

Исследования по клеточной биологии

УДК 636.92.454(045)

В.М. Покровский, Е.А. Патраханов, А.Ю. Карагодина, Ю.В. Степенко, Н.Е. Казбан, А.В. Турпакова, О.Б. Алтухова, П.Р. Лебедев, А.В. Дейкин¹

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КРОЛИКОВ

В данной статье мы представляем некоторые практические рекомендации, разработанные нами в ходе двухлетней работы по получению нескольких линий кроликов с искусственно измененным геномом. Технология получения генетически модифицированных кроликов основана на получении датированных оплодотворенных яйцеклеток с дальнейшей микроинъекцией генетических конструкций, оценкой выживаемости и пересадкой эмбрионов лапароскопическим и лапаротомическим способами. Наибольшую эффективность продемонстрировала следующая схема: введение сывороточного гонадотропина (Фоллимаг, МОСАГРОГЕН, Россия) в дозе 4МЕ/кг подкожно и внутривенное введение хорионического гонадотропина человека (Хорулон, Merck Animal Health, США) в дозе 60МЕ/кг. Таким образом, разработанная в итоге операционная процедура позволяет оператору проводить микроинъекции с высокой эффективностью переноса и максимальной выживаемостью клеток. Микроинъекцию проводят через пневматический микроинъектор «Eppendorf FemtoJet 4i» с помощью гидравлических микроманипуляторов под визуальным контролем через инвертированный исследовательский микроскоп «NIKON ECLIPSE TS2R». Описанные результаты могут быть полезны в составлении стандартных операционных процедур, применяемых в лабораториях, которые занимаются получением генетически модифицированных животных кроликов.

Ключевые слова: трансгенные животные, гормональная система, прокол конструкции, культивирование, эмбрионы, яйцеклетки, суперовуляция.

DOI: 10.35634/2412-9518-2022-32-4-439-448

Возможность целенаправленного редактирования генома про- и эукариот является одним из наиболее значимых достижений современной науки и промышленности [1–3]. Помимо неопределенного вклада в пищевую и фармацевтическую отрасли, генетически модифицированные организмы оказали существенное влияние на экологию [4] и развитие биомедицины [5]. Особую медицинскую значимость в последнее десятилетие приобрели технологии генетического редактирования позвоночных. При этом наибольшее количество работ по созданию высших животных с измененным геномом проведено на таких видах, как *Danio rerio* [6], *Rattus norvegicus* [7], *Mus musculus* [8], *Capra aegagrus* [9] и *Oryctolagus cuniculus* [10].

В целом задачи, которые могут быть решены с помощью геномного редактирования позвоночных животных, можно разделить на 1) *фундаментальные*, связанные с изучением вклада генетических вариаций и отдельных генов в фенотип; 2) *медицинские*, связанные с созданием модельных организмов, на которых можно изучать патогенез заболеваний и тестировать медицинские вмешательства; 3) *биотехнологические*, связанные с созданием продуцентов рекомбинантных белков.

В то время как для решения фундаментальных и медицинских задач наибольшую популярность приобрели лабораторные мыши (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*), оптимальным организмом для использования в биотехнологии представляются кролики (*Oryctolagus cuniculus*). Подобная логика является отражением оптимального сочетания большой массы и быстрых темпов размножения наряду с относительно низкими требованиями к содержанию [11–14]. В этой связи кролики могут служить производителями рекомбинантных белков в высоких количествах, а их непродолжительный срок гестации ускоряет получение генетически модифицированных линий.

¹ Работа выполнена в рамках гранта (соглашение с Минобрнауки России №075-15-2022 от 06.05.2022) по реализации Программы стратегического академического лидерства Приоритет-2030, Стратегический проект «Наука XXI века», кластер проектов «Развитие генетических технологий», в интересах реализации программы консорциума «Генетические технологии для биомедицины, сельского хозяйства и промышленной микробиологии», подраздел «Молодые лидеры в науке».

В данной статье мы представляем некоторые практические рекомендации, разработанные нами в ходе двухлетней работы по получению нескольких линий кроликов с искусственно измененным геномом. При этом основной фокус наших рекомендаций направлен на осуществление процедур, связанных с репродуктивными, а не молекулярно-биологическими технологиями. Опыт показывает, что эффективность практического применения новейших подходов генетического редактирования зачатую можно повысить с помощью простых приемов, связанных с особенностями репродуктивной биологии кроликов.

Нами были разработаны гормональные протоколы, опробованы новые методы микроинъекций, протестированы различные среды для культивирования. Кроме того, нами проведено сравнение эффективности разных схем гормональной стимуляции для получения максимального количества оплодотворенных яйцеклеток от каждого кролика. Описанные результаты могут быть полезны в составлении стандартных операционных процедур, применяемых в лабораториях, которые занимаются получением генетически модифицированных животных, включая кроликов, мышей и крыс.

Целью данного исследования стала разработка стабильной технологии получения генетически модифицированных кроликов, основанная на получении датированных оплодотворенных яйцеклеток с дальнейшей микроинъекцией генетических конструкций, оценкой выживаемости и пересадкой эмбрионов лапароскопическим и лапаротомическим способами.

