

УДК 57.084.1

## КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КАК ПОДХОД К СОХРАНЕНИЮ УНИКАЛЬНЫХ ЛИНИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2022 г. М. А. Филатов<sup>1, \*</sup>, Ю. Д. Окулова<sup>1</sup>, Р. А. Шафей<sup>2</sup>, Д. С. Коршунова<sup>1</sup>, Ю. Ю. Силаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: maxfilat@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.09.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 25.09.2022 г.

В настоящей статье рассмотрен опыт создания криобанка для хранения генетически модифицированных линий мышей. Показано, что частота наступления стадии бластоцисты в группах эмбрионов после процедур криоконсервации и размораживания, эмбрионов, обработанных растворами для витрификации и ревитрификации, но не подвергнутых процедуре криоконсервации, и интактных статистически значимо не различаются ( $p > 0.05$ ). Более того, статистически значимые различия в эффективности переноса эмбрионов псевдобеременным самкам интактных или криоконсервированных эмбрионов дикого типа, а также криоконсервированных эмбрионов дикого типа или криоконсервированных трансгенных эмбрионов отсутствуют ( $p > 0.05$ ). В статье рассмотрены основные сложности, возникающие при организации депозитария и возможные пути их решения.

**Ключевые слова:** криоконсервация, мышь, эмбрионы

**DOI:** 10.56304/S0234275822060072

### ВВЕДЕНИЕ

Создание линий генетически-модифицированных животных является одним из современных инструментов проведения биологических исследований [1, 2]. Применение подобных животных позволяет воспроизводить многие характерные для человека заболевания, что дает возможность осуществлять поиск терапевтических подходов для их лечения [3–6]. Кроме того, создание генетически модифицированных животных крайне актуально с точки зрения фундаментальной науки, так как позволяет детально изучить различные процессы (в том числе на молекулярном уровне), происходящие в клетках живых организмов.

Получение генетически-модифицированных животных — это длительная и кропотливая работа [7–9]. Так, например, в случае мыши, для получения первичного трансгена нужно потратить не менее двух–трех месяцев. Работа включает в себя следующие этапы: создание генетической конструкции (сроки зависят от сложности задачи), гормональная подготовка мышей — доноров яйцеклеток (порядка 4 дней), микроинъекции гене-

тической конструкции, пересадка микроинъектированных эмбрионов, ожидание рождения модифицированных животных поколения  $F_0$  (21 день — именно столько длится беременность у мыши). Однако необходимо понимать, что добиться столь быстрого получения животных с модифицированным геномом удается нечасто, поскольку существует множество причин, по которым процедура получения генетически модифицированных животных может обернуться неудачей: полученные трансгенные эмбрионы могут по какой-либо причине погибнуть и не имплантироваться, генетическое редактирование может пройти неуспешно и т.д. В большинстве случаев получить первичного трансгена удается в течение 3–4 месяцев (<https://www.criver.com/products-services/research-models-services/genetically-engineered-model-services/transgenic-mouse-rat-model-creation/transgenic-mice?region=3696>).

Большинство существующих методов геномного редактирования основаны на генетическом редактировании эмбриона, из которого потом разовьется генетически модифицированный живой организм. Однако, как правило, рождающиеся в результате подобных манипуляций трансгенные животные являются химерными, то есть содержат две (или более) различных субпопуляций клеток,

*Список сокращений:* ГСЖК — гонадотропин сыворотки жеребых кобыл, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, МЕ — международные единицы.

часть из которых является генетически модифицированными, а другая нет. Проводить полноценные научные исследования на подобных животных не представляется возможным ввиду гетерогенности их клеточного состава, таким образом, необходимо получить следующее поколение животных, которые были бы генетически однородными. Кроме того, при получении трансгенов методом случайного встраивания необходим этап проверки уровня экспрессии трансгена у животных поколения  $F_1$  (а в ряде случаев – у животных следующих поколений, если есть данные, свидетельствующие о возможной потере экспрессии трансгена в ряду поколений) [10]. На это также требуется дополнительное время. Более того, для проведения научных исследований в большинстве случаев требуется значительная группа животных. Учитывая все вышесказанное, в среднем для получения линии трансгенных животных требуется от года до двух лет.

Как правило, трансгенных животных получают для решения какой-либо конкретной задачи. Во многих случаях исследование расширяется, и тогда животные могут быть использованы для проведения дополнительных экспериментов. Однако в других случаях после проведения запланированных экспериментов линия животных оказывается в текущий момент ненужной, хотя в будущем эксперименты на этой линии могут потенциально возобновиться. Содержать длительное время такую линию животных довольно накладно с финансовой точки зрения: животных требуется кормить, убирать за ними, а также они занимают мощности вивария, что делает невозможным проведение каких-либо иных актуальных исследований. В то же время, если такую линию животных ликвидировать, а она спустя некоторое время все же понадобится, то по ее восстановлению придется заново проводить длительную (и дорогостоящую!) работу. Возможным выходом в подобной ситуации является создание криобанка то есть, получение от генетически модифицированных животных эмбрионов и последующая их криоконсервация [11]. В случае необходимости производят разморозку криоконсервированных эмбрионов и осуществляют их пересадку реципиенту – суррогатной матери. Это в конечном счете позволяет не тратить средства, мощности вивария на поддержание линии животных, и сохранять линию трансгенных животных в течение длительного времени.

