

УДК 578.23:578.5:636.422:599.731.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ ГЕНОМОВ ЭНДОГЕННЫХ РЕТРОВИРУСОВ У СИБИРСКИХ МИНИ-СВИНЕЙ

© 2014 г. **Р.Б. Айтназаров¹, Н.С. Юдин^{1,2}, С.В. Никитин¹,
В.И. Ермолаев¹, М.И. Воевода^{1,2}**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: autrus@bionet.nsc.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки НИИ терапии СО РАМН,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 9 сентября 2013 г. Принята к публикации 7 октября 2013 г.

В работе представлены данные по изучению популяционной динамики сибирских мини-свиней по локусам *gag* и *env* эндогенных ретровирусов свиней. Частота носителей полноразмерных геномов PERV типов А, В и С у современных мини-свиней очень велика. В ходе селекции с 2005 г. по 2013 г. наблюдается достоверное повышение доли животных, свободных от ретровирусов типа В.

Ключевые слова: эндогенные ретровирусы свиньи, мини-свиньи, ксенотрансплантация, селекция.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных проблем трансплантологии как прикладной области медицинской хирургии является недостаток совместимых органов для пересадки от человека человеку. Считается, что в силу анатомо-физиологического сходства с человеком, по этическим и экономическим причинам, мини-свиньи являются главными донорами органов при ксенотрансплантации. Однако присутствие в клетках свиньи эндогенных ретровирусов (Porcine Endogenous Retrovirus, PERV), которые являются составной частью генома, вызывает опасность потенциальной зоонозной инфекции. При ксенотрансплантации искусственно создаются условия для рекомбинаций патогенных близкородственных вирусов человека и животного; появления новых инфекций; адаптации к организму человека вирусов, размножающихся в организме свиней. Существует вероятность того, что, находясь в латентной форме, при пересадке органа от животного-донора, PERV могут активизироваться и вызвать заболевания у человека, в том числе онкологические.

По структуре нуклеотидных последовательностей PERV подразделяют на три типа: А, В и С. Представители разных типов обнаруживают высокую гомологию в генах *gag* (group-specific-antigens) и *pol* (polymerase), но различаются по нуклеотидной последовательности в рецептор-связывающем домене гена *env* (envelope), кодирующего белок оболочки вируса. Эти различия определяют круг хозяев ретровирусов PERV, принадлежащих к разным типам (Jin *et al.*, 2000; Юдин, 2011).

Специально для нужд ксенотрансплантации за рубежом выведены несколько пород лабораторных мини-свиней. Первое стадо отечественных мини-свиней «минисибс» было создано в ИЦиГ СО РАН при скрещивании свиней вьетнамской черной и пятнистой пород, домашних свиней пород ландрас и крупной белой, а также кабанов европейского и среднеазиатского подвидов. В настоящее время совместно с Кемеровским производственным центром СО РАМН проводятся исследования по апробации и производству биопротезов клапанов сердца, кровеносных сосудов и ксеноперикардiallyного лоскута для интракардиальной хирургии и

ангиопластики с использованием материалов от минисибсов. С использованием пластинок роста тел позвонков новорожденных мини-свиней в Новосибирском НИИТО разработан метод получения хондротрансплантатов для коррекции дистрофических и травматических изменений хрящевой ткани, а также процессов роста при идиопатическом сколиозе (Тихонов, 2010).

Ранее нами было показано, что у сибирских мини-свиней широко распространены ретровирусы PERV всех трех типов (Никитин и др., 2008). Обогащенность геномов миниатюрных свиней ретровирусами, вероятно, обусловлена внесением их от пород-основателей. Особый интерес для ксенотрансплантации представляют животные, у которых не выявлено присутствие ретровирусов в геноме. Однако популяция сибирских мини-свиней была обследована нами ранее, в 2005 г. С тех пор скрининг популяции не проводился. Кроме того, для типирования ретровирусов в предыдущей работе мы использовали амплификацию только небольшого фрагмента гена *env*, что не позволяло идентифицировать полноразмерные геномы ретровирусов PERV.

Целью работы являлось изучение динамики популяции сибирских мини-свиней по локусам эндогенных ретровирусов PERV. Для идентификации полноразмерных геномов ретровирусов исследование проводили по двум локусам – *gag* и *env*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Центра коллективного пользования «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН. Были изучены основные хря-

ки-производители, свиноматки и случайная выборка молодняка в 2004 г. ($n = 160$) и 2013 г. ($n = 39$). Кровь брали из сердца после декапитации или прижизненно из передней полой вены. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Идентификацию геномов PERV проводили методом ПЦР с праймерами, специфичными для фрагментов генов *gag*, *env-A*, *env-B* и *env-C* (Никитин и др., 2008). Результаты обрабатывали с помощью критерия χ^2 с поправкой Йейтса в программе Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2005 г. нами было исследовано 160 сибирских миниатюрных свиней, из них 158 оказались носителями PERV типов А и С, 157 – типа В (табл.). У двух животных из 119 обследованных отсутствовал локус *gag*. Однако одно *gag*-негативное животное было положительно по локусу *env-A*, другое – по локусам *env-A* и *env-B*. Возможны два объяснения этому феномену. Известно, что геном свиньи содержит не только полноразмерные копии PERV, но также большое число дефектных провирусов, которым необходимо рекомбинировать, прежде чем они достигнут способности к производству полноценных вирионов (Юдин и др., 2011). Не исключено, что ДНК *gag*-негативных животных содержит «усеченный» провирус с делецией в гене *gag*. Второе объяснение связано с мутациями ДНК провируса в участках связывания с *gag*-специфичными праймерами. Поскольку считается, что геном свиньи может содержать от 6 до 10 способных к репликации провирусов, от 30 до 50 полноразмерных копий PERV и от 100 до 200 локусов, содержащих их частичную последовательность (Юдин и др.,

