

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

УДК 577.95;575;591.3;592/599

Брусенцев Евгений Юрьевич

Основные подходы к созданию криобанка эмбрионов и гамет
хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*) и
воздействие факторов роста в их преимплантационном развитии

03.02.04 – зоология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. С.Я. Амстиславский

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТАННОСТИ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	10
1.1. Хомячки рода <i>Phodopus</i>	10
1.2. Сохранение генетических ресурсов лабораторных животных.....	12
1.2.1. Лабораторные модели значимые для биомедицинских исследований.....	12
1.2.2. Сохранение генетических ресурсов лабораторных животных в виде криобанков...	13
1.2.3. Теоретические основы программного замораживания и витрификации.....	15
1.2.4. Сохранение генетических ресурсов в виде гамет (семя, ооциты, яичниковая ткань) и преимплантационных эмбрионов.....	22
1.2.4.1. Замораживание семени.....	22
1.2.4.2. Замораживание ооцитов.....	24
1.2.4.3. Замораживание яичниковой ткани.....	25
1.2.4.4. Замораживание преимплантационных эмбрионов.....	26
1.2.5. Особенности криоконсервации эмбрионов и гамет различных зоологических таксонов.....	27
1.3. Культивирование эмбрионов млекопитающих <i>in vitro</i>	29
1.3.1. Культивирование эмбрионов <i>in vitro</i> и другие репродуктивные технологии.....	29
1.3.2. Питательные среды для культивирования преимплантационных эмбрионов.....	31
1.3.3. Особенности культивирования эмбрионов лабораторных животных.....	37
1.3.4. Влияние факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов.....	40
1.3.4.1. Цитокины как факторы роста.....	43
1.3.4.1.1. Группа воспалительных цитокинов.....	43
1.3.4.1.2. Группа противовоспалительных цитокинов.....	44
1.3.4.1.3. Группа регуляторов иммунитета.....	46
1.3.4.2. Гормональные факторы роста.....	47
1.3.5. Эффекты субоптимальных условий культивирования эмбрионов лабораторных животных на формирование фенотипа рожденных особей.....	48
1.3.6. Факторы и приемы позволяющие оптимизировать условия пребывания эмбрионов разных видов животных вне организма.....	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
2.1. Экспериментальные животные.....	52

2.2. Кр​иоконсервация эпидидимального семени.....	52
2.2.1. Получение, замораживание и оттаивание эпидидимального семени.....	52
2.2.2. Оценка жизнеспособности семени.....	53
2.2.3. Морфологический анализ эпидидимального семени.....	54
2.3. Кр​иоконсервация эмбрионов хомячков рода <i>Phodopus</i>	54
2.3.1 Спаривание самок-доноров и получение эмбрионов.....	54
2.3.2. Замораживание эмбрионов.....	55
2.3.3. Оттаивание эмбрионов.....	56
2.3.4. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов после процедур замораживания-оттаивания.....	56
2.3.4.1. Оценка жизнеспособности эмбрионов методом двойного окрашивания флуоресцеином диацетатом и пропидия йодидом.....	56
2.3.4.2. Культивирование <i>in vitro</i> преимплантационных эмбрионов.....	57
2.3.4.3. Подсчет интерфазных ядер.....	58
2.3.4.4. Трансплантация эмбрионов.....	59
2.4. Статистический анализ.....	60
ГЛАВА 3. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ И ЭМБРИОНОВ ХОМЯЧКОВ ДЖУНГАРСКОГО И КЭМПБЕЛЛА, И ПРОВЕРКА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПОСЛЕ ОТТАИВАНИЯ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>	61
3.1. Морфологические характеристики интактного эпидидимального семени у хомячков джунгарского и Кэмпбелла.....	61
3.2. Жизнеспособность интактного эпидидимального семени у хомячков джунгарского и Кэмпбелла.....	63
3.3. Кр​иоконсервация эпидимального семени хомячков.....	64
3.4. Потенциальная и фактическая плодовитость хомячков <i>P. sungorus</i> и <i>P. campbelli</i>	67
3.5. Замораживание, кр​иоконсервация и оттаивание эмбрионов хомячков рода <i>Phodopus</i>	67
3.5.1. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов методом двойного окрашивания флуорохромами FDA + PI.....	69
3.5.2. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов хомячков <i>P. sungorus</i> и <i>P. campbelli</i> путем культивирования <i>in vitro</i>	72
3.5.3. Воздействие факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов хомячков рода <i>Phodopus</i> и подсчет интерфазных ядер.....	75
3.5.4. Оценка жизнеспособности эмбрионов мохноногих хомячков: развитие <i>in vivo</i> после трансплантации.....	77

