НАУЧНАЯ ШКОЛА АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА: ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ (К 80-ЛЕТИЮ УЧЕНОГО)

Дорогой Лев Константинович!

8 января 2009 года Вам исполнилось 80 лет. Президиум Российской академии сельскохозяйственных наук, коллектив Всероссийского научно-исследовательского института животноводства Российской академии сельскохозяйственных наук (ВНИИ животноводства — ВИЖ), Центра биотехнологии и молекулярной диагностики животных ВНИИ животноводства и руководимой Вами научной школы сердечно поздравляют Вас с юбилеем.

Более 50 лет Вашей трудовой деятельности связано с ВНИИ животноводства. Здесь Вы закончили аспирантуру, работали старшим научным сотрудником, заведующим созданной Вами лабораторией по использованию математических методов и вычислительных машин в животноводстве, а затем заместителем директора и директором.

Коллектив ВНИИ животноводства благодарен Вам за то, что, войдя в состав руководства Российской академии сельскохозяйственных наук, Вы продолжали и продолжаете уделять повышенное внимание работе института. При Вашем непосредственном участии определялись основные направления развития зоотехнической науки, во флагман которой — во многом благодаря Вам — преобразился ВИЖ.

Именно Вы в конце 1980-х годов организовали и возглавили новое направление в аграрной науке — сельскохозяйственную биотехнологию. И сегодня это направление продолжает активно развиваться при Вашем непосредственном активном участии. Под Вашим мудрым руководством воспитываются научные кадры, для которых Вы служите олицетворением настоящего ученого, бескорыстно посвятившего себя науке. Многие молодые ученые именно благодаря Вашей поддержке остаются в науке и продолжают развивать отечественную биотехнологию.

Вас знает научное сообщество во всем мире. Работы, проводимые коллективом руководимой Вами научной школы, соответствуют высочайшему мировому уровню.

По праву руководимый Вами коллектив уже в третий раз удостоен гранта Президента России и получил статус ведущей научной школы Российской Федерации.

Дорогой Лев Константинович, примите самые искренние пожелания доброго здоровья, счастья и дальнейших успехов в работе!

Президиум Российской академии сельскохозяйственных наук,
коллектив Всероссийского НИИ животноводства,
коллектив Центра биотехнологии и молекулярной диагностики
Всероссийского НИИ животноводства,
редакционный совет серии «Биология животных»
журнала «Сельскохозяйственная биология»

УДК 636:636.082.12:575.113

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ*

Л.К. ЭРНСТ[1], Н.А. ВОЛКОВА[2], Н.А. ЗИНОВЬЕВА[2]

Обсуждается применение трансгенных технологий для получения сельскохозяйственных животных — продуцентов рекомбинантных белков, используемых в ветеринарии и медицине, доноров внутренних органов для пересадки человеку, особей, генетически устойчивых к инфекционным заболеваниям, с измененными хозяйственно ценными признаками. Представлены данные собственных исследований по переносу рекомбинантной ДНК в эмбрионы кур и семенники сельскохозяйственных животных in vivo. Описаны особенности фенотипа свиней, трансгенных по гену рилизинг-фактора гормона роста человека.

Ключевые слова: клеточная инженерия, трансгенез, ретровирусные векторы, трансгенные животные, рилизинг-фактор гормона роста человека.

Key words: cell engineering, transgenesis, retrovirus vectors, transgenic animals, growth hormone relising-factor.

