

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СВИНЕЙ
В ПЕРИОД ЭМБРИОГЕНЕЗА ПРИ ИНТЕГРАЦИИ ГЕНА
РИЛИЗИНГ-ФАКТОРА ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА**

**Н.А. ВОЛКОВА, И.Я. ШИХОВ, Н.А. ЗИНОВЬЕВА,
Л.А. ВОЛКОВА, Л.К. ЭРНСТ, Е. ТОМГОРОВА, Г. БРЕМ**

Исследовали влияние интеграции гена рилизинг-фактора гормона роста человека на интенсивность роста и развития трансгенных свиней в эмбриональный период развития. Определяли весовые и линейные характеристики роста трансгенных эмбрионов. Рассматриваются структурно-функциональные особенности железистых органов и характер накопления нуклеиновых кислот в клетках железистых органов.

Интеграция чужеродных генов в геном животных может вызывать различные изменения на уровне фенотипа, обусловленные дополнительной экспрессией рекомбинантного продукта. Эти изменения могут проявляться на разных уровнях организации индивидуумов (цитологическом, тканевом, организменном) и в определенной степени влиять на функциональное состояние отдельных систем организма. Так, при введении генов, кодирующих белки гормона роста (рилизинг-фактор, инсулиноподобный фактор и др.) у трансгенных животных выявлена повышенная скорость роста мышечной ткани и увеличение конечной живой массы. Полученные трансгенные мышцы с геном гормона роста превосходили по скорости роста своих аналогов в 4 раза и имели вдвое большую живую массу (1).

Несколько позднее были получены трансгенные по генам гормона роста кролики, свиньи и овцы, у которых также наблюдались определенными сдвиги по интенсивности роста и развития (2-4). Однако в отличие от данных, полученных на мышах, у сельскохозяйственных животных соответствующего увеличения скорости роста не отмечено. В частности, живая масса трансгенных свиней была незначительно выше, чем в контроле (5-7). У овец, трансгенных по генам гормона роста и соматолиберина, несмотря на повышенную концентрацию гормона роста в крови, не выявлено усиления интенсивности роста (8).

В то же время при отсутствии существенной разницы по показателям роста у трансгенных животных отмечены определенные изменения в метаболизме клеток ряда органов и тканей, что выражалось прежде всего в увеличении содержания белка и уменьшении количества жира в тканях (9, 10). При этом исследования по оценке фенотипа трансгенных животных проводили в основном в постнатальный период развития. Однако с точки зрения биологических основ трансгеноза несомненный интерес представляет изучение влияния интеграции чужеродных генов на фенотипические признаки животных в период эмбриогенеза.

В связи с этим в задачу нашей работы входила оценка особенностей предплодного и плодного периодов внутриутробного развития свиней, трансгенных по гену рилизинг-фактора гормона роста человека.

Методика. Объектом исследований служили эмбрионы свиней (помеси крупная белая × ландрас), полученные после осеменения свиноматок семенем хряков, трансгенных по гену рилизинг-фактора гормона роста человека. Извлечение плодов осуществляли на 25, 35, 45 и 90-е сут эмбрионального развития. Трансгенность полученных эмбрионов свиней определяли методом ПЦР-анализа. На основании этих данных формировали группы животных: контроль и опыт — соответственно интактные и

трансгенные эмбрионы. У эмбрионов каждой группы определяли весовые и линейные показатели, а также исследовали структурно-функциональные особенности железистых органов (печень, поджелудочная, щитовидная железа, донная часть желудка и двенадцатиперстная кишка). Для ПЦР использовали ДНК, выделенную из тканей уха эмбрионов с применением перхлората натрия (11). ПЦР проводили в 10-кратном буфере (20 мкл) следующего состава: 166,7 мМ (NH₄)₂SO₄; 100 мМ Трис-НСl (рН 8,3); 1,5 мМ MgCl₂; 0,1 % Tween 20. В инкубационную смесь входили 0,2 мМ dNTP, 25 пкмоль каждого из праймеров и 1 ед. Taq-полимеразы.