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	79
4.1. Особенности репродукции хомячков рода <i>Phodopus</i>	79
4.2. Криоконсервация эпидидимального семени хомячков джунгарского и Кэмпбелла.....	79
4.3. Криобанк преимплантационных эмбрионов <i>P. sungorus</i> и <i>P. campbelli</i> и проблема сохранения генетических ресурсов лабораторных животных.....	81
4.4. Особенности культивирования <i>in vitro</i> преимплантационных эмбрионов <i>Cricetinae</i>	83
4.5. Влияние факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов млекопитающих.....	84
4.6. Трансплантация эмбрионов видов <i>Cricetinae</i>	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ВЫВОДЫ.....	88
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	89

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РТ	репродуктивные технологии
ДМСО	диметилсульфоксид
РС	Рамановская спектроскопия
ЭГ	этиленгликоль
ЭКО	экстракорпоральное оплодотворение
DAPI	4,6-диамидино-2-фенилиндол
DPBS	фосфатно-солевой буфер Дульбекко
EGF	epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста
FDA	fluorescein diacetate, флуоресцеина диацетат
НВ-EGF	heparin-binding epidermal growth factor, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста
HECM	hamster embryo culture medium, среда для культивирования преимплантационных эмбрионов хомяков рода <i>Mesocricetus</i>
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IGF	insulin like growth factors, инсулиноподобный фактор роста
LIF	leukemia inhibitory factor, фактор ингибирующий лейкемию
mR1ECM	modification rat 1-cell embryo culture medium, модифицированная среда для культивирования преимплантационных эмбрионов крыс со стадии зиготы
pc	post coitum, после коитуса
PI	propidium iodide, пропидия йодид
R1ECM	rat 1-cell embryo culture medium, среда для культивирования преимплантационных эмбрионов крыс со стадии зиготы
SPF	specified pathogens free, свободные от видоспецифичных патогенов
SYBR Green I	флуорохром применяемый в ПЦР (используется нами для окрашивания сперматозоидов)
TGF	transforming growth factors, трансформирующий фактор роста
TNF	tumor necrosis factor, фактор некроза опухолей

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Репродуктивные технологии (РТ) все более широко используют для сохранения исчезающих видов млекопитающих (Амстиславский, Трушкин, 2010). Ранее для сохранения видов животных применяли в основном традиционные подходы, основанные на создании особо охраняемых территорий (заповедников, заказников и т.д.), а также на разведении в неволе (зоопарки, фермы и т.д.). По мере усиления антропогенного давления на окружающую среду в конце XX начале XXI века этих традиционных способов сохранения биоразнообразия оказалось недостаточно и, в настоящее время, для этих целей все более активно стали применять новые репродуктивные технологии: работы с эмбрионами и гаметам, в том числе создаются криобанки генетических ресурсов для разных видов млекопитающих.

Современный комплекс РТ включает классическое ЭКО (Stephoe, Edwards, 1978), интрацитоплазматическую инъекцию сперматозоида – ИКСИ (Palermo et al., 1992), интрацитоплазматическую инъекцию селекционированного по морфологии сперматозоида – ИМСИ (Berkovitz et al., 2005), искусственное осеменение (Steiman, Taumor, 1977), созревание ооцитов *in vitro* (Veeck et al., 1983), криоконсервацию гамет (Sherman, 1963) и преимплантационных эмбрионов (Mohr, Trounson, 1985), трансплантацию зигот (Devroey et al., 1989) и эмбрионов (Mason et al., 1990). Особое место в этом списке занимают такие ключевые технологии, как криоконсервация гамет и преимплантационных эмбрионов, и культивирование преимплантационных эмбрионов *in vitro* (McLaren, Biggers, 1958; Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014а). Разработка и применение РТ к двум видам хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus*, Pallas, 1773 и *P. campbelli*, Thomas, 1905) имеет большое практическое значение, как для оптимизации содержания и разведения этих лабораторных животных в неволе, так и в качестве модели для сохранения исчезающих видов *Cricetinae*.

Развитие преимплантационных эмбрионов у джунгарского хомячка (Murtagh, Messinger, 1994) и у хомячка Кэмпбелла (Erb, Wynne-Edwards, 1993) 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 (Fickel et al., 2007; Agca, 2012), либо преимплантационных эмбрионов (Saragusty, Arav, 2011), единственным представителем хомячков в этом списке являлся золотистый хомячок (*Mesocricetus auratus*, Waterhouse, 1839) (Ridha, Dukelow, 1985; Lane et al., 1999). До настоящего времени не удавалось успешно заморозить семя или преимплантационные эмбрионы млекопитающих хомячков, а также культивировать ранние (дробящиеся) эмбрионы *in*

vitro. Более того, отсутствуют сообщения о криоконсервации семени какого-либо представителя *Cricetinae*.

