак авторы пришли к выводу, что у этих животных в ответ на условный сигнал увеличивалась мощность γ -ритма в полосе частот 80–200 Гц

при параллельном снижении активности на частотах 30–80 Гц.

При внутриклеточной регистрации идентифицированных вставочных и пирамидных нейронов гиппокампа выявлены кластеры вставочных нейронов, синхронизированных с разрядами вставочных нейронов и колебаниями фокального потенциала. ***γ -осцилляции — память, когнитивность, психика***

Показано, что частота колебаний фокального потенциала соответствует частотному диапазону γ -ритма. Ряд гипотез ориентируют на то, что, по-видимому, существует специфический механизм кодирования информации, который базируется на частотной избирательности пейсмекерной активности вставочных нейронов, обуславливающих связывание (binding) структур мозга для реализации психических функций. При этом разные участки мозга характеризуются разной частотой пейсмекерных потенциалов вставочных нейронов, которая может быть выделена из вызванного потенциала методом частотной фильтрации [2, 3, 35, 84].

В физиологических исследованиях активности мозга, а также внимания и восприятия широко используется регистрация высокочастотной составляющей спектра ЭЭГ — γ -ритма, т.е. колебаний корковых потенциалов в диапазоне от 30 до 70 Гц и выше [4, 7, 20, 25, 46, 51, 54, 60, 63]. Было обнаружено, что усиление γ -ритма в ЭЭГ кошки происходит в тот момент, когда она пристально следит за объектом охоты [40]. Аналогичным образом мощность γ -ритма у человека увеличивается во время когнитивной нагрузки по сравнению с состоянием покоя; этим γ -активность отличается от активности в β -диапазоне, которая, наоборот, снижается при повышении уровня когнитивной нагрузки [59]. Наличие γ -ритма в мозге человека и животных позволило установить его роль в интегративной деятельности мозга и психических функциях, в сенсорных, когнитивных и исполнительных

процессах [35]. γ -ритм участвует в процессах обработки информации, фазовой синхронизации в полосе 35–85 Гц, возникающей между удалёнными участками зрительной коры кошки [49]. Показана синхронизация осцилляторной активности удалённых локусов мозга на частоте γ -ритма как основной механизм коммуникации между нейронными сетями, который обеспечивает самые разные виды взаимодействия между сенсорными, исполнительными и когнитивными процессами, включая память.

Вызывает сомнение в доказательной базе синхронизация γ -осцилляций, которая базируется лишь на основе измерения амплитуды или мощности γ -ритма. Мощность и фаза — два независимых измерения осцилляторной активности, тогда как синхронизация имеет дело с фазовыми отношениями, а не с мощностью. Фазовая синхронизация γ -осцилляций может возникать и без увеличения их мощности. Синхронизацию нейронных разрядов в зрительной коре и гиппокампе наблюдали без изменения в частоте их разрядов [55, 61]. Возникновение γ -осцилляций в различных нейронных сетях частотно синхронизировано или связано по фазе [41].

Ожидание стимула и подготовка к выполнению реакции в ответ на стимул также ведут к усилению показателей γ -активности [7, 54]. С другой стороны, эпизоды значительного усиления и синхронизации γ -ритма сверх обычного фонового уровня сопровождаются т.н. «слепотой невнимания», при которой реакции на сенсорные стимулы блокируются [47]. Флуктуации фоновой γ -активности — это проявления устойчивого внимания (sustained attention) [26], которое создаётся корковыми ассоциативными системами. Включение этого состояния опосредовано рядом когнитивных процессов (память, ожидание, мотивация и др.). Согласно современным представлениям, в организации данного проявления

внимания ведущую роль играет фронто-париетальная система [38, 96].

В работе [93] показана связь активности γ -ритма с сохранением информации в памяти. Устойчивое увеличение мощности γ -осцилляций (24 Гц) исследователи наблюдали в зрительной коре. γ -осцилляции (на частоте около 25–70 Гц) играют важную роль в различных аспектах обработки зрительной информации и способствуют синхронизации активности нейронных ансамблей. Отмечена связь γ -ритма с восприятием и опознанием стимула, возникновением иллюзий, формированием гештальта [3]. Включённость γ -ритма в самые различные сенсорные, когнитивные и исполнительные процессы, наличие его не только в мозге человека, но и у животных, в т.ч. у беспозвоночных, позволило рассматривать γ -ритм в качестве функциональных строительных блоков, используемых в интегративной деятельности мозга и психических функций.

О нейрохимических основах γ -осцилляций

γ -колебания (30–100 Гц) обеспечивают фундаментальный механизм обработки информации во время сенсорного восприятия, двигательного поведения и формирования памяти путём координации нейронной активности в нейросетях. Мы исследовали клеточные механизмы γ -колебаний, лежащие в основе нейроэнергетики [22], т.е. высокую скорость потребления кислорода и исключительную чувствительность к метаболическому стрессу во время гипоксии или отравления митохондриальным окислительным фосфорилированием. γ -колебания возникают в результате точных синаптических взаимодействий возбуждающих пирамидных клеток и тормозных ГАМК-ергических интернейронов.

В частности, специализированные интернейроны, такие как парвальбумин-положительные корзинчатые клетки, генерируют потенциалы действия с высокой частотой («быстрые всплески») и синхронизируют

активность многочисленных пирамидных клеток путём ритмического торможения («часовой механизм»). Корзинчатые нейроны — тормозные ГАМК-ергические вставочные нейроны молекулярного слоя мозжечка. В качестве предпосылок быстродействующие интернейроны обладают уникальными электрофизиологическими свойствами и особенно высоким потреблением энергии, что отражается в ультраструктурах путём обогащения митохондриями и цитохром С-оксидазой, наиболее вероятно необходимой для интенсивного мембранного транспорта ионов и метаболизма ГАМК. Это подтверждает гипотезу о том, что высокоэнергетичные интернейроны с быстрыми всплесками являются центральным элементом обработки информации в коре головного мозга и могут иметь решающее значение для снижения когнитивных способностей, когда поступление энергии становится ограниченным [10].

Оптогенетические исследования говорят о том, что в генерации γ -ритмов важную роль могут играть парвальбумин-содержащие нейроны [89]. γ -ритм, регистрируемый магнитоэнцефалографией, позволяет судить о балансе тормозящих и возбуждающих импульсов, помогая выявить его нарушения у человека. Наибольшей информативностью обладают γ -ритм, вызываемый зрительными стимулами, а также свойства γ -ритма отражать процессы нейронного торможения. Полученные результаты полезны для понимания механизмов нейропсихиатрических заболеваний (шизофрения, аутизм, эпилепсия) [77]. Сообщается о разнообразных нарушениях γ -активности у больных шизофренией [45], в т.ч. под влиянием психотропных средств.

Предпринимаются попытки связать эти отклонения с данными о нейрохимических отличиях, обнаруживаемых в мозге больных с изменённой активностью клеток-канделябров. Клетки-канделябры (chandelier cell neuron) — ГАМК-ергические интер-

нейроны неокортекса (и древней коры гиппокампа), образующие продолговатые аксо-аксональные соединения исключительно с начальными сегментами аксонов пирамидальных клеток. Одна клетка-канделябр может иннервировать более 200 пирамидальных клеток. Клетки-канделябры содержат кальций-связывающий белок парвальбумин и способны к высокочастотной генерации импульсов. Аксональные терминалы «картриджи» имеют специфическую иммунореактивность к транспортному белку GABA-transporter (GAT-1), который обеспечивает обратный захват ГАМК в терминалы. Клетки-канделябры оказывают как тормозное, так и возбуждающее ГАМК-ергическое воздействие [68, 91].

γ -осцилляции и ГАМК

ГАМК — один из базовых тормозных нейромедиаторов центральной нервной системы (ЦНС), является аминокислотой и образуется при декарбоксилировании глутамата. Данная аминокислота обнаружена во многих участках ЦНС: в сером веществе головного мозга, лобных долях, подкорковых ядрах (хвостатое ядро и бледный шар), таламусе, гиппокампе, гипоталамусе, ретикулярной формации. ГАМК участвует в процессах, происходящих в нейронах спинного мозга, обонятельного тракта, сетчатки глаза, мозжечка. Треть всех синапсов в ЦНС контактируют через ГАМК-ергические интернейроны, причём 40% из них являются парвальбумин-положительными (PV⁺) [94]. ГАМК как один из нейромедиаторов производит свой переход на пресинаптическом участке из цитоплазмы в везикулы частично при участии фермента VGAT₁ (vesiculogranular amino acid transporter).

Фермент VGAT₁, кроме участия в везикулярном транспорте ГАМК, задействован в везикулярном транспорте глицина — не менее важного тормозного нейромедиатора ЦНС. В синаптической щели после высвобождения из везикул ГАМК переносится нейрональными мессенджерами,

такими как GAT_1 , GAT_2 , GAT_3 (granular amino acid transporter), которые находятся в нейронах и астроцитах [69, 72]. Воздействует ГАМК на специфические рецепторы, которые по своему характеру подразделяются на ионотропные рецепторы ($ГАМК_A$, $ГАМК_C$) и метаболотропные — $ГАМК_B$. Рецепторы $ГАМК_A$ реализуют немедленный синаптический ответ вследствие проницаемости своих каналов для ионов хлора и бикарбоната. В связи с этим активация рецепторов $ГАМК_A$ зависит от электрохимической активности ионов хлора и бикарбоната на постсинаптической мембране [53, 73], что подтверждается в γ -осцилляциях при фармакотерапевтических исследованиях.

ГАМК активирует энергетические процессы мозга, повышает дыхательную активность тканей, увеличивает утилизацию мозгом глюкозы, усиливает кровоснабжение в головном мозге [22]. Для понимания механизмов γ -осцилляций важно, что ряд производных соединений от ГАМК (Пирацетам, Аминалон, оксипутират натрия или гамма-оксимасляная кислота) стимулируют созревание структур мозга и образование стойких связей между популяциями нейронов. Это способствует формированию памяти, что послужило поводом к использованию названных соединений в клинической практике для ускорения восстановительных процессов после различных поражений мозга. Активация рецепторов $ГАМК_A$ приводит к деполяризации нейронов. В структуре рецепторов $ГАМК_A$, кроме специфических сайтов для связывания вещества-агониста, имеется и ряд модуляторных неспецифических сайтов [24, 32, 33, 65, 67, 82]. Примером неспецифических сайтов могут быть бензодиазепиновые, при действии на которые увеличивается аффинность рецепторов $ГАМК_A$ к агонистам, а также барбитуровые сайты рецепторов $ГАМК_A$ — они увеличивают период, в течение которого ионные

каналы данных рецепторов являются открытыми и проводимыми [32, 33, 67, 82]. Кроме того, некоторые авторы выделяют еще такие неспецифические сайты ГАМК, как нейростероидные и этаноловые, модулирующие γ -активность.

Рецепторы $ГАМК_B$ являются метаболотропными и находятся как на пре-, так и на постсинаптических участках, т.е. там, где и формируются γ -осцилляции. На постсинаптическом уровне рецепторы $ГАМК_B$ определяют «быстрый» ионотропный ответ путём длительной гиперполяризации. Пресинаптические рецепторы $ГАМК_B$ при активации снижают высвобождение ГАМК в тормозных синапсах и высвобождение глутамата — в возбуждающих. Рецепторы $ГАМК_C$ отличаются от рецепторов $ГАМК_A$ по фармакологическому профилю, а именно, данные рецепторы не чувствительны к бикикуллину, аллостерическим модуляторам и ряду агонистов рецепторов $ГАМК_A$. Для рецепторов $ГАМК_C$ есть свои специфические антагонисты; данные рецепторы находятся в процессе изучения [19, 67, 72, 73].

γ -осцилляции и ацетилхолин (АЦХ)

Нейронные теории механизмов генерирования и модуляции функциональной активности γ -ритмов изложены в ряде фундаментальных обзоров [62, 71]. Наиболее характерные проявления γ -осцилляций, связанные с холинергической системой, обнаруживаются в неокортексе. У человека функциональное значение γ -ритма связывают, прежде всего, с когнитивной деятельностью [81, 88].

Подчёркивается роль холинергических влияний в поддержании γ -синхронности, что подтверждается фармакологическими исследованиями [86]. Введение скополамина (антагониста мускариновых рецепторов) вызывало нарушение памяти и снижение γ -активности [48]. Клозапин, с частичным эффектом агониста мускариновых рецепторов, влияет на повышение психомотор-

ной скорости и подвижности речи [34], что связано с повышением показателей γ -активности до границ нормы у пациентов. Делается вывод о том, что клозапин больше повышает спектральную мощность γ -активности у больных с негативными симптомами, чем уменьшает мощность γ -активности у больных с позитивными симптомами [34].

Считается, что параметры генерации γ -ритма в основном определяются текущим уровнем холинергической активации корковых нейронных сетей [39, 44, 83]. Благодаря наличию мощных глутаматергических проекций от префронтальной области коры в базальное крупноклеточное ядро основания переднего мозга (БКЯ) [58, 95] и восходящих холинергических проекций из БКЯ практически во все области коры [74, 85] фронто-париетальная система внимания получает возможность осуществлять холинергическую модуляцию различных областей коры и переводить их в состояние синхронизации в диапазоне γ -ритма. Иными словами, существуют пути согласованной регуляции системной деятельности мозга в диапазоне γ -ритмики между ГАМК-, глутаматергической и холинергической системами.

Холинергическая иннервация обеспечивает уровень активации коры больших полушарий, необходимый для привлечения внимания, и создаёт условия для обработки информации о поступившем стимуле [31], а возникающий γ -ритм отражает характер происходящего при этом процесса обработки информации. Высказано предположение, что колебания γ -активности, видимо, отражают связь нейронных сетей с селективной детекцией стимулов [39, 96]. Показано, что синхронизация клеток коры в диапазоне γ -ритма при воздействии ацетилхолина усиливает реакцию сети на сенсорный стимул и снижает её порог [39].

В ходе исследований в полосе 1–256 Гц [2], включающей ранее систематически

не исследованные высокочастотные (ВЧ) компоненты частотой 80–250 Гц, показана более высокая информативность ВЧ-компонентов и более узкая локализованность их в коре по сравнению с частотами не только традиционного диапазона (1–30 Гц), но и γ -диапазонов (30–80 Гц). Это ещё раз подчёркивает важность системного подхода к анализу мозговой γ -ритмики разных диапазонов.

Удалось установить формирование в процессе обучения сложной пространственно-временной организации потенциалов, состоящей одновременно как из однонаправленных (синхронных) процессов по всей полосе частот в ряде пар областей «новой» коры, так и разнонаправленных (несинхронных) процессов между другими корковыми областями, в зависимости от величины фазовых сдвигов между потенциалами на той или иной частоте [7].

Инсулин-контролируемый метаболизм и γ -осцилляции

Литературные данные о влиянии инсулина на высокочастотные компоненты ЭГМ крайне противоречивы. Одни демонстрируют ингибирующее действие инсулина на γ -осцилляции в обонятельной системе («загрубляет» запахи»). Там он активирует деполяризацию через калиевые каналы. Другие источники наблюдали подавление γ -осцилляций при диабете 2-го типа. Возможно, это связано с отсутствием системного подхода и неадекватностью использованных методик.

Поскольку все данные о влиянии инсулина на γ -осцилляции в мозге получены в опытах *in vitro*, в основном на срезах гиппокампа (рис. 1), они нуждаются в подтверждении в исследованиях *in vivo*.

Инсулин вызывал генерацию осцилляций на частоте 64 Гц (γ -ритм) в дозозависимой манере, хотя ингибировал спонтанные осцилляции на частоте 20 Гц в срезах гиппокампа [78]. Инсулин предотвращал вызванную β -амилоидом деградацию

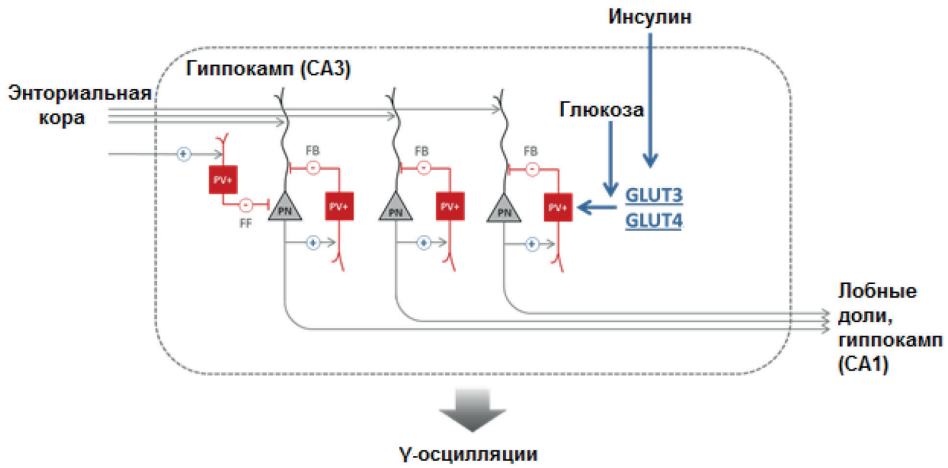


Рис. 1. Метаболический контроль γ -осцилляций. CA1 и CA3 области гиппокампа; PV⁺ — парвальбумин-положительные ингибиторные ГАМК-ергические интернейроны; PN — возбуждающие пирамидальные нейроны; FF — прямая отрицательная связь (feedforward); FB — обратная отрицательная связь (feedback); GLUT3 — основной нейрональный транспортер глюкозы; GLUT4 — инсулин-зависимый транспортер глюкозы.

Fig. 1. Metabolic control of γ -oscillations. CA1 and CA3 regions of the hippocampus; PV⁺, parvalbumin-positive inhibitory GABAergic interneurons; PN, excitatory pyramidal neurons; FF, forward negative connection (feedforward); FB, negative feedback (feedback); GLUT3, major neuronal glucose transporter; GLUT4, insulin-dependent glucose transporter.

γ -осцилляций в пирамидальных нейронах и PV⁺ интернейронах [70]. Эти данные, несмотря на ограниченность, тем не менее указывают на возможное участие инсулина в поддержании высокочастотной электрической активности мозга, а также на возможную роль инсулиновой резистентности в нарушении высокочастотных γ -осцилляций при болезни Альцгеймера (БА).

БА — состояние, при котором нарушен церебральный метаболизм глюкозы, сопровождается выраженной центральной инсулиновой резистентностью [76, 79]. Показано, что активация инсулинового рецептора и его субстрата (IRS-1) в мозге пациентов с БА в ответ на одну и ту же концентрацию инсулина меньше на 29–34 и 90% соответственно, по сравнению с контролем [92].

Установлено, что у пациентов с БА когнитивный γ -ответ происходит с задержкой (более чем на 100 мс) по сравнению

с здоровыми волонтерами, что отражает задержку передачи нейронных сигналов в когнитивных нейронных сетях. Кроме того, пациенты с БА имели сниженный сенсорный γ -ответ на визуальный стимул [37]. Эти данные поддерживают идею о возможности метаболического контроля γ -осцилляций в мозге, если учесть, что пациенты с БА имеют выраженный гипометаболизм глюкозы в мозге и нарушенный ответ и регуляторную функцию инсулина.

Снижение амплитуды γ -осцилляций наблюдалось у трансгенных животных, продуцирующих человеческий белок — предшественник амилоида (hAPP) [61]. Нарушения γ -ритмов у пациентов с БА имеют более сложный характер, что, как полагают, связано с большей сложностью мозга человека [36].

Цель работы — поиск информативных критериев нормированных электрографи-

ческих параметров γ -осцилляций головного мозга при системном фармакологическом тестировании с помощью средств рецепторного и метаболического действия (Аминалон, Галантамин, Инсулин) для скрининга веществ ноотропного действия и иных нейро-, психотропных средств.

Материалы и методы

Дизайн исследований

Объектами исследований являлись белые крысы-самцы Wistar массой 230–250 г, полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.).

Содержание и кормление. Содержание и обращение с животными в эксперименте — в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [52], а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [23]. Эксперименты проводились согласно утверждённому письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Животные содержались с соблюдением ветеринарных и зоогиgienических норм в вентилируемых клетках Rair Iso System (“Metris B.V.”, Нидерланды), по 5 особей в группе, при температуре воздуха 20–22°C, относительной влажности 40–60%, световом режиме 12:12 с включением света в 8:00. Использовался стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5 (ООО «Лабораторкорм», Россия) при сво-

бодном доступе к водопроводной питьевой воде. Подстил в клетках состоял из опилок нехвойных и лиственных гипоаллергенных пород деревьев.

Карантин. До начала исследований животные выдерживались в отдельной карантинной зоне в течение 14 дней, проходили ежедневный осмотр (поведение и общее состояние).

Имплантация электродных комплексов

В головной мозг животных операционным путём по стереотаксическим координатам [27] хронически имплантированы разработанные электродные конструкции для оценки интрацентральных отношений мозга. В работе использовалась заранее изготовленная конструкция для одномоментного вживления в мозг нескольких электродов, проводники присоединялись к разъёму на специальном макете (фантоме), имитирующем дорсальную поверхность черепной коробки. На матрице и фантоме прорисовывались ориентиры — сагиттальный и коронарный шов (точка пересечения — брегма). На матрицу наносились точки внедрения электродов, рассчитанные по стереотаксическому атласу. Конструкция состояла из собственно электрода, который погружался в исследуемую область мозга, провода, который припаивался одним концом к электроду, а другим — к разъёму марки IDC-16-2. Электроды, погружаемые в мозг, изготавливались из нихромовой проволоки диаметром $\approx 0,3$ мм и тщательно изолировались полиуретановым лаком УЛ-1 или другими лаками. Вживление электродов осуществлялось по общим правилам операционной техники в асептических условиях под общим наркозом [9, 11, 28].

Разработка средств для детекции и программного анализа информативных параметров электрограмм головного мозга

Для регистрации и анализа биоэлектрической активности мозга животных с целью исследования интрацентральных отноше-



Рис. 2. Устройство QMS17 (слева), материнская плата (справа).
Fig. 2. QMS17 device (left) and its motherboard (right).

ний головного мозга разработан и апробирован макет технического устройства (микромодуль), базирующегося на современных научных взглядах и технологиях. Он состоит из двух частей: физический электроэнцефалограф и аппаратно-программный комплекс с математическим анализом выходных данных, поступающих на компьютер.

В работе использовано устройство серии QMBox, состоящее из набора функциональных модулей, устанавливаемых в единый корпус (рис. 2). Это могут быть модули аналогово-цифрового преобразователя (АЦП), цифро-аналогового преобразователя (ЦАП), дискретного ввода-вывода, релейной коммутации и т.д., объединяемые в единое устройство. Нами была выбрана модель QMS17, в состав которой входит АЦП (16 бит, 1 МГц, 16 дифференциальных каналов, входные диапазоны ± 10 В, ± 5 В, переключение программное).

Устройство поставляется с программным обеспечением для связи и сбора данных, а также с пакетом программ на языке программирования Python для анализа данных. Преимуществом такой компоновки является возможность установить операционные усилители перед устройством QMBox, отказоустойчивость устройства и надёжно спроектированная печатная плата.

Блок-схема устройства QMS17 представлена на рис. 3.

При применении ЭЭГ-биомаркеров акцент делается в основном на амплитуде

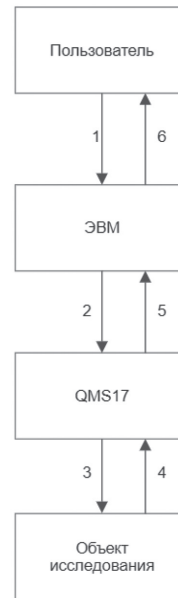


Рис. 3. Блок-схема устройства QMS17.

Первое действие (1–3): 1) Пользователь даёт команду старта записи исследования и информацию об объекте исследования; 2) ЭВМ передаёт на QMS17 информацию о конфигурации; 3) QMS17 настраивает АЦП на основе данных конфигурации и начинает запись.

