

На правах рукописи

БРУСЕНЦЕВ ЕВГЕНИЙ ЮРЬЕВИЧ

**ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ КРИОБАНКА
ЭМБРИОНОВ И ГАМЕТ ХОМЯЧКОВ РОДА *RHODOPUS*
(*P. SUNGORUS* И *P. CAMPBELLI*) И ВОЗДЕЙСТВИЕ
ФАКТОРОВ РОСТА В ИХ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОМ
РАЗВИТИИ**

03.02.04 – Зоология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск 2016

Работа выполнена в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий
Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО
РАН г. Новосибирск.

Научный руководитель

Амстиславский Сергей Яковлевич
Доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Вершинин Владимир Леонидович
Доктор биологических наук, доцент,
ФГБУН Институт экологии растений и
животных УрО РАН, заведующий
лабораторией функциональной экологии
наземных животных

Стариков Владимир Павлович
Доктор биологических наук, профессор,
ГОУ ВПО Сургутский государственный
университет, заведующий кафедрой
зоологии

Ведущее Учреждение:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биофизики
клетки РАН, г. Пущино

Защита диссертации состоится _____ 2016 г. в _____ часов на
заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и
экологии животных СО РАН по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе 11.
Факс (383) 217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и
экологии животных СО РАН и на сайте института www.eco.nsc.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Петрожицкая Людмила
Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТАЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Репродуктивные технологии (РТ) все более широко используют для сохранения исчезающих видов млекопитающих. Разработка комплекса репродуктивных технологий по отношению к хомячкам джунгарскому (*Phodopus sungorus*, Pallas, 1773) и Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*, Thomas, 1905) может оптимизировать поддержание и обмен генетическим материалом между различными лабораториями и способствует сохранению генетических ресурсов *Cricetinae*. С другой стороны, исследование особенностей репродуктивной биологии хомячков рода *Phodopus* и изучение специфики применения технологий криоконсервации их эмбрионов и гамет является важной задачей в контексте изучения и восстановления численности видов – представителей этого рода, некоторые из которых относятся к числу редких и исчезающих.

Степень разработанности темы.

Развитие преимплантационных эмбрионов у джунгарского хомячка и у хомячка Кэмпбелла активно изучается, но до сих пор РТ по отношению к этим видам не применяли. Хотя несколько десятков видов млекопитающих были успешно заморожены или витрифицированы, в виде семени, либо преимплантационных эмбрионов, единственным представителем хомячков в этом списке являлся золотистый хомячок (*Mesocricetus auratus*, Waterhouse, 1839). Поскольку создание криобанков эмбрионов и семени является важным методом сохранения охраняемых (редких и исчезающих) диких видов млекопитающих, а по отношению к *Cricetinae* этот вопрос разработан недостаточно, представленная работа важна для поддержания численности и биоразнообразия видов этого подсемейства.

Успех создания криобанка того или иного вида млекопитающих зависит не только собственно от успеха криоконсервации эмбрионов и гамет, но и требует разработки с учетом видовой специфики таких репродуктивных технологий как трансплантация эмбрионов (Евсиков, Морозова, 1977; 1978), их культивирование (Брусенцев и др., 2014) и другие (Amstislavsky et al., 2012).

При культивировании *in vitro* большое воздействие на развивающиеся эмбрионы оказывают факторы роста. Они также могут быть важны для восстановления эмбрионов после процедур замораживания-оттаивания. До сих пор воздействие факторов роста в культуре изучали преимущественно на преимплантационных эмбрионах мышей, но на видах рода *Phodopus* таких исследований не проводилось.

Цель работы: Разработка подходов к созданию криобанка эмбрионов и семени для сохранения генетических ресурсов *Cricetinae* и изучение воздействия факторов роста на преимплантационные зародыши хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus*, Pallas, 1773 и *P. campbelli*, Thomas, 1905).

В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Сравнить различные способы замораживания семени хомячков джунгарского и Кэмпбелла.

2. Разработать технологию культивирования *in vitro* эмбрионов мохноногих хомячков.

3. Разработать способ замораживания эмбрионов хомячков джунгарского и Кэмпбелла, а также оценить их жизнеспособность *in vitro* и *in vivo* после криоконсервации.

4. Исследовать влияние факторов роста: гранулоцитарного-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF) и эпидермального фактора роста (EGF) на преимплантационные эмбрионы хомячков рода *Phodopus* после процедур замораживания-оттаивания в культуре *in vitro*.

Научная новизна работы.

В результате выполненных нами исследований впервые:

- Криоконсервированы эмбрионы хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*).

- Культивированы *in vitro* эмбрионы рода *Phodopus*, начиная со стадии дробящихся зародышей и продемонстрирован стимулирующий эффект фактора роста GM-CSF на их развитие.

- Криоконсервировано эпидидимальное семя хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*).

- Изучены видовые особенности криоконсервации семени у хомячков джунгарского и Кэмпбелла.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы.

Работа расширяет имеющиеся представления о криоконсервации преимплантационных эмбрионов и семени *Cricetinae* и создании криобанков генетических ресурсов млекопитающих. Разработанные методы и подходы могут быть использованы для сохранения и восстановления численности редких и исчезающих видов, прежде всего, *Cricetinae*. Изучены особенности репродукции и раннего развития хомячков джунгарского и Кэмпбелла, что имеет как теоретическую ценность для зоологии, так и практическое значение для оптимизации их разведения в неволе.

Положения, выносимые на защиту:

- Ростовый фактор GM-CSF ускоряет развитие эмбрионов *P. sungorus* и *P. campbelli* на стадии дробления в культуре *in vitro* после процедур замораживания-оттаивания.

- Среда R1ECM может быть использована для культивирования *in vitro* ранних дробящихся эмбрионов хомячков рода *Phodopus* (джунгарского и Кэмпбелла).

- Модифицированный протокол программного замораживания и смесь криопротекторов этиленгликоля и сахарозы может использоваться для

криоконсервации преимплантационных эмбрионов хомячков рода *Phodopus* (джунгарского и Кэмпбелла).

▪ Криопротекторные смеси CaniPlus Freeze и CaniPlus Chill, разработанные для семени псовых, могут быть применены для криоконсервации семени *P. sungorus* и *P. campbelli*.

Степень достоверности результатов.

Достоверность результатов, как по эпидидимальному семени, так и по преимплантационным эмбрионам хомячков джунгарского и Кэмпбелла подтверждена разными способами. Выживание сперматозоидов после криоконсервации было проверено после применения трех различных протоколов замораживания семени. Жизнеспособность эмбрионов мохноногих хомячков была подтверждена их успешным развитием, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Для подтверждения достоверности полученных результатов были использованы как методы световой микроскопии, так и современные методы конфокальной и флуоресцентной микроскопии. Материалы и методы, использованные для проведения исследований, адекватны и соответствуют поставленным задачам. Для статистической обработки полученного материала применялись корректные методы статистического анализа, такие как: метод χ^2 и t-критерий с использованием пакета STATISTICA 8.0.

