
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 575:577.1:57.089.3

**БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ:
СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ЗА РУБЕЖОМ И В РОССИИ**

Рябых В.П.¹, Эрнст Л.К.²

¹Институт физиологии, биохимии и питания с.-х. животных, Боровск, Россия

²Российская академия сельскохозяйственных наук, Москва, Россия

К настоящему времени в мире пока нет универсального определения понятия «биотехнология». Несмотря на это, все исследователи сходятся в едином мнении, что **биотехнология** - это использование биологических процессов **в производстве** полезных продуктов. Само по себе использование биологических процессов для удовлетворения потребностей человека не является чем-то новым. С целью получения еды и одежды люди начали выращивать сельскохозяйственные культуры и держать скот уже 10000 лет назад. Кроме того, уже на протяжении 6000 лет люди используют микробиологические процессы для производства хлеба, сыра и молочнокислых продуктов. Однако только в последние годы появилось такое понятие как «биотехнология». Произошло это потому, что в 60-70-е годы XX века развитие биологии достигло такого уровня, который позволил человеку использовать для достижения своих целей **не только целые организмы**, но и их мельчайшие компоненты – биологические молекулы. На основе этих знаний и возникли новые биотехнологии. Основным их отличием является то, что получение необходимой продукции основывается на использовании таких одноклеточных или многоклеточных организмов, наследственное вещество или ход процесса наследования которых на клеточном уровне изменены в целях достижения практической пользы.

В соответствии с этим к биотехнологиям не относятся традиционные технологии, в которых живые организмы используются в их естественном состоянии, т.е. без целенаправленного изменения их генетической программы. Так, например, не считаются биотехнологиями традиционные технологии сыроварения, пивоварения, производства молочнокислых продуктов. В животноводстве к биотехнологиям не относят искусственное осеменение, традиционные методы разведения и селекции, повышение продуктивности животных за счёт изменения рационов кормления или применения различных кормовых добавок и т.п.

В животноводстве к биотехнологиям во всём мире относят те технологии, которые базируются на получении и использовании генетически изменённых организмов или на генетическом манипулировании с эмбрионами. В связи с этим следует обратить внимание на появившийся в последнее время термин «ДНК-технологии», пользуясь которым в России под понятие «биотехнология» необоснованно включаются исследования, направленные просто на анализ ДНК в организме животных. Такие исследования во всём мире относят к специальности «генетика».

Одним из основных факторов, необходимых для увеличения производства высококачественных продуктов животноводства, наряду с улучшением кормовой базы, является повышение генетического потенциала сельскохозяйственных животных для обеспечения более эффективного использования кормов и резкого по-

вышения продуктивности. Однако для повышения генетического потенциала животных методами классической селекции требуется не одно десятилетие.

Успехи, достигнутые в последние годы в области эмбриоинженерии и генетической инженерии, предоставляют исследователям новые возможности для генетического улучшения животных путем прямого переноса дополнительных генов в их геном. Разработка эффективной технологии переноса генов открывает огромные перспективы для генетического совершенствования животных, с помощью которой за одно поколение жизни животных можно будет достичь большего генетического совершенствования, чем методами классической селекции за десятилетия.

Уже первые и, вероятно, не самые удачные варианты полученных трансгенных животных дают основание полагать, что трансгеноз может оказать неоценимое влияние на ускорение темпов селекционного процесса. Эксперименты, проведенные на мышах, показали, что увеличение интенсивности роста мышей в 2 раза методами классической селекции было достигнуто только через 50 поколений (Von Butler, Pirchner, 1985). Тогда как для получения линии трансгенных мышей, гомозиготных по гену соматотропного гормона (СТГ) крысы, в 2 раза превышающих по интенсивности роста нетрансгенных контрольных животных, потребовалось 4-5 поколений (Palmiter, Norstedt, 1983), т. е. один и тот же конечный результат был достигнут методами трансгеноза через 14 месяцев, а методами классической селекции через 150 месяцев.

Не менее впечатляющие результаты получены на трансгенных свиньях по снижению толщины жира на спине. Теория и практика селекции показывают, что при средней толщине шпика у свиней в конце откорма в пределах 24 мм, снижение этого показателя в результате классических селекционных программ, основанных на принципах искусственного осеменения, составляет в лучших вариантах около 2%, т. е. 0,48 мм в год, тогда как у свиней аналогичной массы тела, трансгенных по генам соматотропина человека или крупного рогатого скота, толщина шпика составила 7,0 и 7,9 мм, соответственно. Таким образом, за одно поколение жизни свиней технология трансгеноза позволила получить селекционный эффект, на который методами классической селекции при благоприятном стечении обстоятельств потребовалось бы свыше 30 лет (Pursel et al., 1989).

Приведенные факты показывают, что возможности технологии трансгеноза для ускорения селекционного процесса в животноводстве могут оказаться очень эффективными. Потенциальные преимущества биоинженерных технологий, основанных на прямом переносе дополнительных генов в геном животных с целью их генетического совершенствования животных могут состоять в следующем:

- возможности получения селекционного эффекта по отдельным признакам в несколько раз быстрее, чем при обычной селекции;
- возможности создания генетических вариантов, которые ранее не существовали у животных данного вида (продукция лекарственных веществ с молоком), или достигать изменения признаков, которые до последнего времени не поддавались селекции (устойчивость к инфекциям);
- возможности внедрения определенного гена в популяцию, не манипулируя, как при естественном скрещивании, множеством неизвестных и часто нежелательных генов, а вводя в геном животного отдельный ген или группу генов, определяющих конкретный признак.

До настоящего времени основным способом введения чужеродных генов в геном животных является метод микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот. В связи с этим технология получения трансгенных животных, основанная на микроинъекционном методе, включает в себя этапы двух видов: генно-инженерные и физиолого-эмбриологические (рис. 1).