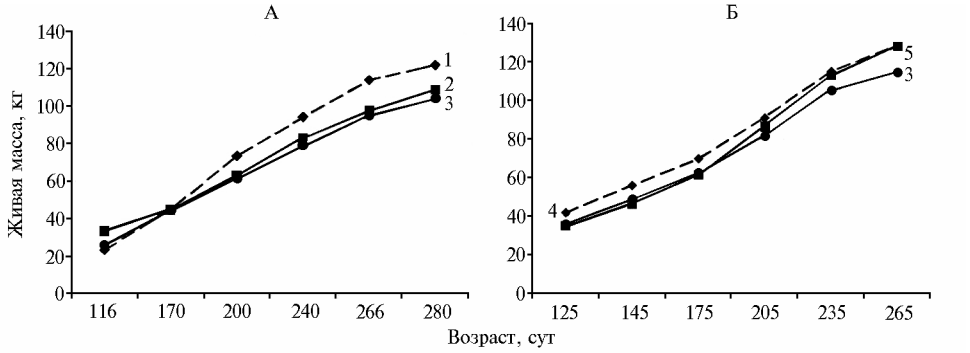
Изучение биологических основ создания трансгенных организмов представляет собой актуальнейшую задачу современной науки. Трансгенез — неотъемлемая часть биотехнологий будущего, необходимых для решения широкого спектра фундаментальных и прикладных задач. С возникновением и развитием методов генной инженерии появилась возможность целенаправленного изменения генома, что позволило создавать генетические варианты сельскохозяйственных животных, которые раньше не существовали у вида (интеграция трансгена) или не поддавались селекции (устойчивость к инфекциям). В настоящее время можно выделить четыре основных направления в использовании трансгенных технологий в животноводстве: создание трансгенных продуцентов рекомбинантных белков для ветеринарии и медицины (1-3), получение животных с измененными хозяйственно ценными признаками (4-6), особей-доноров внутренних органов для пересадки человеку (7) и форм, генетически устойчивых к инфекционным заболеваниям (8).

Значительная часть исследований по созданию сельскохозяйственных животных с измененными хозяйственно ценными признаками связана с использованием каскада генов, регулирующих рост, в частности гена гормона роста (4-6), гена рилизинг-фактора гормона роста и генов инсулиноподобных факторов роста (9). Предполагают, что дополнительный синтез перечисленных гормонов в организме животного приведет к повышению интенсивности роста и улучшению качества получаемой продукции. С целью проверки этой гипотезы мы провели изучение трансгенных по гену рилизинг-фактора гормона роста человека (hGRF) свиней ранних (II и III) и поздних (VIII, IX и X) генераций. При восстановлении животных II генерации для внутриутробного осеменения нетрансгенных свиноматок применяли семя трансгенных хряков, хранившееся в криобанке при глубоком замораживании более 10 лет. Возобновление поколений трансгенных особей позволило сравнить фенотип свиней II и VIII, III и IX, а также X генерации в разные периоды онтогенеза по ряду признаков: уровню синтеза собственного гормона роста (одна из ключевых характеристик экспрессии интегрированного гена соматолиберина в организме трансгенных свиней), показателям мясной и откормочной продуктивности, биохимиче-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 07-08-13652_офи-ц и № 08-08-90011Бел_а).

скому статусу, гистоструктуре внутренних органов.

Изучение скорости роста трансгенных животных и их нетрансгенных аналогов в разные периоды онтогенеза выявило у первых тенденцию к ее увеличению в конце эмбриогенеза и в постнатальный период. У трансгенных особей практически всех возрастов живая масса и ее среднесуточный прирост оказались больше, чем у нетрансгенных сверстников: максимальная разница между экспериментальными группами достигала соответственно 11,9 и 35,7 %. Анализ результатов двух независимых опытов по контрольному откорму свиней II и VIII, а также III и IX генераций показал, что животные ранних (II и III) генераций в среднем превосходили особей более поздних (VIII и IX) генераций по живой массе и ее среднесуточному приросту соответственно на 1,8-12,4 и 3,0-14,5 % (рис.).



Сравнительная динамика роста свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека, во II и VIII (А)**, а также в III и IX** (Б) **генерациях:** 1, 2, 4 и 5 — соответственно II, VIII, III и IX генерации, 3 — контроль (нетрансгенные аналоги).

У трансгенных животных в ряде генераций масса печени, желудка, кишечника, почек, матки, яичников, щитовидной железы и гипофиза была выше, чем у аналогов, причем преимущество по массе органов желудочно-кишечного тракта и репродуктивных органов сохранялось во всех исследованных генерациях (различия до +65,2 %).

