

УДК 577.95;575;592/599

## РЕДЕРИВАЦИЯ ПУТЕМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ И КРЫС

© 2013 г. С.Я. Амстиславский<sup>1,2</sup>, Т.Н. Игонина<sup>1</sup>, И.Н. Рожкова<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Брусенцев<sup>1</sup>, А.А. Роговая<sup>2</sup>, Д.С. Рагаева<sup>2</sup>, В.А. Напримеров<sup>1,3</sup>,  
Е.А. Литвинова<sup>1</sup>, И.Ф. Плюснина<sup>1,2</sup>, А.Л. Маркель<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: amstis@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования Новосибирский государственный  
аграрный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 17 сентября 2012 г. Принята к публикации 12 декабря 2012 г.

Редеривация позволяет очистить колонии лабораторных мышей и крыс от специфических патогенов и перевести их в SPF (specified pathogen free) статус. В данной работе приведены результаты редеривации двух уникальных линий крыс, селекционированных в ИЦиГ СО РАН: ручных крыс-пасюков, крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) и линии мышей ICR. SPF-статус редеривированных крыс был подтвержден при помощи животных-индикаторов, называемых также сентинелами (sentinel animals). В статье предложена оптимизированная модель редеривации лабораторных животных, которая включает в себя набор эмбриотехнологических методов, таких, как замораживание и криоконсервация эмбрионов, их очистка путем отмывки в стерильных средах, культивирование 48 ч и, наконец, трансплантация реципиентам (SPF-статуса). В результате применения этой модели по отношению к мышам линии ICR удалось получить 39 потомков, рожденных в условиях SPF-вивария. Следует отметить, что эффективность процедуры вполне соответствует международным стандартам, причем все три линии демонстрировали характерный фенотип после прохождения всех процедур редеривации.

**Ключевые слова:** крысы НИСАГ, ручные крысы, мыши ICR, трансплантация эмбрионов, редеривация.

### ВВЕДЕНИЕ

По мере повышения стандартов в биологических исследованиях все большее значение уделяется животным **SPF-статуса**. Работа на таких животных позволяет получать более точные результаты, а также уменьшить число экспериментальных животных в группах за счет уменьшения неконтролируемой изменчивости (Nicklas *et al.*, 2002; Shek, 2008). Поскольку имеется много ценных в генетическом отношении линий мышей и крыс, по-прежнему разводимых в конвенциональных условиях, актуальной задачей является

освобождение этих линейных животных от патогенов и перевод их в **SPF-статус (редеривация)** (Morrell, 1999; Брусенцев и др., 2011).

В то же время не существует единого способа редеривации. Иногда для этих целей применяют подсадку новорожденных мышат от инфицированной линии приемным матерям неинфицированной линии (Watson *et al.*, 2005; Artwohl *et al.*, 2008; Yeom *et al.*, 2009). Другой распространенный способ заключается в том, что еще не родившихся, но практически сформированных особей извлекают путем гистерэктомии из доноров непосредственно перед

родами и отдают на вскармливание суррогатным матерям SPF-статуса (Marcotte *et al.*, 1996; Masy *et al.*, 2000; Glage *et al.*, 2007). Эти методы до сих пор применяют в ряде лабораторий, хотя они не обеспечивают полной защиты от патогенов, проникающих через фето-плацентарный барьер, т. е. существует риск заражения плода от матери (Le Monnier *et al.*, 2006). Экспериментально показано, например, что подсадка новорожденных мышат на воспитание приемным матерям SPF-статуса позволяет избежать лишь от некоторых вирусных и бактериальных инфекций, другие вирусы (такие, как murine poxvirus) и бактерии (*Helicobacter hepaticus*) при этом не устраняются (Yeom *et al.*, 2009).

Трансплантация эмбрионов в сочетании с их отмывкой в стерильных средах позволяет избежать от подавляющего большинства известных патогенов, и этот способ в настоящее время является наиболее распространенным для редеривации лабораторных животных в ведущих генетических центрах мира в силу своей технологичности, воспроизводимости и эффективности в отношении подавляющего большинства изученных патогенов (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Rall *et al.*, 2000; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008).

Несмотря на то что редеривация путем трансплантации эмбрионов считается «золотым стандартом» для очистки линий мышей и крыс от патогенов и придания им SPF-статуса (Mahabir *et al.*, 2008), эмбриотрансплантацию часто сочетают с другими эмбриотехнологическими процедурами, такими, как криоконсервация эмбрионов (Morrell, 1999) или экстракорпоральное оплодотворение (Suzuki *et al.*, 1996; Mahabir *et al.*, 2009).

Задачей данной работы был перевод в SPF-статус двух уникальных линий крыс, полученных путем селекции в ИЦиГ СО РАН, а именно ручных крыс-пасюков, представляющих собой модель доместикационного процесса (Plyusnina *et al.*, 2011), и крыс НИСАГ, являющихся генетической моделью артериальной гипертензии (Маркель, 1985; Markel *et al.*, 1999). Другой задачей данной работы были выбор и оптимизация модели редеривации. С этой целью был проведен эксперимент по редеривации мышей линии ICR, причем модель редеривации

включала как классическую отмывку эмбрионов путем проводки через стерильные среды, так и замораживание/криоконсервацию, размораживание и культивирование эмбрионов в течение двух суток перед трансплантацией. Были исследованы такие параметры, влияющие на эффективность данной модели, как унилатеральная/билатеральная трансплантация, а также синхронизация в развитии эмбриона и стадии псевдобеременности реципиента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальные животные: редеривуемые линии мышей и крыс

**Ручные крысы-пасюки.** Линия ручных крыс-пасюков была получена путем селекции на отсутствие агрессии по отношению к человеку из диких серых крыс-пасюков *Rattus norvegicus* (Plyusnina *et al.*, 2009, 2011). Отбор осуществлялся на основе теста на перчатку, в котором оценку поведения по отношению к человеку проводили по балльной системе (Naumenko *et al.*, 1989; Plyusnina, Oskina, 1997). Работа проведена на линии ручных крыс 12-го поколения инбредных скрещиваний (общее число поколений селекции – 75). Характерной особенностью поведения крыс этой линии является высокая толерантность к взятию их в руки, средний балл поведенческой реакции на человека крыс-доноров составлял  $+3,30 \pm 0,01$  при максимальной балльной оценке +4.

**Крысы линии НИСАГ.** Линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) (Маркель, 1985; Markel *et al.*, 1999) является признанной в мире оригинальной моделью гипертонической болезни человека (Rapp, 2000). В работе были использованы крысы инбредной сублинии альбиносов 77-го поколения селекции. Важнейшей характеристикой крыс линии НИСАГ является повышенное артериальное давление (АД) (Маркель, 1985; Markel *et al.*, 1999; Амтиславский и др., 1999). Имеются выраженные онтогенетические и половые различия этого показателя у крыс НИСАГ. У молодых самцов НИСАГ в возрасте 1,5 месяца среднее АД в покое достигает 150 мм рт. ст., а у взрослых 4-месячных самцов оно составляет уже

170 мм рт. ст.; после достижения этого уровня АД самцов крыс НИСАГ меняется мало, оставаясь примерно на этом же уровне и у стареющих животных в возрасте 8 месяцев (Амстиславский, 2006). В то же время у взрослых самок среднее АД в покое лишь слегка превышает 150 мм рт. ст. (Амстиславский и др., 1999). Артериальное давление, измеренное в покое, у взятых в эксперимент самок-доноров крыс линии НИСАГ было  $156,3 \pm 5,9$  мм рт. ст.

