

УДК 57.089:59

ГЕНОТИПЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© 2014 г. М.П. Мошкин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: mmp@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 10 мая 2013 г. Принята к публикации 1 февраля 2014 г.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно прогнозу журнала «Nature» (Abbott, 2004) генетическое разнообразие лабораторных млекопитающих, прежде всего мышей, достигнет к 2030 г. 300 тыс. генотипов. Столь бурный рост обусловлен развитием молекулярно-генетических и биоинформационных технологий, которые, с одной стороны, формируют запрос на разнообразие лабораторных животных, а с другой, обеспечивают генно-инженерное конструирование организмов с заданными генетическими свойствами. Причиной растущего запроса служит накопление сведений о генетическом вкладе в развитие многих заболеваний. Уже сегодня известно более 2 млн генетических полиморфизмов, которые определяют наследственную предрасположенность людей к различным болезням, в том числе формирующимся в результате сочетания факторов –

генотип человека и неадекватные генотипу условия климата, производственной, бытовой и социальной среды. Этот внушительный список полиморфизмов постоянно пополняется, чему способствуют совершенствование и удешевление методов прочтения геномов (секвенирование), а также развитие информационных технологий, обеспечивающих накопление и переработку гигантских баз данных.

Вклад генетического разнообразия лабораторных животных в развитие фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований наглядно иллюстрирует динамика публикаций, которая только для работ, основанных на изучении трансгенных мышей, выросла с единичных статей в конце 1980-х годов до 13–14 тыс. публикаций в год в 2010–2012 гг. (рис. 1).

Таким образом, создание, сохранение, разведение и изучение различных генетических линий лабораторных животных становятся заметными

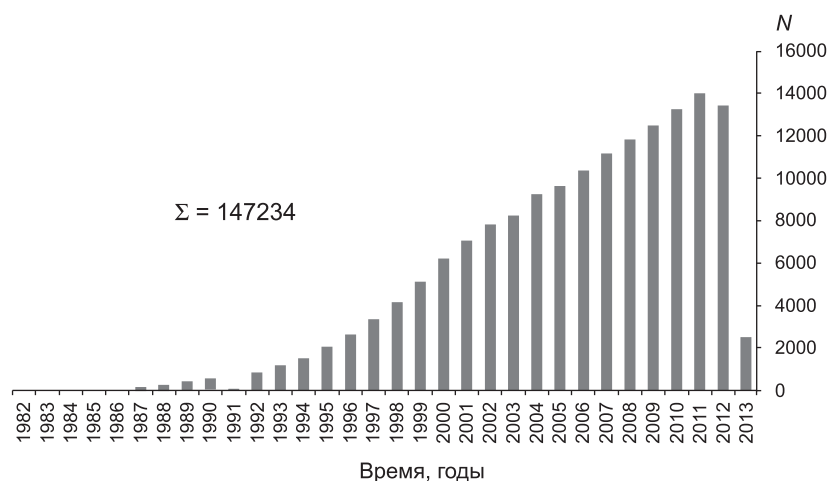


Рис. 1. Динамика числа публикаций при запросе на сайте PubMed словосочетания «трансгенные мыши».

компонентами современной биологии, которая требует подготовки специалистов, обладающих мультидисциплинарными знаниями в таких областях биологии, как генетика (в том числе генная инженерия) и селекция, иммунофизиология, этология, специализированные зоотехния и ветеринария, биоинформатика. В США, странах ЕС, Японии и Китае эту задачу решает специализация студентов в области наук о лабораторных животных (**Laboratory Animal Sciences**). К сожалению, в нашей стране нет не только адекватного русского аналога понятию **Laboratory Animal Sciences**, но и направленной подготовки специалистов в этой быстро развивающейся сфере научно-практической деятельности.

Ниже дан общий обзор современного состояния и трендов в области создания и научного использования рукотворного биоразнообразия основных видов лабораторных млекопитающих – мышей и крыс.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛИНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ СЕЛЕКЦИИ И МУТАГЕНЕЗА

Селекция

Первая инбредная линия мышей была получена в 1909 г. американским ученым Кларенсом К. Литтлом, который обнаружил в лабораторной колонии пару особей со светло-коричневой окраской. Затем путем братско-сестринских спариваний более чем 20 поколений в сочетании с селекцией на выживаемость и наличие опухолей молочных желез была получена первая высоко-раковая линия мышей (DBA). В 1929 г. Литтл основал в Бар-Харборе (штат Мэн, США) Джексонскую лабораторию, названную так в честь Роско Джексона – первого спонсора данного проекта. Вскоре Джексонская лаборатория заняла лидирующие позиции как главный мировой центр генетического разнообразия мышей.

Сегодня линии лабораторных мышей и крыс, полученные путем селекции по патологическим симптомам, широко используются при расшифровке генетических основ различных заболеваний. Конкретные примеры таких исследований представлены в статье А.Л. Маркеля (Маркель, 2014). Следующий шаг в уточнении вклада отдель-

ных генов в формирование фенотипа позволяет изучать конгенные линии, которые получают при скрещивании гомозиготных родителей, генетически отличающихся друг от друга, и последующих возвратных спариваниях с особями одной из родительских линий при постоянном отборе по целевому признаку. Полученная таким образом конгенная линия отличается от исходной только по гену или комплексу генов, определяющих контролируемое фенотипическое свойство.

Индукцированные нецелевые мутации

Один из подходов к изучению роли отдельных генов основан на химическом мутагенезе, вызываемом *N*-этил-*N*-нитрозомочевинной (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea – ENU). Введение ENU самцам мышей приводит к образованию точечных мутаций в сперматогониях с частотой $\approx 1,5 \times 10^{-3}$. Этот подход был предложен Расселом и соавт. (Russell *et al.*, 1982) как метод нетоксичного увеличения частоты мутаций. На следующем этапе для выявления мутантных фенотипов проводят скрининг потомков от самцов, которым вводили ENU (рис. 2). Для просмотра большого числа особей разработаны стандартные протоколы фенотипирования, которые позволяют за 15 мин получить несколько десятков морфологических и поведенческих характеристик. На основе данного метода получено около 300 линий мутантных мышей, используемых в биомедицинских исследованиях.

Еще более эффективный метод выключения отдельных генов, получивший название генной ловушки (**gene trap**), был разработан сравнительно недавно (International Mouse Knockout ..., 2007). В основе метода лежит введение вектора, содержащего сильный акцептор сплайсинга и репортерный ген (рис. 2), что приводит к инсерции одного из генов. Электропорацией или с помощью ретровирусной инфекции конструктор внедряется в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые затем вводят в бластоцисту для получения химерных животных. Далее возвратными скрещиваниями с исходной линией получают генотипы с точечными мутациями, для «вылавливания» которых проводят фенотипирование.