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 (Paria, Dey, 1990; Robertson et al., 2001; Dadi et al., 2007; Singh et al., 2011; Чернов и др., 2012). 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 (Paria, Dey, 1990; Robertson et al., 2001; Dadi et al., 2007; Singh et al., 2011; Чернов и др., 2012), но на видах рода *Phodopus* таких исследований не проводилось.

В связи с ограниченностью ресурсов, и высокими стандартами при разведении и содержании животных для биомедицинских исследований, существует потребность создания криобанков лабораторных животных (Rall et al., 2000; Yoshiki et al., 2009; Landel, 2010). Таким образом, разработка комплекса РТ по отношению к хомячкам джунгарскому и Кэмпбелла может оптимизировать поддержание и обмен генетическим материалом между различными лабораториями для решения проблемы сохранения 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 этих видов.

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* и *P. campbelli*).

Задачи исследования:

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

- Кримоконсервированы 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.
- Кримоконсервировано эпидидимальное семя хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*).
- Изучены видовые особенности кримоконсервации семени у хомячков джунгарского и Кэмпбелла.

Теоритическая и научно практическая ценность работы

Работа расширяет имеющиеся представления о кримоконсервации преимплантационных эмбрионов и семени *Cricetinae* и создании кримобанков генетических ресурсов млекопитающих. Данные могут быть использованы для сохранения 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

- Ростовой 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 кримопротекторов этиленгликоля и сахарозы может использоваться для кримоконсервации преимплантационных эмбрионов хомячков рода *Phodopus* (джунгарского и Кэмпбелла).
- Кримопротекторные смеси CaniPlus Freeze и CaniPlus Chill, разработанные для семени псовых, могут быть применены для кримоконсервации семени *P. sungorus* и *P. campbelli*.

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 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.

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Сергею Яковлевичу Амстиславскому, к.б.н. Елене Александровне Кизиловой, к.в.н. Василию Анатольевичу Напримерову, а также всем сотрудникам сектора криоконсервации и репродуктивных технологий за неоценимую помощь на всех этапах работы над диссертацией.

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

1.1. Хомячки рода *Phodopus*

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. Такие традиционные способы предотвращения исчезновения видов, хоть и работают уже десятки лет, имеют существенные недостатки. Разведение диких видов млекопитающих в питомниках иногда проблематично в силу недостатка знаний по биологии размножения этих видов, но если даже это удастся, то 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 методы репродуктивной биологии в сочетании с методами криобиологии – речь идет, прежде всего, о создании криобанка эмбрионов и гамет в сочетании с другими репродуктивными технологиями.

Репродуктивные технологии все более широко используют для сохранения исчезающих видов млекопитающих (Амстиславский, Трушкин, 2010). Ранее для сохранения видов животных применяли в основном традиционные подходы, основанные на создании особо охраняемых территорий, а также на разведении животных в неволе. По мере усиления антропогенного давления на окружающую среду в конце XX начале XXI века этих традиционных способов сохранения биоразнообразия оказалось недостаточно и, в настоящее время, для этих целей все более активно стали применять новые репродуктивные технологии: работы с эмбрионами и гаметами, в том числе создаются криобанки генетических ресурсов для разных видов млекопитающих.

В мире существует 3 вида мохноногих хомячков (род *Phodopus*): джунгарский хомячок (*P. sungorus*, Pallas, 1773), хомячок Кэмпбелла (*P. campbelli*, Thomas, 1905) и хомячок Роборовского (*P. roborovskii*, Satunin, 1903). Хомячки джунгарский и Кэмпбелла обитают на юго-западе Сибири, северо-востоке Казахстана и Хакасии (изолированной части Минусинского бассейна) (Wilson, Reeder, 2005). Они имеют схожий кариотип, у них по 28 хромосом (Воронцов и др., 1967; Феоктистова, 2008), хотя по поведению и физиологии они отличаются (Феоктистова, 2008). Кроме того, эти виды имеют различные цветовые вариации окраски шерсти (Феоктистова и др., 2012).

