ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 604.6

ТРАНСГЕННЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

Андреева Д. Д.^{1,2}, Синегубов А. А.¹, Бурзак Н. А.^{1,2},
Мурашова Л. А.^{1,2}, Васютина М. Л.^{1,2}, Дячук В. А.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Дячук Вячеслав Алексеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: slava_d83@mail.ru

Статья поступила в редакцию
15.09.2021 и принята к печати
25.10.2021.

РЕЗЮМЕ

В обзоре рассмотрены основные направления работы с модельными организмами (*Danio rerio*, *Mus musculus*) в области современной персонализированной медицины, представлены основные подходы к трансгенезу, позволяющие более точно моделировать конкретные патологии человека. Описаны существующие модельные системы для изучения атеросклероза, дислипидемических расстройств, нейродегенеративных заболеваний. Упомянуты трехмерные клеточные технологии, применимые в рамках персонализированного подхода к пациенту.

Ключевые слова: Данио, дислипидемия, модельные организмы, нейродегенеративные заболевания, трансгенез, трехмерные клеточные культуры.

Для цитирования: Андреева Д.Д., Синегубов А.А., Бурзак Н.А. и др. Трансгенные модельные объекты нового поколения и их использование в персонализированной медицине. *Российский журнал персонализированной медицины.* 2021;1(1):95-117.

ВВЕДЕНИЕ

Трансгенные животные используются в лабораториях в качестве биомоделей в медицинских исследованиях. Более 90 % из них — генетически модифицированные грызуны, преимущественно мыши (*Mus musculus*). Использование генетически модифицированных животных является важным инструментом для исследования заболеваний человека, они используются для понимания функции отдельных генов и геномов в контексте восприимчивости к разным заболеваниям, их причины и прогрессирования, а также для создания альтернативных подходов для лечения патологий. В данном обзоре мы обсудим как уже ставшие классическими методы трансгенеза, так и новые подходы к получению трансгенных животных, которые наиболее часто используются в фундаментальной и прикладной медицине, а также рассмотрим детально некоторые патологии, где модифицированные животные — основной инструмент и ключ к пониманию молекулярных и клеточных аномалий, приводящих к заболеваниям позвоночных животных, включая человека.

ОБЗОР КЛАССИЧЕСКИХ И НОВЫХ ПОДХОДОВ ТРАНСГЕНЕЗА

Применение трансгенных моделей получило широкое распространение в биологии и медицине. Одним из наиболее ранних инструментов генной инженерии, стал метод конвенционального нокаута гена, позволяющий получить линию животных, у которых полностью отсутствует функциональный продукт гена на всех этапах онтогенеза. Благодаря деятельности нескольких консорциумов практически достигнута цель получить нокауты всех известных генов мыши, интенсивно развивается получение трансгенных организмов данного типа для экспериментальных животных других видов [1]. Однако традиционная техника конвенционального нокаута гена имеет целый ряд ограничений. В ходе масштабных программ фенотипирования трансгенных мышей было обнаружено, что нокаут около 30 % генов в гомозиготном состоянии ведет к летальному фенотипу и еще 7 % — к репродуктивным дефектам [2]. Также подобные линии животных не позволяют исследовать роль гена в течение отдельно взятого периода онтогенеза или в пределах определенной морфологической структуры.

Методы создания трансгенных стабильных линий животных многочисленны и разнообразны, зависят от целей и задач исследователей. Они включают в себя нокаут генов для определения,

например, сигнального пути, индукцию сверхэкспрессии белков и экспрессии, которые позволяют изменять клеточные процессы, визуализировать клетки или уничтожать их путем образования токсичных продуктов, осуществляемых с помощью направленного мутагенеза, трансгенов или вирусной трансдукции [3–5].

Большинство подходов к экспрессии трансгена в определенном типе клеток требуют промотор, который управляет транскрипцией гена в данной клетке. Существует несколько способов активации промотора в определенном типе клеток. Если известны промоторные последовательности, специфичные для интересующего типа клеток, их можно использовать для создания конструкции и последующей случайной вставки в геном мыши [6]. Однако часто этот подход требует создания и скрининга многих трансгенных линий, поскольку уровень экспрессии трансгена и эффективность передачи могут варьировать в зависимости от количества копий трансгена в геноме и их интеграционных сайтов [7].

Экспрессия гена в интересующей клетке также может быть достигнута с помощью «нокаута», когда трансген вставлен в геномную кодирующую последовательность специфичного для клетки гена с использованием специфического мутагенеза. Данный подход обеспечивает наиболее точную экспрессию трансгена, поскольку все внутренние регуляторные элементы промотора сохраняются, но приводит к нежелательному гомо- или гетерозиготному нокауту специфичного для клетки гена. Этого можно избежать, если трансген вставлен вместе с IRES-участком (internal ribosome entry site), который обеспечивает внутреннюю инициацию трансляции, и экспрессия обоих генов происходит параллельно [8].

Еще одним способом осуществления прямой экспрессии трансгена являются трансгенные конструкции на основе бактериальных, дрожжевых или других искусственных хромосом (BAC, YAC или PAC). Искусственные хромосомы содержат большие фрагменты геномной ДНК, а конкретный клон будет включать в себя кодирующую последовательность специфичного гена и элементы промотора [9, 10]. Данный подход обладает двумя преимуществами: во-первых, большие геномные фрагменты могут содержать большую часть или все промоторные области, которые управляют экспрессией трансгена в интересующей клетке; и во-вторых, эндогенная кодирующая последовательность специфичного гена не изменяется, если только трансген случайно не интегрируется в кодирующую последовательность гена.

Прямой контроль экспрессии трансгена требует активации промотора в интересующей клетке в определенное время. С помощью индуцируемой экспрессии трансгена можно осуществить такой жесткий пространственный и временной контроль. Широко используемые подходы Tet-On и Tet-Off позволяют активировать экспрессию трансгена в интересующей клетке в определенное время [11, 12]. В системе Tet-Off и Tet-On используется белок-трансактиватор тетрациклина (tTA), способный связываться с ДНК в определенных последовательностях оператора TetO. Активация tTA может подавляться (Tet-On) или активироваться (Tet-Off) тетрациклином и его производными и тем самым предотвращать активацию специфических генов [13].