Апробация результатов.

Материалы диссертации обсуждены на конференциях: “Теоретические и практические аспекты современной криобиологии” (г. Сыктывкар, 2014), “V международная научно-практическая конференция – От эмбриона к человеку”, (г. Новосибирск, 2013), “III ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными (Rus-LASA)” (г. Новосибирск, 2013).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых отечественных изданиях, 2 статьи в рецензируемых зарубежных изданиях (все 5 в журналах, рекомендованных ВАК) и 3 тезиса в сборниках трудов конференций.

Структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 111 страницах печатного текста, содержит 16 рисунков и 9 таблиц. Библиографический указатель литературы включает 319 источников, из них 31 отечественных и 288 зарубежных.

1. СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТАННОСТИ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Традиционные методы сохранения видов млекопитающих *ex situ* включают в себя организацию питомников и зоопарков, предназначенных для разведения животных в неволе с возможностью выпуска их в природу. Однако выросшие в неволе животные часто теряют способность выживать самостоятельно, и возвращение их в естественную среду обитания затрудняется (Amstislavsky et al., 2008). Организация же природных резерватов и прочих защищенных территорий не всегда возможна и требует больших финансовых затрат. В этой ситуации на помощь приходят репродуктивные технологии в сочетании с методами криобиологии. Речь идет, прежде всего, о создании криобанка эмбрионов и гамет, что требует базовых знаний зоологии и репродуктивной биологии каждого из сохраняемых видов. До настоящего времени не удавалось успешно заморозить семя или преимплантационные эмбрионы млекопитающих, а также культивировать ранние (дробящиеся) эмбрионы *in vitro*. Более того, отсутствуют сообщения о криоконсервации семени какого-либо представителя *Cricetinae*. В представляемой работе разработаны основные подходы к созданию криобанка семени и зародышей хомячков джунгарского и Кэмпбелла, и изучается роль факторов роста в их преимплантационном развитии.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные. 21 взрослая самка джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) и 16 взрослых самок хомячков Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) в возрасте от 11 до 13 месяцев были использованы в качестве доноров эмбрионов.

Для получения эпидидимального семени были использованы 5 взрослых самцов джунгарского хомячка и 6 взрослых самцов хомячков Кэмпбелла в возрасте от 2 до 4 месяцев. Все эмбрионы, используемые в этом исследовании, были собраны от естественно спаренных животных. Перед спариванием самцов содержали по одному в клетках отдельно от самок в течение суток. Гибридных самок F1, которые в дальнейшем были использованы в ходе экспериментов по переносу эмбрионов, получали в результате скрещивания самок Кэмпбелла с джунгарскими самцами.

2.2. Криоконсервация эпидидимального семени

2.2.1. Получение, замораживание и оттаивание эпидидимального семени. После эвтаназии животных у них удаляли семенники с эпидидимисами и отделяли эпидидимисы от семенников, очищали их от жира и других тканей. Семя хомячков (джунгарских и Кэмпбелла) для

процедуры замораживания получали из каудальных эпидидимисов. Для этого эпидидимисы помещали в раствор Human tubal fluid – HTF (Sigma, USA), после чего их измельчали. Чашки с содержимым выдерживали в термостате в течение 15 мин при 37 °С, после чего всю жидкость собирали в пробирку. Затем из пробирки забирали каплю объемом 50 мкл и смешивали с одной из трех комбинаций криопротекторов: 1) 18 % раффинозы и 3 % обезжиренного сухого молока, 2) CaniPlus Chill (Minitube, Germany) или 3) CaniPlus Freeze (Minitube, Germany). После этого заполняли пластиковые соломины для последующего замораживания согласно инструкции производителя. Соломины с материалом выдерживали в парах азота на расстоянии 2 см от его жидкой фазы в течение 8 минут, после чего их опускали в жидкий азот и помещали в криохранилище.

Процедуру оттаивания семени проводили в 2 этапа. Сначала доставали соломины с семенем из жидкого азота, и выдерживали в течение 10 секунд на воздухе при комнатной температуре. После чего их помещали в водяную баню на 30 секунд при температуре 37 °С.

2.2.2. Оценка жизнеспособности семени. Жизнеспособность интактных и после процедуры замораживания-оттаивания сперматозоидов оценивали посредством двойной окраски флуорохромами SYBR Green I и йодистым пропидием (PI) с последующей конфокальной микроскопией. Изображения получены и обработаны под микроскопом LSM 780 NLO AxioObserver Z1 на базе ЦКП МАБО СО РАН.

2.2.3. Морфологический анализ эпидидимального семени. Морфологический анализ проводили после фиксации сухих мазков раствором формальдегида (4 % ФА на DPBS pH 7.4-7.6) и последующей окраски гематоксилином Джилла с эозином при помощи светового микроскопа Axioskop 2 plus.

2.3. Криоконсервация эмбрионов хомячков рода *Phodopus*

2.3.1. Спаривание самок-доноров и получение эмбрионов. На этапе проэструса, самок ссаживали с самцом того же вида с проверенной фертильностью. Спаривание подтверждалось на следующее утро по наличию сперматозоидов в вагинальных мазках. День, в который были обнаружены сперматозоиды, считался первым днем после коитуса – *post coitum* (pc). Покрытые самки были подвергнуты эвтаназии при помощи дислокации шейных позвонков на 3 день pc в 13:00, с целью получения эмбрионов на стадии дробления.

Извлеченные эмбрионы были подсчитаны и оценены с помощью стереомикроскопа S8 APO (Leica microsystems, Germany). Эмбрионы плохого качества были элиминированы; эмбрионы хорошего качества, находящиеся на стадии 2-8 клеток, без значительных дефектов и с неповрежденными прозрачной оболочкой, последовательно промывали в

трех каплях, после чего они были либо заморожены, как описано ниже, либо использованы в качестве интактных для контроля.

2.3.2. Замораживание эмбрионов. Для замораживания преимплантационных эмбрионов хомячков рода *Phodopus* применяли программный замораживатель CL 8800 (CryoLogic, Australia) с использованием 1.5 М этиленгликоля (ЭГ), в качестве криопротектора без добавок, либо в сочетании с 0.1 М сахарозой, а также классическую программу замораживания преимплантационных эмбрионов с модификацией. После замораживания соломины с эмбрионами помещали в жидкий азот.

