

ISSN 1817-7204 (Print)

ISSN 1817-7239 (Online)

ЖЫВЁЛАГАДОЎЛЯ І ВЕТЭРЫНАРНАЯ МЕДЫЦЫНА **ANIMAL HUSBANDRY AND VETERINARY MEDICINE**

УДК 636.92.082.12:602.6

<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2025-63-1-45-57>

Поступила в редакцию 03.11.2022

Received 03.11.2022

**Е. М. Колоскова, В. А. Езерский, Т. П. Трубицина, О. Б. Жукова, К. С. Остренко,
Н. В. Белова, И. И. Кутын, В. П. Рябых**

Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФИЦ животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Боровск, Российская Федерация

ТРАНСГЕННЫЕ КРОЛИКИ С ГЕНАМИ ГРАНУЛОЦИТ-КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА И ЗЕЛЕНОГО ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕГО БЕЛКА

Аннотация. Гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека (*GCSF*, ГКСФ) – один из белков фармакологического назначения, который может быть выделен из молока трансгенных (ТГ) животных. Была получена плазмида, содержащая ген *GCSF* человека под контролем регуляторных элементов гена β-лактоглобулина крупного рогатого скота, и ген репортерного зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*) под цитомегаловирусным (*cmv*) промотором. Использование выбранных промоторов обеспечивает тканеспецифичную экспрессию целевого белка в молочной железе ТГ животного-продуцента и высокий уровень ранней экспрессии репортерного белка в клетках эукариот, что позволяет детектировать ТГ эмбрионы на стадии культивирования и производить их предимплантационный отбор. Тестирование конструкции для оценки ее эффективности проводили на ТГ кроликах, полученных методом микроинъекции в мужской пронуклеус зигот. Был сделан вывод о токсичности *GFP* для эмбрионов на ранних стадиях развития из-за чрезмерной экспрессии гена *EGFP* под сильным *cmv* промотором. Была получена ТГ крольчиха (F0), у которой методом ИФА был оценен уровень ГКСФ человека в молоке и сыворотке крови. Из 22 крольчат, полученных от нее за четыре окрола, два были трансгенны. От ТГ самца F0 было получено потомство (F1), 56 % которого составляли самцы, из них 88 % были ТГ и по состоянию здоровья не отличались от обычных кроликов. Среди самок ТГ было 10 %, и они погибали в течение двух недель после рождения.

Ключевые слова: трансгенные кролики, микроинъекции, эмбрион, генная конструкция, *GCSF*, *EGFP*

Для цитирования: Трансгенные кролики с генами гранулоцит-колониестимулирующего фактора человека и зеленого флуоресцирующего белка / Е. М. Колоскова, В. А. Езерский, Т. П. Трубицина [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2025. – Т. 63, № 1. – С. 45–57. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2025-63-1-45-57>

**Elena M. Koloskova, Vadim A. Ezerskij, Tatjana P. Trubitsina, Olga B. Zhukova, Konstantin S. Ostrenko,
Nadezhda V. Belova, Ivan V. Kutijn, Vladimir P. Ryabykh**

All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Borovsk, Russian Federation

TRANSGENIC RABBITS WITH GENES OF HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR AND GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Abstract. Human granulocyte–colony stimulating factor (*GCSF*) is one of the pharmacological proteins that can be isolated from the milk of transgenic (TG) animals. The plasmid containing the human *GCSF* gene under the control of regulatory elements of the bovine β-lactoglobulin gene and the reporter green fluorescent protein (*EGFP*) gene under the cytomegalovirus (*cmv*) promoter were obtained. The use of the selected promoters ensures tissue-specific expression of the target protein in the mammary gland of the TG producing animal and a high level of early expression of the reporter protein in eukaryotic cells, which makes it possible to detect TG embryos at the cultivation stage and perform their preimplantation selection. Testing of the gene construct effectiveness was carried out on TG rabbits obtained by microinjection into the male pronucleus of zygotes. It was concluded that *GFP* is toxic to embryos in the early stages of development due to overexpression of the *EGFP* gene under a strong *cmv* promoter. The TG female rabbit (F0) was obtained, in which the level of human GKSF in milk

and blood serum was assessed by the ELISA method. Of the 22 baby rabbits obtained from her in four kindling, two were transgenic. Offspring (F1) was obtained from the TG male F0, 56 % of which were males, of which 88 % were TG and did not differ from ordinary rabbits in terms of health. Among females, TG was 10 %, and they died within two weeks after birth.

Keywords: transgenic rabbits, microinjections, embryo, genetic construct, *GCSF*, *EGFP*

For citation: Koloskova E. M., Ezerskiy V. A., Trubitsina T. P., Zhukova O. B., Ostrenko K. S., Belova N. V., Kutijn I. V., Ryabykh V. P. Transgenic rabbits with genes of human granulocyte colony-stimulating factor and green fluorescent protein. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2025, vol. 63, no. 1, pp. 45–57 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2025-63-1-45-57>

Введение. Молочную железу (МЖ) трансгенных (ТГ) сельскохозяйственных животных можно рассматривать как биореактор, являющийся альтернативой системам культивирования клеточных культур для получения высокоценных фармакологически активных рекомбинантных белков (РБ). Регуляторные последовательности генов молочных белков определяют тканеспецифичный характер экспрессии трансгена в клетках МЖ и используются в генных конструкциях при создании животных – продуцентов биологически активных белков. При целенаправленном переносе в геном данных генных конструкций, в случае их экспрессии в МЖ ТГ животных, вместе с молоком могут выделяться целевые РБ, количество которых может достигать нескольких миллиграммов и даже граммов на литр молока [1, 2]. В качестве животных-биореакторов обычно предпочитают использовать ТГ коз или коров. Тем не менее все предварительные эксперименты по оценке работы генных конструкций и их компонентов проводятся на мелких лабораторных животных – мышах и крысах. Кролики, будучи сельскохозяйственными животными, широко применяются в биомедицинских исследованиях и рассматриваются как варианты для экспрессии в МЖ высокоактивных белков фармакологического назначения, потребность в количестве которых относительно невелика [3, 4].

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) – гемопоетический гликопротеин, который является одним из физиологических регуляторов, специфически и высокоэффективно стимулирующих пролиферацию и дифференцировку гемопоетических предшественников нейтрофилов, увеличивает продолжительность жизни клеток костного мозга, усиливает функциональную активность зрелых нейтрофилов [5]. Присутствие рецепторов *GCSF* в различных клетках органов репродуктивной системы предполагает его значение в процессах оогенеза, овуляции, имплантации и развития беременности [6].

Рекомбинантный ГКСФ человека (*hGCSF*) используется для лечения анемий различной этиологии, повышает эффективность трансплантации костного мозга [7], позволяет восстановить уровень нейтрофилов, повысить иммунитет и избежать возникновения сопряженных инфекций [8]. В клинической практике используют препараты рекомбинантного *hGCSF*, полученные в системе клеток *E.coli* (филграстим) или в системе клеток яичников китайских хомячков (СНО) (ленограстим). Гликозилированный ленограстим по сравнению с филграстимом более идентичен природному *hGCSF* [9].