Материалы и методы исследований

Исследование было проведено на базе Лаборатории геномного редактирования в биомедицине и ветеринарии НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ» в период с 2020 по 2022 гг. и являлось частью нескольких исследовательских проектов, направленных на создание уникальных линий трансгенных кроликов, экспрессирующих рекомбинантный человеческий HSP70 (протокол заседания этического комитета №10-28/20-а), браззеин (протокол заседания этического комитета №10-21/20-с) и GFP (протокол заседания этического комитета №05-23/21-е), а также кроликов с нокаутом гена *RPE65* (протокол заседания этического комитета №01-25/21).

В качестве объекта исследования суммарно было использовано 112 кроликов породы «Хи-коль», полученных из питомника ООО «НТЦ БИО». После поступления из питомника животные проходили 10-дневный период карантина и адаптации. На всех этапах исследования животные содержались в специализированных клетках в условиях контролируемого освещения 12/12 часов при температуре 21–23°C и влажности 40–60 %. Проавтоклавированный корм и очищенная вода были представлены в свободном доступе (ГОСТ 50258-92). В качестве подстилки использовались опилки, прошедшие предварительную стерилизацию при приемке. В комнатах содержания животных осуществлялась приточно-вытяжная вентиляция с принудительным воздухообменом, эквивалентным 10 объемам в час.

Все манипуляции с животными проводили квалифицированные сотрудники в соответствии с требованиями Положения о лабораторной практике в РФ 2003 г. и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, а также правил 3R. В карантинный период, а также на протяжении исследования животных ежедневно осматривал штатный ветеринарный врач НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ».

Общая стратегия создания генетически модифицированных животных. Предложено большое количество вариаций в подходах к созданию генетически модифицированных животных. Генетически измененные зиготы могут быть получены с использованием переноса ядер стволовых клеток [15], трансплантации сперматогональных стволовых клеток [16], введения генетической конструкции с помощью электропорации [17], вирусной трансфекции [18] или трансфекции с липофектаминосом [19], а также прямой микроинъекцией в пронуклеус [20]. В нашей лаборатории был выбран и развивается последний подход. В соответствии с этим все описанные процедуры и результаты имеют отношение к стратегии получения животных по следующей схеме: 1) суперовуляция и забор оплодотворенных яйцеклеток у самок-доноров; 2) микроинъекция генетической конструкции в пронуклеус зиготы; 3) культивирование зиготы до стадии двух бластомеров; 4) выбор морфологически сохранных зигот и их трансплантация в яйцевод самок-реципиентов.

Оснащение:

- сывороточный гонадотропин 200 МЕ/мл;
- хорионический гонадотропин человека 300 МЕ/мл;

- новокаин;
- раствор йода;
- медетомидин;
- пинцет хирургический прямой;
- операционный стол для кроликов;
- ножницы хирургические прямые;
- атравматические иглы;
- шприцы 1 мл;
- шприцы 2,5 мл;
- шприцы 25 мл;
- катетер 21G, поливинилхлорид;
- среда Дюльбекко;
- ватные тампоны;
- пробирки 50 мл;
- среда эмбриологическая M2;
- чашки Петри D=30 мм;
- иглы атравматические полипропилен монопить синий USP 4/0 (MP1,5), 90 см, 5 шт.;
- капилляры стеклянные;
- стеромикроскоп с объективами 5x и 20x;
- инвертированный исследовательский микроскоп с объективом 20x, 40x;
- пуллер микропипеток;
- кузнца для изготовления микрокапилляров;
- стерилизатор паровой.

Результаты и их обсуждение

Суперовуляция. Первым этапом в большинстве технологий создания генетически модифицированных позвоночных является получение оплодотворенных яйцеклеток у самки-донора. В качестве общепринятого подхода к увеличению количества зигот используется стимуляция гормональными препаратами, интенсифицирующими выход яйцеклеток в яйцеводы. При разработке схемы гормональной суперовуляции мы опирались на коэффициенты межвидового пересчета [21], опыт работы на мышах [22] и статистику по количеству полученных яйцеклеток при применении каждой из схем.

Из опробованных нами схем наибольшую эффективность продемонстрировала следующая схема: введение сывороточного гонадотропина (Фоллимаг, МОСАГРОГЕН, Россия) в дозе 4МЕ/кг подкожно и внутривенное введение хорионического гонадотропина человека (Хорулон, Merck Animal Health, США) в дозе 60МЕ/кг в следующем режиме:

1-й день – Фоллимаг – 16.30; 2-й день – Фоллимаг – 9.00 и 16.30; 3-й день – Фоллимаг – 9.00 и 16.30; 4-й день – Фоллимаг – 9.00; 5-й день – Хорулон – 16.30, с последующим искусственным осеменением. Данная схема позволяет добиться выхода около 40 яйцеклеток у одной самки.

Забор зигот у самок-доноров. При работе с мелкими лабораторными животными общепринятым способом получения зигот является терминальное вымывание оплодотворенных яйцеклеток, производящееся непосредственно после эвтаназии. Ряд причин, включая этические и экономические аспекты, не позволяет применять аналогичный подход у кроликов, что диктует необходимость проведения операционного вмешательства с соблюдением анестезиологических стандартов, а также правил асептики и антисептики.