2.3.3. Оттаивание эмбрионов. Соломины доставали из хранилища с жидким азотом, выдерживали в течение 40 секунд при комнатной температуре, и помещали на 40 секунд в водяную баню (30 °C). После оттаивания, криопротектор удаляли путем последовательного переноса через три капли EMCARE holding solution (ICPbio Reproduction, USA) с понижающейся концентрацией ЭГ и затем переноса в этот же раствор без криопротектора.

2.3.4. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов после процедур замораживания-оттаивания

2.3.4.1. Оценка жизнеспособности эмбрионов методом двойного окрашивания флуоресцеином диацетатом и пропидия йодидом. Жизнеспособность эмбрионов оценивали после оттаивания путем визуального осмотра с использованием световой и флуоресцентной микроскопии после окрашивания флуорохромами FDA и PI, а также фотосъемки с использованием микроскопа M205FA (Leica microsystems, Germany). Эмбрионы с 75 % живых бластомеров (по результатам световой и флуоресцентной микроскопии) считались успешно пережившими криоконсервацию.

2.3.4.2. Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов. После процедур замораживания-оттаивания (интактные – контроль) эмбрионы переносили в каплю либо среды hamster embryo culture medium (HECM), либо модифицированной среды rat 1-cell embryo culture medium (R1ECM), и культивировали с добавлением или без добавления гранулоцитарного-макрофагального колониестимулирующего фактора – GM-CSF rat (Sigma, 2 нг/мл), либо эпидермального ростового фактора – EGF rat (Sigma, 10 нг/мл) в течение 48 ч под минеральным маслом в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C и высокой влажности в CO₂-инкубаторе (Binder, Germany). Жизнеспособность эмбрионов оценивали по их развитию через 24 часа культивирования *in vitro* при помощи инвертированного микроскопа DM IL LED (Leica microsystems, Germany) перед культивированием, после 24 часов, и после 48 часов культивирования *in vitro*.

2.3.4.3. Подсчет interfазных ядер. Блaстоцисты после фиксации в течение 3 ч при комнатной температуре, подвергали воздействию 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, Sigma). Стекля с препаратами были проанализированы с использованием исследовательской станции LSM 780 NLO AxioObserver Z1 снабженной AxioCam MRM. Ядра и ядерные фрагменты были подсчитаны для каждого эмбриона. Индексы фрагментации ядер и митотический индекс были рассчитаны, соответственно, путем деления числа митотических клеток или ядерных фрагментов, соответственно, на общее количество клеток.

2.3.4.4. Трансплантация эмбрионов. Шесть эмбрионов джунгарского хомяка и пять эмбрионов хомяка Кэмпбелла после процедур замораживания-оттаивания культивировали в R1ECM 24 часа, как описано выше, после чего переносили в рога матки гибридных самок-реципиентов. Трансплантацию проводили на 3 день после спаривания самки-реципиента либо с фертильным самцом *P. campbelli* (для эмбрионов джунгарского хомячка) с последующим генетическим анализом потомков-трансплантантов, либо вазэктомированным самцом проверенным на стерильность (для эмбрионов хомячка Кэмпбелла). Процедура переноса эмбрионов в рог матки была аналогична той, что применялась ранее (Amstislavsky et al., 2006).

2.4. Статистический анализ. Доля нормальных сперматозоидов и их типичных повреждений, жизнеспособность сперматозоидов (мертвые, живые, гибнущие) в интактных образцах эпидидимального семени и после замораживания-оттаивания с различными криопротективными растворами (рафиноза + молоко, CaniPlus Chill с модификацией и CaniPlus Freeze) были представлены как средний процент \pm ошибка средней ($M \pm SEM$). При разных условиях культивирования *in vitro* рассчитывали процент развившихся эмбрионов до стадии морулы и бластоцисты. Различия между этими группами сравнивали с использованием теста χ^2 . После процедур замораживания-оттаивания преимплантационных зародышей с различными криопротективными растворами (ЭГ и ЭГ + сахараза) рассчитывали долю (в процентах) выживших эмбрионов как $M \pm SEM$. Результаты двойного окрашивания FDA + PI с указанием количества живых эмбрионов, а также результаты культивирования *in vitro*, то есть, среднее количество клеток, митотических ядер и индексов ядерной фрагментации были представлены как $M \pm SEM$. Значимость различий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента. Результаты при $p < 0.05$ считали статистически значимыми. Данные были проанализированы с использованием стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc).

3. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ И ЭМБРИОНОВ ХОМЯЧКОВ ДЖУНГАРСКОГО И КЭМПБЕЛЛА, И ПРОВЕРКА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПОСЛЕ ОТТАИВАНИЯ *IN VITRO* И *IN VIVO*

3.1. Морфологические характеристики интактного эпидидимального семени у хомячков джунгарского и Кэмпбелла. Сперматозоиды двух исследованных видов близки морфологически, как по общему плану строения, так и по соотношениям отдельных частей: длине хвоста, длине и ширине шейки, размеру головки и другим характеристикам.

Среди морфологически нормальных сперматозоидов встречались и аномальные формы. Спектр аномалий сперматозоидов достаточно широк и включает в себя повреждения головки, шейки, хвоста и различные сочетанные дефекты.

Достаточно тяжелыми аномалиями можно считать разнообразные повреждения акросомы, сопряженные с изломами хвоста. Следует особо отметить, что у хомячков джунгарского и Кэмпбелла редко встречаются тератоморфные сперматозоиды (не более 0.08 % в расчете на общее число сперматозоидов для каждого из изученных видов).

Морфологический анализ показывает, что в интактных образцах эпидидимального семени джунгарского хомячка доля нормальных сперматозоидов несколько выше, чем у хомячка Кэмпбелла, хотя статистически они не отличаются (таблица 1).

Таблица 1. Доля нормальных сперматозоидов и анализ типичных повреждений сперматозоидов (каждая аномалия представлена в процентах от общего числа аномалий)

Учтенные сперматозоиды	Вид	
	Джунгарский хомячок (N=5)	Хомячок Кэмпбелла (N=6)
Всего	1568	1294
Нормальные, %	67,0 ± 3,3	58,9 ± 6,3
Аномалии головки, %	4,0 ± 0,7	3,4 ± 0,8
Аномалии акросомы, %	78,5 ± 2,2	82,3 ± 3,7
Аномалии шейки, %	3,8 ± 0,9	5,4 ± 1,4
Аномалии хвоста, %	6,3 ± 1,2 ^a	2,2 ± 0,6 ^b
Комплекс аномалий, %	7,4 ± 1,0	6,7 ± 1,8

Достоверность отличий: ^a*P* < 0.05.

