

## ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ СОДЕРЖАНИЯ И ВЫВЕДЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ В НЦБМТ ФМБА РОССИИ

Н.В. Петрова\*, М.М. Скрипкина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»  
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Проанализированы особенности мониторинга здоровья и поддержания линий трансгенных мышей. Отработана методика содержания животных в лабораторных условиях, охарактеризованы критерии инбредного разведения гомозиготных трансгенных линий мышей. Полученные данные могут быть полезны сотрудникам вивария для поддержания трансгенной линии мышей.

**Ключевые слова:** трансгенные мыши, лабораторные животные, инбредное скрещивание, криоконсервация, гомозиготные линии, наследование признаков

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

**Для цитирования:** Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):70–75. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-70-75>

Поступила 13.05.2021

Принята после доработки 01.08.2021

Опубликована 20.10.2021

## MAINTENANCE AND BREEDING OF TRANSGENIC MOUSE STRAINS AT THE SCIENTIFIC CENTER OF BIOMEDICAL TECHNOLOGIES OF THE FMBA OF RUSSIA

Nataliya V. Petrova\*, Mariya M. Skripkina

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

In this article, we analyze the specifics of health monitoring and maintenance of transgenic mouse strains. A method for keeping animals in laboratory conditions is discussed, the criteria for inbred crossing of homozygous transgenic mice lines are characterized. The obtained data can be useful for the staff of vivaria in maintaining the transgenic line of mice.

**Keywords:** transgenic mice, laboratory animals, inbred crossing, cryopreservation, homozygous lines, inheritance of traits

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

**For citation:** Petrova N.V., Skripkina M.M. Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):70–75. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-70-75>

Submitted 13.05.2021

Revised 01.08.2021

Published 20.10.2021

## Введение

В настоящее время исследование базовых и прикладных биомедицинских вопросов невозможно без проведения исследовательских работ на лабораторных животных, где особая роль отведена генетически модифицированным организмам.

Реализация разработки изменённых на геномном уровне мышей внесла большой вклад в изучение разных заболеваний человека. Мышь — животное с небольшим периодом беременности (19–22 дня), между человеком и мышью выявлено удивительное сходство молекулярных процессов. В связи с получением анализа геномов мыши и человека стали осуществимы сопоставимые генетические исследования. Поэтому можно смело заявлять, что на геномном уровне трансгенные мыши считаются ведущей экспериментальной моделью для исследований. Конечно, есть некоторые ограничения на использование мышиной модели при изучении таких болезней, как, например, сердечно-сосудистые заболевания, однако из-за простоты генетических манипуляций с мышами данная модель считается стандартным трамплином для проверки гипотез и прогнозирования экспериментов на животных значительно крупнее [5].

У лабораторных мышей существуют наиболее благоприятные и неблагоприятные периоды для спаривания, они классифицируются на следующие стадии: диэструс, проэструс, эструс, метаэструс.

## Характеристика стадий эструса лабораторных мышей

Лабораторные мыши могут плодиться круглый год. Эстральный цикл (цикл течки) самок продолжается 4–5 дней, чувствителен к свету: охота (стадия эструса) у самок может наступить через 3–5 ч с приближением ночи. При непрерывном освещении у самок может наступить постоянная стадия эструса, что способно спровоцировать

поликистоз яичников. Поэтому в виварии чётко следует соблюдать цикл дня и ночи.

Работая с лабораторными мышами, также следует учитывать следующие биологические особенности:

- эффект Брюса — беременность не начинается, если к самочке в течение дня и ночи после скрещивания в клетку сажают другого самца. Феромоны чужого самца предупреждают имплантацию зародышей. Спустя 4–5 дней у подобных самок возобновляется эструс. Самцы, кастрированные до половозрелости, подобный эффект не вызывают.

- эффект Ли — Бута — при содержании самок группами больше четырёх голов без случки прослеживается огромное количество мнимых беременностей из-за женских феромонов. При нахождении в более крупных группах, например до 30 особей, самочки имеют все шансы войти в анэструс.

- внутри систем, которые можно назвать «гаремами», самочки часто группируют помёты сходного возраста и заботятся о них вместе. Отсчёт беременности у мышей начинается с момента образования копуляционной пробки. Длительность лактации — примерно 21 сут. Если зачатие произошло в период лактации и выращивания потомства, беременность может затянуться до 26–28 дней [1].