Согласно разработанному нами протоколу, извлечение эмбрионов из яйцеводов проводится хирургическим методом, через бахромку яйцевода. Общий наркоз вызывают с помощью медетомидина. У наркотизированного животного вымывают и выбривают операционное поле. После этого животное дислоцируют в операционную комнату, укладывают на операционный станок и фиксируют за ноги. Операционное поле дезинфицируют 5 % раствором йода и осуществляют местную инфильтрационную анестезию 2 % раствором новокаина. Для сохранения стерильности операционного поля, зону вокруг него покрывают стерильной простыней. Разрез кожи производится по белой линии живота на уровне двух последних сосков длиной 10 см. Мышцы разделяют тупым способом. После вскрытия брюшной полости подтягивают к разрезу яйцевод и яичник. Через бахромку в ампулу яйцевода вво-

дят пластиковый катетер подходящего диаметра длиной 40–50 см и фиксируют его там усилием большого и указательного пальцев хирурга.

Со стороны маточно-трубного соединения в яйцевод вводят инъекционную иглу, к которой затем подсоединяют шприц, заполненный 50 мл фосфатно-солевого буфера Дюльбекко, обогащенного 4 % фетальной сывороткой крупного рогатого скота. Нагнетая раствор, проводят вымывание эмбрионов из яйцевода. Вытекающую через пластиковый катетер жидкость с эмбрионами собирают в стеклянный флакон.

Полученную промывную жидкость отстаивают в термостате или на обогреваемом столике в течение 10–15 минут. Осторожно с помощью шприца удаляют верхний слой жидкости. Оставшуюся во флаконе жидкость взбалтывают и переносят в большую чашку Петри. В чашке под стереомикроскопом при увеличении 5х проводится поиск эмбрионов. Найденные эмбрионы переносят в малые чашки Петри в свежую среду Дюльбекко и оценивают их состояние. После этого яйцеклетки промывают в 3–4 порциях среды Дюльбекко с добавлением 0,3 % бычьего сывороточного альбумина. Наконец, проводят визуальную оценку морфологии эмбрионов (рис. 1).

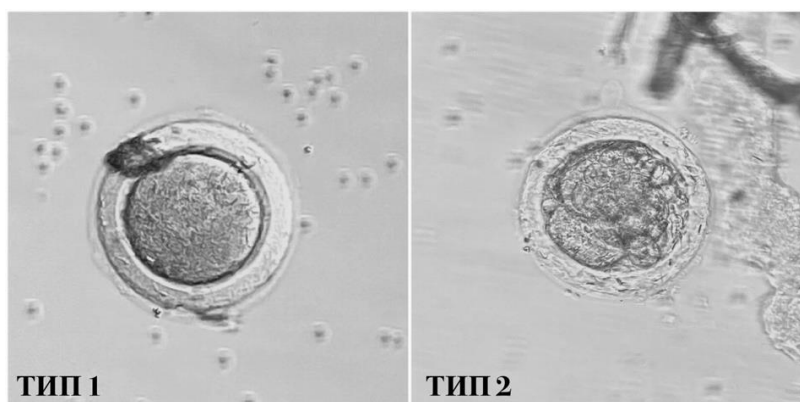


Рис. 1. Общий вид эмбрионов кроликов.

Примечание. Тип 1 – Зрелый или нормальный тип, эмбрион с равными blastomeres, без ануклеарных фрагментов и с видимыми пронуклеусами. Тип 2 – Абнормальный тип, эмбрион неудовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов, отсутствием пронуклеусов

Микроинъекция генно-инженерной конструкции. Следующим после получения зигот этапом при получении генетически модифицированных животных является введение генно-инженерной конструкции, служащей для внесения трансгена или модификаций в геноме. Наиболее важным аспектом на данном этапе является отработка техники приготовления микрокапилляров и процесса микроинъектирования. При разработке оптимальной технологии внесения генетического материала мы использовали генно-инженерные конструкции, содержащие трансген зеленого флуоресцентного белка GFP. Данный подход позволил проводить быструю и удобную оценку эффективности микроинъекции и выживаемости клеток по количеству зигот, проявляющих флуоресцентную эмиссию (таблица).

Выживаемость и эффективность встраивания генетической конструкции после микроинъекции конструкции, содержащей кДНК GFP

Показатель	Микроинъекция	Интактные
Количество живых эмбрионов до начала микроинъекций	500	100
Количество живых эмбрионов после окончания микроинъекций, 0 ч	255 (51 %)	100 (100 %)
Количество живых эмбрионов через 24 ч	210 (42 %)	94 (94 %)
Количество поделившихся двухбластомерных эмбрионов через 24 ч	197 (39,4 %)	86 (86 %)

Таким образом, разработанная в итоге операционная процедура позволяет оператору проводить микроинъекции с высокой эффективностью переноса и максимальной выживаемостью клеток. Микроинъекцию проводят через пневматический микроинжектор Eppendorf FemtoJet 4i» (Eppendorf,

США) с помощью гидравлических микроманипуляторов (Narishige group, Япония) под визуальным контролем через инвертированный исследовательский микроскоп «NIKON ECLIPSE TS2R» (Nikon, Япония). Изготовление микроинъекционных игл для прокалывания осуществляется на «пуллере микропипеток Флеминга-Брауна Р-97». Изготовление капилляров для фиксации яйцеклеток производится с помощью пуллера для вытягивания капилляров «Narishige Р-1000» (Япония) и микрокузницы «Narishige MF-900» (Япония). Микроинъекции производятся в одно и то же время суток, одним оператором (рис. 2).