Одним из возможных путей криоконсервации эмбрионов является витрификация – сверхбыстрое замораживание. Ключевым вопросом, определяющим возможность использовать этот метод как способ депонирования ценных линий живот-

ных, является вопрос о количестве эмбрионов, которое необходимо витрифицировать, чтобы иметь гарантированную возможность восстановления линии. Причем эта возможность связана не только и не столько с человеческим фактором (качество заморозки и переноса эмбрионов), но и с возможными эпигенетическими эффектами процедуры витрификации [12, 13]. Ранее было показано, что в зависимости от линии криоконсервируемых эмбрионов среди домашней мыши рождение мышат наблюдается в 11–53% случаев (от числа пересаженных эмбрионов) [14].

Целью данной работы являлась оценка влияния витрификации на развитие эмбрионов на предимплантационных стадиях (при культивировании *in vitro*) и после переноса реципиентам, а также разработка протокола витрификации линий генетически модифицированных животных, обеспечивающего сохранность эмбрионов и гарантирующего восстановление линии.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### *Содержание животных*

В ходе настоящей работы использовали мышей линии C57Bl/6J, CD1, гибридов первого поколения CBA x C57Bl/6J, а также трансгенных животных, полученных на бэкграунде линии C57Bl/6J. Животных содержали при световом режиме – 14 ч света и 10 ч темноты и температуре, поддерживаемой в диапазоне 22–24°C. Воду и питание (специализированный экструдированный комбикорм для разведения мышей) животные получали *ad libitum*.

Все манипуляции с животными производили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН.

### *Получение вазэктомированных самцов*

Получение вазэктомированных самцов осуществляли согласно общеизвестной методике [15] с использованием самцов линии CD1. Животным в возрасте 2–3 месяцев (масса ~25 г) вводили внутривенно в качестве наркоза смесь препаратов Ксила (действующее в-во Ксилазина гидрохлорид) (Interchemie, Нидерланды) в дозировке 2 мг/кг и Золетил (действующее в-во Тилетамин/Золазепам) (Virbak, Франция) в дозировке 20 мг/кг. Затем осуществляли продольный разрез длиной примерно 1 см кожи и брюшины на 1 см выше пениса с брюшной стороны. С помощью пинцета, удерживая жировые отложения, извлекали яичко с придатком и *vas deferens*, после чего с помощью раскаленного на горелке пинцета производили пережигание семявыносящего канальца. Затем помещали яичко, придаток яичка и *vas deferens* под брюшину, после

чего повторяли вышеописанную процедуру со вторым семявыносящим протоком. После выполнения данных манипуляций послойно ушивали область разреза с помощью саморассасывающихся хирургических нитей 3D-0,5\*16-(4/0)-PGA (“Медтехника”, Россия). Спустя 2 недели после проведения манипуляции и полного восстановления самцов после операции их использовали для получения псевдобеременных самок.

#### *Гормональная стимуляция овуляции*

Для повышения результативности процедур по криоконсервации и разморозки с последующей пересадкой эмбрионов необходимо использовать их большое количество. Этого можно добиться, осуществляя гормональную стимуляцию самок – доноров зигот. В качестве доноров использовали неполовозрелых самок весом 10–12 г в возрасте около 3 недель. Гормональную стимуляцию осуществляли в соответствии с двухступенчатым протоколом: в 13:00 первого дня внутрибрюшинно вводили ГСЖК (препарат Фоллимаг, “Мосагроген”, Россия) из расчета 5 МЕ на одно животное, через 48 ч внутрибрюшинно вводили ХГЧ (препарат Хорулон, Merck Animal Health, США) из расчета 10 МЕ на одно животное, после чего ссаживали данных самок с самцами для спаривания.

#### *Получение эмбрионов*

Выделение эмбрионов производили на стадии зиготы (E0,5), после чего осуществляли их культивирование *in vitro*. Для получения эмбрионов самок умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Затем выделяли яйцеводы, которые помещали в среду Ооклин (“ПанЭко”, Россия), где отсепаарировали жировую ткань с помощью игл от шприцов и пинцетов. Очищенные яйцеводы переносили в чистую каплю среды Ооклин объемом 100 мкл, где с помощью игл от шприцов вскрывали ампулярную часть яйцевода, что позволяло получить ооцит-кумулясные комплексы. Затем в данную каплю вносили примерно 0.03 г гиалуронидазы (препарат лидаза. АО НПО “Микроген”, Россия) для очистки зигот от клеток кумулюса. Полученные зиготы последовательно отмывали в четырех каплях среды Ооклин, после чего переносили в среду для культивирования.