**Мыши ICR.** Аутбредные мыши линии ICR отличаются высокой плодовитостью и низким уровнем эмбриональной смертности (Карих и др., 1999). Часто используются в качестве доноров эмбрионов и/или матерей-реципиентов (Luo *et al.*, 2011; Omar Farouk *et al.*, 2011; Kolbe *et al.*, 2012), а также в качестве животных-индикаторов микробиологического статуса (Williams *et al.*, 2005; Baze *et al.*, 2006; Lindstrom *et al.*, 2011).

Линейные крысы («ручные» и НИСАГ) и мыши (ICR) – доноры эмбрионов содержались в условиях конвенционального вивария при естественном освещении, свободном доступе к сбалансированному корму и воде.

### Животные-реципиенты

В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов линии ручных крыс были использованы линейные крысы Sprague-Dawley SPF-статуса, полученные из контролируемого источника (питомник лабораторных животных «Пушино», Россия). Эти крысы характеризуются высокой плодовитостью и хорошими показателями материнской заботы (Holinka, Carlson, 1976; Chapin *et al.*, 1993; Wilkinson *et al.*, 2000).

В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов после процедур редеривации крыс НИСАГ из сублинии альбиносов использованы редеривированные крысы ручной линии, полученные в условиях SPF-вивария.

В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов после процедур редеривации мышей линии ICR были использованы межлинейные гибриды F1, рожденные в условиях SPF-вивария в результате скрещивания линий C57BL<sub>6</sub> и BALB/c, завезенные из контролируемого источника (питомник лабораторных животных

«Пушино», Россия). Все животные-реципиенты содержались в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН при круглогодичных стандартных параметрах условий содержания в соответствии с требованиями GLP: комфортной температуре 22–24 °С, свободном доступе к пище и воде и режиме освещения 12 ч день – 12 ч ночь.

### Схема редеривации линейных мышей и крыс

**Линия ручных крыс-пасюков.** Эмбрионы ручных крыс-пасюков получали после забоя животных путем дислокации шейных позвонков и последующего извлечения репродуктивных органов. Эмбрионы вымывали из яйцеводов и матки и оценивали при помощи стереомикроскопа МБС 10 (ЛЗСОС, Россия) в условиях стерильного бокса вивария конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН, помещали в соломинку и переносили в редеривационный блок SPF-вивария, где проводили первичную отмывку эмбрионов перед передачей в лабораторию. В лаборатории эмбрионы отмывали от возможных патогенов путем последовательной проводки по одному эмбриону через 10 пассажей на свежую стерильную среду EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США), содержащую антибиотики в соответствии с рекомендациями (Stringfellow *et al.*, 1998). Процедура отмывки занимала в среднем 30 мин. Сразу после отмывки эмбрионы трансплантировали подготовленным крысам-реципиентам, как описано в соответствующем разделе.

**Крысы линии НИСАГ.** Редеривация крыс линии НИСАГ происходила согласно схеме, описанной выше для крыс-пасюков ручной линии, с тем существенным отличием, что процессы получения и трансплантации эмбрионов были разобщены, так как эмбрионы замораживали в соответствии с описанной ниже стандартной программой замораживания и хранили в криобанке при температуре жидкого азота. Через 2–20 недель после криохранения эмбрионы размораживали и в дальнейшем проводили процедуры очистки и трансплантации в соответствии с вышеописанной схемой для крыс-пасюков ручной линии.

**Мыши линии ICR.** Редеривация мышей линии ICR происходила согласно схеме, описан-

ной выше для крыс линии НИСАГ, т. е. после получения эмбрионов производили сначала их замораживание и криоконсервацию, а лишь затем подвергали дальнейшим процедурам редеривации. Однако имелось два весьма существенных отличия от протокола, примененного нами для крыс линии НИСАГ. Первое отличие заключалось в том, что эмбрионы мышей в отличие от эмбрионов крыс после проведения процедур отмывки не трансплантировали, а культивировали 48 ч, как описано ниже. После культивирования отбирали для трансплантации те эмбрионы, которые развивались в культуре и достигли стадии бластоцисты. Второе отличие заключалось в том, что во время проводки (отмывки) через стерильные среды эмбрионы находились на подогреваемом столике (HT 007, Minitube, Германия).

#### Получение преимплантационных эмбрионов

Проводили контролируемое спаривание самок-доноров с самцами той же линии в возрасте 2–4 мес. Определение фертильного спаривания проводили по наличию сперматозоидов во влагалищных мазках (у крыс) и по наличию влагалищных пробок (у мышей) согласно стандартной методике (Hogan *et al.*, 1986). Для получения преимплантационных эмбрионов на стадии морулы эмбрионы вымывали через 96 ч после оплодотворения (4-й день) у крыс и через 72 ч (3-й день) у мышей. Яйцеводы и матку промывали средой для вымывания эмбрионов EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPbio reproduction, США). Полученные эмбрионы оценивали при помощи микроскопа МБС-10 (Россия), при этом производили первичную выбраковку и переносили через 2–3 капли среды EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США). Затем эмбрионы помещали в соломины 0,25 мл (IMV Technologies, Франция) в среде EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США) в случае крыс-пасюков или в среде с криопротектором этиленгликолем (EMCARE Ethylene Glycol 1,5 M, ICPbio reproduction, США) в случае крыс НИСАГ и мышей ICR. Далее соломины транспортировали в блок редеривации SPF-вивария, где проводили дезинфекцию соломин путем об-

работки 70 %-м раствором спирта и подвергали замораживанию и криоконсервации, по методу описанному ниже.

#### Замораживание и криоконсервация эмбрионов

Полученные из конвенционального вивария соломины с эмбрионами в криопротекторе (EMCARE Ethylene Glycol 1,5 M, ICPbio reproduction, США) замораживали в соответствии со «стандартным методом» быстрого программного замораживания (Leibo, Songsasen, 2002) на установке CL 8800 (Cryologic, Австралия). Эмбрионы после инкубации с этиленгликолем при комнатной температуре помещали в соломину, которую загружали в программный замораживатель. Замораживание начиналось при температуре +18 °С. Соломины с эмбрионами выдерживали при этой температуре одну минуту, после чего охлаждали до –7 °С со скоростью 1 °С в минуту. Через одну минуту после достижения этой температуры производили «сидинг» путем прикосновения к соломине переохлажденным пинцетом и выдерживали 9 мин при этой температуре. Затем охлаждали соломины с эмбрионами со скоростью 0,3 °С в минуту до температуры –35 °С, выдерживали 10 мин при этой температуре и быстро помещали в жидкий азот.

Замороженные эмбрионы хранили в жидком азоте до дня постановки на культивирование или трансплантации их самкам-реципиентам.

#### Размораживание эмбрионов, их очистка и отбор

Соломины с замороженными эмбрионами доставали из жидкого азота и опускали на 10 с в водяную баню, нагретую до 37 °С. Затем проводили отмывку размороженных эмбрионов путем проведения их через 10 капель стерильной, содержащей антибиотика, среды EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США), после чего отбирали эмбрионы хорошего и отличного качества без повреждений в прозрачной оболочке в соответствии с рекомендациями (Stringfellow *et al.*, 1998). Отобранные эмбрионы подготавливали к трансплантации (крысы) или культивированию (мыши).

