

ГЕНЕТИКА И ПРИОРИТЕТНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СУПЕРМЕЛКИХ МИНИ-СВИНЕЙ ДЛЯ МЕДИКО-БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

В.Н. Тихонов, В.Е. Бобович

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: Tikhonov@bionet.nsc.ru

В результате многолетней межподвидовой гибридизации домашних и диких свиней европейского и азиатского происхождения под иммуноцитогенетическим контролем создана новая форма особо мелких карликовых лабораторных свиней для медико-биотехнологического использования. Первая отечественная популяция супермелких микросибсов имеет уникальный кариотипический полиморфизм по числу хромосом ($2n = 36, 37$ и 38), а также не встречающуюся ни у одной породы домашних свиней необычную короткую форму слезной кости черепа (*os lacrimale*), особо раннюю репродуктивную скороспелость, своеобразные иммуногенетические характеристики концентрации аллелей кровогрупповых локусов *EAA*, *EAD*, *EAE*, *EAF*, *EAG* и *EAL*. Супермелкие мини-свиньи открывают возможность наиболее адекватного и экономичного моделирования широкого круга медико-биотехнологических исследований.

Ключевые слова: свиньи лабораторные, мини- и микросибс (лабораторная сибирская свинья), иммуногенетика, робертсоновская транслокация, краниология.

Введение

Лабораторные миниатюрные свиньи в настоящее время все шире используются во многих странах как новый вид лабораторных животных для решения широкого круга проблем, имеющих важное значение для медицинских, ветеринарных и селекционно-генетических исследований. Ежегодно публикуются многие сотни работ, выполненных на мини-свиньях с тех пор как на них была продемонстрирована наибольшая адекватность организму человека при радиоактивном воздействии и изучении метаболического синдрома (Тихонов, 2010).

В мировой лабораторной практике используют более 10 породных популяций мини-свиней, из которых наиболее удачными признаются созданные в США (хэнфордские, хормельские и юкатанские) и в ФРГ (геттингенские). Первые отечественные лабораторные свиньи, выведенные в Институте цитологии и генетики СО РАН, «минисибс» (миниатюрная сибирская свинья), по основным параметрам мини-свиней – ди-

намике роста живой массы, репродуктивным свойствам и жизнеспособности – полностью соответствуют лучшим зарубежным популяциям (Тихонов, 1990, 2010). Однако в последние годы возникла необходимость в дальнейшей селекционно-генетической работе по уменьшению их живой массы и адаптации к условиям содержания в современных вивариях, что обеспечивает более рациональное и экономичное их содержание и, главное, соответствует требованиям, необходимым для адекватного решения широкого круга новых медико-биотехнологических задач (Тихонов, Жучаев, 2008).

Материалы и методы

Создание первых мини-свиней в нашей стране было начато в конце 1960-х гг. в Институте цитологии и генетики СО АН СССР. Для этой цели впервые была использована оригинальная методика отдаленной межподвидовой гибридизации с использованием иммуно- и цитогенетического мониторинга. В многолетней работе

были получены и генетически изучены гибриды двух альтернативно различающихся по ростовой и репродуктивной скороспелости культурных пород свиней азиатского и европейского происхождения (вьетнамская порода и шведский ландрас), а также 2 подвида диких кабанов (среднеазиатский и центрально-европейский). Выбор указанных исходных популяций (генофондов) для нового вида лабораторных животных, а также иммуно- и цитогенетические методы изучения были определены особыми специфическими требованиями, которые предъявляют к ним в связи с научными задачами (Tikhonov, 1996; Петухов и др., 2005).

Результаты

Основной целью при создании компаундного желательного генома лабораторной свиньи прежде всего остается значительное уменьшение величины тела животного – карликовость,

что определяет удобство работы и стоимость содержания (рис. 1). Поэтому первой задачей являлся поиск адекватных исходных генофондов карликовости. С учетом результатов зарубежного опыта и отечественных возможностей было решено использовать геномы доступных популяций свиней, в генофонде которых могут находиться локусы, детерминирующие разную степень карликовости различного генезиса: мелких индокитайских домашних свиней, родственных *Sus scrofa vittatus*, и наиболее мелких горных диких кабанов из Средней Азии, *Sus scrofa nigripes*.