Второе действие (4–6): 4) АЦП считывает сигналы на входах, преобразуя их в цифровую форму; 5) QMS17 передаёт данные на ЭВМ; 6) После завершения записи ЭВМ оповещает об этом пользователя.

Fig. 3. Block diagram of the QMS17 device.

First action (1–3): 1) The user sends the command to start recording of the study and information of the object of study; 2) The PC transmits configuration information to QMS17; 3) QMS17 configures the ADC based on the configuration data and starts recording.

Second action (4–6): 4) ADC reads the signals at the inputs, converting them into digital form; 5) QMS17 transmits data to the PC; 6) After the recording is completed, the user is notified by the PC.

и мощности ритмов без учёта изменений. Отправной точкой работы с данными ЭЭГ-исследования (не считая их преобразование, направленную на удаление артефактов, полосовую фильтрацию для выделения заданного окна частот и пр.) является применение к ним преобразования Фурье. С его помощью возможно получить представление сигнала в частотной области, включая зависимость амплитуды и мощности сигнала на заданной частоте [21].

В рамках проводимых исследований нами было разработано программное обеспечение для математического анализа результатов нормализации и нормирования ЭГМ при действии фармакологических факторов относительно фоновых значений ЭГМ. В основе метода для сравнительного анализа, обозначенного нами как НЭМ, лежит методика оценки изменений в частотной области спектра снятых электрограмм до воздействия исследуемых факторов (фоновые данные) и после, что позволяет увидеть возбуждение или депрессию активности исследуемых областей мозга в определённых γ -ритмах.

Математическая нормализация рядов γ -ритмов

Нормализация — это способ организации данных, причём в нормализованной базе нет повторяющихся данных, поэтому с ней легче работать. Поскольку γ -осцилляции представляют собой стохастические, нестационарные и нелинейные процессы, единого математического анализа для них не существует. Разные авторы полагают, что γ -ритмы являются чуть ли не производными электрокардиограммы, электромиограммы, дыхательных движений, что, по нашим результатам и данным других авторов [2, 3, 5, 7, 8, 12, 16, 28, 35, 39, 59, 62, 71, 80, 89], не совсем верно. Мы сочли необходимым рассмотреть вопрос формирования высокочастотных ритмов ЭГМ. Когда же целесообразнее осуществлять нормализацию, до или после преобразования с помощью

быстрого преобразования Фурье (БПФ)? Конечно же, до. Нормализация уменьшает объём данных, упрощает поиск по заданным категориям, уменьшает вероятность ошибок и аномалий. Нормализованные формы данных взаимосвязаны, а если нужно изменить или удалить данные в одном пуле, то остальные связанные с ней данные автоматически обновятся, т.е. не будет ошибок, когда в базу внесут изменения. Иными словами, уже на этапе проектирования базы, т.е. до начала регистрации ЭГМ, мы прописываем процесс. Обычно мы нормализуем данные «вручную», т.е. закладываем условия для обращения с трендами, например мышечными наводками, двигательными, сердечными, пульсовыми, внешними звуковыми, световыми и другими неклассифицируемыми факторами, изменяющими структуру и динамику ЭГМ.

Известно, что в правилах нормализации баз данных есть 7 нормальных форм. Как правило, приводят данные к нормальным формам следует последовательно, поэтому база в шестой нормальной форме выступает как идеально нормализованная. Однако на практике нас удовлетворяет нормальная форма Бойса – Кодда (НФБК, или BCNF), которую именуют усиленной третьей нормальной формой [6, 17]. Цель нормализации — в устранении излишней избыточности и дублирования данных, что неизбежно происходит с рядами γ -осцилляций после их оцифровки и преобразования Фурье. Разложение функции в ряд Фурье является мощным инструментом анализа ЭГМ и, в частности, γ -ритмов, поскольку является функцией, представляющей амплитуду и фазу соответствующими каждой частоте. БПФ имеет два математических метода: один — для исходных непрерывных функций, другой — для множеств отдельных дискретных значений. Оба эти метода идеальны для оценки различных ЭГМ (ВП, УВП, спонтанные ЭГМ, ритмические сверхмедленные колеба-

ния постоянного потенциала, первичные и вторичные ответы, навязанные ритмы и т.д.), но при разложении в ряды дают избыточные данные, включая удвоение и реверсные ряды. Чтобы этого избежать, и необходима предварительная нормализация исходных рядов γ -осцилляций. С помощью нормализации ЭГМ мы выделяем квазистационарные участки для последующего анализа [13].

Математическое нормирование высокочастотных составляющих ЭГМ

Регистрируемая в составе ЭЭГ человека и животных γ -активность простирается, по данным разных авторов, от 30 до 250 Гц и даже до 600 Гц. Амплитуда сигнала не превышает 10 $\mu\text{В}$, а при 15 $\mu\text{В}$ — γ -ритмы в ЭЭГ рассматриваются как признак патологии. Психотропные средства существенно модифицируют γ -осцилляции, значительно меняя общую картину, их амплитуду и фазность [11, 12, 28]. Чтобы «извлечь» информативные признаки эффектов психотропных средств, особенно ноотропов, необходимы некоторые иные подходы, одним из которых мы избрали нормирование, основанное на двойном дискретно-временном преобразовании Фурье (ДВПФ). В строгом смысле, нормирование — это домножение функции или членов ряда на специально подобранный фактор для обеспечения равенства единице интеграла от этой функции или суммы ряда. Функция ЭГМ отображает параметры плотности распределения после их домножения. Следует отличать нормализацию от нормирования и нормировки. Так, если после нормализации все числовые значения ЭГМ будут приведены к одинаковой области их изменений [13, 14], т.е. более узкому диапазону γ -осцилляций, и обеспечат корректную работу вычислительных алгоритмов, то нормирование даст отображение элементов поля или целостного кольца в некоторое упорядоченное поле для кон-

кретного психотропного средства [12, 14, 15, 29, 30].

Используя дискретное нормирование для упорядоченных с помощью нормализации рядов γ -осцилляций, мы приходим к разновидности экспоненциального нормирования, являющегося, в свою очередь, отображением целых чисел в аддитивной группе, а кольцо нормирования обозначается, естественно, кольцом дискретного нормирования. Определяя расстояние между двумя элементами нормированного поля F , например между значениями ЭГМ при действии психотропного средства Y и фона, исходного состояния X , как норму разности $Y-X$, мы превращаем его в метрическое пространство, а в случае неархимедовой нормы — в ультраметрическое пространство. Разные нормы определяют разные метрики, но эквивалентные нормы определяют одинаковую F -топологию. Не вдаваясь в доказательства и определения изоморфизма и изометрии, отметим, что многообразные функции по терминологии Бурбаки называются нормированием или экспоненциальным нормированием [1, 18].

Преобразование Фурье, особенно его быстрое преобразование, — базовое понятие в обработке сигналов, а в биомедицине — основа для анализа ЭЭГ, электромиограммы, ультразвуковой вокализации и др. Эти алгоритмы резко сокращают число шагов в вычислении преобразования Фурье. Этот метод позволяет представить непрерывную функцию $f(x)$ или сигналы ЭГМ в виде суммы бесконечного ряда тригонометрических функций (синусы, косинусы) с определёнными амплитудами и фазами на отрезке времени.

Поскольку после квантования аналоговых сигналов ЭГМ мы имеем ряды дискретных значений, к ним адекватно приложим математический аппарат ДВПФ. После классических преобразований непрерывных сигналов $S(t)$ через δ -функцию

Дирака, Фурье-преобразование дискретного сигнала $Sd(t)$ и фильтрацию δ -функций, приходим в случае ограничения во времени N отсчётами к выражению для периодического спектра $Sd(\omega)$ ДВПФ:

$$Sd(\omega) = \sum_{n=0}^{N-1} s(n) \exp(-j\omega n), \quad (1)$$

где $s=0$ при $0 > n \geq N$.

Результат ДВПФ (1) является комплексной функцией, оптимизированной для прямого и обратного ДВПФ-преобразования.

Используемый нами подход нормирования ЭГМ как отношений стохастических рядов, отображающий влияние психотропных средств (Fp) к исходным, фоновым значениям (Fn), основан на отношениях одной функции вещественной переменной Fp на другую функцию (Fn), т.е. фактически двойном ДВПФ-преобразовании. Мы используем БПФ как математическую операцию, которая преобразует функцию от времени в частотные компоненты, а также обратную процедуру ДВПФ-преобразования для перевода частотных компонентов во временные же компоненты.

Вычислительные алгоритмы нормирования данных ЭГМ

Имея определённое количество последовательных чисел, мы можем оперировать ими как одним множеством (V). Любые операции над множествами выполняются поэлементно. То есть, например, множество $\{6, 2\}$, сложенное с множеством $\{2, 3\}$, будет равно множеству $\{8, 5\}$.

АЦП непрерывно, в течение заданных секунд делает замеры с определённой частотой квантования (в нашем случае — 1024). После этого пакет входных данных отправляется с помощью микроконтроллера на компьютер.

Диапазон измерений напряжения на АЦП равен от -5 до +5 В. Соответственно, одна единица данных представляет собой разницу напряжения на АЦП между определённой парой электродов.

После того как множество данных (длиной 1024) передано на компьютер, оно обрабатывается при помощи БПФ. После преобразования получается множество комплексных чисел, длина которого равна длине изначального множества. На этом этапе в множестве могут быть как положительные, так и отрицательные числа.

После этого от множества берётся первая половина элементов, т.к. после БПФ множество симметрично относительно центра. Затем для каждого элемента множества вычисляется модуль комплексного числа. Теперь мы имеем множество длин векторов комплексных чисел. На этом этапе числа в множестве становятся больше или равны нулю, а любое рациональное число, возведённое в степень, равную двум, будет положительным.

После набора необходимых данных (фоновые измерения + минимум одно измерение после воздействия) выполняется нормирование по формуле (2):

$$V_{\text{нормированное}} = \text{atan}\left(\frac{V_{\text{воздействия}}}{V_{\text{фона}}}\right), \quad (2)$$

Под воздействием понимается множество, измеренное при действии фармакологических, химических или физических факторов.

Для удобства вычислений нами использована функция atan2 (арктангенс двойного угла):

$$\text{atan2}(y, x) = \begin{cases} \arctan\left(\frac{y}{x}\right) & \text{if } x > 0 \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) + \pi & \text{if } x < 0 \text{ and } y \geq 0 \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) - \pi & \text{if } x < 0 \text{ and } y < 0 \\ +\frac{\pi}{2} & \text{if } x = 0 \text{ and } y > 0 \\ -\frac{\pi}{2} & \text{if } x = 0 \text{ and } y < 0 \\ \text{undefined} & \text{if } x = 0 \text{ and } y = 0 \end{cases} \quad (3)$$

Данная функция (3) позволяет обработать возможные нули.

После этой операции получается множество, все элементы которого лежат в диапазоне от 0 до $+\pi/2$.

После функции деления (арктангенса двойного угла) применялась функция вы-

читания БПФ фоновых значений из БПФ воздействия.

Для борьбы с растеканием γ -спектра применяют более гладкую оконную функцию спектра с более значимым главным лепестком к низким уровням боковых лепестков. Когда входной сигнал дискретизируется по времени, а не непрерывно, анализ обычно выполняется с применением оконной функции, а затем — дискретного преобразования Фурье (ДПФ).

Оконная функция — это математическая функция, которая имеет нулевое значение за пределами некоторого выбранного интервала, обычно симметричная относительно середины интервала. Основным назначением оконных функций является сужение, а не сегментация.

Строго говоря, существуют десятки видов окон и их перекрытий, но окно Хэмминга принято нами как оптимальное и перспективное. Оно даёт наибольшее приближение параметров отдельных ритмов в фоновых и экспериментальных ЭГМ, как бы концентрируя спектральные картины и повышая точность расчётов.

Для вычисления данной функции используется следующая формула (4):

$$w(n) = a_0 - a_1 \times \cos\left(\frac{2 \times \pi \times n}{N-1}\right) + a_2 \times \cos\left(\frac{4 \times \pi \times n}{N-1}\right) - a_3 \times \cos\left(\frac{6 \times \pi \times n}{N-1}\right), \quad (4)$$

где $w(n)$ — мультипликатор для элемента n ; n — индекс элемента; N — количество элементов (размер окна); a — коэффициенты: $a_0=0,35875$, $a_1=0,487396$, $a_2=0,144232$, $a_3=0,01168$.

Нейровизуализация и сравнительный анализ информативных параметров электрограмм головного мозга

Получаемые данные по соотношению частотно-спектральных характеристики ЭГМ отображались в линейном графическом виде.

Линейные диаграммы, получаемые с применением устройства QMS17, отражают соотношение экспериментальных данных к исходным (фоновым) и представлены в частотной полосе 60–250 Гц.

Мозг функционирует как единое целое, и даже слабые высокочастотные сигналы имеют некоторую мощность, которая при стандартной обработке ЭГМ ничтожна ($<5 \mu\text{В}$) и почти неразличима глазом. В силу большого объёма и значительной субъективности визуального сравнения получаемых графиков НЭМ нами был разработан алгоритм для программного анализа результатов и их представления в числовом значении. В основе алгоритма также лежит функция арктангенса, имеющая ряд особенностей и преимуществ:

- 1) функция арктангенса определена на всей числовой прямой и непрерывна;
- 2) область значений функции строго ограничена интервалом от $-\pi/2$ до $+\pi/2$;
- 3) даже небольшие изменения становятся весьма заметными.

Формула сравнительного анализа имеет следующий вид (5):

$$N_i = \frac{\tan^{-1}\left(\frac{S_{1i}}{S_{2i}}\right)}{0,5 \times \pi} \times 2 - 1, \quad (5)$$

где N — сравнительный массив данных; i — индекс частоты; S_1 — массив исходных (фоновых) данных; S_2 — массив сравниваемых (экспериментальных) данных.

Изучение эффектов Аминалона (ГАМК), Галантамина (АЦХ) и Инсулина (Инс)

Системное накопление в мозге нейромедиатора ГАМК достигалось с помощью однократного внутривенного введения препарата «Аминалон» в эквивалентных человеку терапевтических дозах (с учётом коэффициентов дозопереноса для крыс — 60 мг/кг). ГАМК — ноотропное средство, широко распространено в ЦНС человека и млекопитающих и примерно в 50% выяв-

ляется во всех нервных окончаниях мозга. ГАМК является основным тормозным нейромедиатором, биогенным веществом, принимающим участие в нейромедиаторных и метаболических процессах в мозге.

Системное накопление в мозге нейромедиатора АЦХ достигалось с помощью однократного внутривенного введения препарата «Галантамин» в эквивалентных человеку терапевтических дозах (с учётом коэффициентов дозопереноса для крыс — 1 мг/кг). АЦХ — селективный, конкурентный и обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы, который стимулирует никотиновые рецепторы и повышает чувствительность постсинаптической мембраны к ацетилхолину. Облегчает проведение возбуждения в нервно-мышечном синапсе и восстанавливает нервно-мышечную проводимость. Повышая активность холинергической системы, Галантамин улучшает когнитивные функции у животных и человека.

Системное накопление в мозге гормона Инс достигалось с помощью однократного транспалатинального введения липосомированной формы Инс-липо в эквивалентных человеку терапевтических дозах (с учётом коэффициентов дозопереноса для крыс — 280 мг/кг). Как известно, глюкоза имеет первостепенное значение в поддержании γ -осцилляций [57], нейрональной активности и формировании долговременной памяти [43, 90]. Транспорт же глюкозы осуществляется инсулин-зависимым GLUT4, локализованным в структурах головного мозга с минимальной плотностью инсулиновых рецепторов [50]. Поэтому нами использован транспалатинальный путь введения для оптимального достижения уровней экзогенного инсулина в искомым областях головного мозга.

Детекция параметров ЭГМ осуществлялась согласно фармакокинетическим и фармакодинамическим данным, на графиках представлены наиболее характерные результаты по обозначенным реперным точкам.

Результаты и их обсуждение

Аминалон

Через анализ нормированных функций ЭГМ осуществлена нейровизуализация эффектов Аминалона. Наиболее значимые эффекты в различных областях головного мозга, отражающие интрацентральные механизмы, представлены на рис. 4–6.

НЭМ-анализ ГАМК в гипоталамусе (рис. 4) отражает его тотальное депримирующее действие по всему анализируемому диапазону через 20 мин после введения, с наиболее выраженными элементами угнетения на диапазоне 60–110 Гц (снижение в 25 раз). Через 1 ч после введения наблюдаемые эффекты сохраняются.

НЭМ-анализ ГАМК в коре мозга (рис. 5) отражает его преимущественно активирующее действие через 20 мин после введения, имеющее волнообразный характер и наиболее выражено проявляющееся в диапазоне 60–75 Гц (повышение в 10 раз). При этом в более высокочастотном диапазоне (100–250 Гц) параметры НЭМ близки к фоновым значениям, а на некоторых частотах наблюдаются эпизоды угнетения. Через 1 ч после введения параметры НЭМ близки к фоновым значениям, со смещением в сторону угнетения (снижение примерно в 1,5 раза).

НЭМ-анализ ГАМК в лобных долях мозга (рис. 6) выявляет картину, сходную с гипоталамусом, и отражает его тотальное депримирующее действие по всему анализируемому диапазону через 20 мин после введения (снижение в 10 раз) и сохраняющееся через 1 ч после введения (снижение в 14 раз). В диапазоне 125–250 Гц активность мозга достигала фоновых значений.

С целью верификации обнаруженных эффектов ГАМК проведён сравнительный анализ параметров НЭМ с ранее полученными результатами исследования активности мозга при действии нейромедиатора, преимущественно в низких диапазонах частот. Основные сходства просле-

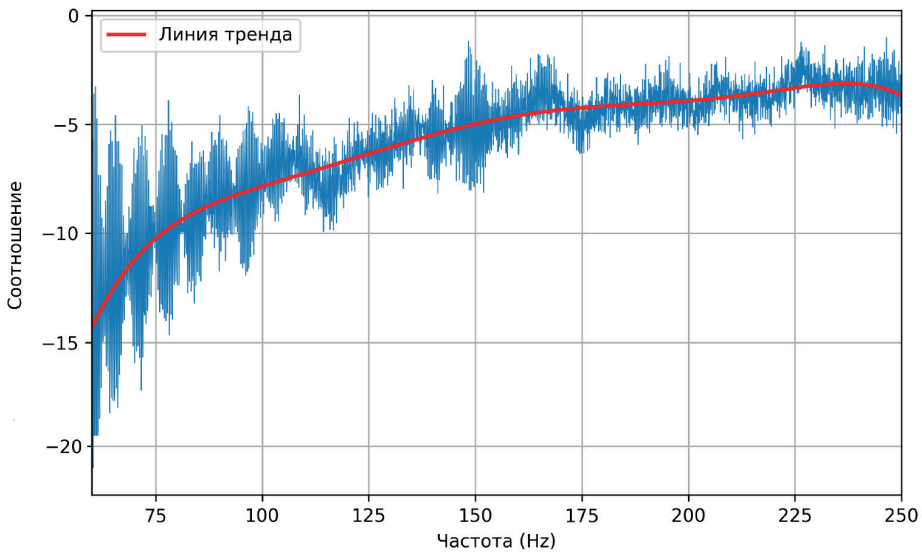


Рис. 4. Параметры НЭМ заднего ядра гипоталамуса (*nucleus hypothalamicus posterior*) через 1 ч после введения ГАМК.

Примечание: здесь и далее, по оси абсцисс — частоты, 60–250 Гц, по оси ординат — спектральные характеристики электрограмм головного мозга (ЭГМ) (отн. ед.); красная кривая — линия тренда.

Fig. 4. NBE parameters of *nucleus hypothalamicus posterior* 1 h after GABA administration.

Note: here and below, on the abscissa axis — frequencies, 60–250 Hz, on the ordinate axis — spectral characteristics of brain electrograms (BE) (relative units); the red curve is the trend line.

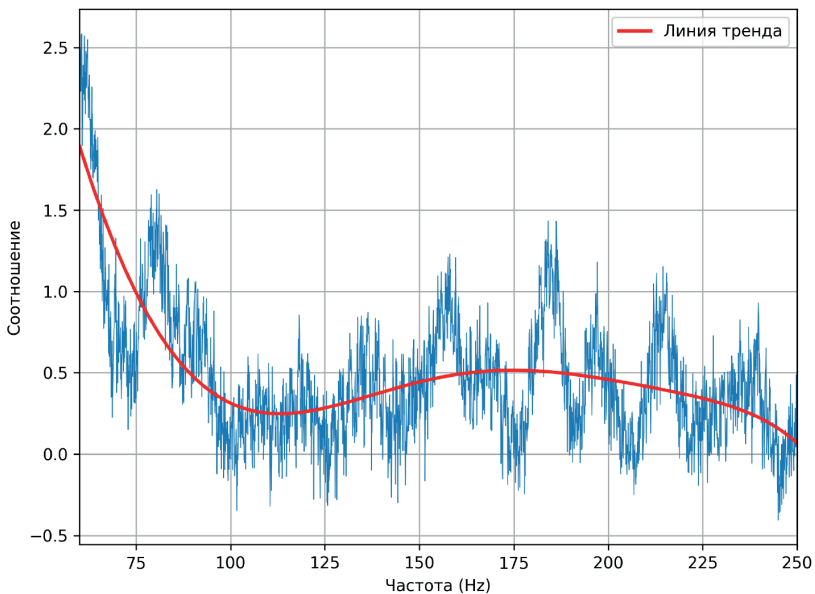


Рис. 5. Параметры НЭМ передней супрасильвиевой извилины (*gyrus suprasylvius anterior*; неокортекс) через 20 мин после введения ГАМК.

Fig. 5. NBE parameters of *gyrus suprasylvius anterior* (neocortex) 20 min after GABA administration.

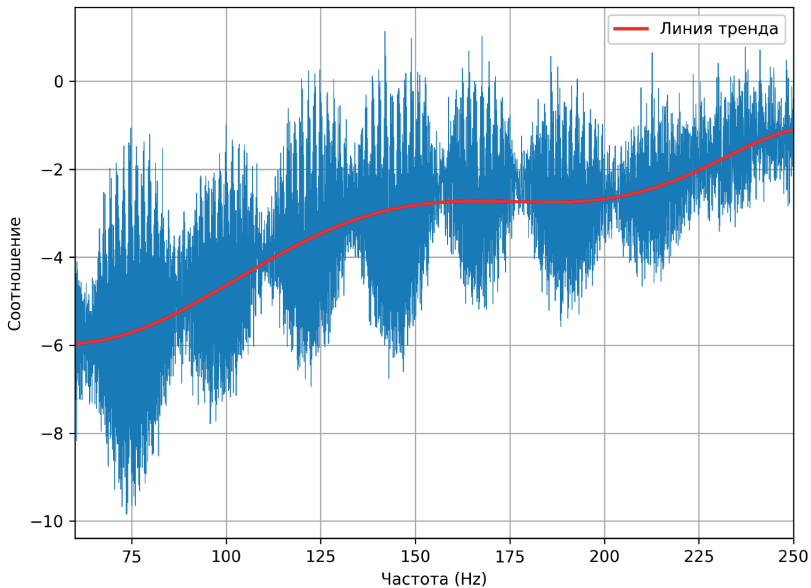


Рис. 6. Параметры НЭМ прореальной извилины (*gyrus prorealis*, лобные доли) через 20 мин после введения ГАМК.
Fig. 6. NBE parameters of *gyrus prorealis* (frontal lobes) 20 min after GABA administration.

живаются в коре головного мозга в области 35–65 Гц.

Эффекты нейровизуализации согласуются с фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами ($C_{\max}=60$ мин (в плазме), через 24 ч в плазме крови следы вещества не обнаруживаются) и отражают характер влияния препарата на цикл сна-бодрствования, когнитивные функции и ВНД животных и человека.

