

# ПОСТГЕНОМНАЯ ЭРА

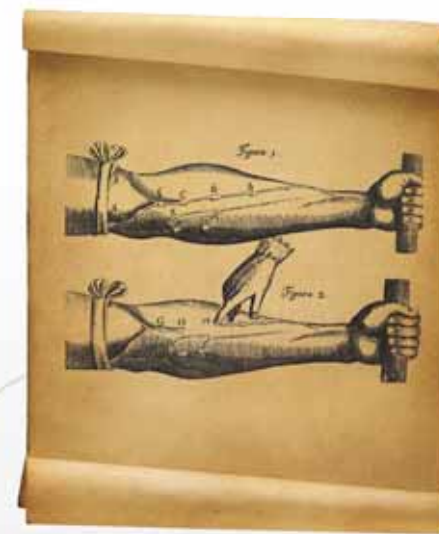
или Зачем нужны 300 тысяч линий мышей

М. П. МОШКИН



МОШКИН Михаил Павлович — доктор биологических наук, профессор, заведующий Отделом генофондов экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Область научных интересов: популяционная физиология, исследование материальных основ внутривидовых взаимодействий, обеспечивающих устойчивое воспроизведение биологических видов. Автор более 150 научных статей, 4 статей в БРЭ, 1 монографии

Нет нужды доказывать, что вопрос о том, как работает живой организм, актуален для каждого из нас. Проблема заключается лишь в выборе адекватного «инструмента» познания. Как правило, процесс исследования любой биологической системы, будь то клетка, особь или биогеоценоз, начинается с «морфологического», структурного описания. Однако несмотря на необходимость этого этапа, его одного недостаточно, чтобы постичь механизмы функционирования изучаемой системы. Замечательной иллюстрацией того, насколько ошибочными могут быть умозрительные построения, опирающиеся исключительно на описание структур, являются представления античных ученых о функции головного мозга. Этому «материальному субстрату» высшей нервной деятельности Аристотель, как и его коллеги, отводили роль хранилища воды и слизи для охлаждения крови, а также спермы, поступающей из мозга по венам вокруг ушей. Современные методологические основы изучения функций были заложены еще в XVII в. английским врачом В. Гарвеем, который одним из первых начал сознательно манипулировать структурами организма с целью понять их предназначение. И сегодня, спустя столетия, этот подход не утратил своей актуальности: направленные воздействия на живые системы остаются основным подходом к экспериментальному изучению механизмов их функционирования. Изменился лишь масштаб: в наше время объектами манипуляций все чаще становятся как крупные экосистемные образования (например, элементы ландшафтов), так и мелкие структуры живых организмов (клетки, клеточные органеллы и органические молекулы)



Опыт В. Гарвея по изучению кровообращения. При остановке венозного оттока с помощью жгута можно увидеть работу венозных клапанов, «облегчающих» движение крови по направлению к сердцу

О создании Сибирского центра генетических моделей на животных

Сравнительно недавно произошло поистине эпохальное событие, которое задавало вектор научных исследований на многие десятилетия вперед: в 2001 г. две конкурирующие научные команды (Международная организация по изучению генома человека — HUGO и Celera Genomics) объявили о первых расшифровках генома человека. Составление полного списка нуклеотидных последовательностей ДНК человека (а заодно и некоторых наиболее изученных видов животных) можно смело отнести к одному из самых грандиозных описаний.

Однако, сам факт расшифровки «генетического» текста (т.е. определение порядка расположения нуклеотидов в геноме) не предполагает его «понимания». На ум приходят такие классические книги, как Библия, которые читаются, перечитываются и переистолковываются многократно.

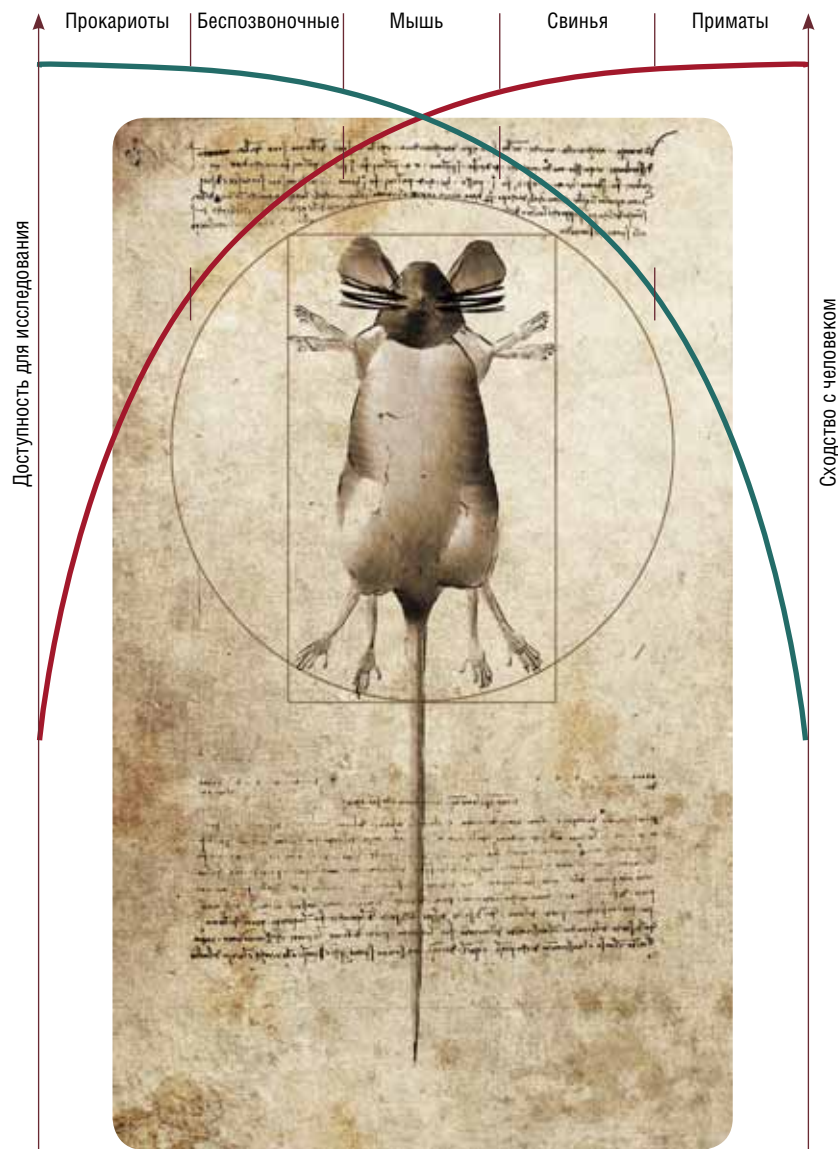
### Области применения генетических моделей на животных:

1. Моделирование патологий (*model of diseases*).
2. Молекулярно-генетическая физиология (*functional genomics*).
3. Испытание средств профилактики и лечения (*preclinical studies*)

В случае же «генетического» текста ситуация усложняется тем, что сам процесс «считывания» информации происходит в несколько этапов, на каждом из которых возможна корректировка и перекодирование. В итоге элементарное событие на уровне *генотипа*, начинающееся с транскрипции конкретного гена, на уровне *фенотипа* приобретает достаточную неопределенность.

Чтобы разобраться во всех этих хитросплетениях, неизмеримо более сложных, чем даже взаимодействия между органами, тканями и клетками, ученые вновь вынуждены прибегать к манипуляциям структурами. Однако, в отличие от «постгареевского» времени, в «постгеномную» эру в распоряжении исследователей находятся уже не десятки видимых глазом структурных образований, но около 25 тысяч (!) микрообъектов — генов. Ведь именно таковы размеры геномов человека и многих видов млекопитающих, используемых современной наукой в качестве экспериментальных моделей.

Возможность целенаправленного генно-инженерного манипулирования резко увеличила темпы накопления знаний о роли отдельных генов и их комбинаций в реализации программ индивидуального развития, в реакциях организма на различные факторы среды, а также в понимании патологических процессов, имеющих генетическую природу. Так, простой наукометрический анализ, заключающийся в запросе на сайте PubMed научных статей, в которых



Мышь как оптимальный модельный объект в координатах «доступность—адекватность»

упомянуто словосочетание «трансгенные мыши», дает более 90 тыс. ссылок (и это при том, что впервые такие мыши были получены всего лишь 20 лет назад)! Сегодня рост числа статей в этой области биологии идет со скоростью, превышающей тысячу публикаций в месяц.

### Мышиная троица

Но почему, собственно, мы завели речь о ... мышах? Не секрет, что львиная доля научных исследований ориентирована на обеспечение здоровой и продолжительной жизни людей. Но среди всего многообразия экспериментальных объектов, именно мыши попадают в точку оптимума при учете двух главных факторов — генетической близости к человеку и доступности для

### Трансгенные животные — это генетически модифицированные организмы, в геном которых искусственно введен чужеродный ген, способный экспрессироваться и наследоваться как любой природный ген

исследования. Бактерии, дрозофилы и другие беспозвоночные, безусловно, наиболее удобны для содержания в лабораторных условиях, но по многим характеристикам, в том числе генетическим, слишком далеки от человека. Обезьяны и свиньи, напротив, наиболее генетически близки к нам, однако содержание и изучение подобных многокилограммовых объектов требует значительных материальных затрат. Кроме того, работа с крупными млекопитающими ограничена по этическим соображениям. Например, в Японии не хотят убивать обезьян, и хотя избыточная численность обезьян в некоторых районах приносит реальный экономический ущерб, японцы вкладывают немалые средства в разработку методов контрацепции диких животных.

Итак, в качестве наиболее приемлемого компромисса для исследователей остается мышь с заданными генетическими свойствами. Какие же возможности открываются при изучении подобных модельных объектов? Во-первых, мы можем приблизиться к пониманию роли и места генетических процессов в формировании фенотипа в широком смысле этого слова, т. е. в регуляции морфологического развития и в обеспечении физиологических и поведенческих функций. Одним из наиболее продуктивных подходов в этой области является строго адресованное «выключение» (*нокаутирование*) отдельных генов или, наоборот, усиление их функции.

Во-вторых, благодаря генно-инженерным методам, появилась возможность прямого наблюдения



СЕРОВ Олег Леонидович — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики развития Института цитологии и генетики СО РАН. Лауреат государственной премии, автор более 200 публикаций



СЕРОВА Ирина Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института цитологии и генетики СО РАН. Автор более 70 публикаций

### Получение трансгенных животных

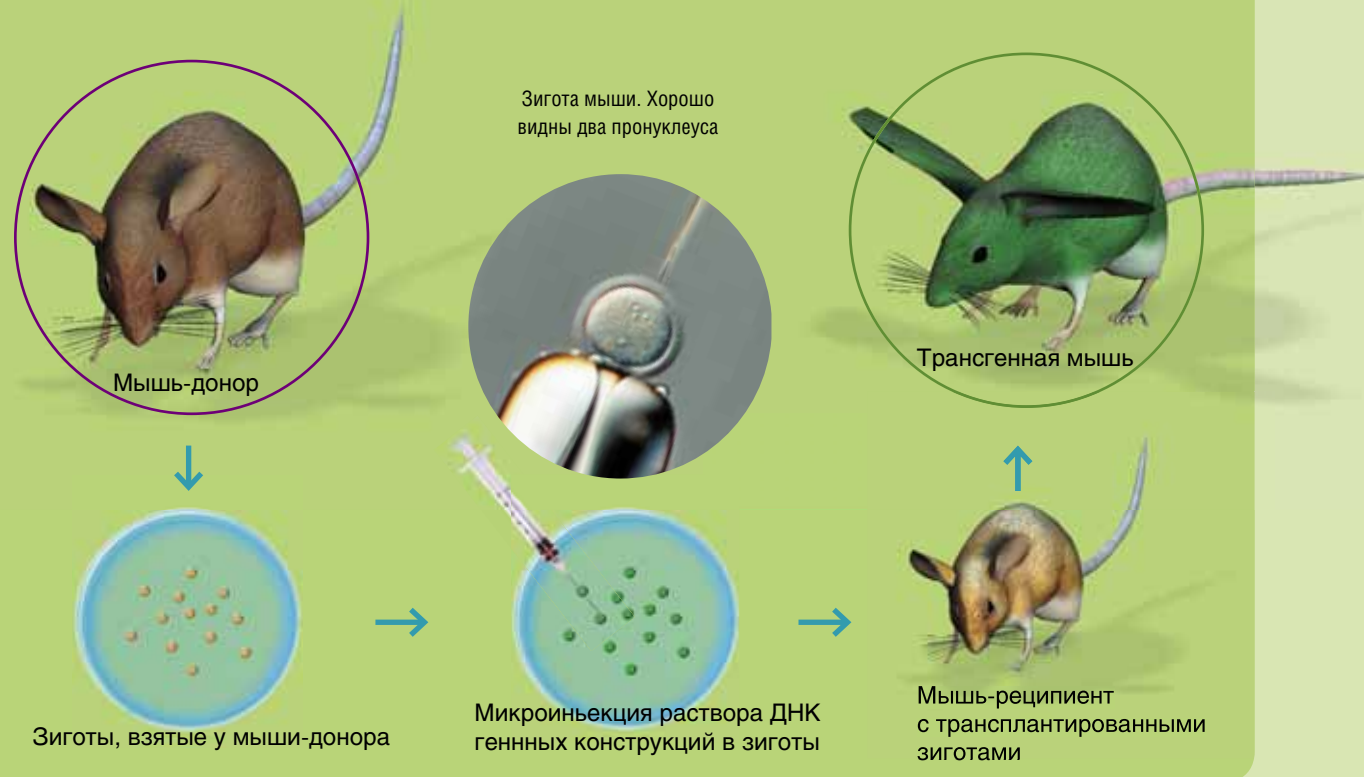
В наши дни трансгенные организмы перестают быть редкостью и значение их для биологии и медицины трудно переоценить. Искусственное включение практически любого интересующего исследователей гена позволяет физиологам изучать на трансгенных животных различные отклонения в гомеостазе организма, иммунной системе, в эмбриогенезе и во многих других случаях.

Исследования в биомедицине сосредоточены в основном на том, чтобы создать широкий спектр моделей заболеваний человека, включая такие, как атеросклероз, диабет, гипертонию, болезнь Альцгеймера, ретинобластому, онкологические и многие другие заболевания. Модели трансгенных животных, как правило мышей, позволяют изучать механизмы развития и лечения болезней человека.

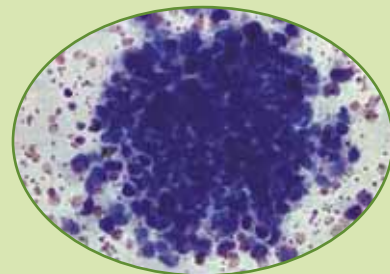
Трансгенные мыши являются также незаменимой модельной системой и для тестирования генетических конструкций перед получением сельскохозяйственных трансгенных животных-биореакторов, способных с молоком продуцировать белки человека.