При анализе типичных повреждений сперматозоидов в интактных образцах эпидидимального семени джунгарского хомячка и хомячка

Кэмпбелла наблюдается достоверное отличие ($P < 0.05$) по доле аномалий хвоста (таблица 1).

Таким образом, морфологический анализ показал, что в интактных образцах эпидидимального семени у данных видов хомячков доля сперматозоидов, имеющих нормальную морфологию, не превышает 70 %. Самым частым отклонением от нормы является повреждение акросомы.

3.2. Жизнеспособность интактного эпидидимального семени у хомячков джунгарского и Кэмпбелла. В интактных образцах эпидидимального семени у обоих видов хомячков доля живых сперматозоидов согласно методу двойного окрашивания SYBR Green I + PI не превышает 30 % (таблица 2).

Таблица 2. Жизнеспособность интактных сперматозоидов (после окрашивания SYBR Green I + PI)

Исследованные сперматозоиды	Вид	
	Джунгарский хомячок (N=5)	Хомячок Кэмпбелла (N=6)
Всего	6886	9376
Мертвые, %	71.7 ± 1.5 ^a	63.4 ± 6.1 ^b
Живые, %	23.1 ± 3.1	28.0 ± 5.1
Гибнущие, %	5.2 ± 2.9	8.7 ± 2.7

Достоверность отличий: ^a $P < 0.05$.

3.3. Криоконсервация эпидидимального семени хомячков. Криоконсервация семени лабораторных животных является важным звеном при создании современных криобанков генетических ресурсов. В мировой практике, по лабораторным животным, наилучший результат при замораживании семени был получен на лабораторной мыши, для которого в качестве криопротекторов используют обезжиренное молоко и раффинозу.

Морфологический анализ сухих мазков эпидидимального семени джунгарского хомячка после процедур замораживания и оттаивания показал, что при реализации протокола с использованием смеси рафинозы с сухим молоком, практически все сперматозоиды имеют грубые повреждения, а доля нормальных сперматозоидов была наиболее низкой и составляла немногим более 3 % (таблица 3).

При использовании криопротектора CaniPlus Chill с модификацией сперматозоиды обоих видов демонстрируют большую сохранность клеточных структур, доля сперматозоидов с нормальной морфологией превышала 70% (таблица 3).

Таблица 3. Сравнение влияния разных протоколов замораживания и оттаивания на морфологию сперматозоидов эпидидимального семени джунгарского хомячка (каждая аномалия представлена в процентах от общего числа аномалий)

Учтенные сперматозоиды	Криопротектор	
	Молоко + раффиноза (N=3)	CanPlus Chill (N=3)
Всего	346	445
Нормальные, %	3,5 ± 0,7 ^a	72,0 ± 2,1 ^б
Аномалии головки, %	0,6 ± 0,6	0
Аномалии акросомы, %	93,3 ± 1,7 ^в	86,0 ± 3,7 ^г
Аномалии шейки, %	0,3 ± 0,3	1,7 ± 1,7
Аномалии хвоста, %	0 ^д	3,7 ± 1,5 ^е
Комплекс аномалий, %	5,8 ± 1,6	8,7 ± 2,4

Достоверность отличий: ^{аб, вг, де}P < 0.05.

При применении протокола с использованием CanPlus Chill с модификацией доля морфологически нормальных сперматозоидов была достоверно выше, что показали исследования на джунгарском хомячке. Сравнение двух криопротекторов, а именно: CanPlus Freeze и CanPlus Chill проведенный на хомячках Кэмпбелла показал, что доля морфологически нормальных сперматозоидов была достоверно выше при применении первого протокола (таблица 4).

Таблица 4. Сравнение влияния разных протоколов замораживания и оттаивания на морфологию сперматозоидов эпидидимального семени хомячка Кэмпбелла (каждая аномалия представлена в процентах от общего числа аномалий)

Учтенные сперматозоиды	Криопротектор	
	CanPlus Freeze (N=3)	CanPlus Chill (N=3)
Всего	516	895
Нормальные, %	16,9 ± 4,7 ^a	38,6 ± 8,5 ^б
Аномалии головки, %	1,4 ± 0,8	0,3 ± 0,3
Аномалии акросомы, %	95,5 ± 0,5	94,0 ± 1,0
Аномалии шейки, %	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3
Аномалии хвоста, %	1,0 ± 0,3	2,4 ± 1,9
Комплекс аномалий, %	1,8 ± 0,4	3,1 ± 2,2

Достоверность отличий: ^{аб}P < 0.05.

Анализ типичных повреждений структуры сперматозоида после процедур замораживания-оттаивания показывает, что во всех проведенных

экспериментах наиболее уязвимой частью сперматозоида хомячка является акросома.

Результаты двойной окраски флуорохромами SYBR Green I + PI и последующей конфокальной микроскопии показали, что процедуры криоконсервации приводят к снижению доли живых сперматозоидов у хомячков обоих исследованных видов. Из трех использованных в данной работе протоколов, только второй и третий (с применением CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze соответственно) были достаточно эффективными. При применении протокола 1 (молоко с рафинозой), как показали исследования на джунгарских хомячках, доля мертвых сперматозоидов была выше при применении молока и рафинозы, причем при применении этой криопротективной смеси живых сперматозоидов вообще не было, все сперматозоиды были либо мертвыми, либо гибнущими (таблица 5).

Таблица 5. Сравнение влияния разных протоколов замораживания-оттаивания на жизнеспособность сперматозоидов эпидидимального семени джунгарского хомячка

Учтенные сперматозоиды	Вид	
	Молоко + раффиноза (N=3)	CaniPlus Chill (N=3)
Всего	1022	660
Мертвые, %	93.1 ± 3.6 ^a	77.4 ± 6.3 ^b
Живые, %	0 ^b	6.6 ± 2.8 ^c
Гибнущие, %	6.9 ± 3.6	16.0 ± 6.4

Достоверность отличий: ^{ab, bc}P < 0.05.

Сравнение эффективности применения CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze было проведено на хомячках Кэмпбелла. Доля живых сперматозоидов при применении CaniPlus Freeze была достоверно выше, однако при этом была выше и доля мертвых сперматозоидов, при этом доля гибнущих сперматозоидов была выше при применении CaniPlus Chill. Процент жизнеспособного семени после криоконсервации с применением CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze для хомячков Кэмпбелла составил 2-4 %, а для джунгарского хомячка при использовании CaniPlus Chill – около 7 % (таблица 5, 6).