Работа по получению ТГ животных – биореакторов *hGCSF* ведется с начала 2000 г., когда была получена коза с интегрированным под промотором гена β -казеина козы геном *hGCSF* [10]. Содержание РБ в молоке не превышало 50 мкг/мл, коза не дала потомства. С генной конструкцией (ГК), содержащей регуляторные области гена α S1-казеина (*CSN1S1*) КРС, были получены ТГ мыши. Концентрация *hGCSF* в молоке достигала 1 мг/мл. Наблюдали эктопическую экспрессию трансгена, что вызывало нежелательную стимуляцию кроветворения у некоторых из мышей [11].

Использование в составе ГК регуляторных областей гена *CSN1S1* – 5'-региона козы (3387 п. н., 1-й экзон и интрон, часть 2-го экзона) и 3'-региона КРС (1518 п. н., с некодирующими экзонами 18 и 19) – позволило получить ТГ мышей с экспрессией *hGCSF* только в молоке. Это обеспечило у ТГ мышей тканеспецифичную экспрессию *hGCSF* с высокой биологической активностью в диапазоне 19–40 мкг/мл молока [12]. Вектор был запатентован как *pGoatcasGCSF* (патент RU2422529C1, «Генно-инженерная конструкция *pGoatcasGCSF*, обеспечивающая продукцию гранулоцит-колониестимулирующего фактора человека в молоко трансгенных животных», авторы – И. А. Серова, Г. А. Дворянчиков, Л. Е. Андреева, О. Л. Серов, опубл. 27.06.2011). Бразильско-российским коллективом ученых были получены козы с высоким уровнем РБ в молоке, способные к передаче трансгена потомству [13].

Ген цитокина гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (*GM-CSF*), фактора роста лейкоцитов, тоже стал объектом для трансгенеза: экспрессия *GM-CSF* под контролем регуляторных последовательностей *CSN/IS1* КРС [14] и козы [15] была специфичной для МЖ мышей (содержание в молоке на уровне 1 мг/мл и 14 мкг/мл молока соответственно). Методом искусственного осеменения трансфицированными сперматозоидами были получены ТГ куры с геном *hGCSF*, концентрация РБ в сыворотке крови была 50–220 пкг/мл [16].

Частота интеграции трансгена в геном животного при микроинъекции (МИ) в пронуклеус зиготы при традиционном способе получения ТГ животных, уровень экспрессии РБ в МЖ, как правило, невысоки. Особенно важной эта проблема становится при работе с малоплодными сельскохозяйственными животными – козами, овцами, коровами. Оптимизировать получение ТГ животных можно с использованием репортерных систем, подтверждающих наличие трансгена в эмбрионе на предимплантационной стадии [17]. *GFP* активно применяется при изучении *in vivo* генной экспрессии: для его флюоресценции не требуются субстрат или кофакторы, он термостабилен и устойчив к действию протеаз, не токсичен при использовании в качестве селекционного маркера у предимплантационных эмбрионов [18].

EGFP – вариант *GFP* с более высокой экстинкцией и эффективным фолдингом [19]. *EGFP* трансгенные мыши и крысы используются для моделирования заболеваний человека [20, 21], в тканевой инженерии [22]. С использованием в векторе экспрессии промотора β -актина курицы и энхансера *cmv* (*CAGGS*) были получены ТГ животные с тотальной экспрессией РБ, в том числе кролики [19, 23, 24]. ТГ животные с тканеспецифичной экспрессией *GFP* являются ценными объектами в доклинических исследованиях клеточной терапии и трансплантации [25].

Сильные промоторы, такие как *cmv* или промотор β -актина курицы, слитый с ранним энхансером *CMV-IE*, обеспечивают сильную экспрессию гена *GFP* в предимплантационных эмбрионах КРС: ее легко обнаружить в живых ТГ эмбрионах, с последующей их трансплантацией животным-реципиентам для создания ТГ линий домашних животных, продуцирующих с молоком белки человека терапевтического назначения [26].

Цель работы – создание генетической конструкции, содержащей ген *hGCSF* с регуляторными элементами гена β -лактоглобулина КРС (β Lg) и ген *EGFP* под *cmv* промотором, и оценка эффективности созданной ГК при получении ТГ кроликов – продуцентов *hGCSF* с молоком.

Материалы и методы исследований. **Создание ГК.** ДНК-фрагмент, содержащий структурный ген *GCSF* человека (GenBank: X03656.1, 1486 п. н.) с регуляторными областями гена β Lg КРС (5'-регион, 3002 п. н., включая 1-й экзон и часть 2-го экзона, с сохранением рамки считывания для кодирующей последовательности гена РБ, и 3'-регион – 1573 п. н.) был переклонирован по *Xba* I сайту из плазмиды *p β LgGC*, ранее созданной в нашей лаборатории [27], в *pBluescript II SK(-)*. В полученную плазмиду по *Not* I сайту рестрикции клонировали фрагмент *cmv-EGFP-PolyA site BGH*. Получение плазмиды *p β LgGCcmvEGFP* описано в нашей статье [28]. Из плазмиды *p β LgGCcmvEGFP* рестриктазой *Cla* I вырезали линейную ГК размером 7919 п. н. и после препаративного электрофореза выделяли из агарозного геля. Раствор очищенной ГК доводили до 8 нг/мкл, фильтровали через фильтр 0,22 мкм (Millipore), разносили по 3 мкл в стерильные пробирки и хранили при температуре –20 °С до использования. Аналогично для МИ готовили вырезанный из плазмиды *p β LgGC* по *Xba* I сайту фрагмент ГК размером около 6100 п. н. Сперматозоиды млекопитающих входят в яйцеклетки практически по касательной, при этом ядро разрывается, хроматин деконденсируется и реконструируется. Мужской пронуклеус увеличивается в размере, в то время как женский завершает второе деление мейоза. Центросома, сопровождающая мужской пронуклеус, продуцирует микротрубочки, по большей части из белков яйцеклетки, и контактирует с женским пронуклеусом. После этого каждый пронуклеус мигрирует по направлению к другому, реплицируя ДНК. Для наблюдения удобнее всего выбирать мужские пронуклеусы, которые в зиготах мыши всегда крупнее женских пронуклеусов, что облегчает видеонализ.

Получение кроличьих зигот. Кролики содержались в условиях вивария Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания животных (ВНИИФБиП). Суперовуляцию самок (возраст 1,5–2,5 года, вес 2,5–3,5 кг) вызывали методом гормональной

стимуляции. В целях получения максимального количества зигот у крольчих-доноров вызывали суперовуляцию инъекцией ФСГ по схеме: 1-й день – в 16.30; 2-й и 3-й дни – в 9.00 и 16.30; 4-й день – в 9.00, в 16.00 – ХГ человека (100 МЕ). Самок-доноров покрывали самцом и через 15, 17–19 ч после введения ХГЧ хирургическим методом извлекали зиготы. Собранные зиготы промывали в каплях свежеприготовленной среды и переносили в такие же капли свежеприготовленной среды под минеральным маслом (Sigma embryo tested, США).

