

**ОПТИМАЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЭМБРИОНОВ
ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В РАБОТАХ ПО ПОЛУЧЕНИЮ
ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ
МЫШЕЙ И КОЗ**

© 2018 г. Ю. Ю. Силаева^а, Ю. К. Кирикович^с, Л. Н. Скуратовская^б, А. В. Дейкин^{а, б, *}

^аФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук
Россия, Москва, ул. Вавилова, 34/5

^бФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии
Россия, Москва, ул. Балтийская, д. 8

^сРУП “Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству”
Республика Беларусь, г. Жодино, ул. Фрунзе, 11

*E-mail: deikin@igb.ac.ru

Поступила в редакцию 11.12.2017 г.

Окончательный вариант получен 27.06.2018 г.

Технология создания генетически-модифицированных животных (плацентарных млекопитающих) методом микроинъекции в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки предполагает в качестве одного из ключевых этапов трансплантацию ранних эмбрионов самкам-реципиентам. Однако среди исследователей существует значительный разброс мнений об оптимальном количестве эмбрионов, переносимых самке-реципиенту. Так, в методической литературе и экспериментальных статьях, посвященных методике создания генетически-модифицированных животных, приводятся данные о пересадке от 20 до 60 эмбрионов мыши и от 2 до 6 эмбрионов коз одному реципиенту. Таким образом, стандартной рекомендацией является перенос значительно большего числа эмбрионов, чем развивается у животных обоих видов при физиологической беременности. В то же время технология трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота (КРС) предполагает перенос одного эмбриона, что является физиологической нормой для этого вида животных. Клинические протоколы вспомогательных репродуктивных технологий для трансплантации эмбрионов человека также рекомендуют переносить один эмбрион, поскольку перенос числа эмбрионов, большего, чем при физиологической беременности, ведет к увеличению рисков. В своей работе мы анализируем результаты экспериментов по получению генетически-модифицированных мышей и коз и приводим данные, свидетельствующие о необходимости пересмотра стандартных рекомендаций о количестве переносимых эмбрионов в сторону уменьшения. Мы полагаем, что количество переносимых эмбрионов не должно превышать число эмбрионов, характерное для физиологической беременности. Превышение количества трансплантируемых эмбрионов приводит к патологическому течению беременности и значительному снижению эффективности работы в целом.

Ключевые слова: генетически-модифицированные животные, мыши, козы, трансплантация эмбрионов, патологии беременности

DOI: 10.1134/S047514501806006X

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация эмбрионов является одним из ключевых этапов работы по получению трансгенных мышей и коз с использованием различных способов модификации генома. Однако развитие этой технологии в основном ориентировано на репродуктивные программы у человека или крупных сельскохозяйственных животных. Соответственно, в медицине и ветеринарии приняты стандарты, позволяющие минимизировать риски

выполнения процедуры и обеспечить максимально эффективный результат. Общим принципом технологии для человека (Zander-Fox et al., 2011; Pandian et al., 2013) и крупных сельскохозяйственных животных (Hasler, 2014; Scherzer et al., 2008) является строгий запрет на трансплантацию эмбрионов в количестве больше физиологической нормы. Так для крупного рогатого скота строго ограничивают количество пересаживаемых эмбрионов 1–2. В репродуктивных программах у че-

ловека последние годы все больше склоняются к пересадке одного эмбриона.

В работах по получению трансгенных мышей и коз на сегодняшний день нет четких методических указаний о количестве пересаживаемых эмбрионов, а соответственно нет общепринятого понимания о максимально эффективной практике. В различных методических руководствах рекомендуется разное количество пересаживаемых эмбрионов: 40 (по 20 в каждый рог матки) (Voncken, 2011), 30–60 (15–30 в каждый рог матки) (Ittner, Götz, 2007), 30–40 (15–20 в каждый рог матки) (Cho et al., 2009), 20–30 (10–15 в каждый рог матки) (Damert, Kusserow, 2003), 30 (15 в каждый рог матки) (Kadulin et al., 2006). В статьях, посвященных созданию трансгенных животных, сообщается о пересадке 20 (Rodriguez et al., 1995), 28 (Niavarani et al., 2005), 28 (Lisauskas et al., 2008), 25 (Hansson et al., 1994) эмбрионов у мышей и 5–6 (AmiriYekta et al., 2013), 3.8 (Zhang et al., 2008), 6.2 (Baldassarre et al., 2003), 6.6 (Batista et al., 2014; Freitas et al., 2012), 2.4 (Yu et al., 2012, 2013) эмбрионов у коз. Таким образом, во всех работах рекомендуется пересаживать количество эмбрионов, значительно превышающее число эмбрионов, развивающихся при физиологической беременности у животных обоих видов. Так, физиологической нормой для домашней мыши (*Mus musculus*) является 2–10 детенышей в помете, обычно 5–6 (Sokolov, 1989), а для коз (*Capra hircus*) – 1–2, реже 3 козлят в помете (Sokolov, 1989).

