

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>

## ТРАНСГЕННЫЕ И НОКАУТНЫЕ КРОЛИКИ В БИМЕДИЦИНЕ И ГЕНОТЕРАПИИ. CRISPR/CAS9-ТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

Е.М. Колоскова<sup>1</sup>, В.Н. Каркищенко<sup>2</sup>, В.А. Езерский<sup>1</sup>, Н.В. Петрова<sup>2\*</sup>, С.В. Максименко<sup>2</sup>,  
Е.Л. Матвеев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»  
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, пос. Институт*

<sup>2</sup> *ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий  
Федерального медико-биологического агентства России»  
143442, Российская Федерация, Московская обл.,  
Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1*

С появлением эндонуклеазных методов редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9, стало возможным методом микроинъекции зигот с высокой эффективностью получать животных — как мышей, так и особенно генно-модифицированных кроликов — для различных целей. В настоящей работе рассматриваются современные мировые достижения по созданию кроликов — биомоделей заболеваний человека с использованием технологий геномного редактирования, явления мозаицизма. Делается заключение о целесообразности получения генетически модифицированных кроликов для биомедицинских исследований и биомоделирования.

**Ключевые слова:** редактирование генома кроликов, трансгеноз, нокаут, CRISPR/Cas9-технологии, мозаицизм, биомодели для генной терапии и биомедицины

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А., Петрова Н.В., Максименко С.В., Матвеев Е.Л. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;15(4):12–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>

Поступила 08.06.2019

Принята после доработки 29.10.2019

Опубликована 10.12.2019

## RABBIT BIOMODELS OF HUMAN DISEASES DEVELOPED USING NEW GENOMIC TECHNOLOGIES. CRISPR/CAS9 (REVIEW)

Elena M. Koloskova<sup>1</sup>, Vladislav N. Karkischenko<sup>2</sup>, Vadim A. Yezersky<sup>1</sup>,  
Nataliya V. Petrova<sup>2\*</sup>, Sergey V. Maksimenko<sup>2</sup>, Elena L. Matveyenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after academician L.K. Ernst  
249013, Russian Federation, Kaluga region, Borovsk, Institut village*

<sup>2</sup> *Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, building 1*

With the advent of endonuclease methods of genome editing, particularly CRISPR/Cas9, it has become possible to obtain genetically modified rabbits by microinjection of zygotes. These highly effective human disease models can be used for various purposes. The present review aims to consider modern achievements in the creation of rabbit biomodels of human diseases using the technologies of genetic editing. It is concluded that Russian laboratories should intensify research in the development of genetically modified rabbits that can be used for various biomedical studies and biomodelling.

**Keywords:** rabbit genome editing, transgenesis, knockout, CRISPR/Cas9 technologies, mosaicism, biomodels for gene therapy and biomedicine

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Koloskova E.M., Karkischenko V.N., Yezersky V.A., Petrova N.V., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L. Rabbit Biomodels of Human Diseases Developed Using New Genomic Technologies. CRISPR/Cas9 (Review). *Journal Biomed.* 2019;15(4):12–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>

Submitted 08.06.2019

Revised 29.10.2019

Published 10.12.2019

## Введение

Генетически модифицированные (ГМ) животные используются в биомедицине для изучения молекулярных основ болезней человека, моделирования заболеваний, в разработке и испытании биопродуктов, для получения рекомбинантных биотехнологических, или т. н. «фармацевтических», белков. Особо востребованы для фармако-токсикологических исследований гуманизированные модели — трансгенные животные, содержащие функционирующие гены, клетки, ткани или иные органоиды человеческого организма [4]. Так, с целью использования в доклинических испытаниях лекарственных препаратов российскими учеными были созданы генно-модифицированные мыши с введенными человеческими генами NAT1, NAT2, HLA I класса и др. [2, 3].

В подавляющем большинстве исследований в качестве биомодели используют мышь, но ее полезность ограничена небольшим размером, короткой продолжительностью жизни, различиями с человеком в анатомии, физиологии, биохимии. В отличие от модели-мыши кролик имеет ряд преимуществ более крупного животного и давно используется для изучения заболеваний человека. Кролики быстро достигают половой зрелости, имеют короткий период беременности,

дают большое потомство при относительно простом содержании. В течение последних двух десятилетий кролики, в т. ч. и трансгенные, все больше востребованы в области биомедицины [6, 11].

## Недалекая история трансгеноза и геномного редактирования кроликов

Первый трансгенный кролик был получен микроинъекцией (МИ) конструкции ДНК в пронуклеус зиготы еще в 1985 г. [29], однако эффективность получения трансгенных (ТГ) животных классическим трансгенозом длительное время оставалась низкой [12, 33]. В отличие от мышей технологии использования эмбриональных стволовых клеток (ESC) на кроликах практически не работали, метод переноса ядер соматических клеток (SCNT) имел очень низкую эффективность [16, 30, 99]. В 2011 году с использованием ZNF был получен первый ГМ кролик с сайт-специфичной модификацией — разрушением локуса гена *IgM* [24]. Эта технология была применена в создании кроликов с нокаутом генов *APOC3* и *APOE* [35, 93], *CETP* [101] в 2017 году. Примерно в это же время TALEN-технологией были созданы КО-кролики *Rag1*, *Rag2* [71, 86], *FAH* [43].

Первый кролик с нокаутом гена (knock-out, KO) был получен методом SCNT только

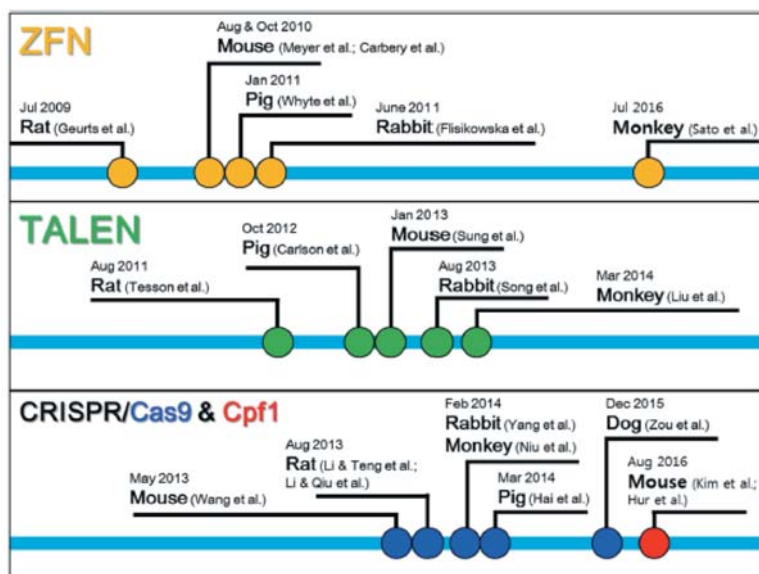
в 2015 году [94]. Тем временем стремительно развивающиеся методы редактирования генома позволили получать КО-гены у разных видов животных, в т. ч. и кроликов [12, 32].

С появлением методов геномного редактирования и новых эндонуклеазных технологий более 10-ти видов млекопитающих, в т. ч. кролик, были добавлены в список животных с нокаутом генов (рис. 1). Эффективность получения ГМ животных методом микроинъекции в пронуклеус возросла в несколько раз. Так, при извлечении из суперовулированной крольчихи 30–50 ооцитов/эмбрионов при их МИ компонентами той или иной эндонуклеазной системы развивается до 50% эмбрионов. После их переноса в фаллопиевы трубы крольчихи-реципиентки 30–50% дают потомство, эффективность ГМ которого может достигать 100%.

По сравнению с классическим трансгенозом современные технологии дают возмож-

ность получения животных с расширенным диапазоном модификаций (нокаутом одного или нескольких целевых генов одновременно, сайт-специфической вставки (knock-in, KI) конкретной геномной последовательности) в применении к оплодотворенным яйцеклеткам методом МИ с очень высокой эффективностью.

Основными механизмами репарации разрывов, вносимых сайт-направленными нуклеазами в определенное место генома, являются негомологичная сшивка концов ДНК (NHEJ) и, в случае наличия подходящей одно- или двухцепочечной матрицы, — гомологичная рекомбинация (HDR), позволяющая сайт-специфично интегрировать трансген, находящийся между плечами гомологии к ДНК-мишени. Направленное редактирование генома позволяет избежать основных недостатков «классического» трансгеноза — случайного встраивания трансгена в геном, неконтролируемого числа копий трансгена.



**Рис. 1.** Хронология применения нуклеазных технологий ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 и Cpf1 для редактирования генома у различных лабораторных животных [41].

**Fig. 1.** Chronology of application of nuclease technologies ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 and Cpf1 for genome editing in various laboratory animals [41].

## Гены-мишени кроликов-биомоделей, полученные с использованием современных эндонуклеазных технологий

Несмотря на впечатляющие результаты, применение методов ZFN и TALEN в практике большинства лабораторий затруднительно. Для редактирования геномов более востребованной оказалась технология **РНК-направляемых эндонуклеаз** — CRISPR/Cas9. Начиная с 2013 года, CRISPR-технология активно применяется для получения ГМ животных с целью их использования в качестве биомоделей для изучения физиологии и болезней человека или животных, биореакторов для получения биологически активных белков, доноров органов для трансплантации [44, 57, 78].

Для идентификации подходящих мишеней РНК-направляющих (sgRNA) эндонуклеаз создано множество онлайн-инструментов [7], позволяющих оценить не только эффективность gRNA, но и их потенциальное неспецифическое действие на геном выбранного организма. Векторы для технологии CRISPR, в т. ч. экспрессионные плазмиды с кодон-оптимизированной версией эндонуклеазы Cas9 (hCas9), можно приобрести в разных компаниях, наиболее популярная из них — Addgene (<http://www.addgene.org>). Существует несколько методов построения векторов экспрессии sgRNA, но все они заключаются в синтезе пары олигонуклеотидов на основе последовательности целевого сайта, которые затем отжигаются и клонируются в CRISPR-вектор.

## Кролики, полученные с использованием технологии CRISPR/Cas9

**Кролики с нокаутом одного или одновременно нескольких генов.** Первые ГМ КО-кролики с использованием технологии РНК-направляемых эндонуклеаз были получены международной группой исследователей (США, Китай, Япония) в 2014 году.

В условиях *in vitro* культивирования кроличьих эмбрионов был осуществлен нокаут девяти генов: *APOE*, *CD36*, *LDLR*, *RyR2*, *CFTR* (трансмембранный регулятор муковисцидоза), *APOC3*, *SCARB1* (белок липидного метаболизма — scavenger receptor class B member1), *LEP* (лептин) и *LEPR* (рецептор лептина). Эффективность sgRNA к целевым генам была разной: от 10% к *LEPR* до 100% к *RyR2*. Были получены F0 кролики нескольких нокаутных линий — *CD36*, *LDLR*, *APOE* и *RyR2* со средней эффективностью нокаута генов 56%, получения биаллельных мутаций — 40%. При использовании всего 10-ти кроликов — доноров эмбрионов и 10-ти реципиентов из 301-го эмбриона получили 38 КО F0 (табл. 2). В среднем на один ген было использовано пять кроликов, работа была выполнена всего за два месяца [92]. В том же году на эмбрионах кроликов была показана возможность одновременного нокаута нескольких генов: эффективность биаллельного КО каждого из генов *IL2rg*, *RAG1* и *RAG2* была 100, 90 и 100% соответственно, т. е. для трех генов сразу — почти 100%. Для 5-ти генов одновременно (*IL2rg*, *RAG1*, *RAG2*, *TIK1*, *ALB*) эффективность биаллельного КО была у каждой третьей бластоцисты. В этой же серии экспериментов с очень высокой эффективностью были получены кролики КО по одному (*IL2rg*<sup>-/-</sup>) и двум генам одновременно (*IL2rg*<sup>-/-</sup> + *RAG1*<sup>-/-</sup>) (табл. 2 и 3) [90].

## Кролики со встроенными модификациями (Knock-in, KI)

Локус *ROSA26* очень часто используется для направленного трансгена гомологичной рекомбинацией при создании трансгенных организмов с предсказуемым профилем экспрессии трансгена. Встраивание трансгена в этот локус не вызывает неблагоприятных последствий для жизнеспособности и позволяет получить устойчивую экспрессию трансгена во всем организме.

Таблица 1. Гены-мишени для нокаута у кроликов-моделей

Table 1. Target genes for knockout in rabbit models

Ген	Белок, функция	Модель-заболевание, цель исследования	Ссылка
<b>IgM</b>	Иммуноглобулин М	Инактивация эндогена для замены человеческим	[24] <sup>z</sup>
<b>ApoE</b>	Аполипопротеин Е	Метаболизм липидов и липопротеинов: гиперлипидемия, атеросклероз	[93, 35] <sup>z</sup> ; [92, 51, 98]
<b>LDLR</b>	Рецептор липопротеинов низкой плотности		
<b>APOC3</b>	Аполипопротеин С-III		
<b>RyR2</b>	Рианодинновый рецептор 2, компонент кальциевого канала	Сердечная недостаточность	[92]
<b>CD36</b>	Мембранный белок поверхности макрофагов	Врожденный иммунитет	[92]
<b>FAH</b>	Фумарилацетоацетатгидролаза	Тирозинемия 1-го типа (HT1)	[43] <sup>T</sup>
<b>CETP</b>	Белок-переносчик эфиров холестерина	Атеросклероз	[101] <sup>z</sup>
<b>FBN1</b>	Фибриллин-1	Поражения соединительной ткани	[14]
<b>FOXN1</b>	Фактор транскрипции — развитие волосяного фолликула и тимуса	Т-клеточный иммунодефицит	[69]
<b>IL2RG</b>	Сигнальный компонент интерлейкиновых рецепторов	Т-, В- и NK-клеточный иммунодефицит	[90, 69]
<b>RAG1</b>	Элементы соматической рекомбинации генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов	Т- и В-клеточный иммунодефицит	[71, 86] <sup>T</sup> ; [90, 69]
<b>RAG2</b>			
<b>PRKDC</b>	Полипептид репарации двунитевых разрывов ДНК	Т- и В-клеточный иммунодефицит	[69]
<b>Tyr</b>	Тирозиназа: окисление фенолов, биосинтез меланина	Альбинизм, пигментная меланома	[31]; [75]; [47] <sup>BE</sup> , [48] <sup>APOBEC3A-nCas9</sup>
<b>MSTN</b>	Миостатин	Гипермышечный фенотип	[53]; [27]; [47] <sup>BE</sup>
<b>PFEX</b>	Фосфат-регулирующая эндопептидаза	Гипофосфатемия, рахит	[80]
<b>DMD</b>	Дистрофин	Мышечная дистрофия Дюшенна	[77]; [47] <sup>ABE7</sup>
<b>ANO5</b>	Аноктамин-5, трансмембранный белок (возможный хлоридный канал)	Поясно-конечностная мышечная дистрофия	[79]
<b>DMP1</b>	Белок матрицы дентина 1	Минерализации костей и дентина	[48]
<b>GJA8</b>	Коннексин 50, трансмембранный белок хрусталика глаза	Порошкообразная зонулярная катаракта	[96]
<b>CRYAA</b>	α-кристаллин А	Ядерная форма катаракты	[97]
<b>SRY</b>	Белковый фактор развития семенников	Гермафродитизм	[72, 74]
<b>ATP7B</b>	Транспортирующий медь АТФ-азный протеин Р-типа	Болезнь Вильсона	[36]
<b>PAX4</b>	Ядерный транскрипционный фактор: генерация, дифференциация, развитие и выживание β-клеток, продуцирующих инсулин в поджелудочной железе	Сахарный диабет	[89]
<b>LMNA</b>	Ламин А/С, основные компоненты слоя под мембраной клеточного ядра, называемого ядерной ламиной	Синдром преждевременного старения	[78]; [47] <sup>BE</sup>
<b>FUT1,FUT2, SEC1</b>	Фукозилтрансферазы	Межклеточные взаимодействия: гликозилирование белков	[45]
<b>Hoxc13</b>	Фактор транскрипции: развитие волос, ногтей, волосяных луковиц	Эктодермальная дисплазия волос и ногтей 9 (ECTD-9)	[18]
<b>GADD45G</b>	Белок реагирования на стресс	Расщепление нёба	[52]

Примечание: <sup>z</sup> — ZNF-технология; <sup>T</sup> — TALEN-технология; <sup>BE, ABE7, APOBEC3A-nCas9</sup> — редакторы оснований, модификация CRISPR.

Note: <sup>z</sup> — ZNF-technology; <sup>T</sup> — TALEN-technology; <sup>BE, ABE7, APOBEC3A-nCas9</sup> — base editors, modification CRISPR.

Таблица 2. Кролики, нокаутные по одному гену  
Table 2. One-gene knockout rabbits

Ген-мишень	mRNA Cas9 (нг/мкл) / sgRNA (нг/мкл) / кол-во sgRNA	Живые крольчата / всего крольчат / подсажено эмбрио- нов / МИ эмбрионов	Биаллельны (-/-) / ГМ (-/-, -/+) / всего крольчат	Ссылка
<b>APOE</b> <b>CD36</b> <b>LDLR</b> <b>RyR2</b>	150/6/1	12/?/94/? 13/?/54/? 28/?/93/? 15/?/60/? Всего: 68/?/301/?	10/10/12 4/11/13 0/9 /28 1/8 /15 Всего: 15/38/68	[92]
<b>LDLR</b> (7 экзон)	49/13 sgRNA1	3/3/12/14	3/3/3	[51]
	49/13 sgRNA2	4/10/79/82	10/10/10	
<b>LDLR</b> (2, 7 экзон, Δ2800)	40/13/2+2	1/5/?/179	1 <sup>+</sup> (Δ2800)	[98]
<b>FBN1</b> (65 экзон)	200/30/2	28/?/197	26/28	[14]
<b>Il2rg</b>	200/20	8/?/66/?	3 <sup>+</sup> /8/8	[90]
TIK11	200/20	5/?/30/?	3 <sup>+</sup> /5/5	
<b>TYR</b> (экзон 1)	5 (pX330)	9/9/67/77	1 <sup>+</sup> /2/9	[31]
<b>TYR</b> (экз.3, Δ105 п.н.)	100/25/2	17/169/?	1 <sup>+</sup> (Δ105)/15/17	[75]
<b>TYR</b> (3'utr, Δ330 п.н.)	100/25/2	4/?/84/92 <sup>1</sup>	2(в т. ч. Δ)/3/4	[73]
<b>TYR</b> (экзон 1) <sup>BE3</sup>	200/50	?	6 <sup>+</sup> /6/7	[47]
<b>TYR</b> (экзон 1) <sup>АРОВЕС3А</sup>	200/50	?	5 <sup>+</sup> /5/5	[48]
<b>MSTN</b> (экзон 1)	180/40/2	20/?/158/?	6 <sup>+</sup> /16/20	[53]
<b>MSTN</b> (экзон 1) <sup>BE3</sup>	200/50	?	4 <sup>+</sup> /6/7	[47]
<b>MSTN</b> (экзоны 1,3; Δ ≈4600 п.н.)	200/20/1	2/2/65/85	24/34 (19–экз1, 18–экз2, 13–экз1+экз3, 2-Δ)	[27]
	200/40/2	3/5/56/80		
	100/40/2	29/32/194/218		
<b>PHEX</b> (экзон 1)	200/40/2	26/?/131/?	11 <sup>+</sup> /19/26	[80]
<b>GJA8</b> (экзон 1)	180/40/2	11/11/110/?	0/11/11	[96]
<b>CRYAA</b> (экзон 2)	180/40/2	19/?/85/?	15/19/19	[97]
<b>DMD</b> (экзон 51)	200/50/2	33/?/128/?	22 <sup>+</sup> /26/33	[77]
<b>DMD</b> (экзон 9) <sup>ABE7</sup>	200/50	?	6 <sup>+</sup> /6/7	[47]
<b>ANO5</b> (экзон 12, 13)	200/40/2	26/?/124/?	?/13/26	[79]
<b>SRY</b> (Sp1)	100/25/2	9♂ из 20/?/391/?	7/9	[72]
<b>SRY</b> (HMG)	100/25/2	1/?/75/?	Мозаичность, химеризм	[74]
<b>PAX4</b> (экз. 3,5, Δ ≈1200 п.н.)	180/40/2	22/?/210/?	15 <sup>+</sup> /19/22	[89]
<b>LMNA</b> (экзон 3)	200/50/2	32/?/126/?	29 <sup>+</sup> /30/32	[78]
<b>FOXN1</b>	150/6	4/?/20/?	20/21	[69]
<b>RAG2</b>	150/6	3/?/18/?		
<b>IL2RG</b>	150/6	10/?/20/?		
		3/?/18/?		
<b>PRKDC</b>	150/6	Итого: 21/?/76/? (3 рец.)		
<b>FBN1</b> (экз. 65)	200/30/2	28/?/197/?	26/28	[14]
<b>LMNA</b> (экзон 11) <sup>BE3</sup>	200/50	?	7 <sup>+</sup> /7/8	[47]

Примечание: ? — данные не приведены; Δ — ожидаемая крупная делеция; гз — гомозиготы.  
Note: ? — data not provided; Δ — the expected large deletion; гз — homozygotes.

С использованием локуса *ROSA26* были созданы сотни ТГ животных, в первую очередь — мышей, и клеточных линий, экспрессирующих различные трансгены. Как и у мышей, транскрипты локуса *Rosa26* кроликов — некодирующие РНК, стабильно экспрессируемые во всех тканях [91]. С применением ДНК-матрицы, содержащей ген зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*) с соответствующими фрагментам



Таблица 3. Кролики, нокаутные по нескольким генам одновременно

Table 3. Multi-gene knockout rabbits

Гены-мишени	mRNA Cas9 (нг/мкл) / sgRNA (нг/мкл) / кол-во sgRNA	Живые крольчата / всего крольчат / подсажено эмбрионов / МИ эмбрионов	Характеристика ГМ крольчат(-/-, +/-) / живые крольчата	Ссылка
<b>Il2rg+RAG1</b>	200/20+20	5/?/67/?	2 Il2r <sup>-/-</sup> , 3 Il2r <sup>+/+</sup> ; 5 RAG1 <sup>-/-</sup>	[90]
<b>RAG1+RAG2</b>	150/6	3/15 (1 рец.)	1(RAG1 <sup>-/-</sup> +RAG2 <sup>-/-</sup> )/3/3	[69]
<b>FOXN1+PRKDC+IL-2RG+RAG1 +RAG2</b>	150/6	5/45 (2 рецип.)	1 (FOXN1+PRKDC+RAG1); 1(IL2RG+RAG1); 1(IL2RG); 1 (PRKDC+RAG1); 1 (FOXN1+PRKDC+IL2RG <sup>-/-</sup> +RAG1 <sup>-/-</sup> )/5	
<b>LDLR (2,7 экзон)+APOE (5'utr)</b>	40 / 13 / пара 1+1	4/10/?/96	1(LDLR <sup>-/-</sup> , Δ2800); 2 (LDLR <sup>-/-</sup> +APOE <sup>-/-</sup> )/4	[98]
<b>LDLR (2, 7 экзон)+APOE (1 экзон)</b>	40 / 13 / пара 2+1	2/3/?/109	2 (LDLR <sup>-/-</sup> +APOE <sup>-/-</sup> )/2	
<b>FUT1+FUT2+SEC1</b>	200/50/2	31/?/181/?	6 <sup>-/-</sup> /8/31	[45]

Таблица 4. Knock-in кролики

Table 4. Knock-in rabbits

Ген-мишень	mRNA Cas9 (нг/мкл) / sgRNA (нг/мкл) / кол-во sgRNA	ДНК донор, конц.	Условия введения	KI / KO / всего крольчат / транспл. эмбрионов	Ссылка
<b>rbROSA26 (интрон1)</b>	150/6+RS-1/7,5	Cre-reporter 100 нг/мкл	CP	7/?/20/100	[91]
<b>rbROSA26 (интрон1)</b>	100/6	EGFP 100 нг/мкл	CP	3/29/43/373	[70]
	100/6+RS-1/7,5			10/18/38/146	
<b>ATP7B (экз.8)</b>	20/10/2	ssODNs, (Arg778Leu) 50mM	19 ч после ХГЧ 14 ч после ХГЧ	2/7/14/62 9/5/17/56	[36]
<b>TYR (экз.3)</b>	100/25/2	ssODNs, (K373T) 50mM	CP	5/17/22/158	[76]

**Примечание:** CP — МИ в цитоплазму; ХГЧ — хорионический гормон человека; ssODNs — одонитевые олигонуклеотиды ДНК.

**Note:** CP — microinjection into the cytoplasm; ХГЧ — human chorionic hormone; ssODNs — single-stranded DNA oligonucleotides.

*Rosa26* плечами гомологии, были получены *rbRosa26-EGFP* кролики с экспрессией зеленого белка во всех тканях (табл. 4). Эффективность гомологичной рекомбинации (HDR) возрастала при использовании вещества *RS-1*, успешно применявшегося для получения KI-мышей. Ингибитор процесса негомологичного соединения концов (*NHEJ*), соединение *SCR7*, однако, не смещал ДНК-репарацию в пользу HDR [70].

С использованием рекомбинационной системы Cre/loxP получают ТГ животных с условным нокаутом генов, нокаутом генов в нужное время или в нужном месте. Линия кроликов *rbRosa26-CRE-reporter* содержала

ген *tdTomato*, инвертированный ген *EGFP* и введенные последовательности *loxP* и мутантную *loxP2272*, дающие возможность Cre-удаления гена *tdTomato* с последующей экспрессией *EGFP* [91].

### Методические проблемы, связанные с формой и местом введения компонентов

Подавляющее большинство работ с использованием CRISPR/Cas9-технологии в настоящее время проводятся либо с использованием РНК-форм компонентов, либо рибонуклеопротеинового комплекса — белок Cas9 и gRNA. Прямая МИ

в пронуклеус плазмидной ДНК (pX330), содержащей кассеты экспрессии hCas9 и сайт-специфичной sgRNA, — простой и воспроизводимый метод целевого мутагенеза у мышей [56], на кроликах была применена в работе по получению КО *Tyr* кроликов [31, 38].

Компоненты CRISPR/Cas9 в РНК-форме вводят в цитоплазму яйцеклетки. Как правило, для сайт-специфичной модификации гена в эмбрионах млекопитающих вводимые мРНК готовят в несколько этапов: реконструируют вектор экспрессии мРНК, после чего получают нужную молекулу транскрипцией *in vitro* [92]. Время жизни РНК в клетке гораздо меньше, чем у плазмидной ДНК, что также может быть причиной меньшего проявления мозаицизма и неспецифических мутаций. Введение плазмидной ДНК в цитоплазму вместо пронуклеуса приводит к мозаичности у большинства эмбрионов кроликов. Плазмидная форма, в отличие от РНК, более устойчива и не требует особых условий хранения ( $-20^{\circ}\text{C}$  против  $-80^{\circ}\text{C}$ ), работа с ней проще. Рибонуклеопротеиновый комплекс в виде композиции белка Cas9 и sgRNA или белка Cas9 с парой crRNA–tracrRNA вводят в пронуклеус, при этом эффективность последнего варианта в экспериментах на мышах была выше, чем при использовании РНК-форм [8].

**Концентрации, количество CRISPR-компонентов.** Для Cas9 mRNA и sgRNA в первой работе на кроликах [92] брали 150 и 6 нг/мкл соответственно: более высокие концентрации sgRNA (12, 18 или 24 нг/мкл) не улучшали эффективность целевых мутаций, но могли привести к появлению неспецифических нарушений. При равных концентрациях sgRNA Cas9 mRNA в количестве 200 нг/мкл была токсичнее для развития эмбрионов, чем 100 нг/мкл: выживаемость эмбрионов перед трансплантацией составляла 70% против 89%. Отмечены факты съедания неполноценного потомства

матерями [27]. Концентрация плазмидных форм компонентов CRISPR/Cas9 (pX330) для введения в пронуклеус, как правило, не превышает 5–10 нг/мкл [31].

При использовании двух sgRNA, направленных на ДНК-фрагменты с рядом расположенными PAM-мотивами, эффективность нокаута гена может быть выше, как это продемонстрировано на гене *MSTN* у кроликов [53].

**Неспецифичность.** Критической проблемой геномного редактирования является эффект неспецифичности CRISPR/Cas9, наблюдаемый, однако, не так уж часто, особенно на полученных живых F0 потомков. В сообщениях о сайт-специфично модифицированных мышах и крысах, полученных с помощью системы Cas9, было очень мало обнаруживаемых нецелевых мутаций [85]. В контексте получения ГМ животных основное внимание к нецелевым мутациям обычно сужают до области экзона, что делает их анализ возможным и доступным. При использовании строгого способа оценки нецелевых мутаций в возможных мишенях-экзонах (условие — точное совпадение ключевой последовательности 12-ти нуклеотидов плюс NGG в PAM), их не нашли, возможно, из-за низкой концентрации sgRNA — 6 нг/мкл [92]. Напротив, при 20 нг/мкл sgRNA нецелевые мутации были обнаружены у 5-ти из 13-ти крольчат F0 только в одном сайте (с не самой высокой расчетной вероятностью) из нескольких. Побочная мутация не отразилась на рождении и фенотипе *IL2rg* КО-кроликов [90].

При одновременном введении нескольких sgRNA и исследовании 30-ти потенциальных неспецифических мишеней их модификаций не нашли [98]. У КО *PFEX* кроликов при исследовании 14-ти потенциальных сайтов лишних мутаций не обнаружили [80]. При использовании pX330 у F0 крольчат не было ни *hCas9* трансгенеза, ни потенциальных неспецифических мутаций [31].



**«Технические» моменты получения ГМ кроликов с использованием CRISPR/Cas9-технологии.** Исследования КО-кроликов показали, что часто модифицируются сразу оба аллеля (не редкость и гомозиготные модификации), фенотип биаллельных мутаций может быть получен уже в поколении F0 без скрещивания моноаллельных мутантных родителей. Размножение скрещиванием нокаутных гетерозиготных братьев и сестер способно вызвать инбредную депрессию, что может препятствовать распространению и практическому использованию КО-кроликов.

Как и у других видов, при предимплантационном развитии эмбрионов у кроликов может возникнуть мозаичность. Первое деление эмбрионов кроликов происходит примерно через 24–32 ч после оплодотворения, а второе и третье деление — в течение следующих 8-ми ч с образованием 8-клеточных эмбрионов. Этот короткий период на 2- и 8-клеточной стадиях может вызвать более сложные мозаичные модели, чем у других видов.

**Дополнительные возможности CRISPR/Cas9.** Набор инструментов редактирования генов постоянно расширяется. Появилась возможность редактирования отдельных нуклеотидов ДНК. В 2016 году команда Гарвардского университета сообщила о создании первого метода «редактирования оснований», разработанного для преобразования одного нуклеотида в другой без расщепления двойной спирали генома с использованием направленной ферментативной активности цитидиндезаминазы к конкретным геномным локусам. Этот метод редактирования оснований (Base editor, или BE3) работает в двух случаях превращений: C-T и G-A [39]. Другой редактор оснований (ABE7) преобразует T-C или A-G [25]. Оба метода имеют высокую точность и могут применяться для исправления большинства однобуквенных мутаций, присутствующих в геноме.

При использовании систем BE3 и ABE7.10 для создания точечных замен оснований в генах кролика *Mstn*, *Dmd* и *Tia1* эффективность, проверенная на бластоцистах, составляла 53–88%. Эффективность точечных замен у F0 кроликов по генам *Mstn*, *Tyr*, *LMNA*, *Dmd* составляла в среднем 86,5% (табл. 2). Частота инделей, соответственно, уменьшалась [47]. Однако при использовании BE3 часто возникают нежелательные замены C-T, когда в «окне редактирования» находится несколько C-нуклеотидов. Еще один редактор оснований с использованием однодоменной цитидиндезаминазы человека (APOBEC3A (eA3A)) предпочтительно дезаминирует цитидины в конкретных мотивах в соответствии с иерархией TCR>TCY>VCN [25]. Если в первой работе с использованием BE3-редактора частота случайных соседних C-T мутаций гена *Tyr* была 86%, в следующем эксперименте с использованием APOBEC3A-nCas9-редактора в целевой точечной замене все кролики были гомозиготны (табл. 2), частота лишних замен была 28%. Все F0 были альбиносы [46]. Полученные результаты демонстрируют перспективность применения редакторов оснований в создании моделей, точно имитирующих генетические заболевания человека.

### Мозаицизм как геномное разнообразие

Ранее мы показали, что попадание плазмидной формы ДНК в цитоплазму приводит к почти 100%-ной мозаичности, поскольку клетки могут претерпевать изменения во время последовательных этапов онтогенеза, то есть подвергаться различным постзиготическим мутациям, которые наследуют все дочерние клетки [102].

Многоклеточный организм, в структуре которого присутствуют генетически разнородные популяции клеток, произошедшие из общей зиготы, называется *мозаик*. Мозаицизм может существовать как в сом-

тических клетках, так и в клетках зародышевой линии [13]. Если мозаицизм встречается только в популяции соматических клеток, фенотипический эффект будет зависеть от размера популяции мозаичных клеток и сроков возникновения мутаций. Такой признак не будет передан потомству [13]. А если мозаицизм встречается только в популяции клеток зародышевой линии, индивидум не будет иметь фенотипических проявлений, но его потомки унаследуют данный признак. Также возможно, что в случае индукции мозаицизма в раннем онтогенезе как соматические, так и клетки зародышевой линии будут мозаичны [17]. Существует множество возможных механизмов развития мозаицизма: соматические мутации, эпигенетические изменения, нарушения структуры и/или количества хромосом [13, 102].

Хромосомный мозаицизм проявляется с довольно высокой частотой в эмбриональных тканях, достигая 25% в спонтанных абортусах. Ограниченность мозаицизма только одной специфической тканью — известный феномен. Ещё в 1983 г. Калоушек и Дилл описали хромосомный мозаицизм, ограниченный только плацентой (ограниченный плацентарный мозаицизм) [34].

Вполне резонно предположить, что самой обычной генетической причиной пренатальной смерти может быть хромосомный мозаицизм. Можно прийти к заключению, что ограниченный определённой тканью мозаицизм — причина дисфункции этой ткани, как это было продемонстрировано на примере заболеваний головного мозга, на мозге плодов и тканях яичника. Следовательно, при поиске роли хромосомного мозаицизма в патологии нужно напрямую изучать ткани, подвергшиеся патологическим изменениям.

С хромосомным мозаицизмом связаны некоторые хромосомные болезни человека, обычно трисомии: мозаичную форму могут иметь синдром Дауна (око-

ло 2%), синдром Клайнфельтера, синдром Шерешевского — Тёрнера (20–50% больных), синдром Эдвардса (около 10%), синдром де ля Шапеля; при этом, как правило, часть клеток характеризуется обычным набором хромосом, а часть клеток — наличием дефектной хромосомы. Если число мутантных клеток при мозаицизме составляет менее 10%, то картина синдромов менее выраженная. Мозаицизм по половым хромосомам (XX/XY) в ряде случаев приводит к интерсекс-состояниям [34].

С мозаичными формами генных болезней не следует путать мозаицизм гонад. Мозаицизм гонад является частным случаем органного мозаицизма, возникающего на более поздних стадиях эмбрионального развития в процессе органогенеза. Наличие его у клинически здорового индивида может обусловить рождение детей с полной формой доминантной наследственной болезни (например, гемофилии) [34].

Не так давно было обнаружено, что соматический хромосомный мозаицизм характерен для развивающегося головного мозга человека в большом числе нормальных эмбрионов. Более того, было установлено, что увеличение мозаичной анеупloidии в развивающемся мозге человека — интегральный компонент развития центральной нервной системы [34].

## Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине

Последовательности генов кроликов имеют гомологию с генами человека больше, чем у грызунов. Ранний эмбриогенез и гастрюляция (процесс образования зародышевых листков) кролика более близки к человеку, что позволяет использовать кролика как репродуктивную модель [20]. Терагенный эффект талидомида, не проявлявшийся на мышах, был подтвержден на кроликах [42]. Заболевания легких, их патофизиология, воспалительные реакции модели-кролика, особенно в случае аст-

мы, сопоставимы с теми, что встречаются у человека: кроликов используют в лекарственных скрининговых тестах на аллергические реакции как модель для исследования терапии стволовыми клетками [37], заболеваний глаз (дегенерация сетчатки, синдром сухого глаза, глаукома, катаракта, увеит и др.) [40, 100].

Моделирование опухолей у кроликов применяется достаточно давно. Преимущественно используется опухоль VX2 (плоскоклеточная карцинома). Перевивку этой опухоли применяют в экспериментальной онкологии для моделирования злокачественных новообразований головы и шеи, почки, головного мозга, печени [62], при исследовании колоректального рака с метастазами в печень [67]. Для исследования образования метастазов лимфатическая система кролика подходит больше, чем у грызунов [61].

Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной заболеваемости и смертности в развитых странах. Мыши — не самая подходящая модель для изучения этих болезней не только из-за размера: у грызунов преобладает  $\alpha$ -тяжелая цепь миозина (*MHC*), у крупных млекопитающих, включая кроликов и людей, экспрессируется преимущественно  $\beta$ -*MHC*. Трансгенные по мутантному гену  $\beta$ -*MHC* человека кролики — модель для изучения гипертрофической кардиомиопатии человека [49]. Трансгенные кролики используются для изучения атеросклероза, нарушений ионных каналов сердца, индуцированной тахикардией кардиомиопатии [61]. Кролики — объект для моделирования артериального тромбоза [5], остеопороза [66].

Для изучения защитного иммунитета, индуцированного профилактической вакцинацией, например вирусом простого герпеса (HSV-1), гуманизированные HLA-трансгенные кролики во многих случаях — более корректная модель, чем HLA-трансгенные мыши [15]. На кроликах

изучают инфекционные заболевания человека, включая СПИД (вызванный ВИЧ1), Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-I), вирус простого герпеса типа 1, туберкулез, сифилис [65], исследуют острую печеночную недостаточность, заболевания, вызванные норовирусами, папилломавирусами [19].

На кроликах исследуют обусловленные питанием метаболические синдромы [9, 50]. В отличие от мышей кролики чувствительны к холестерину: как у людей, у них могут развиваться тяжелые гиперхолестеринемии. Природные мутанты с наследуемой гиперлипидемией несут мутацию сдвига рамки считывания в гене рецептора липопротеина низкой плотности, и у них развивается атеросклероз даже при нормальном питании. Модели кролика, в т. ч. и трансгенные, активно используются для исследования липидного обмена, атеросклероза, остеопороза [20, 21].

Для изучения **метаболизма липидов и липопротеинов** необходимы разные модели: если *APOE* KO-кроликов, чтобы вызвать гиперлипидемию, необходимо держать на диете с высоким содержанием холестерина, нужны и модели с возможностью развития метаболических заболеваний на обычном рационе. Модификация гена *LDLR* созданием инделей в 7-м экзоне (кодирует консервативный домен, подобный предшественнику эпидермальный фактор роста (EGF)) привела к получению семи кроликов *LDLR* KO, и все они содержали биаллельные модификации. Моделирование третичной структуры модифицированных белков *LDLR* KO-кроликов показало отличие каждого из них от WT типа. У всех F0 кроликов на нормальной диете спонтанно развивались гиперхолестеринемия и атеросклероз, выраженные как на биохимическом, так и на гистологическом уровнях. Такая модель полезна для изучения семейной гиперхолестеринемии человека [51].

При одновременном использовании gRNA к разным экзонам гена *LDLR* был проведен нокаут гена как большой (2800 п. н.), так и мелкими делециями в сайтах-мишенях (табл. 1). С высокой эффективностью был осуществлен и одновременный нокаут генов *LDLR/APOE*, в т. ч. с большой делецией в гене *LDLR* (табл. 3). У КО-кроликов была выраженная гиперлипидемия с уровнем холестерина в 10 раз большим по сравнению с кроликами дикого типа. У КО F0 кроликов развивался аортальный и коронарный атеросклероз [98]. Ожирение и **метаболический синдром** — проблемы социально-медицинского значения. Признанная экспериментальная модель для изучения наследственной гиперхолестеринемии, атеросклероза человека — кролики линии Ватанабе с врожденной гиперхолестеринемией, вызванной генетическим нарушением функции рецептора *LDLR*. Диеты с высоким содержанием жира, холестерина и сахара приводят к быстрому развитию гиперхолестеринемии, атеросклероза, сосудистых изменений. *APOE* КО-кролики с точки зрения их липидного и липопротеинового профилей сравнимы с кроликами Ватанабе и могут быть полезной моделью для изучения гиперлипидемии человека [57]. Трансгенные кролики с измененной экспрессией специфических генов позволяют уменьшить продолжительность экспериментальных исследований, демонстрируют быструю и сильную реакцию на диету [50].

Быстрое и эффективное получение **иммунodefицитных** кроликов было выполнено комплексной трансплантацией эмбрионов с мишенями в генах *FOXN1*, *RAG2*, *IL2RG*, *PRKDC*. Группы эмбрионов, микроинъектированных sgRNA к этим генам, объединяли для трансплантации всего трем реципиентам. В результате у 20-ти из 21-го крольчат были индели в соответствующих генах (табл. 2). При одновременном таргетинге двух соседних генов *RAG1* и *RAG2* (меж-

ду ними 6,1 т. п. н.) у всех крольчат были индели по обоим генам, у одного — биаллельные гомозиготные мутации. При одновременной МИ сразу пяти sgRNA к генам *FOXN1*, *RAG1*, *RAG2*, *IL2RG* и *PRKDC* были получены крольчата с мутациями от одного до четырех генов (табл. 3) [69]. У кроликов был тяжелый комбинированный иммунодефицит, характеризующийся отсутствием или выраженной гипоплазией тимуса и белой пульпы селезенки, а также отсутствием незрелых и зрелых Т- и В-лимфоцитов в периферической крови. Полный анализ крови показал тяжелую лейкопению и лимфоцитопению, сопровождающуюся тяжелой нейтрофилией [68].

**Тирозиназа** — медьсодержащий фермент, катализирующий окисление фенолов, играет ключевую роль в биосинтезе меланина. Пигментная меланома, злокачественная опухоль, берущая свое начало из меланоцитов, характеризуется повышенной активностью тирозиназы. Мутации гена тирозиназы нарушают процесс синтеза меланина и приводят к альбинизму глаз и кожи, изменению пигментации кожи. КО *Tyr* мыши и крысы характеризуются разнообразием окраски шерсти [58, 95], что сразу наглядно демонстрирует эффективность ГМ. В первом опыте по КО гена *Tyr* кролика использовали плазмиду pX330 с кодирующей последовательностью Cas9 и gRNA, разработанную Mashiko и сотр. для мышей [56]. Кролики КО *Tyr* имели окрас по типу голландского кролика [31]. Для получения нефункциональной тирозиназы использовали пару sgRNA для образования крупной делеции. Эффективность каждой sgRNA была около 80%, но делеции крупного фрагмента при совместной МИ двух sgRNA была менее 10%. С применением 4-х sgRNA (по паре к каждому сайту) эффективность крупной делеции выросла до 17%. Возможно, одновременное использование нескольких sgRNA снижает эффективность отдельных из них, и для получения

направленной крупной делеции требуется не более четырех sgRNA [75]. На примере нокаута гена *Tyr* была показана важность 3'-некодируемой последовательности (utr) с polyA-мотивами в его нормальном функционировании: в результате ее удаления у кроликов (делеция по одному аллелю) был серый цвет шерсти и уменьшение уровня меланина в волосных фолликулах и радужках глаз [73].

**Миостатин** — белок, подавляющий рост и дифференцировку мышечной ткани у млекопитающих. Нокаут гена *Mstn*, ранее успешно осуществленный для мышей, коз, свиней и КРС, с высокой эффективностью был получен и у кроликов [53]. Кролики имели типичный фенотип с гипертрофией и/или гиперплазией мышц, увеличенную массу тела. Полученный фенотип сохранялся в F1, при этом у новорожденных крольчат не было существенной разницы в размере тела и весе по сравнению с WT. В работе др. группы ученых мишенью были выбраны 1-й и 3-й экзоны гена *Mstn*, в т. ч. с целью получения большой делеции. Было отмечено много мертворождений, ранней смертности. У большинства ГМ крольчат был увеличенный язык. Почти у половины крольчат были индели в обоих экзонах, у двух — большие делеции. По сравнению с предыдущей работой, у *Mstn* KO новорожденных крольчат был повышенный вес [27]. Такие исследования важны для выяснения безопасности KO *MSTN* с/х животных, получаемых с целью увеличения мясной продуктивности.

Связанная с X-хромосомой **гипофосфатемия** (XLH) — наиболее распространенная причина наследуемого рахита, встречающаяся у людей с частотой 1/20000. Инактивация или мутация гена *PHEX* приводит к гипофосфатемии и дефектам минерализации костей, хрящей, зубов. *PHEX* KO-кролики имели типичный для заболевания фенотип. Крольчата начинали умирать после рождения: в течение 15-ти недель

смертность составляла 90%, самцы погибали в течение двух месяцев [80].

Другое связанное с X-хромосомой заболевание — **мышечная дистрофия Дюшенна** (DMD) возникает в результате мутаций в гене дистрофина *DMD*. Встречаемость заболевания — 1 из 3500 новорожденных мальчиков. Как биомодель DMD применяют мышей *Mdx* (*Dmd*), однако доклинические исследования на этой модели плохо соотносятся с состоянием DMD-пациентов. У KO *Dmd* кроликов понижалась физическая активность, повышался уровень креатинкиназы в сыворотке крови, наблюдался прогрессирующий мышечный некроз и фиброз, имелись и др. признаки, очень похожие на таковые у человека с DMD. Эффективность получения *Dmd* KO-кроликов была очень высокой: 78% F0 крольчат, из которых 85% были *Dmd*<sup>-/-</sup> [77].

Другие дистрофии — поясно-конечностная мышечная дистрофия типа 2L и мышечная дистрофия Миоши типа 3 — связаны с мутациями в гене *ANO5*. Мыши с полным нарушением транскриптов *ANO5*, как биомодели, не проявляли явных фенотипов мышечной дистрофии, тогда как у кроликов с инделями в 12-м и/или 13-м экзоне *ANO5* были типичные признаки соответствующей мышечной дистрофии [79].

DMP1 — белок, необходимый для правильной **минерализации кости и дентина**, присутствует в различных клетках костной и зубной тканей. KO *Dmp1* мыши имеют ограничения для изучения гипофосфатемического рахита (ARHR). KO *Dmp1* кролики имели многие особенности ARHR человека и после рождения погибали в течение 8-ми недель из-за развития тяжелого дефекта костной микроархитектуры [46].

Синдром Марфана — заболевание наследственного типа, при котором поражается **соединительная ткань** — проявляется признаками изменения скелета, сердца и сосудов, глаз, кожи, ЦНС, легких. Синдром развивается в результате мутации



гена *FBNI*, кодирующего фибриллин-1, при недостатке которого волокна соединительной ткани становятся чрезмерно растяжимыми и менее устойчивыми к деформациям. В наибольшей степени повреждению подвержены сосуды и связки. При модификации 65-го экзона гена *FBNI* у фибриллина-1 обрезаются С-конец, необходимый для его секреции. *FBN*<sup>+/+</sup> кролики имели все признаки синдрома Марфана: мышечное истощение, глазной синдром, расширение аорты и липодистрофия, снижение сборки микрофибрилл во внеклеточном матриксе (табл. 2) [14].

На сегодняшний день идентифицировано 22 гена, мутации в которых ответственны за развитие наследственной врожденной **катаракты**. С целью скрининга лекарств для ее профилактики и лечения были получены кролики с нокаутом некоторых генов, кодирующих критичные для зрения белки. Мутации в белке *коннексин 50* (Cx50 или GJA8) приводят к возникновению порошкообразной зонулярной катаракты. При получении КО *GJA8* кроликов эффективность мутации была 98,7% у эмбрионов и 100% у крольчат, у которых были обнаружены микрофтальмия, малый размер хрусталика и катаракта [96]. Мутации в гене *CRYAA* белка, играющего важную роль в поддержании прозрачности хрусталика, структуры др. его белков, — одна из причин развития ядерной формы врожденной катаракты. КО *CRYAA* крольчата имели мутации гена *CRYAA* с инделями в диапазоне 3–52 п. н., без неспецифических мутаций, у большинства была катаракта разной степени [97].

**Гермафродитизм** — проявление аномалий генов, регулирующих определение пола, развитие гонад или экспрессию гормонов и их рецепторов в эмбриональном развитии во время половой дифференцировки. Один из генов — *SRY* (*Sex-determining Region Y*), расположенный на Y-хромосоме большинства млекопитающих, кодирует белковый

фактор развития семенников и инициирует развитие организма по мужскому типу. Мутация или дисфункция его консервативного домена *HMG* (ДНК-связывающегося домена белка *SRY*) индуцирует синдром реверсии пола у XY-носителей. Мутации *Sp1*-связывающего сайта (*Sp1* — фактор транскрипции, необходимый для дифференциации сперматозоидов) в 5'-фланкирующей области *SRY* также связаны с клиническим синдромом реверсии пола. В первом исследовании при введении мутаций в *Sp1*-сайте большинство полученных крольчат-самцов КО *SRY-Sp1* имели женские признаки и были бесплодны, но при гормональной обработке могли стать «суррогатными матерями» [72]. При введении мутации в область *HMG* был получен кролик-гермафродит, имевший яичники, семенники и матку одновременно (табл. 2) [74].

С возникновением и развитием **сахарного диабета** связаны нарушения множества генов, *PAX4* — один из них. У *PAX4*<sup>-/-</sup> кроликов наблюдали замедление роста, стойкую гипергликемию, снижение количества инсулинпродуцирующих β-клеток и увеличение количества глюкагонопродуцирующих α-клеток. Фенотипы, ассоциированные с заболеванием, включая диабетическую нефропатию, гепатопатию, миопатию и кардиомиопатию, также наблюдались только у *PAX4*<sup>-/-</sup> кроликов (табл. 2) [89].

Причиной развития **синдрома преждевременного старения**, известного как прогерия, или синдром Гилфорда, является мутация гена *LMNA*. При этом очень редком наследственном заболевании у детей развиваются симптомы, ассоциированные с преклонным возрастом, в т. ч. выпадение волос, уменьшение слоя подкожной жировой клетчатки, атеросклероз и изменения скелета. Такие дети обычно умирают от болезней сердечно-сосудистой системы в подростковом возрасте. Для понимания патофизиологических механизмов синдрома преждевременного и процессов нор-



мального старения человека были получены *LMNA* КО-кролики. Все они имели пониженную двигательную активность, аномально жесткий скелет, укороченный рост и умерли в течение 22-х дней. У кроликов были кардиомиопатия, мышечная дистрофия, костные и суставные аномалии, липодистрофия. Эффективность получения *LMNA* ГМ кроликов была 94%: 29 из 30-ти ГМ крольчат были *LMNA*<sup>-/-</sup> (табл. 2) [78].

Одновременная **мутация нескольких гомологичных генов** с использованием общих для этих генов sgRNA была выполнена на группе генов трех фукозилтрансфераз (*FUT1*, *FUT2* и *SEC1*). Эти ферменты участвуют в биосинтезе фукозилированных гликанов, необходимых для многочисленных биологических процессов, таких как сигнальная трансдукция, взаимодействие хозяина и микрофлоры, развитие тканей, прогрессирование рака и др. Нуклеотидные последовательности генов *FUT1*, *FUT2* и *SEC1* имеют высокую гомологию, что позволяет подобрать общие для них sgRNA. Были получены кролики с КО *FUT1*, *FUT2* и *SEC* в разных комбинациях со сниженной активностью ферментов (табл. 3). Из восьми ГМ крольчат у четырех были мутации одновременно по двум генам, у одного — биаллельные мутации сразу по трем генам [45].

**Эктодермальная дисплазия 9 (ECTD-9)** характеризуется гипотрихозом и дистрофией ногтей без других эктодермальных нарушений и вызывается мутациями в гене *HOXC13*. Мыши и свиньи с мутациями в *Hoxc13* не дают гипотрихозный фенотип, тогда как у *Hoxc13*<sup>-/-</sup> кроликов шерстный покров отсутствует. При резком снижении количества волосных луковиц увеличивалось количество сальных желез, и такой дисбаланс соответствовал клиническим проявлениям заболевания. *Hoxc13*<sup>-/-</sup> кролики могут быть адекватной моделью для изучения ECTD-9 человека, дерматологических заболеваний, таких

как акне и гипотрихоз, в доклинических исследованиях [18].

**Расщепление нёба** («заячья губа») — один из наиболее распространенных врожденных дефектов у человека. Как один из факторов, влияющих на риск развития этого заболевания, определен ген *GADD45G* из семейства генов, ответственных за реагирование на стресс. Из-за тяжелых черепно-лицевых дефектов *GADD45G*<sup>-/-</sup> крольчата умирали после рождения: впервые была показана роль гена *GADD45G* в формировании верхней челюсти [52].

**Болезнь Вильсона** — врожденное или приобретенное нарушение метаболизма меди, приводящее к тяжелейшим наследственным болезням центральной нервной системы и внутренних органов. Описано более 600 мутаций гена *ATP7B*, приводящих к болезни Вильсона. Из-за недостатка белка ATP7B (транспортирующий медь АТФ-азный протеин Р-типа) нарушается трансмембранный транспорт меди, встраивание ионов меди в белок церулоплазмин. С использованием CRISPR/Cas9-технологии в сочетании с однокитевыми олигонуклеотидами ДНК (ssODNs, плечи гомологии по 46 нуклеотидов) была сгенерирована точечная мутация гена *ATP7B* для моделирования наиболее часто встречаемого типа мутации у азиатов (Arg778Leu) с болезнью Вильсона. Кролики, несущие аллель с мутантным *ATP7B*, умирали примерно в трехмесячном возрасте. Содержание меди в их печени было увеличено в девять раз, что аналогично пятикратному увеличению, наблюдаемому у людей с болезнью Вильсона. Авторы исследования отмечали высокую эффективность сайт-специфичных точечных мутаций при МИ РНК в зиготы на более ранних стадиях: 53% против 14% при МИ зигот через 14 и 19 ч соответственно после обработки ХГЧ [36].

В другой работе тоже была сгенерирована точечная мутация гена *TYR* с изменением 373-го кодона, приводящая к замене

в тирозиназе треонина на лизин. Мутация T373K в гене *TYR* снижала активность фермента: у кроликов *TYR-K373T* пигментация луковиц шерсти и радужки глаз была нарушена [76].

## Генная терапия

**Генная терапия** — совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний. Это новая и бурно развивающаяся область, ориентированная на исправление дефектов, вызванных мутациями ДНК, или придания клеткам новых функций, альтернативная стратегия лечения многих заболеваний. Иными словами, это способ лечения или коррекции заболевания путем искусственного введения в клетку новой генетической информации, призванной поправить ту, с которой связана болезнь. Животные-модели, имитирующие условия заболевания человека, в генной терапии необходимы при оценке использования вирусных векторов — их безопасности, эффективности, дозировки, локализация экспрессии трансгена в доклинических испытаниях препаратов генной терапии. Наиболее часто в исследованиях генной терапии используются мыши, крысы, кролики, свиньи, гуманизированные мыши [27]. Кролик, классическая модель для изучения офтальмологических и сердечно-сосудистых заболеваний, используется в качестве модели генной терапии этих же заболеваний. В доклинических исследованиях внутримышечное введение кролику плазмидной ДНК, кодирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), усиливало коллатеральное развитие сосудов и перфузию тканей на модели ишемии задней конечности [78]. Эффективным для этих целей было и введение плазмиды с геном фактора роста гепатоцитов (HGF) [81]. Было показано предотвращение об-

разования артериального тромба путем локальной сверхэкспрессии тканевого активатора плазминогена (ТАП) [87] введением в бедренную артерию кролика рекомбинантного аденовирусного вектора, экспрессирующего ТАП человека.

Описано успешное применение гена IL-10 с использованием тетрациклин-зависимого промотора в качестве терапевтического при генной терапии аутоиммунного дакриoadенита (воспаление слезных желез) у кроликов [82]. Неоваскуляризация — патологическое разрастание сосудов там, где в норме их быть не должно. В офтальмологии выделяют неоваскуляризацию роговицы и хориоидальную неоваскуляризацию. Протеогликан декорин способен подавлять этот процесс. Введение гена декорина в роговицу заметно снижало ее VEGF-индуцированный ангиогенез [59].

На кроликах проверяли эффективность, безопасность, уровень экспрессии трансгена человеческого фактора IX (hFIX) в зависимости от дозы, серотипа аденоассоциированного вирусного вектора, способного вызывать у человека иммунный ответ [22].

Генно-направленная ферментативная пролекарственная терапия — «тройная» суицидальная генная терапия, представляющая собой нацеленную на опухоль систему доставки гена, кодирующего фермент, преобразующий безвредное пролекарство в цитотоксические метаболиты *in situ*. Описано исследование, что внутриартериальное введение стволовых клеток мезенхимы, трансдуцированных оптимизированным геном (MSC-CYP2B6TM-RED), с последующим внутривенным введением циклофосфида (CPA) в опухоль печени кролика VX2 привело к 78%-му некрозу опухоли с уменьшением метастазов [63].

**Продукенты** диагностических и терапевтически активных белков — еще одна область применения кроликов, в т. ч. и трансгенных. Кроличьи моноклональные антитела от использования в сугубо

научных целях имеют все более широкое терапевтическое и диагностическое применение [85]. Для диагностических приложений, в т. ч. нескольких видов рака, FDA утверждено использование ряда кроличьих поли- и моноклональных антител (pAbs, mAbs). Кроличьи mAbs к рецептору программируемой клеточной смерти (PD-1) — ниволумаб и атезолизума (последний пока не зарегистрирован в России) — используются в таргетной иммунотерапии рака. До III фазы клинических испытаний дошел уже целый ряд mAbs [55].

Трансгенные животные перспективны в качестве биореакторов для продукции фармацевтических белков с молоком или кровью. Кролик — самое маленькое животное, из которого могут быть получены рекомбинантные белки фармацевтического назначения в экспериментальном и промышленном масштабе. Содержание белка в молоке кроликов значительно выше, чем в коровьем (14% против 5%) [54]. Кролики могут найти применение для производства с молоком фармакологических белков, не требуемых в больших количествах: рекомбинантный ингибитор C1 эстеразы человека (Pharming BV) для лече-

ния пациентов с наследственным ангионевротическим отеком из молока ТГ кроликов разрешен к применению [10].

## Заключение

С развитием новых технологий редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9 и его модификаций, стало возможным с высокой эффективностью получать все большее количество животных с точно заданными генетическими модификациями для решения самых разнообразных задач научного и прикладного характера. Кролики как биомодели заболеваний человека, биореакторы-продуценты фармакологически активных рекомбинантных белков становятся все более востребованным видом лабораторных животных. Эффективность получения ГМ кроликов методом микроинъекции зигот сравнима с эффективностью получения трансгенных мышей. Несмотря на очевидные успехи зарубежных, особенно китайских, генетиков в создании генно-редактированных кроликов, такие работы в России практически отсутствуют. Тем не менее опыт получения трансгенных кроликов в нашей стране есть [1].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Езерский В.А., Шишиморова М.С., Тевкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Безбородова О.А. и др. Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов. *Проблемы биологии продуктивных животных*. Боровск. 2013;4:33–52. [Ezerskii V.A., Shishimorova M.S., Tevkin S.I., Trubitsina T.P., Koloskova E.M., Bezborodova O.A., et al. Integratsiya i tkanespetsificheskaya ekspressiya gena laktoferrina cheloveka v molochnoi zheleze transgennykh krolikov [Integration and tissue-specific expression of human lactoferrin gene in mammary gland of transgenic rabbits]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals]. 2013;4:33–52. (In Russian)].
- Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В. и др. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;(1):74–85. [Karkischenko V.N., Bolotskikh L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., et al. Sozdanie linij transgennykh zhivotnykh-modelej s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creating lines of transgenic animal models with human genes NAT1 and NAT2]. *Biomedicine*. 2016;(1):74–85. (In Russian)].
- Каркищенко В.Н., Ряхых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В. и др. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;(1):52–66. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Bolotskikh L.A., Semenov Kh.Kh., Kapanadze G.D., Petrova N.V., et al. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of creating transgenic mice with

- integrated human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomedicine*. 2016;(1):52–66. (In Russian)].
4. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Koloskova E.M., Karkischenko V.N. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological studies (successes, failures and prospects)]. *Biomedicine*. 2014;(3):4–22. (In Russian)].
5. Макаренко И.Е., Калатанова А.В., Ванатиев Г.В., Мужикян А.А., Шекунова Е.В., Буренков П.В. и др. Выбор оптимального вида животных для моделирования экспериментального артериального тромбоза. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;2:116–125. [Makarenko I.E., Kalatanova A.V., Vanatiev G.V., Muzhikyan A.A., Shekunova E.V., Burenkov P.V., et al. Vybór optimal'nogo vida zhivotnykh dlya modelirovaniya eksperimental'nogo arterial'nogo tromboza [Selection of the optimal animal species for modeling experimental arterial thrombosis]. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii [International journal of veterinary medicine]*. 2016;2:116–125. (In Russian)].
6. Рыбакова А.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Использование кроликов в доклинических исследованиях. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;4:102–106. [Rybakova A.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Ispol'zovanie krolikov v doklinicheskikh issledovaniyakh [Use of rabbits in preclinical studies]. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii [International journal of veterinary medicine]*. 2016;4:102–106. (In Russian)].
7. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Герашенков Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матнязов Р.Т. и др. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов. *Биомика*. 2017;9(3):203–228. [Chemeris D.A., Kir'yanova O.Yu., Gerashchenkov G.A., Kuluev B.R., Rozhnova N.A., Matniyazov R.T., et al. Bioinformaticheskie resursy dlya CRISPR/Cas redaktirovaniya genomov [Bioinformatics resources for crispr/Cas genome editing]. *Biomica*. 2017;9(3):203–228. (In Russian)].
8. Aida T., Chiyo K., Usami T., Ishikubo H., Imahashi R., Wada Y., et al. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol*. 2015;16(87):11.
9. Arias-Mutis O.J., Marrachelli V.G., Ruiz-Sauri A., Alberola A., Morales J.M., Such-Miquel L., et al. Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit. *PLoS One*. 2017;23(12):e0178315.
10. Bosze Z., Hiripi L., Carnwath J.W., Niemann H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic. Res*. 2003;12:541–553.
11. Bosze Z., Houdebine L.M. Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci*. 2006;14:1–14.
12. Bosze Z., Major P., Baczko I., Odening K.E., Bodrogi L., Hiripi L., et al. The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Prog. Biophys. Mol. Biol*. 2016;121:123–130.
13. Campbell I.M., Shaw C.A., Stankiewicz P., Lupski J.R. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet*. 2015;31(7):382–392.
14. Chen M., Yao B., Yang Q., Deng J., Song Y., Sui T., et al. Truncated C-terminus of fibrillin-1 induces Marfanoid-progeroid-lipodystrophy (MPL) syndrome in rabbit. *Dis. Model. Mech*. 2018;11(4). PII: dmm031542. DOI: 10.1242/dmm.031542.
15. Chentoufi A.H., Dasgupta G., Christensen N.D., Hu J., Choudhury Z.S., Azeem A., et al. A novel HLA (HLA-A\_0201) transgenic rabbit model for preclinical evaluation of human CD81 T cell epitope-based vaccines against ocular herpes. *J. Immunol*. 2010;184:2561–2571.
16. Chesné P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol*. 2002;20:366–369.
17. Darby C.A., Fitch J.R., Brennan P.J., et al. Samovar: Single-Sample Mosaic Single-Nucleotide Variant Calling with Linked Reads. *iScience*. 2019;18:1–10.
18. Deng J., Chen M., Liu Z., Song Y., Sui T., Lai L., et al. The disrupted balance between hair follicles and sebaceous glands in Hoxc13-ablated rabbits. *FASEB J*. 2019;33(1):1226–1234. DOI: 10.1096/fj.201800928RR.
19. Esteves P.J., Abrantes J., Baldauf H.M., BenMohamed L., Chen Y., Christensen N., et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases. *Exp. Mol. Med*. 2018;50(5):66. DOI: 10.1038/s12276-018-0094-1.
20. Fan J., Chen Y., Yan H., Niimi M., Wang Y., Liang J. Principles and Applications of Rabbit Models for Atherosclerosis Research. *J. Atheroscler. Thromb*. 2018;25(3):213–220. DOI: 10.5551/jat.RV17018.
21. Fan J., Kitajima S., Watanabe T., Xu J., Zhang J., Liu E., et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol. Ther*. 2015;146:104–119. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.009.
22. Favaro P., Finn J.D., Siner J.I., Wright J.F., High K.A., Arruda V.R. Safety of liver gene transfer following peripheral intravascular delivery of adeno-associated virus (AAV)-5 and AAV-6 in a large animal model. *Hum. Gene Ther*. 2011;22(7):843–852.
23. Fischer B., Chavatte-Palmer P., Viebahn C., Santos A.N., Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*. 2012;144:1–10. DOI: 10.1530/REP-12-0091.

24. Flisikowska T., Thorey I.S., Offner S., Ros F., Lifke V., Zeitler B., et al. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One*. 2011;6:e21045.
25. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., et al. Programmable base editing of A\*T to G\*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464–471. DOI: 10.1038/nature24644.
26. Gehrke J.M., Cervantes O., Clement M.K., Wu Y., Zeng J., Bauer D.E., et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat. Biotechnol.* 2018;36(10):977–982. DOI: 10.1038/nbt.4199.
27. Gopinath C., Nathar T.J., Ghosh A., Hickstein D.D., Nelson E.J.R. Contemporary Animal Models For Human Gene Therapy Applications. *Curr. Gene. Ther.* 2015;15(6):531–540.
28. Guo R., Wan Y., Xu D., Cui L., Deng M., Zhang G., et al. Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2016;15;6:29855. DOI: 10.1038/srep29855.
29. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985;315:680–683.
30. Honda A., Hirose M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Shimozawa N., et al. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod. Biomed. Online*. 2008;17:706–715.
31. Honda A., Hirose M., Sankai T., Yasmin L., Yuzawa K., Honsho K., et al. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp. Anim.* 2015;64:31–37.
32. Honda A., Ogura A. Rabbit models for biomedical research revisited via genome editing approaches. *J. Reprod. Dev*2020. 2017;63(5):435–438. DOI: 10.1262/jrd.2017-053.
33. Houdebine L.M., Fan J. *Rabbit biotechnology: rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*. Heidelberg/Berlin/New York: Springer Science & Business Media, 2009.
34. <https://monographies.ru/en/book/section?id=10062>
35. Ji D., Zhao G., Songstad A., Cui X., Weinstein E.J. Efficient creation of an APOE knockout rabbit. *Transgenic Res*. 2015;24:227–235.
36. Jiang W., Liu L., Chang Q., Xing F., Ma Z., Fang Z., et al. Production of Wilson Disease Model Rabbits with Homology-Directed Precision Point Mutations in the ATP7B Gene Using the CRISPR/Cas9 System. *Sci. Rep.* 2018;8(1):1332. DOI: 10.1038/s41598-018-19774-4.
37. Kamaruzaman N.A., Kardia E., Kamaldin N., Latahir A.Z., Yahaya B.H. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. *Biomed. Res. Int.* 2013;691830. DOI: 10.1155/2013/691830.
38. Kawano Y., Honda A. Gene Targeting in Rabbits: Single-Step Generation of Knock-out Rabbits by Microinjection of CRISPR/Cas9 Plasmids. *Methods Mol. Biol.* 2017;1630:109–120. DOI: 10.1007/978-1-4939-7128-2\_10.
39. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016;533:420–424.
40. Kondo M., Sakai T., Komeima K., Kurimoto Y., Ueno S., Nishizawa Y., et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009;50:1371–1377.
41. Lee J.G., Sung Y.H., Baek I.J. Generation of genetically-engineered animals using engineered endonucleases. *Arch. Pharm. Res.* 2018;41(9):885–897. DOI: 10.1007/s12272-018-1037-z.
42. Lenz W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology*. 1988;38:203–215. DOI: 10.1002/tera.1420380303.
43. Li L., Zhang Q., Yang H., Zou Q., Lai C., Jiang F., et al. Fumarylacetoacetate Hydrolase Knock-out Rabbit Model for Hereditary Tyrosinemia Type 1. *J. Biol. Chem.* 2017;292(11):4755–4763. DOI: 10.1074/jbc.M116.764787.
44. Li Q., Qin Z., Wang Q., Xu T., Yang Y., He Z. Applications of Genome Editing Technology in Animal Disease Modeling and Gene Therapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019;17:689–698. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.05.006.
45. Liu H., Sui T., Liu D., Liu T., Chen M., Deng J., et al. Multiple homologous genes knockout (KO) by CRISPR/Cas9 system in rabbit. *Gene*. 2018;647:261–267. DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.044.
46. Liu T., Wang J., Xie X., Wang K., Sui T., Liu D., et al. DMP1 Ablation in the Rabbit Results in Mineralization Defects and Abnormalities in Haversian Canal/Osteon Microarchitecture. *J. Bone Miner. Res.* 2019. DOI: 10.1002/jbmr.3683.
47. Liu Z., Chen M., Chen S., Deng J., Song Y., Lai L., et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2717. DOI: 10.1038/s41467-018-05232-2.
48. Liu Z., Chen S., Shan H., Zhang Q., Chen M., Lai L., et al. Efficient and precise base editing in rabbits using human APOBEC3A-nCas9 fusions. *Cell Discov.* 2019;5:31. DOI: 10.1038/s41421-019-0099-5.
49. Lombardi R., Rodriguez G., Chen S.N., Ripplinger C.M., Li W., Chen J., et al. Resolution of established cardiac hypertrophy and fibrosis and prevention of systolic dysfunction in a transgenic rabbit model of human cardiomyopathy through thiol-sensitive mechanisms. *Circulation*. 2009;119:1398–1407.
50. Lozano W.M., Arias-Mutis O.J., Calvo C.J., Chorro F.J., Zarzoso M. Diet-Induced Rabbit Models for the Study of Metabolic Syndrome. *Animals (Basel)*. 2019;9(7). PII: E463. DOI: 10.3390/ani9070463.
51. Lu R., Yuan T., Wang Y., Zhang T., Yuan Y., Wu D., et al. Spontaneous severe hypercholesterolemia and atherosclerosis lesions in rabbits with deficiency of low-density