Размеры тела и органов мини-свиней детерминируются белковым соматотропным гормоном роста, который образуется в передней части гипофиза и состоит из 191 аминокислоты. По нашим данным, экспрессия фенотипической карликовости у миниатюрных свиней при определенных геномах может выражаться в 10 и более раз сильнее, чем у человека. Так, при



Рис. 1. Взрослый самец минисибс (живая масса 30 кг) с наследственным геномом карликовости (справа) рядом с обычным самцом нормального размера родительской породы шведский ландрас (живая масса 300 кг).

нормальном хорошем росте обычные свиньи современных пород в 6-месячном возрасте имеют живую массу 100 кг, а мини-свиньи могут иметь в этом возрасте менее 10 кг живой массы. Основным исходным пулом генов карликовости послужили вьетнамские черные масковые свиньи, изученные нами в зоопарках Кубы, и горный среднеазиатский кабан из популяции Сары-Челекского заповедника (Киргизия), использованный нами и при создании ландрас-кабаньих гибридов.

Мировой опыт использования разных исходных пород азиатского происхождения для выведения мини-свиней показывает, что они имеют крайне нежную конституцию и генетически обусловленный обмен веществ, который ведет к раннему патологическому ожирению. Они характеризуются гомозиготным генотипом по аллелям, детерминирующим черную пигментацию кожи и щетины и некоторыми другими нежелательными для лабораторных животных качествами. Поэтому на начальном этапе выведения мини-свиней мы использовали скрещивание домашних азиатских свиней с наиболее подходящими дикими предковыми формами, что придает им крепость конституции и позволяет фиксировать эффект взаимодействия генов карликовости разного генезиса в компаундном геноме.

В связи с нежелательными поведенческими и некоторыми другими физиологическими особенностями у азиатских диких и домашних свиней в качестве родоначальников породной группы мини-свиней было сочтено целесообразным включить в число исходных форм известную старую европейскую культурную породу домашних свиней – шведский ландрас. Биологические особенности этой породы были нам хорошо знакомы по многолетней селекционно-генетической работе с ней. Методами отдаленной межподвидовой гибридизации и воспроизводительным скрещиванием вышеописанных исходных форм в течение 40-летней селекционно-генетической работы под иммуно- и цитогенетическим контролем было получено около 10 тыс. гибридных животных 20 поколений.

Селекционно-генетическую работу при выведении миниатюрных свиней проводили под иммуногенетическим мониторингом по

антигенам систем групп крови (Тихонов, 1967, 1991). С 1969 г. она сопровождалась и цитогенетическим анализом (Tikhonov, Troshina, 1974, 1980), который в последние годы проводили при участии Н.М. Астаховой и М.Л. Кочневой (Тихонов, 2010).

Для понимания молекулярно-генетических особенностей генома отечественных микро-свиней следует постоянно иметь в виду, что одним из непосредственных их ближайших прародителей является вьетнамская порода, которая происходит от азиатского подвида *S. s. vittatus*. Последнее обстоятельство адекватно отражается в консервативных особенностях генома вьетнамских свиней, что убедительно подтверждается изучением у них частот азиатских иммуногенетических маркерных аллелей локусов *EAD*, *EAE*, *EAF* (Тихонов, 1991). Эти маркеры хорошо отражают многовековую историю микроэволюции и участия геномов азиатских предковых форм в процессе пороодообразования фактически всех современных домашних пород свиней, в том числе и крупной белой, беркширской и разных внутривидовых типов кемеровской. Микроэволюция геномов мини- и микросибсов хорошо прослеживается у всех современных культурных черно-пестрых и белых пород, особенно при сравнении с микроэволюционными изменениями при выведении миниатюрных сибирских лабораторных свиней. Динамика частот аллелей и генотипов локусов систем групп крови *EAA*, *EAD*, *EAE*, *EAF*, *EAG* и *EAL* (соответственно расположенных в хромосомах: 1, 12, 9, 17, 15 и 4), систем полиморфных белков сыворотки крови и гемолизатов одинаково адекватно моделируют сложнейшие элементы процесса пороодообразования микросибсов (Тихонов, 2010).