### Культивирование эмбрионов мышей

В чашку Петри помещали капли среды M16 (Sigma) объемом 50 мкл, покрывали их парафиновым маслом и ставили в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 12 ч для уравнивания. Размороженные и отмытые в 10 каплях стерильной среды эмбрионы мышей линии ICR переносили в ранее подготовленные и уравновешенные в условиях 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C и 80 %-й влажности капли со средой для культивирования и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Эмбрионы культивировали в течение 48 ч, после чего отбирали развивающиеся эмбрионы на стадии бластоцисты для дальнейшей трансплантации самкам-реципиентам.

### Оценка жизнеспособности эмбрионов путем флюоресцентного окрашивания

Жизнеспособность эмбрионов крыс оценивали до замораживания (свежеполученные эмбрионы) и после криоконсервации (в пределах 30–40 мин после оттаивания) методом двойной окраски флюоресцентными красителями: диацетатом флюоресцеина (FDA – **fluorescein diacetate Sigma**) и йодистым пропидием (PI – **propidium iodide, Sigma**) (Jones, Senft, 1985). При применении данного метода в одном эмбрионе можно видеть как живые бластомеры, окрашенные диацетатом флюоресцеина, так и мертвые бластомеры, окрашенные йодистым пропидием.

Для возбуждения и детекции флюоресцентного сигнала после экспозиции эмбрионов в растворе FDA использовались **фильтр возбуждения 470/40 нм** и **фильтр эмиссии 525/50 нм**. Для возбуждения и детекции флюоресцентного сигнала после экспозиции эмбрионов в растворе PI использовались **соответственно фильтры 545/30 нм** и **620/60 нм**.

Для приготовления маточных растворов флюоресцентных красителей 0,002 г диацетата флюоресцеина растворяли в 200 мл ацетона и 0,0125 г йодистого пропидия растворили в 25 мл фосфатного буфера. Эмбрионы крыс отмывали в 3 каплях среды EMCARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США) и затем в 2 каплях фосфатно-солевого буфера (PBS, Sigma). Затем эмбрионы переносили в 0,25 мл PBS и в затемненном помещении добавляли 10 мкл

маточного раствора йодистого пропидия и 10 мкл маточного раствора диацетата флюоресцеина, выдерживали в течение 3–4 мин, после чего производили визуальную оценку и фотографирование эмбрионов при помощи флюоресцентного микроскопа Leica M205FA (Leica Microsystems, Germany).

Эмбрионы, у которых все бластомеры флюоресцировали зеленым, считали жизнеспособными (Mohr, Trounson, 1980). Те эмбрионы, у которых во время оценки на световом микроскопе были выявлены повреждения и при окрашивании йодистым пропидием имелись флюоресцирующие в красной области спектра бластомеры, считали нежизнеспособными (Сайфитдинова, 2008).

### Трансплантация эмбрионов самкам-реципиентам

Проводили контролируемое спаривание самок-реципиентов с фертильными самцами (крысы) или со стерильными самцами (мыши) в SPF-зоне с целью получения беременных и псевдобеременных животных **SPF-статуса**. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в мазке у крыс, а первым днем псевдобеременности считали день появления влажной пробки у мышей.

Трансплантацию эмбрионов производили в рог(а) матки реципиента согласно стандартной методике (Hogan *et al.*, 1986). Для трансплантации крысиных эмбрионов использовали самок-реципиентов 4-го дня беременности (считая день покрытия первым днем). Животных наркотизировали, затем вводили подкожно 0,02 мл амоксициллина (амоксициллина тригидрат, 150 мг/мл). Готовили операционное поле согласно правилам асептики: сбрасывали шерсть в зоне операционного поля и обрабатывали кожу 70 %-м раствором спирта. Применяли правосторонний вертикальный оперативный доступ: самку клали на левый бок и делали разрез кожи и подлежащего мышечного слоя в области расположения матки (в дорзо-вентральном направлении на 5 мм каудальнее нижних ребер). Пинцетом захватывали подушку сальника и извлекали наружу вместе с яичником, яйцеводом и верхним отделом матки. На место перехода яйцевода в рог матки накладывали лигатуру

и с помощью стерильного капилляра вводили в матку 6–10 эмбрионов, предварительно отмытых в стерильных средах. Разрез зашивали узловым швом и припудривали антибиотиком (амоксициллина тригидрат), затем обрабатывали операционный шов бетедином. В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов от ручных серых крыс использовали самок линии Sprague-Dawley, спаренных с самцами той же линии. Потомков редеривуемой линии в помете отличали по серой окраске шерсти, так как собственные потомки линии Sprague-Dawley имели белую окраску шерсти. В качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов от крыс НИСАГ использовали самок линии ручных крыс-пасюков, спаренных с самцами той же линии. Потомков редеривуемой линии в помете отличали по белой окраске шерсти, так как собственные потомки линии ручных крыс-пасюков имели серую окраску шерсти.

Самки-реципиенты мышинных эмбрионов были разделены на 3 группы: первая группа – 3-й день псевдобеременности, трансплантация 10–12 эмбрионов в 1 рог матки; вторая группа – 3-й день псевдобеременности, трансплантация по 7–9 эмбрионов в оба рога матки; третья группа – 4-й день псевдобеременности, трансплантация по 7–9 эмбрионов в оба рога матки. Хирургическую операцию проводили в том же порядке, что и на крысах, однако не накладывали лигатуру в области перехода яйцевода в матку. Поскольку мышинные эмбрионы трансплантировали псевдобеременным самкам, все рожденные потомки были получены из трансплантированных эмбрионов.

Для поддержания температуры тела в оптимальном режиме (в целях избегания переохлаждения) наркотизированные животные во время операции находились при температуре 37 °С на подогреваемом операционном столике.

### Наркоз

Крыс-реципиентов наркотизировали путем внутрибрюшинного введения 0,1 мг/кг медетомедина гидрохлорида (Domitor 1 mg/ml, Orion-Corporation, Finland) и через 10 мин – 12,5 мг/кг золетила (Zoletil, Virbac Sante Animale, Франция).

Мышей-реципиентов наркотизировали путем внутрибрюшинного введения 0,25 мг/кг медетомедина гидрохлорида и через 10 мин – 50 мг/кг золетила.

### Оценка микробиологического статуса потомков редеривуемых линий с помощью иммунодефицитных животных-«индикаторов»

Самки-реципиенты вместе с рожденными потомками находились в карантинном блоке, где они проходили проверку на наличие патогенов. Контроль микробиологического статуса редеривированных животных в ЦКП «SPF-виварии» ИЦиГ СО РАН проводили с использованием иммунодефицитных животных-«индикаторов» (sentinel) линии SCID (Weisbroth *et al.*, 1998; Каркищенко, Грачева, 2010). Иммунодефицитные, атимичные, мыши не устойчивы к любой паразитарной атаке, что приводит к развитию у них признаков болезненного поведения и приводит к гибели или развитию патологии внутренних органов, а также к появлению спонтанных новообразований (Каркищенко, Грачева, 2010). Двух иммунодефицитных мышей с известным микробиологическим статусом линии SCID в возрасте 6 недель помещали в отдельные индивидуально вентилируемые клетки и в течение 6 недель экспонировали подстилкой дважды в неделю из 10 клеток редеривированных крыс линии ручных серых крыс (Weisbroth *et al.*, 1998). По окончании экспозиции проводили эвтаназию углекислым газом, брали мазок на липкую ленту с анальной области, кусочек шерсти, проводили патологоанатомическое вскрытие, извлекали кишечник, делали смыв из легкого и ротовой полости. Из клетки собирали образцы фекальных шариков для определения наличия яиц эндопаразитов методом флотации (Weisbroth *et al.*, 1998; Reuter, Dysko, 2003; Каркищенко, Грачева, 2010). По результатам проведения всех тестов на экто-, эндопаразитов, наличие/отсутствие клинических проявлений бактериальной и вирусной инфекций и результатам патологоанатомического вскрытия мышей линии SCID делали заключение о микробиологическом статусе редеривированных крыс линии ручных пасюков.