**Гранулоцит-колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) является ценным стимулятором кроветворения, широко применяемым в клинике при переливании крови, лечении последствий радио- и химиотерапии в онкологии (Hobel et al., 2003). В клинических исследованиях показано, что Г-КСФ-терапия предотвращает и лечит инфекции у иммунонекомпетентных пациентов, благоприятно воздействуя на клетки крови. В последнее время Г-КСФ используется и для различных целей так называемой регенерационной медицины. Появились сообщения, что Г-КСФ улучшает функции сердечной мышцы и уменьшает смертность после острого инфаркта миокарда при введении в область инфаркта стволовых клеток крови пациента. Г-КСФ синтезируется в моноцитах, фибробластах и эндотелиальных клетках**

## Получение линий трансгенных мышей



Были созданы три генно-инженерные конструкции, способные обеспечить синтез биологически активного гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека в молоке трансгенных мышей. Конструкции содержали ген Г-КСФ человека, слитый с регуляторными последовательностями гена альфа-S1-казеина молока коровы или козы разной длины — от 721 до 3387 пар оснований (pb). Это позволяло включить от минимально необходимого до максимального набора сайтов регуляции, которые составляют сложный физиологический механизм активации функций молочной железы, таких, например, как рецепторы гормональной стимуляции лактации, беременности и др. С помощью микроинъекций рекомбинантной ДНК в зиготы мышей получено более 10 трансгенных животных, каждое из которых дало начало собственной линии мышей. На более чем 400 потомках этих основателей были исследованы: наследование трансгена, продукция и биологические свойства Г-КСФ человека. Установлено, что трансген наследуется в ряду поколений по законам Менделя как любой природный ген. Обнаружено, что в молочных железах трансгенных лактирующих самок всех линий трансген стабильно экспрессировался. Концентрация Г-КСФ человека в молоке варьировала от 0,1 мг/мл до 1000 мкг/мл. У трансгенных животных с самой «короткой» регуляторной последовательностью (721 pb) выявлено присутствие Г-КСФ человека в сыворотке крови, что свидетельствует об эктопической экспрессии трансгена, т.е. белок человека синтезировали не только клетки молочной железы, но и других внутренних органов. Это было нежелательное осложнение, поскольку трансгенный белок — сильный стимулятор кроветворения и может нанести вред здоровью трансгенной особи. Молоко всех трансгенных животных стимулировало образование кроветворных гранулоцитсодержащих колоний в культуре клеток пуповинной крови человека, и его активность была сопоставима с активностью препаратов натурального Г-КСФ человека. По совокупности характеристик наиболее перспективной оказалась третья конструкция с самой протяженной (3387 pb) регуляторной областью, которая и была использована для получения трансгенных коз



Молоко трансгенных мышей стимулирует рост кроветворных колоний у человека



Момент микроинъекции рекомбинантной ДНК в мужской пронуклеус зиготы козы

Наиболее широко используемый метод введения трансгена — микроинъекция в пронуклеусы (мужское и женское ядро) зиготы в тот момент, когда спермий проник в яйцеклетку, и пронуклеусы готовятся к слиянию. Суть метода заключается во введении в мужской пронуклеус с помощью микроманипулятора со стеклянным капилляром (диаметр кончика 1 мкм) раствора экзогенной (чужеродной) ДНК (500–1000 копий гена). Эта процедура проводится под микроскопом со специальной оптикой, позволяющей видеть пронуклеусы в трехмерном измерении.

Эффективность интеграции трансгенов в геном, т.е. число трансгенных животных от общего числа родившихся при использовании данного метода в зависимости от вида животных колеблется незначительно. Так, у мышей этот показатель составляет 5–15%, у свиней — 10–15%, у кроликов — 10%, у овец, коз и коров — 5–10%

Можно выделить следующие этапы получения трансгенных животных:

- 1) получение зигот от гормонально стимулированных самок;
- 2) микроинъекция раствора ДНК генных конструкций в мужской пронуклеус зиготы;
- 3) трансплантация проинъецированных зигот самкам-реципиентам, подготовленным для вынашивания беременности;
- 4) анализ родившихся потомков на присутствие трансгена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ);
- 5) анализ трансгенных животных по наследованию трансгена, экспрессии рекомбинантного белка, его биологической активности; необходимо узнать, активен

Вот далеко не полный список фармакологически ценных белков человека, полученных от трансгенных мышей: интерферон, фактор свертываемости крови IX, сывороточный альбумин, некоторые иммуноглобулины и многие другие белки, которые уже рекомендованы для создания молочных биореакторов

ли встроенный трансген, передается ли он потомкам, обладает ли белок всеми биологическими свойствами его природного аналога и соответствует ли уровень продукции биотехнологическим целям;

б) создание линии (стада) трансгенных животных для научных или биотехнологических целей.

## Животные-биореакторы

Получение терапевтически ценных белков человека в молоке трансгенных животных — одно из перспективных направлений современной биотехнологии. Стратегия создания сельскохозяйственных молочных животных в качестве биореакторов основана на введении в управляемую регуляторными элементами одного из «генов молока» коровы, козы или овцы комбинированной генетической конструкции, содержащей последовательность ДНК человека, кодирующую необходимый белок. Согласно этой стратегии, такие трансгенные животные способны синтезировать на высоком уровне белок человека исключительно в молочной железе и секретировать его в молоко, которое в свою очередь становится источником для выделения белка человека.

В настоящее время имеются примеры успешного применения этой технологии, и созданы трансгенные козы, овцы, кролики, свиньи — продуценты человеческих белков:  $\alpha$ -антитрипсина, сывороточного реактивного белка С, антитромбина, факторов VIII и IX свертываемости крови, лактоферрина, кальцитонина и др. (Wall et al., 1997; Rudolph, 1999; Гольдман и др., 2002).

Фармакологический рынок рекомбинантных белков, полученных из молока трансгенных домашних животных оценивается в 1 млрд долл. в настоящее время и прогнозируется его развитие до 18,6 млрд долл. к 2013 г. (Niemann и др., 2007).

Тестирование новых генно-инженерных конструкций, как правило, производится на трансгенных мышах из-за того, что большинство крупных животных — потенциальных продуцентов лекарственных белков человека имеют длительный репродуктивный период и к тому же дорого обходятся. Анализ генетических конструкций на трансгенных мышах позволяет быстро отобрать из них наиболее перспективные как по уровню продукции



Последний день эксперимента на козах по получению трансгенных коз с геном Г-КСФ человека. Осень, 2007 год



После этого эксперимента в марте 2008 г. на свет появилось 24 козленка. ПЦР-анализ всех козлят показал, что только три козленка — трансгенные, несущие Г-КСФ человека. Один из трансгенных козлят, к сожалению, родился мертвым. Фото сделано участником проекта, профессором Vicente Freitas

для тестирования, проведения его предклинических и клинических испытаний и разрешения применения получаемого лекарства в медицинской практике.

Опыт ведущих фармакологических фирм США, Канады и Англии показывает, что такие проекты длятся около 10 лет при высоком уровне финансирования. С сожалением можно отметить, что в России таких технологий практически нет, как и инфраструктуры для их развития, а это означает, что биологически ценные белки человека мы будем покупать за рубежом. А таких белков уже около 60 (Rudolph, 1999).

К тому же досадно, что российские ученые получили и протестировали на трансгенных мышах несколько эффективных генных конструкций для целей биотехнологии (Завадская и др., 2001; Дворянчиков и др., 2005; Гольдман и др., 1998; Zakharova et al., 2006), однако современных биотехнологических ферм в России нет, и эти разработки пока не используются в полной мере.

Скорее как исключение следует отметить два биотехнологических проекта, развивающихся в России.

В рамках российско-бразильского проекта, о котором рассказывается выше, участвуют Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Государственный университет Рио де Жанейро (UFRJ) и Университет штата Сеара (UECE), в июле 2006 г. получена трансгенная коза с геном Г-КСФ человека, конструкция предварительно была протестирована на трансгенных мышах (Dvoryanchikov et al., 2005). Статья, посвященная получению трансгенной козы опубликована в Журнале Академии наук Бразилии (Freitas et al, 2007). Осенью 2007 г. эксперимент успешно повторен, и в марте 2008 г. родились три трансгенных козленка, из которых сейчас успешно подрастают только двое — Камилла и Августин.

заданного белка, так и по его биологическим свойствам.

Проекты по получению трансгенных биореакторов, как правило, состоят из трех частей: создание генетической конструкции, включающей ген человека под управлением регуляторных областей одного из «молочных генов» (например, казеиновых), тестирование ее на трансгенных мышах и, наконец,

введение отобранных конструкций в геном молочных животных.

Получение эффективного продуцента — большая удача и гарантия в относительно сжатые сроки создания стада его потомков, обеспечивающих рынок ценным фармакологическим продуктом. При таком стаде создается лаборатория по выделению и очистке рекомбинантного белка, который передается в соответствующие фарминституты



Два трансгенных козленка с геном Г-КСФ человека противоположного пола — Камилла (слева) и Августин (справа), которые родились в марте 2008 года

Второй биотехнологический проект на козах, известный нам пока только из популярной прессы, развивается в совместном российско-белорусском проекте с генетической конструкцией лактоферрина человека. Лактоферрин содержится в женском грудном молоке и является природным антибиотиком, защищающим детский организм от всевозможных болезней. Государственными заказчиками программы выступают Федеральное агентство по науке и инновациям России и Национальная академия наук Белоруссии. Основные исследования проводят специалисты Института биологии гена РАН и Научно-практического центра НАН Белоруссии по животноводству. В конце 2007 г. ученые сумели получить двух трансгенных козлят, которые несут ген лактоферрина человека.

Фотоматериалы получены совместно с участником проекта Л.Е. Андреевой (к.б.н., с.н.с. Института молекулярной генетики РАН (Москва)).

#### Литература

Гольдман И.Л. и др. Лактоферрин: свойства и перспективы биотехнологического производства // Биотехнология. — 1998. — № 4. — С. 3—16.

Гольдман И.Л. и др. Трансгенные козы в мировой фармацевтической промышленности XXI века // Генетика. — 2002. — Т. 38, № 1. — С. 5—21.

Завадская Е.С. и др. Получение рекомбинантного эндостатина в молоке трансгенных мышей // Генетика. — 2001. — Т. 37. — С. 1207—1212.

Dvoryanchikov G.A. et al. Secretion of Biologically Active Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) in Milk of transgenic Mice // Russian J. of Genetics. — 2005. — V. 41, N. 10. — P. 1088—1094.

Freitas V.J. et al. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil // Ann. Braz. Acad. Sci. — 2007. — V. 79 N. 4. — P. 585—592.

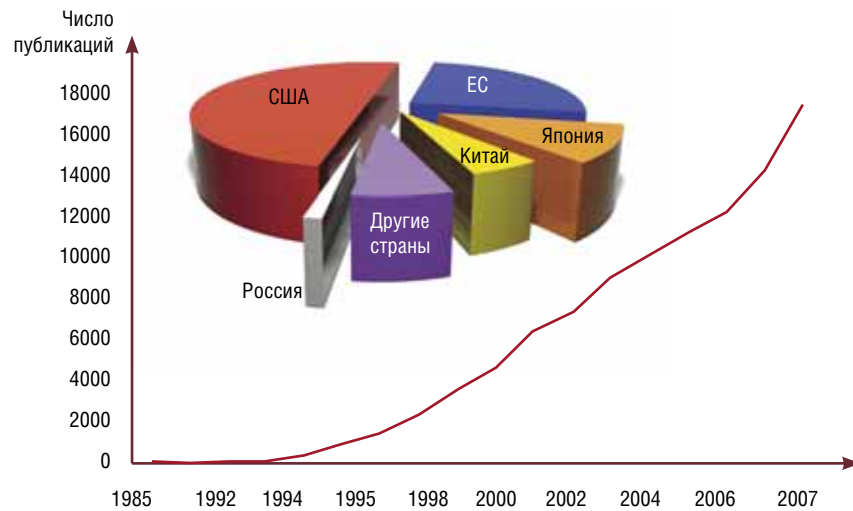
Hubel K. et al. Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary // Ann. Hematol. — 2003. — V. 82. — P. 207—213.

Niemann H. et al. Transgenic farm animals: an update // Reprod. Fertil. Dev. — 2007. — № 19. — 762 p.

Wall R.J. et al. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale // J. Dairy Sci. — 1997. — V. 80. — P. 2213—2224.

Wall R.J. Transgenic livestock: progress and prospects for the future // Theriogenology. — 1996. — V. 45. — P. 57.

Zakharova E.S. et al. Transcription and mRNA splicing of the human lactoferrin gene controlled by the regulatory region of the bovine alphaS1 casein gene in the mammary gland of transgenic mice and in mouse embryonic stem cells // Dokl. Biochem. Biophys. — 2006. — N. 411. — P. 336—338.



Кривая роста числа публикаций с использованием материалов по изучению трансгенных мышей и вклад разных стран мира (круговая диаграмма) в общее число публикаций. Данные получены на основе запроса (*transgenic mouse*) на сайте PubMed. К моменту выхода статьи общее число публикаций перевалило за 100 000

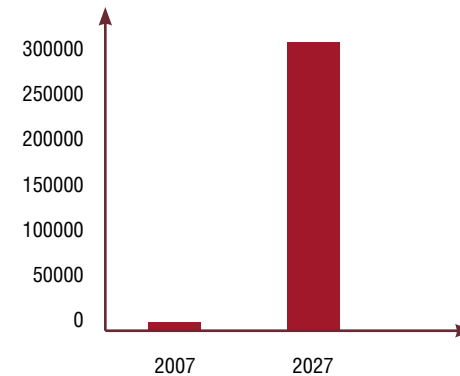
«Три ипостаси» генетически модифицированной мыши:  
 1) объект исследования;  
 2) инструмент исследования;  
 3) звено в биотехнологическом производстве

за морфофункциональными процессами, происходящими в организме. И, наконец, уже созданы трансгенные мыши, которые могут стать реальными звеньями в биотехнологических цепочках, связанных с производством лекарственных препаратов. Иными словами, трансгенная мышь сегодня выступает сразу в трех ипостасях: она может быть и *объектом исследования*, и его *инструментом*, и *производительной мощностью* в биотехнологическом цикле.

### Ген в нокауте

Сегодня редкая зарубежная статья, посвященная механизмам функционирования организмов, обходится без использования нокаутных животных. Значимость этого подхода отмечена Нобелевской премией 2007 г. в области физиологии и медицины, которую разделили М. Капекки (США), О. Смитис и сэр М. Эванс (Великобритания). Премия была присуждена за «Открытие принципов введения специфических генных модификаций в организм мышей посредством эмбриональных стволовых клеток», т. е. за изобретение *метода нокаута (gene knockout)* отдельных генов.

С помощью этого метода удалось показать, что выключение гена может отражаться не только на «целевых признаках», контролируемых этим геном, но и на многих других характеристиках организма. Это хорошо известное классическим генетикам так называемое *плейотропное действие* генов. Однако масштабы плейотропии, которые наблюдаются при изучении нокаутных генотипов, часто превосходят самые смелые ожидания. Нужно заметить, что при этом наши современники нередко попадают в ситуацию, подобную аристотелевской в отношении роли мозга. Однако в отличие от античных ученых они довольно быстро находят правильные решения, поскольку следуют экспериментальным принципам Гарвея, даже если и не отдадут себе в этом отчета.