- lipoprotein receptor (LDLR) on exon 7. *EBioMedicine*. 2018;36:29–38. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.09.020.
52. Lu Y., Liang M., Zhang Q., Liu Z., Song Y., Lai L., et al. Mutations of GADD45G in rabbits cause cleft lip by the disorder of proliferation, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019;1865(9):2356–2367. DOI: 10.1016/j.bbdis.2019.05.015.
53. Lv Q., Yuan L., Deng J., Chen M., Wang Y., Zeng J., et al. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 2016;6:25029.
54. Maertens L., Lebas F., Szendrő Zs. Rabbit milk: a review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. *World Rabbit Sci.* 2006;14:205–230.
55. Mage R.G., Esteves P., Rader C. Rabbit models of human diseases for diagnostics and therapeutics development. *Dev. Comp. Immunol.* 2019;92:99–104. DOI: 10.1016/j.dci.2018.10.003.
56. Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A., Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.* 2013;3:3355.
57. Meier R.P.H., Muller Y.D., Balaphas A., Morel P., Pascual M., Seebach J.D., et al. Xenotransplantation: back to the future? *Transpl. Int.* 2018;31(5):465–477. DOI: 10.1111/tri.13104.
58. Mizuno S., Dinh T.T., Kato K., Mizuno-Iijima S., Tanimoto Y., Daitoku Y., et al. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm. Genome*. 2014;25:327–334.
59. Mohan R.R., Tovey J.C.K., Sharma A., Schultz G.S., Cowden J.W., Tandon A. Targeted Decorin gene therapy delivered with adenoassociated virus effectively retards corneal neovascularization *in vivo*. *PLoS One*. 2011;6(10):e26432.
60. Niimi M., Yang D., Kitajima S., Ning B., Wang C., Li S., et al. ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2016;245:187–193.
61. Oshiro H. The role of the lymphatic system in rabbit models for cancer metastasis research: a perspective from comparative anatomy. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 2014;91(2):25–28.
62. Parvinian A., Casadaban L.C., Gaba R.C. Development, growth, propagation, and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and “how to” guide. *Diagn. Interv. Radiol.* 2014;20(4):335–340. DOI: 10.5152/dir.2014.13415.
63. Pellerin O., Amara I., Sapoval M., Méachi T., Déan C., Beaune P., et al. Hepatic Intra-arterial Delivery of a “Trojan-horses” Gene Therapy: A Pilot Study on Rabbit VX2 Hepatic Tumor Model. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 2018;41(1):153–162. DOI: 10.1007/s00270-017-1833-8.
64. Peng X. Transgenic rabbit models for studying human cardiovascular diseases. *Comp. Med.* 2012;62(6):472–479.
65. Peng X., Knouse J.A., Hernon K.M. Rabbit Models for Studying Human Infectious Diseases. *Comp. Med.* 2015;65(6):499–507.
66. Permuy M., López-Peña M., Muñoz F., González-Cantalapiedra A. Rabbit as model for osteoporosis research. *J. Bone Miner. Metab.* 2019;37(4):573–583. DOI: 10.1007/s00774-019-01007-x.
67. Prieto V., Ludwig J.M., Farris A.B., Nagaraju G.P., Lawal T.O., El-Rayes B., et al. Establishment of human metastatic colorectal cancer model in rabbit liver: A pilot study. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177212. DOI: 10.1371/journal.pone.0177212.
68. Song J., Wang G., Hoenerhoff M.J., Ruan J., Yang D., Zhang J., et al. Bacterial and Pneumocystis Infections in the Lungs of Gene-Knockout Rabbits with Severe Combined Immunodeficiency. *Front. Immunol.* 2018;9:429. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00429.
69. Song J., Yang D., Ruan J., Zhang J., Chen Y.E., Xu J. Production of immunodeficient rabbits by multiplex embryo transfer and multiplex gene targeting. *Sci Rep.* 2017;7(1):12202. DOI: 10.1038/s41598-017-12201-0.
70. Song J., Yang D., Xu J., Zhu T., Chen Y.E., Zhang J. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat. Commun.* 2016;7:10548.
71. Song J., Zhong J., Guo X., Chen Y., Zou Q., Huang J., et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res.* 2013;23:1059–1062.
72. Song Y., Liu T., Wang Y., Deng J., Chen M., Yuan L., et al. Mutation of the Sp1 binding site in the 5' flanking region of SRY causes sex reversal in rabbits. *Oncotarget*. 2017;8(24):38176–38183. DOI: 10.18632/oncotarget.16979.
73. Song Y., Xu Y., Deng J., Chen M., Lu Y., Wang Y., et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of tyrosinase (Tyr) 3' UTR induce graying in rabbit. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1569. DOI: 10.1038/s41598-017-01727-y.
74. Song Y., Xu Y., Liang M., Zhang Y., Chen M., Deng J., et al. CRISPR/Cas9-mediated mosaic mutation of SRY gene induces hermaphroditism in rabbits. *Biosci. Rep.* 2018;38(2). PII: BSR20171490. DOI: 10.1042/BSR20171490.
75. Song Y., Yuan L., Wang Y., Chen M., Deng J., Lv Q., et al. Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73:2959–2968. DOI: 10.1007/s00018-016-2143-z.
76. Song Y., Zhang Y., Chen M., Deng J., Sui T., Lai L., et al. Functional validation of the albinism-associated tyrosinase T373K SNP by CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair (HDR) in rabbits. *EBioMedicine*. 2018;36:517–525. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.09.041.
77. Sui T., Lau Y.S., Liu D., Liu T., Xu L., Gao Y., et al. A novel rabbit model of Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9. *Dis. Model. Mech.* 2018;11(6). PII: dmm032201. DOI: 10.1242/dmm.032201.



78. Sui T., Liu D., Liu T., Deng J., Chen M., Xu Y., et al. LMNA-mutated Rabbits: A Model of Premature Aging Syndrome with Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy. *Aging Dis.* 2019;10(1):102–115. DOI: 10.14336/AD.2018.0209.
79. Sui T., Xu L., Lau Y.S., Liu D., Liu T., Gao Y., et al. Development of muscular dystrophy in a CRISPR-engineered mutant rabbit model with frame-disrupting ANO5 mutations. *Cell. Death. Dis.* 2018;9(6):609. DOI: 10.1038/s41419-018-0674-y.
80. Sui T., Yuan L., Liu H., Chen M., Deng J., Wang Y., et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of PHEX in rabbit recapitulates human X-linked hypophosphatemia (XLH). *Hum. Mol. Genet.* 2016;25:2661–2671.
81. Taniyama Y., Morishita R., Aoki M., Nakagami H., Yamamoto K., Yamazaki K., et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hind limb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther.* 2001;8:181–189.
82. Thomas P.B., Samant D.M., Selvam S., Wei R.H., Wang Y., Stevenson D., et al. Adenoassociated virus-mediated il-10 gene transfer suppresses lacrimal gland immunopathology in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. *IOVS.* 2010;51:5137–5144.
83. Tsurumi Y., Takeshita S., Chen D., Kearney M., Rossow S.T., Passeri J., et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation.* 1996;94(12):3281–3290.
84. Volobueva A.S., Orekhov A.N., Deykin A.V. An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases — focus on atherosclerosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2019;52(5):e8108. DOI: 10.1590/1414-431X20198108.
85. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013;153(4):910–918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
86. Wang Y., Fan N., Song J., Zhong J., Guo X., Tian W., et al. Generation of knockout rabbits using transcription activator-like effector nucleases. *Cell. Regen. (Lond.)*. 2014;3:3. DOI: 10.1186/2045-9769-3-3.
87. Waugh J.M., Kattash M., Li J., Yuksel E., Kuo M.D., Lussier M., et al. Gene therapy to promote thromboresistance: Local overexpression of tissue plasminogen activator to prevent arterial thrombosis in an *in vivo* rabbit model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(3):1065–1070.
88. Weber J., Peng H., Rader C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. *Exp. Mol. Med.* 2017;49(3):e305. DOI: 10.1038/emmm.2017.23.
89. Xu Y., Wang Y., Song Y., Deng J., Chen M., Ouyang H., et al. Generation and Phenotype Identification of PAX4 Gene Knockout Rabbit by CRISPR/Cas9 System. *G3 (Bethesda)*. 2018;8(8):2833–2840. DOI: 10.1534/g3.118.300448.
90. Yan Q., Zhang Q., Yang H., Zou Q., Tang C., Fan N., et al. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell. Regen. (Lond.)*. 2014;3(1):12. DOI: 10.1186/2045-9769-3-12.
91. Yang D., Song J., Zhang J., Xu J., Zhu T., Wang Z., et al. Identification and characterization of rabbit ROSA26 for gene knock-in and stable reporter gene expression. *Sci. Rep.* 2016;6:25161.
92. Yang D., Xu J., Zhu T., Fan J., Lai L., Zhang J., et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *J. Mol. Cell. Biol.* 2014;6(1):97–99. DOI: 10.1093/jmcb/mjt047.
93. Yang D., Zhang J., Xu J., Zhu T., Fan Y., Fan J., et al. Production of apolipoprotein C-III knockout rabbits using zinc finger nucleases. *J. Vis. Exp.* 2013;(81):e50957. DOI: 10.3791/50957.
94. Yin M., Jiang W., Fang Z., Kong P., Xing F., Li Y., et al. Generation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene knockout rabbits by homologous recombination and gene trapping through somatic cell nuclear transfer. *Sci. Rep.* 2015;5:16023.
95. Yoshimi K., Kaneko T., Voigt B., Mashimo T. Allelespecific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat. Commun.* 2014;5:4240.
96. Yuan L., Sui T., Chen M., Deng J., Huang Y., Zeng J., et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts. *Sci. Rep.* 2016;6:22024.
97. Yuan L., Yao H., Xu Y., Chen M., Deng J., Song Y., et al. CRISPR/Cas9-Mediated Mutation of  $\alpha$ A-Crystallin Gene Induces Congenital Cataracts in Rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017;58(6):BIO34–BIO41. DOI: 10.1167/iovs.16-21287.
98. Yuan T., Zhong Y., Wang Y., Zhang T., Lu R., Zhou M., et al. Generation of hyperlipidemic rabbit models using multiple sgRNAs targeted CRISPR/Cas9 gene editing system. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):69. DOI: 10.1186/s12944-019-1013-8.
99. Zakhartchenko V., Flisikowska T., Li S., Richter T., Wieland H., Durkovic M., et al. Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. *Biol. Reprod.* 2011;84:229–237.
100. Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Iomdina E.N., Averina O.A., Permyakov S.E., Philippov P.P., et al. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2016;15(3):267–291.
101. Zhang J., Niimi M., Yang D., Liang J., Xu J., Kimura T., et al. Deficiency of Cholesteryl Ester Transfer Protein Protects Against Atherosclerosis in Rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017;37(6):1068–1075. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309114.
102. <https://medach.pro/post/2059>

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Колоскова Елена Михайловна**, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;  
e-mail: [heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

**Каркищенко Владислав Николаевич**, д.м.н., проф., ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;  
e-mail: [scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru)

**Езерский Вадим Аркадьевич**, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;  
e-mail: [ez.vadim@yandex.ru](mailto:ez.vadim@yandex.ru)

**Петрова Наталья Владимировна\***, ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;  
e-mail: [m-sklad@yandex.ru](mailto:m-sklad@yandex.ru)

**Максименко Сергей Васильевич**, к.б.н., ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;  
e-mail: [vx136@rambler.ru](mailto:vx136@rambler.ru)

**Матвеенко Елена Леонидовна**, к.э.н., доц., ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;  
e-mail: [matveyenkoel@mail.ru](mailto:matveyenkoel@mail.ru)

**Elena M. Koloskova**, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after academician L.K. Ernst;  
e-mail: [heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

**Vladislav N. Karkischenko**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru)

**Vadim A. Yezerzsky**, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after academician L.K. Ernst;  
e-mail: [ez.vadim@yandex.ru](mailto:ez.vadim@yandex.ru)

**Nataliya V. Petrova\***, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [m-sklad@yandex.ru](mailto:m-sklad@yandex.ru)

**Sergey V. Maksimenko**, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [vx136@rambler.ru](mailto:vx136@rambler.ru)

**Elena L. Matveyenko**, Cand. Sci. (Econ.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [matveyenkoel@mail.ru](mailto:matveyenkoel@mail.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author