### **Оценка линейных характеристик редеривированных животных**

Характерной особенностью поведения серых крыс ручной линии является высокая толерантность к взятию их в руки (Plyusnina *et al.*, 2009, 2011). Оценку этого поведенческого показателя проводили по балльной системе в тесте на перчатку (Plyusnina, Oskina, 1997). Потомков от рожденных трансплантантов обоих полов в возрасте 2 мес. тестировали на перчатку.

Для измерения базального артериального давления (АД) у крыс линии НИСАГ применяли сфигмографический метод (*tail-cuff method*) (Bunag, 1984). С этой целью у крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, регистрировали пульс хвостовой артерии при помощи чувствительного датчика, соединенного с осциллографом. Затем в манжету, надетую на хвост, нагнетался воздух и при помощи манометра определяли давление в манжете в момент исчезновения пульсовой волны. Этот принцип является общепринятым при измерении систолического АД у крыс. АД измеряли у 2–3-месячных самцов крыс линии НИСАГ, полученных от скрещивания самцов и самок, прошедших редеривацию в SPF-виварии. В качестве сравнения использовали крыс линии НИСАГ из конвенционального вивария.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Проверка жизнеспособности эмбрионов мышей и крыс после примененных процедур замораживания–криоконсервации–оттаивания**

**Культивирование эмбрионов мышей после криоконсервации для проверки их жизнеспособности.** Всего было исследовано 77 эмбрионов, извлеченных у мышей линии ICR на третий день после спаривания на стадии дробления (до морулы включительно) и прошедших полный цикл замораживания–криоконсервации–оттаивания, из них 76 поставлено на культивирование (рис. 1, а).

Из поставленных на культивирование зародышей через 48 ч нахождения в культуре 54 эмбриона достигли стадии бластоцисты, причем бластоцисты были как ранние, так и

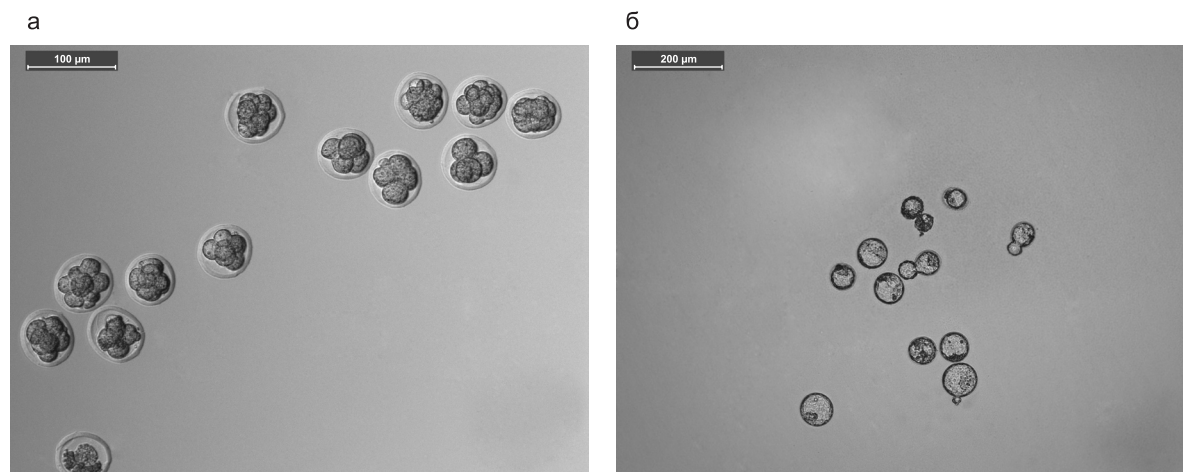
поздние, включая стадии вылупляющейся и вылупившейся бластоцисты (рис. 1, б), что является объективным показателем того, что эти эмбрионы сохранили жизнеспособность после криоконсервации. Остальные эмбрионы не развивались и дегенерировали через 48 ч, т. е. они не пережили процедуры криоконсервации.

Этот эксперимент был сделан в 4 независимых группах эмбрионов в разные дни, и в каждом из повторов было взято 12–25 зародышей. Доля развивающихся зародышей по четырем независимым повторам составила  $72,6 \pm 7,6\%$ . Таким образом, обобщенные цифры по трем повторам свидетельствуют о том, что в среднем  $72,6\%$  всех зародышей мышей, прошедших процедуру замораживания и криоконсервации, сохраняют жизнеспособность и потенциал к дальнейшему развитию.

**Оценка жизнеспособности эмбрионов крыс до и после криоконсервации методами световой и флюоресцентной микроскопии.** Для проверки жизнеспособности эмбрионов крыс до и после замораживания и криоконсервации был использован метод инкубации с флюоресцентными красителями. Было разморожено и окрашено 23 эмбриона крыс линии НИСАГ. Из них 18 эмбрионов сохраняли жизнеспособность, как показал тест с витальным красителем FDA. У остальных эмбрионов крыс после замораживания и криоконсервации либо отсутствовала оболочка, либо были погибшие бластомеры, как показал тест инкубации с PI (такие бластомеры не окрашивались FDA, однако их ядра окрашивались PI) (рис. 2, а). Эксперимент по оценке жизнеспособности крыс после криоконсервации с помощью флюоресцентной микроскопии был проделан в трех повторах. Доля живых зародышей, определенная при помощи этого метода, составила в среднем  $79,35 \pm 6,40$  (рис. 2, а, б).

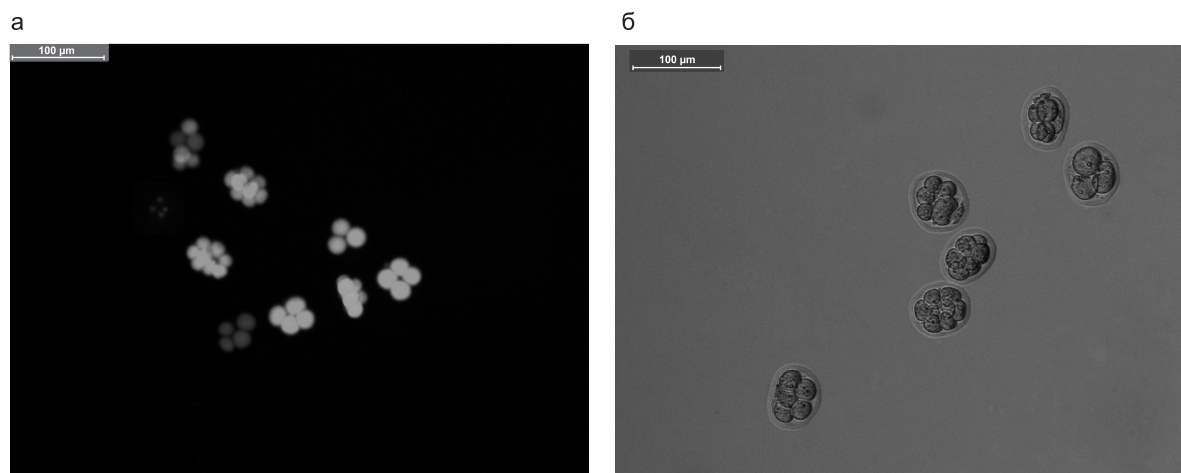
### **Эффективность различных процедур трансплантации эмбрионов при редеривации мышей линии ICR**