#### *Криоконсервация и размораживание эмбрионов*

Криоконсервацию и размораживание эмбрионов осуществляли с помощью коммерческих наборов Z-VIT (для витрификации) и Z-REV (для размораживания) в соответствии с рекомендация-

ми производителя (ЗАО “Протеинсинтез”, Россия). Эмбрионы на стадии морулы последовательно помещали в растворы №№ 1, 2 и 3 для криоконсервации со временем инкубации 5, 5 и 0.5 мин соответственно. Инкубацию производили в каплях объемом 200 мкл одновременно группами по 10 эмбрионов. После чего эмбрионы помещали на носитель закрытого типа (крио-соломину) для замораживания и хранения в жидком азоте (Minutube, Германия), защитный колпачок на носитель надевали непосредственно в жидком азоте. Хранение эмбрионов при температуре –196°С осуществляли не менее 2 дней.

Для размораживания образцы с эмбрионами изымали из жидкого азота, снимали защитный колпачок с носителя и помещали носитель с эмбрионами в каплю объемом 400 мкл раствора № 1 для размораживания, при этом данная капля имела продолговатую форму, чтобы обеспечить полное погружение части носителя для криоконсервации, несущей эмбрионы, в раствор. Затем эмбрионы отбирали и последовательно переносили в растворы для размораживания №№ 2, 3 и 4, инкубируя в них 1, 2, 3 и 4 мин соответственно. Объем капель растворов №№ 2, 3 и 4, составлял 200 мкл. Далее эмбрионы помещали в отмывочную среду (Ооклин, ПанЭко) на 5 мин, после чего производили их перенос в среду для культивирования или суррогатной матери.

#### *Воздействие криопротекторных растворов на эмбрионы*

Для анализа воздействия криопротекторных растворов на эмбрионы их инкубировали в растворах для витрификации и ревитрификации в соответствии с методикой, описанной выше, без помещения в жидкий азот.

#### *Культивирование эмбрионов*

Культивирование эмбрионов до стадии морулы (примерно 2.5 дня эмбрионального развития, E2.5) осуществляли в четырехлуночных планшетах (Termo Scientific Nunc, США), использовали среду для культивирования гамет и эмбрионов (Fujifilm Irvine Scientific, США). От стадии морулы до стадии бластоцисты (E3.5) эмбрионы культивировали в покрытых минеральным маслом (Origio, Дания) каплях среды объемом 20 мкл по 2–3 эмбриона в капле.

#### *Перенос эмбрионов*

Перенос эмбрионов реципиентам осуществляли в соответствии с общеизвестной методикой [16]. Псевдобеременным самкам линий CD1 или

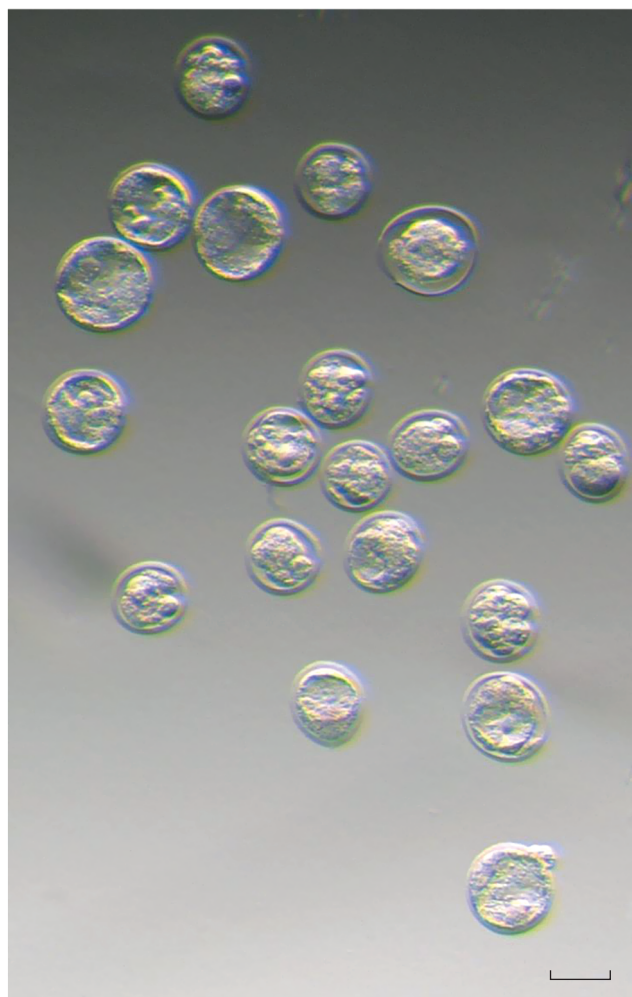
F1 СВА × С57В1/6J в возрасте 2–3 мес (масса ~25 г) вводили внутривентрально в качестве наркоза смесь препаратов Ксила (Interchemie), в дозировке 2 мг/кг и Золетил (Virbak) в дозировке 20 мг/кг. Затем производили разрез кожи и брюшины со спинной стороны примерно на 0.5 см краниальнее бедра, после чего извлекали за жировую капсулу яичник с яйцеводом и маткой. С помощью пинцета раскрывали капсулу яичника и, пользуясь стеклянным капилляром, переносили в воронку яйцевода эмбрионы на стадии морулы. Затем яичник с яйцеводом и маткой помещали внутривентрально. После выполнения данных манипуляций послойно ушивали область разреза с помощью саморассасывающихся хирургических нитей 3D-0.5\*16-(4/0)-PGA (“Медтехника”). Далее аналогичные действия производили со вторым яйцеводом.

#### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Dell, США), Microsoft Excel 2013 (Microsoft corporation, США). С использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилка были проверены гипотезы о нормальности распределений исследуемых показателей. Поскольку анализируемые выборки имели распределения, отличные от нормального, то значимыми показателями служили медиана, квартили (25–75%) и вариация (минимальное и максимальное значения) исследуемой величины. В экспериментах по исследованию приживаемости эмбрионов после пересадки реципиентам для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна–Уитни (U-критерий). Для анализа различий в частоте наступления стадии бластоцисты среди эмбрионов, подвергнутых воздействию растворов для криоконсервации, и интактных эмбрионов были использованы таблицы распределения  $\chi^2$ . Во всех случаях критический уровень значимости ( $p$ ) принимали равным 0.05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования влияния растворов для витрификации и ревитрификации на развитие эмбрионов *in vitro* был проведен эксперимент, в котором эмбрионы на стадии морулы разделили на две группы – контрольную и опытную. Опытную группу помещали последовательно в растворы для витрификации, а затем, минуя стадию помещения в жидкий азот, в растворы для ревитрификации. Эмбрионы контрольной группы не подвергали никаким воздействиям. Эмбрионы обеих



**Рис. 1.** Состояние эмбрионов после инкубации в растворах для витрификации и размораживания спустя сутки культивирования. Измерительный отрезок – 100 мкм.

**Fig. 1.** State of embryos after their incubation in solutions for cryopreservation and revitrification after one day of *in vitro* culture. Scale bar—100  $\mu$ m.

групп культивировали в течение сут, затем подсчитывали количество бластоцист в обеих группах. Эмбрионы спустя сут культивирования после инкубации в растворах для витрификации и ревитрификации (опытная группа) представлены на рис. 1. Отчетливо видны эмбрионы на стадии морулы, а также на стадии бластоцисты.

У криоконсервированных эмбрионов, прошедших затем процедуру размораживания в соответствии со стандартным протоколом, определяли частоту стадии наступления бластоцисты. Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

Установлено отсутствие статистически значимых различий в наступлении различных морфологических стадий раннего эмбриогенеза между группами эмбрионов, обработанных раствора-

**Таблица 1.** Частота наступления стадии бластоцисты среди эмбрионов, подвергнутых воздействию криопротекторных растворов, криоконсервированных и интактных (срок эмбрионального развития соответствует стадии E3.5)  
**Table 1.** Frequency of blastocyst stage occurrence among the embryos subjected to the action of cryoprotective solutions, cryopreserved embryos and intact embryos (stage E3.5 of embryo development)

Стадия развития	Интактные	Обработанные криопротекторами	Криоконсервированные
Бластоцист	29 (78%)	30 (67%)	30 (75%)
Морул	8 (22%)	15 (33%)	10 (25%)
Всего	37	45	40

ми для криопротекторов и интактными, а также между интактными эмбрионами и эмбрионами, подвергнутыми процедуре криоконсервации и размораживания, и между группами эмбрионов, подвергнутых воздействию растворов для криоконсервации и размораживания, и криоконсервированных эмбрионов ( $p > 0.05$ ).