В настоящее время исследования по получению трансгенных сельскохозяйственных животных для ускорения селекционного процесса ведутся в следующих направлениях:

- повышение продуктивности животных и улучшение качества продукции;
- повышение устойчивости сельскохозяйственных животных к инфекционным заболеваниям;
- получение трансгенных животных, продуцирующих лекарственные биологически активные вещества с молоком;
- повышение качества продукции животных (молока, шерсти и др.);
- получение трансгенных животных доноров органов и тканей для ксенотрансплантации.

Повышение продуктивности и улучшение качества продукции животных путем интеграции в их геном дополнительных генов соматотропного каскада (СТГ, РГ-СТГ, соматомединов). Это было первое направление, которое послужило основой технологии трансгеноза. Первая трансгенная мышь, которая по интенсивности роста в два раза превышала своих нетрансгенных собратьев, была получена в 1981 году путём введения в мышиную зиготу гена СТГ крысы (Palmiter et al., 1982). В последующие годы были предприняты многочисленные попытки воспроизвести на сельскохозяйственных животных результаты, полученные в экспериментах на мышах, на основе использования многочисленных генных конструкций, включающих гены соматотропина животных различных видов. Позднее, в 1985 году сразу двум группам исследователей (Hammer et al., 1985; Brem et al., 1985) удалось получить трансгенных свиней с интегрированным геном СТГ крупного рогатого скота или свиньи. Однако оказалось, что свиньи, трансгенные по СТГ, имели высокое содержание в крови СТГ, но росли не так интенсивно как мыши.

Первые исследования, проведенные на свиньях, трансгенных по гену СТГ крупного рогатого скота, показали, что при значительной экспрессии трансгена интенсивность роста трансгенных свиней существенно не увеличивалась. Но во всех этих экспериментах было отмечено, что под влиянием чужеродного гормона роста у свиней происходят изменения метаболических процессов, приводящих к уменьшению толщины жира на спине и увеличению мясности туши. Однако, наряду с отмеченными положительными изменениями в организме трансгенных свиней, экспрессирующих высокие уровни СТГ человека или крупного рогатого скота, очень часто наблюдались значительные нарушения здоровья (Pursel et al., 1989).

Основываясь на фактах об отрицательном влиянии высокого уровня СТГ на организм свиней, были предприняты попытки создать умеренный уровень гормона роста за счет интеграции в их геном гена рилизинг-фактора соматотропного гормона (РФ-СТГ). Предполагалось, что повышение уровня РФ-СТГ в организме трансгенных свиней увеличит секрецию эндогенного СТГ *только* в гипофизе, но не в других органах, что позволит устранить нежелательные последствия, связанные с чрезмерно высоким бесконтрольным уровнем СТГ в организме животных. Однако

свиньи, трансгенные по РФ-СТГ, не отличались по интенсивности роста от контрольных животных (Pursel et al., 1989). Концентрация СТГ в крови у этих свиней находилась в пределах 11-16 нг/мл, несмотря на то, что концентрация РФ-СТГ в их крови была в 11-19 раз выше, чем у контрольных животных (Pursel et al., 1990).

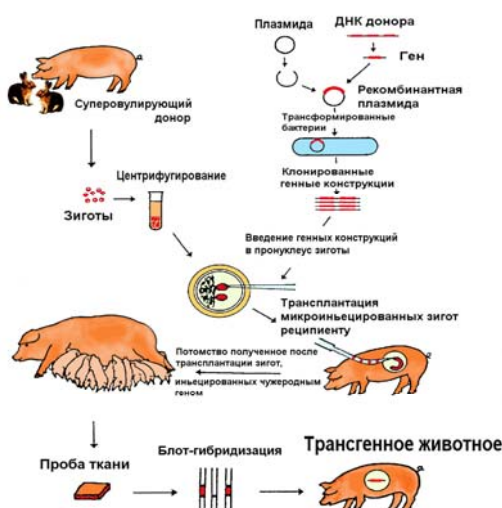


Рис. 1. Принципиальная схема технологии получения трансгенных животных

Значительные различия в интенсивности роста между трансгенными мышами и свиньями авторы пытаются объяснить тем, что в использованных для переноса генов линиях мышей не велась предварительная селекция на интенсивность роста, тогда как большинство используемых пород свиней происходили из популяций, в которых уже в течение десятилетий велась селекция на повышение продуктивности (Pursel et al., 1990; Brem et al., 1990). Приведенная выше гипотеза о различиях в интенсивности роста мышей и свиней под действием СТГ наводит на мысль о поиске более сложных путей регуляции роста животных, которые позволили бы сделать возможным скачок на более высокое ростовое плато.

После всестороннего изучения физиолого-биохимических процессов, происходящих в организме свиней, трансгенных по генам СТГ или РФ-СТГ, стало ясно, что только совместными усилиями молекулярных генетиков, физиологов и биохимиков может быть решен вопрос о выборе генных конструкций (структурных генов и промоторов) для получения полноценных трансгенных животных с повышенной интенсивностью роста.

Что делается в настоящее время за рубежом и в России в этом направлении?

За рубежом после получения трансгенных животных с генами СТГ и РФ-СТГ велись работы по получению трансгенных животных с геном двойной обмускульности, но в последнее время работы в этом направлении несколько замедлились. Причин, по-видимому, несколько. Во-первых, полученный трансгенный про-

дукт сложно коммерциализовать. Во-вторых, проявляется недостаток знаний в области *генетической биохимии* о процессах роста животных. До настоящего времени имеется мало информации о том, какие гены ответственны за рост животных кроме генов соматотропинового каскада. Биотехнологам не ясно, какие генно-инженерные конструкции необходимо использовать для получения желательных фенотипических эффектов. Это большой пласт исследований, который должны поднимать физиологи и биохимики.