Микроинъекция ГК в пронуклеусы кроличьих зигот. Микроинъектирование ГК в зиготы проводили под инвертированным микроскопом ICM-405 (производства фирмы Opton), снабженного оптикой Номарского (фирмы Nikon) и комплектом манипуляторов и микроинжекторов (производства фирмы Narishiga). Линейная ГК была инъектирована в мужской пронуклеус зигот через микроиглу с внешним диаметром 1,5–2 мкм в объеме 2–3 пкл, с концентрацией 7–8 мкг/мл. Зиготы, не разрушавшиеся в течение 1 ч после МИ, были трансплантированы синхронизированным крольчихам-реципиентам по 15–40 шт. поровну в оба яйцевода с помощью пластикового катетера. Часть микроинъектированных зигот была поставлена на культивирование.

Культивирование кроличьих эмбрионов *in vitro*. Для длительного культивирования зигот до стадии бластоцисты была использована среда Ham's F-10, обогащенная 20%-й эмбриональной сывороткой КРС (Eurobio, Франция). Культивирование проводили в пластиковых чашках Петри 40 мм (SPL, Корея) в каплях среды объемом 40 мкл под легким минеральным маслом (Sigma embryo tested) под газовой фазой 5 % CO₂ в воздухе при 38,5 °С. После этого бластоцисты были использованы для определения интеграции ГК в их геном методом флуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЦР-анализ кроличьих бластоцист. Бластоцисты, развившиеся из зигот, визуально оценивали под люминесцентным микроскопом при освещении синим светом и методом ПЦР. Бластоцисты отбирали из культуральной среды, по одной помещали в 10 мкл неполного буфера для лизиса (Протеиназа К 125 мкг/мл; Трис-НСl, pH 8,3, 100 мМ; KCl, 100 мМ; Tween 20, 0,45 %) и замораживали. Хранили при –20 °С до анализа. Перед анализом бластоцисты лизировали, для нейтрализации неинтегрированной ГК и устранения ложноположительных результатов проводили рестрикцию Dpn I. ПЦР проводили с использованием праймеров GFPE1 (AGCCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT) и GFPE2 (AGACTCGAGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTC), размер ПЦР-ампликона 750 п. н.

Определение ТГ кроликов. Геномную ДНК выделяли из кусочка уха двухнедельных крольчат. Для ПЦР-детекции *EGFP* использовали праймеры GFPE1-GFPE2. Для детекции β LgGC использовали праймеры β LgE14 (AAAGGCCGTGTCTCCAGT) и GC7 (GATCTCACAGGGGCCCTTG), размер ПЦР-ампликона 960 п. н.

Концентрацию ГКСФ человека в молоке и сыворотке крови определяли с использованием набора для иммуноферментного анализа ГКСФ человека в биологических жидкостях человека и культуральных средах производства ЗАО «Вектор-Бест» (G-CSF-ИФА-Бест Кат. № А-8786).

Результаты исследований и их обсуждение. Сравнивали влияние *cmvEGFP* фрагмента в составе ГК β LgGC*cmvEGFP* на развитие и выживаемость кроличьих эмбрионов в условиях культивирования. В качестве контроля брали зиготы, микроинъектированные буфером ТЕ и ГК β LgGC. Эмбрионы культивировали до стадии бластоцисты на протяжении 4 сут (96 ч), после чего оценивали их развитие и флуоресценцию *EGFP* (табл. 1).

До стадии бластоцисты-морулы из микроинъектированных эмбрионов контрольной группы развивалось 97 %. Введение в ГК гена *EGFP* под *cmv* промотором уменьшало эффективность развития эмбрионов на 28 % по сравнению с эмбрионами, микроинъектированными ГК без репортерного фрагмента: 60 и 88 % соответственно. Эффективность интеграции трансгена, оцененная по результатам свечения 2–16 клеточных эмбрионов, достигала 52 %, тогда как на стадии бластоцисты светилось 17 % (рис. 1). Эмбрионы, микроинъектированные β LgGC*cmvEGFP* и развившиеся до стадии бластоцисты-морулы, проверяли ПЦР-анализом (праймеры GFPE1-GFPE2). Из 53 проверенных эмбрионов трансген был обнаружен у 15: 28 % против 17 % светящихся в синем свете эмбрионов.

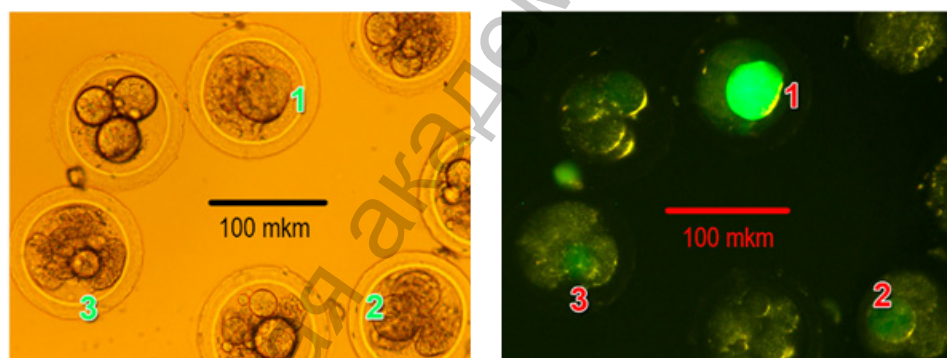
Таблица 1. Показатели развития зигот кролика *in vitro* после микроинъекции генной конструкции $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ и βLgGC (% относительно микроинъецированных зигот)Table 1. Indicators of rabbit zygote development *in vitro* after microinjection of $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ and βLgGC genetic constructs (% relative to microinjected zygotes)

Группа blastocyst		МИ	Культировано (≈ 96 ч)	Развилось до стадии		Светились в УФ	
				2–16 клеток	бластоцисты-морулы	2–16 клеток	бластоцисты-морулы
				N/%	N/%	N/%*	N/%*
К	ТЕ, буфер	30	30/100	1/3	29/97	–	–
I	$\beta\text{LgGCcmvEGFP}$	89	83/93	30/36	53/60	16/52	9/17
II	βLgGC	85	82/96	7/8	75/88	–	–

* % относительно развившихся до соответствующего состояния.

*% relative to the developed to the corresponding state.

Было проверено влияние длительности культивирования микроинъецированных ГК $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ эмбрионов на их жизнеспособность, приживляемость в организме животных-реципиентов (табл. 2). У крольчих-реципиентов зиготы, микроинъецированные ГК, приживлялись почти так же, как и контрольные (7 и 6 крольчат в помете). Приживляемость эмбрионов, развившихся *in vitro* до стадии бластоцисты, была почти в два раза ниже (4 крольчонка в помете). Кроме того, при трансплантации эмбрионов, микроинъецированных ГК, более чем в 2 раза снижалось число сукрольных реципиентов по сравнению с контролем (33 против 80 %). Из 36 родившихся крольчат F0 у двух (6 %) ПЦР-анализ показал наличие в геноме трансгенов *GCSF* и *EGFP* (табл. 3).