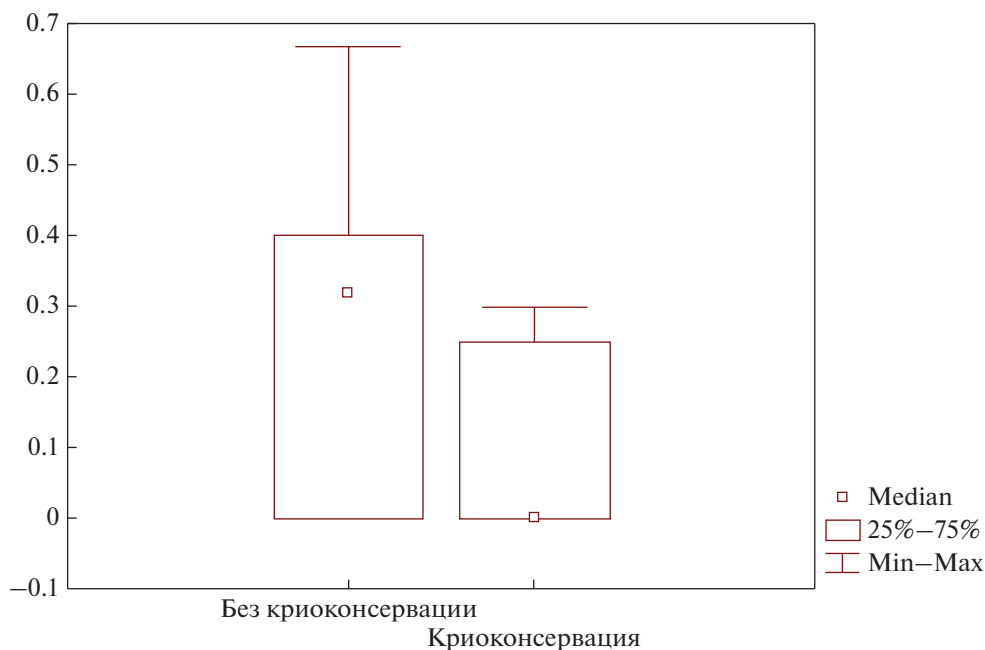
В настоящей работе была исследована эффективность криоконсервации эмбрионов мышей дикого типа, а также трансгенных гетерозиготных животных, полученных в результате скрещивания трансгенных животных с гибридами F<sub>1</sub> C57BL/6J. Для сравнения эффективности пересадки эмбрионов между разными группами использовали коэффициент D – отношение

числа пересаженных мыши эмбрионов к числу рожденных мышат.

Статистически значимые различия в результативности пересадки между эмбрионами, пересаженными после криоконсервации и разморозки, и эмбрионами, не подвергавшимся данным процедурам, отсутствуют (рис. 2).

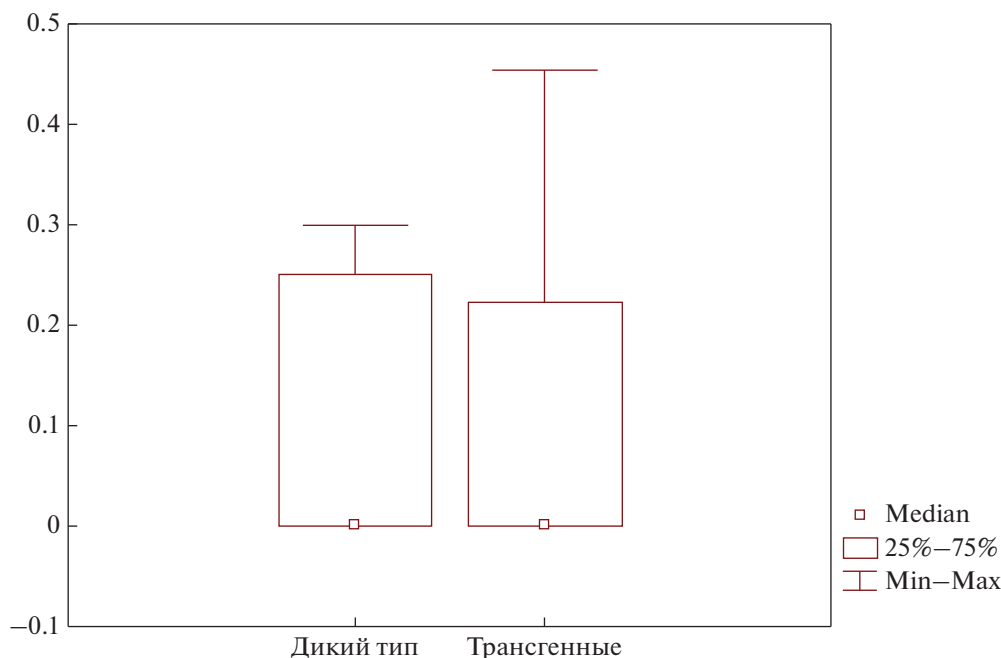
При сравнении пересадок эмбрионов дикого типа и гетерозиготных трансгенных эмбрионов (полученных в результате скрещивания гомозиготного трансгенного самца с самкой дикого типа), статистически значимые различия в результативности пересадки отсутствуют (рис. 3).

Полученные нами данные однозначно свидетельствуют о том, что процедура криоконсервации



**Рис. 2.** Сравнение коэффициента D (по оси ординат) для эмбрионов дикого типа, пересаженных псевдобеременным самкам после культивирования *in vitro* и для эмбрионов дикого типа, культивированных *in vitro* и прошедших процедуру криоконсервации-размораживания на стадии морулы (E2.5). Статистически значимые различия отсутствуют ( $p > 0.11$ ).