Наблюдаемое подавление активности высокочастотных параметров НЭМ при действии ГАМК в лобных долях, очевидно, «растормаживает» кору головного мозга. Депримирующие эффекты препарата в гипоталамусе и лобных долях, а также активирующие эффекты в коре мозга свидетельствуют о принципах равновесия интрацентральных отношений.

Можно заключить, что обнаруженные эффекты отражают седативные, умеренные анксиолитические и антидепрессивные,

а также ноотропные свойства, связанные, по всей видимости, с механизмами ингибирования обратного захвата ГАМК.

Активация ГАМК-ергической стресс-лимитирующей системы может рассматриваться как один из перспективных методов в профилактике и лечении заболеваний, связанных с нейрогенным фактором.

Галантамин

Наиболее значимые эффекты, отражающие интрацентральные механизмы при действии Галантамина, представлены на рис. 7, 8.

Параметры НЭМ в гиппокампе через 20 мин после введения АЦХ близки к фоновым значениям, с незначительным смещением в сторону угнетения (рис. 7). Через 1 ч после введения (рис. 8) наблюдаемая картина в целом сохраняется, смещение в сторону угнетения имеет более выраженный характер (снижение примерно в 0,8 и 0,7 раза соответственно).

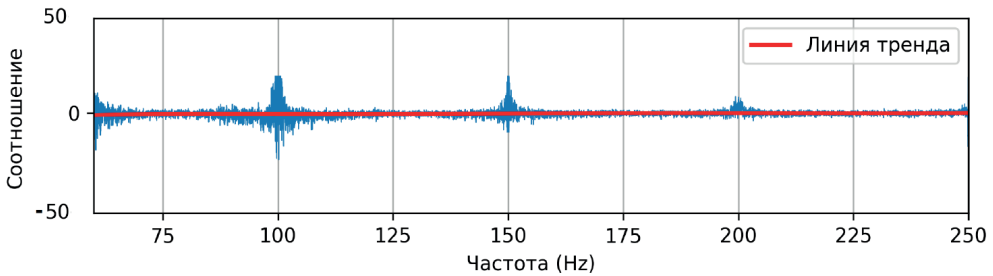


Рис. 7. Параметры НЭМ заднего гиппокампа (*hippocampus posterior*) через 20 мин после введения АЦХ. Наблюдается проявление сетевой наводки в 100, 150, 200 Гц.

Fig. 7. NBE parameters of *hippocampus posterior* 20 minutes after Acetylcholine administration. Network noise at 100, 150, and 200 Hz is observed.

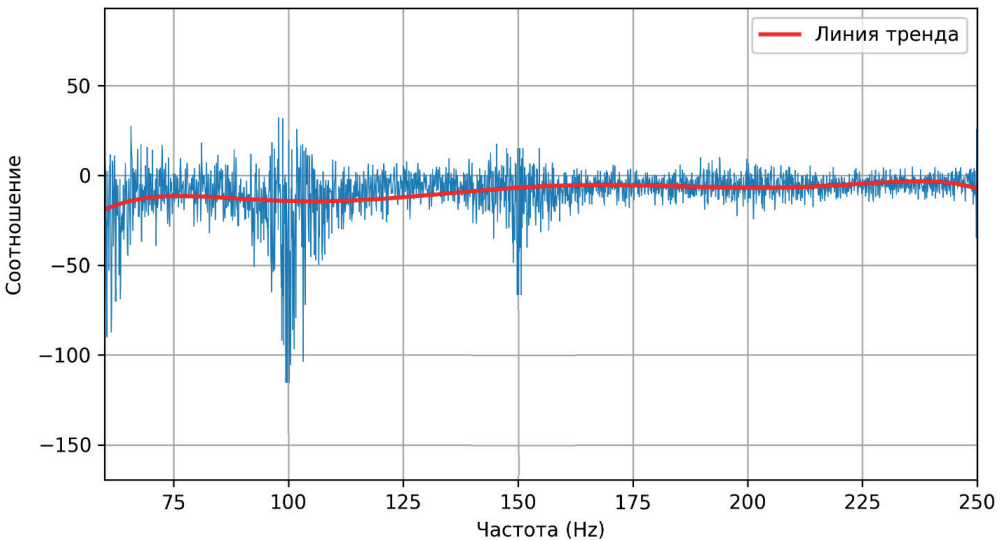


Рис. 8. Параметры НЭМ заднего гиппокампа (*hippocampus posterior*) через 1 ч после введения АЦХ. Наблюдается проявление сетевой наводки в 100 и 150 Гц.

Fig. 8. NBE parameters of *hippocampus posterior* 1 h after Acetylcholine administration. Network noise is manifested at 100 and 150 Hz.

НЭМ-анализ АЦХ в гипоталамусе выявляет картину, сходную с гиппокампом: через 20 мин и через 1 ч после введения Галантамина параметры НЭМ близки к фоновым значениям, со смещением в сторону угнетения (снижение примерно в 0,7 и 2,5 раза соответственно).

Наибольшее угнетение высокочастотных ритмов в обеих зонах мозга обнаруживается на частотном диапазоне 60–150 Гц.

Ввиду наблюдаемой десинхронизации и проявления сетевой наводки при действии Галантамина требуются дополнительные исследования, включая подбор доз и коррекцию режима введения препарата.

Сравнительный анализ параметров НЭМ с ранее полученными результатами исследования активности мозга при действии нейромедиатора преимущественно в низких диапазонах частот с целью верифика-

ции обнаруженных эффектов АЦХ выявил основные сходства в гиппокампе в области 45–50, 60 Гц.

Эффекты нейровизуализации согласуются с фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами ($C_{\max} = 60\text{--}90$ мин (в плазме), через 24 ч выводится около 20% Галантамина) и отражают характер влияния препарата на когнитивные функции.

Можно заключить, что наблюдаемые эффекты отражают облегчение проведения возбуждения в нервно-мышечном синапсе и восстановление нервно-мышечной проводимости в случаях её блокады миорелаксантами, т.е. ноотропные свойства с минимальным седативным компонентом, связанные, по всей видимости, с механизмами ингибирования обратного захвата ацетилхолинэстеразы.

Таким образом, активация ацетилхолинэстеразной системы также может рассматриваться как один из перспективных

методов в профилактике и лечении заболеваний, связанных с нейрогенным фактором.

Инсулин липосомированный

Через анализ нормированных функций ЭГМ осуществлена нейровизуализация эффектов Инс-липо. Наиболее значимые эффекты в различных областях головного мозга, отражающие интрацентральные механизмы, представлены на рис. 9, 10.

Параметры НЭМ в коре мозга через 30 мин после введения Инс (рис. 9) близки к фоновым значениям, с некоторым смещением в сторону активации (повышение в 2 раза). Через 1 ч после введения наблюдаемая картина в целом сохраняется, смещение в сторону активации имеет более выраженный характер (повышение в 4 раза).

НЭМ-анализ Инс в гиппокампе (рис. 10) выявляет картину, сходную с корой мозга: через 20 мин после введения наблюдается близкий к фону уровень активности высокочастотных ритмов, а через 1 ч после

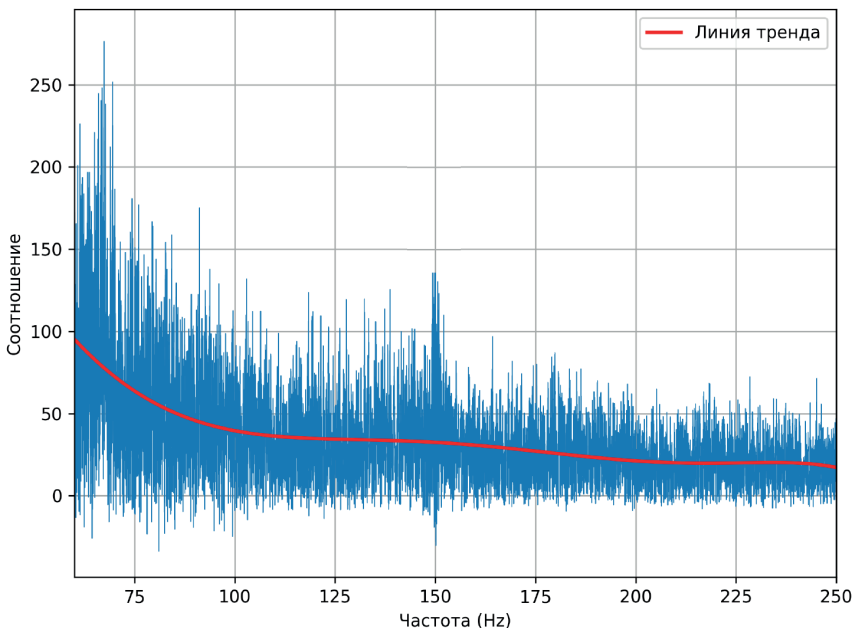


Рис. 9. Параметры НЭМ передней супрасильвиевой извилины (*gyrus suprasylvius anterior*; неокортекс) через 1 ч после введения Инс.

Fig. 9. NBE parameters of *gyrus suprasylvius anterior* (neocortex) 1 h after Insulin administration.

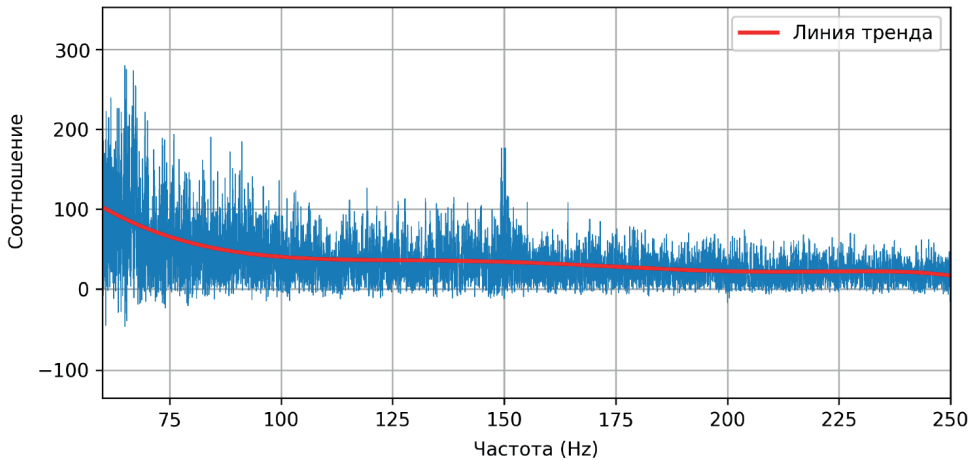


Рис. 10. Параметры НЭМ заднего гиппокампа (*hippocampus posterior*) через 1 ч после введения Инс.
Fig. 10. NBE parameters of *hippocampus posterior* 1 h after Insulin administration.

введения, при общей сохраняющейся тенденции, наблюдаются признаки активации, наиболее выраженные в области 60–75 Гц (повышение в 2 и 5 раз соответственно).

Проведённый сравнительный анализ параметров НЭМ с ранее полученными результатами исследования активности мозга при действии гормона не выявил убедительных сходств в низких диапазонах частот.

Эффекты нейровизуализации могут свидетельствовать о том, что применяемая биодоступная форма инсулина связана с продолжительным действием и «длинными» фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами, которые отражают характер влияния препарата на процесс гликолиза.

«Растормаживающее» действие в коре головного мозга и гиппокампе, нарастающее примерно через 1 ч после введения, может отражать особенности интрацентральных отношений мозга на фоне действия Инс.

Можно предположить взаимосвязь снижения уровня глюкозы в крови, повышения её усвоения тканями и усиления липогене-

за и гликогеногенеза, т.е. метаболотропных свойств с ноотропными.

Активация сигнальной инсулиновой системы также может рассматриваться как один из перспективных методов в профилактике и лечении заболеваний, связанных с нейрогенным фактором.

Заключение

Работа посвящена поиску информативных точек головного мозга и информативных параметров ЭГМ в диапазоне γ -осцилляций, позволяющих установить базовые признаки для скрининга и изучения интимных механизмов действия метаболотропных и психотропных средств и особенно ноотропов. Прежде всего нас интересовали эффективные параметры для оценки влияния на память и когнитивные функции. Можно отметить несколько характерных проявлений γ -осцилляций.

Во-первых, стабильность картины, характерной для состояния покоя животных или действия ГАМК-тропного вещества Аминалона, а также эффектов Галантамина и Инсулина на пике их плазменной кон-

центрации (по параметрам фармакокинетики). Ранее мы уже подчёркивали, что для пресинаптического высвобождения нейромедиатора ГАМК, а также для мембранного транспорта ионов в дендритах и обширной оболочке аксонов требуются высокие энергетические затраты [22]. Быстродействующие PV+ интернейроны играют центральную роль в возникновении γ -колебаний, обеспечивающих фундаментальный механизм обработки сложной информации во время сенсорного восприятия, двигательного поведения и формирования памяти в сетях гиппокампа и неокортекса. И наоборот, дефицит глюкозы и кислорода (метаболический стресс), поступление и/или чрезмерное образование активных форм кислорода и азота (окислительный стресс) может сделать эти интернейроны уязвимой мишенью [22]. Дисфункция при быстром нарастании PV+ интернейронов может установить низкий порог для нарушения быстрых сетевых колебаний и, следовательно, более динамичных функций мозга. Этот механизм может иметь большое значение для гериатрических исследований (старения мозга), поиска способов улучшения консолидации памяти и когнитивных функций, а также для диагностики и лечения различных острых и хронических заболеваний головного мозга, таких как инсульт, сосудистые когнитивные нарушения, эпилепсия, болезнь Альцгеймера и шизофрения. Можно констатировать, что разработанный и используемый нами подход нормирования электрограмм мозга (НЭМ) позволяет достаточно стабильно получать и оценивать характерные для разных групп фармакологических веществ эффекты. Смещение мощностей НЭМ отдельных частот или групп γ -осцилляций в отрицательную или положительную подобласти является стабильным фактором для конкретных фармсредств, но ещё предстоит найти биомедицинские корреляты полученным феноменам.

Во-вторых, любое изменение состояния покоя, а особенно поисковые реакции животных, сопровождаются возрастанием нестационарности в ЭГМ, некоторым «хаосом» [47, 86] в высокочастотной ритмике как у животных, так и у человека. Новые методы анализа электрической активности (ЭА) позволили разделить топографическую представленность γ -волн и их синхронность. В частности, при исследовании вызванной активности в ЭЭГ человека (метод вейвлетного анализа) было обнаружено, что в интервале 200–500 мс после стимула очень стабильные во времени и топографии γ -волны были несинхронны, тогда как ранние (80–120 мс) γ -волны были очень вариабельны по топографии, но совместимы во времени. Авторы рассматривают выраженность γ -активности и её нестационарности как информативный показатель когнитивной деятельности. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что пространственная синхронизация ЭА мозга на высоких частотах (30–200 Гц) является необходимым условием функционального объединения нейронов для их совместной деятельности [16].

В-третьих, исследованные нами средства рецепторного и метаболотропного действия имеют общие черты влияния на γ -осцилляции, проявляющиеся в стабильной и характерной для каждого вещества картине. Так, действие ГАМК на мозг характеризуется преимущественно депримирующими эффектами, наблюдаемыми в гипоталамусе и лобных долях, а также активирующими эффектами в неокортексе. Действие АЦХ на мозг характеризуется частичными депримирующими эффектами в гиппокампе и гипоталамусе. Действие Инс на мозг характеризуется частичными активирующими эффектами в неокортексе и в гиппокампе.

Обобщая полученные данные, можно выделить ряд аспектов действия ГАМК, АЦХ и Инс на γ -осцилляции. ГАМК синхронизи-

рует НЭМ, что проявляется в возрастании амплитудных характеристик НЭМ. АЦХ, в противоположность ГАМК, оказывает десинхронизирующее действие на НЭМ, резко снижая амплитуду и сдвиг в сторону более высоких частот γ -осцилляций. Десинхронизирующее действие АЦХ на НЭМ в лобном полюсе мозга крыс сопровождается синхронизацией γ -осцилляций в гипоталамусе и других субкортикальных структурах. Инс, подобно ГАМК, выравнивает картину НЭМ, приближая амплитудные характеристики γ -осцилляций к уровню исходных (фоновых) показателей.

Возрастание значимости метаболического компонента в ряду АЦХ, ГАМК, Инс сопровождается ростом мощности γ -осцилляций и их синхронизации. Рост десинхронизирующего действия наблюдается по мере превалирования рецепторных механизмов от АЦХ к ГАМК и Инс.

γ -активность головного мозга поддерживается на системном уровне. Так, блокада γ -осцилляций в лобном полюсе приводит к их активации в сопряжённых структурах головного мозга: гипоталамусе, ретикулярной формации, хвостом ядре и др. [11, 12, 29, 30].

Смещение мощности НЭМ по частотному диапазону является признаком, характеризующим действие нейромедиаторов. Депримирующее действие ГАМК наиболее ярко прослеживается на всём анализируемом диапазоне в заднем ядре гипота-

ламуса и прореальной извилине, а также на частотах 100–145, 175, 205, 225, 240 Гц в передней супрасильвиевой извилине. Активирующее действие ГАМК в коре наиболее выражено проявляется в диапазоне 60–75 Гц. Депримирующее действие АЦХ наиболее ярко прослеживается в гиппокампе и гипоталамусе на частотах около 60–65, 95–105 и 150 Гц. Активирующее действие Инс наиболее ярко прослеживается в диапазоне 60–85 Гц, наиболее заметные элементы депримации детектируются на частоте около 150 Гц.

Формирование γ -осцилляций под влиянием веществ, изменяющих нейромедиаторный пейзаж, имеет характерные признаки для различных отделов мозга: в лобных долях, коре, гипоталамусе и гиппокампе при действии ГАМК, АЦХ и Инс обнаруживаются стабильные эффекты, совпадающие с фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами и отражающие действие на фундаментальные механизмы мозга.

Наблюдаемые изменения нормированных параметров ЭГМ подтверждают наши результаты [12] и литературные данные о влиянии тестируемых средств на когнитивные функции, взаимосвязанные с активностью γ -ритма. Преобладающие изменения в высокочастотном γ -диапазоне (до 250 Гц) могут являться важнейшими показателями эффектов нейропсихотропных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Атья М., Макдональд И. *Введение в коммутативную алгебру*. М.: Мир, 1972:115. [At'ya M., Makdonal'd I. *Vvedenie v kommutativnyuyu algebru [Introduction to commutative algebra]*. Moscow: Mir Publ., 1972:115. (In Russian)].
2. Бушов Ю.В., Светлик М.В., Крутенкова Е.П. *Высокочастотная электрическая активность мозга и восприятие времени*. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2009:120. [Bushov Yu.V., Svetlik M.V., Krutenkova E.P. *Vysokochastotnaya elektricheskaya aktivnost' mozga i vospriyatие vremeni [High-frequency electrical activity of the brain and perception of time]*. Tomsk: Tom. un-ta Publ., 2009:120. (In Russian)].
3. Данилова Н.Н. Частотная специфичность осцилляторов амплитуда-ритма. *Российский психологический журнал*. 2006;2:35–60. [Danilova N.N. Chastotnaya specifichnost' oscillyatorov amplituda-ritma [Frequency specificity of amplitude-rhythm oscillators]. *Russian Psychological Journal*. 2006;2: 35–60. (In Russian)].
4. Данилова Н.Н., Астафьев С.В. Внимание человека как специфическая связь ритмов ЭЭГ с волновы-

- ми модуляторами сердечного ритма. *Журн. высш. нерв. деят.* 2000;50(5):791–804. [Danilova N.N., Astaf'ev S.V. Vnimanie cheloveka kak specificheskaya svyaz' ritmov EEG s volnovymi modulyatorami serdechnogo ritma [Human attention as a specific connection of EEG rhythms with heart rate wave modulators]. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti [Journal of Higher Nervous Activity]*. 2000;50(5):791–804. (In Russian)].
5. Данилова Н.Н., Быкова Н.Б. *Осцилляторная активность мозга и информационные процессы*. Доклады конф. «Психология: современные направления междисциплинарных исследований». М.: Из-во ИПРАН, 2003:271–283. [Danilova N.N., Bykova N.B. *Oscillatory brain activity and information processes*. Doklady konf. "Psihologiya: sovremennyye napravleniya mezhdisciplinarnykh issledovaniy". Moscow: IPAN Publ., 2003:271–283. (In Russian)].
 6. Дейт К.Дж. *Введение в системы баз данных. 8-е изд.* М.: Вильямс, 2005:1328. [Dejt K.Dzh. *Vvedenie v sistemy baz dannykh. 8-e izd.* [Introduction to database systems. 8th ed.]. Moscow: Vil'yams Publ., 2005:1328. (In Russian)].
 7. Думенко В.Н. *Высокочастотные компоненты ЭЭГ и инструментальное обучение*. М.: Наука, 2006:151. [Dumenko V.N. *Vysokochastotnyye komponenty EEG i instrumental'noye obucheniye* [High-frequency EEG components and instrumental learning]. Moscow: Nauka Publ., 2006:151. (In Russian)].
 8. Думенко В.Н., Козлов М.К. Исследование селективного внимания у собак по данным когерентно-фазовых характеристик корковых потенциалов в широкой полосе частот 1–220 Гц. *Журн. высш. нервн. деят.* 2002;4:428–440. [Dumenko V.N., Kozlov M.K. Issledovanie selektivnogo vnimaniya u sobak po dannym kogerentno-fazovykh harakteristik korkovykh potencialov v shirokoy polose chastot 1–220 Gez [Investigation of selective attention in dogs using coherent-phase data of cortical potentials in the wide frequency band 1-220 Hz]. *Zhurn. vyssh. nervn. deyat.* [Journal of Higher Nervous Activity]. 2002;4:428–440. (In Russian)].
 9. Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии*. М.: Изд-во ВПК, 2007:448. [Karkischenko N.N. *Alternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i al'ternativy farmakotoksikologii* [Alternatives to biomedicine. Vol. 2. Classics and alternatives of pharmacotoxicology]. Moscow: VPK Publ., 2007:448. (In Russian)].
 10. Каркищенко Н.Н. *Психонитропизм лекарственных средств*. М.: Медицина, 1993:208. [Karkischenko N.N. *Psihounitropizm lekarstvennykh sredstv* [Psychonitropism of drugs]. Moscow: Medicina Publ., 1993:208. (In Russian)].
 11. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В. О механизмах фармакологической модуляции обсессивно-компульсивных и когнитивных расстройств кошек, распознаваемых методом нормирования БПФ-преобразуемых функций электрограмм фронтальной коры головного мозга и гиппокампа. *Биомедицина*. 2020;16(1):12–27. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V. O mehanizmah farmakologicheskoy modulyatsii obsessivno-kompul'sivnykh i kognitivnykh rasstrojstv koshek, raspoznavаемых методом normirovaniya BPF-preobrazуемых функций электрограмм frontal'noy kory golovnogo mozga i gippokampa [Mechanisms of the Pharmacological Modulation of Obsessive-Compulsive and Cognitive Disorders in Cats Recognized by the Method of Normalizing FFT-Convertible Functions of Electrograms of the Frontal Cortex and Hippocampus]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(1):12–27. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-1-12-27.
 12. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Таболякова Л.А., Алимкина О.В., Борисова М.М. Между когнитивностью и нейропатиями: нейровизуализация эффектов ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтального неокортекса по нормированным электрограммам мозга. *Биомедицина*. 2020;16(2):12–38. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Borisova M.M. Mezhdru kognitivnost'yu i nejropatiyami: nejrovizualizatsiya effektivov GAMK-ergicheskoy modulyatsii gippokampa i prefrontal'nogo neokorteksa po normirovannym elektrogrammam mozga [Between Cognition and Neuropathies: Neuroimaging of the Effects of GABAergic Modulation of the Hippocampus and Prefrontal Neocortex by Normalized Brain Electrograms]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(2):12–38. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-2-12-38.
 13. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Харитонов С.Ю. Нейровизуализация эффектов психоактивных средств посредством нормализации электрограмм головного мозга. *Биомедицина*. 2019;15(1):12–34. [Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Kharitonov S.Yu. Nejrovizualizatsiya effektivov psikoaktivnykh sredstv posredstvom normalizatsii elektrogramm golovnogo mozga [Neuroimaging of the Effects of Psycho-active Substances by Means of Normalization of Brain Electrograms]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(1):12–34. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-12-34.
 14. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л. Фармакологическая регуляция когнитивных функций и интрацентральных отношений липосомированными ацетилхолином и инсулином. *Экспериментальная и клиническая фармакология. Прил. Мат-лы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи — новые лекарства»*. 2023;86(11s):70. [Karkischenko N.N., Fokin Yu.V., Lyublinskiy S.L. Farmakologicheskaya regulyatsiya kognitivnykh funktsij i intracentral'nykh otnoshenij liposomirovannymi acetilxolinom i insulinom [Pharmacological regulation of cog-