Рис. 1. Фотографии эмбрионов кролика, микроинъецированных конструкцией $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$, культивируемых до стадии бластоцисты (слева – в видимом свете, справа – в синем свете (480 нм)). Цифрами обозначены эмбрионы с выраженной флуоресценцией: 1 – двухклеточный эмбрион; 2 и 3 – мозаичные эмбрионыFig. 1 Photos of rabbit embryos microinjected by the $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ construct, cultured to the blastocyst stage (on the left – in visible light, on the right – in blue light (480 nm)). The numbers indicate embryos with evident fluorescence: 1 – a two-cell embryo; 2 and 3 – mosaic embryosТаблица 2. Приживляемость микроинъецированных генной конструкцией $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ эмбрионов разных стадий развитияTable 2. Acceptability of embryos, microinjected by the $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ genetic construct, at different stages of development

Характеристика эмбрионов	Число реципиентов / родивших	Трансплантировано эмбрионов / на одного реципиента	Родилось крольчат (♂/♀)	Родилось / трансплантировано, %	Количество крольчат на одну родившую крольчиху
Контроль	5/4	110/22	28 (15/13)	25	7
МИ зиготы	7/4	154/22	24 (11/13)	16	6
МИ бластоцисты	5/3	95/19	12 (7/5)	13	4

Таблица 3. Общая эффективность получения трансгенных кроликов при трансплантации эмбрионов разных стадий развития, микроинъектированных генной конструкцией $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ Table 3. The overall efficiency of obtaining transgenic rabbits during transplantation of embryos at different development stages, microinjected with $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$ genetic construct

Характеристика эмбрионов	Число реципиентов / число родивших	Трансплантировано эмбрионов	Родилось крольчат		Общая эффективность трансгенноза, %
			всего	из них трансгенных, N/%	
МИ зиготы	12/7	249	36	2/6	0,8

Трансгенная самка № 13 (R) при скрещивании с нетрансгенными самцами в результате 4 окролов принесла 26 крольчат, из которых 22, в том числе 2 ТГ, погибли сразу или в течение нескольких суток после рождения. ПЦР-анализ ДНК, выделенной из органов и тканей крольчихи F0, умершей вскоре после 4-го окрола, показал наличие трансгена в пробе уха, мышечной ткани, сердце, почках, яичниках, и отсутствие – в легких, печени, толстом и тонком кишечнике (рис. 2).



Рис. 2. Тушка крольчихи № 13 в видимом и синем свете (a); освеженная тушка: полусухожильная, двуглавая мышцы бедра, ягодичные и длиннейшая мышца спины заметно различаются по цвету (b); образцы мышечной ткани в видимом (c) и синем свете (d)

Fig. 2. The carcass of rabbit No. 13 in visible and blue light (a); the skinned carcass: semitendinous, biceps thigh muscles, gluteal and the longest back muscle significantly differ in color (b); muscle tissue samples in visible (c) and blue light (d)

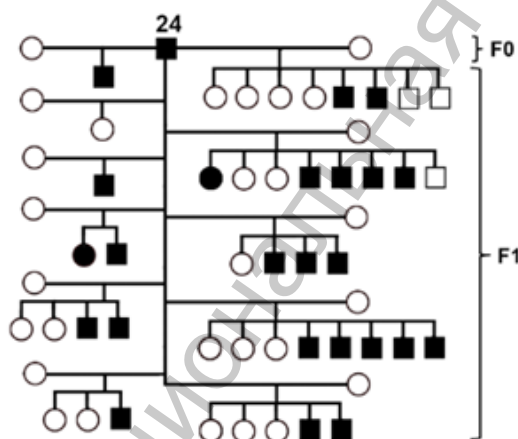


Рис. 3. Наследование трансгена у потомков трансгенного самца № 24 в F1 от скрещивания с нетрансгенными животными (круг – самка, квадрат – самец, черная заливка – трансген)

Fig. 3. Inheritance of transgene in descendants of transgenic male No. 24 in F1 after crossing with non-transgenic animals (circle – female, square – male, black fill – transgene)

Во время первой лактации для определения содержания чГКСФ в молоке у крольчихи № 13 на 2, 15, 25 и 35-е сут брали пробы. Молоко разбавляли в 10, 100 и 1000 раз в отмывочном буфере из набора для проведения ИФА. В отмывочный буфер предварительно добавляли БСА (Sigma, A4503) до 1 %. В качестве отрицательного контроля использовали молоко нетрансгенной крольчихи в таких же разведениях. Сыворотки крови проверяли без разведения.

У нетрансгенных крольчих ($N = 7$) в сыворотке крови ГКСФ не был обнаружен у 5 особей, у двух других – (20 ± 2) и (56 ± 4) пг/мл, в молоке ГКСФ отсутствовал. У ТГ крольчихи содержание ГКСФ в крови было (19 ± 1) пг/мл, а в молоке на 2-е сут лактации – 7 нг/мл, и на 25-е и 35-е сут лактации 77 и 200 нг/мл соответственно.

В отличие от ТГ самки самец № 24 (F0) в результате скрещивания с нетрансгенными крольчихами произвел многочисленное потомство (рис. 3). От 11 самок было получено 45 потомков F1: 25 (56 %) самцов

и 20 (44 %) самок. Из 25 самцов 22 (88 %) были трансгенны. Из 20 самок ТГ было всего 2 (10 %), и они погибли в течение двух недель после рождения.

Был проведен ПЦР-анализ геномной ДНК, выделенной из органов и тканей выборочных ТГ потомков кролика № 24, показавший наличие трансгена во всех образцах.

Для получения высокого уровня экспрессии в клетках млекопитающих используются сильные промоторы/энхансеры, такие как промотор цитомегаловируса человека [29], популярный для экспрессии коммерческих рекомбинантных антител в клетках млекопитающих [30]. Однако в условиях *in vivo* эффективность экспрессии РБ может повредить развитию живого организма. В наших исследованиях до состояния бластоцисты-морулы развивалось 88 % зигот, микроинъецированных ГК βLgGC и не более 60 % с ГК $\beta\text{LgGCcmvEGFP}$. Около 52 % эмбрионов имели интенсивное свечение на стадии 2–16 клеток, но на стадии бластоцисты происходило трехкратное снижение количества светящихся эмбрионов (табл. 1). При этом светились не вся бластоциста, а несколько ее клеток, что является свидетельством мозаицизма эмбриона. ПЦР-анализ развившихся бластоцист показал, что реальное количество из них трансгенных было не визуальные 17 %, а 28 % (включая все светящиеся бластоцисты). Полученные результаты подтверждаются работой [31], показавшей, что при микроинъецировании зигот ГК, содержащими *EGFP* под различными промоторами, частота развития эмбрионов кроликов до стадии морулы была самой низкой для конструкций с *cmv* промотором, при этом эффективность интеграции трансгена (15 %), мозаицизм (60 %) были самыми высокими. Высокая степень мозаичности эмбрионов КРС (75 %) в аналогичном эксперименте была показана и для трансгена *EGFP* под сильным промотором бета-актина курицы, раннего энхансера *CMV-IE*, и последовательностью полиаденилирования бета-глобина кролика [32].

Несмотря на общепринятое мнение о нетоксичности флуоресцентных белков для организма и клеток млекопитающих, было показано, что *GFP* может ухудшать здоровье ТГ животных. У мышей и кроликов с тотальной экспрессией репортерного белка наблюдали гломерулосклероз, а специфичная для сердца экспрессия *GFP* вызывала дилатационную кардиомиопатию, задержку роста у мышей ТГ линий, что нужно учитывать при применении *GFP*-трансгенных животных в биомедицинских исследованиях [32].