## Инбредное разведение гомозиготных трансгенных линий мышей

Размножение лабораторных животных осуществляют по типу узкого инбридинга в два этапа: 1-й этап — работа с племенным ядром и 2-й — ступенчатое расширенное воспроизводство для использования в экспериментах (племенное стадо). В данной работе мы говорим о первом варианте.

Племенным ядром линии является группа животных, которая состоит из размножающихся пар репродуктивного возраста (родных братьев и сестёр) в соотношении

1 самец / 1 самка. В границах племенного стада к одному самцу подсаживают двух самок. Необходимо учитывать инбредный возраст каждого гнезда. Все рождённые от первого поколения (F1) инбредного разведения потомки (помёт) числятся вторым поколением (F2), при спаривании которого появляется третье поколение (F3) и т. д. Представленные генетико-селекционные процедуры считаются основными, чтобы исключить возможность генетической контаминации и утраты гомозиготности рядов.

### Развитие племенных ядер гомозиготных трансгенных линий мышей

Для сохранения любой трансгенной линии составляют порядка 8–12 целевых гнёзд, которые при отбраковке одного из родителей подвергаются восстановлению за счёт подсадки особи из помёта данной трансгенной линии, достигшей половой зрелости и находящейся в непосредственных родственных связях. Целевые гнёзда по окончании репродуктивного возраста (примерно 7–8 мес.) должны подвергаться выбраковке (эвтаназия с дальнейшей утилизацией).

При падеже самки или самца в целевом гнезде, что является признаком нежизнеспособности, гнездо выбраковывается полностью. При селекции мышей, придерживаясь инбридинга, целесообразно осуществлять возвратное скрещивание каждой трансгенной линии с контрольной линией — мыши дикого типа, для получения гетерозиготных животных. Впоследствии приобретённых гетерозиготных самцов и самок используют с целью создания гнёзд для становления потомства, состоящего из 25% мышей дикого типа, 50% — гетерозигот и 25% — гомозиготных особей в одном помёте. Данных мышей маркируют и генотипируют для дальнейшего формирования новых гнёзд между гомозиготными особями. Представленная операция осуществляется с регулярностью один раз в 1–2 года [3].

Мыши каждого последующего поколения передаются в возрасте от 3 до 5 недель на ПЦР-диагностику и секвенирование для верификации редактирования генов (рис. 1).

**Цель** работы — изучение и внедрение принципов выведения и поддержания

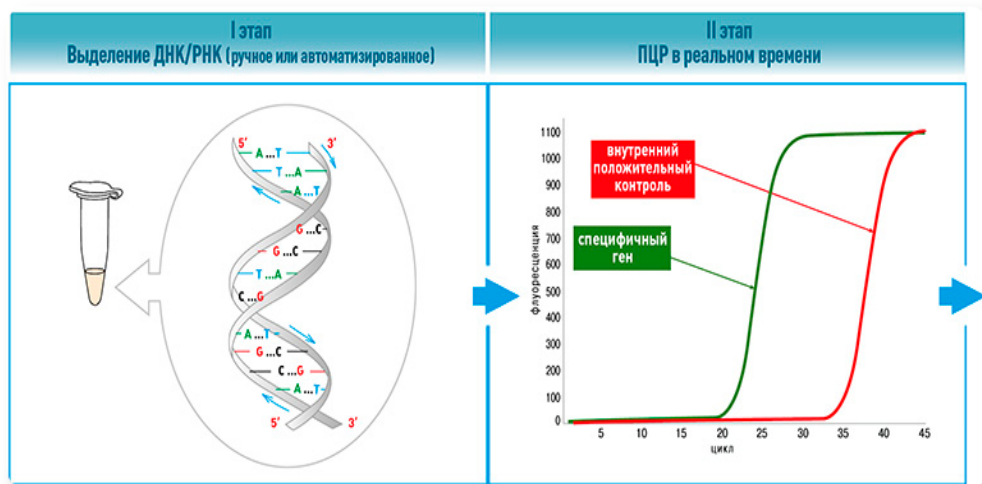


Рис. 1. Схематические этапы и результаты ПЦР-анализа.

Fig. 1. Schematic steps and results of PCR analysis.

трансгенных животных в НЦБМТ ФМБА России.

## Материалы и методы

Лаборатория постгеномных технологий ФГБУН НЦБМТ ФМБА России проводит свою научно-исследовательскую работу начиная с 2019 года. В виварии лаборатории выполняются следующие работы:

- 1) уход и содержание мышей;
- 2) проведение операций (вазэктомирование), для которых используются самцы линии Balb/c;
- 3) микроинъекции для получения животных-прародителей (поколения F0), на межлинейных гибридных самках-донорах и реципиентах CBA×C57BL/6;
- 4) гистерэктомия для получения животных SPF-статуса (свободных от патогенной микрофлоры) на самках межлинейных гибридов CBA×C57BL/6, линий Balb/c, C57BL/6;
- 5) выведение гомозиготных линий мышей.