- nitive functions and intracentral relationships by liposomated acetylcholine and insulin]. *Экспериментальная и клиническая фармакология. Прил. Mat-ly VI s'ezda farmakologov Rossii "Smena pokolenij i sohranenie tradicij. Novye idei — novye lekarstva"* [Experimental and clinical pharmacology. Adj. Proceedings of the VI Congress of Pharmacologists of Russia "Generational change and preservation of traditions. New ideas are new medicines"]. 2023;86(11s):70. (In Russian). DOI:10.30906/ekf-2023-86s-70.
15. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л., Помыткин И.А., Алимкина О.В., Таболякова Л.А., Капцов А.В., Борисова М.М., Каркищенко Н.Н. Центральные механизмы липосомированных форм ацетилхолина и инсулина посредством анализа когнитивных, психоэмоциональных и поведенческих параметров крыс. *Биомедицина*. 2022;18(1):32–55. [Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Lyublinskiy S.L., Pomytkin I.A., Alimkina O.V., Tabolyakova L.A., Kaptsov A.V., Borisova M.M., Karkischenko N.N. Centralnye mehanizmy liposomirovannyh form acetylholina i insulina posredstvom analiza kognitivnyh, psihoemocional'nyh i povedencheskih parametrov krys [Central mechanisms of liposomal forms of acetylcholine and insulin through analysis of cognitive, psychoemotional and behavioural parameters in rats]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(1):32–55. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-1-32-55.
 16. Кирой В.Н., Белова Е.И. Механизмы формирования и роль осцилляторной активности нейронных популяций в системной деятельности мозга. *Журн. высш. нерв. деят.* 2000;50(2):179. [Kiroj V.N., Belova E.I. Mehanizmy formirovaniya i rol' oscillyatornoj aktivnosti nejronnyh populyacij v sistemnoj deyatel'nosti mozga [Mechanisms of formation and the role of oscillatory activity of neuronal populations in systemic brain activity]. *Zhurn. vyssh. nerv. deyat. [Journal of Higher Nervous Activity]*. 2000;50(2):179. (In Russian)].
 17. Кузнецов С.Д. *Основы баз данных. 2-е изд.* М.: БИНОМ, лаборатория знаний, 2007:484. [Kuznecov S.D. *Osnovy baz dannyh. 2-e izd. [The basics of databases. 2nd ed.]*. Moscow: BINOM, laboratoriya znanij Publ., 2007:484. (In Russian)].
 18. Ленг С. *Алгебра*. М.: Мир, 1967:565. [Leng S. *Algebra*. Moscow: Mir Publ., 1967:565. (In Russian)].
 19. Митрохин К.В., Баранишин А.А. Классификация и краткое описание лекарственных препаратов — аналогов производных гамма-аминомасляной кислоты и токсических веществ, влияющих на ГАМК-ергическую связь. *Анестезиология и реаниматология*. 2018;6:22–30. [Mitrokhin K.V., Baranishin A.A. Klassifikatsiya i kratkoye opisaniye lekarstvennykh preparatov — analogov proizvodnykh gamma-aminomaslyanoy kisloty i toksicheskikh veshchestv, vliyayushchikh na GAMK-yergicheskuyu svyaz' [Classification and brief description of drugs — analogues of derivatives of gamma-aminobutyric acid and toxic substances that affect the GABAergic relationship]. *Anesteziologiya i reanimatologiya [Anesthesiology and Intensive Care]*. 2018;6:22–30. (In Russian)]. DOI: 10.17116/anaesthesiology201806122.
 20. Панасюк Я.А., Мацелера О.Б., Чернышев Б.В., Семикопная И.И., Москвитин А.А., Тимофеева Н.О. Фоновая гамма-активность в электроэнцефалограмме как показатель уровня устойчивого (тонического) внимания при реализации парадигмы «активный одд-болл» у кроликов. *Журн. высш. нерв. деят.* 2011;61(1):75–84. [Panasyuk Ya.A., Macepera O.B., Chernyshev B.V., Semikopnaya I.I., Moskvitin A.A., Timofeeva N.O. Fonovaya gamma-aktivnost' v elektroencefalogramme kak pokazatel' urovnya ustojchivogo (tonicheskogo) vnimaniya pri realizacii paradigmy "aktivnyj odd-boll" u krolikov [Background gamma-activity in the electroencephalogram as an indicator of the level of sustained (tonic) attention during the implementation of the active-odd-ball paradigm in rabbits]. *Zhurn. vyssh. nerv. deyat. [Journal of Higher Nervous Activity]*. 2011;61(1):75–84. (In Russian)].
 21. Пашков А.А., Дахтин И.С., Харисова Н.С. Электроэнцефалографические биомаркеры экспериментально индуцированного стресса. *Вестник ЮУрГУ. Серия «Психология»*. 2017;10(4):68–82. [Pashkov A.A., Dakhtin I.S., Kharisova N.S. Elektroencefalograficheskie biomarkery eksperimental'no inducirovannogo stressa [Electroencephalographic biomarkers of experimentally induced stress]. *Vestnik YuUrGU. Seriya "Psikhologiya" [Bulletin of SUSU. Series "Psychology"]*. 2017;10(4):68–82. (In Russian)]. DOI: 10.14529/psy170407.
 22. Помыткин И.А., Каркищенко Н.Н. Метаболический контроль высокочастотных гамма-осцилляций в головном мозге. *Биомедицина*. 2019;15(2):43–53. [Pomytkin I.A., Karkischenko N.N. Metabolicheskij kontrol' vysokochastotnyh gamma-oscillyacij v golovnom mozge [Metabolic Control of High-Frequency Gamma Oscillations in the Brain]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(2):43–53. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-2-43-53.
 23. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С. 2010:358. [Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
 24. Саульская Н.Б., Виноградова Е.В. Влияние активации и блокады ГАМКА-рецепторов на активность нитрергической системы прилежащего ядра (*n. accumbens*). *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2014;100(7):791–801. [Saul'skaya N.B., Vinogradova Ye.V. Vliyaniye aktivatsii i blokady GAMKA-retseptorov na aktivnost' nitrerghicheskoy sistemy prilozhashchego yadra (*n. accumbens*) [The effect of activation and blockade of GABAA receptors on the activity of the nitreergic system]. *Russkij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2014;100(7):791–801. (In Russian)].

- tem of the nucleus accumbens (*n. accumbens*). *Russian physiological Sechenov Journal*. 2014;100(7):791–801. (In Russian)].
25. Сорокина Н.Д., Селицкий Г.В., Косицын Н.С. Нейробиологические исследования биоэлектрической активности мозга в диапазоне γ -ритма у человека. *Успехи физиол. наук*. 2006;37(3):3–10. [Sorokina N.D., Seliczkiy G.V., Kosicyn N.S. Nejbriologicheskie issledovaniya bioelektricheskoj aktivnosti mozga v diapazone γ -ritma u cheloveka [Neurobiological studies of the bioelectric activity of the brain in the range of gamma rhythm in humans]. *Uspehi fiziol. nauk [Successes of the physiological sciences]*. 2006;37(3):3–10. (In Russian)].
26. Уточкин И.С. Теоретические и эмпирические основания уровня подхода к вниманию. *Психология. Журн. Высш. школы экономики*. 2008;5(3):31–66. [Utochkin I.S. Teoreticheskie i empiricheskie osnovaniya urovnevnogo podhoda k vnimaniju. *Psixologiya [Theoretical and empirical foundations of a level-based approach to attention. Psychology]. Zhurn. Vyssh. shkoly ekonomiki [Journal of Higher Schools of Economics]*. 2008;5(3):31–66. (In Russian)].
27. Фифков Е., Маршал Дж. Стереотаксические атласы мозга кошки, кролика и крысы. В кн.: *Электрофизиологические методы исследования* (Буреш Я., Петрань М., Захар И.). Пер.: Кедер-Степанова И.А. М.: Изд-во иностранной литературы, 1962:456. [Fifkov E., Marshal Dzh. Stereotaksicheskie atlasy mozga koshki, krolika i krysy [Stereotactic atlases of the cat, rabbit and rat brain]. V kn.: *Elektrofiziologicheskie metody issledovaniya [In the book: Electrophysiological methods of research]* (Buresh Ya., Petran' M., Zahar I.). Transl.: Keder-Stepanova I.A. Moscow: Izd-vo inostrannoj literatury Publ., 1962:456. (In Russian)].
28. Фокин Ю.В. Сравнительная оценка влияния психоактивных средств на гиппокампальные тета- и гамма-ритмы. *Биомедицина*. 2019;15(3):23–32. [Fokin Yu.V. Sravnitel'naya ocenka vliyaniya psichoaktivnykh sredstv na gippokampal'nye teta- i gamma-ritmy [Comparative Evaluation of the Effect of Psychoactive Medicines on Hippocampal Theta and Gamma Rhythms]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(3):23–32. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-3-12-34.
29. Фокин Ю.В., Харитонов С.Ю., Каркищенко Н.Н. Фармако-ЭЭГ анализ эффектов регуляторных нейропептидов с ноотропными свойствами у кошки. *Биомедицина*. 2023;19(2):8–15. [Fokin Yu.V., Kharitonov S.Yu., Karkischenko N.N. Farmako-EEG analiz effektivov reguljatornykh nejropeptidov s nootropnymi svojstvami u koshek [Pharmacology-EEG Analysis of Regulatory Neuropeptides with Nootropic Properties in Cats]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2023;19(2):8–15. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-19-2-8-15.
30. Фокин Ю.В., Харитонов С.Ю., Таболякова Л.А., Каркищенко Н.Н. Фармако-ЭЭГ анализ влияния на гиппокамп кошек ацетилхолина и инсулина в наночастицах. *Биомедицина*. 2023;19(3):58–65. [Fokin Yu.V., Kharitonov S.Yu., Tabolyakova L.A., Karkischenko N.N. Farmako-EEG analiz vliyaniya na gippokamp koshek acetilholina i insulina v nanochastitsah [Pharmacology-EEG Analysis of the Effect of Acetylcholin and Insulin in Nanoparticles on the Hippocampus of Cats]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2023;19(3):58–65. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-58-65.
31. Чернышев Б.В., Панасюк Я.А., Семикопная И.И., Тимофеева Н.О. Активность нейронов базального крупноклеточного ядра при реализации инструментального условного рефлекса. *Журн. высш. нерв. деят.* 2003;53(5):633–645. [Chernyshev B.V., Panasyuk Ya.A., Semikopnaya I.I., Timofeeva N.O. Aktivnost' neuronov bazal'nogo krupnokletочноgo yadra pri realizacii instrumental'nogo uslovnogo refleksa [The activity of neurons of the basal large cell nucleus during the implementation of the instrumental conditioned reflex]. *Zhurn. vyssh. nerv. deyat. [Journal of Higher Nervous Activity]*. 2003;53(5):633–645. (In Russian)].
32. Шабанов П.Д., Вислобоков П.Д., Шилов Г.Н., Булай П.М., Луговский А.П. Изменение внутриклеточных потенциалов и ионных токов нейронов моллюсков и активности Cl-каналов под влиянием некоторых тормозных аминокислот и новых литий-содержащих соединений на их основе. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2015;3(3):39–47. [Shabanov P.D., Vislobokov P.D., Shilov G.N., Bulay P.M., Lugovskiy A.P. Izmeneniye vnutrikletочноykh potentsialov i ionnykh tokov neyronov molluskov i aktivnosti Cl-kanalov pod vliyaniem nekotorykh tormoznykh aminokislot i novykh litiysoedержashchikh soyedineniy na ikh osnove [Changes in intracellular potentials and ionic currents of mollusk neurons and Cl-channel activity under the influence of some inhibitory amino acids and new lithium-containing compounds based on them]. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii [Clinical pharmacology and drug therapy reviews]*. 2015;3(3):39–47. (In Russian)].
33. Шилов Г.Н., Бубель О.Н., Шабанов П.Д. Новый подход к пониманию структуры, функции и классификации ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса, молекулярной мишени для разработки новых антиконвульсантов на базе тормозных аминокислот. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2016;14(3):34–45. [Shilov G.N., Bube' O.N., Shabanov P.D. Noviy podkhod k ponimaniyu struktury, funktsii i klassifikatsii GAMK-benzodiazepinovo retseptornogo kompleksa, molekulyarnoy misheni dlya razrabotki novykh antikonvulsantov na baze tormoznykh aminokislot [A new approach to understanding the structure, function and classification of the GABA-benzodiazepine receptor complex, a molecular target for the development of new anticonvulsants based on inhibitory amino acids]. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii [Clinical pharmacology and drug therapy reviews]*. 2016;14(3):34–45. (In Russian)].

34. Allen H., Liddle P.P., Frith C.D. Negative features, retrieval processes and verbal fluency in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry.* 1993;163:769–775.
35. Başar E., Basar-Eroglu C., Karakas S., Schurman M. Brain oscillation in perception and memory. *International Journal of Psychophysiology.* 2000;35:95.
36. Başar E., Femir B., Emek-Savaş D.D., Güntekin B., Yener G.G. Increased long distance event-related gamma band connectivity in Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2017;14:580–590. DOI: 10.1016/j.nicl.2017.02.021.
37. Başar E., Emek-Savaş D.D., Güntekin B., Yener G.G. Delay of cognitive gamma responses in Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2016;11:106–115. DOI: 10.1016/j.nicl.2016.01.015.
38. Berger A., Posner M.I. Pathologies of brain attentional networks. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000;24(1):3–5.
39. Borgers C., Epstein S., Kopell N.J. Background gamma rhythmicity and attention in cortical local circuits: a computational study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102:7002–7007.
40. Bouyer J.J., Montaron M.F., Rougeul A., Buser P. Parietal electrocortical rhythms in the cat: their relation to a behavior of focused attention and possible mesencephalic control through a dopaminergic pathway. *C.R. Seances. Acad. Sci.* 1980;291:779–783.
41. Bressler S.L. Large-scale cortical networks and cognition. *Brain Research Reviews.* 1995;20:288–304.
42. Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 2002;33(3):325–340.
43. Cali C., Tauffenberger A., Magistretti P. The Strategic Location of Glycogen and Lactate: From Body Energy Reserve to Brain Plasticity. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:82. DOI: 10.3389/fncel.2019.00082.
44. Cape E.G., Jones B.E. Effects of glutamate agonist versus procaine microinjections into the basal forebrain cholinergic cell area upon gamma and theta EEG activity and sleep-wake state. *Eur. J. Neurosci.* 2000;12:2166–2184.
45. Cho R.Y., Konecky R.O., Carter C.S. Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(52):19878–19883. DOI: 10.1073/pnas.0609440103.
46. Debener S., Hermann C.S., Kranczioch C., Gembris D., Engel A.K. Topdown attentional processing enhances evoked gamma band activity. *Neuroreport.* 2003;14:683–686.
47. Dehaene S., Changeux J.P. Ongoing spontaneous activity controls access to consciousness: a neuronal model for inattentive blindness. *PLoS Biol.* 2005;3(5):e141.
48. Ebert U., Kirsh W. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998;28:944–949.
49. Eckhorn R., Bauer R., Jordan W., Brosch M., Kruse W., Munk M.H.J., Reitboeck H.J. Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biological Cybernetics.* 1988;60:121–130.
50. El Messari S., Leloup C., Quignon M., Brisorgueil M.J., Penicaud L., Arluison M. Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1998;399(4):492–512.
51. Engel A.K., Fries P., Singer W. Dynamic prediction: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001;2:704–716.
52. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123)*, Strasbourg, 1986.
53. Fornasari D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. *Pain Ther.* 2017;6(1):25–33. DOI: 10.1007/s40122-017-0091-4.
54. Fries P., Reynolds J., Rorie A.E., Desimone R. Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science.* 2001;291:1560–1563.
55. Fries P., Roelfsema P.R., Engel A.K., Koenig P., Singer W. Synchronization of oscillatory responses in visual cortex correlates with perception in interocular rivalry. *Proceedings of the National Academy of Science USA.* 1997;94:12699–12704.
56. Galambos R. A comparison of certain gamma band (40-HZ) brain rhythms in cat and man. In E. Basar & T.H. Bullak (Eds) *Induced Rhythms in the Brain*, Boston: Birkhauser, 1992:201–206.
57. Galow L.V., Schneider J., Lewen A., Ta T.T., Papageorgiou I.E., Kann O. Energy substrates that fuel fast neuronal network oscillations. *Front Neurosci.* 2014;8:398. DOI: 10.3389/fnins.2014.00398.
58. Golmayo L., Nunez A., Zaborszky L. Electrophysiological evidence for the existence of a posterior cortical-prefrontal-basal forebrain circuitry in modulating sensory responses in visual and somatosensory rat cortical areas. *Neuroscience.* 2003;119(2):597–609.
59. Gross D.W., Gotman J. Correlation of high-frequency oscillations with the sleep-wake cycle and cognitive activity in humans. *Neuroscience.* 1999;94:1005–1018.
60. Grossberg S., Gumewald A. Cortical synchronization and perceptual framing. *J. Cognitive Neurosci.* 1997;9(1):117.
61. Herculano-Houzel S., Munk M.H.J., Neuenschwander S., Singer W. Precisely synchronized oscillatory firing patterns require electroencephalographic activation. *J. Of Neuroscience.* 1999;19:3992–4010.
62. Hermann C.S., Demiralp T. Human EEG gamma oscillations in neuropsychiatric disorders. *Clin. Neurophys.* 2005;116:2719–2733.
63. Herrmann C.S., Knight R.T. Mechanisms of human attention: event-related potentials and oscillations. *Neurosci. Behav. Rev.* 2001;25:465–476.
64. Herrman C.S., Mecklinger A., Pfeifer E. Gamma response and ERPs in visual classification task. *Clin. Neurophysiol.* 1999;110:636–642.
65. Kann O., Huchzermeyer C., Kovács R., Wirtz S., Schuelke M. Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain.* 2011;134(2):345–358. DOI: 10.1093/brain/awq333.

66. Kann O., Papageorgiou I.E., Draguhn A. Highly energized inhibitory interneurons are a central element for information processing in cortical networks. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2014;34(8):1270–1282. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.104.
67. Khakh B.S., Henderson G. Modulation of fast synaptic transmission by presynaptic ligand-gated cation channels. *J. Auton. Nerv. Syst.* 2000;81(1-3):110–121.
68. Khirug S., Yamada J., Afzalov R., Voipio J., Khiroug L., Kaila K. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J. Neurosci.* 2008;28:4635–4639.
69. Kullmann D.M. Spillover and synaptic cross talk mediated by glutamate and GABA in the mammalian brain. *Prog. Brain Res.* 2000;125:339–351.
70. Kurudenkandy F.R., Zilberter M., Biverstål H., Presto J., Honcharenko D., Strömberg R., Johansson J., Winblad B., Fisahn A. Amyloid- β -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *J. Neurosci.* 2014;34(34):11416–11425. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1195-14.2014.
71. Lee K.-H., William L.M., Breakspear M., et al. Synchronous Gamma activity: a review and contribution to an integrative neuroscience model of schizophrenia. *Brain Res. Rev.* 2003;41:57–78.
72. Makeig S., Jung T.P. Tonic, phasic, and transient EEG correlates of auditory awareness in drowsiness. *Cogn. Brain Res.* 1996;4:15–25.
73. Mason B.J., Quello S., Shadan F. Gabapentin for the treatment of alcohol use disorder. *Expert Opin Investig Drugs.* 2018;27(1):113–124. DOI: 10.1080/13543784.2018.1417383.
74. Mesulam M.M., Mufson E.J., Wauner B.H., Levey A.I. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience.* 1983;10:1185–1201.
75. Mima T., Simpkins N., Oluwatimilehin T., Hallett M. Force Level Modulates Human Cortical Oscillatory Activities. *Neuroscience Letters.* 1999;275(2):77–80.
76. Oliveira L.T., Leon G.V.O., Provance D.W. Jr., de Mello F.G., Sorenson M.M., Salerno V.P. Exogenous β -amyloid peptide interferes with GLUT4 localization in neurons. *Brain Res.* 2015;1615:42–50. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.04.026.
77. Orekhova E.V., Rostovtseva E.N., Manyukhina V.O., Prokofiev A.O., Obukhova T.S., Nikolaeva A.Yu., Schneiderman J.F., Stroganova T.A. Spatial suppression in visual motion perception is driven by inhibition: Evidence from MEG gamma oscillations. *NeuroImage.* 2020;213:116753. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2020.116753.
78. Palovcik R.A., Phillips M.I., Kappy M.S., Raizada M.K. Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res.* 1984;309(1):187–191.
79. Pearson-Leary J., McNay E.C. Intrahippocampal administration of amyloid- β (1-42) oligomers acutely impairs spatial working memory, insulin signaling, and hippocampal metabolism. *J. Alzheimers Dis.* 2012;30(2):413–422. DOI: 10.3233/JAD-2012-112192.
80. Pulvermuller F., Eulitz C., Pantev C., et al. High-frequency conical responses reflect lexical processing: an MEG study. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1996;(98):76–85.
81. Pulvermuller F., Lutzenberger W., Preissl H. Nouns and verbs in intact brain: Eviden from event-related potentials and high — frequency cortical responses. *Cereb. Cortex.* 1999;(9):497–506.
82. Roberto M., Gilpin N.W., O'Dell L.E., et al. Cellular and behavioral interactions of gabapentin with alcohol dependence. *J. Neurosci.* 2008;28(22):5762–5771. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0575-08.2008.
83. Rodriguez R., Kallenbach U., Singer W., Munk M.H. Short- and long-term effects of cholinergic modulation on gamma oscillations and response synchronization in the visual cortex. *J. Neurosci.* 2004;24:10369–10378.
84. Sannita W.G. Stimulus-specific oscillatory responsiveness of the brain: a time/frequency-related coding process. *Clinical Neurophysiology.* 2000;111(4):565–583.
85. Saper C.B. Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 1984;222:313–342.
86. Sheer D.E. Focused arousal, 40-Hz EEG, and dysfunction. In: *Self-Regulation of the Brain and Behavior.* Elbert T., Rockstroh B., Lutzenberger W., et al. (Eds.). Berlin: Springer, 1984:64–84.
87. Shibata T., Shimoyama I., Ito T., Abla D., Iwasa H., Koseki K., Yamanouchi N., Sato T., Nakajima Y. Event-Related Dynamics of the Gamma-Band Oscillation in the Human Brain — Information-Processing During a Go/Nogo Hand Movement Task. *Neuroscience Research.* 1999;33(3):215–222.
88. Singer W., Gravis C.M. Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Ann. Rev. Neurosci.* 1995;18:555–586.
89. Sohal V.S., Zhang F., Yizhar O., Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature.* 2009;459(7247):698–702. DOI: 10.1038/nature07991.
90. Suzuki A., Stern S.A., Bozdagi O., Huntley G.W., Walker R.H., Magistretti P.J., Alberini C.M. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell.* 2011;144(5):810–823. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.018.
91. Szabadi J., Varga C., Molnar G., Olah S., Barzo P., Tamas G. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science.* 2005:311.
92. Talbot K., Wang H.Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., Fuino R.L., Kawaguchi K.R., Samoyedny A.J., Wilson R.S., Arvanitakis Z., Schneider J.A., Wolf B.A., Bennett D.A., Trojanowski J.Q., Arnold S.E. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 2012;122(4):1316–1338. DOI: 10.1172/JCI59903.