В России в 90-х годах были получены трансгенные кролики с интегрированным геном СТГ (ВИЖ) и изучены физиолого-биохимические особенности их развития. Проведены всесторонние исследования трансгенных свиней с интегрированным геном РФ-СТГ человека под металлотеиноиновым промотором (ВИЖ, ВНИИФБиП, ВНИИГРЖ, СКНИИЖ). На основании результатов физиолого-биохимических и генетических исследований свиней, трансгенных по РФ-СТГ, в настоящее время сотрудниками ВИЖ и ВНИИФБиП ведутся совместные работы по получению трансгенных свиней с интеграцией двух генов соматотропинового каскада – РФ-СТГ и инсулиноподобного фактора роста I, который является конечным звеном соматотропинового каскада. Предполагается, что такое сочетание генов позволит получить определённый желательный фенотипический эффект повышения продуктивности (Рябых и др., 1995).

Повышение устойчивости сельскохозяйственных животных к инфекционным заболеваниям. Важность и сложность этого направления обусловлены тем, что методами обычной селекции до сих пор не достигнуто сколько-нибудь значимых успехов в повышении устойчивости сельскохозяйственных животных к инфекциям вирусной природы, против которых трудно или почти невозможно добиться соответствующей вакцинации. Расчёты показывают, что расходы, связанные с заболеваемостью сельскохозяйственных животных, составляют зачастую более 20% стоимости продукции. Поэтому наряду с необходимыми профилактическими мероприятиями важное значение имеет селекция животных на устойчивость к инфекционным заболеваниям.

Предполагается, что повышения устойчивости сельскохозяйственных животных к инфекционным заболеваниям можно добиться за счет введения в их геном:

- антисмысловых РНК, комплементарных функционально важным участкам мРНК вируса;
- рибозимов (РНК, способных ингибировать отдельные этапы жизненного цикла вирусов);
- генов, ответственных за синтез факторов, обеспечивающих устойчивость животных к различным вирусным инфекциям (*Мх*-ген, гены интерферонов, иммуноглобулинов и т. д.);
- генетической иммунизацией.

Резистентность к ряду заболеваний является полигенным признаком, но имеются механизмы резистентности, которые контролируются единичными генами. Примером резистентности, обусловленной экспрессией одного гена, является устойчивость к вирусу гриппа А некоторых линий мышей, несущих в своём геноме *Мх*-ген (Lindenmann, 1964). Этот ген был выделен и использован в рамках программ по трансгенезу. Были получены трансгенные свиньи, у которых была отмечена экспрессия *Мх*-гена на уровне синтеза РНК (Muller et al., 1991). В последнее

время для повышения резистентности к вирусным заболеваниям разрабатывается технология так называемой «внутриклеточной иммунизации», которая основывается на интеграции в геном животных антигенных частей вирусных протеинов, умеренная экспрессия которых вызывает наработку в организме животного этих антигенов, в результате чего достигается иммунизация животного к этому вирусу. У мышей, кроликов и свиней было показано, что вследствие экспрессии трансгена может быть достигнут повышенный титр сывороточных антител (Weidle et al., 1991).

Многообещающим методом защиты от вирусных инфекций является получение трансгенных животных, содержащих антисмысловой ген, направленный против определенных вирусов. Экспрессия антисмысловой РНК (асРНК) в клетках приводит к ее последующей гибридизации со смысловой РНК вируса и, следовательно, к ингибированию репликации вирусного генома. На основе использования антисмысловой РНК получены трансгенные кролики, которые экспрессировали асРНК против аденовируса (Ernst et al., 1991). На культуре клеток было показано, что клеточные линии, содержащие трансгенную асРНК, имели на 90-98% более высокую резистентность против Ad5 по сравнению с нормальными клеточными линиями.

Повышение устойчивости животных к инфекционным болезням путём интеграции в их геном дополнительных генов представляет большой интерес, однако еще требуется проведение фундаментальных исследований, прежде чем результаты этого направления будут успешно использоваться в практике. Как за рубежом, так и в России прошла первая волна исследований в этом направлении и пока наблюдается некоторое затишье. Причины, по-видимому, те же, что и при получении животных с повышенной продуктивностью – сложность коммерциализации полученного продукта и недостаточность знаний о молекулярно-биологических механизмах противoinфекционных процессов в каждом отдельном случае.

Получение трансгенных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества лекарственного назначения, считается в настоящее время одним из потенциально наиболее быстро окупаемых направлений трансгенной технологии, разработке которого уделяется наибольшее внимание. Генно-инженерные лекарственные препараты, появившиеся на рынке в последнее десятилетие, представляют собой естественные природные биорегуляторы и биологически активные вещества, синтез которых для медицинских целей вне живого организма невозможен или весьма затруднителен. Препараты (интерлейкины и их ингибиторы, колониестимулирующие факторы и факторы роста, ангиогенин, тканевый активатор плазминогена, вакцины и др.) не имеют аналогов на рынке, обладают широким спектром биологических свойств или широкими возможностями применения и имеют большой потенциальный рынок. Из данных, приведенных в табл. 1, становится понятно почему центр тяжести исследований по получению трансгенных животных переместился в этом направлении – полученный продукт можно легко коммерциализовать.

Таблица 1. Ежегодная потребность США в некоторых биологически активных веществах фармакологического назначения и их стоимость (Wall et al., 1997)

Показатели	Биологически активные вещества					
	F-VIII	F-IX	протеин-С	анти-тромбин	фибриноген	альбумин
Необходимое количество	0,3 кг	4 кг	10 кг	21 кг	150 кг	315 т
Существующая цена за 1 г (\$)	2.900.000	40.000	10.000	7.000	1.000	3,6
Объем рынка (млн. \$)	882	160	100	150	150	1.120

В настоящее время получение биологически активных веществ (БАВ) фармакологического назначения на основе трансгенных технологий ведётся тремя основными способами.

С использованием бактерий. Этот путь может быть использован только для получения небольшого числа белков, т.к. бактерии не способны осуществлять сложные посттрансляционные модификации синтезируемых полипептидов (гликозилирование, β -гидроксилирование, γ -карбоксилирование и др.), которые в совокупности и обеспечивают функциональную активность большинства белков.