1. Морфологический состав и качество туш у разных генераций свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека, и их нетрансгенных аналогов

Генерация	Длина полутуши, см	Выход туши, %	Состав туши, %			Толщина шпика, см
			мясо	сало	кости	
1-й опыт						
II	97,3±3,6	66,4	54,0	34,3	11,7	3,81±0,27
VIII	108,7±3,9	65,1	55,9	32,2	11,9	3,46±0,29
Контроль (нетрансгенные аналоги)	96,0±0,7	66,1	56,3	31,3	12,4	3,26±0,31
2-й опыт						
III	100,7±2,9	64,5	52,8	37,8	9,4	3,54±0,27
IX	98,5±5,0	67,3	55,6	34,1	10,3	3,13±0,39
Контроль (нетрансгенные аналоги)	97,0±0,8	65,2	54,1	36,4	9,5	3,03±0,30
3-й опыт						
X	107,4±0,8	72,9	52,4	37,1	10,5	4,55±0,27
Контроль (нетрансгенные аналоги)	111,0±1,5	73,5	51,1	39,2	9,7	4,56±0,47

Примечание. Толщину шпика определяли как среднее по четырем точкам — на холке, над 6-7-м грудными позвонками, на пояснице и на крестце.

Анализ морфологического состава и качества туш трансгенных и контрольных свиней выявил различия по длине туши, доле мяса и сала, толщине шпика (табл. 1). При этом у трансгенных животных поздних (IX и X) генераций по сравнению с контролем отмечалось увеличение доли мяса (+1,5 %) и уменьшение — сала (–1,9 %) в туше. С увеличением числа генераций у трансгенных животных уменьшалась толщина шпика: если

свиньи ранних генераций превосходили по этому показателю аналогов на 16,9 %, то животные более поздних генераций — на 3,3-6,1 %.

2. Экспрессия гормона роста у разных генераций свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека, и их нетрансгенных аналогов (по данным иммунохимических исследований)

Генерация	ИФА, нг/мл (*Cv*, %)		ИГХ, усл. ед. (*Cv*, %)	
	опыт	контроль	опыт	контроль
II	6,20±1,11 (54)	3,31±0,44 (56)	106,7±5,1 (45)	98,3±2,9 (28)
III	7,15±1,34 (56)	3,11±0,37 (51)	91,4±4,2 (44)	82,8±3,7 (42)
VIII	4,60±1,10 (72)	3,31±0,44 (56)	100,5±4,7 (44)	98,3±2,9 (28)
IX	6,16±1,12 (54)	3,11±0,37 (51)	99,3±4,2 (33)	82,8±3,7 (42)
X	4,88±0,56 (44)	3,40±0,42 (43)	96,0±3,2 (41)	88,0±3,2 (35)

Примечание. ИФА — иммуноферментный анализ, ИГХ — иммуногистохимический анализ; *Cv* — коэффициент вариации; контроль — нетрансгенные аналоги.

Были установлены также некоторые изменения гормонального и биохимического статуса трансгенных животных. В частности, по данным иммуноферментного анализа (ИФА), у трансгенные особей содержание гормона роста в крови было в среднем в 1,5-2,0 раза выше, чем у нетрансгенных сверстников (табл. 2). При этом животные ранних (II и III) генераций характеризовались более высоким содержанием соматотропина в крови по сравнению с животными поздних (VIII, IX и X) генераций. Иммуногистохимические исследования подтвердили, что превышение содержания соматотропина в клетках гипофиза у трансгенных животных относительно контрольных достигало 20 % (см. табл. 2).

3. Некоторые гисто- и цитоморфометрические показатели у разных генераций свиней, трансгенных по гену соматолиберина человека, и их нетрансгенных аналогов

Генерация	Толщина печеночных балок, мкм	Диаметр мышечных волокон, мкм	Толщина кардиомиоцитов, мкм	Диаметр фолликулов щитовидной железы, мкм
II	21,9±0,6	48,9±1,5	24,8±0,6	197±8,9
VIII	26,7±0,7	52,4±1,5	24,6±0,7	176±7,8
Контроль (нетрансгенные аналоги)	25,2±0,6	47,9±1,3	25,1±0,5	185±8,1
III	25,4±0,6	68,6±1,8	23,2±0,5	224±16,2
IX	24,9±0,6	55,6±1,2	20,9±0,5	183±12,9
Контроль (нетрансгенные аналоги)	20,7±0,2	69,6±2,0	22,5±0,3	188±9,6
X	19,6±0,3	71,4±1,1	27,6±0,6	141±4,5
Контроль (нетрансгенные аналоги)	19,3±0,3	75,1±1,2	19,1±0,4	181±5,5