Таблица

Динамика структуры популяции мини-свиней по локусам эндогенных ретровирусов PERV

Год	Локусы, %							
	<i>env-A</i>		<i>env-B</i>		<i>env-C</i>		<i>gag</i>	
	+	–	+	–	+	–	+	–
2005	158 (98,75)	2 (1,25)	157 (98,12)	3 (1,88)	158 (98,75)	2 (1,25)	117 (98,32)	2 (1,68)
2013	36 (92,31)	3 (7,69)	35 (89,74)	4 (10,26)	39 (100)	0 (0)	39 (100)	0 (0)

2011), мы видим второе объяснение наиболее вероятным.

В 2013 г. из 39 животных 36 оказались носителями *env-A* и 35 – *env-B*. Все обследованные животные оказались положительными по локусам *env-C* и *gag*. Таким образом, с 2005 г. по 2013 г. в ходе селекции произошло достоверное повышение доли животных, свободных от ретровирусов типа В с 1,88 % до 10,26 % ($\chi^2 = 4,26$, $p = 0,04$). Наблюдаемая динамика может быть просто результатом генетического дрейфа, поскольку известно, что популяции сельскохозяйственных животных имеют низкую эффективную численность. Однако ранее нами было показано, что у мини-свиней, наряду с вертикальным переносом в ряду поколений, также, возможно, происходит горизонтальная передача инфекционных вирионов от особи к особи (Айтназаров, 2006). Повышение числа животных, свободных от PERV типа В, может быть связано с улучшением зоогигиенических условий содержания животных в последние годы.

Наше исследование показывает, что частота носителей полноразмерных геномов PERV типов А, В и С у современных сибирских мини-свиней очень велика. Мини-свиньи других пород также характеризуются высоким процентом носителей (Юдин и др., 2011). Поскольку существуют опасность активации вирусов PERV при ксенотрансплантации, а также способность к рекомбинации с эндогенными ретровирусами человека, в качестве доноров для ксенотрансплантации целесообразно выбирать особей, свободных хотя бы от одного из типов PERV.

ВЫВОДЫ

1. Частота носителей полноразмерных геномов PERV всех трех типов у сибирских мини-свиней очень высока.
2. В ходе селекции с 2004 г. по 2013 г. наблюдается достоверное повышение доли животных, свободных от вирусов типа В.
3. В качестве доноров для ксенотрансплантации целесообразно выбирать особей, свободных хотя бы от одного из типов PERV.

Работа поддержана грантом РФФИ (научный проект № 13-04-00968-а), грантом СО РАН (экспедиционный проект № 3э), Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № ФНМ-2012-05) и базовым бюджетным проектом № VI.53.12.

ЛИТЕРАТУРА

- Айтназаров Р.Б. Молекулярно-генетический анализ эндогенных ретровирусов у некоторых пород домашних свиней и диких кабанов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2006. 16 с.
- Никитин С.В., Юдин Н.С., Князев С.П. и др. Оценка частоты хромосом, содержащих свиные эндогенные ретровирусы, в популяциях домашней свиньи и дикого кабана // Генетика. 2008. Т. 44. № 6. С. 789–797.
- Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи, генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. 304 с.
- Юдин Н.С., Айтназаров Р.Б., Ермолаев В.И. Эндогенные ретровирусы свиньи: насколько велик риск при ксенотрансплантации? // Вавилов. журн. генет. и селекц. 2011. Т. 15. № 2. С. 340–350.
- Jin H., Inoshima Y., Wu D. *et al.* Expression of porcine endogenous retrovirus in peripheral blood leukocytes from ten different breeds // *Transplant Infectious Disease*. 2000. V. 2. No. 1. P. 11–14.

**IDENTIFICATION OF WHOLE GENOMES
OF ENDOGENOUS RETROVIRUSES IN SIBERIAN MINIATURE PIGS****R.B. Aitnazarov¹, N.S. Yudin^{1,2}, S.V. Nikitin¹, V.I. Ermolayev¹, M.I. Voevoda^{1,2}**

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: autrus@bionet.nsc.ru;

² Research Institute of Internal Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy
of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

Summary

Study of the populational dynamics of Siberian miniature pigs for the *gag* and *env* loci of endogenous pig retroviruses is reported. Currently, the frequency of carriers of types A, B, and C of PERV genomes in minipigs is high. Their breeding conducted from 2005 till 2013 increased the percentage of animals free from type B retroviruses.

Key words: pig endogenous retroviruses, miniature pigs, xenografting, breeding.