С использованием культур клеток. В отличие от микроорганизмов, культуры клеток млекопитающих в большинстве случаев обладают ферментными системами для модификации вновь синтезируемых полипептидов и придания им биологической активности. Однако концентрация получаемого вещества остаётся очень низкой. Кроме того, этот путь очень дорог и трудоёмок, т.к. связан с эксплуатацией сложных ферментеров для культивирования клеток и использованием дорогостоящих сред. При этом следует учитывать ограниченность пассажирования клеточных линий отдельных культур и снижение их активности после каждого цикла. Поэтому лекарственные вещества, получаемые этим способом, имеют очень высокую стоимость.

С использованием трансгенных животных. Это направление трансгенной технологии считается в настоящее время одним из наиболее перспективных, разработке которого уделяется наибольшее внимание. Принципиальная возможность получения трансгенных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества белковой природы, обусловлена механизмом тканеспецифической экспрессии, определяемой регуляторными последовательностями генов основных белков молока, используемых в качестве промоторов при создании генно-инженерных конструкций. При получении трансгенных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества фармакологического назначения, в качестве промоторов в генно-инженерных конструкциях используют регуляторные участки генов белков молока, которые обеспечивают тканеспецифическую экспрессию трансгена только в клетках молочной железы. В связи с этим синтезированный целевой белок выводится из организма животного с молоком, не попадая в кровоток и не оказывая влияния на организм животного, т.к. молочная железа является уникальной изолированной системой, производящей продукт на экспорт. Привлекательным является доступность фармакологических белков, полученных с молоком, высокая продуктивность молочной железы (20-30 литров моло-

ка в день у коров и 3-5 литров у коз) и относительно низкая себестоимость эксплуатации животных-продуцентов. Расчеты, основанные на результатах первых экспериментов, свидетельствуют о том, что только разработка технологии получения трансгенных животных, продуцирующих лекарственные биологически активные вещества с молоком, позволит решить проблему более быстрыми темпами и с наименьшими затратами. Эти животные-суперпродуценты могут стать высокоэффективными экологически чистыми биофабриками по производству биологически активных веществ, необходимых для медицины и сельского хозяйства по несравненно низкой себестоимости (как минимум на порядок ниже существующих цен). Кроме того, получение этих веществ из молока позволит устранить опасность заражения вирусами гепатита, СПИДа и др., которая существует при традиционной технологии получения этих веществ из тканей человека. Уже первые работы по получению животных-продуцентов биологически активных веществ показали, что концентрация секретируемых в молоко животных человеческих биологически активных веществ колеблется от миллиграммов до граммов на 1 литр, что значительно превышает концентрацию веществ, получаемых с помощью культуры клеток. Кроме того, выделение этих веществ из молока животных значительно проще, чем из бактериальной культуры.

За рубежом за период с 90-го года получено большое количество трансгенных лабораторных животных, продуцирующих с молоком БАВ фармакологического назначения. Однако пока ещё не очень много получено трансгенных сельскохозяйственных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества человека. Принимая во внимание перспективность этого направления исследований, создаются биотехнологические фирмы и компании, которые вкладывают большие средства в разработку этой трансгенной технологии. В середине 2006 г. Европейское агентство по контролю за качеством медикаментов (ЕМЕА) выдало разрешение на применение человеческого антитромбина, полученного из молока трансгенных коз. Этот первый зарегистрированный препарат, полученный на основе данной технологии, под названием АТгуп производит фирма GTC Biotherapeutics – дочернее предприятие биотехнологической компании Genzyme. По имеющимся литературным сведениям к настоящему времени клинические испытания проходит и рекомбинантный лактоферрин человека.

В России в 90-х годах были получены трансгенные овцы, экспрессирующие в молоко прохимозин (ВИЖ). Две группы исследователей в России сделали ставку на получение гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Были получены трансгенные кролики с интегрированным геном Г-КСФ (Биотехцентр и ВНИИФБиП).

В настоящее время специалистов в области онкологии очень интересует лактоферрин человека. По их рекомендации во ВНИИФБиП были созданы генно-инженерные конструкции, включающие нуклеотидные последовательности гена лактоферрина человека под промоторами генов белков молока. Проведены их испытания, получены два варианта трансгенных мышей с этими конструкциями. В ближайшее время планируется изучение экспрессии трансгена у этих мышей, а также полноты гликозилирования продуцируемого лактоферрина и его биологической активности.

Повышение качества продукции животных (молока, шерсти и др.) за счет интеграции в их геном отдельных генов или групп генов, кодирующих ключевые ферменты метаболизма белков, жиров и углеводов.

Экспрессия в органах и тканях дополнительных генов может способствовать улучшению качества продукции животноводства с точки зрения ее пригодности для человека. Исследования по изменению состава и свойств молока ведутся в двух направлениях: в направлении повышения сыродельческих качеств за счёт интеграции в геном коров дополнительных генов κ -казеина или других белков и в направлении изменения состава коровьего молока с целью использования его для детского питания, т.е. приближении его к составу женского молока.

Основными недостатками молочных смесей для детского питания, созданных на основе коровьего молока, является высокое содержание β -лактоглобулина и низкое – лактоферрина. У многих детей молочные смеси, созданные на основе коровьего молока, вызывают аллергию. Основным аллергеном является β -лактоглобулин, которого в женском молоке почти нет. Нокаутировать у коровы или козы нужный ген или модифицировать его так, чтобы белок перестал быть аллергеном – вполне реальный путь ближайшего времени.

Второй путь придания коровьему молоку новых свойств - обогащение его лактоферрином человека, т.к. содержание лактоферрина в коровьем молоке составляет только 0,02 г/л, тогда как в человеческом - 1,7 г/л. Лактоферрин - основной железосвязывающий белок в молоке, который обеспечивает транспорт железа и его абсорбцию. Кроме того, по современным представлениям лактоферрин обладает сильным бактерицидным действием, усиливает противовирусную активность иммунной системы, подавляет рост раковых опухолей и метастазов. Повышение концентрации лактоферрина в молоке коров может приблизить его по своим качествам к человеческому молоку и позволит использовать его для детского питания. Дети-«искусственники» в 10 раз реже болеют гастроэнтеритом, если получают каплю раствора лактоферрина в день.