В дальнейшем особое внимание было уделено селекции по снижению пре- и постнатальной, а также ростовой скороспелости и возрасту достижения репродуктивной зрелости. В результате многолетней селекционно-генетической работы удалось закрепить уровень генетической скороспелости, который сейчас соответствует лучшим американским породным группам миниатюрных лабораторных свиней хэндфордских и юкатанских в ведущей специализированной медико-биологической лаборатории Чарльза Риверса (США). Достигнутая живая масса мини-свиней

в США и России наиболее адекватна организму взрослого человека среднего телосложения.

Результаты по снижению и фиксации живой массы минисибсов при получении последних поколений микросибсов позволили создать питомник супермелких мини-свиней, которых мы назвали микросибс, или суперминисибс (рис. 2–4). Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о значительном превосходстве микросибсов по мелкорослости над лучшей американской группой «мини-юкатанские», полученной в последние годы при длительной

селекции местной мелкой мексиканской свиньи, очень давно разводившейся в этом регионе.

Большое внимание оказалось необходимым придавать изучению оптимального времени наступления полового созревания и оплодотворения, а также потенциальной и фактической плодовитости. Многие самки микросибсов даже при недостаточно удовлетворительных условиях кормления и содержания могут успешно давать первое потомство ранее достижения ими календарного возраста 12 мес., а некоторые даже ранее 10 мес. Продолжительность

Таблица 1

Динамика живой массы у мини-свиней и микропигов США, мини- и микросибсов ИЦиГ СО РАН (для сравнения приведены данные по исходной породе минисибсов – ландрас)

Популяции	Живая масса (кг) животных в возрасте (мес.)			
	2	4	6	12
мини-хэнфорд, США	8–11	20–29	32–42	50–70
мини-юкатанская, США	7–9	15–20	25–30	45–65
минисибс, Россия	8–11	20–30	35–40	50–70
микропиги, США	6–8	12–14	16–20	35–50
микросибс, Россия	4–5	10–12	15–20	30–35
ландрас, Россия	20	50	100	200



Рис. 2. Свиноматка микросибс Веста № 472, давшая первое потомство (6 поросят) в возрасте 12,5 месяцев.