Сравнение метаболического профиля трансгенных свиней и их аналогов выявило различия в интенсивности обменных процессов, которые наблюдались практически во всех изученных генерациях. Так, в возрасте 3,5-4,5 мес у трансгенных животных отмечалось снижение содержания общего белка в крови на 1,5-8,2 % по сравнению с контролем. Липидный обмен характеризовался преимущественно повышением концентрации триглицеридов в крови (до +32,1 %) и снижением — холестерина (до –13,8 %). После того как животных сняли с откорма в возрасте 8-9 мес, у трансгенных свиней наблюдалось, наоборот, повышение концентрации общего белка в крови по сравнению с контролем (до +13,9 %). Углеводно-липидный обмен при этом характеризовался увеличением концентрации глюкозы (до +39,2 %) и триглицеридов (до +31,5 %) в крови. Снижение количества холестерина в крови (на 6,4-8,1 %) было установлено только у животных поздних генераций при откорме до живой массы 120 кг. Из ме-

таболитов минерального обмена повторяющиеся в ряде генераций различия были выявлены по содержанию магния и хлоридов в крови: у трансгенных свиней оно соответственно возрастало до 11,6 % и снижалось до 4,3 % по сравнению с нетрансгенными аналогами.

Вместе с тем гистологические исследования не выявили у трансгенных животных каких-либо отклонений, связанных с воспалительными или патологическими процессами во внутренних органах, однако, как и в эмбрионах трансгенных свиней разных стадий развития (10), в большинстве органов взрослых животных были обнаружены некоторые морфометрические изменения. В частности, практически во всех исследованных поколениях отмечалось увеличение по сравнению с контролем толщины печеночных балок (до +22,7 %, $p \leq 0,01$) и железистого слоя донной части желудка (до +11,2 %, $p \leq 0,01$), а также высоты ворсинок 12-перстной кишки (до +24,3 %, $p \leq 0,05$). У трансгенных свиней в ранних генерациях наблюдали увеличение диаметра ацинусов поджелудочной железы и фолликулов щитовидной железы соответственно на 7,3 ($p \leq 0,05$) и 6,5-19,1 %, в более поздних — наоборот, снижение этих показателей относительно зарегистрированных у аналогов соответственно на 6,4-8,8 ($p \leq 0,01$) и 2,6-21,8 % ($p \leq 0,001$). Значительными оказались изменения гистоструктуры органов сердечно-сосудистой и выделительной систем, а также мышечной ткани, однако эти признаки варьировали в ряде поколений (табл. 3). Практически во всех изученных генерациях трансгенных животных увеличился размер клеток большинства исследованных органов, что в основном было связано с увеличением объема цитоплазмы. У трансгенных животных в клетках таких органов выявили повышенное содержание РНК по сравнению с контролем (до +34,6 %, $p \leq 0,001$), что свидетельствует о более интенсивном синтезе белков.

Наряду с получением и исследованием генеративных трансгенных животных, важное значение имеет так называемый соматический трансгенез, то есть локальная трансформация органов и тканей. Для трансформации половых клеток у кроликов и свиней мы разработали технологию локального трансгенеза семенников in vivo с использованием ретровирусных векторов (11). Суть технологии заключается в том, что в период наиболее активной пролиферации сперматогониев в семенники животных вводятся генные конструкции, которые встраиваются в эти клетки-мишени и мультиплицируются в процессе их деления. Проведенные исследования позволили выявить факторы, влияющие на результативность переноса экзогенной ДНК в половые клетки сельскохозяйственных животных in vivo: установлено, что она зависит от используемой генной конструкции, способа ее переноса (с клетками-упаковщицами или с препаратом рекомбинантного ретровируса) и периода времени, прошедшего после инъекции генных конструкций в семенники. Более высокую эффективность трансгенеза отмечали при введении ретровирусного вектора pX-Ins, содержащего ген инсулина человека под вирусным промотором MLV (по сравнению с pX-RSVhgh), и использовании в качестве источника генных конструкций суспензии клеток-упаковщиц. С увеличением периода после инъекции число трансформированных сперматогониев увеличивалось.