С помощью технологии трансгеноза были предприняты попытки изменения белкового состава шерстных волокон с целью придания шерсти животных лучших технологических свойств. На формирование шерстных фолликулов и молекулярную структуру шерстных волокон у овец оказывает влияние целый комплекс генов, кодирующих регуляторные и структурные белки. Для улучшения качества шерсти особое внимание уделяют генам кератинов внутреннего филамента (*IF*) и генам кератин-связанных белков (*KAP*).

Ведутся работы по повышению качества шерсти за счёт введения генов, обеспечивающих дополнительный синтез серосодержащих аминокислот (цистеина, метионина), недостаток которых значительно снижает выход и качество шерсти.

За рубежом ведутся исследования по получению трансгенных животных с введением в их геном дополнительного гена κ -казеина с целью повышения сыродельческих качеств молока. Получены трансгенные мыши, экспрессирующие κ -казеин крупного рогатого скота в молоко.

В Голландии и Южной Корее получены быки с интегрированным геном лактоферрина человека, которые являются родоначальниками линий животных, продуцирующих с молоком лактоферрин человека. Концентрация лактоферрина у коров голландской линии приближается к 1 г/л.

Получены трансгенные овцы с геном кератина типа II IF, экспрессирующим в шерстных фолликулах.

В России в результате совместных исследований нескольких институтов РАСХН (ВНИИФБиП, ВИЖ, ВНИИСБ) и Ставропольского государственного аграрного университета на базе этого университета получены трансгенные овцы. В геном этих овец интегрирована генно-инженерная конструкция, включающая нуклеотидные последовательности гена спидроина паука под промотором гена кератина овцы. Как известно, паутина по прочности превосходит сталь, поэтому сделано предположение, что встраивание паутинного белка в шерсть позволит увеличить её прочность. Первый анализ шерсти трансгенных овец показал, что прочность шерсти на разрыв у них на 60% выше, по сравнению с контролем. При этом отмечено снижение толщины волокна.

Осенью 2005 г. началась реализация программы «БелРосТрансген». Это совместный проект, выполняемый Институтом животноводства Национальной академии наук Беларуси и Институтом биологии гена РАН под эгидой правительства Союзного государства. Проект направлен на получение коз, продуцирующих с молоком человеческий лактоферрин. О результатах выполнения этого проекта пока ничего не сообщается.

Во ВНИИФБиП проводятся работы по получению коров, продуцирующих с молоком лактоферрин человека, на основе использования эмбрионов, полученных *in vitro*. Разработана технология дозревания и оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*, созданы собственные генно-инженерные конструкции, включающие нуклеотидные последовательности гена лактоферрина человека под промоторами генов основных белков молока, получены трансгенные мыши с этими конструкциями.

Получение трансгенных животных – доноров органов и тканей для ксенотрансплантации их человеку. В последние годы интенсивно ведутся исследования, направленные на выяснение возможности трансплантации органов и тканей животных человеку (ксенотрансплантация). При этом оказалось, что по многочисленным причинам использование в качестве доноров органов человекообразных обезьян не является обнадеживающим вариантом. Принимая во внимание анатомо-физиологические сходства и соразмерность некоторых органов свиньи (сердце, почки и др.) с органами человека, исследователи склонны считать, что при определенном генетическом вмешательстве в иммунные процессы, органы трансгенных свиней могут быть использованы для трансплантации их человеку. И самое главное, что свинья и человек почти не имеют общих инфекционных заболеваний. Правда, в последнее время был обнаружен вирус, который восприимчив и свиньей, и человеком, но доказательств его отрицательного влияния на здоровье человека пока не получено (Dinsmore et al., 2000).

Потребности в донорских органах довольно велики. Несмотря на высокую стоимость операции, только в экономически развитых странах около 150 тыс. человек включены в «списки ожидания» донорских органов. При многих болезнях сердца почек, печени и др. органов пересадка их является единственным способом спасения жизни людей. Поэтому проблема ксенотрансплантации органов и тканей животных человеку превратилась в глобальную мировую проблему. И если пересадка отдельных органов свиньи человеку ещё требует значительных исследова-

ний, то ксенотрансплантация некоторых видов клеток и тканей может быть реальностью уже в ближайшее время. Пересадка нервных клеток свиньи человеку рассматривается как многообещающая возможность лечения болезни Паркинсона (Deacon et al., 1997), а ксенотрансплантация β -клеток островков Лангерганса должна открыть возможность лечения инсулинозависимого сахарного диабета (Cozzi, White, 1995).

За рубежом получением трансгенных животных для ксенотрансплантации органов и тканей человеку занимаются крупные фирмы, которые объединяются с исследовательскими институтами. В настоящее время некоторыми зарубежными фирмами уже получены трансгенные свиньи с отдельными генами главного комплекса гистосовместимости человека, которые призваны предотвращать сверхострое отторжение пересаженных свиных органов (Fodor et al., 1994; Cozzi et al., 2000; Huang et al., 2001). Ведётся исследование механизмов отторжения трансплантата и поиск генов, ответственных за эти механизмы.

В России в результате совместной работы сотрудников ВИЖ и ВНИИФБиП на базе ОПХ «Клёно-Чегодаево» получены трансгенные свиньи с интегрированными генными конструкциями, содержащими нуклеотидные последовательности гена HLA-E и гена β_2 -микроглобулина человека, которые, по современным представлениям, должны предотвращать сверхострое отторжение органов и тканей при ксенотрансплантации их человеку.