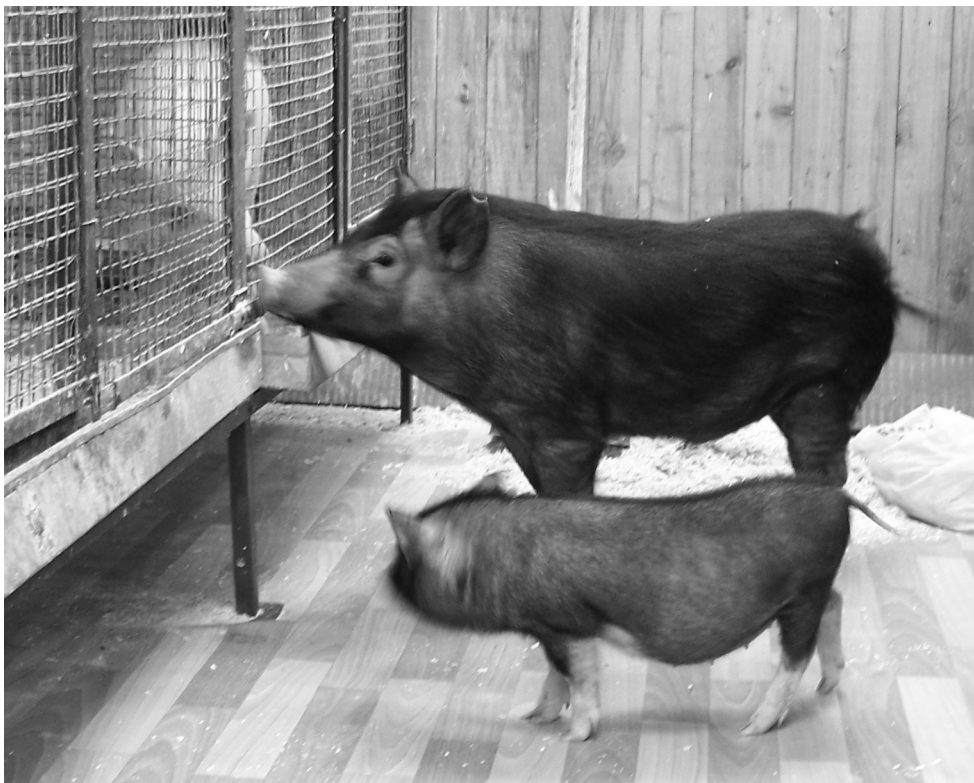


Рис. 3. Супермелкий хряк минисибс Хрюн (живая масса в 12 мес. – 27 кг) и свинка микросибс Мотя (живая масса в возрасте 5 мес. – 5 кг).



Рис. 4. Свиноматка микросибс № 242 с поросятами-отъемышами (опоросилась в возрасте 12 мес.).

беременности (супоросность) у минисибсов в разные годы колебалась от $112,9 \pm 0,2$ (1980 г. по 62 опоросам) до $115,1 \pm 0,3$ дня (1983–1986 гг. по 147 опоросам). Эти данные близки к продолжительности супоросности у геттингенских мини-свиней (115,3 дней), но следует отметить, что у вьетнамских свиней супоросность значительно короче $112,3 \pm 0,2$ дня, а у свиней ландрасской породы продолжительнее: $116,7 \pm 0,6$. Кстати, у диких кабанов она еще больше: 115–120 дней (Козло, 1975; Данилкин, 2002). Уже в пренатальный период интенсивность роста живой массы у мини-свиней значительно меньше, чем у обычных домашних свиней, о чем можно судить по живой массе новорожденных поросят и в 3-недельном возрасте. Минисибсы имели живую массу при рождении $639,9 \pm 14,4$ г, т. е. в 2–2,5 раза меньше, чем у ландрасов (1359 г) и по мере дальнейшего постнатального роста разница по живой массе увеличивается, достигая во взрослом состоянии 4–5-разовой кратности. Живая масса микросибсов при рождении колеблется от 400 до 680 г и составляет в среднем меньше 550 г. На 80-й день эмбрионального периода плоды

имеют массу от 200 до 280 г, а на 90-й день – около 300 г, тогда как у крупной белой породы в этом возрасте – более 600 г (Тихонов, 1950).

Для мини- и микросибсов характерной очень редкой генетической особенностью является необычное строение черепа, не встречающееся ни у одной культурной породы свиней (рис. 5, 6). Индекс коэффициента соотношения роста длины к ширине (высоте окологлазничной впадины) слезной кости всегда менее 1. У всех известных домашних пород свиней и изученных европейских и азиатских кабанов этот индекс наоборот больше 1, и увеличение его (удлинение слезной кости) связывают с увеличением доли европейских и уменьшением доли азиатских родоначальников в геноме современных домашних пород свиней, имеющих глобальное распространение (Адлерберг, 1933; Филиппченко, 1933; Genov *et al.*, 1999; Данилкин, 2002).

Обсуждение результатов

Лабораторные свиньи служат наилучшим модельным объектом и заслуженно пользуются



Рис. 5. Соотношение размеров, формы лобной и лицевой (носовой) частей черепа, а также наклона затылочного гребня у взрослых хряков минисибс (на переднем плане) и родительской формы европейского кабана (на заднем плане).