Эмбрионы мышей линии ICR были трансплантированы псевдобеременным гибридным самкам в трех группах. В группе, в которой эмбрионы не были подвергнуты культивированию, а после размораживания и стандартной



**Рис. 1.** Эмбрионы мышей линии ICR.

а – после замораживания и криоконсервации; б – после замораживания, криоконсервации и культивирования в течение 48 ч.



**Рис. 2.** Эмбрионы крысы после замораживания и криоконсервации.

а – флуоресцентная микроскопия после окраски с FDA (Sigma-Aldrich, США) и PI (Sigma-Aldrich, США); б – световая микроскопия.

десятикратной отмывки в стерильных средах были трансплантированы непосредственно в рог матки на третий день псевдобеременности, из 9 реципиентов лишь 2 принесли потомство, причем не более 3 потомков на родившую самку. В целом по этой группе лишь 4 эмбриона из 89 прошли полное развитие до рождения потомства (4,5 %).

В двух других экспериментальных группах доля эмбрионов, развившихся после трансплантации самкам-реципиентам до рождения, была достоверно выше, чем в первой группе (табл. 1).

В этих двух группах эмбрионы после размораживания перед трансплантацией реципиентам подвергали не только стандартной отмывке в стерильных средах, но и культивированию в течение 48 ч. Наилучшие результаты были получены в группе, в которой эмбрионы трансплантировали в один рог матки на третий день псевдобеременности реципиента. Из 7 самок 3 принесли потомство, причем число потомков в выводках было от 3 до 9. Именно в этой группе был зарегистрирован случай рекордно большого числа эмбрионов (90 %), родившихся после трансплантации одному



Таблица 1

Результаты редеривации/трансплантации эмбрионов мышей ICR гибридным реципиентам в разные дни псевдобеременности в один или оба рога матки после криоконсервации и культивирования *in vitro*

День псевдобеременности самки-реципиента	Число пересаженных эмбрионов	Число реципиентов		Число потомков		
		всего	родивших (доля от общего числа, %)	всего	разброс в группе родивших самок	доля развившихся потомков от общего числа пересаженных эмбрионов, %
Трансплантация эмбрионов в один рог матки (без культивирования)						
3	89	9	2 (22,2)	4	1–3	4,5
Трансплантация эмбрионов после культивирования <i>in vitro</i> в один рог матки						
3	79	7	3 (42,8)	15	3–9	18,9**
Трансплантация эмбрионов после культивирования <i>in vitro</i> в оба рога матки						
4	124	8	4 (50,0)	20	3–7	16,1*

Примечание. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с группой, в которой культивирование отсутствовало.

из реципиентов; этой самке-реципиенту было пересажено 10 эмбрионов и родилось 9 потомков. В целом по этой группе 15 эмбрионов из 79 трансплантированных прошли полное развитие до рождения потомства (18,9 %). В группе, в которой эмбрионы после размораживания, отмывки и культивирования пересаживали в оба рога матки на 4-й день псевдобеременности реципиентов, из 8 самок четыре принесли потомство. В целом по этой группе 20 эмбрионов из 124 трансплантированных прошли полное развитие до рождения потомства (16,1 %), причем величина выводков была от 3 до 7 потомков.

#### Линейные характеристики и микробиологический статус потомков после применения комплекса процедур редеривации на крысах

**Ручные крысы-пасюки.** После прямой трансплантации 38 эмбрионов ручных крыс 6 реципиентам два реципиента принесли потомство. Всего родилось 3 потомка ручных крыс, что составляет 7,9 % от числа пересаженных эмбрионов. Микробиологический статус этого потомства проверяли с помощью животных-индикаторов (сентинел) – линии мышей SCID. В течение 6-недельного срока у мышей линии SCID, в клетку к которым добавляли подстилку от редеривированных крыс, не наблюдалось

каких-либо признаков заболевания, и динамика увеличения веса соответствовала возрастным характеристикам, свойственным данной линии мышей. По окончании срока проверки мыши были подвергнуты эвтаназии. При вскрытии не было выявлено патологических изменений внутренних органов.

Путем обычного разведения (естественного размножения) в условиях SPF-вивария было получено следующее поколение от редеривированных крыс ручной линии. Животные этой группы были проанализированы в тесте на перчатку и показали высокие баллы ручного поведения. Средний балл по 12 самцам, рожденным после процедур редеривации в SPF-виварии, составил  $3,4 \pm 0,1$ . Средний балл по 13 самкам этой группы составил  $3,3 \pm 0,1$ .

Таким образом, тест с мышами-сентинелами подтвердил SPF-статус редеривированной линии ручных серых крыс, а проведенное тестирование продемонстрировало, что эти животные проявляют ручное поведение, характерное для данной линии.

**Крысы линии НИСАГ.** После трансплантации 90 эмбрионов крыс НИСАГ 9 реципиентам 3 самки реципиента принесли потомство. Всего родилось 6 потомков крыс линии НИСАГ, что составляет 6,7 % от числа пересаженных эмбрионов.

Путем естественного размножения в условиях SPF-вивария было получено следующее

поколение от редеривированных крыс данной линии. У 2-месячных самцов, полученных в результате такого разведения, был исследован уровень базального АД в покое в сравнении с самцами линии НИСАГ того же возраста и поколения селекции, полученными в условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН. У 7 самцов из группы редеривированных крыс НИСАГ среднее АД составило  $174,4 \pm 3,5$  мм рт. ст. У 12 самцов НИСАГ из конвенционального вивария среднее АД составило  $176,9 \pm 1,6$  мм рт. ст. Различий между этими группами обнаружено не было.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время как благодаря традиционной селекции, так и при помощи современных генноинженерных методов получено большое число различных линий мышей, моделирующих те или иные генетически обусловленные патологии человека (Abbott, 2004; Амстиславский, Трушкин, 2010). Одной из главных современных тенденций в экспериментальной работе на лабораторных животных является уменьшение числа экспериментальных животных за счет повышения их качества, так называемый принцип редукции (Festing, 2004). С этой целью конвенциональных животных подвергают редеривации, освобождая от патогенной нагрузки, и переводят в SPF-статус (Morrell, 1999; Sheck, 2008; Брусенцев и др., 2011).

С 1980-х годов перенос эмбрионов от доноров, несущих патогены, к «чистым» реципиентам SPF-статуса широко используется в качестве метода редеривации (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008). Этот метод является многоэтапным, требующим четкой работы группы квалифицированных сотрудников (Брусенцев и др., 2011). Несмотря на длительность и трудоемкость, именно трансплантацию эмбрионов в сочетании с их многократной отмывкой в стерильных средах можно считать «золотым стандартом редеривации», т. е. оптимальным способом очистки животных от подавляющего большинства патогенов (Carthew *et al.*, 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike *et al.*, 2007; Fray *et al.*, 2008).