Таким образом, методами селекции и мутагенеза получено несколько сотен лаборатор-

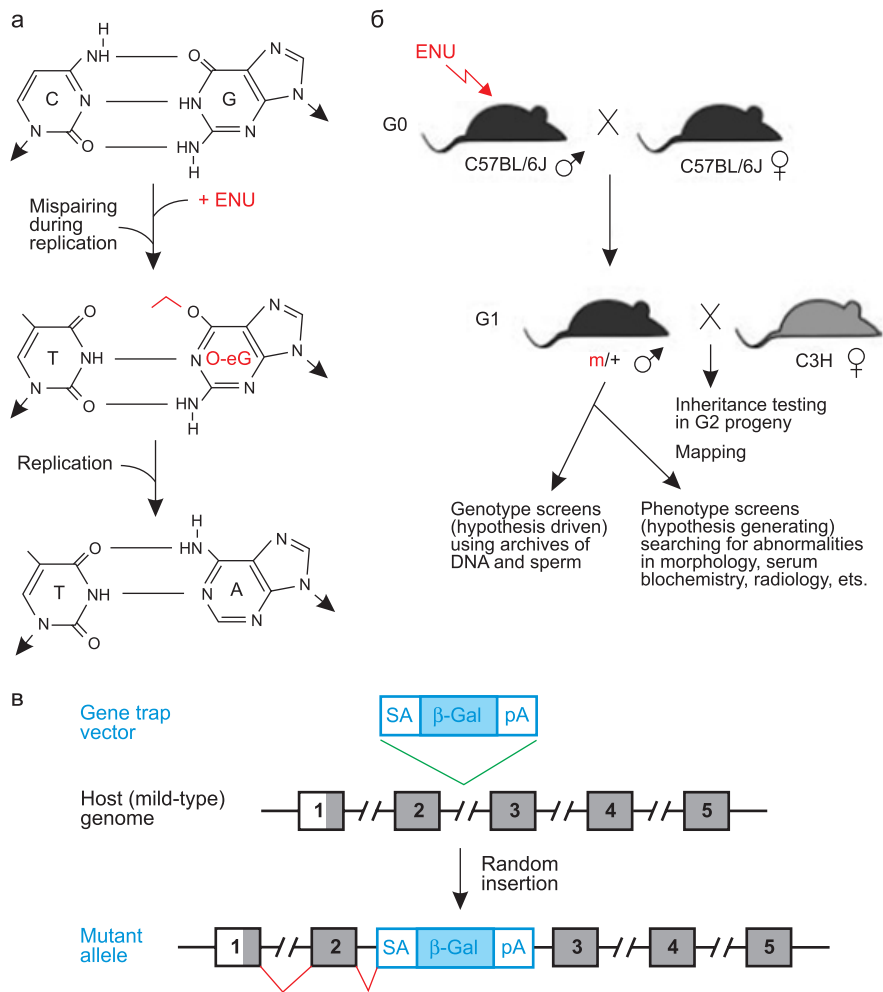


Рис. 2. Методы нецелевого мутагенеза.

а – химический мутагенез с использованием *N*-этил-*N*-нитрозомочевины (ENU). ENU как алкилирующий агент внедряет этильную группу в гуанин. Образующийся при этом O^6 -этилгуанин комплементарен не к цитозину, а к аденину. В результате происходит точечная замена, в том числе и в ДНК сперматозоидов; б – ENU-мутагеноз самцов (поколение G_0) скрещивают с самками дикого типа той же линии и получают первую генерацию (G_1) потомков. Самцов G_1 фенотируют для выявления морфофункциональных аномалий. Далее на основе скрещиваний и молекулярно-генетических методов анализа мутантных гаплотипов проводят картирование мутации. Мутантный аллель обозначен красной буквой *m*, аллель дикого типа – знаком +; в – инсерции, получаемые методом генетических ловушек (gene-trap). Вектор содержит сильный акцептор сплайсинга, репортерный ген (β -галактозидаза – β -gal) и полиадениновый тракт (pA). При сплайсинге данный вектор встраивается в геном, что приводит к инсерции в случайном положении. Закрашенные голубым боксы соответствуют кодирующим последовательностям, незакрашенные – некодирующим последовательностям (Piret, Thakker, 2011. P. 211–230).

ных генотипов мышей и крыс. Они широко используются при расшифровке механизмов генетически предетерминированных патологий, а также в качестве экспериментальных моделей патологии при изучении терапевтической эффективности новых средств профилактики и лечения болезней. Но на сегодняшний день это лишь небольшая часть от общего числа генетических линий лабораторных животных.

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ЛИНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Экспансия генно-инженерных организмов

Настоящий бум в создании новых линий животных начался благодаря разработке и развитию генно-инженерных методов. Ти-

пичным примером может служить Япония, где годовое производство мышей поддерживалось до 1992–1993 гг. на уровне 45–50 млн голов. Далее с развитием методов трансгенеза (в широком смысле) число экспериментов на мышах неуклонно возрастало, превысив к настоящему времени внушительную цифру – 200 млн голов в год. К сожалению, в России найти надежные сведения о разведении лабораторных животных различных генотипов крайне сложно, но по экспертной оценке их число не превышает 0,5–0,7 млн голов в год. Что же касается генно-инженерных методов создания модельных организмов, то в России это направление только зарождается и представлено лишь несколькими научными коллективами. Детальный анализ российской ситуации, а также высокопрофессиональное объяснение методов целевой трансформации геномов млекопитающих дается в статье О.Л. Серова (2013). Поэтому здесь можно ограничиться лишь перечислением основных этапов получения новых лабораторных организмов.

1. Инъекция в пронуклеус искусственной конструкции ДНК, инъекция транспозонов и ретровирусов, гомологичная рекомбинация.

2. Инкубация зародышей, развивающихся из генетически модифицированных зигот, и их трансплантация суррогатным матерям, либо получение генетически модифицированных линий ЭСК.

3. Микроинъекция ЭСК в эмбрионы на стадии бластоцисты и их трансплантация суррогатным матерям.

4. Получение химерного потомства и создание путем возвратных скрещиваний генетически модифицированных животных.

В итоге удается получить организмы, которые позволяют исследовать фенотипические последствия потери функции (нокаут) или, наоборот, приобретения/модификации функции целевых генов. Кроме того, внедрение генов различных флюоресцентных белков дает возможность визуализировать морфофункциональные процессы, протекающие в организме. Для ряда биомедицинских исследований генно-инженерными методами создаются животные с заменой собственных генов на гены человека.