Рис. 6. Слезная кость (*os lacrimale*) хряка минисибс № 157 с вертикальным расположением в черепе, индекс соотношения ее длины к высоте 0,5.

репутацией оптимально удачной модели для медико-биологических экспериментов, благодаря тому что их органы размерами, анатомическими и функциональными особенностями в норме и патологии в наибольшей степени сходны с человеческими.

У мини-свиней и людей практически одинаковая топография артерий и вен кардиоваскулярной системы. Небольшое анатомическое отличие заключается только в том, что у свиньи имеется дополнительная малая левая непарная вена (*v. azygous minor*), которая входит в коронарный синус. У других лабораторных животных – крыс, кроликов, собак – кардиоваскулярная топография сосудов и гемодинамические особенности отличаются от человеческих в значительно большей степени. Такое же сходство справедливо отмечается и в отношении поджелудочной железы, органов выделения (включая почки), нейроэндокринной и половой систем.

Для медико-биологических исследований приоритетную роль играет особенно большое сходство органов пищеварительной системы мини-свиней и человека, которое обусловлено

общим растительно-мясным типом питания, их «всеядностью». Желудок у мини-свиней типичный однокамерный, относительная длина кишечника очень велика и примерно в 10 раз больше длины туловища.

Благодаря одинаковому типу питания и особенностям липидного и углеводного метаболизма, человек и мини-свиньи имеют очень похожий метаболический синдром. Они болеют аналогичными болезнями, в том числе спонтанным инфарктом и диабетом 2-го типа, которые справедливо называют «чумой 21-го века». Именно эти обстоятельства способствовали широкому использованию мини-свиней для моделирования и изучения метаболического синдрома. Метаболический синдром включает несколько важных симптомов: снижение чувствительности тканей организма к инсулину, абдоминальное ожирение и нарушения липидного обмена, повышенное артериальное давление. Метаболический синдром одинаково быстро приводит к развитию сахарного диабета второго типа (инсулиннезависимого), атеросклерозу, ишемической болезни сердца.

В индустриальных странах в настоящее время от метаболического синдрома страдает уже более 10–20 % населения старше 30 лет.

Именно мини-свиньям выпала важная миссия стать наиболее подходящими испытателями новых средств лечения метаболического синдрома. Проблемы ожирения, липидного и углеводного (особенно с инсулиновым компонентом) обмена на мини-свиньях изучают давно, но, к сожалению, не по всем комплексам метаболического обмена. Наиболее успешно пока проходят создание и совершенствование биоксенопротезов клапанов сердца в Кемеровском кардиологическом центре под руководством академика Л.С. Барбараша. Кстати, первые отечественные ксенобиопротезы клапанов сердца в нашей стране были изготовлены при использовании сердец от мини-свиней. Они могут быть весьма полезны и при дальнейшей разработке новых усовершенствованных ксенобиопротезных сердечных клапанов и кардиохирургических инструментов для всей линейки автоматического манипулирования с особо мелкими сосудами разных органов. При трансплантации сердечных клапанов, когда они предназначены для имплантации пациентам детского возраста, ситуация часто осложняется тем, что размер импланта не меняется по мере роста больного. Удачное решение этой проблемы нашли специалисты Ганноверской лаборатории биотехнологии и искусственных органов им. Лейбница. Из клапанов сердца мини-свиньи, использованной в качестве донора, удаляли все мышечные клетки и оставляли только каркас из соединительной ткани. Затем этот каркас заселяли стволовыми клетками, выделенными из костного мозга или крови реципиента. Такой новый, выращенный за несколько недель, клапан не вызывает иммуногенетического отторжения, связанного с гистонесовместимостью, и, главное, ксенобиопротез клапана растет вместе с пациентом. Работа по созданию «растущего биопротеза клапана сердца» была отмечена на высшем уровне премией Президента ФРГ.