Первыми в России кто занялся разведением хомячков джунгарского и Кэмпбелла в лабораторных условиях, и применения их в биомедицинских экспериментах были профессора М.Н. Мейер из Зоологического института АН и Е.Е. Погосянц из Института экспериментальной и клинической онкологии АМН (Суров, Феоктистова, 2006). В настоящее время эти виды хомячков в качестве лабораторных животных активно используют в различных странах мира (Jones, Wynne-Edwards, 2000; Gregg, Wynne-Edwards, 2005; Diedrich, Steinlechner, 2012), а также выводят линии джунгарского хомячка с определенными свойствами, например, линии UCT и Weasleyan, которые не реагируют на фотопериод (Суров, Феоктистова, 2006; Feoktistova et al., 2013).

Джунгарский хомячок используется для исследования феномена торпора, а также для изучения циркадных и сезонных адаптаций, эффектов фотопериодизма (Hoffmann, 1979; Heldmaier et al., 1981; Bartness et al., 1989; Steinlechner, 1998; Steinlechner et al., 2002; Gregg, Wynne-Edwards, 2006; Diedrich, Steinlechner, 2012). Хомячок Кэмпбелла используется в различных биомедицинских исследованиях (Суров, Феоктистова, 2006), например, в онкологии для изучения канцерогенеза, так как у этого вида было установлено спонтанное возникновение различных опухолей (Погосянц и др., 1970). Также хомячок Кэмпбелла является предпочтительной лабораторной моделью для исследований заботы о потомстве, особенно это касается самцов данного вида (Jones, Wynne-Edwards, 2000; Vella et al., 2005). Самцы у этого вида активно участвуют в воспитании потомков и даже помогают в их транспортировке, а также выполняют функцию “акушера”, вылизывая новорожденных (Jones, Wynne-Edwards, 2000). Для самцов хомячков Кэмпбелла характерна плацентофагия (Gregg, Wynne-Edwards, 2005) и оказание общей помощи своим молодым потомкам (Vella et al., 2005).

До сих пор отсутствуют сообщения об успешной криоконсервации преимплантационных эмбрионов и семени мохноногих хомячков. Успешное замораживание-оттаивание семени хомячков рода *Phodopus*, дальнейшее его использование в процедуре оплодотворения *in vitro* может улучшить стратегии для разведения этих видов в неволе и облегчить обмен генетическим материалом между различными лабораториями. Также важно разработать основы криоконсервации преимплантационных эмбрионов представителей данного рода, так как без этого этапа не получится создать полноценный криобанк генетических ресурсов.

В опубликованной литературе отсутствовали данные по культивированию дробящихся эмбрионов мохноногих хомячков. Единственная работа, в которой показана возможность культивирования эмбрионов джунгарского хомячка была выполнена на морулах (Nieder, Carpio, 1990). Кроме того, до настоящего времени эффекты воздействия факторов роста на преимплантационные эмбрионы изучались преимущественно на мышах (Paria, Dey, 1990;

Robertson et al., 2001; Dadi et al., 2007; Singh et al., 2011; Чернов и др., 2012). Исследование краткосрочных эффектов факторов роста на новой модели (хомячок Кэмпбелла, джунгарский хомячок) имеет важное значение для эмбриологии, зоологии и репродуктивной биологии.

1.2. Сохранение генетических ресурсов лабораторных животных

1.2.1. Лабораторные модели значимые для биомедицинских исследований

Расшифровка генома человека (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) подняло на новый уровень поиск способов лечения различных болезней. Расшифрованы геномы и многих других видов животных, в том числе мыши (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002), крысы (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004), собаки (The Canine Genome Sequencing Project, 2005), кошки (NISC Comparative Sequencing Program, 2007), *Danio rerio*, Hamilton, 1822 (Howe et al., 2013), свиньи (Groenen et al., 2012) и других. Эти достижения расширили возможность выбора соответствующих лабораторных животных для определения функций генов и тестирования новых терапевтических подходов.

Мышь, в настоящее время, является, пожалуй, важнейшим и наиболее широко востребованным лабораторным животным (Abbott, 2004; Gondo et al., 2009; Flint, Eskin, 2012). Однако при решении некоторых задач современной биологии мышь не может являться наиболее адекватным лабораторным объектом исследования (Seok et al., 2013). Так, например, механизмы артериальной гипертензии изучают преимущественно на крысах, это же относится и к некоторым другим заболеваниям, имеющим полигенную основу (Pinto et al., 1998; De Artinano, Castro, 2009). Помимо мышей и крыс, приоритетными лабораторными животными для биомедицинских исследований являются собаки, кошки, свиньи, овцы, обезьяны и рыбки *Danio rerio*, известный в англоязычной литературе как “zebrafish” (Mazur et al., 2008; Agca, 2012).