Целевое подавление/усиление экспрессии как подход к изучению фенотипических эффектов отдельных генов

Нокаут. Сегодня редкая статья, посвященная механизмам функционирования организмов, обходится без использования нокаутных животных. Значимость этого подхода отмечена Нобелевской премией в области физиологии и медицины, присужденной в 2007 г. за открытие принципов введения специфических генных модификаций в организм мышей посредством эмбриональных стволовых клеток. Ее лауреатами стали Марио Капекки (США), Оливер Смитис и сэр Мартин Эванс (Великобритания). Основное предназначение нокаутных организмов заключается в получении прямого ответа на вопрос об участии белкового продукта конкретного гена в процессах, разворачивающихся на молекулярном, клеточном и организменном уровнях. Так, в экспериментах на мышах с нокаутом генов интерлейкинов-1 α и 1 β установлено (рис. 3), что их отсутствие снижает активацию внутриклеточных провоспалительных сигналов (Huang *et al.*, 1999); подавляет образование специфических антител в ответ на введение чужеродного антигена (Nakae *et al.*, 2001); сокращает время повышенной секреции адренкортикотропного гормона при стрессе (Horai *et al.*, 1998); уменьшает проявления синдрома болезни, вызванного инъекцией эндотоксина (Мошкин и др., 2003); повышает склонность к внутривидовой агрессии и асоциальному поведению (Tamagawa *et al.*, 2007).

Помимо строгой аргументации в поддержку внятно сформулированных гипотез, изучение нокаутных генотипов дает немало неожиданных результатов, которые либо вводят в ступор узкоориентированных исследователей, либо дают обильную пищу для пытливого ума. В качестве примера можно привести курьезный случай, произошедший в одной из лабораторий Женевского университета при изучении молекулярно-генетических механизмов работы биологических часов. Внимание профессора У. Шиблера и его коллег привлекло семейство белков PAR bZip, объединяющее 3 транскрипционных фактора. Экспрессия генов этих факторов меняется в строгом соответствии с суточным ритмом. Для выяснения их роли в

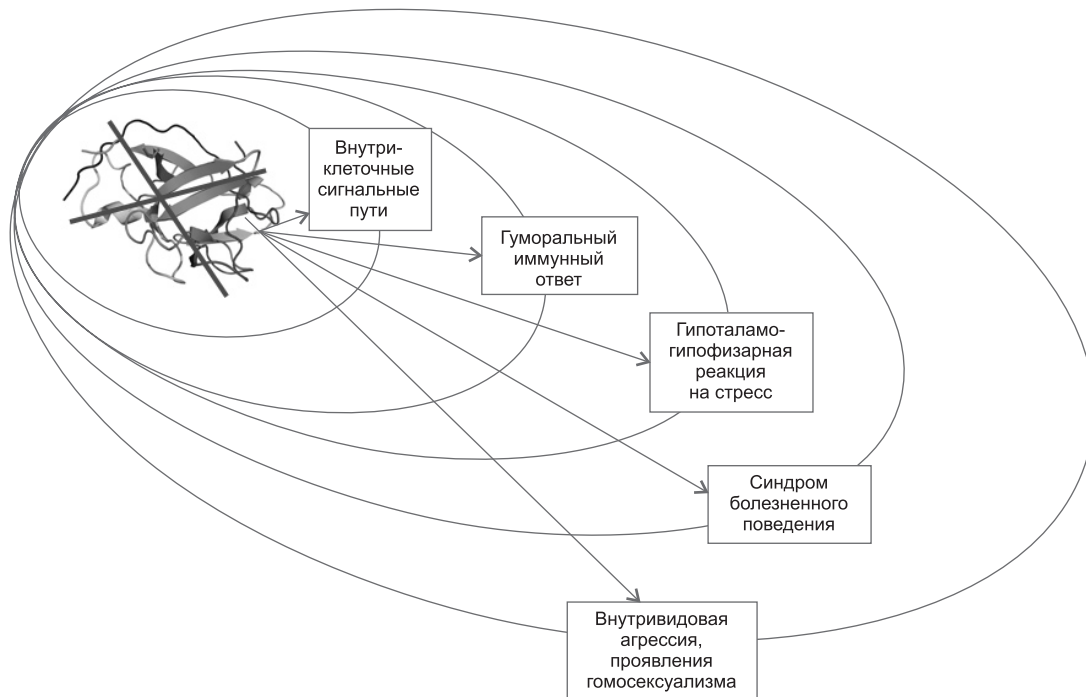


Рис. 3. Клеточные, иммунные, эндокринные, общеорганизменные и социальные эффекты, наблюдаемые у мышей с нокаутом генов важнейших провоспалительных цитокинов – интерлейкинов-1 α и 1 β .

работе биочасов исследователи использовали мышей с нокаутом соответствующих генов, по одному и в комбинации. И здесь они столкнулись с неожиданным явлением: суточный ритм не только не исчез, но дополнился отчетливым недельным циклом. Начали обсуждать биологический смысл принятого с библейских времен недельного цикла, но все разрешилось самым прозаическим образом. Недельный ритм, проявлявшийся в эпилептических припадках у нокаутных животных, совпадал с графиком уборки помещений, которую сопровождал шум пылесоса. Специальное исследование показало, что выключение транскрипционных факторов приводит к резкому росту возбудимости мышей, обусловленному дефицитом фермента, катализирующего превращение витамина B6 – кофактора ферментов, участвующих в поддержании баланса важнейших нейромедиаторов (Shibler *et al.*, 2003).

Исключительная значимость нокаутных животных в развитии функциональной геномики и в решении прикладных биомедицинских задач стимулировала формирование международных консорциумов, провозгласивших

в качестве базовой цели создание коллекций генетических линий ЭСК с нокаутами по всем мышинным генам, за исключением жизненно необходимых генов домашнего хозяйства. На момент подготовки данной статьи наиболее успешный консорциум (**International Knockout Mouse Consortium – ИКМС**), объединяющий 5 научных команд в США, Канаде и ЕС, сообщает о создании более чем 18 тыс. нокаутных линий ЭСК из 24 тыс. возможных. Иными словами, ЭКС как исходный материал для получения лабораторных животных позволяет создать линии мышей с нокаутами, число которых составляет почти 3/4 от общего числа генов в мышинном геноме. Следует отметить, что реальное число линий нокаутных мышей, созданных этим консорциумом, не превышает 14 % от количества линий ЭСК, т. е. существует большой резерв для исследований в области фенотипической аннотации генов на основе их целевого выключения.