Рис. 2. Микроинъекция генно-инженерной конструкции в эмбрион кролика

Примечание. Слева – манипуляционный капилляр для захвата эмбрионов в камере, изготовленный в микрокузнице. Справа – микроинъекционная игла, изготовленная в пуллере Sutter Instrument Company Р-97; в середине рисунка – эмбрион кролика.

Культивирование эмбрионов. Стандартной практикой после внесения генетической конструкции является *in vitro* культивирование эмбрионов. Культивирование позволяет провести селекцию выживших и погибших эмбрионов с помощью визуальной оценки эффективности деления. Кроме того, культивирование позволяет довести эмбрионы до необходимой стадии, что в некоторых случаях позволяет увеличить эффективность имплантации.

Для культивирования микроинъекцированные эмбрионы помещают в предварительно загазованные культуральные среды К-SICM-20 (Sydney IVF Cleavage Medium), приготовленные по следующему протоколу.

Капля среды объемом 200 мкл накрывается легким минеральным маслом и помещается с находящимися в ней эмбрионами в инкубатор с напряжением CO₂ 5 %, при температуре 37° С на 24 ч. Культуральные среды в процессе культивирования не меняются.

Технологии генетического редактирования высших животных приобретают все большее значение для современной медицины и биотехнологии [23]. Помимо того, что генетически модифицированные животные способствуют более прецизионному изучению человеческих патологий, ряд из них может выступать в качестве биореакторов для производства рекомбинантных белков [24]. Закономерным следствием возрастающего спроса на новые линии генетически модифицированных животных является широкое внедрение и распространение репродуктивных и молекулярно-биологических методик в лабораториях, имеющих возможности для содержания животных.

Очевидно, что в терминах технологий генетического редактирования наибольший фокус направлен на молекулярно-биологические аспекты процесса [25]. Тем не менее, создание организмов с измененным геномом также требует высокой профессиональной подготовки и научной квалификации персонала, ответственного за репродуктивные технологии [26]. Кроме того, для повышения эффективности создания линий с измененным геномом требуется постоянный поиск и совершенствование подходов к манипуляциям с животными и зиготами.

В настоящее время существует большое разнообразие подходов к созданию генетически модифицированных позвоночных. Помимо широкого спектра существующих молекулярных машин генетического редактирования [27] и способов их доставки в ядро зиготы [28], значительно варьируют и вспомогательные репродуктивные технологии. Например, некоторые авторы сообщают об успешном

генетическом редактировании без использования экстракорпоральных процедур и переноса эмбрионов суррогатным матерям [29]. Кроме того, особенности культивирования, возраст эмбрионов и способы их трансплантации могут быть изменены в зависимости от конкретной лаборатории, задач исследователя и выработанного протокола [30; 31].

