

*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](http://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 R1ЕСМ 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 млекопитающих 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  $\chi^2$  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 °С). 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 % CO<sub>2</sub> при 37 °С и высокой влажности в CO<sub>2</sub>-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  $\chi^2$ . 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 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,6 <sup>b</sup>
Комплекс аномалий, %	7,4 ± 1,0	6,7 ± 1,8

Достоверность отличий: <sup>a</sup>*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 <sup>a</sup>	63.4 ± 6.1 <sup>b</sup>
Живые, %	23.1 ± 3.1	28.0 ± 5.1
Гибнущие, %	5.2 ± 2.9	8.7 ± 2.7

Достоверность отличий: <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

**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 <sup>a</sup>	72,0 ± 2,1 <sup>б</sup>
Аномалии головки, %	0,6 ± 0,6	0
Аномалии акросомы, %	93,3 ± 1,7 <sup>в</sup>	86,0 ± 3,7 <sup>г</sup>
Аномалии шейки, %	0,3 ± 0,3	1,7 ± 1,7
Аномалии хвоста, %	0 <sup>д</sup>	3,7 ± 1,5 <sup>е</sup>
Комплекс аномалий, %	5,8 ± 1,6	8,7 ± 2,4

Достоверность отличий: <sup>аб, вг, де</sup>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 <sup>a</sup>	38,6 ± 8,5 <sup>б</sup>
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: <sup>аб</sup>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 + рафиноза (N=3)	CaniPlus Chill (N=3)
Всего	1022	660
Мертвые, %	93.1 ± 3.6 <sup>a</sup>	77.4 ± 6.3 <sup>b</sup>
Живые, %	0 <sup>b</sup>	6.6 ± 2.8 <sup>c</sup>
Гибнущие, %	6.9 ± 3.6	16.0 ± 6.4

Достоверность отличий: <sup>ab, bc</sup>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 <sup>a</sup>	83.9 ± 3.6 <sup>b</sup>
Живые, %	4.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.3 <sup>г</sup>
Гибнущие, %	1.9 ± 0.2 <sup>д</sup>	12.1 ± 5.6 <sup>с</sup>

Достоверность отличий: <sup>аб, вг, дс</sup> 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  $5.0 \pm 0.4$  (диапазон от 1 до 10 эмбрионов), а для джунгарских  $4.9 \pm 0.3$ .

### **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) <sup>a</sup>
Эмбрионы замороженные с ЭГ	21 (3)	15 (71.4) <sup>b</sup>
Эмбрионы замороженные с ЭГ+сахароза	13 (3)	12 (92.3) <sup>b</sup>

Достоверность отличий: <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

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) <sup>a</sup>
Эмбрионы замороженные с ЭГ	14 (3)	9 (64.3) <sup>b</sup>
Эмбрионы замороженные с ЭГ+сахароза	14 (3)	13 (92.9) <sup>b</sup>

Достоверность отличий: <sup>a</sup>*P* < 0.01; <sup>b</sup>*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) <sup>a</sup>	0 (0)
R1ECM (интактные)	9 (3)	6 (66,7) <sup>b</sup>	0 (0)
R1ECM (“крио”)	17 (6)	11 (64,7) <sup>b</sup>	0 (0)

Достоверность различий: <sup>a</sup>*b* и <sup>b</sup>*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) <sup>a</sup>
R1ECM + GM-CSF	8 (3)	4 (50)	4 (50) <sup>b</sup>
R1ECM + EGF	11 (3)	7 (63,6)	1 (9,1)

Достоверность различий: <sup>ab</sup>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)

	R1ECM (интактные)	R1ECM ("крио")*	R1ECM ("крио") + GM-CSF
Число культивируемых эмбрионов (число повторов)	15 (3)	15 (3)	10 (3)
Число развившихся бластоцист (%)	13 (86.7)	7 (46.7) <sup>а</sup>	10 (100) <sup>б</sup>
Бластоцисты с фрагментациями (%)	12 (92.3)	7 (100)	9 (90.0)
Число клеток в бластоцисте (M±m)	14.9 ± 1.4 <sup>в</sup>	19.1 ± 3.9 <sup>г</sup>	40.0 ± 3.1 <sup>д</sup>
Индекс фрагментации (M±m)	29.4 ± 5.2 <sup>е</sup>	40.4 ± 11.5 <sup>жз</sup>	10.1 ± 3.6 <sup>з</sup>
Митотический индекс (M±m)	3.5 ± 1.7	4.6 ± 2.6	2.3 ± 1.5

Достоверность различий: <sup>аб</sup> p < 0.05; <sup>вд</sup> и <sup>гд</sup> p < 0.001; <sup>ез</sup> и <sup>жз</sup> 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.