Пронуклеус – аналог ядра – практически не содержит ферментов, деградирующих ДНК, поэтому инъецированная ДНК может сохраняться продолжительное время, не менее одного клеточного цикла (а в реальности сохраняется даже после 3–5 делений [33]) и, соответственно, встраиваться в геном на любом из клеточных делений. Мозаичное встраивание трансгена может происходить как в клетки, образующие эмбриобласт, так и в клетки, образующие трофобласт. В первом случае с высокой вероятностью из эмбриона разовьется и родится полноценное ТГ животное, а при интеграции ГК в клетки, образующие трофобласт, ТГ животных получить не удастся. Можно сделать вывод, что метод определения трансгенности по интенсивности свечения может быть использован для отбора ТГ эмбрионов. При этом целесообразно брать эмбрионы на стадии ранней бластоцисты, в которых флуоресцируют все клетки. Также целесообразно принять за ориентир интенсивность свечения эмбриона.

В связи с тем, что при использовании ГК, содержащих маркерный ген *EGFP*, после микроинъецирования в пронуклеусы зигот, их приходится культивировать *in vitro* до стадии бластоцисты и затем эти бластоцисты трансплантировать животным-реципиентам, возникает вопрос о влиянии длительности культивирования *in vitro* на жизнеспособность эмбрионов и их приживляемость в организме животных-реципиентов. Эксперимент показал (табл. 2), что у сукрольных реципиентов зиготы, микроинъецированные ГК, приживлялись (соотношение родилось/трансплантировано, %) лучше, чем эмбрионы, развивавшиеся *in vitro* до стадии бластоцисты (16 и 13 % соответственно), количество крольчат в гнезде было 6 и 4.

В нашем эксперименте доля ТГ крольчат среди рожденных была 6 %, а общая эффективность трансгеноза, посчитанная как отношение количества рожденных ТГ кроликов к количеству трансплантированных эмбрионов, – 0,8 %. Первый показатель оказался хуже, чем в работе наших коллег, использовавших ГК для экспрессии лактоферрина человека в молочной железе: доля ТГ крольчат была 7 % [34]. Общая эффективность трансгеноза при этом была такой же, как и в нашем эксперименте (0,9 и 0,8 %), что соответствует мировому уровню при получении ТГ

животных методом микроинъектирования ГК в пронуклеусы зигот. Низкую долю ТГ крольчат среди рожденных в нашем случае можно объяснить наличием в ГК гена *EGFP* под сильным промотором: экспрессия гена на ранних стадиях приводила к сверхэкспрессии зеленого флуоресцентного белка. Скорее всего, большинство таких эмбрионов погибали на ранних сроках беременности реципиентов.

У обоих ТГ кроликов, полученных в нашем эксперименте, ПЦР-анализ геномной ДНК, выделенной из пробы кончика уха и лейкоцитов, подтвердил наличие обеих частей генной конструкции. Мы наблюдали мозаичный тип наследования трансгена в потомстве F1 самки № 13 от скрещивания ее с нетрансгенными самцами: соотношение ТГ : неТГ было 1 : 11. Это свидетельствовало о том, что гаметы крольчихи были представлены двумя типами: с трансгеном и без него. В результате мозаицизма гамет в потомстве F1 происходит отклонение от менделевского расщепления 1 : 1 с увеличением доли нетрансгенных потомков. Мозаичность впоследствии была подтверждена ПЦР-анализом ДНК, выделенной из разных органов и тканей. Следует отметить, что потомство, полученное от крольчихи № 13, быстро погибало: мать отказывалась выкармливать новорожденных, часть крольчат были мертворожденными.

Самец № 24, напротив, дал многочисленное потомство F1, в котором преобладали самцы (56 %), почти все они были трансгенными (88 %). Среди самок доля ТГ была всего 10 %, они были нежизнеспособны. Можно предположить, что доля ТГ эмбрионов-самок в период внутриутробного развития была близка к таковой у эмбрионов-самцов, но их большая часть погибла внутриутробно. В результате из-за высокой эмбриональной смертности их доля в числе родившихся была низкой. Это объясняет преобладание самцов в F1. Наследование трансгена в потомстве F1 самца № 24 от скрещивания его с нетрансгенными самцами было 24 : 21, что близко к менделевскому 1 : 1, но если брать во внимание нашу гипотезу о внутриутробно погибших ТГ самках, это соотношение значительно выше в сторону трансгенных потомков.

Факт преобладания ТГ потомков-самцов и нежизнеспособность ТГ самок нуждается в объяснении. Возможно, у самца № 24 (F0) произошла интеграция трансгена в Y-хромосому и передача трансгена по наследству идет только по мужской линии, т. е. получилось сцепление с мужским полом. Этот факт при наличии нетрансгенных самцов F1 свидетельствует о мозаичном встраивании трансгена, но не объясняет факт появления ТГ самок в F1. Как правило, интеграция трансгена происходит случайным образом в один локус реципиентного генома, зачастую в нескольких копиях. Трансген попадает в разное хромосомное окружение, следствием чего является достаточно выраженная вариабельность в его экспрессии у разных ТГ животных [34]. Можно осторожно предположить, что наша ГК интегрировалась не только в Y-хромосому самца F0, но и в другую хромосому, повредив локус, жизненно необходимый для нормального функционирования женского организма. Хотя вероятность такой двойной интеграции мала, в совокупности с мозаицизмом, в том числе гамет, наблюдаемая нами наследуемость трансгена может быть объяснена.

Одной из целей нашей работы было получение ТГ кроликов с тканеспецифичной экспрессией ГКСФ человека в МЖ, для чего мы использовали регуляторные области гена *βLg* в составе ГК. В других работах для этой цели применяли регуляторные последовательности генов других молочных белков: β-казеина козы [10], *CSN1S1* КРС [11, 14] и козы [12, 13, 15]. Самое высокое содержание ГКСФ человека (в среднем 620 мкг/мл) было в молоке трансгенных коз [13]. В молоке нашей ТГ крольчихи содержание ГКСФ на 5 сут первой лактации достигало 200 нг/мл. Экспрессия была тканеспецифичной. Несмотря на низкое содержание ГКСФ, нельзя сделать однозначный вывод об эффективности использованной генной конструкции. Как уже было упомянуто, для экспрессии важное значение имеет сайт интеграции трансгена (хромосомное окружение), количество его встроенных копий [33]. Не исключено, что при получении нескольких линий ТГ по этой ГК кроликов у одной из них были бы удовлетворительные показатели.

Заключение. Были получены трансгенные кролики с интегрированной конструкцией, включающей нуклеотидные последовательности гена *GCSF* человека под контролем регуляторных последовательностей гена бета-лактоглобулина КРС и репортерный экспрессирующий ген зеленого белка под цитомегаловирусным промотором (*βLgGCMV-EGFP*). У обоих кроликов была мозаичность встраивания трансгена, что наблюдалось в доле трансгенных потомков в F1. Метод определения трансгенности предимплантационных эмбрионов по интенсивности свечения про-

дуктов экспрессии гена зеленого белка может быть использован для отбора эмбрионов. При этом целесообразно брать эмбрионы на стадии ранней бластоцисты, в которой флуоресцируют все клетки. Трансгенез с микроинъекцией классической генной конструкции в пронуклеус приводит к появлению F0 животных с интеграцией трансгена в случайные сайты генома, что не всегда обеспечивает ожидаемую и возможную его экспрессию. Необходимо получать несколько F0 животных, чтобы создать устойчивую линию ТГ животных с желательными характеристиками. Современные методы геномного редактирования позволяют сделать процесс получения ТГ животных более эффективным.