Заключение

Нами были воспроизведены, адаптированы и описаны все этапы репродуктивных процедур, необходимых для получения генетически модифицированных кроликов. Результаты проведенной работы могут быть использованы в различных отраслях науки, включая медицинские и сельскохозяйственные. Трансгенные линии лабораторных кроликов могут служить репрезентативной тест-системой для прецизионного изучения патогенеза заболеваний и для изучения эффективности и безопасности лекарственных средств, а также для создания кроликов-продуцентов рекомбинантных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahfouz M.M., Cardi T, Neal Stewart C.Jr. Next-generation precision genome engineering and plant biotechnology // *Plant Cell Rep.* 2016. Vol. 35, no. 7, P. 1397–1399. doi: 10.1007/s00299-016-2009-8.
2. Cameron D.E., Bashor C.J., Collins J.J. A brief history of synthetic biology // *Nat Rev Microbiol.* 2014. Vol. 12, no. 5. P. 381–390. doi: 10.1038/nrmicro3239.
3. Jiang Y., Chen B., Duan C., Sun B., Yang J., Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system // *Appl Environ Microbiol.* 2015. Vol. 81, no. 7. P. 2506–2514, doi: 10.1128/AEM.04023-14.
4. Yu H., Lin T., Meng X., Du H., Zhang J., Liu G., Chen M., Jing Y., Kou L., Li X., Gao Q., Liang Y., Liu X., Fan Z., Liang Y., Cheng Z., Chen M., Tian Z., Wang Y., Chu C., Zuo J., Wan J., Qian Q., Han B., Zuccolo A., Wing R.A., Gao C., Liang C., Li J. A route to de novo domestication of wild allotetraploid rice // *Cell.* 2021. Vol. 184, no. 5. P. 1156–1170. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.013.
5. Phelps M.P., Seeb L.W., Seeb J.E. Transforming ecology and conservation biology through genome editing // *Conserv Biol.* 2020. Vol. 34, no. 1. P. 54–65. doi: 10.1111/cobi.13292.
6. Chen X, Gays D, Santoro MM. Transgenic Zebrafish // *Methods Mol Biol.* 2016. Vol. 1464. P. 107–114. doi: 10.1007/978-1-4939-3999-2_10.
7. Mashimo T, Serikawa T. Rat resources in biomedical research // *Curr Pharm Biotechnol.* 2009. Vol. 10, no. 2. P. 214–220. doi: 10.2174/138920109787315105.
8. Hickman-Davis JM, Davis IC. Transgenic mice // *Paediatr Respir Rev.* 2006. Vol. 7, no. 1. P. 49–53. doi: 10.1016/j.prrv.2005.09.005.
9. Lee C.S., Fang N.Z., Koo D.B., Lee Y.S., Zheng G.D., Oh K.B., Youn W.S., Han Y.M., Kim S.J., Lim J.H., Shin S.T., Jin S.W., Lee K.S., Ko J.H., Koo J.S., Park C.S., Yoo O.J., Lee K.K.. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus* // *Small Rumin Res.* 2000. Vol. 37, no. 1-2. P. 57–63. doi: 10.1016/s0921-4488(99)00139-x.
10. He Z., Jiang L., Zhang T., Zhou M., Wu D., Yuan T., Yuan Y., Cheng Y. Efficient increase of the novel recombinant human plasminogen activator expression level and stability through the use of homozygote transgenic rabbits // *Int J Mol Med.* 2018. Vol. 42, no. 4. P. 2269–2275. doi: 10.3892/ijmm.2018.3754.
11. Fan J., Challah M., Watanabe T. Transgenic rabbit models for biomedical research: current status, basic methods and future perspectives // *Pathol Int.* 1999. Vol. 49, no. 7. P. 583–594. doi: 10.1046/j.1440-1827.1999.00923.x.
12. 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. Vol. 12, no. 5. P. 541–553. doi: 10.1023/a:1025816809372.
13. Jänne J., Alhonen L., Hyttinen J.M., Peura T., Tolvanen M., Korhonen V.P. Transgenic bioreactors // *Biotechnol Annu Rev.* 1998. Vol. 4. P. 55–74, doi: 10.1016/s1387-2656(08)70067-x.
14. Castro F.O., Limonta J., Rodriguez A., Aguirre A., de la Fuente J., Aguilar A., Ramos B., Hayes O. Transgenic rabbits for the production of biologically-active recombinant proteins in the milk // *Genet Anal.* 1999. Vol. 15, no. 3-5. P. 179-187. doi: 10.1016/s1050-3862(99)00024-8.
15. Zhang S., Xiang S., Yang J., Shi J., Guan X., Jiang J., Wei Y., Luo C., Shi D., Lu F. Optimization of parthenogenetic activation of rabbit oocytes and development of rabbit embryo by somatic cell nuclear transfer // *Reprod Domest Anim.* 2019. Vol. 54, no. 2. P. 258–269. doi: 10.1111/rda.13344.
16. Takehashi M., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells // *Dev Growth Differ.* 2010. Vol. 52, no. 3. P. 303–310, doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01167.x.
17. Zhang C., Ren Z., Gong Z. Transgenic Expression and Genome Editing by Electroporation of Zebrafish Embryos // *Mar Biotechnol.* New York, USA. 2020. Vol. 22, no. 5. P. 644–650. doi: 10.1007/s10126-020-09985-0.