Целью данной работы была систематизация и анализ результатов, полученных при работах по трансплантации эмбрионов коз и мышей при реализации проектов по получению трансгенных животных и определение оптимального количества эмбрионов для получения максимально эффективного результата работы в целом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и условия их содержания. В работе использованы мыши гибридной линии F1(СВАХС57ВL/6) (питомник “Столбовая”). В процессе экспериментальной работы мышей содержат в виварии ЦКП ИБГ РАН. Виварий оснащен аппаратурой, позволяющей контролировать температуру воздуха, регулировать световой цикл (12/12) и осуществлять приточно-вытяжную вентиляцию. Мышей содержат в условиях постоянного доступа к воде и корму (вода из централизованного источника водоснабжения, комбикорм – полноценный экструдированный (ООО “Лабораторкорм”, Россия)). Подстилка в клетках – сухие мелкие древесные опилки

(ООО “Лабораторкорм”, Россия), замена раз в неделю. Клетки и бутылки для воды обрабатывают раз в неделю стерилизующими растворами.

Работы с козами проводили на базе лаборатории воспроизводства, трансплантации эмбрионов и трансгенеза животных на Биотехнологическом научно-экспериментальном производстве по трансгенезу животных (д. Будагово) Минской области РУП “Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству”.

Кормление и содержание коз осуществлялось согласно норм ВАСХНИЛ (1985).

Растворы и среды. Для вымывания яйцеклеток мыши использовали среду M2 (Sigma-Aldrich, США), для вымывания яйцеклеток коз использовали среды BWWH-5 или Herpes-KSOM или среду DPBS с добавлением 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Для культивирования яйцеклеток мышей использовали среду M16 (Sigma-Aldrich, США), для культивирования яйцеклеток коз использовали среду BWW-5 или KSOM или Bovihold (Minitube, Германия). Культивирование проводили под минеральным маслом (Sigma, США).

Наркоз. Для обездвиживания и обезболивания мышей использовали авертин, представляющий собой 2.5% водный раствор 1 г 2,2,2-трибромэтанола (Aldrich, USA) в 1 мл 2-метил-2-бутанола (Sigma-Aldrich, USA). Авертин вводили внутрибрюшинно из расчета 15 мкл на 1 г веса животного. В ряде экспериментов для обездвиживания и обезболивания животных использовали наркоз, представляющий собой смесь препаратов “Золетил 100” (VIRBAC, Франция) и “Рометар 20 мг/мл” (Bioveta, a. s., Чешская республика). Для приготовления смеси 0.5 мл “Золетил 100” смешивали с 0.25 мл “Рометар 20 мг/мл” и доводили физиологическим раствором до общего объема 10 мл. Смесь золетил-рометар также вводили внутрибрюшинно из расчета 6 мкл на 1 г веса животного.

Для анестезии коз за 1–1.5 ч до операции им инъецировались наркотические средства с применением раствора ксилазина (Xyla) из расчета 0.15 мл/кг живой массы. Перед введением ксилазина премедикация животного осуществлялась одним из следующих препаратов: 1%-ный раствор атропина сульфата (подкожно), или 2.5%-ный раствор амиазина в дозе 1 мл на 25 кг массы животного. Отмечались начало потери чувствительности (при покалывании в различных участках тела животного) и расслабление мускулатуры (животное ложится).