93. Tallonbaudry C., Kreiter A., Bertrand O. Sustained and Transient Oscillatory Responses in the Gamma-Band and Beta-Band in a Visual Short-Term-Memory Task in Humans. *Visual Neuroscience*. 1999;16(3):449–459.
94. Tremblay R., Lee S., Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*. 2016;91(2):260–292. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.06.033.
95. Zaborszky L., Gaykema R.P., Swanson D.J., Cullinan W.E. Cortical input to the basal forebrain. *J. Neurosci*. 1997;79(4):1051–1078.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., академик РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

Фокин Юрий Владимирович*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Yuriy V. Fokin*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Харитонов Сергей Юрьевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: zetroks5@gmail.com

Sergey Yu. Kharitonov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: zetroks5@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-95-109>



МИНИПИГС — ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНАЯ ЛИНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ЭКСТРАПОЛЯЦИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЧЕЛОВЕКА

О.В. Алимкина*, Н.В. Петрова, Н.В. Станкова, Ю.В. Фокин, Е.С. Глотова,
Н.А. Ларюшина, И.А. Васильева

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

В статье представлены результаты исследований, проведенных на минипигсах в Научном центре биомедицинских технологий за последние 10 лет. Приведены сравнения с наиболее значимыми лабораторными животными, а также показаны перспективы участия минипигсов в различных биомедицинских манипуляциях как альтернатива обезьянам, для использования которых существует ряд ограничений.

Ключевые слова: минипигс, биомодель, гуманизированность, экстраполяция

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алимкина О.В., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Фокин Ю.В., Глотова Е.С., Ларюшина Н.А., Васильева И.А. Минипигс — предпочтительная линия лабораторных животных для экстраполяции биомедицинских исследований на человека. *Биомедицина*. 2024;20(2):95–109. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-95-109>

Поступила 12.02.2024

Принята после доработки 02.05.2024

Опубликована 10.06.2024

MINIPIGS AS PREFERRED LABORATORY ANIMALS FOR EXTRAPOLATION OF BIOMEDICAL RESEARCH DATA TO HUMANS

Oksana V. Alimkina*, Nataliya V. Petrova, Nataliia V. Stankova, Yuriy V. Fokin,
Elena S. Glotova, Nadezhda A. Laryushina, Irina A. Vasil'eva

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

This article presents the results of 10-year research studies conducted using minipigs at the Scientific Center of Biomedical Technologies. Comparisons with the most significant laboratory animals are presented. Prospects for involving minipigs in various biomedical manipulations as an alternative to monkeys, whose use is restricted, are shown.

Keywords: minipigs, biomodel, humanization, extrapolation

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Alimkina O.V., Petrova N.V., Stankova N.V., Fokin Yu.V., Glotova E.S., Laryushina N.A., Vasil'eva I.A. Minipigs as Preferred Laboratory Animals for Extrapolation of Biomedical Research Data to Humans. *Journal Biomed*. 2024;20(2):95–109. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-95-109>

Submitted 12.02.2024
Revised 02.05.2024
Published 10.06.2024

Введение

Вклад исследований на животных в медицину трудно переоценить. Они широко используются в современной медицине, в научных исследованиях и в системе образования. Так, биомедицинские исследования с использованием животных необходимы для разработки и оценки новых методов лечения, фундаментальных исследований (биологических структур и функций, заболеваний и др.), создания биологических продуктов (вакцин, антител и т.п.) и других целей. Одними из наиболее близких к человеку по физиологии сердечно-сосудистой системы, органов пищеварения, строению зубов, почек, кожи, глаз, составу крови и показателям артериального давления являются свиньи, в частности минипигсы, которые были выведены в 1974 году в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России. Минипигсы удобны для содержания в лабораторных условиях и проведения на них различных манипуляций, поскольку обладают небольшой живой массой и малыми размерами. В их генотипе отсутствуют гены карликовости, но они отселектированы по малым размерам и небольшой массе тела. Эти количественные признаки закреплены в генотипе минипигсов в результате сложного кроссбридинга, а также последующего отбора на протяжении ряда поколений [5].

В данной работе мы дадим сравнение наиболее часто используемых лабораторных животных с минипигсами. Для различных исследований наибольшее распространение получили **лабораторные мыши** вида *Mus musculus* L. Они нашли широкое распространение как в России, так и за рубежом [8, 13, 14]. Геном мыши содержит 20 пар хромосом, что составляет около 2,7 млрд комплементарных пар оснований нуклеиновых кислот, а у человека —

23 пары хромосом (около 3,2 млрд нуклеотидов), что позволяет сравнивать напрямую генетические коды мыши и человека. В их геномах содержится примерно по 30 тыс. генов. 99% генов человека соответствуют генам мыши, и 80% из них абсолютно идентичны [10–12]. Мышей используют для научных целей в биологии, онкологии, токсикологии, фармакологии, физиологии, микробиологии, генетике, для определения токсичности лекарств и стандартизации химических и биологических препаратов, стандартизации гормональных препаратов, вакцин, сывороток, для изучения злокачественных опухолей, лейкозов, гнотобиотных процессов [1, 4].

Обезьяны. Обезьяны вследствие большого биологического сходства с человеком являются адекватной экспериментальной моделью для решения многих задач биологии и патологии человека. У макак ДНК на 93% совпадает с человеческой, что делает их кандидатами для создания гуманизированных моделей [20].

Отдельно стоит отметить ограничения, связанные с использованием обезьян в биомедицинских исследованиях. Использование приматов в Европейском союзе регулируется Директивой 2010/63/EU, вступившей в силу 1 января 2013 года. Она разрешает использование приматов, если отсутствуют другие альтернативные методы. Тестирование на приматах разрешено для фундаментальных и прикладных исследований, тестирования качества и безопасности лекарств, продуктов питания и других продуктов, а также исследований, направленных на сохранение вида. Использование человекообразных обезьян, как правило, не допускается, за исключением случаев, когда считается, что эти действия необходимы для сохранения вида или в связи с неожиданной вспышкой опасного для жизни

или изнуряющего клинического состояния у людей. Директива подчеркивает использование принципа 3R (замена, уточнение, сокращение) и благополучие животных при проведении тестирования на приматах [21].

Поправка 2013 года к Закону Германии о защите животных со специальными правилами для обезьян привела к почти полному запрету на использование человекообразных обезьян в качестве лабораторных животных. Последний раз человекообразные обезьяны использовались в лабораторных экспериментах в Германии в 1991 году.

Использование же грызунов и минипиггов ограничивается только правилом трех R, что делает их наиболее доступными для различных манипуляций.

В статье представлены некоторые данные, полученные Научным центром биомедицинских технологий ФМБА России, которые показывают значимость минипиггов в биомедицинских исследованиях и открывают перспективы их дальнейшего использования. В работе используются минипигсы, самцы и самки в возрасте 8–11 мес. со средней массой тела $18,5 \pm 0,74$ кг, выведенные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержатся в одном помещении, в групповых станках по 4 особи, с оптимальными параметрами микроклимата и освещения для содержания крупных лабораторных животных. Используется стандартный тип кормления — полнорационный комбикорм СК-8 (норма — 320 г/сут на голову), поение без ограничений. Исследования проводятся в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС и Базельской декларацией от 2011 года о защите животных, используемых в научных целях. Все эксперименты одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [6].

Минипигсы как биомодель

Атеросклероз. Оказалось, что минипигсы являются адекватной биомоделью для изучения патогенеза этого заболева-

ния. Изучены возрастные особенности изменения биохимических показателей и липидного обмена сыворотки крови этих животных. Было изучено содержание в сыворотке крови общего холестерина, триглицеридов, соотношение фракций липопротеидов у животных разного возраста. Минипигсы использовались при изучении роли экзогенных химических соединений, в т.ч. и фторидов, в патогенезе атеросклероза и ускорении естественных процессов старения [4].

Пневмоцитоз. Исследования проводились на молодняке минипиггов. У поросят болезнь протекала с явлениями пневмонии. После культивирования *Pn. Carinii* в культуре клеток была выявлена локализация возбудителя в цитоплазме.

Ишемия головного мозга. На минипиггах изучалась острая ишемия головного мозга. Полученные данные позволили охарактеризовать миниатюрных свиней как животных, которые легко переносят «выключение» обеих общих сонных артерий. При этом у них, как и у людей, при острых нарушениях мозгового кровообращения возникают проявления висцеральной патологии — нарушается функциональное состояние печени [6].

Язва пищевода и желудка. Исследования показали необычайно высокую частоту язвы пищевода и желудка у минипиггов. Изучаемые симптомы привлекают внимание ученых отчасти как результат существования связи между частотой заболевания и типом рациона, а также в связи с тем, что этиология и патогенез схожи с таковой у человека. У минипиггов объем секреции желудочного сока и концентрация гастрина в сыворотке крови сравнимы с человеческими.

Гнотобиоты. Большой интерес представляют безантигенные животные, контролируемые не только по микробному, но и по антигенному фактору. Гнотобиотическое животное подвергается действию трех факторов: отсутствия микрофлоры, стерильной диеты

и микроклимата изолятора. Суммарный эффект этих факторов формирует специфический морфофизиологический статус организма гнотобиота, для которого характерно недоразвитие дыхательной, лимфатической и пищеварительной систем, а также наличие структурных изменений в остальных органах и системах.

Моделирование алкоголизма. Минипигсы сходны с человеком по физиологии пищеварения, уровню многих ферментов метаболизма, строению и функциям различных систем и органов и, как оказалось, по поведенческим признакам опьянения. На минипигах моделируются главные черты этого заболевания, свойственные человеку, — добровольное потребление алкоголя и четкое разделение отдельных стадий заболевания. Изучались патологические изменения в тканях и органах при хроническом алкоголизме.

Дерматология. На минипигах производится изучение патогенетических механизмов восстановления стромально-эпителиальных возрастных изменений кожи с помощью клеточной трансплантации. Методами гистологии и иммуногистохимии оценивается приживаемость трансплантируемых клеток, возможное воспаление и структурные изменения, происходящие в дерме в результате трансплантации.

Группы крови. Работа по выявлению сходств и различий по эритроцитарным антигенам между человеком и минипигами проводилась путем постановки перекрестных реакций с использованием методики определения групп крови человека и методики определения групп крови свиней. В результате проведенных исследований выявлено четкое сходство между антигеном А системы АВ0 у человека и антигеном Аа системы А у минипигсов. А также между антигеном e(hr') системы Rh у человека и антигенами Ea и Ee системы E у минипигсов. По остальным антигенам сходства не обнаружено. Установлена вы-

сокая степень сходства эритроцитарных систем АВ0 у человека и системы А у наших мини-свиней, а также системам Rh у человека и системы E у мини-свиней. Выявлено сходство между генотипами человека по системе АВ0: 0 (I), А (II) и АВ (IV) и генотипами минипигсов по системе А: А./., Аа/. и Ао/. По остальным системам человека (Kell и MNs) и системам минипигсов (B, D, F, G, L) иммунологического сходства не установлено.

Спорт и восстановительная медицина. Отдельный интерес представляет изучение характеристики воздействия на организм человека физических нагрузок разной мощности при изучении процессов адаптации организма к физическим нагрузкам и применения в клинической спортивной и восстановительной медицине. Экстремальные физические нагрузки на мелких лабораторных животных имеют ограничения из-за больших различий в скорости метаболизма этих животных и человека, а также невозможности многократного забора крови. Мини-пиги представляют собой наиболее релевантную человеку биомодель с этой точки зрения.

Моделирование предельной физической нагрузки у светлогорских минипигсов (рис. 1) показало, что работа «до отказа» вызвала статистически значимое увеличение концентрации лактата в крови минипигсов на 60% к окончанию нагрузки ($p < 0,001$) по сравнению с исходным донагрузочным уровнем. Через 30 мин после окончания нагрузки уровень лактата всё ещё превышал исходный ($p < 0,05$) на 30%, но уже через 1 ч не отличался от исходного ($p > 0,05$). Эти результаты аналогичны наблюдаемым у человека [15].

Повышение уровня лейкоцитов после нагрузки у минипигсов совпадает с известным эффектом у человека. W. Winternitz (1893), E. Willebrand (1903) установили появление лейкоцитоза после мышечной деятельности.

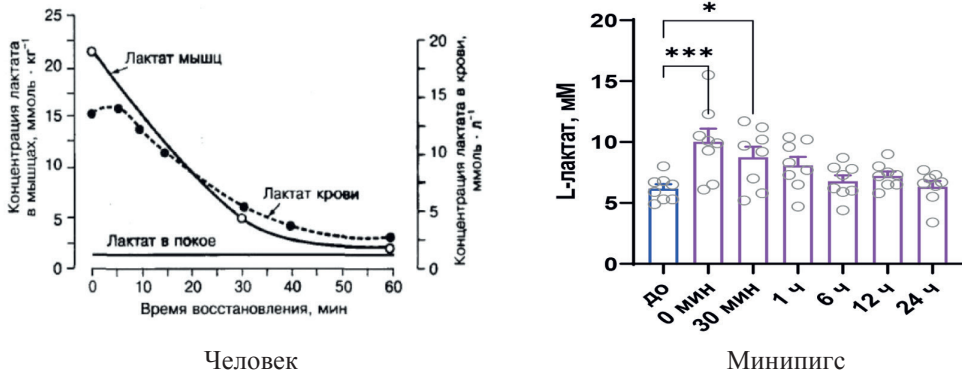


Рис. 1. Сравнение динамики утилизации лактата после перенесенной физической нагрузки у человека и минипигсов.

Fig. 1. Comparison of the dynamics of lactate utilization after physical exertion in humans and minipigs.

Таблица 1. Морфологический состав крови минипигсов до и после физической нагрузки

Table 1. Morphological composition of minipig blood before and after physical exertion

Параметры	До нагрузки	Сразу после	30 мин	1 ч	6 ч	12 ч	24 ч
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	12,5±0,77	11,7±0,60	14,4±1,19	14,6±1,01	15,8±0,78***	14,1±0,67	12,1±0,51
Эритроциты, 10 ¹² /л	8,2±0,11	8,0±0,11	7,8±0,15	7,9±0,09	7,8±0,13	7,7±0,13	7,6±0,10
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	385,3±32,13	393,3±32,12	370,4±37,46	376,5±38,29	323,3±31,50	274±22,75*	345,8±26,11
Гемоглобин, 10 ¹² /л	152,6±2,92	148±3,38	144,4±4,52	146,4±3,77	143,9±4,15	142,4±4,59	140,5±4,06

Первым исследователем, установившим закономерности изменения количества лейкоцитов под непосредственным влиянием физической нагрузки, был А.П. Егоров (1926). Он впервые дал качественную и количественную характеристику изменениям лейкоцитов и выделил три фазы лейкоцитоза.

Первая фаза (лимфоцитарная) возникает после относительно небольшой работы. Она характеризуется незначительным лейкоцитозом ((8–12)×10⁹/л), снижением относительного количества нейтрофилов, абсолютным и относительным увеличением количества лимфоцитов и относительным уменьшением количества эозинофилов. Вторая фаза (нейтрофильная) появляется после сравнительно большой работы. Она характеризуется большим увеличением количества лейкоцитов ((16–18)×10⁹/л).

Третья фаза (интоксикационная) протекает по двум типам: регенеративному и дегенеративному. При регенеративном типе происходит значительное увеличение количества лейкоцитов ((20–50)×10⁹/л), увеличение количества нейтрофилов со сдвигом влево, уменьшение количества лимфоцитов (1%), полное исчезновение эозинофилов. Дегенеративный же тип характеризуется хотя и менее выраженным лейкоцитозом ((10–15)×10⁹/л), но более резким сдвигом нейтрофилов влево, абсолютной лимфо- и эозинопенией и появлением патологических форм лейкоцитов. Интоксикационная фаза лейкоцитоза свидетельствует о крайней чрезмерности нагрузки (табл. 2).

Минипигсы демонстрируют повышение уровня лейкоцитов через 6 ч после перенесенной тяжелой физической нагрузки. Если

Таблица 2. Сравнение некоторых репродуктивных параметров наиболее значимых для биомедицинских исследований лабораторных животных, пригодных для трансгенеза

Table 2. Comparison of some reproductive parameters of the most significant laboratory animals, suitable for transgenesis

Вид	Продолжительность жизни	Возраст наступления половозрелости	Длительность беременности и оварийный цикл	Потомство	Интервал между родами	Интервал времени для создания устойчивой генно-модифицированной линии*
Макака-резус	До 21 года	3–4 года, около 18 лет — репродуктивный период	165 дней беременности, 28–29 дней менструальный цикл	1, реже 2, детёныша за цикл, 14–16 детёнышей за жизнь	360 дней	От 4-х лет — на 1 поколение, от 80 лет — на устойчивую линию
Мини-свинья	10–15 лет	5,5–7,5 мес.	114–118 дней беременности, 21 день оварийный цикл	5–12 детёнышей за цикл, ~25 за год (2 цикла)	~180 дней (2 приплода за год)	От 1 года на 1 поколение, от 20 лет — на устойчивую линию
Мышь	1–2 года	21–30 дней	18–24 дня беременности, 4–5 дней эстральный цикл	6–10 мышат за цикл	От 18 дней (могут оплодотворяться сразу после рождения мышат)	3–4 поколения в год, от 7 лет — на устойчивую линию

Примечание: * — принято, что генно-модифицированная линия считается устойчивой после 20 поколений.

На базе Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России создано 13 трансгенных, 5 трансгенно-нокаутных и 4 нокаутных линии мышей.

Note: * — accepted that a genetically modified line is considered stable after 20 generations.

At the Scientific Center for Biomedical Technologies of the FMBA of Russia, 13 transgenic, 5 transgenic-knockout, and 4 knockout mouse lines were created.

проводить аналогию с данными по человеку, полученные нами результаты указывают на тяжелую физическую нагрузку и неподготовленность организма минипигсов к выполнению данной мышечной работы.

На рис. 2 видно, что происходит резкое нарастание нейтрофилов через 30 мин после бега, указывающее на возникновение 2-й фазы лейкоцитоза (нейтрофильная фаза), что позволяет нам сделать вывод о тяжести физической нагрузки животных. При этом значительно уменьшается количество лимфоцитов. Эти данные также свидетельствуют о схожести физиологических процессов, наблюдаемых у человека после перенесенной тяжелой физической нагрузки [15].

Молекулярно-генетические маркеры, изученные на минипигсах. При изучении генов-мишеней именно *NFE2L2* оказался наиболее чувствителен к степени физической нагрузки у модельных животных, он может служить оценочным критерием при проведении молекулярно-генетиче-

ских исследований работоспособности и выносливости у минипигсов. Он рекомендован для проведения исследований влияния фармакологических препаратов на восстановительные свойства организма при возможном выборе фармнутриентов и биологически активных веществ и экстраполяции исследований на человека. Фактор транскрипции *Nrf2* (ген *NFE2L2*) является мастер-регулятором антиоксидантной защиты организма, под контролем которого находится транскрипция генов, кодирующих ключевые белки антиоксидантных систем глутатиона (*Gclc*, *Gclm*, *Gsr1*, *xCT*) и тиоредоксина (*Txn*, *Txnrd1*, *Srxn1*), а также ферменты синтеза НАДФН (*G6pd*, *Pgd*, *Idh1*, *Me1*) и детоксикации АФК (*Gpx1*, *Gsta1/2/3/5*, *Gstm1/2/3*, *Gstp1*, *Nqo1*) [10]. *Nrf2* экспрессируется во всех органах в ответ на окислительный стресс. Было показано, что ген *NFE2L2*, кодирующий фактор транскрипции *Nrf2*, активно экспрессируется при физических нагрузках [7, 25].

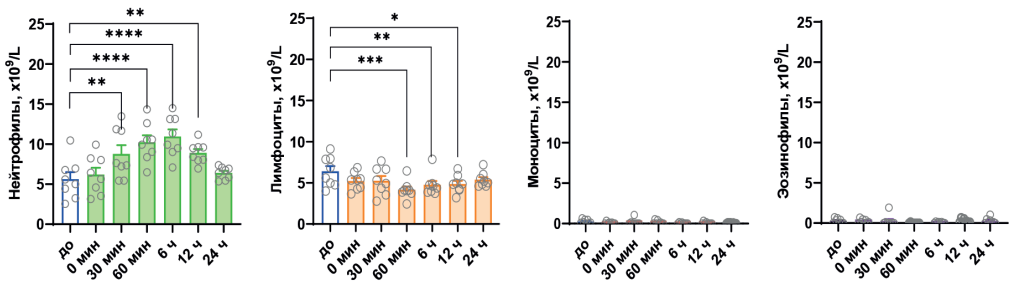


Рис. 2. Изменения лейкоцитарной фракции крови минипигсов до и после физической нагрузки.
Fig. 2. Changes in the leukocyte fraction of minipigs blood before and after physical exertion.

Также мишенями для молекулярных исследований являлись уровни экспрессии следующих генов: *IL-6*, *HMGBl*, *TNF* (гены, отвечающие за синтез белков, относящихся к группе цитокинов) и *SIRT* (трансфераза из семейства белков-сиртуинов).

Ген *IL-6* является провоспалительным цитокином, принимающим участие в воспалительной реакции, а также сильным эндогенным пирогеном, участвует в созревании ряда иммунокомпетентных тканей, в т.ч. В-клеток. Нарушение регуляции в синтезе данного белка ассоциируется с миксомой сердца, неалкогольной жировой болезнью печени, ревматоидным артритом, а также в клеточном массиве миеломы. Ген *TNF* кодирует полифункциональный цитокин. Данный белок продуцируется в основном клетками-макрофагами, способен вызывать гибель линий опухолевых клеток. Ассоциируется с неалкогольной жировой болезнью печени, различными формами рака, упоминается как инициатор цитокинового шторма при иммунотерапии раковых опухолей. Ген *HMGBl* кодирует белок-цитокин, принадлежащий суперсемейству High mobility Group-box. Данный белок участвует в организации и регуляции транскрипции ДНК. Обычно содержится в нуклеоплазме. Вне клетки он является индуктором ряда провоспалительных цитокинов. Его связывают с подавлением эпигенетических генов и рекомбинации рДНК. Его накопление вне цитоплазмы

клетки связывают с процессом старения и некоторыми возрастными патологиями. Ген *Sirt* (сиртуин 1), в отличие от вышеперечисленных генов, не является кодирующим цитокин. Данный ген кодирует белок-трансферазу. По некоторым данным белки этой группы способны положительно регулировать длину теломер. По указанным генам разработаны системы ПЦР-детекции, видоспецифичные праймеры и программы для анализа уровня экспрессии, которые могут представлять научный интерес в биомедицинских исследованиях [7].

Параметры мозга и высшей нервной деятельности. Размеры мозга у некоторых лабораторных животных: у мыши — в среднем 0,5 г; у мини-свиней — 45–70 г; у обезьяны (макак-резусов) — 73–120 г; у человека — в среднем 1500 г.

Несмотря на поверхностные различия, особенно в размере и весе, мозг мыши и его функции могут служить мощной моделью на животных для изучения заболеваний человеческого мозга или психических расстройств. Гены, ответственные за построение и функционирование мозга мыши и человека, на 90% идентичны. Трансгенные линии мышей также позволяют нейробиологам целенаправленно маркировать определенные типы клеток, чтобы исследовать нервную основу фундаментальных процессов. В коре головного мозга мыши около 8–14 млн нейронов, в то время как у людей их более 10–15 млрд.

Понимание нейрофизиологических основ функционирования мозга человека невозможно без использования животных моделей с применением инвазивных методов исследования. Наиболее близкими животными к человеку в эволюционном плане, а также по анатомическому строению и физиологическим особенностям являются обезьяны [20].