18. Romeo C., Chen S.H., Goulding E., Van Gorder L., Schwartz M., Walker M., Scott G., Scappini E., Ray M., Martin N.P. AAV diffuses across zona pellucida for effortless gene delivery to fertilized eggs // *Biochem Biophys Res Commun*. 2020. Vol. 526, no. 1. P. 85–90. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.026.
19. Tamm C., Kadekar S., Pijuan-Galitó S., Annerén C. Fast and Efficient Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells Using Non-Viral Reagents // *Stem Cell Rev Rep*. 2016. Vol. 12, no. 5. P. 584–591. doi: 10.1007/s12015-016-9673-5.
20. Egorova T.V., Zotova E.D., Reshetov D.A., Polikarpova A.V., Vassilieva S.G., Vlodayets D.V., Gavrilov A.A., Ulianov S.V., Buchman V.L., Deykin A.V.. CRISPR/Cas9-generated mouse model of Duchenne muscular dystrophy recapitulating a newly identified large 430 kb deletion in the human DMD gene // *Dis Model Mech*. 2019. Vol. 12, no. 4. dmm037655 p. doi: 10.1242/dmm.037655.
21. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств, Часть 1 / Под ред. А.Н. Миронова А.В. М.: Грифф и К, 2012., 244 с.
22. Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Белашова А.В., Карагодина А.Ю., Шабалин А.А., Нестеров А.В., Марковская В.А., Покровский М.В. Оценка эффективности групповой гормон-регулирующей синхронизации овуляции у самок мышей // *Фармация и фармакология*. 2020.Т. 8, № 4. С. 255–262. doi: 10.19163/2307-9266-2020-8-4-255-262.
23. Doudna J.A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science*. 2014. 346 (6213), 1258096 p. doi: 10.1126/science.1258096.
24. Hay A.N., Farrell K., Leeth C.M., Lee K. Use of Genome Editing Techniques to Produce Transgenic Farm Animals // *Adv Exp Med Biol*. 2022. Vol. 1354. P. 279–297. doi: 10.1007/978-3-030-85686-1_14.
25. Asmamaw M., Zawdie B. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing // *Biologics*. 2021. Vol. 15. P. 353–361. doi: 10.2147/BTT.S326422.
26. Larson M.A. Embryo Transfer Surgery // *Methods Mol Biol*. 2020. Vol. 2066. P. 101–106. doi: 10.1007/978-1-4939-9837-1_8.
27. Khalil A.M. The genome editing revolution: review // *J Genet Eng Biotechnol*. 2020. Vol. 18, no. 1. 68 p. doi: 10.1186/s43141-020-00078-y.
28. Gordon K., Ruddle F.H. Gene transfer into mouse embryos // *Dev Biol*. New York, USA. 1986. Vol. 4. P. 1–36. doi: 10.1007/978-1-4613-2143-9_1.
29. Saito T. Embryonic in vivo electroporation in the mouse // *Methods Enzymol*. 2010. Vol. 477. P. 37–50. doi: 10.1016/S0076-6879(10)77003-8.
30. Hosseini S.M., Hajian M., Ostadhosseini S., Forouzanfar M., Abedi P., Jafarpour F., Gourabi H., Shahverdi A.H., Vosough A., Ghanaie H.R., Nasr-Esfahani M.H. Contrasting effects of G1.2/G2.2 and SOF1/SOF2 embryo culture media on pre- and post-implantation development of non-transgenic and transgenic cloned goat embryos // *Reprod Biomed Online*. 2015. Vol. 31, no. 3. P. 372–383. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.008.
31. Goldstein C.A., O'Brien L.M., Bergin I.L., Saunders T.L. The effect of repeated light-dark shifts on uterine receptivity and early gestation in mice undergoing embryo transfer // *Syst Biol Reprod Med*. 2018. Vol. 64, no. 2. P. 103–111. doi: 10.1080/19396368.2017.1408715.

Поступила в редакцию 29.11.2022

Покровский Владимир Михайлович, младший научный сотрудник, аспирант кафедры фармакологии
E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

Патраханов Евгений Александрович, младший научный сотрудник, аспирант кафедры фармакологии
E-mail: pateval@gmail.com

Карагодина Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник, аспирант кафедры фармакологии
E-mail: karagodina_a@bsu.edu.ru

Степенко Юлия Владимировна, младший научный сотрудник
Лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии
E-mail: aspirj16@gmail.com

Казбан Николай Егорович, лаборант-исследователь НИИ Фармакологии живых систем
Турпакова Анастасия Владимировна, лаборант-исследователь НИИ Фармакологии живых систем
E-mail: 1516173@bsu.edu.ru

Алтухова Оксана Борисовна, доктор медицинских наук, доцент,
заведующий кафедрой акушерства и гинекологии медицинского института
E-mail: altuhova_o@bsu.edu.ru

Лебедев Петр Романович, м.н.с., аспирант кафедры фармакологии.
E-mail: lebedev_p@bsu.edu.ru

Дейкин Алексей Васильевич, кандидат биологических наук, доцент,
директор Объединенного центра генетических технологий
E-mail: deykin@bsu.edu.ru

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

*V.M. Pokrovskiy, E.A. Patrakhanov, A.Yu. Karagodina, Yu.V. Stepenko, N.E. Kazban, A.V. Turpakova,
O.B. Altukhova, P.R. Lebedev, A.V. Deykin*

METHODOLOGICAL RECOMMENDATIONS FOR THE USE OF REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES TO CREATE GENETICALLY MODIFIED RABBITS

DOI: 10.35634/2412-9518-2022-32-4-439-448

In this article, we present some practical recommendations that we developed in the course of two years of work on obtaining several lines of rabbits with an artificially modified genome. The technology of obtaining genetically modified rabbits, based on obtaining dated fertilized eggs with further microinjection of genetic constructs, assessment of survival and embryo transfer by laparoscopic and laparotomic methods. The following regimen demonstrated the greatest efficiency: administration of serum gonadotropin (Follimag, MOSAGROGEN, Russia) at a dose of 4ME/kg subcutaneously and intravenous administration of human chorionic gonadotropin (Chorulon, Merck Animal Health, USA) at a dose of 60ME/kg. Thus, the resulting operating procedure allows the operator to perform microinjections with high transfer efficiency and maximum cell survival. Microinjection is carried out through an Eppendorf FemtoJet 4i pneumatic microinjector using hydraulic micromanipulators under visual control through a NIKON ECLIPSE TS2R inverted research microscope. The described results may be useful in the compilation of standard operating procedures used in laboratories that are engaged in the production of genetically modified rabbit animals.

Keywords: transgenic animals, hormonal system, construct puncture, cultivation, embryos, eggs, superovulation.