Несмотря на то, что к настоящему времени в некоторых странах получены разные виды трансгенных животных с различными заданными признаками, достигнуты эти результаты только экстенсивным путем за счет использования в экспериментах большого количества животных (за счет больших возможностей и вложенных средств). Частота интеграции трансгена в геном рожденного потомства в этих работах находится на таком же низком уровне, как и в работах российских исследователей (5-10%). Общая эффективность технологии трансгеноза также составляет 0,5-1,5%, т.к. механизмы интеграции чужеродной ДНК в геном животных остаются практически мало изученными. Отставание России от зарубежных стран в этом направлении исследований пока ещё не очень сильное и если принять активное участие в этих исследованиях, то не исключено, что в перспективе собственными силами можно будет покрыть внутренние потребности в новых лекарственных препаратах и занять определённую часть формирующегося рынка высоких генных технологий.

Клонирование животных. Второй биоинженерной технологией в животноводстве считается технология клонирования путём трансплантации ядер клеток в энуклеированные яйцеклетки. Потенциальные возможности этой технологии для животноводства заключаются в следующем:

- интенсивное использование уникальных животных, получение клонов выдающихся животных;
- усиление эффекта селекции;
- сохранение исчезающих пород для поддержания генетических ресурсов;
- повышение эффективности исследований по кормлению, тестированию препаратов, этологии и др.

Развитие этого направления исследований происходило волнообразно. Волна исследований то возрастала, то отступала в зависимости от достигаемых результатов.

Первый этап исследований базировался на использовании в качестве кариопластов бластомеров эмбрионов ранних стадий развития, которые считались ещё малодифференцированными. В результате этих работ к середине 90-х годов были получены клонированные сельскохозяйственные животные почти всех видов. Но получаемые клоны животных не являлись идентичными хромосомальному генотипу взрослого животного с известной продуктивностью, которое являлось донором эмбрионов, а являлись генетическими копиями эмбриона, хозяйственная ценность которого неизвестна.

И только после получения в 1997 г. овечки Долли (Wilmut et al., 1997), когда было показано, что в организме взрослых животных имеются недифференцированные клетки, обладающие тотипотентными свойствами, которые могут быть использованы в качестве источников кариопластов для реконструирования клеток с целью клонирования животных, исследования по разработке технологии клонирования животных стали интенсивно развиваться. Поднялась новая волна исследований. Современная схема технологии клонирования приведена на рис. 2. При использовании в качестве источника ядер клеток взрослого животного можно уже получать клоны потомков с известными желаемыми признаками, которые полностью соответствуют признакам своего прародителя.

За рубежом в настоящее время получено потомство почти всех видов сельскохозяйственных и лабораторных животных из клеток, реконструированных при использовании в качестве кариопластов ядер соматических клеток взрослых животных с известными признаками. Различными исследовательскими коллективами клонированы разные виды животных, включая крупный рогатый скот (Kato et al., 1998; Cibelli et al., 1998; Vignon et al., 1998; Wells et al., 1998; Kato et al., 1998; Goto et al., 1999), овец (Wilmut et al., 1997), свиней (Polejaeva et al., 2000; Onishi et al., 2000; Betthausen et al., 2000; Bondioli et al., 2001; Boquest et al., 2002), коз (Baguisi et al., 1999), мышей (Wakayama et al., 1998; Tamashiro et al., 2000), кроликов (Chesne et al., 2002) и др. В связи с этим уже заключаются дорогостоящие договора на клонирование любимых домашних животных и во всём мире широко обсуждается проблема клонирования человека. Первое домашнее животное, которое было клонировано по заказу – кот, генетически идентичный умершему прототипу, который «вернулся» к своей хозяйке в декабре 2004 г. за 50000 долларов.

Во всем мире исследователи используют технологии клонирования, чтобы сохранить исчезающие виды животных. За прошедшие четыре года учеными успешно были клонированы, по крайней мере, три вида исчезающих животных: европейский муфлон и дикие быки гаур и бантенг. Несколько зоопарков и организаций по сохранению исчезающих видов животных создали криобанки, в которых хранятся образцы тканей и яйцеклеток исчезающих видов птиц, млекопитающих и рептилий.

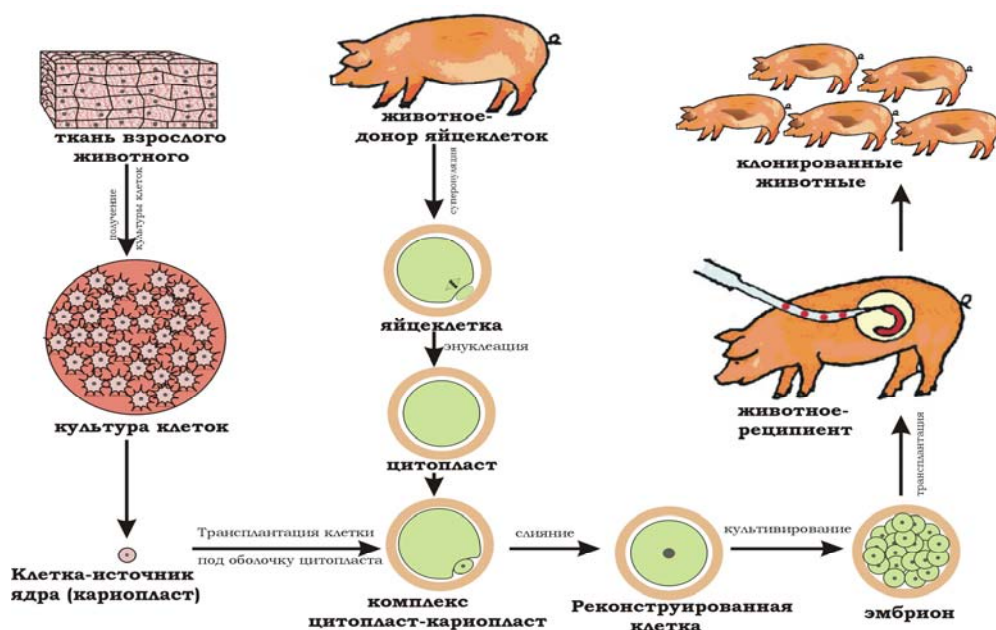


Рис.2. Принципиальная схема клонирования животных при использовании в качестве кариопластов ядер соматических клеток

В России сотрудниками института биофизики (ИБФ РАН, Пущино) в 1988 году впервые в нашей стране разработан отечественный вариант технологии клонирования животных и получено потомство мышей в результате пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки.