Очистка извлеченных эмбрионов непосредственно перед их трансплантацией осуществляется путем отмывания их в стерильной питательной среде. Эту процедуру обычно осуществляют путем переноса зародышей по одному из капли в каплю (Mahabir *et al.*, 2007). При работе с эмбрионами сельскохозяйственных животных существует достаточно жестко регламентированный протокол, при котором отмывание осуществляют последовательно через 10 капель (Stringfellow, 1998). При работе с лабораторными грызунами столь жесткого регламента нет (Mahabir *et al.*, 2008). В данной статье приведены результаты работы по редеривации двух линий крыс и одной линии мышей, что является частью плановой работы по переводу ценных и уникальных генотипов, имеющихся в коллекции ИЦиГ СО РАН, из конвенционального вивария в SPF-виварий ИЦиГ СО РАН. В ходе работы мы придерживались жесткого протокола, принятого для сельскохозяйственных животных, и эмбрионы перед трансплантацией отмывали путем 10-кратного переноса через капли стерильной среды EM-CARE Holding Solution (ICPbio reproduction, США). Данная среда содержит три антибиотика: стрептомицин, амфотерицин и канамицин (персональное сообщение д-ра Ла Фальцы, компания Инвитроген, 2011).

Эффективность используемого протокола очистки после прямой трансплантации эмбрионов от линии ручных крыс реципиентам линии Spague-Dawley была проверена на животных-«индикаторах» микробиологического статуса (сентинелы). Использование животных-индикаторов является хорошо апробированным методом мониторинга колоний лабораторных животных на наличие патогенов (Sheck, 2008). Установлено, что животные-индикаторы могут быть того же или другого вида и должны иметь известный микробиологический статус (Weisbroth *et al.*, 1998). В данном исследовании в качестве животных-индикаторов использовали бестимусных мышей линии SCID, свободных от условно-патогенной и патогенной флоры, SOPF-статуса. Голые бестимусные мыши являются прекрасными индикаторами, поскольку у них имеется выраженный иммунодефицит и они особенно чувствительны к воздействию патогенов (Каркищенко, Грачева,

2010). По результатам проведения всех тестов на экто-, эндопаразитов, наличие/отсутствие клинических проявлений бактериальной и вирусной инфекций и патологоанатомического вскрытия был подтвержден SPF-статус редуцированных крыс.

Кроме практических задач, а именно перевода в SPF-статус уникальных линий крыс, полученных в ИЦиГ СО РАН, целью данной работы была оптимизация модели редеривации лабораторных грызунов, причем эта часть исследования была проведена в основном на мышах линии ICR. Мышь является одним из самых распространенных видов животных в биомедицинских исследованиях (Taft, 2008). Предпосылками этому служат сходство геномов мыши и человека (Waterston *et al.*, 2002), а также небольшой размер, короткая беременность, высокие репродуктивные способности мыши и изученное в деталях преимплантационное развитие эмбрионов (Handyside, Hunter, 1986; Hardy, Spanos, 2002).

При редеривации линий лабораторных мышей часто кроме трансплантации эмбрионов и соответствующих отмывок в стерильных средах используют такие вспомогательные технологии, как криоконсервация зародышей и семени, ЭКО, культивирование определенных стадий развития зародышей и гамет (Suzuki *et al.*, 1996; Morrell, 1999; Mahabir *et al.*, 2009). При этом, однако, следует помнить, что всевозможные дополнительные манипуляции с зародышами и гаметами перед их трансплантацией реципиенту, как правило, снижают эффективность всей процедуры в целом (Hardy *et al.*, 2002). Между тем четко регламентированного общепринятого протокола при редеривации лабораторных мышей и крыс путем трансплантации нет (Брусенцев и др., 2011).

Известно, что у мышей эффективность трансплантации в оба рога матки выше, чем при трансплантации в один рог (Wiebold, Becker, 1987). Наши результаты не подтвердили (но и не опровергли) выводы ранних исследований на мышах. Достоверных различий в эффективности процедуры после трансплантации эмбрионов в оба или один рог матки получено не было, однако это может быть связано с тем, что группы были малочисленными, и необходимы дальнейшие исследования для окончательных выводов.

Этиленгликоль считается одним из наименее токсичных криопротекторов (Moore, Bonilla, 2006), что было экспериментально подтверждено при программном замораживании преимплантационных эмбрионов мыши на различных стадиях развития (Emiliani *et al.*, 2000). При программном замораживании дробящихся эмбрионов мышей с 1,2–1,5 молярным раствором этиленгликоля в качестве криопротектора и последующем их культивировании *in vitro* до стадии бластоцисты развивалось 66–76 % размороженных зародышей (Miyamoto, Ishibashi, 1977; Emiliani *et al.*, 2000), что сопоставимо с полученными нами в аналогичных условиях результатами культивирования (72,5 %).

Показано, что конечный результат замораживания и криоконсервации мышинных зародышей зависит не только от примененного протокола замораживания, но и от генетической конституции эмбриона (Schmidt *et al.*, 1987; Dinnyes *et al.*, 1995). В работе Schmidt с соавт. (1987), например, был использован сходный протокол программного замораживания, как и в наших исследованиях, хотя в качестве криопротектора применен глицерин, а не этиленгликоль. Авторы данной работы продемонстрировали различную выживаемость зародышей 24 различных линий и стоков мышей после процедур замораживания и криоконсервации. Выживаемость зародышей, оцениваемая в данном случае по развитию *in vitro*, была от 27 до 75 %, причем имела место характерная выживаемость для каждого генотипа (повторяемость результатов).

В нашем исследовании при трансплантации эмбрионов мышей после их криоконсервации, последующей 10-кратной отмывки и культивирования в течение 48 ч эффективность процедуры оказалась достоверно выше, чем в группе, в которой культивирование не проводили. Причем это возрастание эффективности комплекса процедур редеривации при добавлении этапа культивирования подтвердилось как при трансплантации в один рог матки, так и при трансплантации в оба рога матки самок-реципиентов. Достигнутая в результате добавления этапа культивирования эффективность процедуры вполне соответствует мировым стандартам. В частности, в работе J.M. Morrell (1999) для редеривации линий мышей при переводе их в SPF-статус использовали те же самые

процедуры, что и в нашем исследовании (криоконсервацию эмбрионов, их отмывку после размораживания и трансплантацию псевдобеременным самкам-реципиентам), но не проводили культивирование зародышей после их отмывки. Эффективность редеривации по соотношению рожденных потомков к числу пересаженных зародышей в нашем исследовании оказалась выше, но лишь в тех двух группах, в которых применяли культивирование зародышей (Morgell, 1999).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что культивирование зародышей непосредственно перед трансплантацией после их криоконсервации и 10-кратной отмывки способствует повышению эффективности процедуры в целом. Одним из вероятных объяснений этому может быть то, что после культивирования зародышей в применявшейся нами системе редеривации они находились в оптимальной стадии синхронизации с реципиентами, т. е. стадия развития эмбриона опережала стадию развития псевдобеременности реципиента. Именно такого рода небольшая разница по срокам развития между эмбрионом и реципиентом (в пользу эмбриона) считается оптимальной при трансплантации эмбрионов у лабораторных животных (Pfaff *et al.*, 2000).