REFERENCES

1. Mahfouz M.M., Cardi T, Neal Stewart C.Jr. Next-generation precision genome engineering and plant biotechnology // *Plant Cell Rep.* 2016. Vol. 35, no. 7, P. 1397–1399. doi: 10.1007/s00299-016-2009-8.
2. Cameron D.E., Bashor C.J., Collins J.J. A brief history of synthetic biology // *Nat Rev Microbiol.* 2014. Vol. 12, no. 5. P. 381–390. doi: 10.1038/nrmicro3239.
3. Jiang Y., Chen B., Duan C., Sun B., Yang J., Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system // *Appl Environ Microbiol.* 2015. Vol. 81, no. 7. P. 2506–2514, doi: 10.1128/AEM.04023-14
4. Yu H., Lin T., Meng X., Du H., Zhang J., Liu G., Chen M., Jing Y., Kou L., Li X., Gao Q., Liang Y., Liu X., Fan Z., Liang Y., Cheng Z., Chen M., Tian Z., Wang Y., Chu C., Zuo J., Wan J., Qian Q., Han B., Zuccolo A., Wing R.A., Gao C., Liang C., Li J. A route to de novo domestication of wild allotetraploid rice // *Cell.* 2021. Vol. 184, no. 5. P. 1156–1170. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.013.
5. Phelps M.P., Seeb L.W., Seeb J.E. Transforming ecology and conservation biology through genome editing // *Conserv Biol.* 2020. Vol. 34, no. 1. P. 54–65. doi: 10.1111/cobi.13292.
6. Chen X, Gays D, Santoro MM. Transgenic Zebrafish // *Methods Mol Biol.* 2016. Vol. 1464. P. 107–114. doi: 10.1007/978-1-4939-3999-2_10.
7. Mashimo T, Serikawa T. Rat resources in biomedical research // *Curr Pharm Biotechnol.* 2009. Vol. 10, no. 2. P. 214–220. doi: 10.2174/138920109787315105.
8. Hickman-Davis JM, Davis IC. Transgenic mice // *Paediatr Respir Rev.* 2006. Vol. 7, no. 1. P. 49–53. doi: 10.1016/j.prrv.2005.09.005.
9. Lee C.S., Fang N.Z., Koo D.B., Lee Y.S., Zheng G.D., Oh K.B., Youn W.S., Han Y.M., Kim S.J., Lim J.H., Shin S.T., Jin S.W., Lee K.S., Ko J.H., Koo J.S., Park C.S., Yoo O.J., Lee K.K.. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus* // *Small Rumin Res.* 2000. Vol. 37, no. 1-2. P. 57–63. doi: 10.1016/s0921-4488(99)00139-x.
10. He Z., Jiang L., Zhang T., Zhou M., Wu D., Yuan T., Yuan Y., Cheng Y. Efficient increase of the novel recombinant human plasminogen activator expression level and stability through the use of homozygote transgenic rabbits // *Int J Mol Med.* 2018. Vol. 42, no. 4. P. 2269–2275. doi: 10.3892/ijmm.2018.3754.
11. Fan J., Challah M., Watanabe T. Transgenic rabbit models for biomedical research: current status, basic methods and future perspectives // *Pathol Int.* 1999. Vol. 49, no. 7. P. 583–594. doi: 10.1046/j.1440-1827.1999.00923.x.