Мы также разработали технологию создания трансгенных кур на основе использования ретровирусных векторов. Генные конструкций вводились в зародышевые клетки на ранних стадиях эмбриогенеза (12), встраивались в их геном и мультиплицировались при делении клеток. Эффективность трансформации эмбриональных клеток кур ретровирусными векторами была установлена как in vitro, так и in vivo. В экспериментах in

vivo общая эффективность трансгенеза достигала (в зависимости от используемого ретровирусного вектора) от 5,0 до 8,0 % (табл. 4). При этом была получена трансгенная птица с интеграцией и экспрессией рекомбинантной ДНК, в частности генов гормона роста и инсулина человека, в клетках ряда органов — преимущественно печени, сердца, кишечника, желудка, яйцевода, репродуктивных органов, а также в мышечной ткани.

4. Оценка эффективности использования ретровирусных векторов для генетической трансформации эмбрионов кур in vivo

Показатель	Опыт		Контроль
Генная конструкция (ген)	pX-RSVhgh (ген гормона роста человека)	pX-Ins (ген инсулина человека)	
Проинъецировано эмбрионов, шт.	100	100	50
Объем суспензии введенных клеток-упаковщиц, мкл (содержание, кл/мкл)	1 (1000)	1 (1000)	
Развилось эмбрионов:			
n (%)	68 (68,0)	60 (70,0)	45 (90,0)
в том числе трансгенных, *n*	42	31	
Вылупилось цыплят:			
n (%)	17 (17,0)	15 (15,0)	38 (76,0)
в том числе трансгенных, *n*	8	5	
Частота интеграции, %	61,8	51,7	
Общая эффективность трансгенеза, %	42,0	31,0	
Эффективность получения трансгенных кур, %	8,0	5,0	

Примечание. Частота интеграции, общая эффективность трансгенеза и эффективность получения трансгенных кур — соответственно доля трансгенных цыплят и эмбрионов от числа развившихся эмбрионов, доля полученных трансгенных цыплят и эмбрионов от числа инъецированных яиц и доля вылупившихся трансгенных цыплят от числа инъецированных яиц.

Таким образом, в последние годы достигнуты значительные успехи в технологии трансгенеза животных: предложено множество приемов направленного переноса генов в клетки, изучены механизмы интеграции, экспрессии и наследования введенных генов. Вместе с тем способы генетической трансформации, успешно применяемые на лабораторных животных, не всегда бывают такими же эффективными при получении сельскохозяйственных трансгенных животных. Следовательно, требуется разработка методологических подходов к созданию генных конструкций и усовершенствованию методик их введения, что позволит повысить общую эффективность трансгенеза при одновременном снижении негативного влияния интегрированных рекомбинантных генов на жизнеспособность и здоровье сельскохозяйственных трансгенных животных. Все более актуальным становится получение трансгенных животных (в том числе птицы), в организме которых экспрессируются рекомбинантные гены белков фармакологического назначения. Таких животных рассматривают как альтернативу традиционным микробиологическим продуцентам рекомбинантных белков человека: не все человеческие белки могут быть синтезированы в микроорганизмах, промышленное использование которых, к тому же, требует более высоких материальных затрат. С развитием методов генной инженерии, направленных на создание эффективных генных конструкций и средств их введения, станет возможным преобразовать животноводство в стабильный источник широкого спектра веществ, обладающих фармакологическими и иными полезными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilmut I., Archibald A., McClenaghan M. e.a. Production of pharmaceutical proteins in milk. Experientia, 1991, 47: 905-912.
2. Брем Г., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Генные фермы — новый путь производства биологически активных протеинов трансгенными животными. С.-х. биол., 1993, 6: 3-27.
3. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А., Волкова Н.А. и др. Некоторые аспекты ис-