В качестве принципиально иного подхода к редактированию применяются сайт-специфичные рекомбиназы, позволяющие осуществлять манипуляции непосредственно на уровне генома в экспериментальном организме. Наиболее распространенной системой для генерации неконвенциональных нокаутных животных является Cre-Lox система [14]. Cre-рекомбиназа — фермент, обнаруженный у бактериофага P1 — специфически распознает последовательности, названные LoxP-сайтами. Данный фермент вырезает последовательность, расположенную между двумя LoxP-сайтами и сшивает концы исходной ДНК. Таким образом, у модельного организма ген или его фрагмент заключен между LoxP-сайтами, и процесс его рестрикции управляется экспрессией Cre.

Применение сайт-специфичных рекомбиназ также открывает новые возможности для создания моделей для генетического трейсинга — техники, позволяющей идентифицировать потомков клеток, экспрессирующих ген интереса. Типичная модельная система состоит из двух генетических конструкций. Первая представлена кодирующей последовательностью Cre-рекомбиназы, расположенной под промотором интересующего гена. Вторая конструкция состоит из гена, кодирующего репортер и расположенного перед ним флюксированного (расположенного между двумя LoxP-сайтами) стоп-кодона. Таким образом, в клетках, в которых активен промотор гена интереса, происходит рекомбинация и коэкспрессия репортерного гена. Дальнейшим путем модификации системы являлось создание фьюжн-белка — CreERT и его модификаций — рекомбиназ, активируемых агонистами эстрогенового рецептора человека [15]. Подобная система позволяет запускать рекомбинацию в определенный период времени путем введения соответствующего лиганда не затрагивая

клетки, экспрессирующие ген интереса в другие периоды онтогенеза.

Дальнейшим путем модификации данного метода является создание новых химерных белков-индукторов рекомбинации на основе Cre. Один из многообещающих вариантов — фьюжн-белок из Cre и дигидрофолатредуктазы E. Coli [16]. В данном случае в качестве индуктора может применяться малотоксичный препарат триметоприм, для которого нет эндогенного рецептора в организме мыши.

Вместе с развитием генетических конструкторов индукторов рекомбинации также развиваются и репортерные. Существование множества вариантов LoxP-сайтов и различных по спектральным характеристикам и внутриклеточной локализации флуоресцентных белков позволило создать ряд сложных репортерных линий животных, таких как Brainbow, ZebraBow, Confetti и другие, в которых рекомбинация приводит к случайной комбинации коэкспрессии нескольких репортеров, что позволяет проводить эксперименты типа клонального анализа [17], исследования коннектома и процессов развития нейронных сетей [18].

В кодирующей последовательности таргетной для рекомбиназы конструкции могут быть размещены не только флуоресцентные белки. Один из эффективных методов исследования роли отдельных типов клеток в развитии организма — генетическая абляция — основан на индукции рекомбиназой экспрессии дифтерийного токсина, вызывающего смерть клеток [19].

Ряд классических методов нейробиологии получил дополнительные возможности благодаря сконструированным белкам-сенсорам. Так, доступны линии мышей, у которых вместо репортерных белков экспрессируются кальций-чувствительные, чувствительные к трансмембранному потенциалу и пероксидам флуоресцентные белки [20]. Таким образом, возможно применение классических методов регистрации нейрональной активности в приложении к определенному типу или популяции клеток, идентифицируемым по экспрессии Cre.

Хорошо охарактеризованным маркером нейрональной активности является экспрессия генов класса IEG (immediate early genes), таких как c-fos, c-jun и Arc. Экспрессирующиеся под промоторами данных генов рекомбиназы позволяют идентифицировать нейрональные ансамбли, участвующие в реализации поведенческих актов у мышей [20].

Cre-Lox-система также является базисной для множества модельных конструкций в оптогенетических исследованиях в нейробиологии. В данном случае рекомбиназа индуцирует экспрессию фотореактивных белков. Первоначально наиболее

распространенными были фотоактивируемые ионные каналы, обнаруженные у ряда бактерий. Все большее распространение получают фьюжн-белки из фотореактивной и ферментативно-активной частей, позволяя индуцировать внутриклеточные биохимические реакции направленным действием света. В сочетании с вышеупомянутыми конструкциями, включающими в себя Cre под промотором IEG, становится возможным реактивировать нейронные сети, участвовавшие ранее в ходе интересующего поведенческого акта [21].

Альтернативным методом является применение Flp-FRT-системы, получившей, однако, меньшее развитие. Среди проблем выделяется термолабильность фермента Flp и относительно низкая эффективность рекомбинации, что не позволяет его использовать у гомеотермных организмов [22]. В ходе дальнейших модификаций рекомбиназы данные проблемы были частично разрешены, однако эффективность ее все еще уступает Cre-Lox.

Сходный с Cre-Lox принцип используется в трейсинге с применением Dre-rox, которая пока не получила широкого распространения. Сочетание из нескольких систем рекомбинации в одном модельном организме позволяет создавать сложные управляемые модели, визуализировать несколько типов или популяции клеток одновременно, при условии одновременной коэкспрессии нескольких генов [23].

ДАНИО — УНИКАЛЬНЫЕ БИОМОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОЛОГИЙ

Модели на *Brachydanio rerio* экономически более выгодны, чем модели грызунов, ввиду меньшей стоимости содержания модельного организма. К преимуществам относится простота содержания и возможность получения большого числа эмбрионов за короткий промежуток времени. Жилищно-селекционные системы гораздо проще. Теоретически одна пара рыбок данио может производить тысячи генетически идентичных эмбрионов. Специфика воспроизводства позволяет исследовать редкие генетические события и проводить параллельное тестирование на большой гомогенной выборке [24].

Внешнее оплодотворение делает манипуляции с эмбрионами гораздо более доступными, чем у млекопитающих. Кроме того, прозрачность эмбрионов *Danio Rerio* позволяет исследовать органогенез прижизненно, в частности при использовании специфических линий и витальных красителей, включая флуоресцентную маркировку.