**Fig. 2.** Comparison of coefficient D (ratio of transferred embryos to surrogate mother to pups born) for the wild-type embryos transferred to pseudopregnant mice after *in vitro* culture (left bar) and wild-type embryos cultured *in vitro* and frozen-thawed at the morula stage (E2.5) (right bar). No statistically significant differences were found between these two groups ( $p > 0.11$ ).



**Рис. 3.** Сравнение коэффициента D (по оси ординат) для эмбрионов дикого типа, пересаженных псевдобеременным самкам после культивирования *in vitro* и прошедших процедуру криоконсервации-размораживания на стадии морулы (E2.5) и эмбрионов, полученных от трансгенных самцов в результате спаривания с самкой дикого типа, также прошедших процедуру криоконсервации-размораживания на стадии морулы (E2.5). Статистически значимые различия отсутствуют ( $p > 0.8$ ).

**Fig. 3.** Comparison of coefficient D (ratio of transferred embryos to surrogate mother to pups born) for the wild-type embryos cultured *in vitro* and frozen-thawed at the morula stage (E2.5) (left bar) and embryos obtained from wild-type females copulated with transgenic males which also were frozen-thawed at the morula stage (E2.5) (right bar). No statistically significant differences were found between these two groups ( $p > 0.8$ ).

не влияет на развитие эмбриона на доимплантационных стадиях, однако для успешного восстановления линии животных необходимо, чтобы эмбрионы, подвергнутые криоконсервации, успешно имплантировались и развивались в жизнеспособный организм.

Для оценки эффективности развития криоконсервированных эмбрионов на постимплантационных стадиях мы сравнивали отношение числа пересаженных эмбрионов к числу родившихся мышат для контрольных “свежих” эмбрионов и эмбрионов, подвергавшихся криоконсервации. Оказалось, что статистически значимых различий между этими группами не наблюдается. Также отсутствовали статистически достоверные различия между криоконсервированными эмбрионами генетически модифицированных животных по сравнению с эмбрионами дикого типа.

Организация депозитария, позволяющего хранить в криоконсервированном виде эмбрионы и осуществлять их последующую пересадку реципиентам, требует слаженной работы большого числа высококвалифицированных специалистов. Так, необходимо поддержание популяции животных, нужно обеспечить особо тщательный

уход за оперированными животными. Работы по переносу эмбрионов и вазэктомии должен осуществлять человек, владеющий хирургическими навыками и имеющий опыт работы с микрообъектами. Навык переноса эмбрионов вырабатывается только в результате длительных тренировок.

Полученные данные иллюстрируют тот факт, что при наличии квалифицированного персонала организовать криобанкирование линий мышей представляется возможным. Необходимо отметить некоторые нюансы, которые могут стать критическими в процессе организации криобанка. Ключевыми проблемами, с которыми можно столкнуться в процессе организации криохранилища, являются проблемы, вызванные действием так называемого “человеческого фактора”. Крайне важно контролировать своевременную заправку криотанков жидким азотом (с одновременным контролем этого процесса несколькими людьми). Важно обеспечить хранение криоконсервированных эмбрионов по принципу RAID-массива: в данном случае эмбрионы одной и той же криоконсервированной линии помещают для хранения в два разных сосуда Дьюара. Притом желательно, чтобы эти сосуды находились в разных зданиях (или,

по крайней мере, в разных помещениях), что позволит избежать риска тотальной утраты образцов в случае форс-мажорного обстоятельства (например, в результате пожара).

На эффективность работ по криобанкированию может оказать влияние даже выбор линии животных реципиентов. Так, крайне важно использовать в качестве суррогатных матерей и вазэктомированных самцов таких животных, цвет шерсти которых будет отличаться от цвета шерсти детенышей, которые разовьются из пересаженных эмбрионов. Если в силу ошибки человека, производящего вазэктомию, окажется, что процедура проведена не полностью, то существует риск того, что суррогатная мать на самом деле родит собственных детенышей, а не детенышей, которые разовьются в результате переноса эмбрионов в яйцевод.

Разные линии мышей также имеют в разной степени развитый материнский инстинкт. Поэтому крайне важно использовать в качестве реципиентов и кормилиц мышей тех линий, которые обладают наиболее выраженным материнским инстинктом. Так, например, известно, что самки аутбредной линии CD1 отличаются от самок инбредной линии C57Bl/6 значительно более выраженной заботой о потомстве.

Чрезвычайно важно также рассчитать количество замороженных эмбрионов, необходимое для гарантированного восстановления линии. Учитывая риски нарушения имплантации и эмбрионального развития эмбрионов после криоконсервации, необходимо витрифицировать значительное число эмбрионов – порядка 300 на одну линию животных, поскольку процент рождения мышат (от количества пересаженных после размораживания эмбрионов) может в некоторых случаях не превышать 11 [14].