Таблица 6. Сравнение влияния разных протоколов замораживания-оттаивания на жизнеспособность сперматозоидов эпидидимального семени хомячка Кэмпбелла

Учтенные сперматозоиды	Вид	
	CanIPlus Freeze (N=3)	CanIPlus Chill (N=3)
Всего	1290	4937
Мертвые, %	91.5 ± 1.5 ^a	83.9 ± 3.6 ^b
Живые, %	4.6 ± 1.3 ^b	2.0 ± 0.3 ^г
Гибнущие, %	1.9 ± 0.2 ^д	12.1 ± 5.6 ^с

Достоверность отличий: ^{аб, вг, дс} P < 0.05.

3.4. Потенциальная и фактическая плодовитость хомячков *P. sungorus* и *P. campbelli*. Для хомячков Кэмпбелла было получено всего 90 эмбрионов от 18 самок-доноров на третий день рс, а для джунгарских хомячков 78 эмбрионов от 16 самок-доноров также на третий день рс. Среднее количество вымытых эмбрионов от самок-доноров для хомячков Кэмпбелла было 5.0 ± 0.4 (диапазон от 1 до 10 эмбрионов), а для джунгарских 4.9 ± 0.3 .

3.5. Замораживание, криоконсервация и оттаивание эмбрионов хомячков рода *Phodopus*

3.5.1. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов методом двойного окрашивания флуорохромами FDA + PI. Чтобы проверить различные варианты замораживания-оттаивания на хомячках Кэмпбелла, были выбраны эмбрионы на стадии 8 клеток. Интактные эмбрионы показывают нормальную морфологию и все клетки флуоресцируют ярко-зеленым после двойного окрашивания FDA + PI, что свидетельствует о жизнеспособности эмбрионов этой группы. Применение стандартного протокола замораживания-оттаивания с ЭГ в качестве криопротектора привело к снижению процента живых эмбрионов по сравнению с контрольной группой (таблица 7). Некоторые эмбрионы в этой группе содержат поврежденные, либо полностью разрушенные бластомеры. Добавление сахарозы в криопротективную смесь улучшило результаты замораживания-оттаивания. Процент жизнеспособных эмбрионов в последнем случае не отличается от такового в контрольной группе (таблица 7).

Таблица 7. Результаты эксперимента по криоконсервации эмбрионов хомячка Кэмпбелла с использованием двух разных вариантов криопротекции и двойного окрашивания флуорохромами FDA и PI

Группы	Число исследованных эмбрионов (число повторов)	Число живых эмбрионов (%)
Контроль (эмбрионы без замораживания)	10 (4)	10 (100) ^a
Эмбрионы замороженные с ЭГ	21 (3)	15 (71.4) ^b
Эмбрионы замороженные с ЭГ+сахароза	13 (3)	12 (92.3) ^b

Достоверность отличий: ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.05$.

Независимо от экспериментов по криоконсервации эмбрионов, на хомячках Кэмпбелла была продемонстрирована возможность успешного культивирования *in vitro* ранних дробящихся зародышей млекопитающих хомячков с использованием среды R1ECM созданной для крыс. В этой среде их развитие проходит успешно со стадии 2-х клеток. Всего 15 эмбрионов было вымыто у 3-х самок-доноров хомячка Кэмпбелла в конце 2 дня pc (3, 5 и 7 эмбрионов соответственно). Все собранные эмбрионы были на 2-х клеточной стадии развития. После 24 часов культивирования *in vitro* 10 из 15 эмбрионов (66.7 %) уже достигли 8-клеточной стадии, но 5 (33.3 %) по-прежнему имели 4 бластомера. После 48 часов культуры *in vitro* 13 эмбрионов (86.7 %) достигло стадии бластоцисты, хотя 2 эмбриона (13.3 %) находились на стадии морулы.

Дальнейший эксперимент по культивированию эмбрионов замороженных различными способами подтвердил, что именно способ замораживания с использованием ЭГ с сахарозой в качестве криопротективной смеси является наиболее оптимальным. С целью подтверждения их жизнеспособности были применены как метод окраски двумя флуорохромами: FDA + PI с последующей микроскопией, так и метод культивирования *in vitro*.

Было показано, что сохранность эмбрионов джунгарских хомячков после криоконсервации также лучше всего в том случае, когда используется сочетание криопротекторов (ЭГ + сахароза) и “стандартный” метод замораживания (таблица 8).

Таблица 8. Результаты эксперимента по криоконсервации эмбрионов джунгарского хомячка с использованием двух разных вариантов криопротекции и двойного окрашивания флуорохромами FDA и PI

Группы	Число исследованных эмбрионов (число повторов)	Число живых эмбрионов (%)
Контроль (эмбрионы без замораживания)	8 (3)	8 (100) ^a
Эмбрионы замороженные с ЭГ	14 (3)	9 (64.3) ^b
Эмбрионы замороженные с ЭГ+сахароза	14 (3)	13 (92.9) ^b

Достоверность отличий: ^a*P* < 0.01; ^b*P* < 0.05.

3.5.2. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов хомячков *P. sungorus* и *P. campbelli* путем культивирования *in vitro*. Результаты культивирования *in vitro* интактных (контроль) и эмбрионов после криоконсервации джунгарского хомячка представлены в таблице 9. Некоторые из эмбрионов успешно развивались до стадии морулы независимо от используемой среды. Следует отметить, что HECM не содержал антибиотиков, в то время как R1ECM имеет в своем составе гентамицин и стрептомицин. Тем не менее, скорость развития в среде R1ECM была выше, поэтому все дальнейшие эксперименты были проведены с использованием среды R1ECM (таблица 9).

Таблица 9. Результаты культивирования *in vitro* интактных и после замораживания (“крио”) эмбрионов джунгарских хомячков (*Phodopus sungorus*) в течение 24 часов, начиная с ранних стадий дробления

Группы	Число исследованных эмбрионов (число повторов)	Развитие эмбрионов <i>in vitro</i> (%)	
		Морул	Бластоцист
HECM (интактные)	11 (3)	2 (18,2) ^a	0 (0)
R1ECM (интактные)	9 (3)	6 (66,7) ^b	0 (0)
R1ECM (“крио”)	17 (6)	11 (64,7) ^b	0 (0)

Достоверность различий: ^a*b* и ^b*b*, *p* < 0.05.

3.5.3. Воздействие факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов хомячков рода *Phodopus* и подсчет интерфазных ядер. На следующем этапе эксперимента на эмбрионах джунгарских хомячков было проведено сравнение темпов развития

эмбрионов *in vitro* после воздействия GM-CSF и EGF. Дозы этих факторов (GM-CSF: 2 нг/мл; EGF: 10 нг/мл) были выбраны на основании изучения литературы по воздействию этих факторов на развитие эмбрионов мышей, крыс и сирийских хомячков и собственных пилотных экспериментов.