Среди всех известных видов обезьян макаки-резусы — самая распространенная животная модель для изучения процессов высшей нервной деятельности. Однако, учитывая явные различия во многих когни-

тивных способностях человека и обезьяны, в размере и строении их мозга, не всегда можно напрямую обобщать получаемые результаты.

Параметры психоэмоционального состояния. Нами изучены параметры ультразвуковой вокализации (УЗВ) животных, отражающей их функциональное и психоэмоциональное состояние (рис. 3).

Ультразвуковая вокализация в состоянии покоя характерна для всех исследованных нами лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи, обезьяны), а также челове-

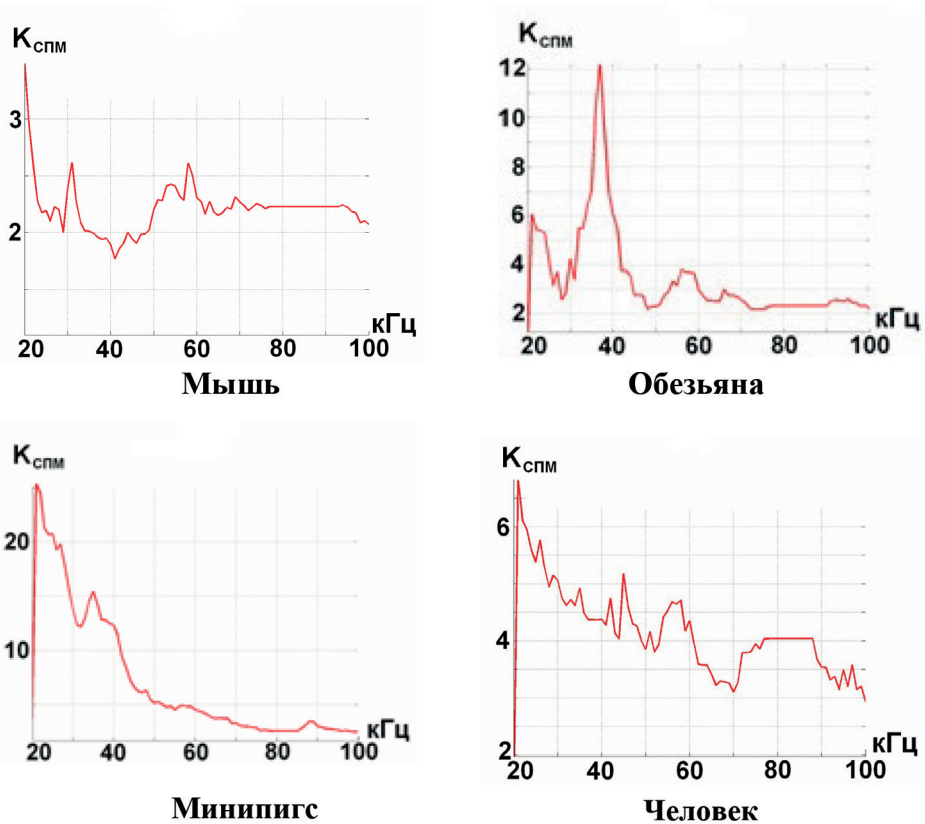


Рис. 3. Ультразвуковая вокализация (распределение числа случаев обнаружения ультразвука) наиболее значимых лабораторных животных и человека. По оси абсцисс — частота (кГц), по оси ординат — спектральная плотность мощности (коэффициент, $K_{спм}$).

Fig. 3. Ultrasonic vocalization (distribution of the number of ultrasound detection cases) of the most significant laboratory animals and humans. Abscissa axis – frequency (kHz); ordinate axis – power spectral density (coefficient, $K_{спм}$).

ку. Наиболее близкими к человеку по УЗВ животными, используемыми в качестве биомоделей в экспериментах по оценке функционального состояния методом анализа УЗВ, вероятно, являются минипигсы и мыши.

Основные методы трансгеноза. Привлекательность минипигсов как биомоделей не ограничивается использованием существующих популяций. Развитие технологий активного редактирования генома в совокупности с методами получения трансгенных животных позволяет с высокой эффективностью получать биомодели, отвечающие требованиям конкретного исследования. В табл. 2 отражены основные репродуктивные параметры наиболее распространённых лабораторных животных, используемых для трансгеноза.

На сегодня для получения трансгенных и/или нокаутных крупных лабораторных животных применяются следующие методы: микроинъекции в пронуклеусы зигот, трансфекция векторами, модификация спермиев и сперматозоидов, перенос ядер модифицированных стволовых клеток [2, 3]. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. Ввиду особенностей минипиггов для получения трансгенных и нокаутных животных, как правило, используется метод переноса ядер модифицированных стволовых клеток (рис. 4). В сочетании с технологиями направленного активного редактирования генома (ZFN, TALENs, CRISPR/Cas9) данный метод позволяет не только получить трансгенное потомство с вероятностью 100%, но и провести предварительный генетический скрининг и отобрать для переноса ядер клеточные клоны, точно соответствующие целям эксперимента (копийность гена, гомо/гетерозиготность, уровень экспрессии, наличие генетических aberrаций в редактируемом локусе и пр.). Более того, данный метод позволяет получать животных с несколькими модификациями за одну стадию. К настоящему времени

мультитрансгенные мини-пиги были получены для ряда исследований, например совместного действия генов, вовлечённых в патогенез диабета [18, 23], или получения животных, экспрессирующих регуляторные факторы комплемента человека [17]. Последние в сочетании с нокаутом гена *GGTA1* представляют важнейшую модель для исследования возможности элиминирования сверхострой реакции отторжения при ксенотрансплантации тканей и органов от свиней приматам [2, 19, 20, 23].

Трансгенные мини-пиги. Исследования, связанные с безопасностью человека, такие как эффекты и методы лечения заболеваний, требуют создания моделей крупных лабораторных животных.

Свиньи были преобладающим объектом выбора при моделировании большинства заболеваний человека благодаря их высокой продуктивности и относительно небольшим финансовым затратам на содержание. С момента разработки методов гибридизации мини-свиньи использовались чаще, чем фермерские свиньи, из-за их примечательно меньшего размера, благодаря этому процесс выращивания был более контролируемым, снижалось количество соединений, которые, как следствие, требовали непомерно высоких затрат на эксперименты, и упрощалась работа с животными. Тем не менее, по сравнению с разведением мини-свиней путем гибридизации, трансгенные свиньи демонстрируют преимущества в сокращении периода разведения и снижении ограничений, таких как происхождение, для введения новых признаков, что в значительной степени влияет на улучшение моделей свиней на генетическом уровне.

Одним из примеров трансгенных мини-свиней Юкатана является создание самцов и самок свиней *LDLR^{-/-}* с помощью методов рекомбинантного аденоассоциированного вирусопосредованного нацеливания генов и переноса ядер соматических

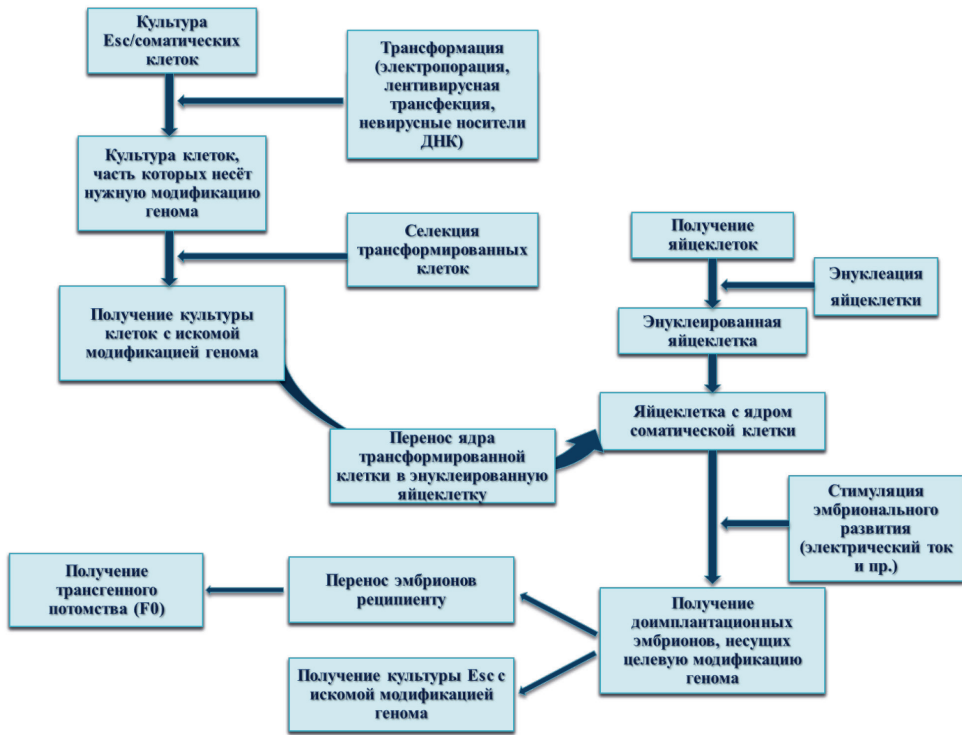


Рис. 4. Получение трансгенных животных методом пересадки ядер соматических клеток (SCNT).
 Fig. 4. Creation of transgenic animals using somatic cell nuclear transfer (SCNT).

клеток, что обеспечивает лучшую модель крупных животных с наследственной гиперхолестеринемией и атеросклерозом. Кроме того, в 2020 году компанией «Choі» были получены генетически наследуемые юкатанские миниатюрные свиньи с нокаутом *GGTA1* путем комбинирования эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN), и ядерного переноса. Исследователи пришли к выводу, что TALEN может быть точным и безопасным инструментом для создания свиней с отредактированным геном, а модель юкатанской миниатюрной свиньи с *GGTA1*-нокаутом TALEN в этом исследовании может служить безопасным и эффективным ресурсом органов и тканей для клинических применений. В 2021 году было сообщено о другой юкатанской мини-свинье с технологией нокаута гена.

Тройной нокаут генов произошел в отношении *GGTA1*, гидроксилазы цитидинмонофосфат-N-ацетилнейраминовой кислоты (CMAH) и альфа-1,3-галактозилтрансферазы 2 (*A3GALT2*) у миниатюрных свиней Юкатана в отношении иммунной реактивности человека [16].

Геттингенская мини-свинья, обладающая хорошей плодовитостью и стабильной генетикой, также является широко используемой моделью мини-пиггов. Геттингенские миниатюрные свиньи обычно используются в качестве модели нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

Свиньи Учжишань были на грани исчезновения в 1980-х годах, это обнаружили китайские ученые при проведении исследований видов животных. Вначале эта порода использовалась для увеличения воспроиз-

водства, а затем было установлено, что она является подходящим видом для модели мини-свиньи. В одном случае путем клонирования вручную были получены трансгенные мини-свиньи Учжишань с нарушенной системной активностью GHR, и в ходе научных исследований оценивался профиль их роста и метаболизм глюкозы. В исследованиях был сделан вывод, что эта модель может быть полезна при изучении функций гормона роста в отношении рака, диабета и долголетия.

Мини-свинка Бама — это миниатюрный вид свиней из китайской провинции Гуанси. В исследовании сообщалось об оптимизации эффективности производства трансгенных мини-свиней Бама с помощью SCNT, в результате чего был сделан вывод о том, что способность трансгенных эмбрионов мини-свиней Бама к развитию *in vitro* и *in vivo* была улучшена с использованием донорских клеток для SCNT, обработанных ретровирусом. Результат обеспечил как оценку, так и создание производственных трансгенных моделей свиней для биомедицинских целей [16].

Иммунологические исследования. Грызуны — биологические модели, одни из наиболее распространенных и часто используемых в сфере иммунологии, фармакодинамики и генетики ввиду ряда очевидных преимуществ, в основном экономических и в, частности, физиологических (например, высокая скорость воспроизведения потомства и т.п.).

Грызуны обладают высокой генетической гомогенностью с геномом человека, поэтому на данных моделях эффективно тестируются различные препараты, в т.ч. и вакцины. Например, в ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» путем прямого введения ts-мутаций из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ряда холодаадаптированных штаммов-доноров аттенуации вируса гриппа в геном вирулентного штамма A/WSN/33 (H1N1),

были получены сайт-специфические мутанты — кандидаты в живые гриппозные вакцины [9].

Тем не менее у грызунов, используемых в качестве моделей человеческого иммунного ответа, наблюдается несколько особенностей. Основной проблемой является слабо контролируемый инбридинг, приводящий к учащению проявлений рецессивных мутаций, а также реактивный иммунитет и быстрое течение заболеваний. Самыми распространенными заболеваниями грызунов являются опухоли, а именно опухоли молочных желез, респираторные заболевания, почечная и сердечная недостаточность.

Также недавно было обнаружено, что с возрастом у мышей определенных видов не происходит накопления больших популяций долгоживущих клеток памяти; это позволяет сохранить разнообразие наивных Т-клеток и избежать старческих аутоиммунных заболеваний [9], в отличие от человека, — со старением в нашем организме просматриваются противоположные тенденции.

Различия в иммунном ответе и развитии побуждают к поиску иных животных-био-моделей, закрывающих научные потребности в схожести с нашим организмом.

Мини-пиги могут выступать в роли более деликатных иммунологических моделей, учитывая возможность оценки влияния стресса и социального взаимодействия на развитие патологий наряду с инфекционными агентами, и на сегодня имеется значительное количество исследований в этой области.

Также отмечается практическое удобство в использовании мини-пиггов, позволяющих проводить базовые манипуляции (например, забор крови, биологических тканей и т.п.) прижизненно.

Например, в ходе доклинических испытаний моноклональных антител за основу была взята линия мини-пиггов Гёттинген.

Были созданы два вектора экспрессии: один — с сегментами гена *IGH*, которые при реаранжировке дают последовательности, кодирующие разнообразные секреторные тяжелые цепи иммуноглобулинов IgG1; другой — с сегментами гена *IGK*, соответственно, дающий легкие цепи Ig-к. Эти генные элементы должны генерировать растворимые IgG человека, при этом не влияя на репертуар свиных антител (такое может произойти только при экспрессии мембраносвязанных иммуноглобулинов).

Векторами трансфицировали фибробласты почек, полученные от самцов мини-пиггов; после ПЦР-скрининга на трансгенность отобранные ядра пересадили в яйцеклетки. Удалось получить восемь трансгенных поросят, четверо достигли половой зрелости, из них трое экспрессировали как тяжелую, так и легкую цепи IgG человека. Все потомки животных-основателей демонстрировали менделевское наследование трансгенов, что указывает на встройку в один геномный локус и стабильный уровень человеческого иммуноглобулина в сыворотке крови. Анализ матричной РНК подтвердил, что реаранжировка генных сегментов идет адекватно, а вариабельная последовательность содержит аминокислотные замены из-за соматических мутаций. Мини-пигги не страдали от повышенной инфекционной нагрузки, морфология селезенки, лимфоузлов и костного мозга не изменилась. Реакция на модельный антиген — гемоцианин лимфы улитки — оказалась нормальной.

В ходе исследования реакции гуманизированных мини-пиггов на прототипные препараты человеческих терапевтических антител (бевацизумаб и даратумумаб) животным сделали семь инъекций и регулярно определяли антитела против антител в крови. Антитела против бевацизумаба были у свиней дикого типа, но не у гуманизированных. Антител против даратумумаба не появилось ни у тех, ни у других. По-видимому, оба эти препарата неиму-

ногенны для людей. Затем оценили иммуногенность терапевтических антител атезолизумаба или цергугтузумаба, которые индуцируют антительные ответы у 39 и 70% пациентов соответственно; аналогичная разница в иммуногенности наблюдалась и у свиней [16].

Таким образом, трансгенные мини-пигги являются идеальной моделью для оценки безопасности терапевтических антител и прогнозирования возможных побочных эффектов.

Заключение

Релевантность использования минипиггов в качестве моделей для биомедицинских исследований подтверждается множеством работ. Физиолого-биохимическая, анатомическая, генетическая и поведенческая схожесть минипиггов с человеком позволяет моделировать различные патологические ситуации и получать уникальные научно-практические данные, которые невозможно получить при использовании мелких лабораторных животных (мышей) в силу уровня развития их центральной нервной системы, размеров тела, особенностей метаболизма и других причин. При этом использование минипиггов не накладывает на исследователей ограничения, которые являются неотъемлемой частью работы с приматами, включая биоэтические аспекты и экономическую составляющую. Немаловажную роль для использования минипиггов в качестве биомоделей играет сравнительно недолгий срок беременности и возраст наступления половозрелости, что позволяет отслеживать наследуемость признаков, а также возможные патологические эффекты у потомства в ряду поколений. Особенное значение этот факт приобретает при исследовании фармакобезопасности препаратов нового поколения, вакцин, а также лекарств из класса генной терапии.

События последних лет диктуют нам необходимость развития отечественных

центров по разведению лабораторных животных для научных исследований. Стимулирование собственного сектора биомоделирования позволит обеспечить исследователей адекватными моделями и сохранить темпы развития науки и технологии, а также высокое качество проводимых исследований.

В НЦБМТ ФМБА России более 10 лет проводятся работы по созданию различных трансгенно-нокаутных биомоделей. За этот период нами успешно создано более 20 гуманизированных трансгенных и/или нокаутных линий мышей, часть которых уже имеет статус чистых линий. В нашем Центре также были созданы конструкции для создания гуманизированных свиней.

Многолетний опыт создания и поддержания биомоделей позволяет нам эффективно и качественно реализовывать стратегию обеспечения исследователей релевантными моделями, соответствующими требованиям эксперимента. Центр оснащён современным оборудованием, а научный персонал владеет методами создания и поддержания трансгенных животных, что позволяет нам в наикратчайшие сроки создавать и генотипировать животных с заданными свойствами. Содержание собственной популяции минипигсов позволяет рассматривать этих животных в качестве источника уникальных трансгенных биомоделей для широкого класса как фундаментальных, так и научно-практических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Алексеев В.И. Нокаутные животные. В кн.: *Актуальные вопросы иммунопатологии*. СПб, 2007:76–82. [Alekseev V.I. Nokautnye zhivotnye. [Knockout Animals]. V kn.: *Aktual'nye voprosy immunopatologii* [In the book: *Topical issues of immunopathology*]. Saint Petersburg, 2007:76–82. (In Russian)].
2. Зиновьева Н.А., Мелерзанов А.В., Петерсен Е.В., Климык Н., Волкова Н.А., Дух А.С., Трусова И.А., Вольф Э., Брем Г. Использование трансгенных GAL-KO свиней в ксенотрансплантации: проблемы и перспективы. *Сельскохозяйственная биология*. 2014;2:42–49. [Zinovieva N.A., Melerzanov A.V., Petersen E.V., Klimyuk N., Volkova N.A., Dukh A.S., Trusova I.A., Wolf E., Brem G. Ispol'zovanie transgennyh GAL-KO svinej v ksenotransplantacii: problemy i perspektivy [Use of transgenic GAL-KO pigs in xenotransplantation: problems and prospects]. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya* [Agricultural biology]. 2014;2:42–49. (In Russian)].
3. Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Багиров В.А., Брем Г. Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы. *Экологическая генетика*. 2015;13(2):58–76. [Zinovieva N.A., Volkova N.A., Bagirov V.A., Brem G. Transgennye sel'skohozyajstvennye zhivotnye: sovremennoe sostoyanie issledovaniy i perspektivy [Transgenic farm animals: current state of research and prospects]. *Ecological genetics*. 2015;13(2):58–76. (In Russian)].
4. Капанадзе Г.Д. Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах. *Биомедицина*. 2006;2:40–52. [Kapanadze G.D. Ispol'zovanie miniaturnykh svinej v biomeditsinskih eksperimentah [The use of miniature pigs in biomedical experiments]. *Biomedicina* [Journal Biomed]. 2006;2:40–52. (In Russian)].
5. Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини-свиней. *Биомедицина*. 2009;6:70–80. [Kapanadze G.D., Ashuev Zh.A. Svetlogorskaya populyaciya mini-svinej [Svetlogorsk mini-pig population]. *Biomedicina* [Journal Biomed]. 2009;6:70–80. (In Russian)].
6. Каркищенко Н.Н. *Основы биомоделирования*. М.: Изд-во ВПК, 2004:607. [Karkischenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya* [Fundamentals of biomodelling]. Moscow: VPK Publ., 2004:607. (In Russian)].
7. Каркищенко Н.В., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Слободенюк В.В., Алимкина О.В., Кулакова М.И., Васильева И.А. Исследование и оценка молекулярно-генетических признаков экспрессии гена *NFE2L2* при адаптации к физическим нагрузкам у мини-пиггов. *Биомедицина*. 2020;16(1):42–52. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Stankona N.V., Slobodenyuk V.V., Alimkina O.V., Kulakova M.I., Vasilyeva I.A. Issledovanie i oценка molekulyarno-geneticheskikh priznakov ekspressii gena *NFE2L2* pri adaptacii k fizicheskim nagruzkam u mini-pigov [Study and evaluation of molecular genetic signs of the *NFE2L2* gene expression during adaptation to physical loads in mini pigs]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2020;16(1):42–52. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-1-42-55.
8. Каркищенко Н.В., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семёнов Х.Х. Соз-

- дание линий трансгенных животных-моделей с генами человека *NAT1* и *NAT2*. *Биомедицина*. 2016;(1):74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskih L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabih V.P., Revyakina A.O., Stankova N.V., Semenov Kh.Kh. Sozdanie linij transgennyh zhivotnyh-modelej s genami cheloveka *NAT1* i *NAT2* [Creation of transgenic animal model lines with human *NAT1* and *NAT2* genes]. *Biomeditsina* [*Journal Biomed*]. 2016;1:74–84. (In Russian)].
9. Каркищенко Н.Н., Глотова Е.С., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А., Петров Д.В., Васильева И.А., Дерябин К.Е. Генетический скрининг новой трансгенной гуманизированной по HLA-A*02:01:01:01 и hβ2m линии мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3E):10–24. [Karkischenko N.N., Glotova E.S., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A., Petrov D.V., Vasil'eva I.A., Deryabin K.E. Geneticheskij skрининг novej transgennoj gumanizirovannoj po HLA-A*02:01:01:01 i hβ2m linii myshej [Genetic Screening of a New Transgenic Mouse Line Humanized for HLA-A*02:01:01:01 and hβ2m]. *Biomedicina* [*Journal Biomed*]. 2023;19(3E):10–24. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-10-24.
10. Каркищенко Н.Н., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В. Новая модель оценки избирательной токсичности антибластомных средств на трансгенных мышях с генами *Nat1* homo человека. *Биомедицина*. 2015;3:4–19. [Karkischenko N.N., Kapanadze G.D., Petrova N.V. Novaya model' ocenki izbiratel'noj toksichnosti antiblastomnyh sredstv na transgennyh myshah s genami *Nat1* homo cheloveka [A new model for assessing selective toxicity of antiblastoma agents in transgenic mice with human *Nat1* homo genes]. *Biomedicina* [*Journal Biomed*]. 2015;3:4–19. (In Russian)].
11. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Sozdanie polnyh gibridnyh DNK-konstrukcij s genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Chimeric Construct Engineering with Human Variant *HLA-A*02:01:01:01*]. *Biomedicina* [*Journal Biomed*]. 2021;17(1):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-1-10-23.
12. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22 [Karkischenko N.N., Ryabih V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumanizirovannyh myshej dlya farmakotoksikologicheskikh issledovanij (uspehi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanised mice for pharmacotoxicological studies (successes, failures and prospects)]. *Biomedicina* [*Journal Biomed*]. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
13. Кит О.И., Максимов А.Ю., Протасова Т.П., Гончарова А.С., Кутилин Д.С., Лукбанова Е.А. Гуманизированные мыши: методы получения, модели и использование в экспериментальной онкологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;15(4):67–81. [Kit O.I., Maksimov A.Yu., Protasova T.P., Goncharova A.S., Kutilin D.S., Lukbanova E.A. Gumanizirovannye myshi: metody polucheniya, modeli i ispol'zovanie v eksperimental'noj onkologii (obzor) [Humanized Mice: Creation, Models and Use in Experimental Oncology (Review)]. *Biomedicina* [*Journal Biomed*]. 2019;15(4):67–81. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-67-81.
14. Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):70–75. [Petrova N.V., Skripkina M.M. Osobennosti organizacii soderzhaniya i vyvedeniya transgennyh linij myshej v NCzBMT FMBA Rossii [Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia]. *Biomedicina* [*Journal Biomed*]. 2021;17(3E):70–75. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-70-75.
15. Станкова Н.В., Алимкина О.В., Помыткин И.А., Каркищенко В.Н. Анализ изменений базовых показателей биологических сред мини-пигов, перенёсших экстремальные физические нагрузки. *Биомедицина*. 2022;18(4):39–47. [Stankova N.V., Alimkina O.V., Pomytkin I.A., Karkischenko V.N. Analiz izmenenij bazovyh pokazatelej biologicheskikh sred mini-pigov, perenysshih ekstremal'nye fizicheskie nagruzki [Analysis of Variations in the Basic Indicators of Mini Pigs under Extreme Physical Exertion]. *Biomedicina* [*Journal Biomed*]. 2022;18(4):39–47. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-39-47.
16. Flisikowska T., et al. A humanized minipig model for the toxicological testing of therapeutic recombinant antibodies. *Nature Biomedical Engineering*. 2022;6:1248–1256. DOI: 10.1038/s41551-022-00921-2.
17. Jeong Y.-H., Park C.-H., Jang G.-H., Jeong Y.-I., Hwang I.-S., Yw J.-w., Kim Y.-K., Shin T., Kim N.-H., Hyun S.-H., Jeung E.-B., Hwang W.-S. Production of Multiple Transgenic Yucatan Miniature Pigs Expressing Human Complement Regulatory Factors, Human CD55, CD59, and H-Transferase Genes. *PLoS One*. 2013;8(5):e63241. DOI: 10.1371/journal.pone.0063241.
18. Kong S., Ruan J., Xin L., Fan J., Xia J., Liu Z., Mu Y., Yang S., Li K. Multi transgenic minipig models exhibiting potential for hepatic insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Molecular medicine reports*. 2016;13(1):669–680. DOI: 10.3892/mmr.2015.4582.
19. Ko N., Shim J., Kim H.-J., Lee Y., Park J.-K., Kwak K., Lee J.-W., Jin D.-I., Kim H., Choi K. A desirable transgenic strategy using GGTA1 endogenous promoter-mediated knock-in for xenotransplantation model. *Scientific Reports*. 2022;12(1):9611.