Условия содержания грызунов соответствуют ГОСТ 33216-2014 и требованиям FELASA (the Federation of European Laboratory Animal Science Associations — Европейская Федерация по работе с лабораторными животными).

При ненадлежащем температурном режиме в виварном помещении у мышей может ухудшаться состояние шерстного покрова, поэтому температура чётко контролируется и поддерживается в пределах 21–24°C. При групповом содержании температура в клетках со сплошным дном чаще бывает выше комнатной, и даже при хорошо работающей вентиляции может превышать её на 6°C. Особое внимание следует уделять поддержанию температуры в комнатах, где находятся системы с индивидуальными вентилируемыми клетками.

Материал для строительства гнёзд и домики позволяют животным самостоятельно контролировать микроклимат и даёт возможность создавать законченное закрытое

гнездо. Однако когда беременная самка находится в стрессе и строит слишком высокое гнездо при помощи опилок и ваты под полкой, возникает высокая вероятность затопления гнезда. Состояние самок следует прогнозировать, и при обнаружении признаков стресса вместо ваты класть бумагу, предварительно простерилизованную в сухожаре. Клетки и материалы, используемые для обогащения среды, должны позволять животным проявлять нормальное поведение и снижать вероятность возникновения конфликтных ситуаций.

Шум, издаваемый не только людьми, но и лабораторным оборудованием, в т. ч. капающими кранами, колёсиками тележек, компьютерными мониторами и т. д., может стать причиной аномального поведения, нарушений репродуктивного цикла у животных. Поэтому в периоды, когда животные находятся вне своих клеток (во время чисток, гормональных обработок, вынужденной изоляции, на карантине после прибытия из питомника), уровень постороннего шума должен быть сведён к минимуму.

## Результаты и их обсуждение

В настоящее время в виварии лаборатории содержится 14 трансгенных линий животных — как F20 поколения, так и формирующееся F0 поколение.

По нашим наблюдениям, трансгенные мыши чрезвычайно уязвимы и чувствительны к условиям окружающей среды, в связи с чем нами был разработан поддерживающий рацион кормления, включающий дозированный ввод витаминов С и В (в комплексе), зелень и рыбную/мясокостную/кровяную муку, семечки, мел.

Также нами был определён оптимальный температурный режим обработки кормов и опилок, исходя из оценки состояния здоровья животных. Температура обработки увеличена до 150°C, длительность обработки составляет 40–50 мин.

Относительная влажность в помещениях для содержания мышей должна поддерживаться в диапазоне 45–65%.

Несмотря на необходимость поддержания высоких гигиенических норм, может оказаться целесообразным оставлять животным некоторое количество запаховых меток. Поэтому мы избегаем частой чистки клеток при содержании беременных самок и самок с потомством, т. к. причиняемое беспокойство может стать причиной поедания потомства самкой или нарушения её материнского поведения [2, 4].

Сотрудниками Центра непрерывно ведётся фактическая схема наследования трансгена — «дерево наследования» (рис. 2), оно является основным способом визуализации генетических признаков животных.

### Дальнейшие перспективы работы

С целью получения мышей SPF-статуса нами также изучена и отработана данная технология получения и выращивания лабораторных животных в изоляторной системе.

Одно из перспективных направлений — криоконсервация биологического материала мышей инбредных линий и создание

криобанка [6]. Поддержание мышинных биомоделей в виде живых колоний затруднительно по экономическим причинам и постоянно несёт потенциальные риски, в т. ч. чрезмерные потери из-за вспышек различных заболеваний, прекращения размножения и сбоев оборудования. В связи с чем стали внедряться криохранилища, чтобы сократить популяционную нагрузку на действующие виварии и снизить необходимость строительства новых объектов. Криоконсервация — очень мощный инструмент, позволяющий управлять колониями, одновременно защищая их от потери и гарантируя, что они останутся доступны по требованию.