Собака активно использовалась в экспериментальной биологии и медицине в XIX-XX веках (Liard et al., 1974; Мяленкова, 1994). В настоящее время собаку все еще используют в качестве лабораторного животного, хотя редко (Agca, 2012). Кошек также до сих пор применяют в качестве лабораторных животных (Agca, 2012). Благодаря сходству кошачьего генома с геномом человека (Driscoll et al., 2009) и сходным клиническим проявлениям некоторых заболеваний у человека и кошки, последняя незаменима для проведения некоторых медицинских исследований (Griffin, Baker, 2002).

Свиней используют в качестве лабораторных животных в различных исследованиях связанных с хирургией, трансплантологией, фармакологией (Whyte, Prather, 2011). Помимо

обычных свиней все чаще в экспериментах стали применять мини-свиней (Тихонов, Бобович, 2011).

Danio rerio является тропической пресноводной рыбкой, которая в природе обитает в Индии и некоторых соседних с ней странах (Беляева и др., 2010). Этот известный каждому аквариумисту вид рыб стал за последние десятилетия очень значимым, так как после расшифровки их генома оказалось, что он имеет много сходства с геномом человека (Howe et al., 2013). Эти небольшие рыбки хорошо размножаются в неволе, неприхотливы, требуют минимальных затрат на поддержание вида в культуре. *Danio rerio* используют в исследованиях по генетике и биологии развития, а также в качестве экспериментального объекта при создании новых лекарственных препаратов и моделировании патологических процессов (Berghmans et al., 2008; Беляева и др., 2010).

Существует много других видов животных, без которых невозможно решить определенные задачи. Например, в силу особенностей преимплантационного развития, впервые возможность успешного клонирования на млекопитающих удалось продемонстрировать на овцах. Этот “эксперимент века” закончился рождением знаменитой Долли (Campbell et al., 1996). Тем не менее, несмотря на то, что множество важных экспериментов проводятся на различных видах млекопитающих, рыб, птиц и представителей других таксонов, мы, в данном обзоре, ограничимся лишь теми видами лабораторных животных, которые считаются приоритетными именно для биомедицинских исследований (Mazur et al., 2008; Agca, 2012).

Применение РТ в сочетании с клеточными и геномными инструментами привело к созданию множества трансгенных и нокаутных животных, которые вносят существенный вклад в биомедицинские исследования, начиная от анализа функций гена до сравнительных исследований разнообразных патологий у человека (Bockamp et al., 2002; Adams, Weiden, 2008; Gondo et al., 2009). На сегодняшний день получены тысячи новых трансгенных, нокаутных и мутантных линий мышей (Abbott, 2004), крыс (Jacob et al., 2010), а также *Danio rerio* (Ekker, 2008) и ряда других животных, которые используются в качестве лабораторных моделей. Поддержание большого числа линий лабораторных животных необходимых для проведения современных медико-биологических исследований невозможно без организации криобанка зародышей, гамет и стволовых клеток (Abbott, 2004; Landel, 2005; Ekker, 2008; Agca, 2012).

1.2.2. Сохранение генетических ресурсов лабораторных животных в виде криобанков

Криоконсервация эмбрионов и гамет широко используется для сохранения генетических ресурсов лабораторных, а также сельскохозяйственных, редких и исчезающих

видов животных (Comizzoli et al., 2009; Амстиславский, Трукшин, 2010; Agca, 2012). Несмотря на то, что уже успешно заморожены эмбрионы и гаметы нескольких десятков видов млекопитающих (Fickel et al., 2007; Saragusty, Arav, 2011), а криобанки генетических ресурсов стали рутинной практикой работы генетических центров (Rall et al., 2000; Landel, 2005; Yoshiki, 2009; Landel, 2010) до сих пор не существует единого универсального протокола замораживания и оттаивания эмбрионов даже для мышей. В некоторых генетических центрах, в которых созданы криобанки различных линий мышей и крыс, предпочитают использовать программное замораживание (Rall et al., 2000; Landel, 2005; Landel, 2010), в других – исключительно витрификацию (Yoshiki, 2009). Между тем, за прошедшие несколько десятилетий криобиология развивалась весьма успешно и, в результате, удалось достигнуть существенного прогресса в понимании механизмов криоповреждения и криозащиты (Mazur, 1990). В последнее время появились новые подходы к исследованию этих вопросов, с использованием современных методов физики (Okotrub et al., 2013). Более того, с возрастанием требований к экспериментам на животных и с появлением огромного числа линий мышей и других приоритетных лабораторных животных, организация криобанков стала одним из основных атрибутов современных генетических центров (Agca, 2012).