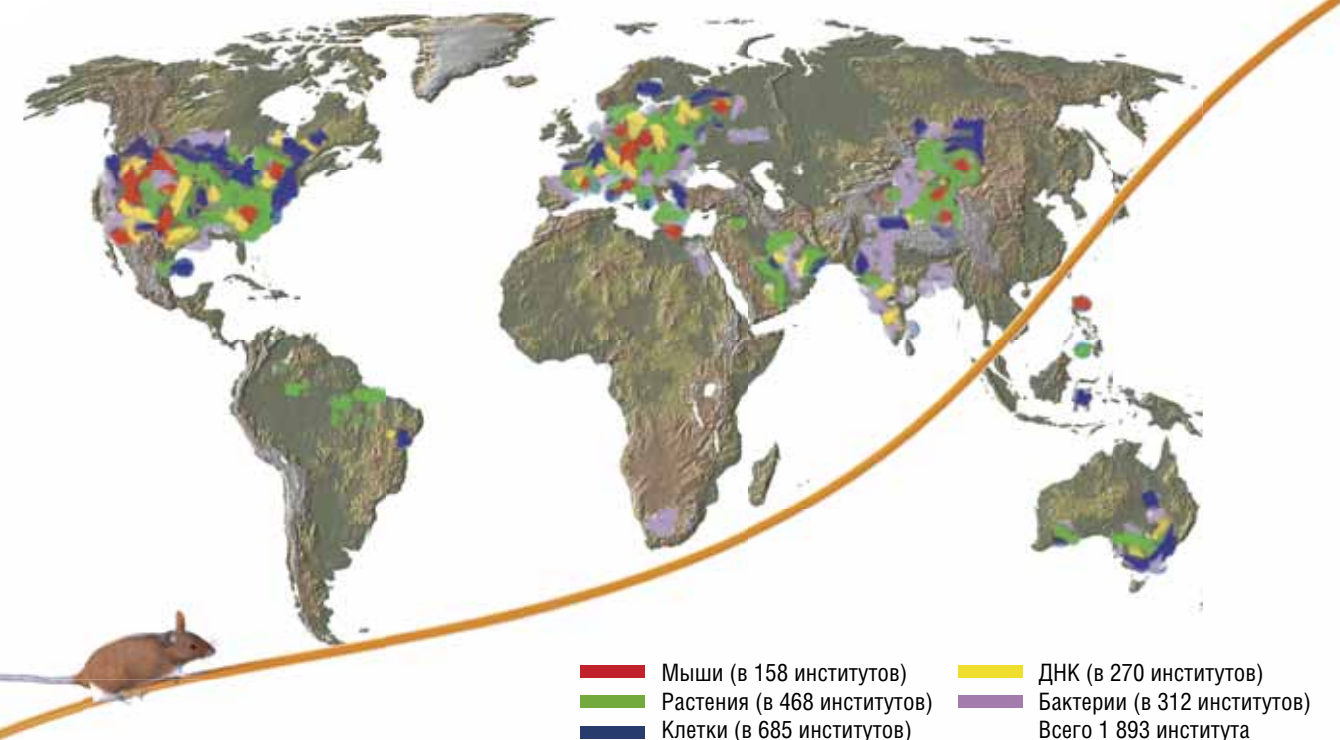


Основные источники разнообразия мышиных линий:  
 1) трансгенез;  
 2) точечные мутации (ENU);  
 3) селекция

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 три транскрипционных фактора, чья экспрессия меняется в строгом соответствии с суточным ритмом. Для выяснения их роли в 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. В кулуарах уже стали обсуждать глубокий биологический смысл библейской недели, но все разрешилось самым прозаическим образом.

Появившийся у нокаутных мышей недельный ритм проявлялся главным образом в массовой гибели животных по понедельникам и четвергам. Выяснилось, что согласно графику уборки помещений в эти дни в виварии работали пылесосы, шум которых вызывал у животных эпилептические припадки. Специальное исследование показало, что выключение транскрипционных факторов попутно приводило к резкому росту возбудимости мышей, обусловленному дефицитом

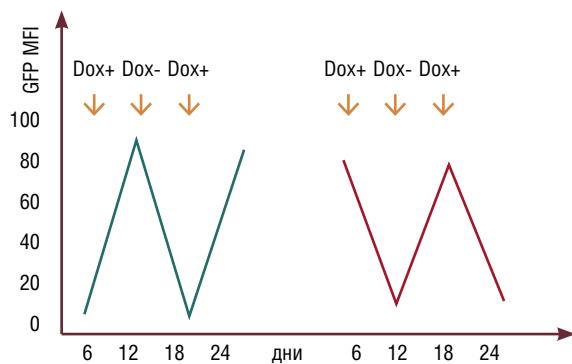
Карта, на которой показано, куда поставляет свои материалы Японский центр биоресурсов. В Россию и Африку биоресурсы практически не поставляются



фермента, катализирующего превращение витамина В6 — кофактора ферментов, участвующих в поддержании баланса важнейших нейромедиаторов. Содержательная часть этой работы была опубликована в журнале *Genes & Development* (2004), а анекдотическая распространяется как устное предание.

Другая важная истина, открывшаяся при

изучении нокаутных животных, заключается в том, что мы недооцениваем *компенсаторные возможности* организмов. Некоторые 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 может компенсироваться в ходе онтогенетического развития за счет других систем организма. Таким образом, на примере каждой нокаутной линии мы, по сути, исследуем не только роль определенного гена, но и работу компенсаторных механизмов, что само по себе интересно и важно.



Демонстрация регулируемой экспрессии GFP в фибробластах из ушных раковин трансгенных мышей. Через 6 дней после добавления (Tet-on) или отмены (Tet-off) доксициклина отмечается экспрессия GFP гена



КОЛОСОВА Наталья Гориславовна — доктор биологических наук, руководитель сектора геномной и постгеномной фармакологии Института цитологии и генетики СО РАН

## Селекция на преждевременное старение

Создание и характеристика биологических моделей социально значимых заболеваний человека — один из подходов к выяснению их этиологии и патогенеза, к разработке новых способов лечения и профилактики.

В последние годы лавинообразно нарастает количество генетических моделей, среди которых доминируют моногенные — это или трансгенные, или животные с нокаутом генов, или животные с определенными мутациями. Такой подход позволяет приблизиться к пониманию вклада конкретного гена в развитие признака, но не воспроизводит фенотипические проявления заболеваний полигенной природы. В полной мере это относится к «заболеваниям пожилого возраста», которые развиваются у людей зачастую параллельно и на фоне комплексных проявлений старения, критический возраст манифестации которых существенно различается. Создание моделей, воспроизводящих такую ситуацию — сложная задача, но именно такой подход представляется оптимальным для поиска и испытания новых способов терапии и профилактики.

В мире существует практически одна признанная модель преждевременного старения: созданная японскими учеными линия мышей SAM (senescence accelerated mouse), которая представлена сегодня 12 сублиниями, различающимися по характеру расстройств в эмоциональной сфере, циркадианных



Линия крыс OXYS. Развитие комплекса признаков преждевременного старения у этих животных — результат направленной селекции крыс Вистар по признаку ранней спонтанной катаракты

ритмов, по степени и природе нарушений когнитивных функций и других проявлений старения. Как показали наши исследования, полноценной моделью преждевременного старения и связанных с ним заболеваний может служить созданная в 70-е гг. прошлого века в Институте цитологии и генетики СО РАН под руководством академика Р. И. Салганика линия крыс OXYS. Развитие комплекса признаков преждевременного старения у этих животных — результат направленной селекции крыс Вистар по признаку ранней спонтанной катаракты.

В пяти первых поколениях развитие этого заболевания провоцировали обогащенной галактозой диетой. К настоящему времени мы имеем 82-е поколение крыс OXYS со спонтанно развивающейся катарактой и сцепленно с ней наследуемым синдромом преждевременного старения. Его проявлениями становятся сниженная на 28% по сравнению с исходной линией крыс Вистар продолжительность жизни и раннее развитие фенотипических проявлений старения и возраст-зависимых заболеваний на фоне ранней инволюции тимуса и снижения активности Т-клеточного звена иммунной системы. В тесном сотрудничестве с коллегами из Института региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, Московского института глазных болезней им. Гельмгольца, Новосибирским научно-исследовательским институтом травматологии и ортопедии нам удалось показать, что развивающиеся у крыс OXYS изменения соответствуют основным критериям моделей таких заболеваний, как сенильная

катаракта, возрастная макулодистрофия и остеопороз. Проявления этих заболеваний воспроизводятся на клиническом и морфологическом уровнях и отвечают на стандартную терапию. Модель плодотворно используется для экспресс-оценки эффективности новых методов диагностики, лечения и профилактики ряда возрастных заболеваний и профилактики преждевременного старения.

Существенно расширить фундаментальные исследования по выяснению молекулярно-генетической природы преждевременного старения позволило сотрудничество с коллегами из МГУ в рамках проекта «Ионы Скулачева». При этом проект нацелен на решение практических задач: разработку фармакологических препаратов, способных осуществлять направленное воздействие на энергетические станции живой клетки — митохондрии, нарушая работу программы старения. Четырех месяцев испытаний на крысах OXYS оказалось достаточно, чтобы показать способность синтезированного под руководством академика В. П. Скулачева митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ («ионы Скулачева») предупреждать и(или) задерживать преждевременное старение и развитие связанных с ним заболеваний у крыс OXYS. Испытания, которые удалось провести за один год, продемонстрировали уникальный лечебный потенциал препарата, его способность не только предупреждать и задерживать развитие катаракты и дистрофии сетчатки, но снижать выраженность уже развитых патологических изменений вплоть до полного их исчезновения.



## Тетрациклиновый выключатель

Для решения ряда задач исследователям нужно не просто выключить тот или иной ген, но добиться изменения его экспрессии в строго определенное время. В этой публикации намеренно не приведены результаты замечательных работ по использованию технологий подавления экспрессии генов путем введения так называемых *антимысловых* или *малых интерферирующих РНК* (*small interference RNA* — siRNA) — это отдельная важная тема. Основное внимание будет уделено трансгенным животным, имеющих благодаря искусству генных инженеров наследственно закрепленные свойства, благодаря которым можно управлять активностью конкретных генов с помощью достаточно простых фармацевтических средств.

Один из подходов к управлению экспрессией генов основывается на создании так называемых *генетических конструкторов*, в которых экспрессию гена контролирует *промотор* (участок ДНК перед самим геном), который запускается определенным лекарственным препаратом (*drug-inducible systems* (DIS) — генные системы, индуцируемые лекарством). 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.

Работу подобных систем наглядно иллюстрирует генно-инженерная конструкция, в которой Tet-off или Tet-on системы регулируют экспрессию гена *зеленого флуоресцирующего белка* (*green fluorescence protein* — GFP), также внедренного в мышинный геном. В результате трансгенные зародыши, несущие подобные конструкции и пересаженные на ранней стадии развития самкам дикого типа, могут менять свою окраску в зависимости от поступления в их клетки доксициклина, который добавляется в питьевую воду матерям, их вынашивающих (Szulc et al., 2006). Контролируемая экспрессия GFP сохраняется и во взрослом состоянии,

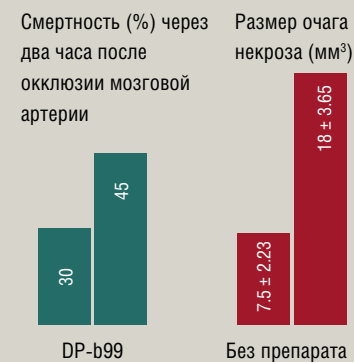


МАРКЕЛЬ Аркадий Львович — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эволюционной генетики Института цитологии и генетики СО РАН. Автор 320 публикаций

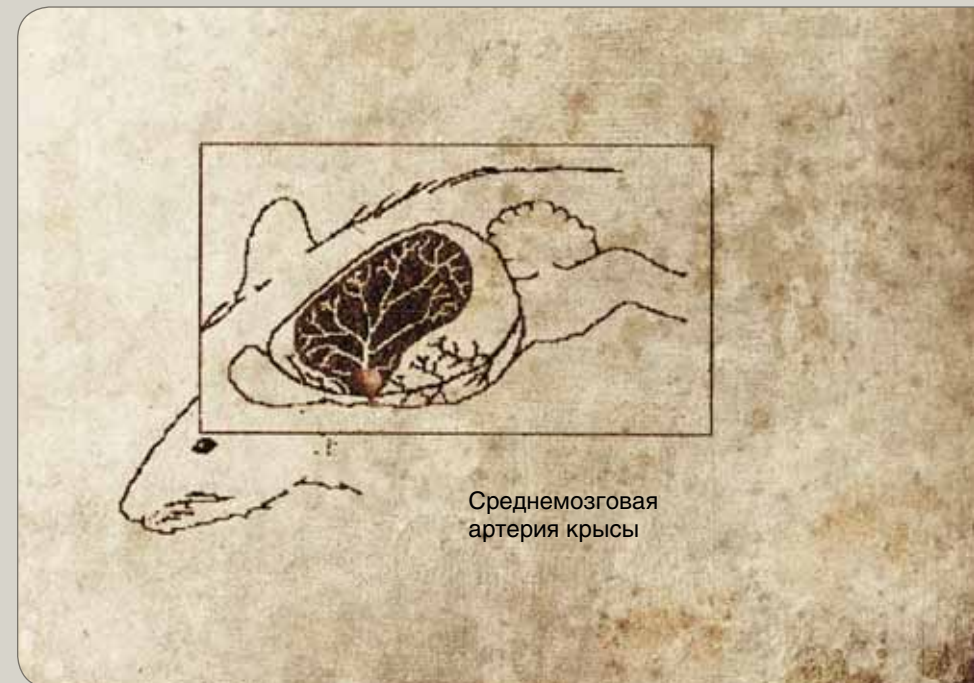
## Селекция гипертоников

Гипертензивные крысы линии НИСАГ со стресс-чувствительной артериальной гипертензией получены в результате многолетней селекции по уровню артериального давления в условиях мягкого эмоционального стресса (Маркель, 1985; Markel, 1991). Исследования причин и генетико-физиологических механизмов формирования стресс-зависимой формы артериальной гипертензии показали, что у крыс НИСАГ действительно имеется генетически обусловленное повышение чувствительности к действию стрессирующих факторов, что выражается прежде всего в формировании стойкого гипертензивного статуса. При снижении порога реагирования на внешнюю стимуляцию повышение артериального давления происходит уже и в обычных «нормальных» условиях. Крылатое выражение Ганса Селье — основателя учения о стрессе, что «вся жизнь — это стресс», очень хорошо подходит для описания подобной ситуации.

О роли стресса как фактора, провоцирующего развитие гипертонической болезни у людей, пишут многие исследователи. При этом имеет значение как наличие генетической предрасположенности к усилению стрессовой реакции, так и все возрастающее давление стресса у популяций людей в индустриально развитых странах с высокой плотностью городского населения и чрезмерным уровнем конкуренции.



Нарушение кровотока в русле среднемозговой артерии у крыс линии НИСАГ с артериальной гипертензией ведет к развитию мозгового инсульта. Введение препарата DP-b99 сразу после развития инсульта значительно уменьшает очаг некроза и снижает смертность в первые часы после инсульта



Оказалось, что механизмы развития артериальной гипертензии у крыс линии НИСАГ адекватно отражают патогенез гипертонической болезни у людей в урбанистических популяциях. Соответствие обнаружено не только на уровне нейроэндокринных и морфофизиологических реакций, но и в характере поведения (высокая мотивированность к конкуренции за «жизненные блага», повышенная агрессивность и усиленная исследовательская активность).

Такая близость нашей экспериментальной модели гипертонической болезни к человеческой патологии позволяет использовать крыс линии НИСАГ не только для изучения механизмов формирования гипертензивных состояний, но и для поиска и испытания новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения гипертонической болезни и ее осложнений. Как известно, одно из грозных осложнений гипертонической болезни — мозговой инсульт.

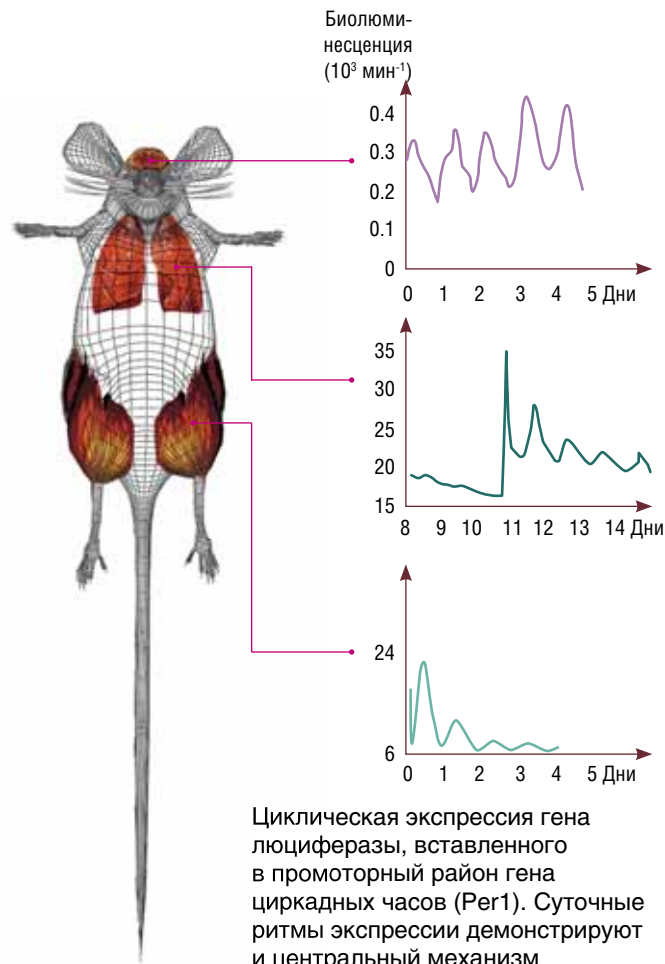
Оказалось, что крысы линии НИСАГ очень чувствительны к нарушениям мозгового кровообращения. Небольшие ограничения притока крови к определенным областям мозга способны привести у крыс НИСАГ к развитию обширного мозгового инсульта и даже к гибели животного. Это сделало их незаменимой экспериментальной моделью для поиска фармакологических препаратов для борьбы с инсультом.