Таблица 1. Результаты эксперимента по трансплантации микроинъецированных эмбрионов

Пересажено клеток	Использовано реципиентов	Беременных реципиентов	Имплантировавшихся эмбрионов к концу 2/3 беременности	Получено детенышей
		Мыши		
12479	1106	307 (28%)	Н/д	713 (н/д)
		Козы		
281	113	32 (28%)	37 (46%**)	33 (89%***)

** % от числа яйцеклеток, пересаженных беременным реципиентам.

*** % от имплантировавшихся эмбрионов.

Протоколы индукции полиовуляции, получения оплодотворенных яйцеклеток на стадии пронуклеусов у мышей и коз, процедуры подготовки вазэктомированных самцов животных-реципиентов были опубликованы нами ранее (Zvezdova et al., 2010; Goldman et al., 2012).

Проведение микроинъекций. Микроинъекции проводили в среде HEPES-KSOM под микроскопом Zeiss Axiovert 200M при увеличении 400×–600×, используя микроманипуляторы Narishige. Для изготовления игл для микроинъекций использовали пуллер Sutter instrument Co P-97 (USA), для изготовления удерживающей пипетки использовали пуллер Narishige PC-10 и микрокузницу Narishige MF-900. Концентрация генетических конструкций 1 нг/мкл.

Трансплантация яйцеклеток в яйцевод псевдобеременного реципиента. Операция трансплантации микроинъецированных зигот псевдобеременным реципиентам была описана нами ранее (Zvezdova et al., 2010; Goldman et al., 2012). Операцию проводили на правом и левом яйцеводах.

Пересадку эмбрионов козам осуществляли хирургическим методом через 24–48 часов после микроинъекции рекомбинантной ДНК или для интактных эмбрионов на седьмой день после выявления коз-реципиентов в охоте.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, где проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы провели анализ эффективности трансплантации эмбрионов в работах по получению трансгенных животных на примере 1106 мышей-реципиентов и 113 коз-реципиентов (Gursky et al., 2009; Deykin et al., 2009; Zvezdova et al., 2010; Goldman et al., 2012; Shelkovnikova et al., 2013; Silaeva

et al., 2013, 2014; Deikin et al., 2014; Robinson et al., 2015; Gurskiy et al., 2016), всего было пересажено 12479 эмбриона мыши и 281 эмбрион коз. Беременность наступила у 28% использованных реципиентов. В процессе работы родилось 713 мышат и 33 козленка. Общие данные по объему работ представлены в табл. 1. Мы полагаем, что объем данных, полученных в ходе экспериментов, достаточен для проведения статистического анализа эффективности трансплантации у коз и мышей.

Определение оптимального количества эмбрионов для трансплантации. Для определения оптимального количества эмбрионов для трансплантации введен коэффициент эффективности, рассчитанный как количество родившихся детенышей/количество пересаженных эмбрионов. В формуле расчета коэффициента эффективности не учтено количество использованных реципиентов, поскольку наиболее трудоемкими и критичными этапами работы являются получение микроинъецированных яйцеклеток и их пересадка псевдобеременным реципиентам. В то же время подготовка псевдобеременных реципиентов значительно менее сложна, и их количество легко может быть увеличено за счет увеличения популяции экспериментальных животных. При расчете эффективности трансплантации из выборки были исключены животные, у которых беременность не наступила, поскольку в этом случае отсутствие беременности может быть обусловлено состоянием реципиента.

На рис. 1 и 2 представлены графики изменения коэффициента эффективности трансплантации с ростом числа пересаженных эмбрионов. Как видно из рис. 1, максимальная эффективность трансплантации у мышей достигается при переносе небольшого числа яйцеклеток – не более 11 одному реципиенту (что соответствует физиологической норме количества развивающихся эмбрионов для вида *Mus musculus* (Sokolov, 1989). Дальнейшее увеличение количества переносимых яйцеклеток

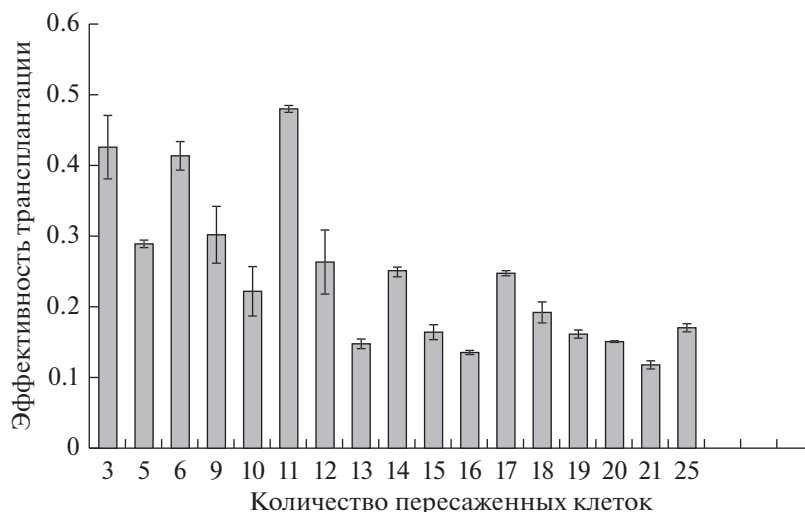


Рис. 1. Зависимость эффективности трансплантации от числа пересаженных эмбрионов у мышей.