Список использованных источников

1. Kues, W. A. Advances in farm animal transgenesis / W. A. Kues, H. Niemann // Preventive Veterinary Medicine. – 2011. – Vol. 102, № 2. – P. 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.009>
2. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production / L. R. Bertolini, H. Meade, C. R. Lazzarotto [et al.] // Transgenic Research. – 2016. – Vol. 25, № 3. – P. 329–343. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9933-9>
3. Transgenic rabbits for the production of biologically-active recombinant proteins in the milk / F. O. Castro, J. Limonta, A. Rodriguez [et al.] // Genetic Analysis: Biomolecular Engineering. – 1999. – Vol. 15, № 3–5. – P. 179–187. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(99\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(99)00024-8)
4. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор) / Е. М. Колоскова, В. Н. Каркищенко, В. А. Езерский [и др.] // Биомедицина. – 2019. – Т. 15, № 4. – P. 12–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>
5. Mechanisms of hemostimulating effects of granulocytic CSF and pantothenic acid under conditions of cytostatic myelosuppression / L. A. Miroshnichenko, V. V. Shdanov, G. N. Zyuz'kov [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2011. – Vol. 150, № 6. – P. 702–706. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1228-9>
6. Possibilities of using granulocyte colony-stimulating factor in reproductive medicine. A literature review / C. T. Nguyen, D. A. Niauri, N. I. Tapilskaya, A. M. Gzgzyan // Journal of Obstetrics and Women's Diseases. – 2021. – Vol. 70, № 2. – P. 119–128. <https://doi.org/10.17816/JOWD43587>
7. Metcalf, D. Biochemistry of the colony-stimulating factors / D. Metcalf, N. A. Nicola // The hematopoietic colony-stimulating factors. From biology to clinical applications / D. Metcalf, N. A. Nicola. – Cambridge [etc.], 1995. – P. 44–64. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511663376.005>
8. Скрыпник, К. А. Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор в клинической практике / К. А. Скрыпник, В. С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 19–24.
9. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества / Ж. И. Авдеева, А. А. Солдатов, Н. А. Алпатова [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2015. – № 1 (53). – С. 4–14.
10. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat / J. H. Ko, Ch.-S. Lee, K. H. Kim [et al.] // Transgenic Research. – 2000. – Vol. 9, № 3. – P. 215–222. <https://doi.org/10.1023/a:1008972010351>
11. Секрета биологически активного гранулоцит колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека в молоке трансгенных мышей / Г. А. Дворянчиков, И. А. Серова, Л. Е. Андреева [и др.] // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 10. – С. 1330–1337.
12. A 3,387 bp 5'-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice / I. A. Serova, G. A. Dvoryanchikov, L. E. Andreeva [et al.] // Transgenic Research. – 2012. – Vol. 21, № 3. – P. 485–498. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9547-1>
13. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression / V. J. F. Freitas, I. A. Serova, R. R. Moura [et al.] // Small Ruminant Research. – 2012. – Vol. 105, № 1–3. – P. 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.009>
14. Bovine alpha s1-casein gene sequences direct highlevel expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice / M. Uusi-Oukari, J.-M. Hyttinen, V.-P. Korhonen [et al.] // Transgenic Research. – 1997. – Vol. 6, № 1. – P. 75–84. <https://doi.org/10.1023/a:1018461201385>
15. Expression of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (*hGM-CSF*) gene under control of the 5'-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice / I. A. Burkov, I. A. Serova, N. R. Battulin [et al.] // Transgenic Research. – 2013. – Vol. 22, № 5. – P. 949–964. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9697-4>
16. Самойлов, А. В. Получение трансгенных кур с геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека методом опосредованного генного переноса с помощью сперматозоидов / А. В. Самойлов, А. З. Кесян, Н. М. Сураева // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2013. – № 5. – С. 517–521. <https://doi.org/10.7868/S0002332913040140>
17. Noninvasive fluorescent screening of microinjected bovine embryos to predict transgene integration / S. J. Rosochacki, L. Kozikova, M. Korwin-Kossakowski [et al.] // Folia Biologica. – Krakow, 2003. – Vol. 51, № 1–2. – P. 97–104.

18. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene / M. Kato, K. Yamanouchi, M. Ikawa [et al.] // *Molecular Reproduction and Development*. – 1999. – Vol. 54, № 1. – P. 43–48. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199909\)54:1<43::aid-mrd6>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199909)54:1<43::aid-mrd6>3.0.co;2-n)
19. Zimmer, M. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond / M. Zimmer // *Chemical Society Reviews*. – 2009. – Vol. 38, № 10. – P. 2823–2832. <https://doi.org/10.1039/b904023d>
20. New Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rat transgenic models with ubiquitous expression of green fluorescent protein / A. I. Garcia-Diaz, B. Moyon, P. M. Coan [et al.] // *Disease Models & Mechanisms*. – 2016. – Vol. 9, № 4. – P. 463–471. <https://doi.org/10.1242/dmm.024208>
21. Effect of hormone modulations on donor-derived spermatogenesis or colonization after syngeneic and xenotransplantation in mice / G. Shetty, Z. Wu, T. N. A. Lam [et al.] // *Andrology*. – 2019. – Vol. 7, № 2. – P. 257–265. <https://doi.org/10.1111/andr.12571>
22. Early tissue formation on whole-area osteochondral defect of rabbit patella by covering with fibroin sponge / E. Hirakata, N. Tomita, Y. Tamada [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials*. – 2016. – Vol. 104, № 7. – P. 1474–1482. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33656>
23. Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits / K. Katter, A. M. Geurts, O. Hoffmann [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2013. – Vol. 27, № 3. – P. 930–941. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205526>
24. Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line / R. Takahashi, T. Kuramochi, K. Aoyagi [et al.] // *Transgenic Research*. – 2007. – Vol. 16, № 1. – P. 115–120. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9043-1>
25. Murakami, T. GFP-transgenic animals for in vivo imaging: rats, rabbits, and pigs / T. Murakami, S. Kobayashi // *In vivo cellular imaging using fluorescent proteins: methods and protocols* / ed. R. M. Hoffman. – New York, 2012. – P. 177–189. – (Methods in Molecular Biology; vol. 872). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-797-2_12
26. Езерский, В. А. Создание генно-инженерной конструкции, содержащей структурный ген GCSF человека под контролем регуляторных элементов гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота / В. А. Езерский, Л. Б. Иванова, В. Г. Шевченко // *Проблемы биологии продуктивных животных*. – 2007. – № 1. – С. 123–131.
27. Генетическая конструкция, включающая кодирующую последовательность Г-КСФ человека с регуляторными областями гена β -лактоглобулина КРС и репортерный ген EGFP / В. А. Езерский, Е. М. Колоскова, Т. П. Трубицина [и др.] // *Проблемы биологии продуктивных животных*. – 2018. – № 3. – С. 35–44. <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.3.35-44>
28. Chrenek, P. Quality of transgenic rabbit embryos with different EGFP gene constructs / P. Chrenek, M. Bauer, A. V. Makarevich // *Zygote*. – 2011. – Vol. 19, № 1. – P. 85–90. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000109>
29. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus / M. Boshart, F. Weber, G. Jahn [et al.] // *Cell*. – 1985. – Vol. 41, № 2. – P. 521–530. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80025-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80025-8)
30. Birch, J. R. Antibody production / J. R. Birch, A. J. Racher // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2006. – Vol. 58, № 5–6. – P. 671–685. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.12.006>
31. Khan, K. H. Gene expression in Mammalian cells and its applications / K. H. Khan // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>
32. Lipták, N. GFP transgenic animals in biomedical research: a review of potential disadvantages / N. Lipták, Z. Bösze, L. Hiripi // *Physiological Research*. – 2019. – Vol. 68, № 4. – P. 525–530. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934227>
33. Серов, О. Л. Трансгенные животные: фундаментальные и прикладные аспекты / О. Л. Серов // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1055–1064.
34. Эффективность интеграции гена лактоферрина человека в геном мыши и кролика / С. И. Тевкин, М. С. Шишиморова, В. А. Езерский [и др.] // *Сельскохозяйственная биология*. – 2009. – Т. 44, № 2. – С. 55–61.