Это обстоятельство послужило основанием для плодотворного международного сотрудничества. Фармацевтическая фирма D-Pharm (Rehovot, Israel), специализирующаяся на разработке новых противоинсультных препаратов, обратилась с просьбой испытать

новый синтезированный в лабораториях фирмы препарат на модели инсульта у крыс линии НИСАГ.

В результате большой экспериментальной работы, проведенной в лабораториях Института цитологии и генетики СО РАН, получены результаты, подтверждающие эффективность нового препарата. Эти результаты послужили основой для проведения клинических испытаний. В пресс-релизе, опубликованном фирмой 3 января 2007 г., приводятся следующие результаты. Закончена вторая фаза клинических испытаний препарата (условное название DP-b99). Препарат использовали для лечения 150 больных ишемическим мозговым инсультом от 7-й до 20-й степени по шкале NIH Stroke Scale (USA). Больные находились в 27 клиниках Германии, Южной Африки и Израиля. В группе больных, получавших препарат DP-b99, отмечено двукратное увеличение числа больных с полным восстановлением всех функций после перенесенного инсульта по сравнению с такой же группой больных, не получавших препарат DP-b99.

Таким образом, новая модель артериальной гипертензии, созданная в Институте цитологии и генетики СО РАН, уже принесла реальную пользу практической медицине. Именно опыты на крысах НИСАГ дали «зеленый свет» для проведения последующих клинических испытаний, которые оказались чрезвычайно успешными. Миллионы больных ждут появления новых эффективных препаратов в борьбе с этим страшным (нередко смертельным) осложнением гипертонической болезни — мозговым инсультом.



Циклическая экспрессия гена люциферазы, вставленного в промоторный район гена циркадных часов (*Per1*). Суточные ритмы экспрессии демонстрируют и центральный механизм биочасов — супрахиазматические ядра (SCN) и периферические органы и ткани. На рисунке суммированы данные, полученные на трансгенных мышах и крысах. По: (Hastings et al., 2003)



ПОПОВА Нина Константиновна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией нейрогеномики поведения Института цитологии и генетики СО РАН. Член Международного общества нейрогенетики поведения (IBANGS) и Serotonin Club. Автор более 350 научных работ

## Генетический нокаут

Согласованная работа медиаторов и модуляторов мозга лежит в основе эмоционального состояния и поведения животных и человека. Эмоции, как и все известные формы поведения — агрессия, половое поведение, сон и бодрствование, привыкание и пристрастие к алкоголю и наркотикам, — реализуются действием определенных медиаторных систем с участием разных типов рецепторов к этим медиаторам. Беспрецедентные международные консорциумы «Геном человека» и «Геном мыши» показали значительное сходство этих геномов и сделали мышь излюбленным объектом генетики. Перед исследователями основного регулятора поведения — мозга — открылись принципиально новые возможности, связанные с поразительными успехами в расшифровке структуры генов и создании методов получения трансгенных и нокаутных мышей.

Стратегия генетического нокаута позволяет получать линии мышей с необратимым селективным повреждением конкретного гена и, соответственно, отсутствующим в организме животного специфическим белком — рецептором или ферментом метаболизма медиатора. Эта методология вызвала огромный интерес в результате чего были выведе-

**МОНОАМИНОКСИДАЗА А**

Фермент метаболизма серотонина, дофамина и норадреналина, которые регулируют:

- поведение;
- эмоции;
- реакцию на стресс

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НОКАУТ MAO A**

Увеличение в мозге уровня серотонина, дофамина и норадреналина. В результате:

- агрессивность, «асоциальность»;
- снижение исследовательского поведения;
- снижение реакции на стресс;
- устойчивость к алкоголю

дены уже более тысячи линий мышей с отсутствием какого-либо гена. Важнейшее достоинство стратегии генетического нокаута то, что она моделирует определенные типы наследственной neuropathology. Так, в середине 90-х гг. XX в. Бруннер (Brunner) описал обширное голландское семейство, в котором выявлены мужчины с признаками умственной недостаточности и проявлением импульсивной агрессии. У них была идентифицирована точечная мутация в восьмом экзоне локализованного в X-хромосоме структурного гена моноаминоксидазы А (MAO A) — одного из основных ферментов катаболизма медиаторов мозга серотонина, дофамина и норадреналина. А через год французские исследователи из Института Кюри были получили линию трансгенных мышей с необратимо разрушенным геном MAO A. При этом принципиально важно, что у линии мышей с отсутствующим геном MAO A обнаружены изменения в уровне серотонина, дофамина, норадреналина и их метаболитов, а также высокая агрессивность, сходные с описанными при точечной мутации этого гена у человека. Как показали наши исследования, для мышей с генетическим нокаутом MAO A характерно снижение исследовательского поведения и усиление разных видов агрессивного поведения. Важной особенностью нокаутных мышей является их асоциальность. «Нормальные» мыши интенсивно дерутся только в первые часы после создания новой группы, затем в сообществе устанавливается определенная иерархия и жестоких драк не происходит. В отличие от них, в группе MAO A-нокаутных драки не прекращаются, приводя к

гибели части животных. Другой особенностью мышей с отсутствующим геном MAO A является сниженная реакция на большинство видов острого стресса и на хронический стресс.

Важный вывод, вытекающий из уже известных данных по нокаутным мышам, заключается в том, что отсутствие одного рецептора или фермента, даже очень важного для функционирования нескольких медиаторных систем, каким является MAO A, не приводит к всеобщей дезорганизации регулируемых этими медиаторами функций. Стратегия генетического нокаута отчетливо демонстрирует менделевский принцип: один ген — один белок. Разрушение гена, контролирующего синтез определенного белка, приводит к полному отсутствию этого белка — фермента или рецептора в организме. Однако другой принцип: один ген — одно нарушение функции (one gene, one disorder) (Plomin et al., 1994), как правило, не выполняется.

Это соответствует распространенному как в генетике, так и в физиологии представлению о том, что любая сложная физиологическая функция или поведение регулируется не одним геном, а ансамблем генов и, соответственно, по крайней мере несколькими медиаторными системами. Все это свидетельствует о сложности и многофакторности регуляции любого адаптивно значимого вида поведения и огромных компенсаторных возможностях организма. Это делает нокаутных мышей не только уникальной моделью для изучения наследственных психопатологий, но и ценной моделью для выявления механизмов их компенсации.

о чем свидетельствует флюоресценция фибробластов, выделенных из ушных раковин взрослых трансгенных особей. Также экспериментально доказано, что подобные трансгенные конструкции, управляющие экспрессией GFP, передаются по наследству.

Но существуют еще более интересные приложения Tet-off/Tet-on систем. Оказывается, под управляемый доксициклином промотор можно поставить небольшой (40–50 оснований) палиндром, частично комплементарный к участку гена, интересующего исследователей. При экспрессии подобной конструкции будут нарабатываться так называемые *шпильчатые РНК* (small hairpin RNA — shRNA), которые связываются с соответствующими комплементарными последовательностями синтезированной на гене матричной РНК, что приводит к разрушению последней и ингибированию синтеза белка (Szulc et al., 2006).



Таким образом, к настоящему времени созданы предпосылки для получения таких генно-инженерных систем, которые позволяют запускать или подавлять экспрессию нужного гена у лабораторной мыши в любой заданный момент времени простым введением антибиотика. К этому можно добавить, что имеются и другие трансгенные конструкции, обеспечивающие подавление экспрессии целевого гена или генов в нужном месте (тканеспецифическое управление работой генов).

## Лучше один раз увидеть...

Упомянутый выше ген GFP используется не только для демонстрации работоспособности Tet-off/Tet-on-конструкций. Например, клетки, полученные от животных с постоянной экспрессией этого гена, можно наблюдать при их введении в организм, у которого этого гена нет.

Ярким примером подобного использования служат работы, посвященные изучению миграции плодовых клеток в материнском организме. Дело в том, что клинические исследования показали, что в тканях женщин можно обнаружить «мужские» клетки, несущие Y-хромосому (Bianchi et al., 1996). Единственный, не мистический путь появления подобных клеток в женском организме — их миграция через плацентарный барьер при вынашивании мальчика. Такой *микримеризм* послужил основой для дискуссии о патогенетической роли плодовых клеток, поскольку последние с большей вероятностью обнаруживаются у женщин, страдающих аутоиммунными заболеваниями (Johnson, Bianchi, 2004). Но чтобы ответить на вопрос, являются ли иммунологически чужеродные клетки причиной болезни или они лишь накапливаются в поврежденных тканях, необходимы детальные исследования перемещения этих клеток в материнском организме как в норме, так и при экспериментальных повреждениях.

Сделать это непросто, поскольку таких клеток немного, а Y-хромосома является хотя и надежным, но не слишком заметным маркером. Существенно облегчить решение сложной задачи могут все те же «зеленые» трансгенные мыши, производящие GFP. Для этого нужно лишь скрестить «зеленых» самцов с обычными самками, а затем проследить пути миграций GFP-экспрессирующих клеток в материнском организме.

С использованием этого подхода было, в частности, обнаружено наличие некоторого числа мужских клеток в тканях мозга самок, причем чаще всего они встречались в отделах, подвергнутых эксперименталь-

ному повреждению (Xiao-Wei Tan et al., 2005). Клетки плода были обнаружены в материнском организме спустя месяц после родов, причем некоторые из них дифференцировались в нейроны. Это позволяет предположить участие эмбриональных стволовых клеток в восстановлении поврежденных отделов материнского мозга. (Подобные научные сведения могут быть с пользой применены нашими политиками, агитирующими российских женщин рожать больше и чаще).

Применение трансгенных конструкций не ограничивается визуализацией движения клеток: оно также позволяет проводить прямую регистрацию экспрессии любых интересующих исследователя генов. В качестве примера можно привести работы из области регуляции циклических процессов, протекающих с суточным или околосуточным (циркадным) периодом в живых организмах. Еще в 1970-е гг. экспериментами на изолированных органах и тканях многоклеточных организмов доказано, что многие из последних обладают способностью к самостоятельной генерации суточных ритмов. Но как работают эти задающие ритм механизмы в рамках целого организма или, как это бывает в иерархически организованных колебательных системах, основную роль водителей ритма выполняет центральный механизм, а все периферические компоненты меняют свою функциональную активность под влиянием команд из центра?

Показателем самостоятельности периферических водителей ритма может быть цикличность экспрессии известных к настоящему времени *часовых генов*. Для наблюдения за уровнем генной экспрессии были созданы трансгенные мыши, у которых промотор одного из часовых генов (*Per1*) запускал также экспрессию гена люциферазы (фермента, катализирующего образование люминесцирующего продукта). При введении в организм субстрата для этого фермента с помощью оптического зонда можно было наблюдать активацию гена люциферазы. Оказалось, что интенсивность свечения при этом в разных органах варьировала с околосуточным периодом, что доказывает самостоятельность работы периферических компонентов часового механизма.

## Мышь-биореактор

Выше упоминалось, что трансгенных мышей можно также использовать в биотехнологических циклах, хотя на первый взгляд этот грызун как продуцент чего-либо полезного выглядит достаточно сомнительно. Но неоспоримым достоинством мыши является то, что она



носит к наиболее освоенным объектам генной инженерии



АМСТИСЛАВСКИЙ Сергей Яковлевич — доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий сектором криоконсервации и репродуктивных технологий Института цитологии и генетики СО РАН. Автор более 80 научных публикаций

## Криоархивирование на примере куницеобразных

В настоящее время кроме *homo sapiens* на Земле обитает еще около 4600 видов млекопитающих. Численность многих из них стремительно сокращается, о чем убедительно свидетельствует Красная Книга (<http://www.redlist.org>). Приведем один конкретный пример: из 37 видов семейства Felidae, лишь судьба домашней кошки не вызывает опасения. Ареал же диких видов кошачьих непрерывно сокращается, многие из них уже занесены в Красную Книгу. Почти столь же остро стоит проблема и в других семействах отряда хищных (Carnivora). Список исчезающих видов куницеобразных, а именно об этом семействе пойдет речь в этом разделе, тоже достаточно впечатляющий (Schreiber et al., 1989).

В связи с тем, что традиционные методы сохранения млекопитающих *in situ* или *ex situ* требуют боль-

детеныши, рожденные в результате трансплантации бластоцист европейской норки хонорику. Фото В. Циндренко

ших финансовых затрат, все более популярными становятся криобанки, в которых можно сохранять генофонд этих видов (Амстиславский, 2006).

Другая причина резко возросшей в последнее время популярности методов репродуктивной биотехнологии заключается в том, что стремительное увеличение числа трансгенных и нокаутных линий мышей создает необходимость их архивирования. Уже существует около тысячи линий крыс и около десяти тысяч линий мышей (Abbott, 2004).

Большая часть этих линий создана в результате трансгенеза, мутагенеза или нокаутирования отдельных генов. Предполагается, что в течение следующих двух десятилетий общее число мышинных линий достигнет 300 000. По образному выражению А. Эбботт, генетики должны готовиться к «потопу» (Abbott, 2004). Зарубежные специалисты по лабораторным животным единодушны в том, что проблему резкого возрастания числа линий лабораторных животных можно решить путем создания криобанка для сохранения этих ресурсов. В настоящее время уже создана Международная федерация генетических центров, снабженных криобанками. В них сохраняют замороженные эмбрионы и сперматозоиды, из которых по мере надобности можно путем эмбриотрансплантации и (или) искусственного осеменения восстановить требуемую линию. В эту федерацию — FIMRe (Federation of International Mouse Resources) вошли ведущие центры Северной Америки, Западной Европы, Японии и Австралии.

В настоящей статье мы расскажем о наших исследованиях, выполненных в содружестве трех институтов (Института цитологии и генетики СО РАН, Института систематики и экологии животных СО РАН и Института прикладной биотехнологии университета г. Куопио, Финляндия) по разработке репродуктивно-биологических подходов и криотехнологий, направленных на консервацию исчезающих видов куницеобразных.

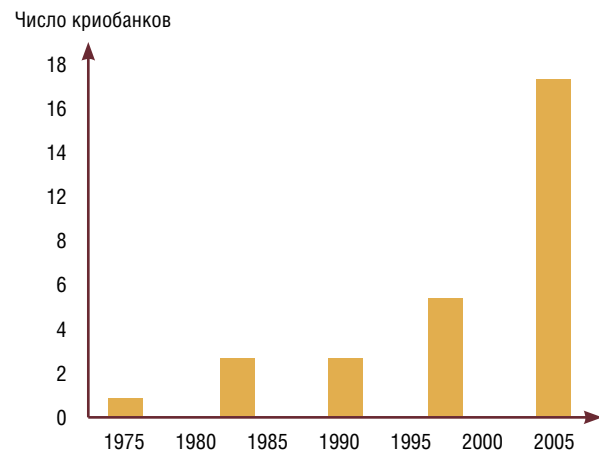
Работа по этому проекту изначально велась на хорьках и отчасти на горностаях. Цель первого этапа — показать, что эмбрионы куницеобразных



среди млекопитающих. Поэтому когда возникла идея получать человеческие антитела не от вакцинированных людей, а от других животных, ученые обратились именно к мышам. Были получены трансгенные животные, у которых мышинные гены, кодирующие легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, были заменены на соответствующие гены человека (Jakobovits et al., 2007).

Создание таких животных шло в несколько этапов. Сначала были получены линии мышинных эмбриональных стволовых клеток, у которых путем нокаута инактивированы гены собственных иммуноглобулинов, а также линии, в которые были внедрены гены иммуноглобулинов человека. На основе этих линий получены трансгенные мыши. При их скрещивании выделена линия XenoMouse, у которой мышинные иммуноглобулиновые гены полностью замещены соответствующими генами человека.

Таким образом, появилась возможность использовать мышиную систему иммунного распознавания чужеродных антигенов для получения клонов В-лимфоцитов, вырабатывающих специфические иммуноглобулины человека. На их основе можно создавать *гибридомы* — клеточные линии, полученные путем слияния иммунных клеток с опухолевыми, которые производят моноклональные антитела по уже известной технологии.



В 1972 г. был открыт способ криоконсервации эмбрионов мышей, а в 1976—1978 гг. — заложен первый криоархив (в Джексоновской лаборатории, Бар Харбор, США) В 2005 г. — создана мировая федерация мышинных ресурсов (FIMRe), куда вошло 17 центров (Mammalian Genome, 2006)

Первыми такими иммуноглобулинами, прошедшими клинические испытания, стали антитела против интерлейкина-8, которые использовали для подавления иммунных процессов при обострении псориаза. Принципиально важным можно считать тот факт, что ни у одного из пациентов не было выявлено аллергической реакции на эти иммуноглобулины (Davis et al., 1999).

В настоящее время стадию предклинических и клинических испытаний проходят более десяти вариантов моноклональных антител, полученных с использованием трансгенных мышей линии XenoMouse.

В основном это антитела против различных факторов роста или их рецепторов, применение которых позволяет ограничить

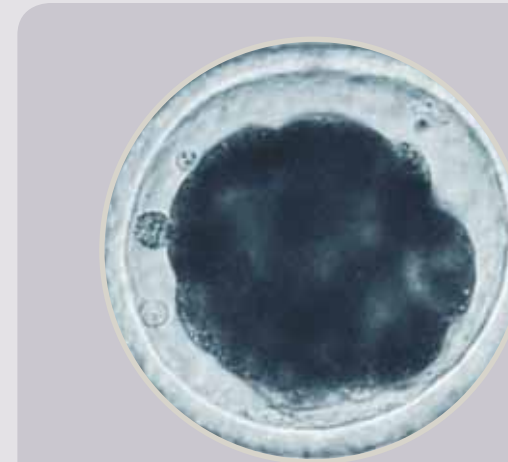
рост злокачественных опухолей, и даже более — вызывать их обратное развитие (Jakobovits et al., 2007).

## В перспективе — мышинное наводнение

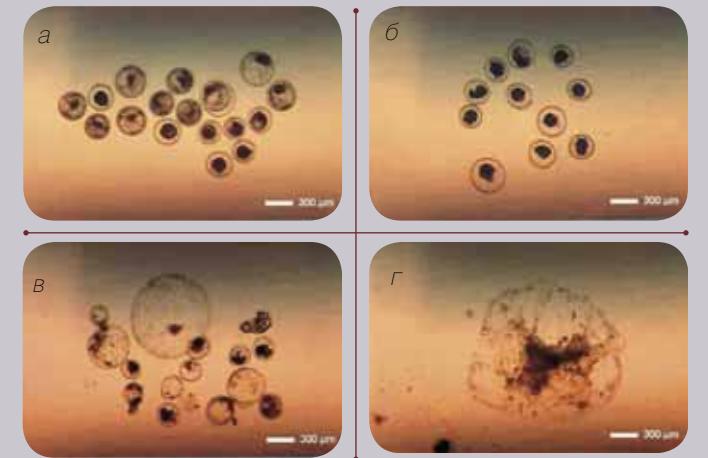
Итак, расшифровка геномов человека и многих лабораторных животных, вкупе с развитием генно-инженерных технологий, открыли практически неограниченные возможности для создания живых «экспериментальных моделей». Уже сегодня общее число генетических линий и стоксов мышей, содержащихся в мировых центрах «мышеводства», перевалило за 20 тысяч.

И число их продолжает стремительно увеличиваться. Достаточно сказать, что один только проект КОМП (Knockout Mouse Project — Проект «нокаутные мыши»), организованный по инициативе Национального института здоровья США, нацелен на создание линий мышинных эмбриональных стволовых клеток с нокаутами по каждому гену. Таким образом, по завершению этого проекта будет получено около 25 тысяч новых клеточных линий (Austin, et al., 2004)! И произойдет это достаточно скоро: один из участников проекта (Wellcome Trust Sanger Institute) информировал, что его производственные мощности позволяют получать 5 тысяч клеточных линий в год.

В проекте также предусмотрено финансирование работ по оптимизации технологии получения нокаутных мышей на основе вновь созданных линий эмбриональных стволовых клеток; по информационному обеспечению; по развитию систем хранения и распределения мышей с различным генотипом. Всего в проекте участвует 19 институтов и научно-исследовательских центров, работающих в разных областях биологии и биомедицины.



Морула европейской норки (*Mustela lutreola*) при световой микроскопии. Темный цвет обусловлен обилием липидных гранул, из-за которых большинство попыток получения потомства после криоконсервации зародышей хищных заканчивалось неудачей. Фото Е. Кизиловой



Развитие эмбрионов хорька в культуре in vitro после криоконсервации:

- а. Эмбрионы хорька до замораживания.  
 б. Те же эмбрионы после криоконсервации.  
 в. Те же эмбрионы после четырех дней культивирования.  
 г. На восьмой день культивирования один из зародышей прикрепился ко дну чашки Петри

способны переживать криоконсервацию при температуре жидкого азота, т.к. на момент начала проекта в мире не было ни одного позитивного результата. Более того, способ замораживания эмбрионов хищных млекопитающих вообще отсутствовал, была лишь одна успешная попытка: в 1988 г. Б. Дрессер с соавторами (США) получили живых котят из эмбрионов, которые хранились в криобанке (Dresser et al., 1988).

Задача этого этапа — поиск и разработка адекватных способов получения эмбрионов куницеобразных и их трансплантации. В качестве экспериментальной модели выбран черный хорек (*Mustela putorius*) и его одомашненная форма — хорек фуру (*Mustela putorius furo*), которые являются ближайшими родственниками исчезающей европейской норки. Кроме того, первые эксперименты по криоконсервации эмбрионов проводились нами также и на эмбрионах горностая (*Mustela erminea*) (Amstislavsky et al., 1996; Кизилова и др., 1998).

На уникальной ферме куницеобразных, основанной супругами Терновскими в конце 1960 — начале 1970-х гг. в Академгородке (Ternovskaya et al., 2006), нами проведены успешные трансплантации эмбрионов между разными хорьками. Показательны эксперименты по трансплантации эмбрионов между хорьком фуру и черным хорьком. Однако неоднократные попытки получить живое потомство после пересадки эмбрионов хорька, прошедших полный цикл «замораживания — криоконсервации — размораживания», не привели к желаемому результату.

В этот период мы полностью осознали, насколько капризны эмбрионы хищных в плане их заморозки и почему подавляющее большинство попыток замораживания эмбрионов псовых и кошачьих заканчивались неудачей. Дело в том, что в эмбрионах хищных (Carnivora) содержится много липидных гранул, которые чувствительны к процедурам криоконсервации. В эмбрионах же лабораторных грызунов и большинства видов сельскохозяйственных животных этих гранул существенно меньше. Именно по этой причине во всем мире большинство попыток получить потомство после криоконсервации зародышей хищных заканчивались неудачей.

К этому времени у нас накопился достаточный опыт и в изучении репродуктивной биологии куницеобразных, и в практической трансплантации эмбрионов разных видов млекопитающих. Более того, к этому моменту мы разработали оптимальную биологическую модель трансплантации эмбрионов хорька. В связи с этим С. Я. Амстиславский был приглашен в Институт прикладной биотехнологии университета г. Куопио (Финляндия) для участия в проекте по трансплантации и криоконсервации эмбрионов хорька.

Ранее автором было замечено, что основные (видимые в световой микроскоп) структурные нарушения эмбрионов хорька и горностая, подвергавшихся процедурам замораживания и криоконсервации, наступают лишь на этапе отмычки от криопротектора. Возникла идея исключить этот этап и сразу из соломины в среде,



С. Я. Амстиславский проводит трансплантацию эмбрионов хорька, подвергавшихся замораживанию и криоконсервации. В результате трансплантации родилось живое потомство. Фото Хели Линдеберг

содержащей криопротектор, пересадить эмбрионы в матку реципиента. Сложность осуществления задуманного заключалась в том обстоятельстве, что глицерин и ДМСО (диметилсульфоксид), которые использовались в качестве криопротекторов при замораживании эмбрионов, очень токсичны. Помог счастливый случай. Именно в это время начинал «входить в моду» этиленгликоль, менее токсичный криопротектор, который мы и решили попробовать вместо ДМСО и глицерина. Кроме того, еще в Новосибирске, нами отработывалась процедура трансплантации эмбрионов в минимальном объеме среды. Это «ноу-хау» оказалось особенно важным теперь, когда мы решили трансплантировать эмбрионы непосредственно в матку, минуя этап отмывки от криопротектора.

Уже в самом начале финского этапа международного проекта удалось получить обнадеживающий предварительный результат. Мы показали, что эмбрионы хорька, прошедшие цикл «замораживания—криоконсервации—размораживания» с этиленгликолем, способны возобновить дальнейшее развитие в условиях *in vitro* вплоть до завершающего этапа — имплантации (Amstislavsky et al., 2000).

Вскоре нам удалось получить и живых хорчат после криоконсервации эмбрионов. Именно «трансплантация без отмывки» оказалась наиболее успешной. После «трансплантации с отмывкой» также родились хорчата, но их было намного меньше, чем при первом (инновационном) подходе (Lindeberg et al., 2003). По-другому мы подробно исследовали биологическую модель трансплантации эмбрионов у этого вида (Lindeberg et al., 2002). Изучили, сколько эмбрионов нужно пересаживать реципиенту, на какой день псевдобеременности, какова должна быть точность синхронизации донора и реципиента и т. д. Все это было очень важно для успеха проекта, т. к. из практики работы на разных видах млекопитающих, в том числе на лабораторных и сельскохозяйственных, нам было хорошо известно, чем больше имеется эмбрионов перед началом замораживания и чем эффективнее отработаны методы их трансплантации, тем выше шанс получить позитивный результат (Амстиславский и др., 1991).

После пресс-конференции в 2001 г., наша группа стала своего рода знаменитостью в Финляндии. Результат, так впечатливший журналистов, действительно интересный. На тот момент это был первый в мире успех криоконсервации зародышей вида, принадлежащего к отряду Carnivora, не учитывая опыт с зародышами домашней кошки. Фотографии хорчат опубликовали во многих газетах, в том числе и в «Helsingin sanomat».

В дальнейшем мы возобновили эксперименты по эмбриотехнологии куницеобразных на базе фермы Терновских. Эти работы были поддержаны в 2002—2006 гг. совместным проектом Российской и Финской академий наук. То, что экспериментальная активность по проекту вновь переместилась в Новосибирск, было связано с важным обстоятельством: в мире существует лишь четыре фермы, где в неволе разводят ближайшего исчезающего родственника хорька — европейскую норку. Еще каких-то 100—150 лет назад ареал его распространения простирался по всей Европе и даже доходил до бассейна р. Оби (Schreiber et al., 1989; Терновский, Терновская, 1994). К настоящему времени от этого ареала остались лишь три «островка», а именно: западная популяция в Пиренеях, южная популяция в дельте р. Дунай и северо-восточная популяция в России и Белоруссии.

Однако, несмотря на осознание проблемы научной общественностью и экологами, исчезновение этого вида продолжается.

Размножающиеся в неволе европейские норки становятся главным гарантом того, что этот вид полностью не исчезнет, и именно эти особи, способные размножаться в неволе, станут основой для изучения репродуктивной биологии данного вида и экспериментов по реинтродукции в природу (Терновский, Терновская, 1994).

Европейскую норку разводят в неволе в Эстонии, Германии, Испании, но в новосибирском Академго-

Один из первых выводков, полученных в 1998 г. после трансплантации эмбрионов хорька, прошедших полный цикл «замораживание — криоконсервация — размораживание». Фото Хели Линдеберг



родке это стали делать первыми в мире. И несмотря на то, что инвестиции в зарубежные фермы (особенно в недавно отстроенный центр в Испании) несравнимы с затратами на поддержание фермы Терновских, именно здесь плодовитость при размножении данного вида остается наиболее высокой по сравнению с зарубежными (Ternovskaya et al., 2006). Тиит Маран — один из лидеров в области сохранения европейской норки, руководитель центра в Эстонии, где этого зверя также разводят в неволе, и, пожалуй, один из самых авторитетных экспертов по этому виду в мире (<http://www.lutreola.ee/>), не перестает этому удивляться!

Именно на базе фермы Терновских, начиная с 2002 г., мы сосредоточились на изучении репродуктивной биологии европейской норки и разработке эмбриотехнологических подходов к консервации этого вида. Мы попробовали создать эффективную модель трансплантации эмбрионов гибридам европейской норки и хорька. Таких гибридов, носящих название хонорики и нохорики, в течение многих лет получают на ферме ИСиЭЖ СО РАН. Хонорики — гибриды самца хорька и самки европейской норки — впервые были получены супругами Терновскими (Терновский, Терновская, 1994). Этот метод широко вошел в практику, и сейчас слово «хонорик» уже никого не удивляет. Обратное скрещивание — самки хорька с самцом норки, — впервые осуществлено в 2001 г., и пока «нохорики» получены только на ферме Терновских (Ternovskaya et al., 2006).

Гибридизация хорька и норки может наблюдаться и в природе. Кстати, это явление считают одной из причин исчезновения европейской норки. Мы попытались

обратить феномен гибридизации с хорьком во благо исчезающего вида и добились успеха.

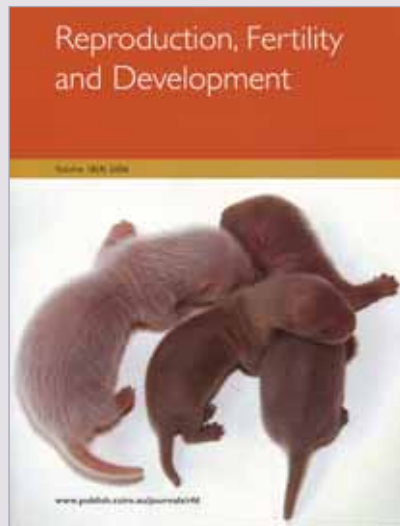
В 2002—2004 гг. мы трансплантировали в общей сложности 56 эмбрионов норки девяти самкам хонорика. При этом родилось 28 детенышей. Кроме того, 16 эмбрионов европейской норки трансплантировали трем самкам нохорика, из которых родилось 8 норчат. Таким образом, при обоих типах трансплантации эффективность составила 50%. (Amstislavsky et al., 2004, 2006).

Один раз мы пересадили самке хонорика 5 эмбрионов норки и 5 эмбрионами хорька. В итоге на свет появился выводок, состоящий из норчат и хорчонка. Этот результат так понравился редакторам журнала «Reproduction Fertility and Development», что фотография этого выводка была вынесена на обложку журнала. (Amstislavsky et al., 2006)

И в самом деле, случай уникальный: родными, а точнее, единоутробными братьями и сестрами стали представители разных видов — хорька и норки.

Несмотря на эти успехи остаются еще важные проблемы, требующие решения. Так, например, эффективность криоконсервации эмбрионов куницеобразных остается пока низкой: лишь 11% эмбрионов хорька подвергшихся «замораживанию—криоконсервации—трансплантации», развились в живых хорчат. Это гораздо ниже эффективности процедур трансплантации для лабораторных или некоторых сельскохозяйственных животных.

Кроме того, прямая трансплантация между европейской норкой и хорьком пока не приводит к рождению потомства. При попытках межвидовой трансплантации эмбрионов, даже между близкородственными видами чаще всего возникают проблемы, обусловленные



Реальный опыт применения репродуктивных технологий для сохранения генофонда. На примере куницеобразных

различием гормональных и иммунных механизмов поддержания беременности у этих видов. Для преодоления межвидового барьера необходимо хорошо изучить их репродуктивную биологию (Амстиславский, 2006).

**В** заключение хотим отметить, что в результате этого проекта впервые показана принципиальная возможность криоконсервации эмбрионов куницеобразных и создана модель трансплантации эмбрионов исчезающего вида — европейской норки. Следует отметить, что наши разработки высоко оцениваются. В 2003 г. на Первой международной конференции по сохранению европейской норки (Logrono, Spain) это направление было одобрено и получило официальное признание в резолюциях конференции.

В 2008 г. нами получен грант РФФИ (№ 08-04-49088) для изучения межвидового репродуктивного барьера между европейской норкой и хорьком и разработки подходов к его преодолению, и уже есть первые результаты (Amstislavsky et al., 2008). Эти успехи дают надежду на

дальнейшее развитие этого направления, а также на то, что на базе изучения специфики репродуктивной биологии этого вида и его ближайших сородичей рано или поздно будет создан оптимальный пакет репродуктивных технологий, который позволит сделать криобанк эмбрионов одним из основных инструментов сохранения европейской норки.

Другим основанием для оптимизма является то, что американский сородич европейской норки, черноногий хорек (*Mustela nigripes*), который еще недавно считался исчезающим видом, и даже существовало убеждение, что он безвозвратно исчез, в настоящее время практически находится вне опасности (Grenier et al., 2007). А ведь именно серьезное изучение репродуктивной биологии этого вида куницеобразных, отработка методов разведения в неволе и ре-интродукции, а также применение репродуктивных биотехнологий как ключевого элемента всей программы обеспечило этот успех.

#### Литература

Амстиславский С.Я. и др. Методы биотехнологии в практике разведения животных. — Новосибирск: Изд-во ИЦиГ, 1991. — 170 с.

Амстиславский С.Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих: дисс. д-ра биол. наук. — Новосибирск, 2006. — 265 с.

Кизилова Е.А. и др. Влияние криоконсервации на морфологию бластоцист хорька // Онтогенез. — 1998. — Т. 29. — С. 1–8.

Терновский Д.В., Терновская Ю.Г. Экология куницеобразных. — Новосибирск: Наука, 1994. — 223 с.

Abbott A. Genetisists prepare for deluge of mutant mice // Nature. — 2004. — N. 432. — 541 p.

Amstislavsky S. et al. Embryo cryobanking for conserving laboratory and wild animal species // Scand. J. of Lab. Anim. Science. — 1996. — N. 23. — P. 269–277.

Amstislavsky S. et al. Ex-situ preservation of Mustelidae: primer of application of genetic resource bank concept with the use of polecats as the model species // Scientifur. — 2000. — N. 24. — P. 45–58.

Amstislavsky S. et al. Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients // Theriogenol. — 2004. — N. 62. — P. 458–467.

Amstislavsky S. et al. Embryo development and embryo transfer in the European mink (*Mustela lutreola*), an endangered mustelid species // Reprod. Fert. Dev. — 2006. — N. 18. — P. 459–467.

Amstislavsky S. et al. Conservation of the European Mink (*Mustela lutreola*): Focus on Reproduction and Reproductive Technologies // Reprod. Domest. Anim. — 2008. — N. 43. — P. 502–513.

Dresser B.L. et al. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring // J. Exp. Zool. — 1988. — N. 246. — P. 180–186.

Grenier M.B. et al. Rapid population growth of a critically endangered carnivore // Science. — 2007. — N. 317. — 779 p.

Lindeberg H. et al. Surgical transfer of in vivo produced farmed European polecat (*Mustela putorius*) embryos // Theriogenology. — 2002. — N. 57. — P. 2167–2177.

Lindeberg H. et al. Surgical recovery and successful surgical transfer of conventionally frozen-thawed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*) // Theriogenology. — 2003. — N. 60. — P. 1515–1526.

Schreiber A. et al. Weasels, Civets, Mongooses and their relatives. An action plan for conservation of Mustelids and Viverrids. — USA: Kelvin Press, 1989. — 99 p.

Ternovskaya Y. et al. Strategies for European mink preservation: International Conference on Conservation of European Mink. 5–8, 2003, Logrono, Spain, Proceedings Book // Gobierno de la Rioja, 2006. — P. 267–279.

К вышесказанному следует добавить, что работы по созданию коллекций эмбриональных стволовых клеток мышей с нокаутами по разным генам сегодня ведутся в Европе, Канаде и Японии. Иными словами, реальность получить в недалеком будущем настоящее мышье «наводнение» уже не вызывает сомнений.

Помимо трансгенной технологии, важным источником генетического разнообразия модельных животных являются *точечные мутации*. Их получают при введении животным *N*-этилнитрозомочевины (*N-ethylnitrosourea* — ENU): этот химический мутаген вызывает единичные замены нуклеотидных оснований, что может оказать значимое влияние на функцию конкретного гена.

Достоинством данного метода является его простота: для получения точечной мутации достаточно однократной инъекции ENU. Однако в отличие от генотипов, полученных с использованием генно-инженерных технологий, местоположение мутации, вызванной химическим мутагеном носит случайный характер. Поэтому требуется проведение значительной работы по ее идентификации, которая начинается с отбора мышей, чей фенотип представляет интерес для дальнейших исследований.

Наиболее масштабные работы по созданию таких генетических моделей мышей выполнены в рамках Мюнхенского ENU проекта. Особо стоит отметить экспресс-методы фенотипического описания мышей, которые были разработаны при его реализации (стандартный протокол фенотипирования включал в себя 135 морфологических, поведенческих и физиолого-биохимических параметров).

Один из наиболее удачных стандартизированных протоколов первичного описания животных, который сейчас используется в разных странах мира, предложен британскими учеными. Он известен по аббревиатуре SHIRPA, в которой последние две буквы (*phenotype assessment*) относятся к содержанию методического подхода, а остальные ведут происхождение от названий университетов и колледжей, в которых протокол разработан.

SHIRPA позволяет в течение 15 минут описать мышь по 58 параметрам, отражающим основные экстерьерные характеристики, показатели двигательной активности и некоторые рефлекторные реакции. Отклонение по этим параметрам является индикатором фенотипически значимых мутаций в генах, контролирующих рост и

развитие животных, работу нервной и нервно-мышечной систем. Этот первичный анализ затем дополняется гематологическими, иммунологическими, биохимическими и эндокринными данными. На следующем этапе животные, отобранные на основе фенотипического скрининга, подвергаются генетическому анализу, который позволяет установить точную локализацию нуклеотидной замены и, соответственно, определить ген, в котором произошла мутация.

Всего с момента основания Мюнхенского проекта (1997) и до настоящего времени проведен скрининг более чем 30 тысяч мышей и получено более 750 линий, на которых проводятся исследования генетических основ отклонений в строении тела, предрасположенности к аллергиям, нарушениям нервной деятельности и обмена веществ.

Помимо полученных в последние годы трансгенных и мутантных мышей и крыс никто не сбрасывает со счетов другие генетические линии животных, полученные в результате направленной селекции, которые традиционно поддерживаются в вивариях. Некоторые из них являются уникальными объектами для изучения генетических механизмов таких социально значимых болезней, как артериальная гипертензия, преждевременная старость, психические расстройства и др. Кроме того, эти линии неопределимы для испытаний новых лекарственных препаратов и при разработке немедикаментозных средств профилактики и лечения болезней.

К имеющемуся списку животных-моделей следует добавить *панели рекомбинантных линий*, которые широко используются в генетике количественных признаков.

Таким образом, с помощью разных методов уже сегодня получены тысячи генетических линий лабораторных мышей. А согласно прогнозу, опубликованному четыре года назад в Nature, к 2025 г. их число достигнет 300 тысяч и, как пишет автор статьи, генетики уже сегодня готовятся к «мышьному потоку» (Abbot, 2004).

## Строим криодамбы\*

В соответствии с общепринятыми нормами для поддержания одной линии мышей «в живом разведении» требуется 10–12 пар племенных животных и, как минимум, 50 голов ремонтного молодняка. Все это количество можно разместить примерно в 3 м<sup>3</sup> виварного помещения. Пока речь идет о десятках генотипов, такой подход кажется вполне приемлемым, но если

\* Этот и следующий разделы написаны совместно с С.Я. Амстиславским



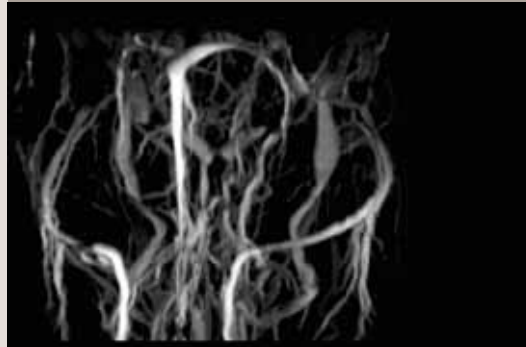
СОЛЕНОВ Евгений Иванович — доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник Института цитологии и генетики СО РАН. Лауреат премии Л. А. Орбели, 1998 г. Автор 92 научных работ

### «Видеть насквозь»

У многих людей эксперименты на животных ассоциируются исключительно с вивисекцией, хотя бы и под анестезией. Это неверно. К настоящему времени создано множество методов, позволяющих исследовать животных, их различные формы поведения, физиологические и биохимические процессы без существенного вреда для жизни животного и даже без ущерба его здоровью. Прогресс в развитии таких подходов связан не столько постепенным развитием морали в человеческом обществе, сколько из прагматических соображений — научные данные, полученные на нетравмированном, здоровом животном наименее искажены артефактами эксперимента. Многие из этих методов имеют значительную историю, и их современное развитие связано главным образом с обеспечением комфортных условий для экспериментального животного и для самого экспериментатора. Наряду с совершенствованием традиционных методов, в последние годы достигнуты впечатляющие успехи в разработке принципиально новых подходов к визуализации внутренних структур и внутренних процессов.

Лидирующие позиции здесь занимает томография, которая позволяет получать изображение внутренних органов слоями и воссоздавать с помощью компьютера их трехмерное изображение. В зависимости от физических принципов, заложенных в эти приборы, они «видят» разные ткани организма по-разному. Так ткани мозга содержат относительно много воды (здесь Аристотель был прав), и, следовательно, атомов водорода, поэтому мозг лучше «разглядывать» с помощью ЯМР-томографа. Для мышей, имеющих малые размеры, необходимо иметь и соответствующие «мышинные» приборы. И такие машины созданы. Инженеры сумели повысить разрешение ЯМР-томографов до десятков микрон (!) — неплохая точность даже в масштабах мышинных органов. Каждый такой прибор очень дорогой и не посилен для академической лаборатории, занимающейся фундаментальными исследованиями. Таким прибором может владеть только центр коллективного пользования, который сделает исследования доступными для многих лабораторий. И здесь в очередной раз становится очевидным обеспечение дорогостоящих экспериментов высококачественными стандартизированными животными, использование которых позволяет получить надежные результаты при небольшом количестве повторов.

Чего ради идти на такие траты? Ради возможности изучать все более глубокие фундаментальные процессы жизни организма. Один из самых современных образцов такого инструмента — Bruker Bio Spin, который предполагается приобрести для комплектации ЦКП генетических моделей, обладает программами, позволяющими выделять движущиеся ткани: кровь, сердечную мышцу, и открывают заманчивые возможности исследования на живой нетравмированной мышце. Этот же прибор, точнее приборный комплекс, способен допол-



Картина движущейся крови в мозге крысы

нить информацию, получаемую в новой, считающейся очень перспективной, области радиомедицины, томографии с применением позитрон-эмитирующих изотопов (PET). Есть еще исключительно привлекательная функция, заложенная в современный исследовательский ЯМР-томограф, это его способность проводить спектроскопический анализ вещества в заданной точке живого нетравмированного организма.

Значительный прогресс происходит и в методах оптического исследования организма. Тенденция та же, поиск путей исследовать животное, сохраняя ему жизнь, а по возможности и комфорт. Светочувствительные приборы, способные регистрировать отдельные кванты света, позволяют видеть светящиеся молекулы-трассеры прямо сквозь ткани мышцы, правда, мышца должна быть как минимум белая, а лучше и вовсе голая, такие тоже бывают. Сейчас уже проводятся исследования роста и метастазирования опухолей, клетки которых мечены генами, производящими светящийся белок — люциферазу. Однако возможно оптическое наблюдение белков, которые сами в обычных условиях не производят, но генерируют его в результате возбуждения внешним излучением. Такой индуцированный свет позволяет видеть молекулярные структуры, которые его излучают даже сквозь ткани организма. Аппаратура, позволяющая вызывать и регистрировать излучение нативных молекул в клетках или межклеточном пространстве, в толще тканей (при этом особенно интересуются мозгом) сейчас считается очень перспективной и разрабатывается во многих ведущих медицинских университетах мира. Традиционное рентгеновское исследование в настоящее время также получило новые функции. Появилась аппаратура, способная анализировать спектральный состав проходящих X-лучей и на этой основе изучать состав костной, жировой и других тканей, что необходимо при исследовании моделей ряда заболеваний, связанных с нарушением минерального и жирового обмена. Одновременно с развитием исследований организма с применением электромагнитных излучений, о которых говорилось выше, развивались и совершенствовались традиционные инвазивные методы. Многие из них сейчас уже нельзя называть кровавыми, настолько незначительны повреждения в организме при их применении.

Для решения многих прикладных и фундаментальных задач исследователям необходимо знать концентрацию тех или иных веществ в изучаемой ткани или, наоборот, вводить заданные количества препаратов в определенные органы. Причем желательно это делать незаметно для животного, и уж точно эта процедура должна быть безболезненна. Традиционно это делалось, в лучшем случае, методом биопсии — процедуры для которой часто применялся наркоз. Сейчас же создан спектр микродиализных приборов, которые могут безболезненно находиться в теле постоянно и позволяют брать пробы тканевой жидкости или вводить тестируемое вещество незаметно для животного.

Закончить этот краткий обзор некоторых современных методов, применяемых в биомедицинских исследованиях хочется на философской ноте. Все, даже самые



Прижизненное прослеживание пути стволовых клеток, проникающих в мозг мыши после экспериментального воздействия, моделирующего инсульт

лучшие методы имеют и свои отрицательные стороны. Для тех методов, о которых говорилось выше, положительная сторона — это их эффективность, а отрицательная — дороговизна и сложность применения. Для проведения исследований такими методами надо вкладывать значительные средства в приборы, воспитывать специалистов высокого уровня и оплачивать их работу. Но результаты окупают все. Вспоминается библейская притча о талантах, где говорится, что больше добавится тому, кто богаче...

речь идет о тысячах и сотнях тысяч линий, то поддержание мышинных ресурсов в форме племенных ядер становится невозможным. Выход из тупикового положения — это создание криоархивов.

Сегодня коллекции генетических линий животных могут сохраняться в виде замороженных эмбрионов, сперматозоидов, яйцеклеток и даже яйчниковой ткани. Однако ведущие архивы генотипов делают ставку прежде всего на эмбрионы. Эмбрион — диплоидный организм, тогда как сперматозоиды и яйцеклетки гаплоидны, поэтому для полноценного архивирования генетической линии можно консервировать либо эмбрионы, либо гаметы обоего пола. Первый путь экономически более оправдан, поскольку второй предполагает еще один технологический этап: размороженные сперматозоиды и яйцеклетки должны соединиться, чтобы образовать эмбрион.