не приводит к увеличению коэффициента эффективности, более того, при значительном увеличении количества переносимых эмбрионов (более 20 яйцеклеток одному реципиенту) происходит падение коэффициента эффективности трансплантации. Таким образом, при пересадке близкого к физиологическому количеству эмбрионов коэффициент эффективности превышает 30% и достоверно отличается от такового при превышении физиологической нормы в 2 раза и более. По всей видимости, это означает, что количество рожденных мышат после трансплантации микроинъецированных яйцеклеток определяется не только жизнеспособностью самих яйцеклеток, но и способностью материнского организма выносить определенное число плодов. Полученные нами результаты свидетельствуют о

том, что пересадка числа микроинъецированных яйцеклеток, значительно превосходящего физиологическую норму для мышей, приводит к необоснованным потерям эмбрионов на ранних стадиях развития.

Похожие результаты мы получили в экспериментах по пересадке микроинъецированных зигот козам-реципиентам (рис. 2): эффективность трансплантации не отличается в случае пересадки 2 и 3 микроинъецированных яйцеклеток и значительно снижается при двукратном увеличении числа переносимых яйцеклеток по сравнению с физиологической нормой для данного вида (Sokolov, 1989).

Исследование влияния увеличения числа переносимых эмбрионов на протекание беременности. Ввиду возможной токсичности генетических

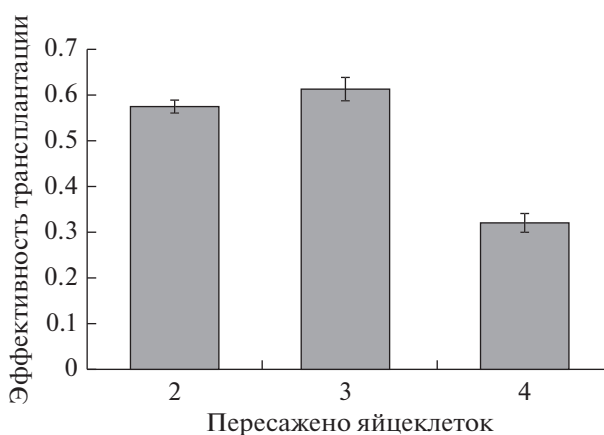


Рис. 2. Зависимость эффективности трансплантации от числа пересаженных эмбрионов у коз. Значения среднего коэффициента эффективности пересадки при пересадке 2–3 эмбрионов достоверно выше такового для 4 эмбрионов ($p = 0.05$).

Таблица 2. Результаты контрольного эксперимента по трансплантации интактных эмбрионов

Пересажено клеток	Использовано реципиентов*	Беременных реципиентов к концу 2/3 беременности	Имплантировавшихся эмбрионов к концу 2/3 беременности	Живых эмбрионов к концу 2/3 беременности
Мыши				
110	11	7 (63%)	53 (76%**)	34 (63%***)
Козы				
84	42	24 (57.1%)	34 (70.8%**)	30 (88.2%***)

* трансплантация в 1 рог матки по 10 зигот у мышей и в 1 рог матки по 2 зиготы у коз.