Данные этого эксперимента на эмбрионах джунгарских хомячков и Кэмпбелла дали четкие результаты (таблица 10, таблица 11). Было подтверждено, что большинство эмбрионов этих видов успешно переживает криоконсервацию, и такие эмбрионы способны к последующему развитию *in vitro* после их оттаивания. Новым результатом было то, что в выбранной дозе GM-CSF стимулирует развитие *in vitro* эмбрионов джунгарского хомячка, достоверно повышая образование бластоцист (таблица 10). В связи с этим интересно отметить, что этот фактор роста, именно в данной дозе, активно начали применять в клиниках ЭКО для повышения эффективности процедур культивирования и трансплантации зародышей по отношению к человеку.

Таблица 10. Результаты культивирования *in vitro* эмбрионов джунгарских хомячков (*Phodopus sungorus*) после криоконсервации развившихся в течение 24 часов культивирования со стадии дробящихся зародышей (2-4 клеток) с добавлением GM-CSF (2 нг/мл) или EGF (10 нг/мл), и без добавления факторов роста

Группы	Число исследованных эмбрионов (число повторов)	Развитие эмбрионов <i>in vitro</i> (%)	
		Морул	Бластоцист
R1ECM	17 (6)	11 (64,7)	0 (0) ^a
R1ECM + GM-CSF	8 (3)	4 (50)	4 (50) ^b
R1ECM + EGF	11 (3)	7 (63,6)	1 (9,1)

Достоверность различий: ^{ab}p < 0.05.

В то же время, существенного влияния EGF на развитие преимплантационных эмбрионов джунгарского хомяка *in vitro* при добавлении этого фактора в культуральную среду обнаружено не было; лишь один эмбрион в группе EGF, развился до стадии бластоцисты (таблица 10). Хотя в литературе имеются указания на то, что EGF улучшает преимплантационное развитие *in vitro* эмбрионов у золотистых хомячков, и, в частности, способствует их хэтчингу этот фактор роста не увеличивал скорость образования бластоцист у джунгарского хомячка. Данное расхождение наших наблюдений с предыдущими результатами, полученными на золотистых хомячках другими исследователями можно объяснить видовой специфичностью действия факторов роста.

Развитие эмбрионов хомячка Кэмпбелла *in vitro* со стадии дробящихся зародышей до бластоцисты как в присутствии GM-CSF, так и без воздействия фактора представлено в таблице 11. При добавлении этого

ростового фактора все эмбрионы, взятые из криобанка, развились до бластоцисты. Однако без добавления GM-CSF до бластоцисты выжило менее 50 % эмбрионов взятых из криобанка. Кроме того, среднее число бластомеров в группе бластоцист полученных с GM-CSF было более чем в два раза выше, чем в группах бластоцист полученных без добавления ростового фактора (таблица 11). Наряду с этим, был показан протективный эффект GM-CSF. Индекс фрагментации был наименьшим именно в этой группе (таблица 11).

Таблица 11. Характеристики бластоцист хомячка Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) развившихся в течение 48 часов культивирования со стадии дробящихся зародышей (2-4 клеток) с добавлением или без добавления GM-CSF (2 нг/мл)

	R1ЕСМ (интактные)	R1ЕСМ ("крио")*	R1ЕСМ ("крио") + GM-CSF
Число культивируемых эмбрионов (число повторов)	15 (3)	15 (3)	10 (3)
Число развившихся бластоцист (%)	13 (86.7)	7 (46.7) ^а	10 (100) ^б
Бластоцисты с фрагментациями (%)	12 (92.3)	7 (100)	9 (90.0)
Число клеток в бластоцисте (M±m)	14.9 ± 1.4 ^в	19.1 ± 3.9 ^г	40.0 ± 3.1 ^д
Индекс фрагментации (M±m)	29.4 ± 5.2 ^е	40.4 ± 11.5 ^{жз}	10.1 ± 3.6 ^з
Митотический индекс (M±m)	3.5 ± 1.7	4.6 ± 2.6	2.3 ± 1.5

Достоверность различий: ^{аб} p < 0.05; ^{вд} и ^{гд} p < 0.001; ^{ез} и ^{жз} p < 0.05.

* – "крио" означает, что эмбрионы взяты после криоконсервации

3.5.4. Оценка жизнеспособности эмбрионов мохноногих хомячков: развитие *in vivo* после трансплантации. Шесть эмбрионов джунгарского хомячка замороженных на стадии 4-х клеток были взяты из криобанка, оттаяны и культивированы. Через 24 часа пять из них уже были на стадии морулы. Все шесть эмбрионов были трансплантированы гибридной самке по методу описанному нами ранее (Amstislavsky et al., 2006). В результате родилось 3 потомка.

Сходную проверку жизнеспособности эмбрионов после криоконсервации путем их развития *in vivo* удалось повторить уже с эмбрионами хомячка Кэмпбелла. Пять зародышей этого вида мохноногих хомячков на стадии 4-х клеток были взяты из криобанка, оттаяны и культивированы. Через 24 часа они достигли стадии морулы. Все эмбрионы

были трансплантированы гибридной самке, как в случае с джунгарскими хомячками. В результате родилось 2 потомка.

Таким образом, впервые на хомячках рода *Phodopus* удалось провести успешную трансплантацию эмбрионов после криоконсервации и культивирования *in vitro*. Удалось получить живое потомство как после трансплантации эмбрионов хомячка Кэмпбелла, так и после трансплантации эмбрионов джунгарского хомячка. Впервые на грызунах (и второй раз в мировой практике после работы на куньих), удалось показать, что межвидовые гибриды являются реципиентами для трансплантации эмбрионов обоих видов. Иными словами, гибриды, полученные путем скрещивания самки хомячка Кэмпбелла с самцом джунгарского хомячка, успешно вынашивали как трансплантированные им эмбрионы джунгарского хомячка, так и хомячка Кэмпбелла.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Особенности репродукции хомячков рода *Phodopus*. Результаты настоящего исследования подтверждают наши предыдущие наблюдения о том, что у хомячков рода *Phodopus* зона пеллюцида относительно более толстая, чем у мышей и крыс (Рожкова и др., 2012). Наши данные согласуются с наблюдениями других исследователей, указывающими на то, что на третий день после спаривания, большинство эмбрионов джунгарского хомячка находятся на стадии дробления и располагаются в яйцеводе (Murray, Messinger, 1994). Также полученные результаты совпадают с предыдущими наблюдениями, предполагая, что на второй и в начале третьего дня после спаривания подавляющее большинство эмбрионов хомячка Кэмпбелла являются дробящимися и по-прежнему находятся в яйцеводах (Erb, Wynne-Edwards, 1993). Среднее число эмбрионов на самку-донора составляло 5 штук в соответствии с нашими наблюдениями. Это хорошо укладывается в пределы, о которых сообщалось ранее для этого вида хомячков: от 3.35 (Erb, Wynne-Edwards, 1993) до 8.2 (Феоктистова, 2008).