Кроме того, эмбрионы рыбок данио чрезвычайно быстро развиваются: к 24 часам после ферти-

лизации большинство этапов органогенеза завершается, что позволяет визуализировать в реальном времени все стадии развития организма [25, 26].

Важно отметить, что в дополнение к этому быстрому анатомическому развитию нейронные, гормональные и паракринные связи также устанавливаются и обеспечивают гомеостаз уже на ранних стадиях развития [27–29].

Небольшой размер эмбрионов рыбок данио и взрослых особей также может быть преимуществом в лабораторных условиях за счет снижения расхода ценных реагентов при проведении скрининговых исследований. Малый размер также облегчает whole-tissue [30], whole-organ и whole-organism транскриптомный [31, 32], протеомный [33] и другие «миксные» анализы [34], а также whole-organ клональный анализ [35] и cell-cell картирование [36].

Несмотря на то что общие предки рыб и человека разошлись около 450 млн лет назад, известно, что порядка 82 % генов, ответственных за генетические заболевания, представлены ортологичными генами у рыб данио [37]. Удобство редактирования генома и обилие генов-ортологов у этих животных позволили создать точные биомодели на данио.

Редактирование генома рыб с помощью программируемых нуклеаз позволяет вносить двуцепочечные разрывы в интересующем участке ДНК, что приводит к целевой мутации, приводящей к инактивации гена интереса или изменению его работы.

Исследования на рыбах играют центральную роль в развитии и применении технологий редактирования генома: первоначально редактирование генома рыбок проводили с помощью технологии ZFN (zinc finger nucleases)— специально сконструированных специфичных протеаз, которые можно нацелить на желаемый участок ДНК и с высокой точностью вносить изменения в геном.

Следующий шаг в развитии редактирования генома и получении модельных рыбок — появление технологии TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases): преимущество этого типа эндонуклеаз в том, что они могут быть сконструированы для связывания с любой интересующей последовательностью ДНК и в том, что они могут вызывать широкий спектр мутаций у рыбок при эффективности свыше 98,5 % [38]. Технология CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas9 — самый современный подход в редактировании генома, она позволяет быстро и точно редактировать геном и является самой распространенной техникой для данио [39]. Перечисленные технологии направлены на инак-

тивацию генов путем внесения инсерции или внесения небольших вставок, что позволяет всего за 2 поколения вывести линии рыбок с гомозиготными мутациями модельных патологий [40]. Таким образом, на рыбах впервые были смоделированы заболевания крови [41], получены биомодели сердечно-сосудистых [42] и нейродегенеративных заболеваний [43].

Отличительная черта использования рыбок в персонализированной медицине — получение гуманизированных моделей болезней. Как правило гуманизированная модель основана на повышении функциональности целевых генов. Самый простой метод — временное повышение экспрессии гена, это позволяет проследить взаимосвязь между эффектом сверхэкспрессии у биомодели и физиологическим эффектом мутации человека [40].

Например, сверхэкспрессия мРНК гена NRAS у эмбрионов данио моделирует процесс, при котором сверхэкспрессия ортологичного гена у человека приводит к развитию синдрома Нунана [44]. Похожие исследования показывают, что гиперэкспрессия гена PTDSS1, связанная с развитием синдрома Маевского, связана с аномалиями в развитии скелета у мальков данио [45].

Гуманизированные рыбы активно используются при исследованиях процессов нейродегенерации, например в качестве моделирования токсического воздействия синуклеинов, в частности человеческого α -синуклеина, участвующего в развитии болезни Паркинсона [46]. Накопление α -синуклеинов в нейронах связывали с нейродегенеративными процессами, механизмы которых были неясны.

С помощью системы GAL4/UAS, которая позволяет искусственно активировать гены интереса, было показано, что гиперэкспрессия человеческого α -синуклеина в нейронах приводит к токсическому эффекту и дегенерации нервных клеток. Похожий подход, который заключался в том, чтобы искусственно создать в гене C9orf72 последовательности, отвечающие за синтез глицин-аланиновых повторов, также позволил создать модель бокового амиотрофического склероза на рыбах данио [47].

На рыбах могут быть исследованы доминантные наследственные болезни и влияние различных мутаций на пенетрантность патологического признака. Например, спинальная мозжечковая атаксия 3-го типа вызвана отмиранием нейронов мозжечка и вызвана мутацией гена потенциал-зависимого калиевого канала Kv3.3. Детская и взрослая формы этого заболевания связаны с мутациями и гиперэкспрессией различных аллелей гена, что приводит к формированию различных фенотипов у модельных рыбок. Младенческая, тяжелая форма заболе-

вания ведет к нарушению миграции мотонейронов, в то время как взрослая форма приводит к нарушению ветвления аксонов мотонейронов [48].

ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА И ДИСЛИПИДЕМИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Идеальная модель дислипидемических расстройств и атеросклероза на животных для биомедицинских и фармацевтических исследований должна обладать соответствующим потенциалом для экстраполяции данных на человека. В основном, такие модели базируются на индукции и ускорении формирования атеросклеротической бляшки за счет применения специализированных диет, генетических манипуляций и средовых воздействий.

В первой половине XX века применялись диет-индуцированные модели атеросклероза, преимущественно на кроликах. Было показано, что высоко холестеринная диета (HCD), а также диета с высоким содержанием животного белка приводят к атеросклерозу и гиперхолестеринемии.

С 1950-х по 1970-е годы на крысах и кроликах были разработаны и протестированы различные диеты, способные индуцировать гиперлипидемию. Исследования индуцируемого диетой атеросклероза внесли принципиальный вклад в понимание патогенеза этого состояния.

В 1970-х и 1980-х годах для исследования атеросклероза начали активно применять лабораторных мышей. Исследования в области метаболизма липопротеинов в плазме в 1980-х годах, в сочетании с появлением технологий трансгенеза в 1990-х годах, привели к появлению таких нокаутных линий мышей, как ApoE^{-/-}, Ldlr^{-/-}, PCSK9^{-/-}. Кроме того, в 2002 году был секвенирован геном мышей линии C57BL/6, являющейся сравнительно чувствительной к моделированию метаболических нарушений посредством диеты.