References

1. Kues W. A., Niemann H. Advances in farm animal transgenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, 2011, vol. 102, no. 2, pp. 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.009>
2. Bertolini L. R., Meade H., Lazzarotto C. R., Martins L. T., Tavares K. C., Bertolini M., Murray J. D. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Research*, 2016, vol. 25, no. 3, pp. 329–343. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9933-9>
3. Castro F. O., Limonta J., Rodriguez A., Aguirre A., de la Fuente J., Aguilar A., Ramos B., Hayes O. Transgenic rabbits for the production of biologically-active recombinant proteins in the milk. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 1999, vol. 15, no. 3–5, pp. 179–187. [https://doi.org/10.1016/s1050-3862\(99\)00024-8](https://doi.org/10.1016/s1050-3862(99)00024-8)
4. Koloskova E. M., Karkischenko V. N., Yezersky V. A., Petrova N. V., Maksimenko S. V., Matveyenko E. L. Rabbit biomodels of human diseases developed using new genomic technologies. CRISPR/Cas9 (review). *Biomeditsina = Journal Biomed*, 2019, vol. 15, no. 4, pp. 12–33 (in Russian). <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>
5. Miroshnichenko L. A., Shdanov V. V., Zyuz'kov G. N., Simanina E. V., Stavrova L. A., Udut E. V., Khrichkova T. Y., Minakova M. Y., Goldberg V. E., Dygai A. M. Mechanisms of hemostimulating effects of granulocytic CSF and panto-hematogen under conditions of cytostatic myelosuppression. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2011, vol. 150, no. 6, pp. 702–706. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1228-9>

6. Nguyen C., Niauri D. A., Tapilskaya N. I., Gzgzryan A. M. Possibilities of using granulocyte colony-stimulating factor in reproductive medicine. A literature review. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2021, vol. 70, no. 2, pp. 119–128. <https://doi.org/10.17816/JOWD43587>
7. Metcalf D., Nicola N. A. Biochemistry of the colony-stimulating factors. *The hematopoietic colony-stimulating factors. From biology to clinical applications*. Cambridge [etc.], 1995, pp. 44–64. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511663376.005>
8. Skrypnik K. A., Kosorukov V. S. Human granulocyte-colony stimulating factor as a new therapeutic agent in clinic. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2011, vol. 10, no. 2, pp. 19–24 (in Russian).
9. Avdeeva Zh. I., Soldatov A. A., Alpatova N. A., Kiselevsky M. V., Lysikova S. L., Bondarev V. P., Medunitsyn N. V., Mosyagin V. D., Merkulov V. A., Mironov A. N. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2015, no. 1 (53), pp. 4–14 (in Russian).
10. Ko J. H., Lee C. S., Kim K. H., Pang M. G., Koo J. S., Fang N., Koo D. B., Oh K. B., Youn W. S., Zheng G. D., Park J. S., Kim S. J., Han Y. M., Choi I. Y., Lim J., Shin S. T., Jin S. W., Lee K. K., Yoo O. J. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Research*, 2000, vol. 9, no. 3, pp. 215–222. <https://doi.org/10.1023/a:1008972010351>
11. Dvoryanchikov G. A., Serova I. A., Dias L. P. B., Serov O. L., Andreeva L. E., Azevedo S. Secretion of biologically active human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in milk of transgenic mice. *Russian Journal of Genetics*, 2005, vol. 41, no. 10, pp. 1088–1094. <https://doi.org/10.1007/s11177-005-0204-8>
12. Serova I. A., Dvoryanchikov G. A., Andreeva L. E., Burkov I. A., Dias L. P., Battulin N. R., Smirnov A. V., Serov O. L. A 3,387 bp 5'-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice. *Transgenic Research*, 2012, vol. 21, no. 3, pp. 485–498. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9547-1>
13. Freitas V. J. F., Serova I. A., Moura R. R., Andreeva L. E., Melo L. M., Teixeira D. I. A., Pereira A. F., Lopes-Jrd E. S., Dias L. P. B., Nunes-Pinheiro D. C. S., Sousa F. C., Alcantara-Neto A. S., Albuquerque E. S., Melo C. H. S., Rodrigues V. H. V., Batista R. I. T., Dvoryanchikov G. A., Serov O. L. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research*, 2012, vol. 105, pp. 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.03.009>
14. Uusi-Oukari M., Hyttinen J. M., Korhonen V. P., Västi A., Alhonen L., Jänne O. A., Jänne J. Bovine alpha s1-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*, 1997, vol. 6, no. 1, pp. 75–84. <https://doi.org/10.1023/a:1018461201385>
15. Burkov I. A., Serova I. A., Battulin N. R., Smirnov A. V., Babkin I. V., Andreeva L. E., Dvoryanchikov G. A., Serov O. L. Expression of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (*hGM-CSF*) gene under control of the 5'-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice. *Transgenic Research*, 2013, vol. 22, no. 5, pp. 949–964. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9697-4>
16. Samoylov A. V., Kesyan A. Z., Suraeva N. M. Development of transgenic chicken with a gene of human granulocyte colony-stimulating factor using sperm-mediated gene transfer. *Biology Bulletin*, 2013, vol. 40, no. 5, pp. 419–422. <https://doi.org/10.1134/s1062359013040134>
17. Rosochacki S. J., Kozikova L. V., Korwin-Kossakowski M., Matejczyk M., Połoszynowicz J., Duszewska A. M. Noninvasive fluorescent screening of microinjected bovine embryos to predict transgene integration. *Folia Biologica (Krakow)*, 2003, vol. 5, no. 1–2, pp. 97–104.
18. Kato M., Yamanouchi K., Ikawa M., Okabe M. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Molecular Reproduction and Development*, 1999, vol. 54, no. 1, pp. 43–48. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199909\)54:1<43::aid-mrd6>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199909)54:1<43::aid-mrd6>3.0.co;2-n)
19. Zimmer M. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chemical Society Reviews*, 2009, vol. 38, no. 10, pp. 2823–2832. <https://doi.org/10.1039/b904023d>
20. Garcia-Diaz A. I., Moyon B., Coan P. M., Alfazema N., Venda L., Woollard K., Aitman T. New Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rat transgenic models with ubiquitous expression of green fluorescent protein. *Disease Models & Mechanisms*, 2016, vol. 9, no. 4, pp. 463–471. <https://doi.org/10.1242/dmm.024208>
21. Shetty G., Wu Z., Lam T. N. A., Phan T. T., Orwig K. E., Meistrich M. L. Effect of hormone modulations on donor-derived spermatogenesis or colonization after syngeneic and xenotransplantation in mice. *Andrology*, 2019, vol. 7, no. 2, pp. 257–265. <https://doi.org/10.1111/andr.12571>
22. Hirakata E., Tomita N., Tamada Y., Suguro T., Nakajima M., Kambe Y., Yamada K., Yamamoto K., Kawakami M., Otaka A., Okumura H., Suzuki S. Early tissue formation on whole-area osteochondral defect of rabbit patella by covering with fibroin sponge. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials*, 2016, vol. 104, no. 7, pp. 1474–1482. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33656>
23. Katter K., Geurts A. M., Hoffmann O., Mates L., Landa V., Hiripi L. [et al.]. Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *The FASEB Journal*, 2013, vol. 27, no. 3, pp. 930–941. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205526>
24. Takahashi R., Kuramochi T., Aoyagi K., Hashimoto S., Miyoshi I., Kasai N., Hakamata Y., Kobayashi E., Ueda M. Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. *Transgenic Research*, 2007, vol. 16, no. 1, pp. 115–120. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9043-1>