4.2. Криоконсервация эпидидимального семени хомячков джунгарского и Кэмпбелла. По результатам морфологического анализа мазков и анализа жизнеспособности сперматозоидов методом двойного окрашивания SYBR Green I + PI после процедур криоконсервации можно заключить, что для эпидидимального семени двух видов хомячков (*P. sungorus* и *P. campbelli*) CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze являются более эффективными криопротекторами по сравнению со смесью рафиноза + молоко. У исследованных нами видов хомячков типичным криоповрежденем сперматозоидов можно считать различные нарушения со стороны акросомы. Наш анализ показывает, что разрывы и деформации

акросомы достаточно часто встречаются и в интактных образцах эпидидимального семени данных видов. Процедуры замораживания-оттаивания усиливают “хрупкость” акросомы, что существенным образом снижает их жизнеспособность.

Замораживание семени представителей рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*) описанное в данной работе, было выполнено впервые в мировой практике. В существующих в мире криобанках семени исчезающих и экзотических видов млекопитающих не представлены хомячки рода *Phodopus*. Предложенный нами метод замораживания семени с применением CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze позволяет сохранить биоразнообразие хомячков джунгарского и Кэмпбелла, и может рассматриваться как перспективный для применения на других видах *Cricetinae*.

4.3. Криобанк преимплантационных эмбрионов *P. sungorus* и *P. campbelli* и проблема сохранения генетических ресурсов лабораторных животных. Несмотря на то, что замораживание-оттаивание эмбрионов золотистого хомячка было успешно осуществлено ранее (Ridha, Dukelow, 1985; Lane et al., 1999), никаких попыток применить эти процедуры к видам рода *Phodopus* предприняты не были. Настоящее исследование является первым, которое демонстрирует выживание эмбрионов Кэмпбелла хомячка и джунгарского после замораживания и оттаивания, а также подтверждения их жизнеспособности в культуре *in vitro* и трансплантации самке-реципиенту.

Известно, что основными факторами, влияющими на успех программного замораживания-оттаивания преимплантационных эмбрионов млекопитающих, является скорость замораживания и оттаивания, тип криопротектора, стадия развития эмбрионов и вид (Renard, Babinet, 1984; Dobrinsky, 2002; Leibo, Songsassen, 2002). Данный эксперимент показал, что эмбрионы хомячка Кэмпбелла и джунгарского возможно успешно замораживать при помощи стандартного программного замораживания. При создании оптимальных условий (смесь криопротекторов ЭГ и сахароза) процент эмбрионов успешно переживших процедуры замораживания достоверно не отличается от такового в контроле.

В наших экспериментах мы успешно использовали ЭГ в качестве криопротектора для замораживания эмбрионов хомячка Кэмпбелла и джунгарского. Хорошо известно, что ЭГ обладает высокой способностью проникновения через клеточные мембраны; клетки эмбриона, по крайней мере, у мышей, имеют высокую проницаемость для ЭГ в течение всего периода преимплантационного развития. По этой причине данный криопротектор широко применяется для разных видов млекопитающих. Результаты по исследованию жизнеспособности эмбрионов при помощи

теста двойного окрашивания FDA + PI и культивирования *in vitro*, находятся в хорошем согласии друг с другом, и демонстрируют, что так называемый “стандартный метод” замораживания эмбрионов использующийся для различных видов млекопитающих, может быть успешно применен и к эмбрионам хомячков рода *Phodopus*.

Добавление сахарозы к основному криопротектору существенным образом повлияло на результаты криоконсервации эмбрионов хомячка Кэмпбелла и джунгарского, о чем свидетельствуют как результаты теста FDA + PI, так и результаты культивирования *in vitro* этих эмбрионов после их оттаивания. Процент жизнеспособных эмбрионов после криоконсервации с использованием криопротективной смеси (ЭГ и сахароза) не отличался от такового в контроле (когда эмбрионы не подвергали криоконсервации). Сахара выступают в качестве осмотического буфера, добавление сахарозы к основному криопротектору защищает эмбриональные клетки от обезвоживания и, таким образом, сохраняет структурную целостность эмбрионов.

4.4. Особенности культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов *Cricetinae*. Развитие преимплантационных эмбрионов было тщательно изучено у хомячка Кэмпбелла (Erb, Wyne-Edwards, 1993) и джунгарского (Murray, Messinger, 1994), но никаких попыток не было сделано для культивирования *in vitro* этих видов млекопитающих. Ранее было показано, что ионы неорганических фосфатов блокируют развитие *in vitro* эмбрионов на ранних стадиях сирийского хомячка (Seshagiri et al., 2002) и крысы (Miyoshi et al., 1995). Чтобы преодолеть эту проблему были разработаны специальные питательные среды, не содержащие фосфаты, такие как HECM и R1ECM (Schini, Bavister, 1988; Miyoshi et al., 1995), однако не было никаких сообщений для использования R1ECM с видами хомячков рода *Phodopus*.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что среда R1ECM является еще более подходящей, чем HECM для культивирования *in vitro* эмбрионов этих видов хомячков, несмотря на то, что первая была разработана специально для крыс (Miyoshi et al., 1995), а последняя для золотистых хомячков (Schini, Bavister, 1988). Обе эти среды характеризуются полным отсутствием фосфатов и сниженной концентрацией глюкозы (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014а). Было показано, что эмбрионы не только крыс, но и мышей (Porova et al., 2011) хорошо развиваются *in vitro* на среде R1ECM. Наличие глюкозы и фосфатов является также вредным для эмбрионов золотистого хомячка (Schini, Bavister, 1988). Однако глюкоза является основным источником энергии для развития эмбрионов млекопитающих после стадии морулы (Brison, Leese, 1991; Lane, Gardner, 2007). Выгодное использование R1ECM, которое подтверждено в настоящем исследовании, может

объясняться тем, что в отличие от НЕСМ эта среда содержит глюкозу, хотя и в низкой концентрации.