Как показали результаты анализа, в тесте с окрашиванием флюорохромами и последующим флюоресцентно-микроскопическим анализом более 79 % крысиных зародышей сохраняют жизнеспособность после примененных нами процедур замораживания и криоконсервации, что соответствует данным литературы по замораживанию эмбрионов других линий крыс в сходных условиях с применением этиленгликоля в качестве криопротектора (Miyamoto, Ishibashi, 1977; Pfaff *et al.*, 2000). Тем не менее при последующей трансплантации таких эмбрионов процент развившихся до рождения крысят был низким. Одним из объяснений такого несоответствия результатов, полученных *in vitro* и *in vivo*, может быть токсичность этиленгликоля, применяемого нами в качестве криопротектора, по отношению к крысиным зародышам, поскольку некоторые авторы указывают на токсические эффекты экспозиции ранних эмбрионов в этиленгликоле, которые проявляются не сразу, а на поздних этапах развития зародыша крысы

(Klug *et al.*, 2001). Другим возможным фактором, снижающим эффективность редеривации крыс, может быть сама модель трансплантации, так как показано, что для крыс очень важна синхронизация донора и реципиента, причем наиболее эффективные результаты трансплантации имеют место тогда, когда стадия развития эмбриона на момент трансплантации на 12 ч опережает стадии псевдобеременности реципиента (Han *et al.*, 2004). Таким образом, примененная нами на крысах модель редеривации нуждается в некоторой доработке, причем одним из перспективных направлений повышения эффективности этой модели может быть культивирование крысиных эмбрионов после их криоконсервации аналогично тому, как это было в случае редеривации мышей.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Елене Алексеевне Галустян и Ольге Николаевне Никитиной за помощь в работе с эмбрионами мышей и крыс; Никите Анатольевичу Морозову за помощь в замораживании и криоконсервации биологического материала; Наталье Юрьевне Сальниковой за организацию работ с реципиентами SPF-статуса; Виктории Витальевне Мак за помощь в организации работ с мышами и крысами в условиях конвенционального вивария.

## ЛИТЕРАТУРА

- Амтиславский С.Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих: Дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2006, 265 с.
- Амтиславский С.Я., Маркель А.Л., Якобсон Г.С. Повышение артериального давления у приемных матерей крыс НИСАГ и Вистар: эффект перекрестного воспитания потомства // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. 1999. Т. 85. С. 1496–1502.
- Амтиславский С.Я., Трукшин И.С. Криобанк эмбрионов млекопитающих: выбор приоритетов и оптимальных репродуктивных технологий // Онтогенез. 2010. № 1. С. 19–31.
- Брусенцев Е.Ю., Напимеров В.А., Амтиславский С.Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 102–113.
- Карих Т.Л., Молокеев А.В., Никулин Л.Г. Генетическая и биологическая характеристика неинбредных мышей колонии ICR // Генетика. 1999. № 3. С. 366–370.
- Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в

- биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С, 2010. 358 с.
- Маркель А.Л. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии // Изв. Ан. СССР. Сер. биол. 1985. Вып. 3. С. 466–469.
- Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов: Уч.-метод. пособие. СПб.: СОЛО, 2008. 72 с.
- Abbott A. Genetists prepare for deluge of mutant mice // Nature. 2004. V. 432. P. 541.
- Artwohl J.E., Purcell J.E., Fortman J.D. The use of cross-foster rederivation to eliminate murine norovirus, *Helicobacter* spp., and murine hepatitis virus from a mouse colony // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2008. V. 47. No. 6. P. 19–24.
- Baze W.B., Steinbach T.J., Fleetwood M.L. *et al.* Karyomegaly and intranuclear inclusions in the renal tubules of sentinel ICR mice (*Mus musculus*) // Comp. Med. 2006. V. 56. No. 5. P. 435–438.
- Bunag R.D. Measurement of blood pressure in rats // Handbook of Hypertension / Ed. W. De Jong. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. V. 4. P. 1–12.
- Carthew P., Wood M.J., Kirby C. Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer // J. Reprod. Fertil. 1983. V. 69. No. 1. P. 253–257.
- Chapin R.E., Gulati D.K., Barnes L.H., Teague J.L. The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats // Fundam. Appl. Toxicol. 1993. V. 20. No. 1. P. 23–29.
- Dinnyes A., Wallage G.A., Rall W.F. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods // Mol. Reprod. Dev. 1995. V. 40. P. 429–435.
- Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S. *et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts // Hum. Reprod. 2000. V. 15. No. 4. P. 905–910.
- Festing M. F. The choice of animal model and reduction // Altern. Lab. Anim. 2004. V. 32. Suppl. 2. P. 59–64.
- Fray M.D., Pickard A.R., Harrison M., Cheeseman M.T. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme // Lab. Anim. 2008. V. 42. No. 2. P. 127–139.
- Glage S., Dorsch M., Hedrich H.J., Bleich A. Rederivation of *Helicobacter hepaticus*-infected Mongolian gerbils by Caesarean section and cross-fostering to rats and mice // Lab. Anim. 2007. V. 41. No. 1. P. 103–110.
- Han M.S., Niwa K., Kasai M. *In vivo* development of vitrified rat embryos: effects of timing and sites of transfer to recipient females // Biol. Reprod. 2004. V. 70(2). P. 425–429.
- Handyside A.H., Hunter S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation // Roux's Arch. Dev. Biol. 1986. V. 195. P. 519–526.
- Hardy K., Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo // J. Endocrinol. 2002. V. 172. P. 221–236.
- Hardy K., Wright C., Rice S. *et al.* Future developments in assisted reproduction in humans // Reproduction. 2002. V. 123(2). P. 171–183.
- Hogan B., Constantiny F., Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. N.Y.: Spring Harbor Laboratory, 1986.
- Holinka C.F., Carlson A.D. Pup attraction to lactating Sprague-Dawley rats // Behav. Biol. 1976. V. 16. No. 4. P. 489–505.
- Homberger F.R. Enterotropic mouse hepatitis virus // Lab. Anim. 1997. V. 31. No. 2. P. 97–115.
- Ike F., Bourgade F., Ohsawa K. *et al.* Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice // Comp. Med. 2007. V. 57. No. 3. P. 272–281.
- Jones K.H., Senft J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide // J. Histochem. Cytochem. 1985. V. 33(1). P. 77–79.
- Klug S., Merker H.J., Jäckh R. Effects of ethylene glycol and metabolites on *in vitro* development of rat embryos during organogenesis // Toxicol. In Vitro. 2001. V. 15(6). P. 635–642.
- Kolbe T., Palme R., Touma C., Rüllicke T. Repeated use of surrogate mothers for embryo transfer in the mouse // Biol. Reprod. 2012. V. 86. No. 1. P. 1–6.
- Leibo S.P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // Theriogenology. 2002. V. 57. P. 303–326.
- Le Monnier A., Join-Lambert O.F., Jaubert F. *et al.* Invasion of the placenta during murine listeriosis // Infect. Immun. 2006. V. 74(1). P. 663–672.
- Lindstrom K.E., Carbone L.G., Kellar D.E. *et al.* Soiled bedding sentinels for the detection of fur mites in mice // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2011. V. 50. No. 1. P. 54–60.
- Luo C., Zuciga J., Edison E. *et al.* Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2011. V. 50. No. 4. P. 471–478.
- Macy J.D. Jr., Weir E.C., Compton S.R. Dual infection with *Pneumocystis carinii* and *Pasteurella pneumotropica* in B cell-deficient mice: diagnosis and therapy // Comp. Med. 2000. V. 50. No. 1. P. 49–55.
- Mahabir E., Bauer B., Schmidt J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world // ILAR J. 2008. V. 49. No. 3. P. 347–355.
- Mahabir E., Bulian D., Needham J., Schmidt J. Lack of transmission of mouse minute virus (MMV) from *in vitro*-produced embryos to recipients and pups due to the presence of cumulus cells during the *in vitro* fertilization process // Biol. Reprod. 2009. V. 81(3). P. 531–538.
- Marcotte H., Levesque D., Delaney K. *et al.* *Pneumocystis carinii* infection in transgenic B cell-deficient mice // J. Infect. Dis. 1996. V. 173. No. 4. P. 1034–1037.
- Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T. *et al.* Developmental Influences on Blood Pressure Regulation in ISIAH Rats // Handbook of Hypertension / Eds R. McCarty, D.A. Blizard, R.L. Chevalier. Elsevier Science, 1999. V. 19. P. 493–526.
- Miyamoto H., Ishibashi T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol // J. Reprod. Fertil. 1977. V. 50(2). P. 373–375.
- Mohr L., Trounson A. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse // J. Reprod. Fert. 1980. V. 58. P. 189–196.
- Moore K., Bonilla A.Q. Cryopreservation of mammalian