25. Murakami T., Kobayashi S. GFP-transgenic animals for in vivo imaging: rats, rabbits, and pigs. *In vivo cellular imaging using fluorescent proteins: methods and protocols. Methods in Molecular Biology. Vol. 872.* New York, 2012, pp. 177–189. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-797-2_12
26. Ezerskii V. A., Ivanova L. B., Shevchenko V. G. Gene-engineering construction containing human gene G-CSF under control of regulatory elements of bovine gene β -lactoglobulin. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh = Problems of Productive Animal Biology*, 2007, no. 1, pp. 123–131 (in Russian).
27. Ezerskii V. A., Koloskova E. M., Trubitsina T. P., Maksimenko S. V., Ryabykh V. P. Genetic engineering structure comprising a coding sequence of human G-CSF with the regulatory regions of bovine β -lactoglobulin gene and reporter gene EGFP. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh = Problems of Productive Animal Biology*, 2018, no. 3, pp. 35–44 (in Russian). <https://doi.org/10.25687/1996-6733.prodanimbol.2018.3.35-44>
28. Chrenek P., Bauer M., Makarevich A.V. Quality of transgenic rabbit embryos with different EGFP gene constructs. *Zygote*, 2011, vol. 19, no. 1, pp. 85–90. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000109>
29. Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Häsler K., Fleckenstein B., Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 1985, vol. 41, no. 2, pp. 521–530. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(85\)80025-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(85)80025-8)
30. Birch J. R., Racher A. J. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, vol. 58, no. 5–6, pp. 671–685. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.12.006>
31. Khan K. H. Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>
32. Lipták N., Bösze Z., Hiripi L. GFP transgenic animals in biomedical research: a review of potential disadvantages. *Physiological Research*, 2019, vol. 68, no. 4, pp. 525–530. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934227>
33. Serov O. L. Transgenic animals: basic and applied aspects. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2013, vol. 17, no. 4/2, pp. 1055–1064 (in Russian).
34. Tevkin S. I., Shishimorova M. S., Ezerskii V. A., Trubitsina T. P., Fatkulina O. B., Ryabykh V. P. Integration efficiency of the human lactoferrin gene in the mouse and rabbit genom. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*, 2009, vol. 44, no. 2, pp. 55–61 (in Russian).

Информация об авторах

Колоскова Елена Михайловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории пищеварения и межоточного обмена, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных (ВНИИФБиП) – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация). E-mail: heleko3@yandex.ru

Езерский Вадим Аркадьевич – младший научный сотрудник лаборатории микробиологии и иммунобиотехнологии, ВНИИФБиП – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация). E-mail: ez.vadim@yandex.ru

Трубицина Татьяна Петровна – кандидат биологических наук, специалист лаборатории микробиологии и иммунобиотехнологии, ВНИИФБиП – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация). E-mail: trubitsina.tp@yandex.ru

Жукова Ольга Борисовна – научный сотрудник лаборатории микробиологии и иммунобиотехнологии, ВНИИФБиП – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация). E-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Information about the authors

Elena M. Koloskova – Ph. D. (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Digestion, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition (VNIIFBiP) – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, v. Institut, Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation). E-mail: heleko3@yandex.ru

Vadim A. Ezerskij – Junior Researcher at the Laboratory of Microbiology and Immunobiotechnology, VNIIFBiP – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, v. Institut, Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation). E-mail: ez.vadim@yandex.ru

Tatjana P. Trubitsina – Ph. D. (Biology), Specialist at the Laboratory of Microbiology and Immunobiotechnology, VNIIFBiP – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, v. Institut, Borovsk, Kaluga region, Russian Federation). E-mail: trubitsina.tp@yandex.ru

Olga B. Zhukova – Researcher at the Laboratory of Microbiology and Immunobiotechnology, VNIIFBiP – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, v. Institut, Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation). E-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Остренко Константин Сергеевич – доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии и иммунобиотехнологии, ВНИИФБиП – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация). E-mail: ostrenkoks@gmail.com

Белова Надежда Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии и иммунобиотехнологии, ВНИИФБиП – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация). E-mail: navikbel@mail.ru

Кутын Иван Владимирович – научный сотрудник лаборатории микробиологии и иммунобиотехнологии, ВНИИФБиП – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация). E-mail: kurookami@mail.ru

Рябых Владимир Павлович – доктор биологических наук, профессор, ВНИИФБиП – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (290013, п. Институт, Боровск, Калужская обл., Российская Федерация).

Konstantin S. Ostrenko – Dr. Sc. (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology and Immunobiotechnology, VNIIFBiP – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, village Institut, Borovsk, Kaluga region, Russian Federation). E-mail: ostrenkoks@gmail.com

Nadezhda V. Belova – Ph. D. (Biology), Researcher at the Laboratory of Microbiology and Immunobiotechnology, VNIIFBiP – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, v. Institut, Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation). E-mail: navikbel@mail.ru

Ivan V. Kutijn – Researcher at the Laboratory of Microbiology and Immunobiotechnology, VNIIFBiP – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, v. Institut, Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation). E-mail: kurookami@mail.ru

Vladimir P. Ryabykh – Dr. Sc. (Biology), Professor, VNIIFBiP – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (249013, v. Institut, Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation).