

УДК 577.29

**СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ И ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ
СПОСОБНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ,
ПРОДУЦИРУЮЩИХ С МОЛОКОМ РЕКОМБИНАНТНЫЙ
БЕЛОК ЧЕЛОВЕКА ЛАКТОФЕРРИН**

© 2009 г. А. В. Дейкин, Т. Г. Ермолкевич, Я. Г. Гурский, А. Н. Краснов,
С. Г. Георгиева, С. Л. Кузнецов, В. Г. Дервянко, Н. И. Новикова,
А. Н. Мурашев, И. Л. Гольдман, Е. Р. Садчикова

Представлено академиком Г.П. Георгиевым 15.01.2009 г.

Поступило 16.01.2009 г.

Обеспечение здоровья трансгенных животных и сохранение у них функции воспроизведения имеет первостепенное значение для их длительного использования в качестве биореакторов лекарственных белков человека. Известно, что многие биологически активные белки человека способны оказывать сходное физиологическое воздействие на организм животных. Поэтому для получения трансгенных животных, синтезирующих лекарственные белки человека с молоком, в геном конструируются применяются тканеспецифические промоторы. Что касается способности трансгенных животных к воспроизведению, то она нарушается лишь в тех случаях, когда при интеграции чужеродного генетического материала в геном животных возникают повреждения (инсерции) участков ДНК, связанные с этой функцией животных. Равным образом инсерции могут изменять какие-либо другие важные участки генома трансгенных животных. Естественно, что для практического использования трансгенных животных должны обеспечивать экономически значимую экспрессию с молоком рекомбинантных белков интереса. Совокупность этих вопросов исследовалась в модельном эксперименте на мышах, трансгенных по гену лактоферрина человека.

В данной работе линии получены размножением первичных трансгенных животных, передающих трансген с высоким уровнем продукции это-

го белка с молоком. Исследованные линии характеризуются нормальной воспроизводительной способностью, соответствуют физиологической норме для данного вида животных и сохраняют эти показатели в ряду поколений, включая уровень продукции лактоферрина человека в молоке.

Лактоферрин – белок грудного женского молока, который защищает новорожденного ребенка от кишечных инфекций до момента становления у него собственного механизма иммунологической защиты [1–3]. Получение этого белка человека при использовании в качестве биореакторов молочных сельскохозяйственных животных позволит создать биологически полноценное питание для детей, находящихся на искусственном вскармливании. Бактерицидные свойства лактоферрина человека перспективны для создания широкого спектра высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных препаратов нового поколения [4–6].

**ПОЛУЧЕНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ
ПЕРВИЧНЫХ МЫШЕЙ, ТРАНСГЕННЫХ
ПО ГЕНУ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА**

Использовали пять полученных в ИБГ РАН генных конструкций (рис. 1), которые содержали ген лактоферрина человека и обеспечивали продукцию этого белка с молоком трансгенных животных. Конструкции были созданы на основе вектора рVC1 из набора рVC1 Milk Expression Vector Kit (“Invitrogen”). Конструкция hLf2 – кДНК лактоферрина размером 2100 п.н. клонирована в вектор рVC1 по сайту XhoI; hLf3 – гибридная конструкция лактоферрина, первая часть которой – геномная копия с 1-го по 7-й экзон (14479 п.н, с АТГ-кодона до SmaI-сайта), а вторая часть – кДНК (1331 п.н., от SmaI-сайта до Stop-кодона), клонирована в вектор рVC1 по сайту XhoI. Эти две части состыкованы по SmaI-сайту, который

*Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва
Московская медицинская академия
им. И.М. Сеченова*

*Филиал Института биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук, Пушкино Московской обл.*

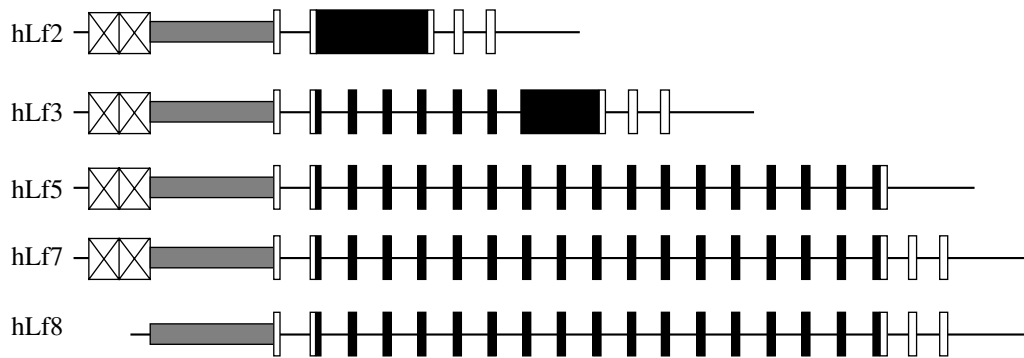


Рис. 1. Структура экспрессионных конструкций с геном лактоферрина человека. Две копии инсультатора отмечены крестами, серым цветом выделен β-казеиновый промотор, черным отмечены кодирующие области лактоферрина, белым отмечены нетранслируемые области.

находится в 7-м экзоне; hLf5 – геномная последовательность лактоферрина длиной 35013 п.н., начиная с ATG-кодона, клонирована в вектор pBC1 по сайтам XhoI и NotI; hLf7 – геномная последовательность лактоферрина длиной 28672 п.н., начиная с ATG-кодона, клонирована в вектор pBC1 по сайту XhoI; hLf8 – из конструкции hLf7 удалены инсультаторы перед β-казеиновым промотором.

Первичных трансгенных мышей получали общепринятым методом посредством микроинъекций ДНК в пронуклеус зигот. Результаты этой работы представлены в табл. 1.

При размножении 54 первичных по гену лактоферрина человека трансгенных мышей (27 ♀ и 27 ♂) был получен следующий результат: 11 животных потомства не дали. Из 43 размножившихся первичных трансгенных мышей 9 трансген не передавали (6 ♀ и 3 ♂). Имелась одна первичная трансгенная самка, не продуцирующая с молоком лактоферрин человека, равно как и ее трансгенное потомство. Таким образом, значительное число полученных первичных трансгенных животных (37%) по разным причинам пришлось выбраковать. Содержание лактоферрина человека

в молоке первичных трансгенных мышей варьировало в зависимости от использованной генной конструкции и у отдельных особей (табл. 2).

От первичных трансгенных мышей, отличающихся высоким уровнем экспрессии с молоком лактоферрина человека, были получены несколько линий трансгенных мышей (до F8) со средней продукцией лактоферрина человека с молоком 10–15 г/л.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И КАЧЕСТВО РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА

Продукция рекомбинантного лактоферрина человека в молоке трансгенных мышей была тканеспецифичной. Следовые количества лактоферрина человека обнаруживались лишь в мозге и мышечной ткани животных.

В отдельном исследовании нами было показано, что рекомбинантный лактоферрин человека, секретируемый с молоком трансгенных мышей, по физико-химическим показателям и биологи-

Таблица 1. Результаты экспериментов по получению первичных мышей, трансгенных по гену лактоферрина человека

Конструкция	Число микроинъекцированных зигот	Число использованных реципиентов	Количество пересаженных эмбрионов одному реципиенту	Число родившихся мышат (% от трансплантированных зигот)	Число трансгенных животных (% от трансплантированных зигот)	Процент трансгенных животных от родившихся мышат
hLf2	400	19	21.05	13 (3.25)	5 (1.25)	38.46
hLf3	610	38	16.05	92 (15.08)	18 (2.95)	19.57
hLf5	380	24	15.83	36 (9.47)	10 (2.63)	27.78
hLf7	358	21	17.05	121 (33.80)	16 (4.47)	13.22
hLf8	257	16	16.06	92 (35.80)	5 (1.95)	5.43
Всего	2005	118	16.99	354 (17.66)	54 (2.69)	15.25

Таблица 2. Содержание лактоферрина человека в молоке 18 первичных трансгенных самок мышей, продуцирующих этот белок

Генная конструкция	№ первичных трансгенных мышей	Продукция лактоферрина человека с молоком, г/л
hLf2	221	4.00
	hLf3	6.10
hLf5	1118	8.70
	385	14.00
	263	10.20
	230	0.87
	112	1.50
hLf7	115	4.80
	116	33.00
	146	40.00
	705	4.20
	787	5.60
hLf8	790	8.09
	793	3.70
	809	7.40
	1252	3.30
	1238	0.22
	1174	1.50

ческой активности идентичен естественному лактоферрину, полученному из грудного молока [7].

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

В совокупности в популяционных исследованиях были задействованы около 2500 мышей.

Сравнение между опытными и контрольными животными по численности помета, индивидуальному развитию и сохранности молодняка не выявило каких-либо существенных различий. Передача трансгена потомству в F1 оказалась несколько ниже расчетного уровня, однако начиная с F2 средний показатель ее не снижался ниже 40%. При этом среди трансгенного потомства наблюдалось, примерно, равное соотношение самцов (♂) и самок (♀) (табл. 3).

Для оценки состояния здоровья подопытных животных в лаборатории биологических испытаний Филиала Института биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова выполнены патоморфологический и гистологический анализы четырех (2 ♂ и 2 ♀) трансгенных мышей с конструкцией LTF5 (обеспечивающей наибольший уровень продукции с молоком лактоферрина человека) в сравнении с интактными (контрольными) четырьмя (2 ♂ и 2 ♀) мышами. Обследовали половозрелых животных (F1–F8), находящихся на стандартном рационе кормления.

В процессе наружного осмотра тела мышей, а также визуальной оценки у них органов брюшной и грудной полостей, органов шеи, головного и спинного мозга каких-либо патологических отклонений, характеризующих каждую из групп обследованных животных, отмечено не было, что позволило сделать заключение об их удовлетворительном состоянии.

При проведении гистологического исследования тканей и органов опытных и контрольных животных были изучены следующие внутренние органы и ткани мышей: головной мозг, спинной

Таблица 3. Трансмиссия трансгенов hLf3, hLf5, hLf7 при размножении некоторых первичных трансгенных самок и самцов мышей

Конструкция	№ первичных трансгенов	Число исследованных потомков	F1			Число исследованных потомков	F2		
			трансгены, число (%)				трансгены, число (%)		
			всего	♂	♀		всего	♂	♀
Размножение первичных трансгенных самок									
hLf3	263, 277, 385, 1118	93	29 (31)	13 (45)	16 (55)	43	9 (21)	4 (44)	5 (56)
hLf5	112, 116, 146,	39	27 (69)	13 (48)	14 (52)	131	66 (50)	32 (48)	34 (52)
hLf7	643, 787, 790, 793, 809	93	21 (23)	15 (71)	6 (29)	82	37 (45)	14 (38)	23 (62)
	Всего	225	77 (34)	41 (53)	36 (47)	256	112 (44)	50 (45)	62 (55)
Размножение первичных трансгенных самцов									
hLf3	281, 373, 382, 398, 1112	154	52 (31)	20 (38)	32 (62)	158	74 (47)	35 (48)	39 (52)
hLf5	113, 138, 145, 172	162	40 (28)	19 (45)	21 (55)	82	27 (38)	15 (53)	12 (47)
hLf7	516, 699, 704, 803, 825, 864	248	78 (31)	34 (44)	44 (56)	125	46 (47)	24 (57)	22 (43)
	Всего	564	170 (30)	73 (43)	97 (57)	365	147 (40)	74 (50)	73 (50)

мозг, селезенка, брыжеечные лимфоузлы, тимус, легкие, сердце, почки, надпочечники, яичники и матка (у самок в период лактации), семенные придатки, предстательная железа, семенники (у самцов), кожа, кожа с молочной железой, двуглавая мышца бедра, щитовидная железа, мочевой пузырь, поджелудочная железа, печень, желудок, кишечник: двенадцатиперстная, тощая, подвздошная, слепая, ободочная, прямая кишки.

В ходе анализа гистологических препаратов головного и спинного мозга, а также параорганных нервных узлов и нервов каких-либо патологических изменений у экспериментальных и контрольных животных обнаружено не было. Сходные между собой нормальные морфологические картины отмечались у экспериментальных и контрольных животных в половых железах – семеннике, яичнике, в производных кожи (волос, железы), в надпочечнике, в органах сердечно-сосудистой системы, в легких и в органах мочевыделительной системы. Морфологическая картина скелетной мышечной ткани двуглавой мышцы бедра, а также скелетной мышечной ткани, забранной для анализа кожи и спинного мозга, в контрольной и экспериментальной группах в целом имела сходный неизменный характер. У одного из животных в двуглавой мышце бедра экспериментальной группы выявлялась зона, в которой отмечался частичный лизис нескольких мышечных волокон с параллельным хорошо выраженным формированием новых молодых волокон – стадия миотуб. Обнаруженная зона может соответствовать посттравматической регенерации скелетного мышечного волокна. Изучение препаратов крупных пищеварительных желез выявляет сходные морфологические картины в обеих группах животных. Следует отметить наличие небольших локальных зон в экзокринных отделах поджелудочных желез одного экспериментального и одного контрольного животных, содержащих клетки с вакуолизированной цитоплазмой. Органы кроветворения и иммуногенеза имеют сходные морфологические черты в экспериментальной и контрольных группах животных. Обращает на себя внимание относитель-

ное увеличение герминативных центров в лимфатических узлах обеих групп животных.

У животных экспериментальной и контрольной групп в легких отмечается сходная морфология воздухоносных путей и респираторных отделов, за исключением зоны субплеврального ателектаза с неясной этиологией, имеющейся у одного из животных контрольной группы.

На основании выполненных популяционных исследований сделано общее заключение о том, что мышцы, трансгенные по гену лактоферрина человека, соответствуют физиологической норме для этого вида животных, поскольку единичные изменения, обнаруженные на гистологических препаратах, в равной мере присущи как опытным, так и контрольным животным. При этом важным моментом является сохранение воспроизводительной функции и высокого уровня продукции лактоферрина с молоком трансгенных животных.

Авторы выражают благодарность С.Г. Кадунину за помощь на первых этапах работы.

Работа выполнена при поддержке “Трансгенбанка”, Программ Союзного государства и грантов РФФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valenti P., Antonini G. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. № 22. P. 2576–2587.
2. Baker E.N. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. № 22. P. 2529–2530.
3. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. № 22. P. 2549–2559.
4. Venkatesh M.P., Rong L. // J. Med. Microbiol. 2008. V. 57. Pt 9. P. 1113–1121.
5. León-Sicairos N., Reyes-López M., Ordaz-Pichardo C., de la Garza M. // Biochem. Cell. Biol. 2006. V. 84. № 3. P. 327–336.
6. Bayes M., Rabasseda X., Prous J.R. // Methods Find. Exp. and Clin. Pharmacol. 2005. V. 27. № 8. P. 569–612.
7. Соколов А.В., Пулина М.О., Кристьян А.В. и др. // ДАН. 2006. Т. 411. № 2. С. 267–269.