Одним из краеугольных вопросов в области криобиологии, связанный репродукцией, является предельно допустимый срок хранения эмбрионов в жидком азоте. В эмбрионах, находящихся в криоконсервированном виде, остановлены все клеточные и молекулярные процессы, в том числе процессы репарации ДНК, таким образом, воздействие радиационного фона потенциально может приводить к развитию мутаций [17].

Для эмбрионов человека существуют противоречивые данные, касающиеся сроков хранения эмбрионов в криоконсервированном виде. Так, в одном из исследований проводили сравнение жизнеспособности эмбрионов и частоты наступления беременности для эмбрионов, хранившихся в жидком азоте разное время. Пациентов разделили на три группы в зависимости от срока хране-

ния эмбрионов (<3, 3–12 и >12 мес) и оценивали влияние времени хранения на частоту наступления и исход беременности. В дальнейшем, для оценки влияния долгосрочного хранения криоконсервированных эмбрионов проводили сравнение частоты наступления и исхода беременности в случае переноса эмбрионов, хранившихся в течение 1–3, 3–5, и более 5 лет по сравнению с эмбрионами, хранящимися менее одного года [18]. Не было обнаружено достоверных отличий в частоте наступления беременности для групп эмбрионов, хранившихся в жидком азоте менее 5 лет, однако при переносе эмбрионов более длительных сроков хранения наблюдалось значительное снижение частоты наступления беременности.

В другом исследовании, однако, описаны случаи наступления беременности после переноса эмбрионов, хранившихся в жидком азоте более 12 лет [19]. Следует принимать во внимание, что во время хранения эмбрионов в жидком азоте возраст женщины, которой планируется осуществлять перенос, также увеличивается, что может быть ведущей причиной снижения частоты наступления беременности при длительном (более 5 лет) хранении эмбрионов. Необходимо отметить, однако, что при витрификации эмбрионов мыши (и других животных), в отличие от человека, эта проблема неактуальна. Отсутствие значимого влияния времени хранения эмбриона в жидком азоте на возможность и частоту наступления беременности подтверждается рядом экспериментов на сельскохозяйственных животных. Так, у овец не было обнаружено разницы в частоте наступления беременности при переносе эмбрионов, хранившихся полгода, по сравнению с эмбрионами, хранящимися 7.5 лет [20].

Не менее важным является вопрос о том, приводит ли витрификация к значимым эпигенетическим изменениям в организме. В исследованиях на эмбрионах мыши было показано, что уровень экспрессии miR-21 и let-7a значительно снижен в витрифицированных 8-клеточных эмбрионах по сравнению с 8-клеточными эмбрионами, не подвергшимися витрификации. Такое изменение паттерна экспрессии miRNA может привести к значительному изменению сигнальных путей, участвующих в развитии [12]. В другой работе на эмбрионах мыши также было показано значительное изменение уровня экспрессии ряда генов вследствие витрификации [13]. Ряд эпигенетических эффектов витрификации может сохраняться, по всей видимости, на протяжении всего онтогенеза: в работе на эмбрионах мыши была показана большая устойчивость животных, развившихся из криоконсервированных эмбрионов к развитию индуцируемых опухолей [24]. Таким образом, принимая