«**Тетрациклиновый выключатель**». Важная истина, открывшаяся при изучении нокаутных животных, заключается в том, что мы недооцениваем компенсаторные возможности

организмов. Многие исследователи были разочарованы, не увидев ожидаемых фенотипических проявлений, которые, согласно начальным представлениям, были «обязаны» иметь место при выключении того или иного гена. Это явление обусловлено тем, что перманентный дефицит продуктов экспрессии конкретного гена компенсируется в ходе онтогенетического развития за счет других систем организма. Поэтому наряду с нокаутными генотипами, важно получить возможность управления экспрессией целевых генов в заданный момент времени.

Один из подходов к управлению экспрессией генов основывается на создании так называемых генетических конструкторов, в которых экспрессию гена контролирует промотор, запускаемый определенным лекарственным препаратом (drug-inducible systems – DIS). Одна из первых систем такого рода основана на использовании тетрациклина (Tet) или его производного доксициклина. Генно-инженерные конструкции, регулируемые этими веществами, получили названия Tet-off или Tet-on в зависимости от того, подавляется ли экспрессия гена удалением (off) или добавлением (on) антибиотика. Для этого под управляемый доксициклином промотор ставят небольшой (40–50 оснований) палиндром, частично комплементарный к участку гена, интересующего исследователей. При экспрессии подобной конструкции нарабатываются так называемые шпилечные РНК (small hairpin RNA – shRNA), которые подобно антисмысловым РНК ингибируют синтез целевого белка (Szulc *et al.*, 2006).

Тканеспецифический нокаут (Cre/LoxP-системы). Помимо тотального выключения современные технологии генной инженерии позволяют направленно нокаутировать гены в одних клеточных системах, не затрагивая другие. Для этого используют рекомбиназу бактериофага P1 Cre (Cyclization recombinase) и сайты LoxP (Locus of crossingover), которые присутствуют в геноме бактерий и участвуют в кроссинговере бактериальных хромосом. Обычно получение мышей с тканеспецифическим нокаутом начинают с создания двух линий животных. В геном животных первой линии внедряют ген *Cre*, активация которого контролируется тканеспецифическими транскрипционными факторами. В ЭСК мышей другой линии встраивают сайты

LoxP с двух сторон всего гена или нескольких экзонов целевого гена. При скрещивании этих линий и последующем отборе мышей, которые содержат оба гена, создаются животные с нокаутом целевого гена в клетках определенных тканей. Нарбатываемая в этих клетках *Cre* приводит, в зависимости от конструкции, к инверсии, транслокации или делеции фланкированной LoxP последовательности целевого гена, но только в тех клеточных системах, которые содержат регуляторы экспрессии гена *Cre*.

Тканеспецифический нокаут становится важным инструментом при изучении сложноорганизованных систем организма, прежде всего нейроэндокринной и иммунной, которые образованы сотнями разных клеток. В нервной системе многие типы нейронов имеют общие нейротрансмиттеры, что затрудняет фармакологический анализ их роли в физиологических и поведенческих реакциях. В этом случае привлечение *Cre/LoxP* технологии позволяет решить проблему. В частности, на ее основе было проведено нокаутирование ГАМК- $\alpha 2$ рецепторов в парвальбуминовых нейронах, что позволило детализировать вклад этих малоизученных нервных клеток в формирование эмоциональных реакций, болевой чувствительности, координации движений, способности к обучению (Leppä *et al.*, 2011).

Визуализация биологических процессов

Открытие зеленого флюоресцентного белка (green fluorescent protein – GFP) стимулировало развитие нового генно-инженерного направления – создания лабораторных животных с репортерными генами. Разные способы внедрения генов флюоресцентных белков позволяют получить организмы с цветовой меткой во всех клетках или в определенных типах клеток. Если ген флюоресцентного белка поставить под определенный промотор, то можно оптически средствами наблюдать активацию целевого гена при реализации программ развития или при формировании реакций организма на внешние стимулы, в том числе и на фармакологические средства.

Яркой иллюстрацией возможностей репортерных генов может служить их применение для картирования нервных путей в головном мозге.

Новый подход к изучению нервных связей основан на экспрессии в отдельных нейронах красного (R), зеленого (G) и голубого (B) дериватов GFP, т. е. XFP. Это достигается применением тканеспецифической Cre/LoxP технологии. Варьирование цветом флюоресцентных белков и числом встроенных генетических копий дает палитру из десятков различных цветов, что при конфокальной микроскопии позволяет описать межнейронные связи (рис. 4), варьирующие в зависимости от генотипа, стадии онтогенеза и жизненного опыта. Этот метод, получивший название «brainbow» (игра слов от rainbow – радуга), находит все более широкое применение в решении задач холологии (от греч. hodos – путь) – проблемы, актуальность которой сохраняется со времен античного созерцания структур мозга до настоящего времени.

Гуманизированные мыши

Животные, несущие функционирующие гены человека или клетки и ткани человека, образуют большую группу гуманизированных лабораторных организмов. Они используются при изучении патогенеза, в том числе таких заболеваний, к которым у лабораторных животных есть врожденная резистентность. Примером может служить вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), не поражающий мышей. Для изучения патогенетических механизмов СПИДа и поиска средств лечения в начале 1990-х годов были созданы ВИЧ-восприимчивые трансгенные мыши (Iwakura *et al.*, 1992). В последнее время все большее место при испытаниях фармакологической эффективности и токсичности новых лекарственных препаратов отводится трансгенным животным, в геноме которых собственные молекулярные мишени заменены соответствующими мишенями человека.

Еще одна область применения гуманизированных мышей связана с производством лекарств. На первый взгляд, идея использовать мышей в качестве продуцентов чего-либо полезного выглядит достаточно сомнительно. Но неоспоримым достоинством мыши является то, что она относится к наиболее освоенным объектам генной инженерии среди млекопитающих. Поэтому первые удачные работы по получению человеческих антител не от вакцинированных

людей, а от животных были выполнены на мышах. Методом трансгенеза были созданы животные, у которых мышинные гены, кодирующие легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, были заменены на соответствующие гены человека (Jakobovits *et al.*, 2007). В результате появилась возможность использовать систему иммунного распознавания у мышей для получения клонов В-лимфоцитов, вырабатывающих специфические иммуноглобулины человека. На их основе были созданы гибридомы – клеточные линии, полученные при слиянии иммунных клеток с опухолевыми. И далее по стандартной технологии были произведены моноклональные антитела, в частности антитела против интерлейкина-8. Их использование при лечении больных псориазом показало высокую эффективность. При этом ни у одного из пациентов не было выявлено аллергической реакции на эти иммуноглобулины (Davis *et al.*, 1999). О высоких темпах развития данного направления свидетельствует то обстоятельство, что в 2009 г. число статей по тематике гуманизированных антител превысило 2 тыс. в год и продолжает нарастать, достигнув 2 894 в 2012 г.