В настоящее время, судя по публикациям, исследования по разработке технологии клонирования животных на основе использования в качестве кариопластов ядер соматических клеток, получаемых от взрослых животных, проводятся в трёх институтах – во ВНИИФБиП, НИИПЗК (РАСХН) и Институте экспериментальной и теоретической биофизики РАН (Пущино). Наибольшим достижением во ВНИИФБиП и НИИПЗК в этом направлении является получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота при использовании в качестве цитопластов ооцитов, созревающих *in vitro*, и в качестве кариопластов – ядер соматических клеток. Таким образом, эти два института получили положительные результаты на первом исследовательском этапе в разработке технологии клонирования крупного рогатого скота и подошли ко второму этапу, на котором начинаются чисто хозяйственные трудности, связанные с обычной трансплантацией эмбрионов.

В последние несколько лет особенно большое значение придаётся исследованиям по использованию технологии клонирования для получения трансгенных животных. Получены первые обнадеживающие результаты (Schnieke et al., 1997; Zakhartchenko et al., 2000; Cibelli et al., 1998). Принципиальная схема использования технологии клонирования для получения трансгенных животных представлена на рис. 3.

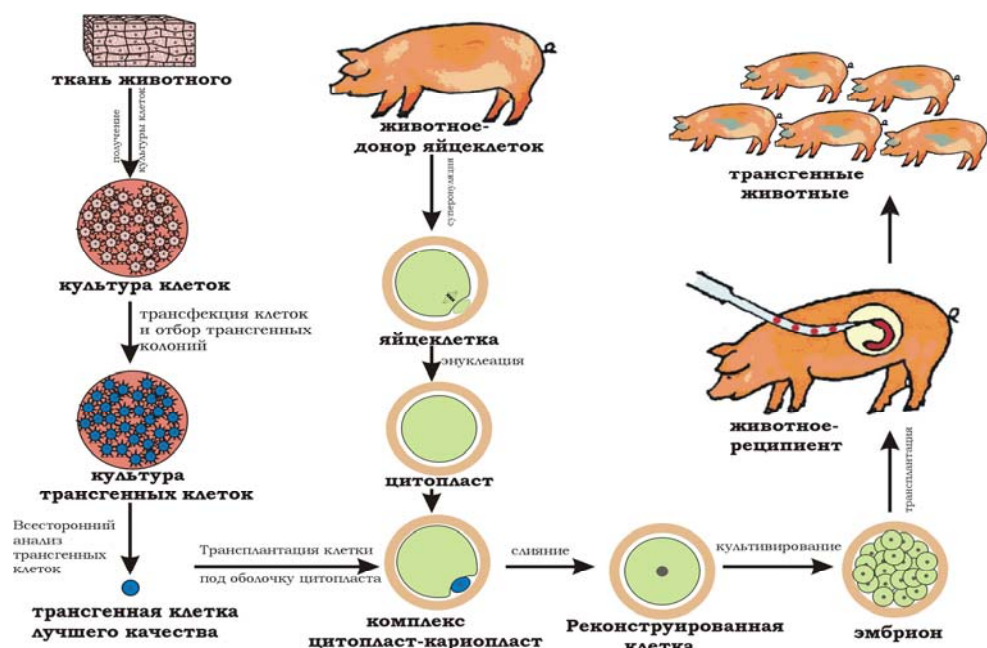


Рис.3. Принципиальная схема использования технологии клонирования для получения трансгенных животных

Эта технология имеет ряд преимуществ, по сравнению с технологией получения трансгенных животных, основанной на использовании способа микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот. Главными преимуществами использования технологии клонирования для получения трансгенных животных являются следующие:

- все родившиеся животные будут трансгенными и будут иметь желательный пол;
- в результате тщательного отбора клеток, используемых в качестве кариопластов, можно избежать мозаичного встраивания трансгена в геном хозяина и, следовательно, все животные будут передавать трансген по наследству;
- при трансфекции клеток можно нокаутировать нежелательные гены;
- при трансплантации ядер можно использовать клетки с наилучшей экспрессией трансгена.

Но наряду с этими преимуществами возникает и большое количество трудностей, т.к. эффективность технологии клонирования остаётся пока ещё низкой.

Основная роль технологии клонирования отводится и при получении эмбриональных стволовых клеток. Основные этапы технологии клонирования животных являются ключевыми звеньями при получении **истинных** эмбриональных стволовых клеток для терапевтического клонирования. В настоящее время особенно большое внимание уделяется исследованиям, направленным на получение эм-

бриональных стволовых клеток *человека* на основе использования яйцеклеток *животных* в качестве цитопластов (Dominko et al., 1999).

Однако, несмотря на то, что за последние годы в области клонирования животных достигнуты определенные успехи, они пока в большей степени носят эмпирический характер, поэтому положительные результаты сильно варьируют от эксперимента к эксперименту. Основной причиной такой нестабильности результатов является недостаточность фундаментальных знаний о глубинных механизмах, обуславливающих процесс репрограммирования кариопластов цитопластами, и факторах, влияющих на этот процесс.