Создание криобанка гамет и преимплантационных эмбрионов лабораторных животных имеет несколько основных задач. Важнейшей из них является сохранение генетических ресурсов видов, линий и популяций животных (Вепринцев, Ротт, 1984). Часто криобанки имеют целью сохранить биоразнообразие того или иного вида млекопитающих (Амстиславский, Трукшин, 2010; Амстиславский и др., 2014). Если численность особей того или иного вида животных достигает некоего критического минимума, велика вероятность потери данного вида (Frankham, 2003). При уменьшении численности популяции возрастает опасность генетического дрейфа, генетической нестабильности и потери особей в результате болезней (Frankham, 2003; Amstislavsky et al., 2008). Наличие криобанка генетических ресурсов того или иного вида позволяет свести к минимуму риск потери вида и его биоразнообразия (Andrabi, Maxwell, 2007).

Наличие криобанка повышает эффективность работы генетических центров путем снижения финансовых затрат и оптимизации их деятельности, помогая ассоциировать их в международные федерации ресурсов лабораторных животных (Landel, 2005; FIMRe, 2006). Упрощается обмен линиями лабораторных животных между центрами, так как транспортировать замороженные гаметы и эмбрионы обычно быстрее, чем взрослых особей; кроме того, обмен генетическими ресурсами в виде замороженных эмбрионов позволяет избежать потенциальной передачи заболеваний и других проблем, связанных со здоровьем животных (Mahabir et al., 2008; Shek, 2008). Таким образом, криобанк дает

исследователям практически неограниченный доступ к уникальным биомедицинским моделям, полученным в различных странах (FIMRe, 2006; Agca, 2012). В настоящее время, возрастают требования к исследованиям, проводимым на лабораторных животных (Festing et al., 1998). Чтобы соответствовать этим стандартам, все чаще исследования проводят на животных SPF-статуса (specified pathogens free), что позволяет получать более точные данные, без ошибок связанных с патогенной нагрузкой на лабораторных животных (Shek, 2008; Брусенцев и др., 2011). Криобанк в сочетании с программой редеривации, позволяет работать с животными SPF-статуса и контролируемого генетического качества (Rall et al., 2000; Брусенцев и др., 2011; Амстиславский и др., 2013). В следующем разделе проанализированы криобиологические основы замораживания и криоконсервации биологических объектов, прежде всего зародышей и гамет млекопитающих.

1.2.3. Теоретические основы программного замораживания и витрификации

Биологический материал может храниться при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ длительное время не теряя своей жизнеспособности, поскольку при этой температуре метаболические процессы практически остановлены (Mazur, 1970). Это теоретическое положение подтверждается на практике получением потомства из замороженных эмбрионов, находившихся в криобанке несколько десятков лет (Glenister, Thornton, 2000). Криобиология играет важную роль в сохранении генетических ресурсов различных животных, однако современное понимание криоконсервации основано на длительной истории экспериментальных исследований в физике, химии и биологии (Arav, 2014).

На сегодняшний день существует два основных способа замораживания биологических образцов: программное замораживание и витрификация. Первый способ заключается в охлаждении с относительно небольшими скоростями, по специальной программе, состоящей из нескольких стадий (Whittingham et al., 1972; Leibo, Songsasen, 2002). Основываясь на всестороннем исследовании процессов, происходящих при постепенном снижении температуры (Mazur, 1990), современные программы замораживания эмбрионов предусматривают этап постепенного снижения температуры ($0.3\text{-}2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту) (Leibo, Songsasen, 2002). Под витрификацией же обычно понимают процесс сверхбыстрого охлаждения, когда кристаллов льда вообще не образуется (Saragusty, Arav, 2011). Витрификация относится к неравновесному процессу. В этом случае существует этап относительно быстрого (в идеальном случае – практически мгновенного) охлаждения, при котором нарушается равновесие фаз, а кристаллического льда не образуется вообще. Происходит образование аморфной твердой фазы – процесс известный под названием “стеклование” (Жмакин, 2008). Следует отметить, что некоторые из разновидностей

программного замораживания также относятся к неравновесному способу – а именно, в тех случаях, когда медленное охлаждение обрывается при температурах от $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ быстрым погружением замораживаемого материала в жидкий азот (Mazur, 1990). При этом равновесие нарушается образованием внутриклеточного льда, но кристаллики настолько малы, что не могут существенно повредить клетки.