Сейчас в США, Китае и других странах многие ученые интенсивно ведут работы на молекулярно-генетическом уровне по преодолению гистонесовместимости между организмом человека и органами мини-свиней, рассматри-

ваемыми в качестве наиболее вероятных возможных доноров. Из выявленных нескольких генов, отвечающих за гистонесовместимость, уже удастся половину инактивировать нокаутированием при трансгенезе.

В нашей стране за последние 15 лет проведены тысячи успешных ксенотрансплантаций клапанов сердца людям, в том числе значительное число операций сделано пациентам детского возраста. При этом во многих случаях не потребовалось проведения повторных трансплантаций. К сожалению, официальное использование в детской кардиохирургии имплантов для ксенотрансплантаций в нашей стране пока не разрешено законом. Это, естественно, задерживает и экспериментальное изучение актуальной проблемы трансплантации ксенобиопротезов от мини-свиней.

Ежегодно во всем мире в трансплантациях органов остро нуждаются сотни тысяч пациентов, но эта потребность не может и никогда не сможет быть удовлетворена за счет только человеческих донорских органов. Даже в таких сравнительно небольших странах, как Англия, ежегодно производят более 10 тыс. трансплантаций. Хронический и практически бесконечный дефицит неизбежно усугубляется объективными причинами: очень высокой индивидуальной иммуногенетической специфичностью органов, необычайной трудностью их получения и, к сожалению, очень высокой стоимостью. При этом в качестве доноров для ксенотрансплантации из всех животных можно рассматривать лишь мини-свиней как по этическим и анатомо-генетическим, так и по чисто финансовым причинам.

Потенциальный мировой рынок в отношении сердец, почек, поджелудочных желез и других органов мини-свиней для ксенотрансплантации человеку даже при современных возможностях обеспечения гистосовместимости по самым осторожным расчетам превосходит 5 млрд долларов. Но еще более значительная сумма вложения требуется для изучения и лечения гастроэнтерологических заболеваний (включая диабет) и нейроэндокринных болезней, а также болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, эпилепсии и многих других.

В 1998–2010 гг. на базе ИЦиГ СО РАН при участии кардиохирургов Научно-исследова-

тельского института патологии кровообращения (НИИПК) МЗ России им. Е.Н. Мешалкина было начато экспериментальное изучение возможности использования минисибсов в качестве наиболее вероятных потенциальных доноров для ксенотрансплантации частей и всего сердца человеку. Экспериментальные кросстрасплантации сердца между мини-свиньями показали полную осуществимость таких пересадок уже в настоящее время по реальным технологическим и хирургическим возможностям, обеспечивающим необходимое поддержание соответствующей гемодинамики. Однако остается актуальной необходимость дальнейшего изучения новых методов обеспечения гистосовместимости на основе трансгенеза мини-свиней с использованием генетических элементов из стволовых клеток эмбрионов человека. Кстати, такие опыты успешно продолжаются в Массачусетском университете США (под руководством известного ученого Д. Тейлор), а также в нескольких университетах континентального Китая и на Тайване.

В 2005 г. в одном из аграрных университетов КНР удалось успешно осуществить клонирование необходимых для трансплантации поросят. А в 2009 г. китайские медики провели серию ксенотрансплантаций разных внутренних органов от мини-свиней шимпанзе. Китайский ученый Янг Хоньцзы, руководивший международным проектом со стороны КНР, сообщил, что первые опыты по ксенотрансплантации будут продолжены в специальной научной лаборатории при Клиническом центре трансплантологии провинции Сычуань. Предполагается сделать попытку пересадить свиную печень, поджелудочную железу, почки и другие органы, наиболее востребованные в клинической медицине при ксенотрансплантации, нескольким шимпанзе.

Изучение возможности модификации генома свиней и их клонирование для ксенотрансплантации органов человеку интенсивно ведут также в Австралии, Южной Корее, ФРГ. В настоящее время работа по геномодификации и клонированию минисибсов с использованием стволовых клеток для создания гистосовместимого генома, обеспечивающего толерантность при ксенотрансплантации органов человеку, находится на начальных этапах. Основным методом

является клонирование трансгенных мини-свиней с нокаутированными генами, что блокирует формирование полисахаридов, участвующих в образовании альфа-1.3-галактозилтрансферазы (*GGTA1*) у доноров.

Литература

- Адлерберг Г.П. К вопросу о происхождении домашних свиней // Проблема происхождения домашних животных. М.: Изд-во АН СССР, 1933. С. 185–210.
- Данилкин А.А. Свиньи. М.: Геос, 2002. 309 с.
- Козло П.Г. Дикий кабан. Минск: Ураджай, 1975. 224 с.
- Петухов В.Л., Тихонов В.Н., Желтиков А.И. Генофонд скороспелой мясной породы свиней. Новосибирск: ИПЦ «Юпитер», 2005. 631 с.
- Тихонов В.Н. Некоторые вопросы эмбрионального роста и развития свиньи: Дис. ... канд. биол. наук. М.: ВИЖ, 1950. 208 с.
- Тихонов В.Н. Использование групп крови при селекции животных. М.: Колос, 1967. 391 с.
- Тихонов В.Н. Генетика мини-свиней. Новосибирск: ИГиГ СО АН СССР, 1990. 209 с.
- Тихонов В.Н. Иммуногенетический и биохимический полиморфизм домашних и диких свиней. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 303 с.
- Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи, генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Наука, 2010. 304 с.
- Тихонов В.Н., Жучаев К.В. Микроэволюционная теория и практика породообразования свиней. Новосибирск: Наука РАН, 2008. 394 с.
- Филиппченко Ю.А. Краниологические исследования диких видов свиней // Проблемы происхождения домашних животных. М.: Изд-во АН СССР, 1933. С. 157–184.
- Genov P.V. A review of the cranial characteristics of the Wild Boar (*Sus scrofa* Linnaeus 1758), with systematic conclusions // Mammal Rev. 1999. V. 29. N 4. P. 205–238.
- Tikhonov V.N. The siberian miniature pig, its development, genetics, and use in biomedical research // Advances in Swine in Biomedical Research. Plenum Press, N.Y., London, 1996. V. 2. P. 693–707.
- Tikhonov V.N., Troshina A.I. Chromosome translocations in the karyotypes of wild boars *Sus scrofa* L. of the European and Asian areals of the USSR // Theor. Appl. Genet. Berlin, 1974. V. 45. P. 1294–1298.
- Tikhonov V.N., Troshina A.I. Marker chromosome translocation Tr.1 and Tr. 2 in development of commercial Landrace × Wild Boar Hybrids and Siberian minipigs // 4th European Colloquium on Cytogenetics. Uppsala, Sweden, 1980. P. 242–249.

GENETICS AND MAJOR APPLICATIONS OF SUPERSMALL PIGS IN MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY

V.N. Tikhonov, V.E. Bobovich

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

Summary

Long-term immunocytogenetically controlled hybridization of domestic pig breeds and wild pigs of European and Asian origin has brought about a breed population of very small laboratory pigs that can be used in medicine and biotechnology. The first Russian population of supersmall Microsibs is uniquely polymorphic in chromosome set ($2n = 36, 37$, or 38). Other features are the unusually short lacrimal bone (*os lacrimale*), not found in any domestic breed; very early reproductive maturity; and specific immunogenetic features of the concentrations of blood type alleles of loci: *EAA*, *EAD*, *EAE*, *EAF*, *EAG*, and *EAL*. Supersmall pigs allow the most adequate and economic modeling in many tasks of medicine and biotechnology.

Key words: laboratory pigs, Mini- and Microsibs (laboratory Siberian swine), immunogenetics, robertsonian translocation, craniology.