### Выводы

Лабораторные мыши являются неотъемлемой частью научной экспериментальной практики благодаря сходству молекулярных процессов с человеческими. Они являются наиболее доступными в приобретении, считаются надёжными моделями. При этом они имеют ряд определённых физиологических и психологических особенностей, которые необходимо учитывать и корректировать своевременным монито-

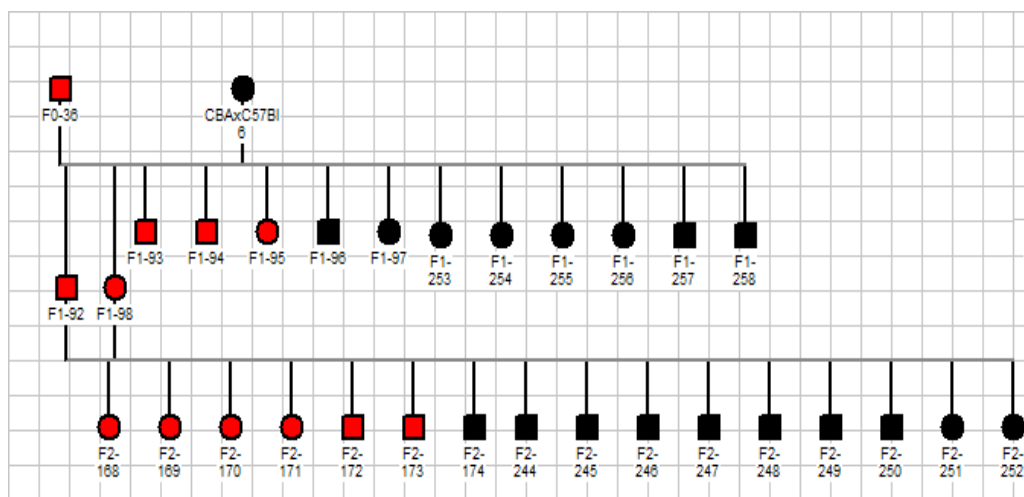


Рис. 2. Элемент генетического дерева мышей трансгенной линии.

Fig. 2. Element of the genetic tree of transgenic mice.

рингом состояния и правильными условиями содержания.

Генетически модифицированные линии мышей нулевого поколения, полученные путём микроинъекции, по нашим данным, являются более чувствительными к среде обитания. Для них потребовалось усовер-

шенствовать систему содержания, исходя из современных представлений. Вследствие улучшения качества жизни мы получаем повышение уровня здоровья, что отражается на производительности и рождаемости животных. Наша задача не только выведение, но и сохранение трансгенных мышей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Аверина О.А., Сергиев П.В. Виды колоний лабораторных грызунов в исследованиях *in vivo*. Институт функциональной геномики МГУ, 2020. [Averina O.A., Sergiev P.V. *Vidy koloniy laboratornykh gryzunov v issledovaniyakh in vivo* [Species of laboratory rodent colonies in vivo studies]. Institute of Functional Genomics of the Moscow State University, 2020. (In Russian)].
2. ГОСТ 33216-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. [GOST 33216-2014. *Mezhhgosudarstvennyy standart. Rukovodstvo po soderzhaniyu i ukhodu za laboratornymi zhiivotnymi. Pravila soderzhaniya i ukhoda za laboratornymi gryzunami i krolnikami* [GOST 33216-2014. Interstate standard. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits]. (In Russian)].
3. Петрова Е.С., Громова А.В., Анисименко М.С., Рубан Л.А., Егорова С.А., Петровская И.Ф., Амстиславская Т.Г., Липина Т.В. Поддержание генетически модифицированных линий мышей: вклад в развитие биокolleкций в России. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;2:2–15. [Petrova E.S., Gromova A.V., Anisimenko M.S., Ruban L.A., Egorova S.A., Petrovskaya I.F., Amstislavskaya T.G., Lipina T.V. Podderzhanie geneticheskii modifitsirovannykh liniy myshey: vklad v razvitie biokollektsiy v Rossii [Maintenance of genetically modified mouse strains: Contribution to the development of biocollections in Russia]. *Laboratornye zhiivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* [Laboratory animals for scientific research]. 2018;2:2–15. (In Russian)]. DOI: 10.29926/2618723X-2018-02-01.
4. <https://www.bbt-lab.com/>
5. <https://meduniver.com/Medical/cardiologia/1365.html>
6. <https://resources.jax.org/colony-management/cryopreservation-a-cool-way-to-stretch-your-research-dollars>

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Скрипкина Мария Михайловна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
e-mail: [skripkina.fmba@gmail.com](mailto:skripkina.fmba@gmail.com)

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

Mariya M. Skripkina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [skripkina.fmba@gmail.com](mailto:skripkina.fmba@gmail.com)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author