Гистологические препараты исследуемых органов готовили по общепринятой методике. Для фиксации образцов тканей эмбрионов использовали фиксатор Карнуа (абсолютный спирт:хлороформ:ледяная уксусная кислота в соотношении соответственно 6:3:1). Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивали на ДНК по Ф льгену, на суммарные нуклеиновые кислоты (РНК+ДНК) галлоцианин-хромовыми квасцами по Эй-нарсену (12). Относительное содержание ДНК в ядрах клеток рассчитывали по формуле $a = (1/b) \cdot S \cdot 100$, где a — относительное содержание ДНК на ядро клетки, b — средняя яркость ядра, S — площадь ядра. Аналогичным образом рассчитывали и относительное содержание суммарных нуклеиновых кислот в клетке. Содержание РНК определяли как разность между относительным содержанием суммарных нуклеиновых кислот и ДНК.

Результаты. По интенсивности роста трансгенных животных и их аналогов в контроле по периодам эмбриогенеза не выявлено существенных различий (табл. 1). В 35-суточном возрасте трансгенные эмбрионы лишь незначительно превосходили по массе таковых в контроле (+2,1 %). У 45-суточных эмбрионов наблюдалась обратная тенденция: живая масса трансгенных особей была меньше, чем интактных (–13,0 %). Во второй половине эмбриогенеза у трансгенных особей повышалась интенсивность роста. Эмбрионы в опыте характеризовались более высокой живой массой и повышенной скоростью роста — соответственно на 0,5 и 15,6 % выше, чем в контроле.

1. Показатели интенсивности роста трансгенных и интактных эмбрионов свиней в различные периоды внутриутробного развития

Возраст, сут	Число эмбрионов		Живая масса, г			Скорость роста, %		
	опыт	контроль	опыт	контроль	% к контролю	опыт	контроль	% к контролю
25	13	3	0,48±0,100	0,50±0,010	–4,0	–	–	–
35	5	8	4,70±0,200	4,60±0,100	+2,1	979	920	+6,4
45	9	5	20,00±0,001	23,00±0,001	–13,0	426	500	–14,8
90	6	10	578,00±0,060	575,00±0,050	+0,5	2890	2500	+15,6

Примечание. Скорость роста — отношение массы плода к таковой предшествующего периода. Контроль и опыт — соответственно интактные и трансгенные эмбрионы. Прочерк означает, что исследования не проводили.

При исследовании интенсивности роста органов и тканей трансгенных и нетрансгенных свиней в ранний период эмбриогенеза выявлена тенденция к снижению массы внутренних органов в опыте по сравнению с контролем: 45-суточные эмбрионы в опыте уступали по массе органов аналогам в контроле в среднем на 3,7-24,7 %. К концу плодного периода (90 сут) у трансгенных животных масса практически всех органов (за исключением почек и кишечника), наоборот, превосходила таковую у особей в контроле. Разница к контролю по абсолютной массе составляла от 1,1 до 9,5 %; в пересчете на относительную

массу (доля от общей массы эмбриона) — от 0,3 до 10,0 %.

Наряду с изменением массы внутренних органов наблюдались и гистоструктурные изменения клеток ряда железистых органов: печени, поджелудочной, щитовидной желез, донной части желудка и двенадцатиперстной кишки. Наиболее значительные структурные изменения выявлены в тканях печени в поздний плодный период (90 сут). Различия между трансгенными и нетрансгенными 35- и 45-суточными эмбрионами по этому показателю были незначительными (табл. 2). Если в предплодный и ранний плодный периоды размеры гепатоцитов в опыте и контроле были практически одинаковыми, то в поздний плодный период у трансгенных эмбрионов по сравнению с нетрансгенными эти клетки при сравнительно одинаковых размерах ядер характеризовались более развитым слоем цитоплазмы. Это обуславливало снижение ядерно-плазматического отношения у трансгенных эмбрионов по сравнению с интактными в среднем на 14,3 %. При этом по толщине печеночных балок между эмбрионами в опыте и контроле не отмечено существенных различий.