пользования ретровирусных векторов для переноса чужеродной ДНК in vivo и in vitro. М., 2003.
4. Pursel V., Cambell R., Miller K. e.a. Growth potential of transgenic pigs expressing a bovine growth hormone gene. J. Anim. Sci., 1988, 66: 267.
5. Ebert K.M., Low M.J., Overstrom E.W. e.a. Porcine growth hormone gene expression from viral promotors in transgenic swine. Anim. Biotechnol., 1990, 1: 145-159.
6. Ениколопов Г.Н., Захарченко В.И., Гращук М.А. и др. Получение трансгенных кроликов, содержащих и экспрессирующих ген соматотропина человека. ДАН, 1988, 299(5): 1246-1249.
7. Platt J.L. Xenotransplantation: recent progress and current perspectives. Cur. Opin. Immunol., 1996, 8(5): 721-728.
8. Ernst L.K., Zaharchenko V.I., Suraeva N.M. e.a. Transgenic rabbits with antisense RNA gene targeted at adenovirus H5. Theriogenology, 1991, 35: 1257-1271.
9. Rexroad C.E., Hammer R.E., Behringer R.R. e.a. Insertion, expression and phisiology of growth-regulating genes. J. Reprod. Fert. Suppl., 1990, 41: 119-124.
10. Волкова Н.А., Шихов И.Я., Зиновьева Н.А. Фенотипические особенности свиней в период эмбриогенеза при интеграции гена рилизинг-фактора гормона роста человека. С.-х. биол., 2007, 2: 37-41.
11. Новгородова И.П., Мормышев А.Н., Зиновьева Н.А. и др. Генетическая трансформация сперматогониев кроликов in vivo. Биотехнология, 2008, 1: 24-28.
12. Волкова Н.А., Тулякова А.О., Волкова Л.А. и др. Эффективность переноса экзогенной ДНК в клетки эмбрионов кур in vitro и in vivo с использованием ретровирусных векторов. Докл. РАСХН, 2007, 3: 37-39.

[1]*Российская академия сельскохозяйственных наук,*
117218 г. Москва, ГСП-7, ул. Кржижановского, 15, корп. 2;
[2]*ГНУ Всероссийский НИИ животноводства Россельхозакадемии,*
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,
e-mail: n_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию 1 февраля 2009 года

SOME ASPECTS IN THE USE OF TRANSGENIC TECHNOLOGIES FOR FARM ANIMALS BREEDING

L.K. Ernst[1], N.A. Volkova[2], N.A. Zinov'eva[2]

Summary

The authors discussed the use of transgenic technologies for obtaining of agricultural animals — the producers of recombinant proteins, applied in veterinary science and medicine, the donors of internal organs for transplantation to mans, the individuals genetic resistant to infectious diseases or with modified economically valued determinants. The own data are presented on the transfer of recombinant DNA to hen embryos and testicles of agricultural animals in vivo. The features of the phenotype of pigs, transgenic on human gene of the growth hormone-releasing factor, were described.

Новые книги

Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков-производителей /Под ред. Н.И. Решетниковой. М., 2008, 160 с.

В книге обобщены материалы многолетних исследований отдела биологии воспроизводства Всероссийского государственного научно-исследовательского института животноводства Россельхозакадемии и Всероссийского научно-исследовательского института племенного дела, научных подразделений других институтов, занимающихся проблемами искусственного осеменения и биологии воспроизведения, практический опыт ОАО «Центральная станция искусственного осеменения», лучших племенных предприятий РФ, а также разработки конструкторских организаций. Описаны критерии комплектования и ветеринарно-санитарные правила организаций по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных племенными быками-производителями. Приведены способы выращивания ремонтных бычков, содержания, кормления и использования племенных производителей. Обсуждаются ветеринарно-санитарные требования при получении, обработке, хранении, транспортировке и использовании спермы для искусственного осеменения.

Иванова Н.В. **Нормативно-справочные материалы по животноводству**. Ростов-на-Дону: изд-во «Феникс», 2008, 256 с.

Изложены сведения по кормлению и содержанию животных, качеству продукции животноводства, биологии воспроизводства и комплексной оценке животных, а также применению лекарственных растений для их лечения.