Показано, что модели атеросклероза на мышах в основном не демонстрируют нестабильность атеросклеротической бляшки с последующим тромбозом, которые чаще всего являются факторами, связанным с клинически значимыми острыми сердечно-сосудистыми эпизодами [49]. Этиопатогенез образования нестабильной атеросклеротической бляшки включает в себя наличие факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, которые индуцируют эндотелиальную дисфункцию и повышают проницаемость сосудов, приводя к инфльтрации липидов и усиливая адгезию и трансмиграцию моноцитов. В интимае сосудов моноциты

дифференцируются в макрофаги и поглощают измененные липиды, превращаясь в пенистые клетки. Одновременно на этом этапе гладкомышечные клетки сосудов мигрируют в интиму, где синтезируют внеклеточный матрикс и способствуют образованию фиброзной капсулы. По мере прогрессирования бляшки количество гладкомышечных клеток уменьшается, пенистые клетки подвергаются апоптозу, высвобождая активные металлопротеиназы, которые разрушают капсулу, повышая вероятность разрыва бляшки. Иммунная система принимает активное участие в этом процессе и играет ключевую роль в дестабилизации бляшек [50].

Кроме этого, в отличие от людей, у мышей редко развивается атеросклероз в коронарных артериях, но легко развивается атеросклероз в корне аорты. Таким образом, распределение поражения тканей у мышей и человека не идентично.

На данный момент большой интерес в качестве биологической тест-системы для изучения атеросклероза и дислипидемических расстройств представляют рыбки *Danio Rerio*, что находит отражение в статистическом анализе публикаций, освещающих соответствующие модели [24, 51]. *Danio Rerio* анатомически схожи с более высокоорганизованными позвоночными. Патологические процессы в тканях могут быть изучены и экстраполированы для широкого спектра сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний у человека [52].

Генетические модификации рыбок *Danio* также берут начало в 1980-х годах. В 2000-х годах количество опубликованных исследований с использованием рыбок *Danio* стало увеличиваться, была получена первая генетически модифицированная модель гиперлипидемии *Apo2^{-/-}*, а вскоре и модель гиперхолестеринемии *LDLR^{-/-}*.

Направленная делеция гена *Apo2* является одним из векторов дальнейшей разработки моделей дислипидемий на рыбках *Danio*. Люди, лишенные *Apo2*, имеют семейную хиломикронемию, характеризующуюся повышенным уровнем триглицеридов и рецидивирующими эпизодами панкреатита. Мутантные *Danio Rerio* демонстрируют отличительные признаки дефицита *Apo2* человека: снижение активности липазы в плазме и тяжелую гипертриглицеридемию. Визуализация сосудистой сети у *Apo2^{-/-}* мутантных рыб выявляет накопление липидов и нагруженных липидами макрофагов, что является признаком формирования атеросклеротических бляшек. Эта модель дислипидемии может оказаться особенно полезной при изучении стадий экстравазации, окисления и поглощения ЛПНП макрофагами стенок сосудов [53].

Зебрафиш, мутантные по *LDLR*, являются биологической моделью для изучения гиперхолестеринемии и накопления липидов в кровеносных сосудах, что эквивалентно раннему этапу развития атеросклероза человека. Для этой модели характерно развитие умеренной гиперхолестеринемии при нормальном питании. Однако кратковременное 5-дневное кормление личинок дефицитных по *LDLR* рыбок диетой с высоким содержанием холестерина (HCD) приводит к обострению гиперхолестеринемии и накоплению и отложению липидов в сосудах [54].

Несмотря на принципиальные различия в физиологии обмена веществ у пойкилотермных и гомойотермных видов, именно *Danio Rerio* позволяют воспроизвести некоторые из тех патологических процессов, которые не могут быть изучены с применением моделирования на грызунах, в связи с чем и приобретают популярность как ценная модель для изучения липидного обмена и связанных с ним нарушений [55].

Известно, что ортологи ключевых факторов, регулирующих метаболизм липидов, такие как микросомальный белок переноса триглицеридов (МТТР), ацил-КоА-синтетаза (ACS) и аполипопротеин C2 (APOC2) экспрессируются у рыбок данио также, как у млекопитающих [56, 57]. В то же время, в отличие от грызунов, рыбки данио обладают белком переноса сложного эфира холестерина (СЕТР), так как ортолог СЕТР сохранен в их геноме. Таким образом, как и у людей, сложные эфиры холестерина у рыбок данио отклоняются от «хороших» ЛПВП к «плохим» ЛПНП, тем самым повышая восприимчивость к атерогенным событиям [58].

Кроме того, *Danio Rerio* являются подходящей моделью для изучения аутовоспалительных расстройств, которые, как известно, являются значимым фактором риска при развитии атеросклеротических изменений и сердечно-сосудистых осложнений, который может сыграть свою роль даже при низком уровне ЛПНП в крови [59].

Хроническое воспаление, через активацию NLRP3 inflammasome-IL-1 β сигнального пути, является важным фактором развития атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (ASCVD), будучи запущенным путем накопления внутриклеточного холестерина в клетках [60].

Пириновый домен семейства NLR, содержащийся в 3 (NLRP3) inflammasome, является одним из наиболее полно охарактеризованных у людей и других млекопитающих. Была произведена молекулярная и функциональная идентификация гомолога NLRP3 (*DrNLRP3*) на модели *Danio Rerio*.

За счет нокаута *DrNLRP3* у личинок зебрафиш и генерации нокаута *DrASC^{-/-}* удалось охарактеризовать функцию *DrNLRP3* inflammasome в антибактериальном иммунитете *in vivo*.

Таким образом, интерес в сфере изучения атеросклероза и дислипидемических расстройств в качестве модельных организмов представляют как лабораторные мыши, так и рыбки данио. Развитие сферы биомоделирования патологических процессов с использованием экспериментальных модельных систем и применением технологий редактирования генома позволяет расширять спектр доступных генетических и сочетанных моделей атеросклероза и дислипидемических расстройств.

СОВРЕМЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОГЕНЕЗА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Процесс развития нервной системы (нейрогенез) — это сложный многоступенчатый процесс формирования (специализации) нервных клеток, формирующих отделы нервной системы (центральный и периферический отделы) [61]. Безусловно, понимание молекулярных и клеточных механизмов развития нервной системы необходимо для расшифровки функционирования работы мозга и его пластичности у человека. К наиболее используемым методам изучения нейрогенеза относятся методы генетического трейсинга, позволяющие проследить за судьбами эмбриональных клеток и методы тканеспецифического нокаута (нокина), выявляющие роль одного или ансамбля генов в нейроразвитии или специализации отдельных нейронов или глии. Отслеживание иерархии клеток в развитии — это процесс, направленный на выявление потомства, которое происходит от одной клетки-предшественника (стволой клетки или предшественника, бластных клеток). Трейсинг может быть реализован разными стратегиями, основанными на генетически модифицированных организмах, с использованием генетических маркеров, трансфицированных вирусных векторов или конструкций ДНК и с помощью секвенирования клеток [62].

Трейсинг клеток-предшественников до состояния их конечной специализации и определения их судьбы во взрослом организме стал возможным благодаря разработке некоторых важных генетических инструментов, которые сделали возможным постоянное маркирование клеток. В частности, рекомбинационные системы Cre-loxP [63] и Flp-FRT

[64] являются наиболее используемыми системами в изучении клеточного трейсинга. Трансгенные линии мышей, которые восприимчивы к индукционной рекомбинации Cre под контролем специфических промоторов, могут вызывать экспрессию флуоресцентного репортера (флуоресцентного белка) для определения судьбы нейронных предшественников *in vivo* [65]. Это было достигнуто путем введения низких доз тамоксифена, и, в зависимости от интересующей линии, были созданы трансгенные мыши, кодирующие различные флуоресцентные белки под контролем специфических промоторов, проявляющие особые преимущества и недостатки [66].

Немного усложненная версия моноцветного (один трейсер) генетического трейсинга является методом многоцветного маркирования клеток (технологии Brainbow) [67]. Трансгенные мыши Brainbow подвергаются стохастической рекомбинации до четырех флуорофоров, которые управляются системой Cre-loxP, в результате чего образуются многоцветные мозаики, в которых можно легко идентифицировать отдельные клетки. Модифицированные версии этой методологии все еще разрабатываются, и они дают яркие изображения, которые позволяют чрезвычайно подробно визуализировать морфологию отдельных меченых клеток. Это очень эффективный метод для картирования клеток, но не для отслеживания происхождения. Однако эта технология оказала огромное влияние на область отслеживания происхождения, что привело к новой волне методов, в которых стохастическая комбинация флуорофоров используется для создания уникальных штрих-кодов нейрональных стволовых клеток, которые могут быть унаследованы всеми их потомками. Этот метод первоначально был разработан для мышей, хотя комбинаторное использование флуоресцентных белков было переделано для картирования судьбы у *Drosophila melanogaster* (Flybow, d-Brainbow, Raerpli) и рыбок-зебр (Zebrabow) [16].

Одним из самых современных подходов в эффективной трансформации клеток, эмбрионов или тканей стал метод трангенеза с помощью рекомбинантных лентивирусов, кодирующих различные флуоресцентные белки, которые создаются, чтобы внести свой вклад в многоцветную мозаику для отслеживания происхождения [68]. Эти рекомбинантные конструкции ДНК могут быть трансфицированы в интересующие клетки и позволяют проследить всех потомков отдельных клеток (StarTrack, iON, CLONE) [69–71]. Новые достижения в области микроскопии привели к прогрессу в отслеживании многоцветных линий [72], расши-

ря возможности отслеживания линий в любом организме и позволяя изучать гетерогенность клеток.

Генетические технологии приобрели значение не только для изучения механизмов нейрогенеза, но и для исследований причин развития нейродегенеративных заболеваний. В отличие от безуспешных поисков новых и эффективных методов лечения, понимание патогенетических механизмов, лежащих в основе основных нейродегенеративных состояний, значительно продвинулось вперед. Механизмы, управляющие патологической агрегацией ключевых белков, природа и процессы повреждения нейронов, связанные с образованием белковых агрегатов, — это современные направления изучения данных нейропатологий.

Ввиду значительного сходства в фенотипе генетических и спорадических форм нейродегенеративных заболеваний (например, болезнь Альцгеймера и Паркинсона, лобно-височная деменция или боковой амиотрофический склероз), генетически модифицированные модели животных, несущие человеческие гены, которые, как оказалось, мутировали в семейных случаях нейродегенераций, были созданы для изучения механизма возникновения и прогрессирования таких патологий.

На сегодняшний день составлена база данных, которая предоставляет информацию об отдельных моделях нейродегенеративных заболеваний у грызунов, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона и боковой амиотрофический склероз. Обобщая, визуализируя и постоянно обновляя доступные данные о характеристиках модельных систем, реализуется цель данной базы — помочь исследователям изучать, сравнивать и определять модели, которые могут ускорить их исследования (<https://www.alzforum.org/research-models>).