** % от числа яйцеклеток, пересаженных беременным реципиентам.

*** % от имплантировавшихся эмбрионов.

конструкций возникает вопрос о необходимости увеличения числа эмбрионов из-за их возможной гибели в результате неудачной модификации генома. Для того, чтобы исследовать влияние увеличения числа эмбрионов на протекание беременности, был проведен контрольный эксперимент по трансплантации. В ходе этого эксперимента псевдобеременным реципиентам переносили по 10 интактных оплодотворенных яйцеклеток в каждый рог матки (т.е. количество, двукратно превышающее физиологическую норму для вида *Mus musculus*). Мышей вскрывали на 14 день после переноса и определяли относительное количество имплантировавшихся эмбрионов. Результаты контрольного эксперимента приведены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что при пересадке в один рог матки эмбрионов с двукратным превышением количества по отношению к физиологической норме к 14 дню беременности у мыши фиксируется высокий уровень имплантации эмбрионов, в среднем, 76% от пересаженных мыши эмбрионов, и высокий уровень эмбриональной гибели, так что живыми к 14 дню оказывается только 63% от имплантировавшихся эмбрионов, что соответствует физиологической норме и составляет в среднем 4.8 эмбриона на рог матки. При этом беременность проходит на фоне большого числа разлагающихся плодов, это приводит к тому, что значительная часть беременностей заканчивается абортми.

В табл. 2 представлены также данные аналогичного эксперимента, проведенного на козах. Оказалось, что при увеличении числа переносимых эмбрионов в два раза по сравнению с физиологической нормой для данного вида животных наблюдается гибель части эмбрионов и рождение козлят в соответствии с физиологической нормой 1.25 козленка на козление.

Таким образом, полученные в ходе контрольного эксперимента результаты опровергают теорию

о необходимости увеличения числа переносимых эмбрионов ввиду возможной токсичности генетической конструкции (Hansson et al., 1994; Rodriguez et al., 1995; Baldassarre et al., 2003; Niavarani et al., 2005; Lisauskas et al., 2008; Zhang et al., 2008; Freitas et al., 2012; Yu et al., 2012, 2013; AmiriYekta et al., 2013; Batista et al., 2014), поскольку “лишние” эмбрионы погибают после середины беременности, и увеличение числа пересаженных эмбрионов не приводит к увеличению числа рожденных животных. Кроме того, результаты, полученные в ходе контрольного эксперимента, полностью согласуются с результатами, полученными в ходе экспериментов по трансплантации микроинъектированных яйцеклеток: увеличение числа переносимых яйцеклеток не приводит к увеличению эффективности трансплантации и рождению большего числа детенышей, а, наоборот, снижает эффективность работы. Основываясь на полученных результатах, мы полагаем, что при работе с токсичными генетическими конструкциями необходимо снижать количество переносимых яйцеклеток по сравнению с физиологической нормой, чтобы максимально уменьшить соотношение между погибшими и живыми эмбрионами, и тем самым увеличить шансы выживших эмбрионов на полноценное развитие.

Таким образом, вне зависимости от видовых особенностей реципиента, в работах по трансплантации эмбрионов при получении трансгенных животных необходимо ориентироваться на физиологическую норму по количеству детенышей/имплантирующихся эмбрионов. Также необходимо учитывать, что для коз такой нормой является 1.3 козленка на козление, у мышей же при первых родах у гибридной линии C57BL6xCBA рождается 4–6 детенышей. Среднее количество мышат около 10 голов можно получить от самок линии CD1 при повторных родах и далее.

Трансплантация большего, чем физиологическая норма, количества эмбрионов приводит к абортам на фоне большого числа имплантированных эмбрионов. Рассчитывая эффективность работ по получению генетически-модифицированных животных, необходимо учитывать, что стадия микроинъекции является максимально травматичной для будущего организма. Получение яйцеклеток, их генетическая модификация, культивирование – самые затратные стадии работы, требующие привлечения высокотехнологического оборудования, специалистов и занимающие больше всего рабочего времени (Maksimenko et al., 2013). Трансплантация – более утилитарный процесс, хорошо отработанный при решении задач репродукции в медицинской и ветеринарной практике, в данном случае резко снижает эффективность работы в целом ввиду необоснованного завышения количества пересаживаемых эмбрионов. Мы полагаем, что использование физиологических количеств пересаживаемых эмбрионов (1 на рог матки у коз и 3–5 на рог матки у мышей) позволит избежать патологий беременности и повысить выход детенышей от числа пересаженных зигот, а, значит, и количества генетически-модифицированных первичных трансгенных животных, получаемых в рамках одной серии экспериментов. Как и в случае реализации репродуктивных программ у человека и сельскохозяйственных животных, особое внимание должно быть уделено качеству пересаживаемых эмбрионов и индивидуальному подходу к работе с ними. Пересадка заведомо нежизнеспособных эмбрионов только искажит статистику, а искусственное создание конкуренции между жизнеспособными эмбрионами повысит риск патологий беременности и абортов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-14-00150 (проведена трансплантация 2470 эмбрионов мыши 269 реципиентам, получено 277 детенышей. Проведена систематизация результатов работ по трансплантации и их статистическая обработка).