20. Lin C.C., Cooper D.K.C., Dorling A. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transplant Immunology*. 2009;21(2):75–80.
21. Mayor S. Research bodies disappointed by decision to cancel primate research laboratory. *British Medical Journal*. 2004;328:306.
22. Morton D.B. The Welfare of Non-human Primates in Research in the EU. *ATLA*. 2004;32(Suppl. 1):307.
23. Pan D., Liu T., Lei T., Zhu H., Wang Y., Deng S. Progress in multiple genetically modified minipigs for xenotransplantation in China. *Xenotransplantation*. 2019;26(1):e12492.
24. Shi L., Luo X., Jiang J., Chen Y., Liu C., Hu T., Li M., Lin Q., Li Y., Huang J., Wang H., Niu Y., Shi Y., Styner M., Wang J., Lu Y., Sun X., Yu H., Ji W., Su B. Transgenic rhesus monkeys carrying the human MCPH1 gene copies show human-like neoteny of brain development. *National Science Review*. 2019;6(3):480–493. DOI: 10.1093/nsr/nwz043.
25. Tonelli C., Chio I.I.C., Tuveson D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(17):1727–1745. DOI: 10.1089/ars.2017.7342.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Алимкина Оксана Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Oksana V. Alimkina*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: alimkina@scbmt.ru

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Nataliya V. Petrova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: snv@scbmt.ru

Nataliia V. Stankova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: snv@scbmt.ru

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Глотова Елена Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Elena S. Glotova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: kichi09@mail.ru

Nadezhda A. Laryushina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kichi09@mail.ru

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: rozhtsul@mail.ru

Irina A. Vasil'eva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: rozhtsul@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА ЛЕЙТРАГИН В СЫВОРОТКЕ КРОВИ СВЕТЛОГОРСКИХ МИНИ-ПИГОВ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ

Н.С. Огнева*, М.С. Нестеров, Д.В. Хвостов, Н.В. Станкова, В.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

В настоящей работе описывается исследование фармакокинетики нового противовоспалительно-го гексапептида, зарегистрированного под названием «Лейтрагин». Исследование проводилось на мини-пигах светлогорской породы при инфузионном, а также однократном ректальном введении в виде раствора и суппозитория в равной дозе 10 мг. Наименьшее время для достижения максимальной концентрации продемонстрировал инфузионный способ введения, величина T_{max} для которого составила 30 мин. Максимальная концентрация (C_{max}) при введении Лейтрагина в форме суппозитория составила 141,37 нг/г. Данная концентрация достигается за T_{max} 90 мин, и далее Лейтрагин определяется в сыворотке крови на протяжении 2,5 ч. Абсолютная биодоступность Лейтрагина для суппозитория составила 59,6%, в то время как для раствора — 70,03%. Достижение концентрационного максимума при клизмном введении Лейтрагина произошло на 150-й минуте, и далее препарат определялся в сыворотке крови на протяжении 4 ч.

Ключевые слова: фармакокинетика, Лейтрагин, суппозитории, ректальное введение, светлогорские мини-свиньи

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Огнева Н.С., Нестеров М.С., Хвостов Д.В., Станкова Н.В., Каркищенко В.Н. Сравнительное изучение фармакокинетики пептидного препарата Лейтрагин в сыворотке крови светлогорских мини-пигов после однократного введения. *Биомедицина*. 2024;20(2):110–122. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-110-122>

Поступила 12.02.2024

Принята после доработки 15.05.2024

Опубликована 10.06.2024

COMPARATIVE PHARMACOKINETICS STUDY OF THE LEUTRAGIN PEPTIDE DRUG IN SVETLOGORSK MINIPIG BLOOD SERUM AFTER SINGLE ADMINISTRATION

Nastasya S. Ogneva*, Maxim S. Nesterov, Daniil V. Khvostov,
Nataliia V. Stankova, Vladislav N. Karkischenko

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

In this work, we investigate the pharmacokinetics of a new anti-inflammatory hexapeptide registered under the name of Leutrugin. The study was conducted on Svetlogorsk minipigs by intravenous and a single rectal administration of the drug in the form of a solution and suppositories at an equal dose of 10 mg. The shortest time to reach peak concentration was demonstrated with intravenous administration, with the T_{max}

being 30 min. The maximum concentration (C_{max}) when administering Leutragin in a suppository form was 141.37 ng/g. This concentration was achieved at the T_{max} of 90 min, following which Leutragin remained in the bloodstream for 2.5 h. The absolute bioavailability of Leutragin in the suppository and solution form was 59.6% and 70.03%, respectively. The peak concentration of Leutragin under its rectal administration occurred at 150 min, following with the drug remained in the bloodstream for 4 h.

Keywords: pharmacokinetics, Leutragin, suppositories, rectal administration, Svetlogorsk mini-pigs

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Ogneva N.S., Nesterov M.S., Khvostov D.V., Stankova N.V., Karkischenko V.N. Comparative Pharmacokinetics Study of the Leutragin Peptide Drug in Svetlogorsk Minipig Blood Serum after Single Administration. *Journal Biomed.* 2024;20(2):110–122. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-110-122>

Submitted 12.02.2024

Revised 15.05.2024

Published 10.06.2024

Введение

Препарат Лейтрагин является синтетическим аналогом эндогенного динорфина 1-6, пептидного агониста δ-опиоидных рецепторов. Благодаря подавлению действия таких цитокинов, как IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, обладает выраженной противовоспалительной активностью. Применение Лейтрагина открывает новые возможности в лечении широкого спектра острых и хронических воспалительных заболеваний. В результате множества работ по изучению Даларгина, имеющего схожую химическую структуру, синтезированного в 1984 году профессором М.И. Титовым [9] и применяемого в качестве средства для лечения панкреатитов и язв желудка с парентеральным путем введения [1], было также показано его положительное влияние на сердечно-сосудистую и дыхательную системы [2, 3, 10]. В 2020 году сотрудниками ФГБУН НЦБМТ ФМБА России был предложен ингаляционный путь введения препарата, зарегистрированного под названием «Лейтрагин», в качестве нового подхода в лечении пневмоний, вызванных вирусом SARS-CoV-2, тяжелое течение которых напрямую связано с цитокиновым воспалительным каскадом, именуемым «цитокиновый шторм». В ходе доклинических и клинических испытаний Лейтрагина в форме раствора для ингаляций была дос-

товерно показана его высокая эффективность в лечении пневмоний, а именно цитокинового шторма, вызванного различными вирусными инфекциями [4–7].

В настоящее время большинство пептидных препаратов вводятся парентерально [21]. Затруднение применения лекарственных средств *per os* обусловлено разрушением пептидов желудочными ферментами пептидазами [14]. Многие годы исследователями различных стран ведутся работы по разработке систем доставки пептидных и белковых препаратов с возможностью их перорального применения [13–17]. Ректальное введение является хорошей неинвазивной альтернативой инъекционному пути доставки лекарственных средств. При ректальном введении лекарственные препараты хорошо всасываются благодаря слизистой прямой кишки, имеющей густую сеть кровеносных и лимфатических сосудов [8]. Благодаря анатомическим особенностям также обеспечивается частичное избегание эффекта первого прохождения через печень. Нижние и средние ректальные вены впадают в нижнюю полую вену, вследствие чего лекарственные препараты попадают в системный кровоток, минуя печень [8].

Изучение фармакокинетики лекарственных препаратов на мини-пигах является более достоверной и надежной альтернативой и дополнением к изучению фармакологических

параметров на мелких лабораторных животных. Возможность обширного и прямого забора крови у пигов позволяет минимизировать количество животных в эксперименте, а также получать полную фармакокинетическую картину по всем точкам у одного животного, что делает такой эксперимент более достоверным по сравнению с усредненными данными на мышах [19]. Схожесть анатомического, физиологического и биохимического строения внутренних органов мини-пигов и человека позволяет максимально точно прогнозировать результаты, получаемые при переходе от доклинических к клиническим испытаниям лекарственных средств [18–21].

Фармакокинетические исследования Лейтрагина в виде ректальных суппозиторий и растворов на мини-пигах, а также других лабораторных животных ранее не проводились. Благодаря новым технологиям, в частности методу ВЭЖХ-масс-спектрометрии высокого разрешения, были получены все основные фармакокинетические показатели.

Целью работы явилось сравнительное изучение фармакокинетики Лейтрагина в сыворотке крови мини-пигов при различных вариантах его введения.

Материалы и методы

Лабораторные животные

В работе были использованы мини-пиги светлогорской популяции, самцы в возрасте 8–11 мес. средней массой тела $18,5 \pm 0,74$ кг ($n=18$), выведенные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Животные содержались в одном помещении, в групповых станках по 4 особи, с оптимальными параметрами микроклимата и освещения для содержания крупных лабораторных животных. Использовался стандартный тип кормления — полнорационный комбикорм СК-8 (норма — 320 г/гол./сут), вода *ad libitum*.

Исследования проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета о защите животных, используемых в научных целях от 22.09.2010; Базельской декларацией (2011); Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)»; Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»; Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»; Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов»; Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [11]; Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [12]. Все эксперименты были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Дизайн исследования

Исследование фармакокинетики проводилось по 15 временным точкам: 0 (до введения препарата); 5; 10; 15; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 150; 180; 240; 360; 420 мин. Исследование проводилось при внутривенном инфузионном, ректальном в виде суппозиторий и ректальном в виде раствора способах введения. В каждую группу было отобрано по 6 мини-пигов. Кровь для исследования отбиралась из верхней полой вены шприцом в объеме 1 мл и переносилась в пробирки типа Eppendorf с соответ-

Вещество	Диагностические массовое число родительского иона	Диагностическое массовое числа дочернего иона	Время удерживания (мин)
Лейтрагин	363,69±0,005 (M+2H) ²⁺	136,07±0,003	20,3±0,05

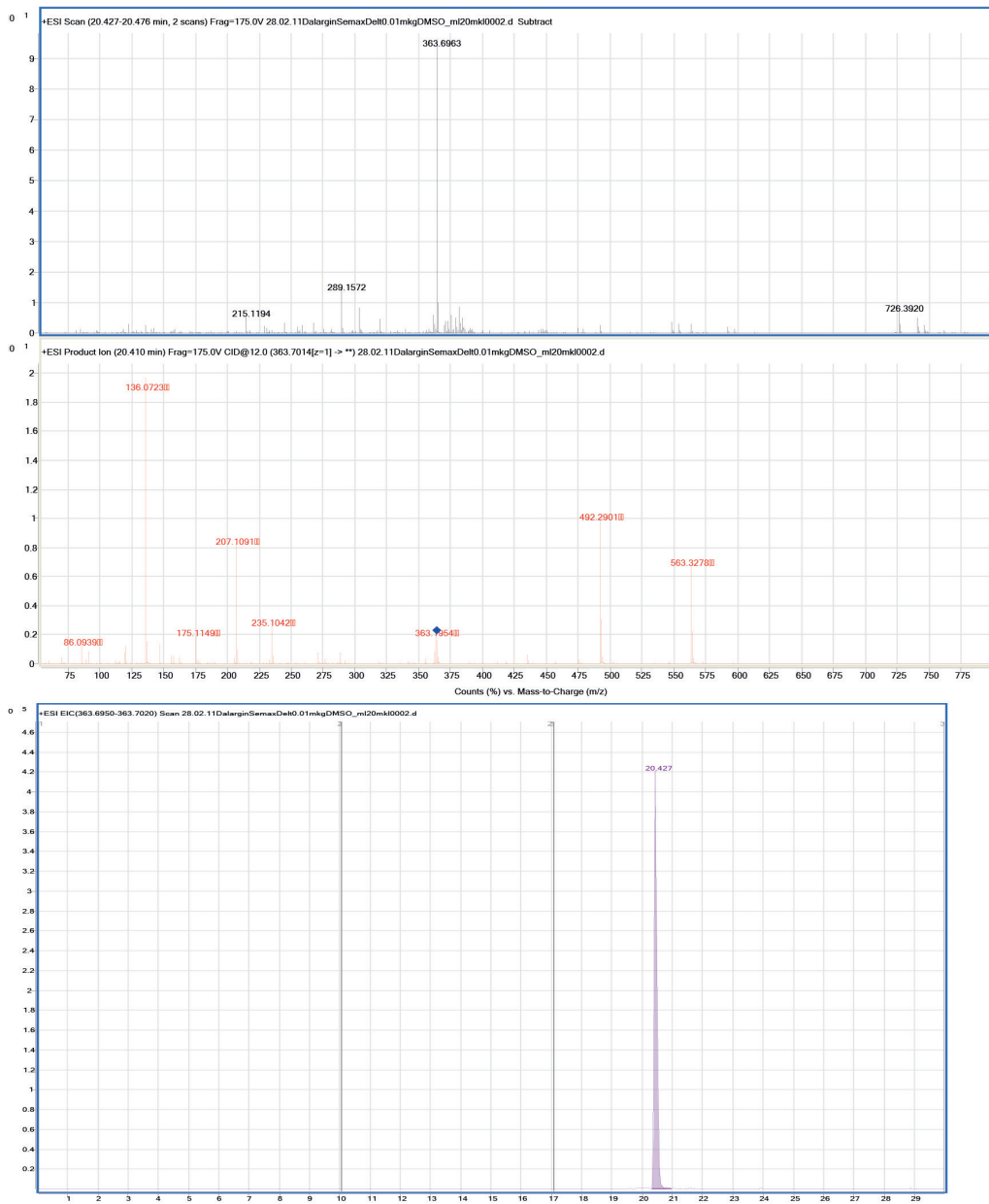


Рис. 1. Условия регистрации: спектр фрагментации и время удерживания гексапептида в составе препарата Лейтрагин.

Fig. 1. Registration conditions: fragmentation spectrum and retention time of hexapeptide in the Leutragin drug.

ствующей маркировкой, содержащей информацию о способе введения препарата, порядковом номере точки и животного.

Пробоподготовка

Исследуемый образец сыворотки крови объемом 0,2 см³ наносили на планшет Cartiva ND 96-well plate, в который заранее было добавлено 800 мкл ацетонитрила. Следуя протоколу, производили фильтрацию раствора в течение 10 мин, осаждая при этом белки сыворотки крови на картридже под вакуумом. Полученный фильтрат переносили в 1,5 мл пробирки. Упаривали на концентраторе при 1500 об./мин, 45°C в течение 45 мин, с последующим восстановлением сухого остатка в 200 мкл ацетонитрила. В ВЭЖХ-МС анализ вводили 0,002 см³ фильтрата.

Метод идентификации

Идентификацию Лейтрагина выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения с применением времяпролетного масс-детектора (ВЭЖХ-МС ВР) на хроматографе жидкостном Agilent 1260, оснащенный автодозатором, с масс-селективным детектором Agilent 6545XT Accurate mass Q-TOF LC/MS. Идентификация аналита проводилась по времени хроматографического удерживания и масс-спектрометрическим характеристикам (рис. 2). Критерием надежной идентификации являлось детектирование сигнала с соотношением «сигнал:шум» не менее 5:1 при времени удерживания, совпадающем в пределах 0,1 мин со временем удерживания, установленным для Лейтрагина в образцах для градуировки. Для надежной идентификации требовалось, чтобы в масс-спектре присутствовали все пики, имеющиеся в масс-спектре аутентичного соединения, с относительной интенсивностью 10% и более. При этом максимальное расхождение в значениях от-

носительных интенсивностей ионов в анализируемом и справочном масс-спектрах не должно было превышать 20%.

Масс-спектр фрагментации и типичный вид масс-хроматограммы приведены на рис. 1.

Статистическая обработка полученных результатов

Полученные экспериментальные данные были подвергнуты математической статистической обработке с помощью программы «Excel v.7.0». В таблицах представлены средние арифметические значения величин (\bar{x}), стандартные отклонения (SD) и коэффициент вариации (C.V.). Достоверность различий для сравниваемых фармакокинетических параметров оценивали с помощью критерия Стьюдента (программа «Statistica 6.0»). Рисунки были выполнены с использованием графического редактора «Origin v.7.0».

Результаты и их обсуждение

Фармакокинетика Лейтрагина в сыворотке крови мини-пигов после его однократного инфузионного введения в дозе 10 мг

Изучение фармакокинетики Лейтрагина в плазме крови мини-пигов проводилось после его инфузионного введения в дозе 0,5 мг/кг (10 мл р-ра Лейтрагина 1 мг/мл, капельно). Полученные данные представлены в табл. 1 и на рис. 2.

После инфузионного введения животным концентрация Лейтрагина в крови быстро нарастает со скоростью 0,024 час⁻¹ ($C_{\max}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$) и определяется в сыворотке крови на протяжении 1,5 ч.

Благодаря проведенному анализу были получены такие фармакокинетические параметры, как период полуэлиминации ($t_{1/2el}$ — 80,37 мин), среднее время удерживания вещества в организме (MRT — 97,94 мин) и время достижения максимальной концентрации (T_{\max} — 0,5 ч).

Таблица 1. Концентрация Лейтрагина (нг/мл) в сыворотке крови мини-пигов после инфузионного введения в дозе 10 мг

Table 1. Leutrugin concentration (ng/mL) in minipig serum after infusion at a dose of 10 mg

Tmin	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	SD	CV, %
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0%
5	5,82	5,00	5,00	6,86	5,12	5,99	5,63	0,74	13%
10	81,03	64,01	98,86	98,86	85,89	60,77	81,57	16,48	20%
15	154,78	116,08	165,61	131,56	139,30	134,66	140,33	17,58	13%
20	558,58	508,31	418,94	463,62	541,83	625,61	519,48	73,00	14%
30	649,75	597,77	532,79	675,74	675,74	571,78	617,26	59,12	10%
45	288,98	288,98	320,76	280,31	306,31	338,10	303,91	22,19	7%
60	31,99	39,03	36,79	33,91	29,43	38,07	34,87	3,74	11%
90	11,70	10,65	14,16	10,06	14,51	11,58	12,11	1,83	15%
120	24,38	20,97	29,50	29,74	25,60	22,43	25,44	3,61	14%
150	46,36	57,95	36,16	51,93	35,24	56,10	47,29	9,83	21%
180	26,05	21,10	21,62	23,96	27,35	21,36	23,57	2,66	11%
240	11,13	13,92	12,91	9,46	8,68	11,58	11,28	1,99	18%
360	14,52	14,81	12,05	15,39	17,43	14,09	14,72	1,75	12%
420	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0%

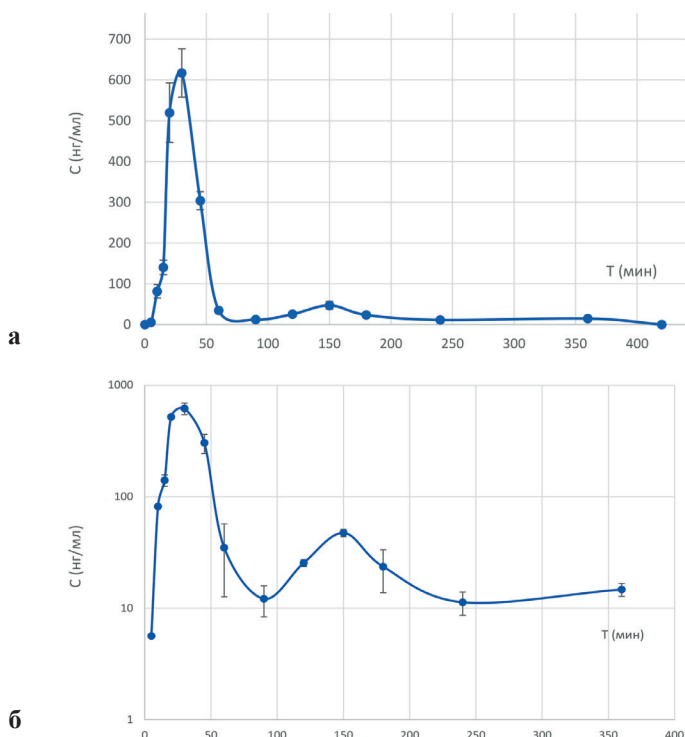


Рис. 2. Кинетические кривые Лейтрагина в сыворотке крови после его инфузионного введения мини-пигам в дозе 10 мг: а — натуральная шкала, б — полулогарифмическая шкала.

Fig. 2. Kinetic curves of Leutrugin in serum after its 10 mg-dose infusion to minipigs: а — natural scale, б — semi-logarithmic scale.