Эмбрион — это уже особь. И хотя эта особь состоит всего лишь из нескольких клеток, у него уже есть программа развития, закодированная в геноме. Поэтому для восстановления линии достаточно трансплантировать размороженные эмбрионы самкам-реципиентам, где они продолжают свое развитие. Большинство экспертов сходятся на том, что для надежной консервации требуется 200—500 эмбрионов. Однако как свидетельствует мировой опыт, генетическую линию удастся иногда восстановить всего лишь из 20 эмбрионов.

Полтысячи эмбрионов легко упаковываются в объем около 0.3 л, что на четыре порядка меньше, чем объем, необходимый для поддержания линии живых мышей. Кроме того затраты на корм, подстилку и обслуживание существенно дороже, чем затраты на консервацию (жидкий азот и его регулярную доливку в сосуд Дьюара).

Но как долго можно сохранять эмбрионы в замороженном состо-



криобанке, нисколько не потеряли своей способности «оживать».

Поучительна и история, связанная с созданием первого в мире (и пока самого крупного) криобанка мышиных генотипов Джексонской лаборатории (США). Поводом к его строительству стал пожар, случившийся в 1947 г., который уничтожил значительную часть коллекции традиционно разводимых там линейных животных. Поэтому как только технологии криохранения эмбрионов мышей были разработаны, их тотчас же реализовали в этом мировом генетическом центре. И когда в 1989 г. в лаборатории случился еще более разрушительный пожар (он бушевал более пяти часов и унес жизни около полумиллиона мышей), криобанк стал настоящей «палочкой-выручалочкой». Ведь некоторые линии мышей существовали лишь в коллекции лаборатории так что восстановить их можно было лишь из собственного криобанка.

Пример Джексонской лаборатории оказался заразителен, и криоархивы стали создаваться в других генетических центрах. Сегодня их число приближается к двадцати. В японских центрах предусмотрен даже резервный банк на случай повреждения основного криохранилища при землетрясении. Например, Центр биоресурсов общества РИКЕН (BRC RIKEN) имеет основной криобанк в г. Тсукубе, а также резервный в 400 км к юго-западу (для последнего выделено место в одном из помещений синхрофазотрона, смонтированного на мощном фундаменте).

Однако криоархивы не только помогают при стихийных бедствиях. Ведь при размножении традиционным способом в генетической линии неизбежно накапливаются мутации. Кроме того, как и все живые существа, мыши подвержены инфекциям. Поэтому криобанк эмбрионов необходим не только для восстановления линии, погибшей от инфекции или несчастного случая, но и для поддержания ее чистоты.

### Свободные от патогенов

Расширение возможностей создания живых генетических «моделей» идет бок о бок с ужесточением требований к организации работы с экспериментальными животными. Наиболее дорогим и трудновыполнимым требованием является обеспечение условий для содержания животных, свободных от основных видоспецифических возбудителей болезней (*specified pathogen free* — SPF).

Для чего нужны такие животные? Благодаря избавлению от инфекций устраняется практически не поддающийся контролю источник вариации экспериментальных данных, в результате надежность получаемых результатов значительно повышается. Поэтому



В Сибирском центре генетических моделей на животных, строительство которого по плану завершится уже в 2009 г., SPF-животных будут содержать по всем международным стандартам. Это помещение уже в скором времени станет стерильным и в нем будут стоять стеллажи с клетками

согласно международным правилам (GMP и GLP стандарты) именно SPF-животные должны использоваться при проведении доклинических испытаний лекарственных препаратов и оценки биобезопасности новых материалов, включая продукты питания.

Стандартизация как условий содержания, так и самих лабораторных животных позволяет существенно сократить размеры экспериментальных групп. Неслучайно в нашей стране SPF-животных впервые стали использовать при изучении воздействия на организм космического полета (императивом к уменьшению числа экспериментальных животных в этом случае служили ограничения, накладываемые размерами космических аппаратов).

Помимо всего прочего, снижение количества объектов исследования без ущерба для качества экспериментов и улучшение условий содержания животных отвечает этическим требованиям.

Еще одной причиной, заставляющей прикладывать значительные усилия для избавления от патогенов, заключается в том, что некоторым генетическим линиям животных свойственна повышенная восприимчивость к болезням. В частности, для решения многих задач иммунологии требуется выключить отдельные звенья иммунной системы, что делает животных беззащитными по отношению к неизбежным в естественных условиях возбудителям болезней. Иллюстрацией к этому служит приведенная выше работа по мышам, производящим человеческие антитела. Промежуточным этапом при получении таких животных были мыши с нокаутированными собственными генами иммуноглобулинов, т. е. мыши, способные погибнуть от любой, даже неопасной, инфекции.

Для обеспечения SPF-стандарта лабораторных животных содержат в чистых помещениях, в которые под избыточным давлением подается стерильный воздух. Корм, вода, подстилка и клетки поступают в чистую зону вивария после предварительной стерилизации. В той же Японии корма обеззараживают гамма-облучением, а все остальное пропускается через автоклавы. И поскольку мышь не является нано-объектом, несмотря на небольшие размеры, объем клетки для содержания 5–6 мышей составляет около 5 л. И регулярное автоклавирование 1–2 тыс. клеток требует оборудования соответствующих габаритов.

Все вышеперечисленное привело к тому, что в развитых странах работу вивариев обеспечивает индустрия, производящая стеллажи, клетки, полки, корма, подстилку и даже специальные «игрушки» для развлечения



И. И. Гейци, — управляющий проектом строительства Сибирского центра генетических моделей животных, рассказывает о принципе сообщения между стерильным помещением и внешним «грязным» коридором. Разработкой этого шлюзового отсека занимались специалисты, которые проектировали подводные лодки

Для обеспечения SPF-стандарта лабораторных животных содержат в чистых помещениях, куда под избыточным давлением подается стерильный воздух. Корм, вода, подстилка и клетки поступают в чистую зону вивария после предварительной стерилизации

янии? На основе накопленного в мире опыта можно уверенно утверждать, что если консервация произведена правильно, то не важно, сколько времени эмбрионы хранились в жидком азоте — несколько секунд или десятки лет. Так, британский ученый Д. Уиттингем с коллегами (в 1972 г. именно они открыли способ заморозки эмбрионов мышей) продолжают и сегодня получать мышей с использованием эмбрионов, замороженных «впрок» более 30 лет назад: эмбрионы, хранящиеся в



шения с вкладчиками в криоархивы FIMRe и пользователями регулируются на основе соглашений о передаче материалов. При этом вкладчики получают следующие преимущества:

- гарантии авторских прав;
- освобождение от затрат на сохранение и распространение генетической модели;
- надежное хранение;
- и, наконец, как подсчитали в японском центре BRC RIKEN, у вкладчиков повышается индекс цитирования более, чем на 88 %.

При передаче созданных «генетических моделей» пользователям учитывается ведомственная принадлежность последних. Например, в Японии университетские и академические лаборатории оплачивают только себестоимость разведения и содержания животных; для коммерческих же организаций плата выше на 30 %. Но в обоих случаях поступления от продажи животных не покрывают расходы на поддержание самих генетических центров. Поэтому большинство из них финансируется из федеральных бюджетов государств, проявляющих реальную заботу о развитии высоких технологий в области здравоохранения.

Создание сети международных центров, объединяемых FIMRe дало весомый вклад в изучение генетических основ функционирования организмов в норме и при патологии, а также в поиск оптимальных средств профилактики и лечения болезней. Сегодня исследователям предлагается следующий алгоритм взаимодействия с мировыми генетическими архивами: формулирование потребности в экспериментальных животных с

заданными свойствами, поиск нужного генотипа в базе данных FIMRe, заказ животных через ближайший Центр, ассоциированный FIMRe, получение Центром заказанной линии, разведение и передача животных заказчику.

При этом в настоящее время уже намечается отчетливая тенденция сокращения обмена племенными животными в пользу обмена криопродуктами. Можно предсказать, что реализация проектов, подобных КОМР, приведет к включению в мировой оборот модельных организмов линий эмбриональных стволовых клеток с заданными изменениями генотипа, а затем и генно-инженерных конструкторов, которые можно будет заказать по каталогам, как любой химиреактив. Это особенно эффективно с точки зрения биобезопасности, поскольку риск трансграничного обмена нежелательными микроорганизмами невозможно исключить при самом тщательном контроле за перевозкой живых организмов.

Но все эти блага прогресса будут доступны только тем странам, в которых будут существовать Центры, обеспечивающие полный цикл работы с генетическими ресурсами, т. е. имеющие в своем составе крио-

банк, лаборатории репродуктивных технологий и трансгенеза, и в которых племенное разведение и содержание животных будут проводиться в соответствии с SPF- стандартом.

## А что в России?

Единственный на сегодня в России питомник SPF-животных, сертифицированный в соответствии с международными стандартами, расположен в Пущинском научном центре неподалеку от Москвы. В Питомнике лабораторных животных Филиала Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН поддерживается около дюжины наиболее «ходовых» линий мышей, несколько линий крыс и одна линия сирийских хомячков. Помимо воспроизводства экспериментальных объектов в питомнике налажена работа по освобождению животных от патогенов, криоконсервирование половых продуктов и эмбрионов, хирургическая подго-

товка животных для хронических и острых экспериментов.

В непосредственной близости от питомника находится один из основных потребителей SPF-животных — лаборатория биологических испытаний Филиала ИБХ РАН. Возможность использования подобных животных позволяет проводить здесь доклиническую оценку лекарственных препаратов в соответствии с международным стандартом GMP (Good Manufacturing Practice) — ISO 9000, и, соответственно, получать заказы на такие испытания от зарубежных университетов и фармацевтических компаний.

А какова ситуация за Уралом? Если двигаться на восток от Пущино-на-Оке, то обнаружится, что следующий центр разведения SPF-животных находится ... в Японии. Все остальное пространство между этими географическими точками абсолютно свободно от животных, свободных от патогенов. И это удручает, потому что и в Сибирском,

Коридоры строящегося здания Центра пока напоминают катакомбы подземелий. Трубы вытяжных систем придают интерьеру фантастический вид

мышей. Последнее, несмотря на кажущуюся комичность — обязательное требование к содержанию животных в Англии и Скандинавских странах.

## Международная кооперация

Стремительно увеличивающееся многообразие мышинных генотипов привело к созданию международной организации, призванной координировать работу национальных центров генетических ресурсов. Сегодня Федерация международ-

ных мышинных ресурсов (Federation of International Mouse Resources — FIMRe) объединяет 16 центров, расположенных в Северной Америке, Европе, Азии и Австралии. Центры формируют коллекции генотипов согласно договоренности, стараясь не дублировать друг друга. Эти коллекции пополняются благодаря собственной генетико-селекционной и генно-инженерной работе центров, однако основной вклад вносят научно-исследовательские лаборатории различной ведомственной принадлежности.

Отно-

**Криоархивы экспериментальных животных-моделей не только являются страховкой на случай стихийных бедствий, но и способствуют поддержанию чистоты генетических линий**

Михаил Мошкин и Юкио Накамура (Yukio Nakamura — заведующий Лабораторией клеточной инженерии, BRC Riken) в криобанке стволовых клеток (Япония)



# ЦЕНТР генетических моделей на животных

Что может дать реализация проекта биомедицинским исследованиям в Сибири:

1. Отработка поставок полноценного стерильного корма и подстилочного материала.
2. Налаживание каналов получения и обмена генетическими линиями.
3. Обучение персонала.
4. Регулярный обмен опытом.
5. Создание условий для исследований по GMP-стандарту



Лаборатория ветеринарного и генетического контроля и Лаборатория пробоподготовки и первичной обработки материалов, взятых от экспериментальных животных



Сектор трансгенных животных

созидает методами генной инженерии экспериментальные модели животных с заданными генетическими свойствами



Криобанк и Лаборатория репродуктивных технологий

предназначены для создания архива генетических линий мышей и крыс на основе криоконсервирования половых клеток и эмбрионов; для перевода в SPF-стандарт уникальных линий животных, полученных в России; для разработки новых технологий криоконсервации



Сектор племенного разведения

предназначен для обеспечения поддержания и разведения племенных ядер разных линий мышей и крыс



Лаборатория «фенотипирования» и доклинических испытаний

Предназначена для прижизненных исследований поведения и морфофизиологических процессов у животных в пределах SPF-зоны



Сектор информационной поддержки

обеспечивает автоматизированный контроль всех видов работ с животными, а также связь с базами данных мировых центров биоресурсов лабораторных животных





Технический этаж Центра со сложной системой фильтров будет обеспечивать надлежащие условия для содержания животных

и Уральском, и Дальневосточном отделениях РАН (а также и РАН) активно ведутся работы с использованием лабораторных мышей и крыс. Если же добавить к ним институты других ведомств, а также классические и медицинские университеты, то окажется, что число потенциальных пользователей животных-моделей переваливает за сотню.

Сегодня все эти исследовательские учреждения обходятся тем ограниченным набором генотипов, которые могут им предоставить существующие виварии. Однако уже сейчас это серьезно тормозит фундаментальные исследования, а на работы прикладного характера накладывает гриф — «Только для внутреннего пользования», поскольку качество подопытных животных и условия их содержания не отвечают мировым стандартам.

Рассматривая скорбное текущее состояние дел и наши светлые перспективы, нельзя не отметить важную историческую роль академика В. К. Шумного, который 5 лет назад, будучи директором Института цитологии и генетики СО РАН и председателем Объединенного ученого совета по наукам о жизни, сумел добиться от российского правительства финансирования работ по строительству современного вивария с повышенными требованиями к содержанию животных.

Точно неизвестно, какие соображения лежали в основе решения о строительстве SPF-вивария, но то, что это было попадание в «яблочко» — несомненно. Причем, пользуясь артиллерийской терминологией, можно сказать, что «выстрел» накрыл не только цели

и задачи, очевидные в момент принятия решения, но и те, актуальность которых стала осознаваться лишь в самое последнее время. В ходе недавнего визита в Германию президент РФ Д. Медведев очередной раз подтвердил, что «Вступление во Всемирную торговую организацию — это тот рубеж, который Россия должна преодолеть». В контексте настоящей статьи это означает обязательное введение международных стандартов на все виды работ с экспериментальными животными, что не представляется возможным без создания адекватной экспериментальной базы.

Но все же главным стимулом к созданию современного центра живых генетических моделей служит внутреннее стремление ученых повысить надежность собственных научных результатов. Ведь возможность проводить исследования на тщательно стандартизированных экспериментальных объектах, содержащихся в строго контролируемой среде, в сочетании с неограниченным доступом к мировым «генетическим ресурсам» является залогом успешного развития современных биологических исследований.

Еще в большей мере это утверждение относится к междисциплинарным исследованиям, призванным решить фундаментальные проблемы функционирования живых организмов на разных уровнях организации. Решение этих проблем может дать ответы на животрепещущие вопросы о причинах болезней и старости, путях достижения успеха в разных формах конкурентной деятельности, биологических основах социальной привязанности

и отторжения и многих других — здесь найдется место и физике, и лирике. Создание современной инфраструктуры, помимо прочего, будет иметь немаловажное значение и для подготовки молодых ученых: возможность работать на уровне мировых стандартов (что подразумевает доступность экспериментальных объектов и необходимого инструментария) выступает для них в роли важнейшего стимула при выборе жизненных ориентиров.

И, наконец, еще одним стимулом к созданию современного генетического центра стала региональная программа развития фармакологической промышленности в Новосибирской области, в частности — создание фармакологического «кластера» с участием Сибирского центра фармакологии и биотехнологии (СЦФБ), институтов СО РАН и СО РАМН, а также венчурных компаний. Все это является существенной составляющей общего инновационного комплекса Новосибирского научного центра и НСО. Нужно отметить, что в области исследований, относящейся к созданию новых средств диагностики, профилактики и лечения болезней, пересекаются интересы не только медиков, биологов и химиков, но и физиков разного профиля, от ядерщиков до аэродинамиков.