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИБГ РАН.

Авторы выражают благодарность А.И. Будевичу и И.Л. Гольдману за неоценимую помощь в освоении технологии создания генетически-модифицированных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amiri Yekta A., Dalman A., Eftekhari-Yazdi P. et al.* Production of transgenic goats expressing human coagulation factor IX in the mammary glands after nuclear transfer using transfected fetal fibroblast cells // *Transgenic Res.* 2013. V. 22(1). P. 131–142.
- Baldassarre H., Wang B., Kafidi N. et al.* Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy // *Theriogenology*, 2003. V. 59(3–4). P. 831–839.
- Batista R., Melo C., Souza-Fabjan J., Teixeira D. et al.* Phenotypic features of first-generation transgenic goats for human granulocyte-colony stimulation factor production in milk // *Biotechnol. Lett.* 2014. V. 36(11). P. 2155–2162.
- Cho A., Haruyama N., Kulkarni A.* Generation of Transgenic Mice. *Current Protocols in Cell Biology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. Inc., 2009.
- Damert A., Kusserow H.* Generation of Transgenic Mice by Pronuclear Injection // *Blood-Brain Barrier*. New Jersey: Humana Press, 2003. P. 513–528.
- Deïkin A.V., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov R.K. et al.* A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein // *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S.S. Korsakova*. 2014. V. 114(8). P. 62–69.
- Deykin A.V., Ermolkevich T.G., Gurskiy Y.G. et al.* The state of health and the reproductive potential of transgenic mice secreting recombinant human lactoferrin in milk // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. MAIK Nauka/Interperiodica, 2009. P. 195–198.
- Freitas V., Serova I., Moura R. et al.* The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression // *Small Rumin Res.* 2012. V. 105(1–3). P. 105–113.
- Goldman I., Georgieva S., Gurskiy Y. et al.* Production of human lactoferrin in animal milk // *Biochem. Cell Biol.* 2012. V. 90(3). P. 513–519.
- Goldman I., Georgieva S., Gurskiy Y. et al.* New opportunities of using transgenic milk animals for pharmaceutical human protein production // *Transgenic Res.* 2012. V. 21(4). P. 923.
- Gurskiy Y., Garbuz D., Soshnikova N. et al.* The development of modified human Hsp70 (HSPA1A) and its production in the milk of transgenic mice // *Cell Stress Chaperones*. 2016. V. 21(6). P. 1055–1064.
- Gurskiy Y., Bibilashvili R., Minashkin M. et al.* Expression of full-length human pro-urokinase in mammary glands of transgenic mice // *Transgenic Res.* 2009. V. 18(5). P. 747–756.
- Hansson L., Edlund M., Edlund A. et al.* Expression and characterization of biologically active human extracellular superoxide dismutase in milk of transgenic mice // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269(7). P. 5358–5363.
- Hasler J.* Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the