Таблица 2. Концентрация Лейтрагина (нг/мл) в сыворотке крови мини-пигов после клизменного введения в дозе 10 мг
Table 2. Leutragin concentration (ng/mL) in minipig serum after enema administration at a dose of 10 mg

Tmin	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	SD	CV, %
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0%
5	11,58	11,83	11,97	15,50	13,95	11,59	12,74	1,62	13%
10	18,92	20,57	20,56	20,19	15,65	19,33	19,20	1,87	10%
15	25,53	29,97	32,88	31,40	28,15	29,37	29,55	2,56	9%
20	25,30	21,48	26,93	31,27	26,79	23,42	25,87	3,37	13%
30	13,65	12,42	23,28	19,96	12,38	13,29	15,83	4,63	29%
45	12,82	13,17	15,34	19,01	14,44	14,49	14,88	2,23	15%
60	28,69	22,02	22,91	34,68	25,61	19,82	25,62	5,39	21%
90	21,42	13,38	22,67	25,07	17,01	12,44	18,67	5,18	28%
120	23,80	31,04	31,56	48,62	35,33	30,73	33,51	8,29	25%
150	159,03	124,12	210,81	217,44	140,11	125,36	162,81	41,76	26%
180	15,90	21,72	79,05	47,63	25,54	23,89	35,62	23,88	67%
240	42,55	21,84	45,88	44,17	25,21	24,02	33,95	11,33	33%
360	10,43	15,72	11,47	35,05	22,03	15,87	18,43	9,12	49%
420	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0%

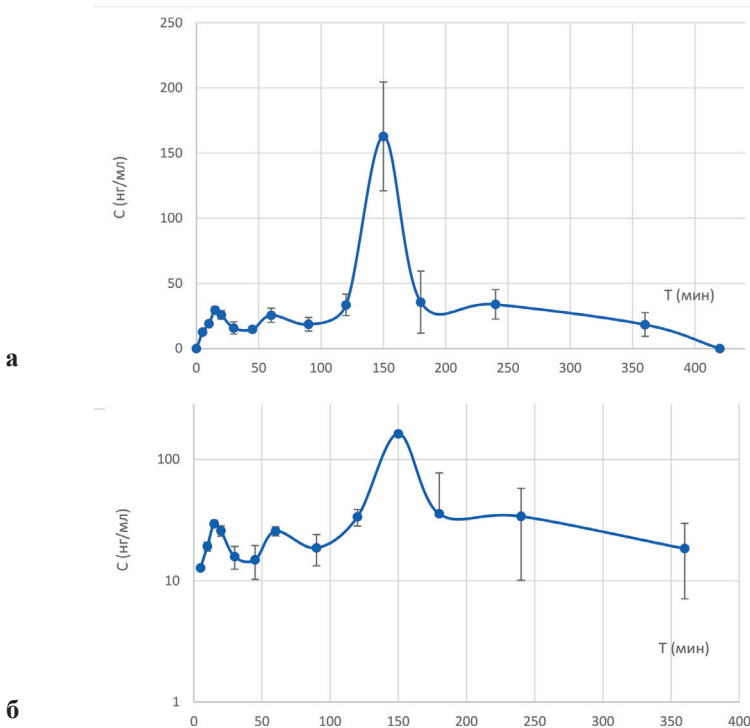


Рис. 3. Кинетические кривые Лейтрагина в сыворотке крови после его ректального клизменного введения мини-пигам в дозе 10 мг: а — натуральная шкала, б — полулогарифмическая шкала.

Fig. 3. Kinetic curves of Leutragin in serum after its rectal enema administration to minipigs at a dose of 10 mg: a — natural scale, б — semi-logarithmic scale.

**Фармакокинетика Лейтрагина
 в сыворотке крови мини-пигов
 после его однократного ректального
 клизменного введения в дозе 10 мг**

Изучение фармакокинетики Лейтрагина в сыворотке крови мини-пигов проводилось после его ректального клизменного введения в дозе 10 мг.

Концентрации и кинетические кривые Лейтрагина в сыворотке крови после клизменного введения представлены в табл. 2 и на рис. 3.

После ректального клизменного введения животным концентрация Лейтрагина в крови нарастает после лаг-периода 110–120 мин со скоростью 0,012 час⁻¹ ($C_{max}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$), с достижением концентрационного максимума на 150-й мин, и далее определяется в сыворотке крови на протяжении 4 ч.

Благодаря проведенному анализу были получены такие фармакокинетические параметры, как период полуэлиминации ($t_{1/2el}$ — 179,29 мин), среднее время удержания

вещества в организме (MRT — 288,45 мин) и время достижения максимальной концентрации (T_{max} — 2,5 ч).

**Фармакокинетика Лейтрагина
 в сыворотке крови мини-пигов
 после его однократного ректального
 введения в форме суппозитория
 в дозе 10 мг**

Изучение фармакокинетики Лейтрагина в сыворотке крови мини-пигов проводилось после его ректального введения в форме суппозитория.

Концентрации и кинетические кривые Лейтрагина в сыворотке крови после ректального введения в форме суппозитория представлены в табл. 3 и на рис. 4.

После ректального введения суппозитория животным концентрация Лейтрагина в крови мини-пигов поступательно нарастает в течение 1 ч со скоростью 0,012 час⁻¹ ($C_{max}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$), с достижением концентрационного максимума на 90-й мин, и далее определяется в сыворотке крови на протяжении 2,5 ч.

Таблица 3. Концентрации Лейтрагина (нг/мл) в сыворотке крови мини-пигов после ректального введения в форме суппозитория

Table 3. Leustragin concentrations (ng/mL) in minipig serum of after rectal administration in suppository form

Tmin	1	2	3	4	5	6	\bar{x}	SD	CV, %
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0%
5	11,84	10,92	11,62	11,41	10,88	11,61	11,38	0,40	4%
10	20,00	14,72	23,52	18,99	16,55	18,80	18,76	3,01	16%
15	18,88	20,47	21,33	20,48	15,83	18,50	19,25	1,99	10%
20	19,84	21,21	27,58	30,79	21,44	21,62	23,75	4,38	18%
30	21,68	20,32	34,90	34,16	22,87	23,20	26,19	6,54	25%
45	51,13	53,25	56,88	46,72	30,84	56,24	49,17	9,72	20%
60	84,51	82,59	92,85	92,71	74,26	76,06	83,83	7,92	9%
90	165,08	144,41	126,07	114,95	144,19	153,53	141,37	18,22	13%
120	31,83	34,61	28,62	32,14	26,21	31,51	30,82	2,96	10%
150	31,69	22,05	27,87	45,97	25,62	32,01	30,87	8,30	27%
180	44,95	29,59	55,62	30,23	24,34	49,45	39,03	12,66	32%
240	21,89	28,98	24,75	26,78	26,95	24,07	25,57	2,51	10%
360	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0%
420	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0%

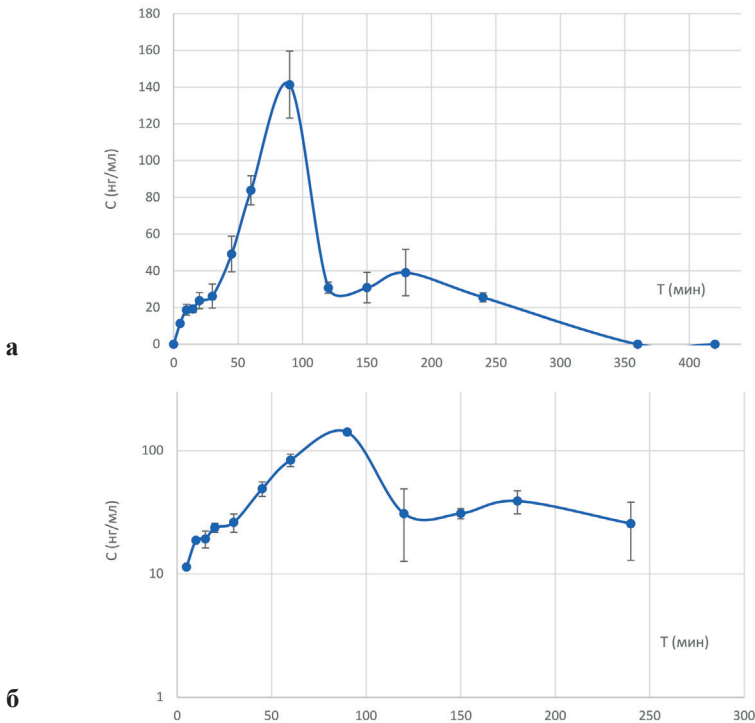


Рис. 4. Кинетические кривые Лейтрагина в сыворотке крови после его ректального введения в форме суппозитория мини-пигам в дозе 10 мг: а — натуральная шкала, б — полулогарифмическая шкала.

Fig. 4. Kinetic curves of Leutrigin in serum after its rectal administration in suppository form to minipigs at a dose of 10 mg: а — natural scale, б — semi-logarithmic scale.

Благодаря проведенному анализу были получены такие фармакокинетические параметры, как период полужизни ($t_{1/2e}$ — 83,51 мин), среднее время удерживания вещества в организме (MRT — 159,55 мин) и время достижения максимальной концентрации (T_{max} — 1,5 ч).

Сравнение полученных в результате различных путей введения Лейтрагина фармакокинетических показателей

По результатам анализа различных форм введения Лейтрагина были получены фармакокинетические кривые, представленные на рис. 5.

На основании данных полученных кривых были рассчитаны фармакокинетические характеристики, представленные в табл. 4.

Как можно видеть из табл. 4, наименьшее время для достижения максимальной концентрации ожидаемо демонстрирует инфузионный способ введения, величина T_{max} для которого составила всего 30 мин. Высшая суточная доза для такого введения составляет 5–10 мг.

Максимальная концентрация для инфузионного способа введения в условиях фармакокинетического исследования на мини-пигах (C_{max}) также является максимальной для сравниваемых способов введения и составляет 617,26 нг/мл.

При сравнении различных способов ректального введения следует отметить, что введение Лейтрагина в форме суппозитория даёт наглядные преимущества, заключающиеся в более быстром достиже-

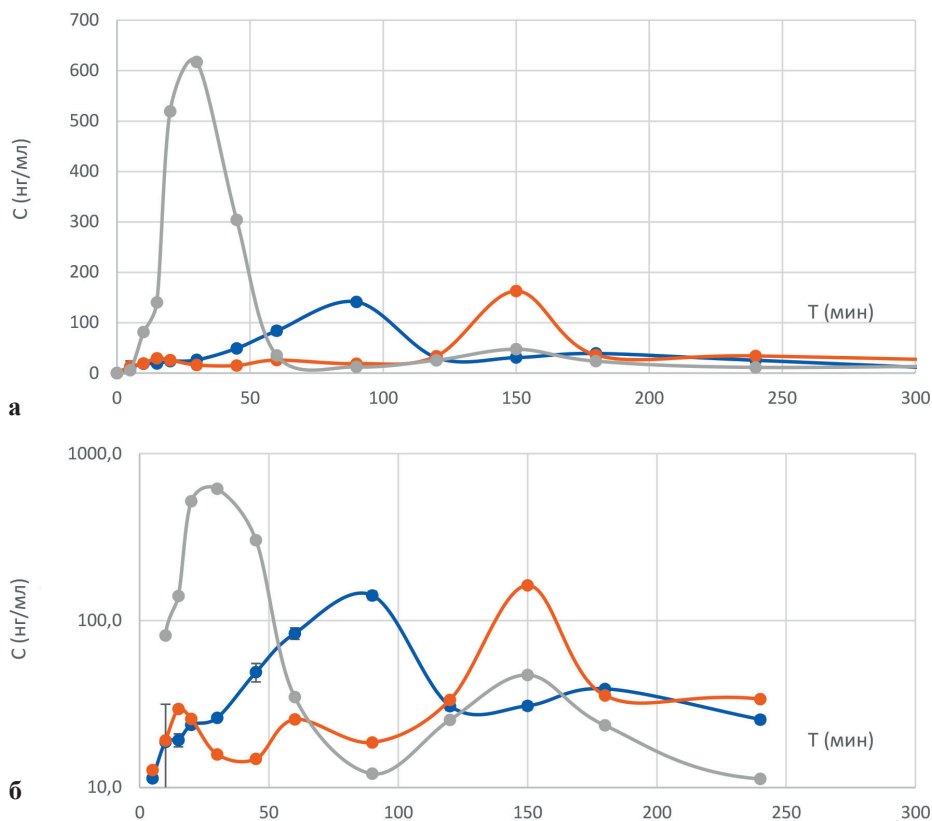


Рис. 5. Кинетические кривые Лейтрагина в сыворотке крови после его введения инфузионно, ректально с помощью клизмы и в виде суппозитория (серая линия — инфузия; синяя — суппозитории; оранжевая — раствор ректально): а — натуральная шкала, б — полулогарифмическая шкала.

Fig. 5. Kinetic curves of Leutragin in serum after its administration by infusion, rectally by enema and as a suppository (gray line — infusion; blue — suppositories; orange — rectal solution): а — natural scale, б — semi-logarithmic scale.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры Лейтрагина при различных способах введения в эквивалентной дозе
Table 4. Pharmacokinetic parameters of Leutragin at different administration routes in equimolar dose

Показатели	Инфузия	Ректально в виде раствора	Ректально в виде суппозитория
С _{max} (нг/мл/г)	617,26	162,81	141,37
T _{max} (мин)	30,0	150,0	90,0
t _{1/2el} (мин)	80,37	179,29	83,51
MRT (мин)	97,94	288,45	159,55
AUC _{0-t} (нг/мл (г) × мин)	23596,80	13712,64	11991,54
AUC _{0-∞} (нг/мл (г) × мин)	25303,23	18479,02	15072,06
C _{max} /AUC _{0-t} (мин ⁻¹)	0,026	0,012	0,012
C _{max} /AUC _{0-∞} (мин ⁻¹)	0,024	0,009	0,009
f _{r 0-t} (%)	—	58,11	50,82
f _{r 0-∞} (%)	—	73,03	59,57

нии максимальной концентрации — T_{max} . В то же время период полуэлиминации у раствора выше, чем у суппозитория, и составляет 179 мин против 83 мин.

Однако, несмотря на такую разницу в константах элиминации, площадь под фармакокинетической кривой обоих ректальных способов введения отличается не критично. В этой связи и биодоступность у обеих лекарственных форм при ректальном введении практически совпадает ($f_{r_{0 \rightarrow \infty}} = 50,8\%$ для суппозитория и $58,1\%$ для раствора, $f_{r_{0 \rightarrow \infty}} = 59,6\%$ для суппозитория и $73,03\%$ для раствора).

Анализ параметров кинетики позволяет заключить, что Лейтрагин довольно быстро выводится из организма, на что указывают значения периода полувыведения препарата ($t_{1/2el}$) из сыворотки крови, которые составляют от 1,5 до 3 ч в зависимости от способа введения.

Выводы

На основании полученных фармакокинетических данных можно сделать следующие выводы:

- Абсолютная биодоступность Лейтрагина составила $59,6\%$ для суппозитория и $73,03\%$ для раствора.

- Максимальная концентрация (C_{max}) при ректальных способах введения Лейтрагина отличается незначительно, в отличие от инфузионного введения, при котором C_{max} в 4–5 раз превышает ректальные.

- Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) варьирует от 30 мин для инфузионного способа введения до 150 мин для ректального введения в виде раствора.

- После различных способов введения (инфузионно, ректально с помощью клизмы и суппозитория) Лейтрагина в дозе 10 мг в организме мини-пигов препарат определяется в течение 2–5 ч.

- Полупериод элиминации Лейтрагина после инфузионного введения составляет $80,37$ мин, что сопоставимо с результатами для суппозитория ($83,5$ мин). Ректальное введение в виде раствора показывает в два раза более длительный полупериод элиминации ($179,29$ мин).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Виноградов В.А., Полонский В.М. Даларгин — первый аналог энкефалинов, применяемых в гастроэнтерологии. *Тер. архив.* 1988;8:147–153. [Vinogradov V.A., Polonskiy V.M. Dalargin — perviy analog enkephalinov, primenyayemih v gastroenterologii [Dalargin — the first enkephalin analog, used in gastroenterology]. *Ter. Arhiv.* 1988;8:147–153. (In Russian)].
2. Донцов А.В. Возможности даларгина в лечении больных ИБС. *Вестник новых медицинских технологий.* 2012;19(3):159–161. [Doncov A.V. Vozmozhnosti dalargina v lechenii bol'nih IBS [Possibilities of dalargin in the treatment of IBS patients]. *Vestnik novih medicinskih tehnologiy [Bulletin of New Medical Technologies]*. 2012;19(3):159–161. (In Russian)].
3. Донцов А.В. Эффективность даларгина в коррекции цитокинового профиля у больных ИБС и метаболическим синдромом. *Человек и его здоровье.* 2013;1:48–51. [Doncov A.V. Effektivnost' dalargina v korrekcii citokinovogo profilya u bol'nih IBS i metaboliceskym sindromom [Efficacy of dalargin in the correction of cytokine profile in patients with CHD and metabolic syndrome]. *Chelovek i ego zdorovyie [Man and his health]*. 2013;1:48–51. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Нестеров М.С., Фокин Ю.В., Табоjakова Л.А., Алимкина О.В., Хвостов Д.В. Лейтрагин повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома при профилактическом и лечебном режимах введения. *Биомедицина.* 2020;16(4):44–51. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Nesterov M.S., Fokin Yu.V., Taboyakova L.A., Alimkina O.V., Khvostov D.V. Lejtragin povyshaet vyzhivaemost' zhivotnyh v modelifatal'nogo ostrogo respiratornogo distress-sindroma pri profilakticheskom i lechebno rezhimah vvedeniya [Leutragine increases the survival rate of animals in a model of fatal acute respiratory distress syndrome with preventive and therapeutic modes of administration]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):44–51. (In Russian)].

5. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Степанова О.И., Клёсов Р.А., Огнева Н.С., Савченко Н.С., Скворцова В.И. Сочетанное применение лейтрагина и лёгочного сурфактанта-БЛ повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):52–59. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Gasanov M.T., Stepanova O.I., Klesov R.A., Ogneva N.S., Savchenko E.S., Skvortsova V.I. Sochetannoe primeneniye leytragina i legochnogo surfaktanta-BL povyshaet vyzhivaemost' zhivotnykh v modeli fatal'nogo ostrogo respiratornogo distress-sindroma [The combined use of leutragine and pulmonary surfactant-BL increases animal survival in a model of fatal acute respiratory distress syndrome]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):52–59. (In Russian)].
6. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Нестеров М.С., Агельдинов Р.А., Зотова Л.В., Колоскова Е.М., Слободенюк В.В., Скворцова В.И. Лейтрагин подавляет экспрессию цитокинов, включая интерлейкин-6, в модели «цитокинового шторма» у мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом. *Биомедицина*. 2020;16(4):34–43. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Nesterov M.S., Ageldinov R.A., Zotova L.V., Koloskova E.M., Slobodenyuk V.V., Skvortsova V.I. Leytragin povdaylaet ekspressiyu citokinov, vlyuchaya interlejkin-6, v modeli «citokinovogo shtorma» u myshej linii C57BL/6Y s inducirovannym ostrym respiratornym distress-sindromom [Leutragin Inhibits Expression of Cytokines, Including Interleukin-6, in a “Cytokine Storm” Model in C57BL/6Y Mice with Induced Acute Respiratory Distress Syndrome]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):34–43. (In Russian)].
7. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Скворцова В.И. Опиоидэргическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма». *Биомедицина*. 2020;16(4):14–23. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Skvortsova V.I. Opioidergicheskaya sistema immunnih kletok: novaya pharmacologicheskaya mishaen' v terapii «citokinovogo shtorma» [The Opioidergic System of Immune Cells: A New Pharmacological Target in the Therapy of “Cytokine Storm”]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):14–23. (In Russian)].
8. Кукес В.Г., Сычев Д.А. и др. *Клиническая фармакология*. Учеб. Изд. 6-е — испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022:1024. [Kukes V.G., Sychev D.A., et al. *Clinical pharmacology*. Textbook Ed. 6th — correct. and additional. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2022:1024. (In Russian)].
9. Титов М.И., Виноградов В.А., Беспалова Ж.Д. Даларгин — пептидный препарат с цитопротективным действием. *Бюллетень Всесоюзного кардиологического научного центра АМН СССР*. 1985;2:72–76. [Titov M.I., Vinogradov V.A., Bepalova Zh.D. Dalargin — peptidnyy preparat s cytoproektivnim deystviem [Dalargin — a peptide preparation with cytoprotective action]. *Bulleten' Vsesoiuznogo kardiologicheskogo nauchnogo tsentra AMN SSSR [Bulletin of the All-Union Cardiological Scientific Center of the USSR Academy of Medical Sciences]*. 1985;2:72–76. (In Russian)].
10. Украинская А.А., Васильева Л.С. Коррекция даларгином и а-токоферолом стресс-индуцированных нарушений структуры лёгких. *Байкальский медицинский журнал*. 2002;30(1):34–38. [Ukrainskaya A.A., Vasil'eva L.S. Korrekciya dalarginom i a-tokoferolom stress-inducirovannih narusheniy strukturi legkih [Correction by dalargin and a-tocopherol of stress-induced lung structure abnormalities]. *Baikal Medical Journal*. 2002;30(1):34–38. (In Russian)].
11. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:944. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaya [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:944. (In Russian)].
12. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [Rukovodstvo po laboratornym zhitvotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [A Guide to Laboratory Animals and Alternative Models in Biomedical Research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2C Publ., 2010:358. (In Russian)].
13. Banerjee A., Ibsen K., Brown T., Chen R., Agatemor C., Mitragotri S. Ionic liquids for oral insulin delivery. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2018;115(28):7296–7301.
14. Chen G., Kang W., Li W., Chen S., Gao Y. Oral delivery of protein and peptide drugs: from non-specific formulation approaches to intestinal cell targeting strategies. *Theranostics*. 2022;12(3):1419–1439.
15. Gupta V., Hwang B.H., Lee J., Anselmo A.C., Doshi N., Mitragotri S. Mucoadhesive intestinal devices for oral delivery of salmon calcitonin. *J. Control Release*. 2013;172(3):753–762.
16. Liu C., Xu H., Sun Y., Zhang X., Cheng H., Mao S. Design of Virus-Mimicking Polyelectrolyte Complexes for Enhanced Oral Insulin Delivery. *J. Pharm. Sci*. 2019;108(10):3408–3415.
17. Moroz E., Matoori S., Leroux J.C. Oral delivery of macromolecular drugs: Where we are after almost 100years of attempts. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016;101:108–121.
18. Pedersen K.M., Gradel A.K.J., Ludvigsen T.P., Christoffersen B.Ø., Fuglsang-Damgaard C.A., Bendtsen K.M., Madsen S.H., Manfè V., Refsgaard H.H.F. Optimization of pig models for translation of subcutaneous pharmacokinetics of therapeutic pro-

teins: Liraglutide, insulin aspart and insulin detemir. *Transl. Res.* 2022;239:71–84.

19. Suenderhauf C., Parrott N. A physiologically based pharmacokinetic model of the minipig: data compilation and model implementation. *Pharm Res.* 2013;30(1):1–15.
20. Tang H., Mayersohn M. Porcine Prediction of Pharmacokinetic Parameters in People: A Pig in a Poke? *Drug Metab. Dispos.* 2018;46(11):1712–1724.
21. Tashima T. Delivery of Orally Administered Digestible Antibodies Using Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(7):3349.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Огнева Настасья Сергеевна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: ognevanastya@mail.ru

Nastasya S. Ogneva*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: ognevanastya@mail.ru

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: mdulya@gmail.com

Maxim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: mdulya@gmail.com

Хвостов Даниил Владиславович, к.т.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Daniil V. Khvostov, Cand. Sci. (Tech.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: snv@scbmt.ru

Natalia V. Stankova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: snv@scbmt.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным комбикормом для лабораторных животных научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень,
- ✓ Премиксы.

НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам



Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 10

ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

www.laboratorkorm.ru



Коллектив Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России, редакция научного журнала «Биомедицина», коллеги и соратники сердечно поздравляют бессменного научного руководителя, главного редактора и идейного вдохновителя журнала

Николая Николаевича КАРКИЩЕНКО

с избранием почётным членом Российской академии ракетных и артиллерийских наук (РАРАН) и награждением медалью «За заслуги в укреплении обороноспособности государства».

Присвоение этих высоких наград несомненно является достойной оценкой личных заслуг и многолетнего плодотворного труда на благо нашей страны.

Искренне желаем Николаю Николаевичу крепкого здоровья, бодрости и оптимизма, реализации всех намеченных планов и начинаний, достижения новых вершин, удачи, благополучия и дальнейших творческих успехов!