- embryos: the state of the art // *Annu. Rev. Biomed. Sci.* 2006. V. 8. P. 19–32.
- Morrell J.M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice // *Lab. Anim.* 1999. V. 33. No. 3. P. 201–206.
- Naumenko E.V., Popova N.K., Nikulina E.M. *et al.* Behavior, adrenocortical activity, and brain monoamines in Norway rats selected for reduced aggressiveness towards man // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989. V. 33. P. 85–91.
- Nicklas W., Baneux P., Boot R. *et al.* FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units // *Lab. Anim.* 2002. V. 36. No. 1. P. 20–42.
- Omar Farouk F.N., Stott D., Vlad M. Mouse embryo co-culture with autologous cumulus cells and fetal development post-embryo transfer // *Anim. Sci. J.* 2011. V. 82. No. 3. P. 420–427.
- Pfaff R.T., Agca Y., Liu J. *et al.* Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients for water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods // *Biol. Reprod.* 2000. V. 63(5). P. 1294–302.
- Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans // *Physiol. Behav.* 1997. V. 61(3). P. 381–385.
- Plyusnina I.Z., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K. Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human // *Behav. Genet.* 2009. V. 39. P. 202–212.
- Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Y., Oskina I.N. Effect of domestication on aggression in gray Norway rats // *Behav. Genet.* 2011. V. 41. No. 4. P. 583–592.
- Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X. *et al.* Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models // *ILAR J.* 2000. V. 41. No. 4. P. 221–227.
- Rapp J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80(1). P. 135–172.
- Reuter J.D., Dysko R.C. Quality assurance/surveillance monitoring programs for rodent colonies // *Laboratory animal medicine and management* / Eds J.D. Reuter, M.A. Suckow. www.ivis.org, Ithaca, 2003. N.Y., USA. P. 1–11.
- Schmidt H.M., Schiewe M.C., Wildt D.E. The genotypic response of mouse embryos to multiple freezing variables // *Biol. Reprod.* 1987. V. 37. P. 1121–1128.
- Sheck W.R. Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents // *ILAR J.* 2008. V. 49. No. 3. P. 316–325.
- Stringfellow D.A. Recommendation for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos // *Manual of the International Embryo Transfer Society.* 1998. P. 79–84.
- Suzuki H., Yorozu K., Watanabe T. *et al.* Rederivation of mice by means of *in vitro* fertilization and embryo transfer // *Exp. Anim.* 1996. V. 45. No. 1. P. 33–38.
- Taft R.A. Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system // *Theriogenology.* 2008. 69(1). P. 10–16.
- Van Keuren M.L., Saunders T.L. Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer // *Transgenic Res.* 2004. V. 13. No. 4. P. 363–371.
- Waterston R., Lindblad-Toh K., Birney E. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome // *Nature.* 2002. V. 420. P. 520–562.
- Watson J., Thompson K.N., Feldman S.H. Successful rederivation of contaminated immunocompetent mice using neonatal transfer with iodine immersion // *Comp. Med.* 2005. V. 55. No. 5. P. 465–469.
- Weisbroth S.H., Peters R., Riley L.K., Sheck W. Microbiological assessment of laboratory rats and mice // *ILAR.* 1998. V. 39(4). P. 272–290.
- Wiebold J.L., Becker W.C. Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the mouse // *J. Reprod. Fert.* 1987. V. 79. P. 125–134.
- Wilkinson J.M., Halley S., Towers P.A. Comparison of male reproductive parameters in three rat strains: Dark Agouti, Sprague-Dawley and Wistar // *Lab. Anim.* 2000. V. 34. P. 70–75.
- Williams C., Greenstein G., Kopec A., Hargaden M. Microbiological evaluation of a newly constructed animal facility // *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 2005. V. 44. No. 2. P. 7–11.
- Yeom S.C., Yu S.A., Choi E.Y. *et al.* Prevalence of *Helicobacter hepaticus*, murine norovirus, and *Pneumocystis carinii* and eradication efficacy of cross-fostering in genetically engineered mice // *Exp. Anim.* 2009. V. 58. No. 5. P. 497–504.

## REDERIVATION BY EMBRYO TRANSFER IN STRAINS OF LABORATORY MICE AND RATS

S.Ya. Amstislavsky<sup>1,2</sup>, T.N. Igonina<sup>1</sup>, I.N. Rozhkova<sup>1</sup>, E.Yu. Brusentsev<sup>1</sup>, A.A. Rogovaya<sup>2</sup>,  
D.S. Ragaeva<sup>2</sup>, V.A. Naprimerov<sup>1,3</sup>, E.A. Litvinova<sup>1</sup>, I.Z. Plyusnina<sup>1,2</sup>, A.L. Markel<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: amstis@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> State Higher Education Institution Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

### Summary

Rederivation allows laboratory animal populations to be purged from specified pathogens and thus turns these animals to the SPF (specified pathogens free) status. Results of the rederivation of two unique rat strains selected at the Institute of Cytology and Genetics and one mouse strain are presented. The two rat strains are: tame Norway rats and rats with Inherited Stress Induced Arterial Hypertension (ISIAH strain). The ICR mouse strain has been named as abbreviation of the Institute of Cancer Research wherefrom these mice were distributed to laboratories all over the world. The SPF status of the rats after rederivation was confirmed by the method of indicator animals (sentinel animals). The optimized model of rederivation offered here involves a combination of such embryotechnological methods as freezing/cryopreservation of embryos, their washing through the number of fresh volumes of sterile media, growing in vitro for 48 hours, and subsequent transfer into either one or both uterine horns of recipient females. Application of this model to rederivation of ICR mice yielded 39 pups born in an SPF vivarium. It should be noticed that the effectiveness of the procedure met international standards, and characteristic features of phenotype were retained in all the three strains after rederivation.

**Key words:** ISIAH rats, tame rats, ICR mice, embryo transfer, rederivation.