12. 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. Vol. 12, no. 5. P. 541–553. doi: 10.1023/a:1025816809372.
13. Jänne J., Alhonen L., Hyttinen J.M., Peura T., Tolvanen M., Korhonen V.P. Transgenic bioreactors // *Biotechnol Annu Rev.* 1998. Vol. 4. P. 55–74, doi: 10.1016/s1387-2656(08)70067-x.
14. Castro F.O., Limonta J., Rodriguez A., Aguirre A., de la Fuente J., Aguilar A., Ramos B., Hayes O. Transgenic rabbits for the production of biologically-active recombinant proteins in the milk // *Genet Anal.* 1999. Vol. 15, no. 3-5. P. 179-187. doi: 10.1016/s1050-3862(99)00024-8.
15. Zhang S., Xiang S., Yang J., Shi J., Guan X., Jiang J., Wei Y., Luo C., Shi D., Lu F. Optimization of parthenogenetic activation of rabbit oocytes and development of rabbit embryo by somatic cell nuclear transfer // *Reprod Domest Anim.* 2019. Vol. 54, no. 2. P. 258–269. doi: 10.1111/rda.13344.
16. Takehashi M., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells // *Dev Growth Differ.* 2010. Vol. 52, no. 3. P. 303–310, doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01167.x.
17. Zhang C., Ren Z., Gong Z. Transgenic Expression and Genome Editing by Electroporation of Zebrafish Embryos // *Mar Biotechnol.* New York, USA. 2020. Vol. 22, no. 5. P. 644–650. doi: 10.1007/s10126-020-09985-0.
18. Romeo C., Chen S.H., Goulding E., Van Gorder L., Schwartz M., Walker M., Scott G., Scappini E., Ray M., Martin N.P. AAV diffuses across zona pellucida for effortless gene delivery to fertilized eggs // *Biochem Biophys Res Commun.* 2020. Vol. 526, no. 1. P. 85–90. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.026.
19. Tamm C., Kadecar S., Pijuan-Galitó S., Annerén C. Fast and Efficient Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells Using Non-Viral Reagents // *Stem Cell Rev Rep.* 2016. Vol. 12, no. 5. P. 584–591. doi: 10.1007/s12015-016-9673-5.
20. Egorova T.V., Zotova E.D., Reshetov D.A., Polikarpova A.V., Vassilieva S.G., Vlodayets D.V., Gavrilov A.A., Ulianov S.V., Buchman V.L., Deykin A.V.. CRISPR/Cas9-generated mouse model of Duchenne muscular dystrophy recapitulating a newly identified large 430 kb deletion in the human DMD gene // *Dis Model Mech.* 2019. Vol. 12, no. 4. dmm037655 p. doi: 10.1242/dmm.037655.
21. Mironov A.N. *Rukovodstvo po provedeniyu klinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' I* [Guidelines for conducting clinical trials of medicines. Part 1], Moscow: Grif i K Publ., 2012, 244 p. (in Russ.).
22. Pokrovskiy V.M., Patrakhanov E.A., Lebedev P.R., Belashova A.V., Karagodina A.Yu., Shabalin A.A., Nesterov A.V., Markovskaya V.A., Pokrovskiy M.V. [Estimation of the efficiency of hormone-regulating synchronization of ovulation in female mice], in *Pharmacy & Pharmacology*, 2020, vol. 8, no. 4, pp. 255–262, doi: 10.19163/2307-9266-2020-8-4-255-262 (in Russ.).
23. Doudna J.A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science.* 2014. 346 (6213), 1258096 p. doi: 10.1126/science.1258096.
24. Hay A.N., Farrell K., Leeth C.M., Lee K. Use of Genome Editing Techniques to Produce Transgenic Farm Animals // *Adv Exp Med Biol.* 2022. Vol. 1354. P. 279–297. doi: 10.1007/978-3-030-85686-1_14.
25. Asmamaw M., Zawdie B. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing // *Biologics.* 2021. Vol. 15. P. 353–361. doi: 10.2147/BTT.S326422.
26. Larson M.A. Embryo Transfer Surgery // *Methods Mol Biol.* 2020. Vol. 2066. P. 101–106. doi: 10.1007/978-1-4939-9837-1_8.
27. Khalil A.M. The genome editing revolution: review // *J Genet Eng Biotechnol.* 2020. Vol. 18, no. 1. 68 p. doi: 10.1186/s43141-020-00078-y.
28. Gordon K., Ruddle F.H. Gene transfer into mouse embryos // *Dev Biol.* New York, USA. 1986. Vol. 4. P. 1–36. doi: 10.1007/978-1-4613-2143-9_1.
29. Saito T. Embryonic in vivo electroporation in the mouse // *Methods Enzymol.* 2010. Vol. 477. P. 37–50. doi: 10.1016/S0076-6879(10)77003-8.
30. Hosseini S.M., Hajian M., Ostadhosseini S., Forouzanfar M., Abedi P., Jafarpour F., Gourabi H., Shahverdi A.H., Vosough A., Ghanaie H.R., Nasr-Esfahani M.H. Contrasting effects of G1.2/G2.2 and SOF1/SOF2 embryo culture media on pre- and post-implantation development of non-transgenic and transgenic cloned goat embryos // *Reprod Biomed Online.* 2015. Vol. 31, no. 3. P. 372–383. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.008.
31. Goldstein C.A., O'Brien L.M., Bergin I.L., Saunders T.L. The effect of repeated light-dark shifts on uterine receptivity and early gestation in mice undergoing embryo transfer // *Syst Biol Reprod Med.* 2018. Vol. 64, no. 2. P. 103–111. doi: 10.1080/19396368.2017.1408715.

Received 29.11.2022

Pokrovskiy V.M., Junior Researcher, Postgraduate Student, Department of Pharmacology
E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

Patrakhanov E.A., Junior Researcher, Postgraduate Student, Department of Pharmacology
E-mail: pateval@gmail.com

Karagodina A.Yu., Junior Researcher, Postgraduate Student, Department of Pharmacology
E-mail: karagodina_a@bsu.edu.ru

Stepenko Y.V., Junior researcher Laboratories of genetic technologies
and gene editing for biomedicine and veterinary medicine

E-mail: aspirj16@gmail.com

Kazban N.E., Laboratory researcher at the Research Institute of Pharmacology of Living Systems

Turpakova A.V., Laboratory researcher at the Research Institute of Pharmacology of Living Systems

E-mail: 1516173@bsu.edu.ru

Altukhova O.B., Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Obstetrics and
Gynecology of the Medical Institute

E-mail: altuhova_o@bsu.edu.ru

Lebedev P.R., Junior Researcher, Postgraduate Student, Department of Pharmacology.

E-mail: lebedev_p@bsu.edu.ru

Deykin A.V., Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,

Director of the Joint Center for Genetic Technologies

E-mail: deyin@bsu.edu.ru

Belgorod State National Research University

Pobedy st., 85, Belgorod, Russia, 308015