решение о криоконсервации линий генетически модифицированных животных, необходимо учитывать все возможные ограничения метода (необходимость витрифицировать значительное число эмбрионов, возможность эпигенетических изменений в первом поколении животных, полученных из ревитрифицированных эмбрионов), однако представленные данные дают основания считать метод витрификации надежным и безопасным способом хранения генетически модифицированных линий животных.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась при финансовой поддержке гранта УНУ “Трансгенбанк” (Соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021 г.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Mobley C.B., Vechetti I.J. Jr., Valentino T.R., McCarthy J.J. CORP: Using transgenic mice to study skeletal muscle physiology. *J. Appl. Physiol.*, (1985), 2020, 128(5), 1227–1239. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00021.2020>
2. Shultz L.D., Ishikawa F., Greiner D.L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, 7(2), 118–130. <https://doi.org/10.1038/nri2017>
3. Ito R., Takahashi T., Ito M. Humanized mouse models: Application to human diseases. *J. Cell. Physiol.*, 2018, 233(5), 3723–3728. <https://doi.org/10.1002/jcp.26045>
4. Van Dam D., Vloeberghs E., Abramowski D., Staufenbiel M., De Deyn P.P. APP23 mice as a model of Alzheimer's disease: an example of a transgenic approach to modeling a CNS disorder. *CNS Spectr.*, 2005, 10(3), 207–222. <https://doi.org/10.1017/s1092852900010051>
5. Lindsay A., Trewin A.J., Sadler K.J., Laird C., Della Gatta P.A., Russell A.P. Sensitivity to behavioral stress impacts disease pathogenesis in dystrophin-deficient mice. *FASEB J.*, 2021, 35(12), e22034. <https://doi.org/10.1096/fj.202101163RR>
6. Jiang Y., Yu Y. Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research. *Oncotarget*, 2017, 8(2), 3696–3710. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12467>
7. Pu X.A., Young A.P., Kubisch H.M. Production of Transgenic Mice by Pronuclear Microinjection. *Methods Mol. Biol.*, 2019, 1874, 17–41. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0_2)
8. Schilit S.L.P., Ohtsuka M., Quadros R.M., Gurumurthy C.B. Pronuclear Injection-Based Targeted Transgenesis. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, 2016, (91), 15.10.1–15.10.28. <https://doi.org/10.1002/cphg.23>
9. Hickman-Davis J.M., Davis I.C. Transgenic mice. *Paediatr. Respir. Rev.* 2006, Mar;7(1), 49–53. Epub 2005 Dec 7. PMID: <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2005.09.00516473817>
10. Auerbach A.B. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim. Pol.*, 2004, 51(1), 9–31.
11. Longenecker G., Cho K., Khillan J.S., Kulkarni A.B. Cryopreservation Protocols for Genetically Engineered Mice. *Curr. Protoc.*, 2021, 1(5), e138. <https://doi.org/10.1002/cpz1.138>
12. Azizi E., Ghaffari Novin M., Naji M., Amidi F., Hosseini-rad H., Shams Mofaraha Z. Effect of vitrification on biogenesis pathway and expression of development-related microRNAs in preimplantation mouse embryos. *Cell Tissue Bank.*, 2021, 22(1), 103–114. <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09870-z>
13. Sahraei S.S., Shahhoseini M., Movaghar B. Vitrification Has an Effect like Culture on Gene Expression and Histone Modification In Mouse Embryos. *Cryo Letters*, 2018, 39(2), 102–112.
14. Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X., Brown S.S., Ward A.C., Hansen C.T. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. *ILAR J.*, 2000, 41(4), 221–227. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.221>
15. Kessler D.L., Smith W.D., Hamilton M.S., Berger R.E. Infertility in mice after unilateral vasectomy. *Fertil. Steril.*, 1985, 43(2), 308–312.
16. Larson M.A. Embryo Transfer Surgery. *Methods Mol. Biol.*, 2020, (2066), 101–106. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9837-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9837-1_8)
17. Yatagai F., Honma M., Takahashi A., Omori K., Suzuki H., Shimazu T., Seki M., Hashizume T., Ukai A., Sugawara K., Abe T., Dohmae N., Enomoto S., Ohnishi T., Gordon A., Ishioka N. Frozen human cells can record radiation damage accumulated during space flight: mutation induction and radioadaptation. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2011, 50(1), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0348-3>
18. Cui M., Dong X., Lyu S., Zheng Y., Ai J. The Impact of Embryo Storage Time on Pregnancy and Perinatal Outcomes and the Time Limit of Vitrification: A Retrospective Cohort Study. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2021, 12, 724853. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.724853>
19. Yuan Y., Mai Q., Ma J., Deng M., Xu Y., Zhuang G., Zhou C. What was the fate of human embryos following long-term cryopreservation (≥12 years) and frozen embryo transfer? *Hum. Reprod.*, 2019, 34(1), 52–55. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey350>
20. Yao Y.C., Qi M.Y., Lu M.H., Wang S.M., Li W., Han H.B. Long-term cryopreservation had no adverse effect on viability of embryos and their offspring in sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 2012, 136(1–2), 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.018>
21. Auroux M., Cerutti I., Ducot B., Loeuillet A. Is embryo-cryopreservation really neutral? A new long-term effect of embryo freezing in mice: protection of adults from induced cancer according to strain and sex. *Reprod. Toxicol.*, 2004, 18(6), 813–818. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.04.010>



## Cryopreservation as a Means of Storing Unique Genetically Modified Animal Lines

M. A. Filatov<sup>a, #</sup>, Yu. D. Okulova<sup>a</sup>, R. A. Shafei<sup>b</sup>, D. S. Korshunova<sup>a</sup>, and Yu. Yu. Silaeva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

<sup>b</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: maxfilat@yandex.ru*

**Abstract**—In this article, we discuss the experience of creating a cryobank for storing genetically modified mouse lines. It has been shown that the frequency of occurrence of the blastocyst stage differed statistically insignificantly ( $p > 0.05$ ) in the following groups of embryos: cryopreserved and then thawed; treated with solutions for vitrification and revitrification, but not cryopreserved; and intact. Moreover, there was also no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between the efficiency of transfer to false-pregnant females of the following embryo groups: wild type intact and cryopreserved; wild type cryopreserved and transgenic cryopreserved. The main difficulties arising in the organization of the depository and possible ways of their solution are discussed.

*Keywords:* cryopreservation, mice, embryo