Трансгенное моделирование болезней и персонализированная медицина

Как было отмечено выше, уже к 2001 г. было выявлено свыше двух миллионов полиморфизмов, ассоциированных с предрасположенностями к болезням (LeVan *et al.*, 2001). И этот список быстро пополняется, вызывая у журналистов и политиков иллюзорные надежды на окончательное решение проблемы, сформулированной Гиппократом (IV в. до н. э.), – «лечить не болезнь, а больного». Но для разработки по-настоящему эффективных стратегий персонализированной терапии одних статистических закономерностей недостаточно. Требуется расшифровка механизмов реализации генетических программ, приводящих к заболеванию. И здесь существенная роль отводится методам генной инженерии, которые дают возможность создавать животных, в геном которых внедрены варианты генов, ассоциированные с болезнями человека.

Один из примеров успешной работы в этой области связан с изучением ревматоидного артрита в Токийском университете (Iwakura *et*

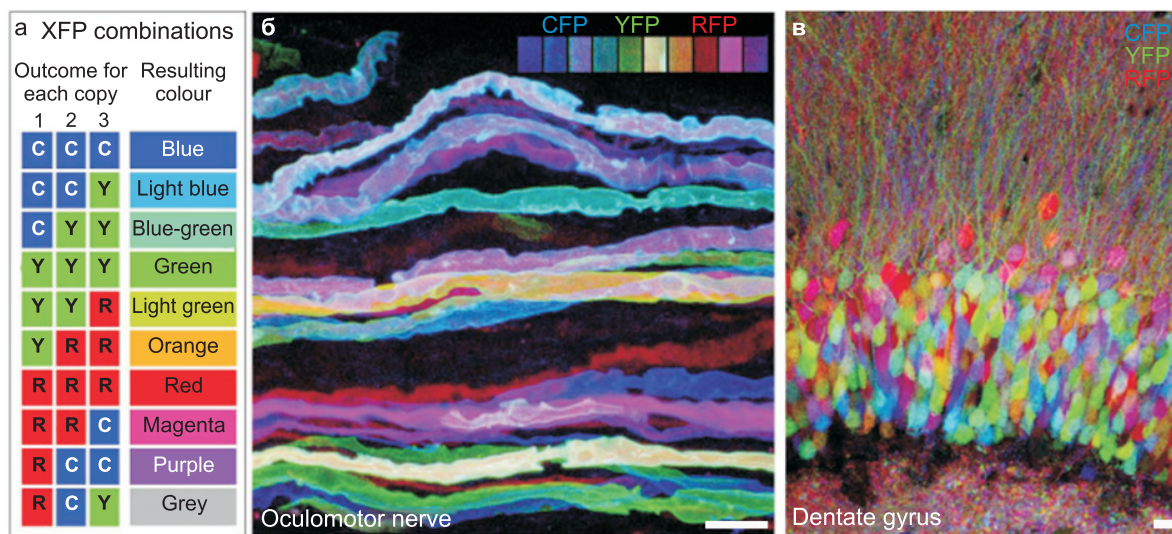


Рис. 4. Визуализация нервных путей в головном мозге мыши на основе комбинаторной экспрессии флуоресцентных белков (FP).

а – экспрессия трех различных (X) белков (XFP) в сочетании с рекомбинацией из трех трансгенных копий дает до 10 цветовых оттенков; б – аксоны глазодвигательного нерва; боксы сверху показывают окрасочные варианты разных аксонов; в – аксоны, иннервирующие зубчатую извилину (Livet *et al.*, 2007. P. 56–63).

al., 2008). В Японии среди страдающих ревматоидным артритом часто встречаются носители ретровируса HTLV-I. Для того чтобы понять его роль в патогенезе заболевания, ретровирус был внедрен в геном мышей, у которых с определенного возраста появляются типичные симптомы данного заболевания. Для сравнительного анализа была создана еще одна линия мышей, у которых предрасположенность к артриту была вызвана выключением гена, отвечающего за выработку контррегулятора воспалительных процессов – рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL-1 Ra). Далее у каждой из линий были поэтапно нокаутированы ключевые гены воспалительных реакций, которые определяют развитие болезни. Полученные генно-инженерными методами линии мышей позволили в результате выявить наиболее адекватные молекулярные мишени для медикаментозного воздействия. Они оказались разными для артрита, обусловленного разными причинами. Стало понятно, почему лекарственные препараты, помогающие большинству европейцев, оказываются бесполезными для большей части японских больных. Этот пример очень важен для многонациональной Российской Федерации, поскольку показывает роль этнических

особенностей и в формировании патологий, и в развитии персонализированной медицины.

Таким образом, генотипы лабораторных мышей и крыс выступают сразу в трех ипостасях:

1. Лабораторные животные с контролируемой экспрессией генов (нокаут/трансгенез и т. д.) являются **объектами исследований**, направленных на фенотипическую аннотацию геномов, изучение механизмов генетически обусловленных заболеваний и поиск новых средств профилактики и лечения болезней;

2. Животные с внедренными в геном репортерными конструкциями, позволяющими визуализировать экспрессию целевых генов, играют роль эффективных **инструментов** при изучении различных морфофункциональных процессов;

3. Животных, у которых собственные гены иммуноглобулинов заменены генами человека, можно рассматривать как неотъемлемый **элемент биотехнологического производства**, прежде всего антител медицинского назначения.

Весомый вклад лабораторных млекопитающих в решение задач фундаментальной биологии, физиологии, биомедицины, биотехнологии и биобезопасности порождает спрос на все

новые и новые генетические линии животных. Следует подчеркнуть, что, несмотря на этически и экономически оправданное стремление к все более широкому использованию компьютерного моделирования, субклеточных и клеточных технологий, отказаться от экспериментов на многоклеточных организмах вряд ли удастся, по крайней мере, в 21-м веке. Организм млекопитающего чрезвычайно сложен, и надежно прогнозировать ответные реакции на те или иные воздействия без экспериментальной проверки *in vivo* все еще невозможно. Данное положение можно подкрепить сотнями примеров. Один из них получен нами при исследовании взаимодействия биологических объектов с наночастицами. В этой области проводится множество экспериментов на субклеточных моделях и на культурах клеток, но не один из них не смог бы предсказать возможность поступления наноразмерных аэрозолей с поверхности обонятельного эпителия в головной мозг, вплоть до гипофиза (рис. 5).

ЦЕНТРЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Международный опыт

Значительный спрос в сочетании с эффективно развиваемым арсеналом генетико-селекционных и генно-инженерных методов получения животных с заданными генетическими характеристиками стимулировали создание специализированных центров генетических ресурсов, обеспечивающих создание, накопление, хранение и изучение генетических линий лабораторных животных. Во многих странах этим центрам придан национальный статус. Их основу составляют виварии, в которых животных, свободных от видоспецифических патогенов (SPF – Specific Pathogen Free), содержат в стерильных и строго стандартизированных по корму, воде и микроклимату условиях. Достигаемое таким образом высокое качество

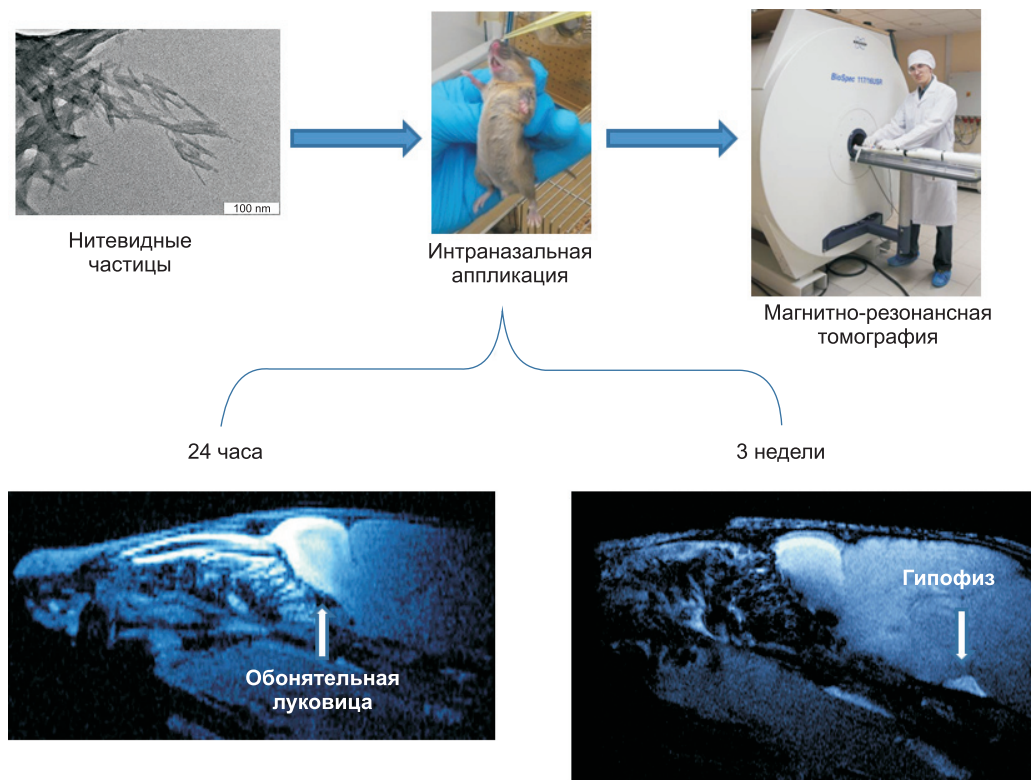


Рис. 5. Поступление наночастиц гидроксида марганца (MnO) с поверхности обонятельного эпителия в головной мозг. Эксперимент, свидетельствующий о неизбежности исследований *in vivo* при выявлении органов-мишеней для вдыхаемых наноразмерных аэрозолей (по результатам совместных исследований ИЦиГ СО РАН, МТЦ СО РАН, ИК СО РАН).

экспериментальных объектов крайне важно для получения воспроизводимых результатов при проведении исследований в разных лабораториях. Значимость стандартизации существенно возрастает при решении задач постгеномной биологии, поскольку для фенотипирования многочисленных генотипов, полученных методами генной инженерии, приходится создавать консорциумы, включающие в себя лаборатории разных стран. Кроме того, сохранение SPF-статуса является единственно возможным условием для выживания и размножения иммунодефицитных генотипов.

Но поддержание в живом разведении даже имеющихся в настоящее время генетических линий является чрезвычайно затратным. Поэтому все современные центры генетических ресурсов имеют в своем составе криобанки и лаборатории репродуктивных технологий, обеспечивающие полный цикл работ: получение эмбрионов, находящихся на ранних стадиях развития (от 2 до 8 клеток), их замораживание, хранение при температуре жидкого азота, размораживание и трансплантацию суррогатным матерям для получения потомства и последующего разведения.

На международном уровне деятельность ресурсных центров координируют такие организации, как Федерация международных мышшиных ресурсов (FIMRe) и Азиатская ассоциация ресурсов мутантных мышей (АММРА). Вместе они объединяют более 25 центров в различных странах. Сегодня только в Джексонской лаборатории (Бар Харбор, США), в самом крупном ресурсном центре, содержится более 10 тыс. генетических линий мышей, в том числе в виде замороженных эмбрионов или половых клеток. Вторую позицию в мировом списке занимает Центр биоресурсов общества РИКЕН (Тсукуба, Япония), коллекция которого превышает 7 000 генотипов мышей. Некоторые центры, например Европейский архив мутантных мышей – European Mouse Mutant Archive (EMMA), основываются на нескольких криохранилищах и вивариях, расположенных в разных университетах Европы с общим координирующим центром в Мюнхене (Германия). В странах Юго-Восточной Азии ресурсные центры начали создавать позже, но к настоящему времени Азиатская ассоциация ресурсов мутантных мышей

объединяет более 10 центров, расположенных в Японии, Китае, Южной Корее, Сингапуре и Австралии.

Важным условием успешной работы центров генетических ресурсов является освоение современных технологий обмена лабораторными животными, которые не ограничиваются пересылкой самих организмов (рис. 6).

Ресурсы лабораторных животных в России

В России имеется несколько питомников лабораторных животных, которые по международной классификации относятся к малым (до 7 тыс. клеток для содержания животных) и средним вивариям. Но ни один из них не отвечает требованиям к структурно-функциональной организации и технологическому наполнению, которые необходимы для полноценной работы центра генетических ресурсов лабораторных животных. Сегодня только Центр генетических ресурсов, сформированный на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН, обладает полным набором технологических компетенций (рис. 7).