4.5. Влияние факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов млекопитающих. В данной работе, было показано, что GM-CSF ускоряет развитие преимплантационных эмбрионов джунгарского хомячка *in vitro* и способствует образованию бластоцист. Наши результаты показали также значительное ускорение развития эмбрионов *in vitro* и у хомячков Кэмпбелла после добавки в культуральную среду GM-CSF; при этом среднее число клеток у хомячка в бластоцистах возрастало больше чем в два раза, а индекс фрагментация ядер, наоборот, значительно снизился. Индекс фрагментации ядер, часто используется как мера целостности ядерной ДНК и жизнеспособности эмбрионов. Уменьшение гибели клеток и увеличение их общего числа в бластоцистах при культивировании *in vitro* в среде содержащей GM-CSF, свидетельствует о том, что данный фактор роста играет важную роль в развитии преимплантационных эмбрионов хомячков рода *Phodopus*.

4.6. Трансплантация эмбрионов видов *Cricetinae*. Успех трансплантации во многом был обусловлен адекватным выбором реципиентов. При трансплантации эмбрионов, вообще, большое значение имеет выбор подходящего реципиента. Так в работах на мышах В.И. Евсикова с коллегами было показано, что при межлинейных (аллогенных) трансплантациях зародышей антигенно-чужеродным самкам-реципиентам, наблюдается эффект гетерозиса уже с пренатального развития (Евсиков, Морозова, 1977; 1978). Мышата, рожденные после таких аллогенных трансплантаций, быстрее развиваются и лучше переносят стресс (Gerlinskaya, Evsikov, 2001).

Получение потомков после трансплантации замороженных-оттаяных эмбрионов как джунгарского хомячка, так и хомячка Кэмпбелла, было окончательным доказательством их жизнеспособности после криоконсервации. Эти данные подтверждают предыдущие результаты с куньими, когда межвидовые гибриды F1 между хорьками и европейскими норками были успешно использованы в качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов, как хорька, так и европейской норки (Amstislavsky et al., 2004; 2006), что может рассматриваться в качестве перспективного подхода для сохранения редких видов. Результаты с хомячками, описанные здесь, доказывают возможность расширения этого подхода для других родов млекопитающих, а не только куньих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что в работе впервые удалось успешно криоконсервировать эмбрионы хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*). Их жизнеспособность после криоконсервации была проверена как *in vitro* путем культивирования, так и *in vivo* (рождение потомства после трансплантации). Более того, впервые по отношению к этой таксономической группе был продемонстрирован стимулирующий эффект фактора роста GM-CSF на развитие эмбрионов. Наряду с этим, впервые на *Cricetinae* было успешно криоконсервировано эпидидимальное семя и изучены видовые особенности криоконсервации семени у хомячков джунгарского и Кэмпбелла. Работа расширяет имеющиеся представления о криоконсервации преимплантационных эмбрионов и семени *Cricetinae* и создании криобанков генетических ресурсов млекопитающих. Изучены особенности репродукции и раннего развития хомячков джунгарского и Кэмпбелла, что имеет как теоретическую ценность для зоологии, так и практическое значение для оптимизации их разведения в неволе. В процессе выполнения диссертационной работы создан криобанк эмбрионов и семени хомячков джунгарского и Кэмпбелла, что представляет практическую ценность для сохранения биоразнообразия хомячков рода *Phodopus*, включая эти два вида. Более того, данный криобанк генетических ресурсов созданный для двух видов мохноногих хомячков можно рассматривать как модель для сохранения редких и исчезающих видов грызунов, прежде всего, *Cricetinae*.

ВЫВОДЫ

1. При сравнении трех криопротекторных смесей (рафиноза с молоком; CaniPlus Chill с яичным желтком и глицерином; CaniPlus Freeze) показано, что две последние оказались наиболее подходящими для замораживания эпидидимального семени мохноногих хомячков.
2. Предложенный нами способ с использованием среды R1ECM позволяет успешно культивировать *in vitro* эмбрионы рода *Phodopus* (джунгарского и Кэмпбелла), начиная с ранних стадий дробления до бластоцисты.
3. Продемонстрирована возможность успешного замораживания преимплантационных эмбрионов хомячков джунгарского и Кэмпбелла с использованием комбинации криопротекторов проникающего (этиленгликоля) и непроникающего (сахарозы). Жизнеспособность эмбрионов после их оттаивания подтверждена при помощи двойного окрашивания флюорохромами, культивирования *in vitro*, подсчета интерфазных ядер и трансплантации эмбрионов с получением живого потомства.
4. Показано существенное ускорение развития *in vitro* дробящихся эмбрионов хомячков Кэмпбелла и джунгарского при воздействии на них

гранулоцитарного-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Amstislavsky, S. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*) / E. Brusentsev, E. Kizilova, T. Igonina, T. Abramova, I. Rozhkova // Theriogenology. — 2015. — V. 83. — P. 1056–1063.

2. Brusentsev, E. Cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) / T. Abramova, I. Rozhkova, T. Igonina, V. Naprimerov, N. Feoktistova, S. Amstislavsky // Reproduction in domestic animals. — 2015. — V. 50. — P. 677–683.

3. Амстиславский, С. Я. Криоконсервация эпидидимального семени хомячков джунгарского (*Phodopus sungorus*) и Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*, *Cricetinae*) / Е. А. Кизилова, Е. Ю. Брусенцев, Т. О. Абрамова, В. А. Напримеров // Зоологический журнал. — 2016. — Т. 95. — № 5. — С. 604–613.

4. Амстиславский, С. Я. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных / Е. Ю. Брусенцев, К. А. Окотруб, И. Н. Рожкова // Онтогенез. — 2015. — Т. 46. — № 2. — С. 67–81.

5. Брусенцев, Е. Ю. Традиционные и современные подходы к культивированию преимплантационных эмбрионов млекопитающих *in vitro* / Т. Н. Игонина, С. Я. Амстиславский // Онтогенез. — 2014. — Т. 45. — № 2. — С. 73–88.

Тезисы:

1. Брусенцев, Е. Ю. Криоконсервация эмбрионов джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) и влияние факторов роста на их последующее развитие / И. Н. Рожкова, Т. О. Абрамова, С. Я. Амстиславский // III ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными. — Новосибирск. — 2013. — С. 13.

2. Брусенцев, Е. Ю. Криоконсервация и культивирование *in vitro* эмбрионов джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) / И. Н. Рожкова, Т. О. Абрамова, С. Я. Амстиславский // V международная научно-практическая конференция “От эмбриона к человеку”. — Новосибирск. — 2013. — С. 109–110.

3. Брусенцев Е. Ю., Поиск способов замораживания и оттаивания преимплантационных эмбрионов млекопитающих направленных на сохранения целостности их прозрачных оболочек / Т. Н. Игонина, И. Н. Рожкова, Т. О. Абрамова, В. А. Напримеров, С. Я. Амстиславский // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. — Сыктывкар. — 2014. — С. 47.