В настоящее время предпринимаются большие усилия по характеристике моделей болезни Альцгеймера на животных, чтобы лучше понять патофизиологию заболевания, а также определить модели, подходящие для исследования потенциальных терапевтических средств. На данном этапе описано 210 моделей животных, которые используются в данном направлении исследования и посвящены в основном изучению амилоидных бляшек (21 модель), Нейрофибриллярных клубков (10), потери тел нейронов (15), глиозиса (27), потери синапсов (16 моделей), долговременной потенциации и длительной депрессии (16 моделей) и когнитивным нарушениям (5xFAD (B6SJL), 3xTg, A7 APP transgenic, Abca7*A1527G/APOE4/Trem2*R47H, APOE2 Knock-In, floxed (CureAlz), APOE3 Knock-In, floxed (CureAlz), APOE4 Knock-In (JAX), APP751SL/PS1 KI). Прогресс в исследованиях и разработке методов

лечения болезни Паркинсона зависит от надежных доклинических моделей, включая модели грызунов. На сегодняшний день описано 20 моделей грызунов, изучающих проблемы потери нейронов, дофаминовый голод, включения α -синуклеина, нейровоспаления, неисправности митохондрий, моторные и не моторные нарушения (α -synuclein KO Mouse, Pink1 KO Rat, Thy1- α Syn “Line 61” Mouse, Parkin KO, DJ-1 KO Rat). В случае бокового амиотрофического склероза насчитывается порядка сорока моделей на грызунах, воспроизводящих различные аспекты болезни, такие как двигательные нарушения или дегенерация двигательных нейронов. Однако ни одна модель не воссоздает все аспекты заболевания человека в совершенстве.

Действительно, базовые клинические исследования убедительно доказывают и подтверждают своими данными, что экспериментальные модели животных чрезвычайно полезны для анализа патогенетических механизмов и подбора инструментов для нейрофармакологии, цель которой повлиять на начальные механизмы развития заболевания.

ОРГАНОИДНЫЕ МОДЕЛИ

Последние годы, в связи с развитием молекулярных методов в исследованиях, моделирование заболеваний человека на лабораторных животных нередко создает дополнительные вопросы по поводу патогенетических механизмов. Даже белки, кодируемые ортологами, не обязательно будут нести совершенно идентичные функции в организмах различных биологических видов. Применение гуманизированных животных также не всегда может дать ответ на все вопросы, модификация далеко не всегда будет затрагивать весь организм.

Для решения задач, связанных с изучением токсичности веществ и реактивности отдельных клеток, двухмерные клеточные культуры применяются уже достаточно давно. Классические двухмерные культуры клеток тем не менее имеют ряд ограничений, которые не позволяют этой технике применяться в качестве универсальной модели для персонализированной медицины. В монослое культуры может заметно меняться транскриптомный профиль клеток, что влечет за собой возможные изменения их свойств и чувствительности к воздействиям. Кроме того, отсутствие молекулярных сигналов от клеток других популяций также влияет на свойства клеток в культуре. Частично эта проблема решена путем кокультивирования разных видов клеток в одной культуре (макрофаги и фибробласты, эндотелии и клетки опухоли, мезенхимальные стволовые клетки и меланоциты и т. д.) [73–75].

Органоидные модели — трехмерные клеточные системы культивирования, которые в большей степени, чем двухмерные, позволяют моделировать как нормальные физиологические процессы, так и патологические состояния. Их возможно создавать из эмбриональных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, а также клеток взрослых организмов, в том числе опухолевых. Они представляют собой относительно недорогие системы, способные к самообновлению и позволяют моделировать самые разные процессы путем воздействия на них различными биологически активными молекулами, физическими факторами, микроорганизмами. При этом сам органоид будет «отвечать» на воздействие сигнальными клеточными каскадами, характерными для того органа/ткани, который он моделирует. Так, органоиды головного мозга генерируют альфа-ритмы, характерные для мозга новорожденных [76].

Органоиды, полученные из новообразований пациентов, демонстрируют те же молекулярные характеристики, что и «материнская» опухоль, что позволяет *in vitro* наблюдать генетические изменения в их клетках, определять чувствительность к разным типам химиотерапевтических препаратов и предполагать с большой долей вероятности возможность метастазирования конкретного новообразования [77, 78].

В органоидных системах относительно просто можно осуществлять редактирование генома, что может быть полезным как при изучении патогенеза отдельных заболеваний, так и для тестирования определенных терапевтических подходов [79, 80].

Интересным направлением является также трансплантация органоидов. Возможна трансплантация как опухолевых, так и нормальных тканей [81]. Также проводятся эксперименты по трансплантации человеческих органоидов лабораторным животным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование трансгенных животных и культур тканей позволяет значительно более детально подходить к лечению пациентов, выбирать наиболее подходящие стратегии. Также есть возможность изучения *in vivo* молекулярных и клеточных основ заболевания и терапевтических подходов с оценкой потенциальных факторов риска. Использование трехмерных культур клеток пациента дает возможность наиболее точно определить молекулярные особенности протекания заболевания у конкретного человека и подобрать индивидуальную программу лечения наиболее точно.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol.* 2009;Chapter 19:Unit-19.12.17. DOI: 10.1002/0471143030.cb1912s441.
- Ayadi A, Birling M-C, Bottomley J, et al. Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. *Mamm Genome.* 2012;23(9-10):600–610. DOI: 10.1007/s00335-012-9418-y.
- Misra RP, Duncan SA. Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination. *Endocrine.* 2002;3(19):229–238.
- Picciotto MR, Wickman K. Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiological Reviews.* 1998;4(78):1131–1163.
- Pease S, Saunders TL. *Advanced Protocols for Animal Transgenesis: An ISTT Manual.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.
- Brenner M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathology.* 1994;3(4):245–257.
- Martin DI, Whitelaw E. The vagaries of variegating transgenes. *BioEssays.* 1996;18(11):919–923. DOI: 10.1002/bies.950181111.
- Gilbert WV. Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry. *J Biol Chem.* 2010;285(38):29033–29038.
- Heintz N. BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nature Reviews. Neuroscience.* 2001;2(12):861–870.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(12):5547–5551.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10933–10938.
- Schönig K, Bujard H, Gossen M. The power of reversibility regulating gene activities via tetracycline-controlled transcription. *Methods in Enzymology.* 2010;477:429–453.
- Kim H, Kim M, Im SK, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147-159. DOI: 10.5625/lar.2018.34.4.147
- Hirrlinger J, Requadrt RP, Winkler U, et al. Split-CreERT2: Temporal Control of DNA