В соответствии с мировыми трендами этот центр имеет в своем составе следующие научные и технологические подразделения:

- сектор племенного разведения, обеспечивающий поддержание и разведение генетических линий лабораторных животных SPF-статуса;
- криобанк для хранения генетических коллекций лабораторных животных в виде замороженных эмбрионов;
- лаборатория репродуктивных технологий для создания племенных ядер генетических линий животных путем имплантации поступающих из криобанка эмбрионов суррогатным матерям с их последующим разведением в SPF-условиях;
- блок редеривации для перевода конвенциональных животных в SPF-статус;
- сектор трансгенеза – для создания новых генетических вариантов лабораторных животных, а также получения генетических линий из импортированных ЭСК;
- сибирская «мышшиная клиника», ориентированная на использование средств высокотехнологического фенотипирования для биохими-

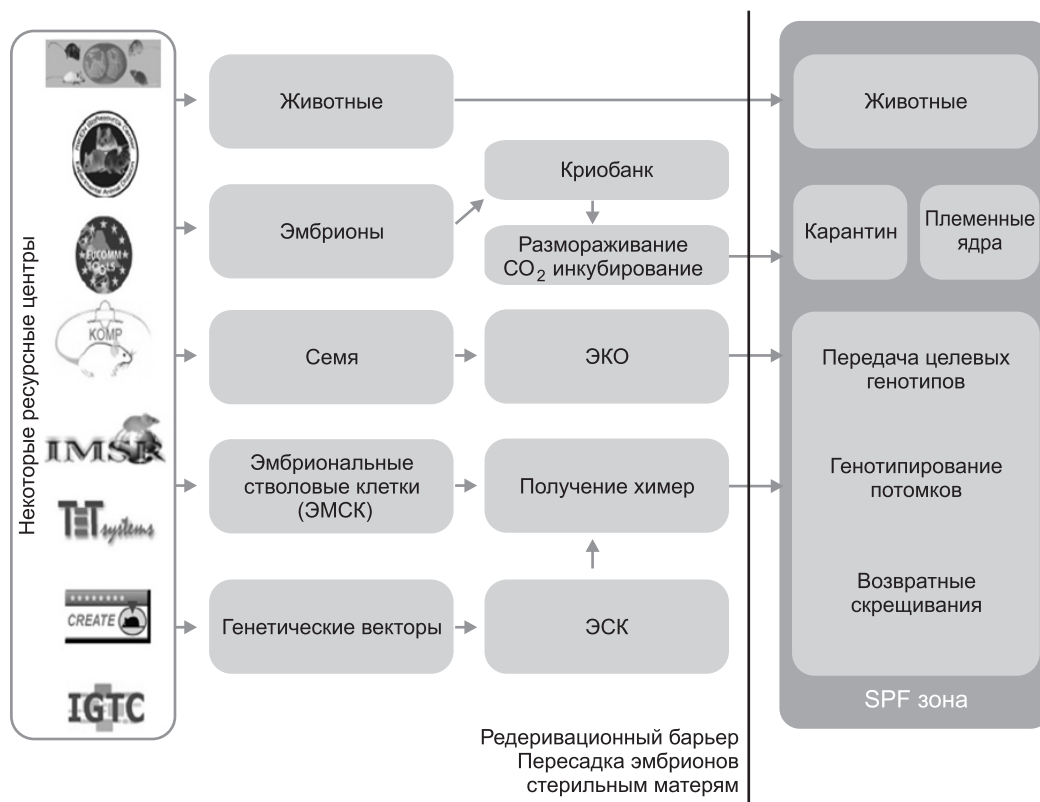


Рис. 6. Основные способы обмена генетическими линиями лабораторных животных.

Слева показаны эмблемы ведущих депозитариев генотипов мышей.

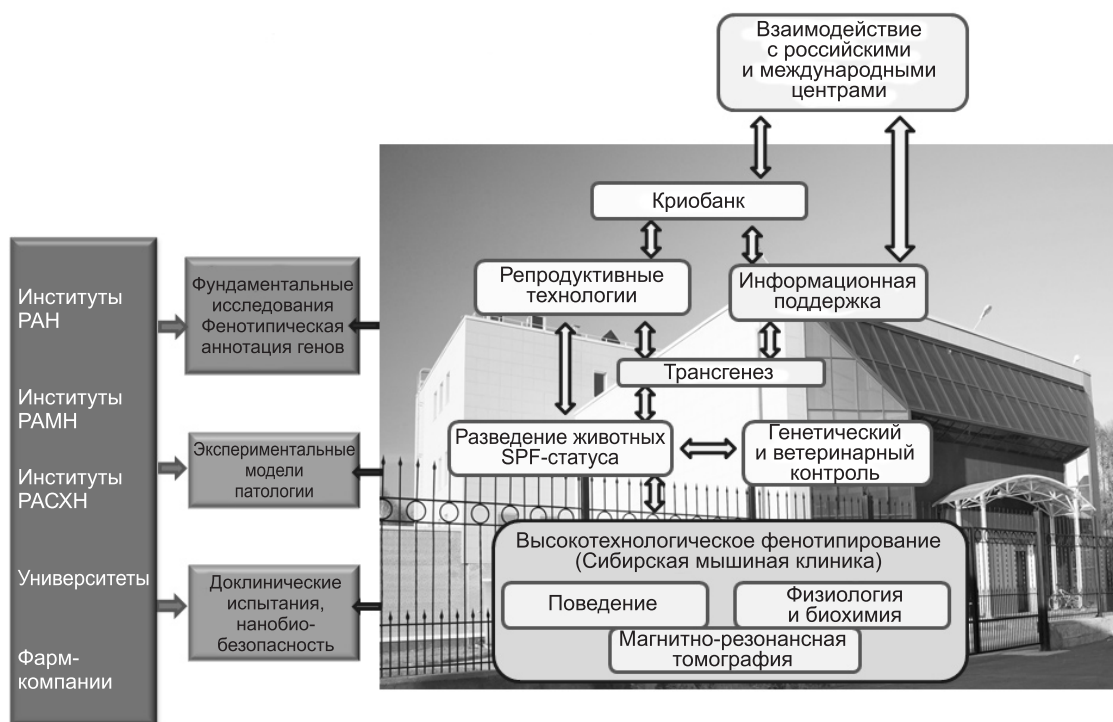


Рис. 7. Структурно-функциональная организация, основные направления деятельности и потенциальные пользователи Центра генетических ресурсов, формирующегося на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН.