2. Морфометрические показатели функциональных отделов органов и желез трансгенных и интактных эмбрионов свиней в различные периоды внутриутробного развития

Показатель	Возраст эмбриона, сут			
	45		90	
	опыт	контроль	опыт	контроль
Печень:				
толщина балок, мкм	10,8±0,2	11,1±0,1	8,6±0,10	8,7±0,06
площадь ядра клеток, мкм ²	25,0±0,4	25,6±0,4	32,0±0,4	32,9±0,5
площадь цитоплазмы, мкм ²	78,2±1,6	77,8±1,3	67,7±0,2	58,7±0,2
ядерно-плазматическое отношение	0,34	0,34	0,48	0,56
Поджелудочная железа:				
диаметр ацинуса, мкм	—	—	33,9±1,1	37,8±0,7
площадь ядра клеток, мкм ²	—	—	15,0±0,1	15,7±0,1
площадь цитоплазмы, мкм ²	—	—	29,8±0,3	27,2±0,3
ядерно-плазматическое отношение	—	—	0,50	0,58
Щитовидная железа:				
диаметр фолликулов, мкм	34,5±1,2	33,6±1,4	39,3±1,3	40,4±2,1
площадь ядра клеток, мкм ²	18,1±0,4	17,2±0,3	14,9±0,3	15,1±0,2
площадь цитоплазмы, мкм ² ;	32,0±0,5	31,7±0,8	26,7±0,3	25,6±0,6
ядерно-плазматическое отношение	0,56	0,54	0,56	0,59
Желудок:				
толщина железистого слоя, мкм	30±2,1	31±1,9	142±3,3	153±3,6
число ядер клеток на 100 мкм среза	12±0,1	13±0,2	11±0,29	10±0,30
Кишечник:				
высота ворсинок, мкм	58±1,7	60±2,0	182±7,5	199±8,8
число ядер клеток на 100 мкм среза	16±0,5	15±0,7	13±0,28	11±0,30

Примечание. Контроль и опыт — соответственно интактные и трансгенные эмбрионы. Прочерк означает, что исследования не проводили.

По морфометрическим показателям других железистых органов различия между эмбрионами экспериментальных групп также выявлены только в поздний плодный период. В частности, у 90-суточных трансгенных эмбрионов площадь цитоплазмы в клетках поджелудочной железы была больше (+9,6 %), чем у интактных особей; ядерно-цитоплазматическое отношение уменьшалось (–13,8 %). Аналогичная тенденция прослеживалась и в клетках щитовидной железы, однако эти изменения были менее выражены (см. табл. 2).

По данным гистологических исследований донной части желудка и двенадцатиперстной кишки 90-суточных эмбрионов, трансгенные особи

уступали интактным по толщине железистого слоя и высоте ворсинок, причем у первых наблюдалось уменьшение размера клеток. У эмбрионов в опыте на 100 мкм железистого слоя желудка и эпителиальной выстилки кишки приходилось в среднем на 10-18 % больше клеток, чем у таковых в контроле, что свидетельствует о некотором снижении интенсивности развития пищеварительных функций у трансгенных особей (см. табл. 2).

Относительное содержание нуклеиновых кислот в клетках железистых органов эмбрионов в контроле и опыте варьировало в зависимости от места синтеза (органа). Более интенсивный синтез ДНК и РНК был отмечен в клетках печени: относительное содержание ДНК — 15,1-20,8, РНК — 28,6-40,2 ед., что выше аналогичных показателей в поджелудочной и щитовидной железах — соответственно в 1,11-1,32 и 2,40-2,70 раза (табл. 3).

3. Относительное содержание нуклеиновых кислот в органах и железах трансгенных и интактных эмбрионов свиней в различные периоды внутриутробного развития

Орган, железа	Группа	n	Относительное содержание в клетках, ед.		РНК/ДНК
			ДНК	РНК	
35-суточные эмбрионы					
Печень	Опыт	5	15,2±0,36	41,9±0,66	2,76
	Контроль	8	15,1±0,30	42,0±0,67	2,78
45-суточные эмбрионы					
Печень	Опыт	5	17,6±0,37	31,1±0,67	1,76
	Контроль	6	17,7±0,34	31,0±0,86	1,77
Щитовидная железа	Опыт	5	13,5±0,84	—	—
	Контроль	6	13,3±0,70	—	—
90-суточные эмбрионы					
Печень	Опыт	6	18,3±0,30	31,5±0,71	1,73
	Контроль	6	20,8±0,36	28,6±0,68	1,38
Щитовидная железа	Опыт	6	14,6±0,35	12,9±0,46	0,89
	Контроль	6	15,7±0,32	11,9±0,23	0,76
Поджелудочная железа	Опыт	6	18,6±0,66	11,8±0,54	0,63
	Контроль	6	18,7±0,37	11,4±0,27	0,61

Примечание. Контроль и опыт — соответственно интактные и трансгенные эмбрионы. Прочерк означает, что исследования не проводили.

Следует отметить, что у трансгенных эмбрионов во всех исследованных органах на фоне снижения содержания ДНК наблюдался более интенсивный синтез РНК — на 3-10 % выше по сравнению с контролем. При этом разница по соотношению РНК/ДНК между эмбрионами в контроле и опыте составляла от 3,3 до 25,4 %.

Таким образом, у трансгенных свиней в период эмбриогенеза не наблюдается существенных изменений по интенсивности роста по сравнению с интактными особями. Вместе с тем следует отметить повышенную скорость роста и увеличение массы внутренних органов у трансгенных эмбрионов в поздний плодный период. При этом наличие чужеродного гена, в частности рилизинг-фактора гормона роста человека, оказывает влияние на характер синтеза нуклеиновых кислот в клетке. У трансгенных эмбрионов в отличие от интактных на фоне снижения содержания ДНК повышается содержание РНК в клетках, что в свою очередь оказывает влияние на структурно-функциональные особенности железистых органов. Это выражается прежде всего в увеличении площади цитоплазмы и повышении плотности расположения клеток в эпителиальных слоях железистых органов. Выявленные изменения в клеточной структуре железистых органов трансгенных животных свидетельствуют, на наш взгляд, о более интенсивных процессах специализации тканей, связанных с дополнительным синтезом чужеродного белка в организме генетически модифицированных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Palmiter R., Brinster R., Hammer R. e.a. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982 300: 611-615.
2. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad Jr. e.a. Production of transgenic rabbit, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315: 680-683.
3. 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.
4. Murray J.D., Nancarrow C.D., Marshall J.T. e.a. Production of transgenic merino sheep by microinjection of metallothionein bovine growth hormone fusion genes. *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 1989, 1: 147-155.
5. Vize P.D., Michalska A.E., Ashman R. e.a. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J. of Cell Science*, 1988, 90: 295-300.
6. Ebert K.M., Low M.J., Overstrom E.W. e.a. Porcine growth hormone gene expression from viral promoters in transgenic swine. *Animal Biotechnology*, 1990, 1: 145-159.
7. Эрнст Л.К., Гольдман И.Л., Кадулин С.Г. Генная инженерия в животноводстве: трансгенные сельскохозяйственные животные, кормовые растения, микроорганизмы рубца. *Биотехнология*, 1993, 5: 2-14.
8. Rexroad C.E., Hammer R.E., Behringer R.R. e.a. Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 1990, 41: 19-124.
9. Pursel V.G., Pinkert C.A., Miller K.F. e.a. Genetic engineering of livestock. *Science*, 1989, 244: 1281-1288.
10. Wieghart M., Hoover J.L., McGrane M.M. e.a. Production of transgenic pigs harbouring a rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone fusion gene. *J. of Reproduction and Fertility*, 1990, 41: 89-96.
11. Зиновьева Н.А., Попов А.Н., Эрнст Л.К. и др. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы, 1998.
12. Микроскопическая техника. Руководство /Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М., 1996.

*Всероссийский государственный
НИИ животноводства,
142132, Московская обл., пос. Дубровицы;
Российская академия
сельскохозяйственных наук, Москва;
Институт животноводства и генетики
ветеринарно-медицинского университета,
А-1210, г. Вена, Австрия*

*Поступила в редакцию
23 октября 2006 года*

PHENOTYPIC PECULIARITIES OF PIGS DURING EMBRYOGENESIS UNDER THE INFLUENCE OF INTEGRATION OF HUMAN GROWTH HORMONE RELEASING FACTOR GENE

*N.A. Volkova, I.Ya. Shikhov, N.A. Zinov'eva,
L.A. Volkova, L.K. Ernst, E. Tomgorova, G. Brem*

S u m m a r y

The authors investigated the influence of integration of human growth hormone releasing factor gene on intensity of growth and development of transgenic pigs at the embryonic period of development. The weight and linear characteristics of growth in transgenic embryos and also the structure-functional peculiarities of glandular organs (liver, pancreas and thyroid gland, fundus of stomach and duodenum) were determined. It was established that the integration of foreign gene do not causes significant changes of morphometric parameters of glandular organs at the period of embryogenesis; however it results in the changes in ratio of cell's nucleic acids. The transgenic embryos in contrast to control embryos have the decrease in DNA content and at the same time the increase in RNA content in the cells average to 3,5-10 %.