- industry in North America, and personal reminisces // *Theriogenology*. 2014. V. 81(1). P. 152–169.
- Ittner L., Götz J.* Pronuclear injection for the production of transgenic mice // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2(5). P. 1206–1215.
- Kadulin S., Ermolkevich T., Andreeva L.* Analysis of transfer of microinjected zygotes in production of transgenic mice // *Ontogenez*. 2006. V. 37(2). P. 109–114.
- Lisauskas S., Cunha N., Vianna G. et al.* Expression of functional recombinant human factor IX in milk of mice // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30(12). P. 2063–2069.
- Maksimenko O.G., Deykin A.V., Khodarovich Y.M. et al.* Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems // *Acta Naturae*. 2013. V. 5(1). P. 33–46.
- Niavarani A., Dehghanizadeh S., Zeinali S. et al.* Development of transgenic mice expressing calcitonin as a beta-lactoglobulin fusion protein in mammary gland // *Transgenic Res.* 2005. V. 14(5). P. 719–727.
- Pandian Z., Marjoribanks J., Ozturk O. et al.* Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. Ltd., 2013. 75 p.
- Robinson H.K., Deykin A.V., Bronovitsky E.V. et al.* Early lethality and neuronal proteinopathy in mice expressing cytoplasm-targeted FUS that lacks the RNA recognition motif // *Amyotroph. Lateral. Scler. Front. Degener.* 2015. V. 16(5–6). P. 402–409.
- Rodriguez A., Castro F.O., Aguilar A. et al.* Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits // *Biol. Res.* 1995. V. 28(2). P. 141–153.
- Scherzer J., Fayrer-Hosken R., Ray L. et al.* Advancements in Large Animal Embryo Transfer and Related Biotechnologies // *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V. 43(3). P. 371–376.
- Shelkovnikova T.A., Peters O.M., Deykin A.V. et al.* Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288(35). P. 25266–25274.
- Silaeva Y.Y., Grinenko T.S., Vagida M.S. et al.* Immune selection of tumor cells in TCR β -chain transgenic mice // *J. Immunotoxicol.* 2014. V. 11(4). P. 393–399.
- Silaeva Y.Y., Kalinina A.A., Vagida M.S. et al.* Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β -chain expression // *BiochemMosc.* 2013. V. 78(5). P. 549–559.
- Sokolov V.E.* *Zhizn zhivotnykh. T. 7.* Moskva: Prosveshchenie, 1989.
- Voncken J.W.* *Genetic Modification of the Mouse: General Technology – Pronuclear and Blastocyst Injection // Transgenic Mouse Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press, 2011. P. 11–36.
- Yu H., Chen J., Liu S. et al.* Large-scale production of functional human lysozyme in transgenic cloned goats // *J. Biotechnol.* 2013. V. 168(4). P. 676–683.
- Yu H., Chen J., Sun W. et al.* The dominant expression of functional human lactoferrin in transgenic cloned goats using a hybrid lactoferrin expression construct // *J. Biotechnol.* 2012. V. 161(3). P. 198–205.
- Zander-Fox D.L., Tremellen K., Lane M.* Single blastocyst embryo transfer maintains comparable pregnancy rates to double cleavage-stage embryo transfer but results in healthier pregnancy outcomes: The benefits of single blastocyst transfer // *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 2011. V. 51(5). P. 406–410.
- Zhang J., Li L., Cai Y. et al.* Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats // *Protein Expr. Purif.* 2008. V. 57(2). P. 127–135.
- Zvezdova E.S., Silaeva Y.Y., Vagida M.S. et al.* Generation of transgenic animals expressing the [alpha] and [beta] chains of the autoreactive T-cell receptor // *Mol. Biol.* 2010. V. 44(2). P. 277.

Optimal Number of Embryos for Transplantation in Obtaining Genetic-Modified Mice and Goats

Yu. Yu. Silaeva¹, Yu. K. Kirikovich³, L. N. Skuratovskaya², and A. V. Deikin^{1, 2, *}

¹Gene Biology Institute, Russian Academy of Sciences, Vavilova Str., 34/5, Moscow, 119334 Russia

²Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya st., 8, Moscow, 125315 Russia

³Scientific and Practical Center for Animal Breeding, Frunze str., 11, Zhodino, 222160 Republic of Belarus

*e-mail: deikin@igb.ac.ru

The technology of creating genetically modified animals (placental mammals) by microinjection into the pronucleus of a fertilized egg suggests, as one of the key stages, the transplantation of early embryos into female recipients. However, there is a wide range of opinions among researchers about the optimal number of embryos to be transferred to the female recipient. Thus, data on transplantation of 20–60 mouse embryos and

from 2 to 6 goat embryos to one recipient are given in the methodological literature and experimental articles devoted to the method of creating genetically modified animals. Thus, the standard recommendation is the transfer of a much larger number of embryos than that which develops in animals of both species in physiological pregnancy. At the same time, technology of transplantation of bovine embryos (cattle) involves the transfer of one embryo, which is the physiological norm for this species of animals. Clinical protocols of assisted reproductive technologies for the transplantation of human embryos also recommend the transfer of one embryo, because transferring the number of embryos greater than in physiological pregnancy leads to increased risks. In our work, we analyze the results of experiments on obtaining genetically modified mice and goats and provide data indicating the need to revise the standard recommendations on the number of transferred embryos downward. We believe that the number of transferred embryos should not exceed the number of embryos characteristic for physiological pregnancy. Excess of the number of transplanted embryos leads to a pathological course of pregnancy and a significant decrease in overall performance.

Keywords: genetically modified animals, mice, goats, embryo transplantation, pregnancy pathology