ческих, морфологических, физиологических и этологических исследований;

– межинститутский сектор томографии (совместно с МТЦ СО РАН) для прижизненного исследования лабораторных животных на основе уникального магнитно-резонансного томографа BioSpec 117/16 (Bruker);

– блоки для создания экспериментальных моделей патологии хирургическими методами и экспозицией в неблагоприятных условиях, в частности в среде с нанозагрязителями;

– лаборатория генотипирования;

– служба обеспечения качества лабораторных животных, включая внутренний контроль основных патогенов мышей и крыс;

– служба информационной поддержки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расшифровка геномов человека и близких к нему видов животных, состоявшаяся на «переломе» тысячелетий, революционизировала весь комплекс экспериментальных исследований на основе генетического разнообразия лабораторных млекопитающих. Открывшиеся возможности функциональной аннотации отдельных генов и их комбинаций, экспериментального моделирования генетически обусловленных болезней человека, использования трансгенных организмов для производства белков человека как основы новых лекарственных препаратов вывели биоразнообразие лабораторных животных в разряд важнейших ресурсов постгеномной биологии. Значимость этого ресурса наглядно иллюстрирует рост числа научных статей, полученных при изучении трансгенных мышей и крыс. Возможности изучения животных с заданным по запросу экспериментатора генотипом сформировали новый вектор биологических исследований, который диктует необходимость интеграции интеллектуальных усилий ученых разного профиля, а также объединения финансовых вложений разных стран мира. В редакционной статье «Мышиная меганаука» (Mouse megascience, 2010) масштабы исследований генетического разнообразия лабораторных животных, в том числе и моделей патологий человека, сопоставляются с таковыми в мегапроекте «Большой андронный коллайдер». Редакция журнала призывает био-

логов объединить усилия в просветительском давлении на политиков для перенаправления финансовых потоков в область такой социально значимой научной активности, как изучение на основе биоразнообразия лабораторных животных фундаментальных механизмов здоровья и болезней человека.

Для полноценного развития этого динамичного научно-практического направления требуются не только создание адекватных мировым требованиям инфраструктурных объектов, но и подготовка специалистов для работы в центрах генетических ресурсов. Профессиональное обучение студентов для работы с генетическим разнообразием лабораторных животных требует новой междисциплинарной интеграции, которая должна складываться из ориентированного преподавания следующих дисциплин:

– генетика и селекция, включая племенную работу;

– технические средства и технологии SPF-содержания;

– генно-инженерные технологии;

– морфология, физиология и этология лабораторных животных;

– криоархивирование и репродуктивные технологии;

– симптоматическая и молекулярно-генетическая диагностика лабораторных животных;

– информационное обеспечение работы ресурсных центров;

– международные правила управления генетическими ресурсами;

– принципы биоэтики.

Следует отметить, что потребность в таких специалистах будет неуклонно расти, в том числе и в связи с реализацией национальных программ и стратегий развития биомедицины, фармакологии и других форм социально-экономической активности, направленной на обеспечение здоровья нации через сохранение и развитие здоровья отдельных граждан.

ЛИТЕРАТУРА

- Маркель А.Л. Физиологическая генетика // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2014. Т. 18. № 1. С. 112–124.
- Мошкин М.П., Герлинская Л.А., Евсиков В.И. Иммунная система и реализация поведенческих стратегий размножения при паразитарных прессах // Журн. общ. биологии. 2003. Т. 64. Вып. 1. С. 23–44.

- Серов О.Л. Трансгенные животные // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1055–1064.
- Abbott A. Geneticists prepare for deluge of mutant mice // Nature. 2004. V. 541. P. 432.
- Davis C.G., Gallo M.L., Corvalan J.R. Transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer // Cancer Metastasis Rev. 1999. V. 18. No. 4. P. 421–425.
- Horai R., Asano M., Sudo K. *et al.* Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion // J. Exp. Med. 1998. V. 187. No. 9. P. 1463–1475.
- Huang J., Wang M.-D., Lenz S. *et al.* IL-12 administered during chlamydia psittaci lung infection in mice confers immediate and long-term protection and reduces macrophage inflammatory protein-2 level and neutrophil infiltration in lung tissue // J. Immunol. 1999. V. 162. P. 2217–2226.
- International Mouse Knockout Consortium: A mouse for all reason / Eds F.S. Collins, J. Rossant, W. Wurst // Cell. 2007. V. 128. No. 1. P. 9–13.
- Iwakura Y., Nakae S., Saijo S., Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens // Immunol. Rev. 2008 V. 226. P. 57–79.
- Iwakura Y., Shioda T., Tosu M. *et al.* The induction of cataracts by HIV-1 in transgenic mice // AIDS. 1992. V. 6. No. 10. P. 1069–1075.
- Jakobovits A., Amado R.G., Yang X. *et al.* From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. No. 10. P. 1134–1143.
- Leppä E., Linden A.M., Vekovischeva O.Y. *et al.* Removal of GABA(A) receptor $\gamma 2$ subunits from parvalbumin neurons causes wide-ranging behavioral alterations // PLoS One. 2011. V. 6. No. 9. e24159.
- LeVan T.D., Bloom J.W., Bailey T.J. *et al.* A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity // J. Immunol. 2001. V. 167. No. 10. P. 5838–5844.
- Livet J., Weissman T.A., Kang H. *et al.* Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system // Nature. 2007. V. 450. P. 56–63.
- Mouse megascience // Nature. 2010. V. 465. No. 7298. P. 526.
- Nakae S., Asano M., Horai R., Iwakura Y. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production // Immunology. 2001. V. 104. No. 4. P. 402–409.
- Piret S.E., Thakker R.V. Mouse models for inherited endocrine and metabolic disorders // J. Endocrinol. 2011. V. 211. P. 211–230.
- Russell W.L., Hunsicker P.R., Raymer G.D. *et al.* Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. No. 11. P. 3589–3591.
- Schibler U., Ripperger J., Brown S.A. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food // J. Biol. Rhythms. 2003. V. 18. No. 3. P. 250–260.
- Szule J., Wiznerowicz M., Sauvain M.O. *et al.* A versatile tool for conditional gene expression and knockdown // Nat. Methods. 2006. V. 3. No. 2. P. 109–116.
- Tamagawa A., Kolosova I., Endo Yu. *et al.* Interleukin-1 deficiency and aggressiveness in male mice // Psychoneuroendocrinol Res. Trends. N.Y.: Nova Sci. Publishers, 2007. P. 1–17.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Мошкин М.П. Постгеномная эра, или Зачем нужны 300 тысяч линий мышей // Наука из первых рук. 2008. № 4. С. 16–53.
- Колчанов Н.А., Мошкин М.П., Сагдеев Р.З., Шумный В.К. Сибирский центр генетических ресурсов – три года спустя // Наука из первых рук. 2011. № 2. С. 76–89.
- Beckers J., Wurst W., de Angelis M.H. Towards better mouse models: enhanced genotypes, systemic phenotyping and envirotype modeling // Nat. Rev. Genet. 2009. V. 10. P. 371–380.