Таким образом, в настоящее время разработаны принципиальные схемы использования биоинженерных технологий в животноводстве, однако пока ещё эти технологии имеют невысокую эффективность, поэтому основной задачей для исследователей остаётся совершенствование основных этапов биоинженерных технологий с целью повышения их эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Von Butler I., Pirchner F., Growth and reproduction in NMRI-mice after long-term divergent selection for 8 week body weight. *Z. Versuchstier.*, 1985, 27: 80-86.
2. Palmiter R.D., Norstedt G., Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 1983, 111: 809-814.
3. Pursel V.G., Pinkert C.A., Miller K.F., et al. Genetic engineering of livestock. *Science*, 1989, 244: 1281-1288.
4. Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E. et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300: 611-615.
5. Hammer R.E., Brinster R.L., Rosenfeld M.G. et al. Expression of human growth hormone releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature*, 1985, 315: 413-416.
6. Brem G., Brenig B., Goodman H.M. et al. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 1985, 20: 251-252.
7. Pursel V.G., Hammer R.E., Brinster R.L. et al. Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pigs. *J. Reproduction and Fertility*, 1990: 77-87.
8. Brem G., Springmann K., Maier E. et al. Factors in the success of transgenic pig programs. *Transgenic Models in Medicine and Agriculture* (R. B. Church, ed.). Wiley. Liss, Inc., New York, 1990: 61-72.
9. Рябых В.П., Кальницкий Б.Д., Эрнст Л.К. К вопросу об использовании генов соматотропного каскада для получения трансгенных свиней с заданным потенциалом продуктивности и качества продукции. В кн. «Генноинженерные сельскохозяйственные животные», М. 1995: 289-325.
10. Lindenmann J. Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1964, 116: 506-509.
11. Muller M., Brenig B., Winnacker E. -L., Brem G. Effects of integrated Mx-gene construct in transgenic pigs. *Mol. Cell. Biol.*, 1991, 3: 1803-1814.
12. Weidle U.H., Lenz H., Brem G. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbit and pig. *Gene*, 1991, 98: 185-191.
13. Ernst L.K., Zakcharchenko V.I., Suraeva N.M. et al. Transgenic rabbits with antisense RNA gene targeted at adenovirus H5. *Theriogenology*, 1991, 35: 1257-1264.

14. Dinsmore J. H., Manhart C., Raineri R., Jacoby D. B., Moore A. No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells. *Transplantation*, 2000, 70: 1382-1389.
15. Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J. et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat. Med.*, 1997, 3: 353-359.
16. Cozzi, E., White D. J. The generation of transgenic pig as potential donors for humans. *Nat. Med.* 1995, 1: 964-970.
17. Fodor W. L., Williams B. L., Matis L. A. et al. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogenic hyperacute organ rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 11153-11160.
18. Cozzi E, Bhatti F, Schmoekel M. et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation*, 2000, 70: 15 -21.
19. Huang J, Gou D, Zhen C, et al. Protection of xenogenic cells from human complement-mediated lysis by the expression of human DAF, CD59 and MCP. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2001, 31: 203 -209.
20. Wall R.J., Kerr D.E., Bondioli K.R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80: 2213-2224.
21. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-813.
22. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256-1258.
23. Vignon X., Chesne P., Le Bourhis D. et al. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci. III*. 1998, 321(9): 735-745.
24. Wells D.N., Misica P.M., Tervit H.R. Vivanco W. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the best surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 1998, 10: 369-378.
25. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095-2098.
26. Goto Y., Kaneyama K., Kobayashi S., Imai K., Shin-noh M., Tsujino T., Nakano T., Matsuda S., Nakane S., Kojima T. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *J. Anim. Sci.*, 1999, 70: 243-245.
27. Kubota C., Yamakuchi H., Todoroki J. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long- term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)* 2000, 97(3): 990-995.
28. Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 86-90.
29. Onishi A., Iwamoto M., Akita T. et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188-1190.
30. Betthauser J., Forsberg E., Augenstein M. et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18: 1055-1059.
31. Bondioli K., Ramsoondar J., Williams B. et al. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001, 60: 189-195.
32. Park K.W., Cheong H.T., Lai L. et al. Production of nuclear transfer-derived swine that express the enhanced green fluorescent protein. *Anim. Biotech.*, 2001, 12: 173-181.
33. Boquest A.C., Grupen C.G., Harrison S.H. et al. Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.*, 2002, 66: 1283-1287.
34. Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T. et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17: 456-461.
35. Wakayama T., Perry A.C.F., Zucotti M. et al. Full -term development of mice from enucleated

- oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 369-374.
36. Tamashiro K.L.K., Wakayama T., Blanchard R.J. et al. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 2000, 63: 328-334.
 37. Chesne P., Adenot P.G., Viglietta C. et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 366-369.
 38. Schnieke A., King A., Ritchie W. et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278: 2130-2133.
 39. Zakhartchenko V., Mueller S., Alberio R. et al. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal in postnatal fibroblasts. *Mol. Reprod. Develop.*, 2000, 60: 362-369.
 40. Dominko T., Mitalipova M., Haley B. et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.*, 1999, 60: 1496-1502.

Bioengineering technologies in animal production: current state abroad and in Russia

¹Ryabyikh V.P., ²Ernst L.K.

¹*Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Farm Animals,
Borovsk, Russia*

²*Russian Agricultural Academy, Moscow, Russia*

The first successful attempts to increase the growth rate in mouse have not been substantiated by research effort devoted at reproducing this effect in farm animals. The reason for this failure may be a knowledge deficit in the area of biochemistry of growth. Transgenic pigs expressing bovine gene STH have been found to be a less fatty, but they had the problems with health. The more successful developments were made in the studies performed to increase the resistance to contagious diseases. Transgenic rabbits expressing anti sense RNA against adenovirus were obtained. The most intensive research efforts at now have the objective to obtain transgenic animals expressing in milk the pharmacologic active substances. The first preparation of human antitrombin obtained from the milk of transgenic goats was officially registered in 2006 year. In Russia the mice expressing gene of human lactoferrin were obtained and the measurements of its biological activity are undertaking at now. The transgenic sheeps are also obtained expressing gene of spider protein spidroin under control of promoter of sheep keratin gene. The strength of wool for rupture is increased by 60% and diameter of hair is diminished. The transgenic pigs with integrated nucleotide sequences of human genes HLA-E and β_2 – microglobulin were obtained with perspectives of their use for organ xenotransplantation to human.

Key words: gene engineering, lactoferrin, spidroin, HLA-E, β_2 –microglobulin, xenotransplantation.

Prob. Prod. Anim. Biol., 2007, 2:3-19