- Recombination Mediated by Split-Cre Protein Fragment Complementation. *PLoS One*. 2009;4(12): e8354. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008354.
15. Sando R 3rd, Baumgaertel K, Pieraut S, et al. Inducible control of gene expression with destabilized Cre. *Nat Methods*. 2013;10(11):1085-1088. DOI: 10.1038/nmeth.2640.
 16. Pan YA, Freundlich T, Weissman TA, et al. Zebrawow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development*. 2013;140(13):2835-2846. DOI: 10.1242/dev.094631
 17. Weissman TA, Pan YA. Brainbow: new resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics*. 2015;199(2):293-306. DOI: 10.1534/genetics.114.172510
 18. Kastriiti ME, Kameneva P, Kamenev D, et al. Schwann Cell Precursors Generate the Majority of Chromaffin Cells in Zuckerkandl Organ and Some Sympathetic Neurons in Paraganglia. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:6. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00006.
 19. Bayguinov PO, Ma Y, Gao Y, et al. Imaging Voltage in Genetically Defined Neuronal Subpopulations with a Cre Recombinase-Targeted Hybrid Voltage Sensor. *J Neurosci*. 2017;37(38):9305-9319. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1363-17.2017.
 20. DeNardo L, Luo L. Genetic strategies to access activated neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;45:121-129. DOI: 10.1016/j.conb.2017.05.014.
 21. Castello-Waldow TP, Weston G, Ulivi Af, et al. Hippocampal neurons with stable excitatory connectivity become part of neuronal representations. *PLoS Biol*. 2020;18(11):e3000928. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000928.
 22. Phan QV, Contzen J, Seemann P, et al. Site-specific chromosomal gene insertion: Fip recombinase versus Cas9 nuclease. *Sci Rep*. 2017;7(1):17771. DOI: 10.1038/s41598-017-17651-0.
 23. Karimova M, Baker O, Camgoz A, et al. A single reporter mouse line for Vika, Fip, Dre, and Cre-recombination. *Sci Rep*. 2018;8(1):14453. DOI: 10.1038/s41598-018-32802-7.
 24. Gut P, Reischauer S, Stainier DYR, et al. Little fish, big data: zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease. *Physiol Rev*. 2017;97:889-938. DOI: 10.1152/physrev.00038.2016
 25. Sehnert AJ, Huq A, Weinstein BM, et al. Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nature Genetics*. 2002;31(1):106-110.
 26. Thisse C, Zon LI. Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science*. 2002;295(5554):457-462.
 27. Jurczyk A, Roy N, Bajwa R, et al. Dynamic glucoregulation and mammalian-like responses to metabolic and developmental disruption in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;170(2):334-345.
 28. Ober EA, Field HA, Stainier DY. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development*. 2003;120(1):5-18.
 29. Schlegel A, Stainier DY. Lessons from "Lower" Organisms: What Worms, Flies, and Zebrafish Can Teach Us about Human Energy Metabolism. *PLoS Genetics*. 2007;3(11):e199.
 30. Cao J, Navis A, Cox BD, et al. Single epicardial cell transcriptome sequencing identifies Caveolin-1 as an essential factor in zebrafish heart regeneration. *Development*. 2016;143(2):232-243.
 31. unker JP, Noël ES, Guryev V, et al. Genome-wide RNA Tomography in the Zebrafish Embryo. *Cell*. 2014;159:662-675.
 32. Lee R, Thiery JP, Carney TJ. Dermal fin rays and scales derive from mesoderm, not neural crest. *Current biology*. 2013;23(9):R336-337.
 33. Nolte H, Höpfer S, Housley MP, et al. Dynamics of zebrafish fin regeneration using a pulsed SILAC approach. *Proteomics*. 2015;15(4):739-751.
 34. Fraher D, Hodge JM, Collier FM, et al. Citalopram and sertraline exposure compromises embryonic bone development. *Molecular Psychiatry*. 2016;21(5):656-664.
 35. Gupta V, Poss KD. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis. *Nature*. 2012;484(7395):479-484.
 36. Song Z, Zhang X, Jia S, et al. Zebrafish as a Model for Human Ciliopathies. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2016;43:107-20.
 37. Howe DG, Bradford YM, Conlin T, et al. ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic acids research*. 2013;41(D1):D854-860.
 38. Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, et al. Simple Methods for Generating and Detecting Locus-Specific Mutations Induced with TALENs in the Zebrafish Genome. *PLoS Genet* 2012;8(8):e1002861. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002861.
 39. Cornet C, Di Donato V, Terriente J. Combining Zebrafish and CRISPR/Cas9: Toward a More Efficient Drug Discovery Pipeline. *Front Pharmacol*. 2018;9:703. DOI: 10.3389/fphar.2018.00703.
 40. Baxendale S, van Eeden F, Wilkinson R. The Power of Zebrafish in Personalised Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1007:179-197. DOI: 10.1007/978-3-319-60733-7_10.
 41. Fish RJ, Di Sanza C, Neerman-Arbez M. Targeted mutation of zebrafish fga models human congenital afibrinogenemia. *Blood*. 2014;123:2278-2281.
 42. Wilkinson RN, Jopling C, van Eeden FJ. Zebrafish as a model of cardiac disease. *Progress in molecular biology and translational science*. 2014;124:65-91.
 43. Schmid B, Haass C. Genomic editing opens new avenues for zebrafish as a model for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*. 2013;127(4):461-470.
 44. Runtuwene V, van Eekelen M, Overvoorde J, et al. Noonan syndrome gain-of-function mutations in NRAS cause zebrafish gastrulation defects. *Disease models & mechanisms*. 2011;4(3):393-399.
 45. Seda M, Peskett E, Demetriou C, et al. Analysis of transgenic zebrafish expressing the Lenz-Majewski

syndrome gene PTDSS1 in skeletal cell lineages. *F1000Research*. 2019;8:273.

46. O'Donnell KC, Lulla A, Stahl MC, et al. Axon degeneration and PGC-1 α -mediated protection in a zebrafish model of alpha-synuclein toxicity. *Disease models & mechanisms*. 2014;7:571-582.

47. Ohki Y, Wenninger-Weinzierl A, Hruscha A, et al. Glycine-alanine dipeptide repeat protein contributes to toxicity in a zebrafish model of C9orf72 associated neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*. 2017;12:6.