Конечно, такое явление, как биомедицинская интеграция естественных наук — тема для специального разговора. Здесь же хотелось бы отметить, что любые работы в этом направлении замыкаются на стадию доклинических испытаний, объектами которых как раз и служат экспериментальные животные с заданными генетическими свойствами, качество которых, как и качество их содержания в виварии, должны отвечать строгим международным стандартам.

## Многофункциональный и коллективный

Итак, что же мы имеем на сегодня? В соответствии с решением Правительства РФ в Новосибирском научном центре на базе ИЦиГ СО РАН строится современный виварий для мелких животных с повышенными требованиями к содержанию. Благодаря оригинальной архитектуре (главный инженер проекта — Б. В. Нестеров, ГИПРОНИИ СО РАН), строящееся здание привлекает всеобщее внимание.

Общая площадь вивария составляет около 5 тыс. м<sup>2</sup>, из них почти 1000 м<sup>2</sup> составляют помещения, оборудованные по стандарту «чистых комнат» (класс С). Эту работу выполняет известный российский лидер в данной области — Миасский завод медицинского оборудования. На 2-м и 3-м этажах оборудуются два полно-

стью оснащенных автономных блока для содержания лабораторных животных, свободных от специфических патогенов. Еще четыре лабораторных помещения общей площадью около 140 м<sup>2</sup> расположены на первом этаже; остальное пространство занято различными технологическими и вспомогательными помещениями.

Подобная структура вивария предоставляет хорошие возможности для многоцелевого использования этого инфраструктурного объекта, и это единственное разумное решение при нынешнем положении дел. Так, в организации исследований на лабораторных животных в развитых странах хорошо просматривается исторически сложившееся разделение функций. В этом смысле показателен пример Японии, имеющей близкую к российской численность населения и высочайшую репутацию как в сфере высоких технологий в целом, так и в «здоровьесберегающих» технологиях в частности. Исследования на лабораторных животных проводятся во многих японских университетах и в коммерческих лабораториях. Все крупные университеты имеют в своем составе виварии, в которых животные содержатся в соответствии с SPF-стандартом, а также лаборатории, производящие трансгенных мышей. Помимо самостоятельного разведения животных университетские виварии также закупают наиболее ходовые линии мышей и крыс из специализированных питомников.

Для интеграции и сохранения стремительно растущего разнообразия лабораторных животных в Японии созданы специальные ресурсные центры. Например, Центр биоресурсов в Тсукубе (BRC Riken) специализируется на мышах и хранит в своем быстро пополняемом криоархиве около 3 тысяч генетических линий. Крысы находятся в ведении «Национального биоресурсного проекта для крыс» с головным учреждением — Институтом лабораторных животных Университета Киото. Сейчас под контролем этого проекта находится 458 линий крыс.

Следует подчеркнуть, что для эффективной работы подобных инфраструктурных комплексов, обеспечива-

**Возможность проводить исследования на тщательно стандартизированных экспериментальных объектах, содержащихся в строго контролируемой среде, в сочетании с неограниченным доступом к мировым «генетическим ресурсам» является залогом успешного развития современных биологических исследований**



М. П. Мошкин и И. И. Гейци на строительной площадке Центра. Примечательно, что Иосиф Иосифович участвовал в строительстве Института физики полупроводников СО РАН в 1963 г. И вот через 45 лет он снова задействован в масштабной стройке, проводимой в новосибирском Академгородке

ющих фундаментальные и прикладные исследования на лабораторных животных, необходимо наличие всех вышеперечисленных структурных компонентов, плюс ряд вспомогательных коммерческих организаций, поставляющих корм, подстилочный материал, дезсредства и другие жизненно-необходимые «мелочи». Мы же сегодня заканчиваем строительство нашего вивария практически посреди инфраструктурной «полупустыни». «Полу» — потому что у нас все же есть:

- виварии, расположенные по соседству, в которых однако отсутствуют условия для SPF-содержания животных;
- корма для животных, но стерилизация их гамма-облучением не отлажена;
- деревья, что не удивительно для Сибири, но при этом отсутствует стружка нужного качества для подстилочного материала.

К сожалению, список, чего у нас пока вообще нет, может занять гораздо больше места...

Однако несмотря на многие, как мы надеемся, временные недостатки, оснований для пессимизма у нас нет. Сама концепция создания мультифункционального комплекса адекватно воспринята руководством ИЦиГ СО РАН, академиком В. К. Шумным и Н. А. Колчановым и далее развивалась как результат коллективного творчества, найдя поддержку у научного сообщества СО РАН. Об этом свидетельствуют постановления Общего собрания ННЦ СО РАН (№ 1 от 15.11.07) и Президиума СО РАН (№ 26 от 24.01.08) об организации на базе строящегося SPF-вивария ИЦиГ СО РАН Центра коллективного пользования, обеспечивающего исследования в области генетики, молекулярной биоло-

гии, физиологии, биомедицины, нанобиобезопасности и фармакологии. Положительные оценки получены и при апробации проекта на заседании Президиума СО РАН (20.02.08).

## Столько, сколько нужно!

В соответствии с концепцией мультифункционального комплекса вновь создаваемый Центр будет включать в себя:

- Криобанк и лабораторию репродуктивных технологий, предназначенные для создания архива генетических линий мышей и крыс на основе криоконсервирования половых клеток, эмбрионов на ранней стадии развития и эмбриональных стволовых клеток; перевода в SPF-стандарт уникальных линий животных, полученных в России; для обмена с криоархивами России и других стран, прежде всего, с генетическими центрами объединяемыми FIMRe; для разработки новых технологий криоконсервации на различных видах животных; для создания криоархивов уникальных пород сельскохозяйственных животных.
- Сектор племенного разведения, обеспечивающий поддержание и разведение племенных ядер разных линий мышей и крыс.
- Сектор трансгенных животных, предназначенный для создания методами генной инженерии новых линий животных с заданными генетическими свойствами.
- Лаборатории физиологического и этологического фенотипирования для прижизненных исследований поведения и морфофизиологических процессов у животных в пределах SPF-зоны.

## Реализация этого плана позволит поднять на качественно новый уровень (в частности, на уровень международных GMP и GLP стандартов) весь комплекс исследований, проводимых на лабораторных животных в СО РАН и в целом в Сибири

- Лаборатории пробоподготовки для первичной обработки материалов, взятых от экспериментальных животных.
- Сектор информационной поддержки, обеспечивающий автоматизированный контроль всех видов работ с животными, а также связь с базами данных мировых центров биоресурсов лабораторных животных.

Реализация этого плана позволит поднять на качественно новый уровень (в частности, на уровень международных GMP и GLP стандартов) весь комплекс исследований, проводимых на лабораторных животных в СО РАН и в целом в Сибири. Мы сможем, наконец, отказаться от «сиротской идеологии», которая в этой области научно-организационной деятельности выражается у нас стандартным вопросом: «А сколько линий мышей будет содержаться в новом виварии?» Сегодня единственно правильный ответ на этот вопрос должен звучать так: «Да ровно столько, сколько нужно, и именно тех генотипов, которые требуются для решения конкретных задач, стоящих перед каждым из вас».

Создание Центра позволит существенно поднять материальную базу прижизненных морфо-функциональных исследований, ведь за последнее время техническое обеспечение этих работ значительно продвинулось благодаря таким методам, как fMRI-томография, тепловидение, телеметрия, прижизненное ИК-сканирование и многое другое. Эти подходы чрезвычайно важны для изучения изменений, протекающих в ходе онтогенеза и при различных экспериментальных воздействиях на организм, например, доклинических испытаниях новых средств профилактики и лечения болезней, оценке безопасности новых наноматериалов и т. д.

Конечно, скептики имеют право усомниться в реалистичности этих планов. Однако опыт успешно развивающихся стран, таких как Южная Корея, Китай, Индия и др., говорит о том, что в сферу новых технологий нужно входить либо стремительно, либо вообще даже не пробовать, а продолжать бурить скважины...

Оптимизм внушает и то обстоятельство, что помимо материальных ресурсов, выделенных на строительство здания нового Центра, мы имеем достойное интеллектуальное и профессиональное обеспечение его будущей деятельности. Пусть у нас еще нет криобанка, но есть С. Я. Амстиславский, который за неимением собствен-

ной лабораторной базы работает в Финляндии над проблемой расширения списка видов, пригодных для криоконсервации (в том числе и европейской норки, сохранение которой лежит в сфере национальной ответственности РФ). Большой опыт селекции экспериментальных животных с генетической предрасположенностью к некоторым болезням накоплен в ИЦиГ СО РАН

Судя по работам в области генной инженерии, выполняемым (часто совместно) в этом институте и в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, будущая генетическая коллекция нового Центра будет успешно пополняться собственными трансгенными животными, созданными под конкретные задачи сибирской науки. Эта работа будет осуществляться на основе межинститутской кооперации в области трансгенеза, причем в части работ на животных будет задействован SPF-виварий.

Сегодня в институтах СО РАН успешно используются самые современные методы исследования молекулярно-генетических, физиологических, морфологических и поведенческих процессов в живых организмах. Например, разработанные в Томографическом центре СО РАН подходы к прижизненному изучению тонких процессов, протекающих в живых организмах, уже применяются в совместных работах ИЦиГ и других биологических институтов СО РАН. А в Новосибирском институте органической химии СО РАН работает одна из наиболее успешных лабораторий фармакологических исследований, обеспечивающая связь химической науки с медицинской практикой (подробнее об этих работах читайте в одном из следующих номеров журнала).

Масштабные и разнообразные по тематике исследования живых организмов с помощью лучевых технологий биологи проводят совместно с физиками из Института ядерной физики и Института химической кинетики и горения СО РАН. Мы очень надеемся, что, наряду с решением фундаментальных задач, эти специалисты помогут разрешить и проблему практического применения технологий лучевой стерилизации, необходимых для выращивания SPF-животных.

## От структуры — к функции

В одном из автобиографических воспоминаний нобелевский лауреат Д. Уотсон пишет, что он начинал научную карьеру как орнитолог, и с тех пор ему крайне хотелось узнать, каким образом в череде поколений обеспечивается устойчивое повторение сложнейших орнаментов, украшающих самцов многих видов птиц. Вместе с Ф. Криком он внес весомый вклад в решение этой проблемы, расшифровав структуру ДНК. Сегодня, после полной расшифровки геномов человека и многих



**Развитие центров генетических ресурсов, которые в развитых странах входят в список национальных приоритетов, помимо решения фундаментальных задач обеспечивает одну из главных задач государства — сохранение здоровья нации**

других видов организмов, мы имеем все теоретические и технологические предпосылки для следующего шага в нашем стремлении — понять, каким образом генетическая информация трансформируется в «истории жизни» отдельных особей.

У этой фундаментальной задачи, скорее всего, нет простого решения. Более вероятно, что оно будет формироваться как интегрированный результат огромного числа частных знаний о «траекториях», ведущих от гена к признаку, или от генов сетей — к фенотипу. И в этом «технологическом» цикле познания живых систем (от морфологического описания — к физиологическому объяснению) облигатным элементом являются исследования на животных с заданными генетическими свойствами. Ведь только на уровне целого организма можно окончательно проверить справедливость тех построений, которые складываются из анализа последовательностей нуклеотидов, изучения структур и функций биомолекул, детализации клеточного строения, математического моделирования генов сетей и т.д. Вспомним знаменитый фильм «Место встречи изменить нельзя»: пианиста можно оценить по фор-

ме рук или музыкальному слуху, но гораздо надежнее просто попросить его сыграть «Мурку»...

Необходимость в накоплении конкретных знаний диктуется не только невообразимой сложностью живых организмов, но и отсутствием «типовых конструкций» в рамках каждого биологического вида, включая человека. Поэтому в биомедицинские исследования, ориентированные на поиск методов лечения «больных, а не болезней», привлекается все больше число разнообразных живых генетических «моделей».

Одним из стимулов для создания подобных моделей служит стремительное накопление информации о генах, ассоциированных с той или иной патологией. В крайне редких случаях ученым удается реализовать полный цикл исследований, который включает в себя идентификацию генотипов, связанных с болезнью; получение соответствующих модельных животных; анализ механизмов генетически детерминированного патогенеза; поиск адекватных средств коррекции.

Следует отметить, что частоты генов, ассоциированных с болезнью, и сам характер этих ассоциаций имеют этнические особенности. И в этой связи создание условий для реализации всего вышперечисленного комплекса исследований входит в разряд национальных приоритетов, поскольку «спасение утопающих — дело рук самих утопающих». Этот тезис находит отражение в стремительно растущем числе подобных генетических центров, создаваемых во всех развитых странах. Расширение спектра модельных млекопитающих с заданными генетическими свойствами лежит в русле общих тен-

ден-  
ций разви-  
тия современной  
биологии и меди-  
цины.

Нужно заметить, что создание Центра, обеспечивающего доступ к мировым архивам лабораторных животных, имеет и далеко идущие последствия, поскольку создание современной инфраструктуры само по себе оказывает колоссальное влияние на воспитание конкурентоспособной молодежи. Это в равной степени относится к любым формам конкурентной деятельности: так, увлечение первого президента России теннисом обеспечило хорошие условия для тренировок молодежи, и сегодня наши теннисисты занимают ведущие позиции в мировом рейтинге.

В науке даже в большей степени, чем в спорте важно, чтобы талантливая молодежь работала у себя на родине. И удерживать ее должны не административные ограничения на выезд, а такие условия жизни и работы, которые не уступают европейским стандартам. Расположенный на территории новосибирского Академгородка новый Центр, несомненно, будет широко использован при подготовке высокопрофессиональных специалистов в разных областях биологии и биотехнологии, которая проводится в Новосибирском государственном университете и в академических институтах СО РАН и СО РАМН.

Итак, строящийся ныне SPF-виварий ИЦиГ СО РАН, счастливо получивший стартовый капитал от Правительства РФ, призван стать центром интеграции исследовательской активности ученых, для которой необходимы экспериментальные животные-модели. Он должен стать Центром коллективного пользования, в чем заинтересованы многие институты РАН и РАМН в разных регионах Урала, Сибири и Дальнего Востока, а также классические, медицинские и сельскохозяйственные университеты. Уже сегодня эта заинтересованность реализуется в виде весомой научно-методической и финансовой поддержки, которая оказывается в рамках программы СО РАН «Геномика, протеомика, биоинформатика», осуществляемой под руководством академиков Р.З. Сагдеева, В.Н. Власова, Н.А. Колчанова.



В развитых странах подобные центры входят в список национальных приоритетов, поэтому их можно рассматривать как один из символов государственности наряду с гимном, гербом и флагом. И такое положение вполне заслуженно, поскольку эти учреждения являются неотъемлемым элементом научно-технологического комплекса, призванного решить одну из главных задач государства: обеспечить здоровье нации через здоровье отдельных граждан.

*Литература:*

Abbott A., Harbor B. *Genetists prepare for deluge of mutant mice* // *Nature*. — 2004. — N. 432. — 541 p.

Collins F.S. et al. *The International knockout mouse consortium* // *Cell*. — 2007. — N. 128. — P. 9–13.

Davison M. *FIMRe: Federation of International Mouse Resources: global networking of resource centers* // *Mamm. Genome*. — 2006. — N. 17 (5). — 363 p.

Gachon F. et al. *The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy* // *Genes. & Dev.* — 2004. — N. 18. — P. 1397–1412.

Sprengel R., Hasa M.T. *Tetracycline-controlled genetic switches* // *HEP*. — 2007. — № 178. — P. 49–72.

Xiao-Wei Tan et al. *Fetal microchimerism in the maternal mouse brain: a novel population of fetal progenitor or stem cells able to cross blood-brain barrier?* // *Stem. Cells*. — 2005. — N. 23. — P. 1443–1452.