48. Issa FA, Mazzochi C, Mock AF, et al. Spinocerebellar ataxia type 13 mutant potassium channel alters neuronal excitability and causes locomotor deficits in zebrafish. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(18):6831-6841.

49. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(5):1104-1115. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.237693.NIH

50. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-32. DOI: 10.1111/joim.12296.

51. Vedder VL, Aherrahrou Z, Erdmann J. Dare to Compare. Development of Atherosclerotic Lesions in Human, Mouse, and Zebrafish. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:109. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00109.

52. Chao L, Gates KP, Fang L, et al. Apoc2 loss-of-function zebrafish mutant as a genetic model of hyperlipidemia. *Dis Models Mech*. 2015;8(8):989-998. DOI: 10.1242/dmm.019836.

53. Chao Liu, Young Sook Kim, Jungsu Kim, et al. Modeling hypercholesterolemia and vascular lipid accumulation in LDL receptor mutant zebrafish. *J Lipid Res*. 2018;59(2):391-399. DOI: 10.1194/jlr.D081521.

54. Jun Ka, Suk-Won Jin. J, Zebrafish as an Emerging Model for Dyslipidemia and Associated Diseases. *J Lipid Atheroscler*. 2021;10(1):42-56. DOI: 10.12997/jla.2021.10.1.42.

55. Jun Ka, Boryeong Pak, Orjin Han, et al. Comparison of transcriptomic changes between zebrafish and mice upon high fat diet reveals evolutionary convergence in lipid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;530(4):638-643. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.042.

56. Schlegel A. Zebrafish models for dyslipidemia and atherosclerosis research. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:159. DOI: 10.3389/fendo.2016.00159.

57. Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;318:2-9.

58. Ridker PM, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-1131.

59. Baragetti A, Catapano AL, Magni P. Multifactorial Activation of NLRP3 Inflammasome: Relevance for a Precision Approach to Atherosclerotic Cardiovascular

Risk and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4459. DOI: 10.3390/ijms21124459.

60. Li JY, Wang YY, Shao T, et al. The zebrafish NLRP3 inflammasome has functional roles in ASC-dependent interleukin-1 maturation and gasdermin E-mediated pyroptosis. *J Biol Chem*. 2020;295(4):1120-1141. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011751.

61. Milichko V, Dyachuk V. Novel glial cell functions: extensive potency, stem cell-like properties, and participation in regeneration and transdifferentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00809.

62. Dyachuk V, Furlan A, Shahidi MK, et al. Neurodevelopment. Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors. *Science*. 2014;345(6192):82-87.

63. Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987;7:2087-2096.

64. Golic KG, Lindquist S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the drosophila genome. *Cell*. 1989;59:499-509.

65. Dhaliwal J, Lagace DC. Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *Eur J Neurosci*. 2011;33:1025-1036.

66. Lacar B, Young SZ, Platel J-C, et al. Imaging and recording subventricular zone progenitor cells in live tissue of postnatal mice. *Front Neurosci* 2010;4:1-16.

67. Livet J, Weissman TA, Kang H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*. 2007;450:56-62.

68. Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, et al (2011) RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat Med*. 2011;17(4):504-509. DOI: 10.1038/nm.2338.

69. García-Marqués J, López-Mascaraque L. Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity. *Cereb Cortex*. 2013;23:1463-1472. DOI: 10.1093/CERCOR/BHS134.

70. Kumamoto T, Maurinot F, Barry-Martin R, et al. Direct readout of neural stem cell transgenesis with an integration-coupled gene expression switch. *Neuron*. 2020;107(4):617-630.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.05.038.

71. Loulier K, Barry R, Mahou P, et al. Multiplex cell and lineage tracking with combinatorial labels. *Neuron*. 2014;81:505-520. DOI: 10.1016/J.NEURON.2013.12.016.

72. Abdeladim L, Matho KS, Clavreul S, et al. Multicolor multiscale brain imaging with chromatic multiphoton serial microscopy. *Nat Commun*. 2019;10:1-14. DOI: 10.1038/S41467-019-09552-9.

73. Hirokazu Kaji, Takeshi Yokoi, Takeaki Kawashima, et al. Controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells on detachable substrates. *Lab Chip*. 2009;9(3):427-432. DOI: 10.1039/b812510d.

74. Kim H, Yi N, Do B, et al. Adipose-derived stem cell coculturing stimulates integrin-mediated extracellular matrix adhesion of melanocytes by upregulating growth factors. *Biomolecules & Therapeutics*. 2019;27:185-192. doi: 10.4062/biomolther.2018.203.

75. Zeng Q, Chen W. The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatin-oxidized alginate hydrogel. *Biomaterials*. 2010;31(22):5772-5781. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.022.

76. Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, et al. Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell Stem Cell*. 2019;25(4):558-569.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2019.08.002.

77. Signati L, Allevi R, Piccotti F, et al. Ultrastructural analysis of breast cancer patient-derived organoids. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):423. DOI: 10.1186/s12935-021-02135-z.

78. Xu H, Lyu X, Yi M, et al. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):116. DOI: 10.1186/s13045-018-0662-9.

79. Gopal S, Rodrigues AL, Dordick JS. Exploiting CRISPR Cas9 in Three-Dimensional Stem Cell Cultures to Model Disease. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:692. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00692.

80. Teriyapirom I, Batista-Rocha AS, Koo BK. Genetic engineering in organoids. *J Mol Med*. 2021;99:555–568. DOI: 10.1007/s00109-020-02029-z.

81. Lupo F, Piro G, Torroni L, et al. Organoid-Transplant Model Systems to Study the Effects of Obesity on the Pancreatic Carcinogenesis in vivo. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:308. DOI: 10.3389/fcell.2020.00308.

Информация об авторах:

Андреева Дарья Дмитриевна, лаборант НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Синегубов Артем Александрович, внештатный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Бурзак Никита Александрович, младший научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мурашова Лада Александровна, младший научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васютина Марина Львовна, Научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дячук Вячеслав Алексеевич, к.б.н, ведущий научный сотрудник, заведующий НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.