Ключевое место, как при равновесном, так и при неравновесном способе занимают криопротекторы. Традиционно криопротекторы делят на проникающие и непроникающие (McGann, 1978; Molinia et al., 1994; Hubalek, 2003). Наиболее известными и широко применяемыми криопротекторами относящимися к первой группе являются диметилсульфоксид (ДМСО); многоатомные спирты, такие как глицерин, пропиленгликоль, этиленгликоль; одноатомный спирт метанол (Molinia et al., 1994; Hubalek, 2003). Ко второй группе криопротекторов относятся, главным образом, различные олиго-, моно- и полисахариды: сахароза, трегалоза, фикоил, рафиноза, фруктоза и другие сахара (McGann, 1978; Hubalek, 2003). Следует отметить, что эта распространенная классификация является неким обобщением, и способность проникать в клетки может достаточно сильно различаться у криопротекторов в пределах одной группы. Так, например, глицерин, как правило, проникает через клеточные мембраны намного медленнее, чем ДМСО или этиленгликоль (Hubalek, 2003). Более того, скорость проникновения через клеточные мембраны для того или иного криопротектора, как и их токсические эффекты, зависят от температуры и типа клеток (Kasai et al., 1981; Hubalek, 2003), в частности, от стадии развития эмбриона (Pedro et al., 2005).

Список криопротекторов непрерывно растет. Некоторые природные комплексные соединения, такие как яичный желток, некоторые пектиновые полисахариды, которые выделяют из растений, гликопротеины, выделяемые из некоторых рыб и насекомых, обладают криопротективными свойствами и их иногда используют для замораживания и криоконсервации различных биологических объектов (Hubalek, 2003). Как правило, комбинация криопротекторов более эффективно предохраняет замораживаемые объекты от повреждающих факторов, чем эти компоненты по отдельности (Hubalek, 2003; Брусенцев и др., 2014б), при определенных комбинациях криопротекторов наблюдается эффект синергизма (Hubalek, 2003). Концентрация криопротекторов при программном замораживании составляет обычно для проникающих криопротекторов около 10 %, а для не проникающих она существенно меньше (McGann, 1978). При витрификации концентрация криопротекторов как правило выше – около 40 %.

Теоретической основой для создания программ замораживания были разработки Питера Мэйзура, который является автором “двухфакторной гипотезы” повреждений возникающих при глубоком охлаждении различных биологических объектов (Mazur, 1970;

Mazur, 1990). По мере охлаждения препарата происходит увеличение концентрации окружающего клетку раствора, что в свою очередь, приводит к постепенному обезвоживанию клетки. Скорость обезвоживания зависит от объема клетки, а также от проницаемости её клеточной мембраны для воды. Двухфакторная гипотеза предполагает два принципиально разных механизма повреждения клетки, реализация которых зависит от скорости охлаждения препарата. В случае слишком быстрого охлаждения клетка не успевает достигнуть достаточной степени обезвоживания и в результате лишняя вода превращается во внутриклеточный лёд. Образование льда в клетке способно привести к механическим повреждениям, таким как разрыв клеточной мембраны. С другой стороны, если проводить охлаждение слишком медленно, то из-за чрезмерного обезвоживания и длительной экспозиции в высококонцентрированном растворе может произойти интоксикация клетки.

Эксперименты по замораживанию разных биологических объектов подтвердили основные положения двухфакторной гипотезы П. Мэйзура (Mazur, 1970; Rall et al., 1983; Mazur, 1990). Из двухфакторной гипотезы следует, что существует некоторая скорость охлаждения, оптимальная с точки зрения выживания клеток. Эта скорость может сильно различаться в зависимости от замораживаемого объекта. Так например, для дрожжевых клеток оптимальная скорость охлаждения составляет 7 °С/мин, для ооцитов и эмбрионов млекопитающих – не более 1 °С/мин, а для эритроцитов человека она оценивается в 3000 °С/мин. (Mazur, 1970).

В процессе медленного (равновесного) программного замораживания внутриклеточная вода выходит из клеток и замещается раствором криопротектора, что существенно снижает точку кристаллизации и позволяет вне- и внутриклеточной жидкости находиться в переохлажденном состоянии (Rall et al., 1983). При программном замораживании эмбрионов млекопитающих, на первом этапе температуру, как правило, снижают на 1-2 °С в минуту до -7 °С - -12 °С, в зависимости от вида животных и типа криопротектора (Leibo, Songsasen, 2002; Tsai et al., 2009). По достижении данной температуры, образец выдерживается 5-10 минут. В этот промежуток времени, в условиях термостатирования, индуцируется кристаллизация льда внутри контейнера содержащего замораживаемый образец – сидинг (англ. seeding) (Leibo, Songsasen, 2002). На практике, чаще всего, касаются охлажденным предметом контейнера, в котором располагается образец, искусственно создавая центры кристаллизации льда. Вода, содержащаяся в растворе криопротектора окружающего замораживаемые объекты, начинает превращаться в лёд, что приводит к выходу воды из клеток биологического образца.

После сидинга наступает второй этап: более медленное охлаждение замораживаемого объекта. Чаще всего на этом этапе температура снижается на 0.3-0.5 °С в минуту, однако, в некоторых случаях, оптимальная скорость охлаждения выше; это существенным образом

зависит от вида охлаждаемого объекта, в частности от проницаемости клеточных мембран (Mazur, 1970). Экспериментально показано, что образование кристаллов льда инициируется и нарастает сначала во внеклеточном пространстве (Rall et al., 1983). С понижением температуры вода в окружающем замораживаемый образец растворе все больше начинает переходить в лёд, а клетки охлаждаемого образца все более обезвоживаются, и происходит существенное повышение концентрации криопротектора в том растворе, который все еще остается в жидкой фазе (Mazur, 1970). В этом концентрированном растворе начинает образовываться аморфная фаза (Jochem, Körber, 1987; Mazur, 1990; Жмакин, 2008). Кристаллы льда внутри клеток, как показали эксперименты, образуются при существенно более низких температурах, чем вне клеток (Rall et al., 1983; Mazur, 1990).

Большинство классических исследований по замораживанию эмбрионов разных видов млекопитающих ориентированы на так называемом “стандартном протоколе”, при котором *plunging* (ангоязычный термин обозначающий быстрое завершение медленного охлаждения погружением контейнера с биоматериалом в жидкий азот) производят при температурах ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Leibo, Sonsassen, 2002). При его применении с использованием криопротекторов в концентрациях 1-2 моль внутриклеточные кристаллы льда образуются, но они настолько малы, что не могут существенно повредить клетки. Этот протокол, предложенный впервые Вилладсеном (Willadsen, 1977) рекомендован для создания криобанка лабораторных животных (Renard, Babinet, 1984) и до сих пор используется, например, в самом крупном мировом криоархиве мышинных линий – Джексоновской лаборатории (Bar Harbor, USA).

Однако самое первое успешное замораживание эмбрионов производили согласно протоколу, при котором их охлаждали до гораздо более низких температур – до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ или до $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ перед тем, как осуществить погружение биоматериала в жидкий азот (Whittingham et al., 1972). Этот классический протокол, с небольшими модификациями, до сих пор иногда применяют (Tsai et al., 2009). При столь длительном обезвоживании кристаллов льда внутри клеток практически вообще не образуется, однако, этот классический способ программного замораживания в наши дни применяется крайне редко, так как ему присущи определенные ограничения. Прежде всего, осуществление такого длительного способа охлаждения занимает слишком много времени. Более того, столь медленное замораживание требует и очень медленного оттаивания (Whittingham et al., 1972). В конечном счете, результаты, полученные с применением более технологичного стандартного протокола (Renard, Babinet, 1984; Leibo, Sonsassen, 2002) ничуть не хуже по сравнению с требующим гораздо большего времени классическим вариантом (Whittingham et al., 1972).

Теоретические основы витрификации были разработаны в 1930-х годах Льюэтом (Luyet, 1937) и успешно реализованы по отношению к эмбрионам млекопитающих в 1980-х годах (Rall, Fahy, 1985). При этом способом основным процессом является упоминавшееся выше стеклование (Fahy et al., 1984). Переход раствора в аморфную твердую фазу происходит при высоких скоростях охлаждения – более 500 °C/мин. При проведении витрификации используют те же самые криопротекторы, что и при программном замораживании, но в концентрации от 4 до 7 моль (Vajta, 2009; Saragusty, Arav, 2011). Данный метод эффективно применяется не только для грызунов (Rall, Fahy, 1985), но и для животных, которых сложно криоконсервировать при помощи программного замораживания из-за содержания в цитоплазме их бластомеров большого количества липидных гранул (Zhang et al., 2012).

Наряду с криопротектором, важным элементом при программном замораживании и витрификации является контейнер, в котором находится образец в процессе замораживания (Saragusty, Arav, 2011). Наиболее распространенными контейнерами для проведения программного замораживания и витрификации эмбрионов являются соломины, либо криопробирки.

Помимо процесса замораживания также важен и обратный процесс оттаивания. Процесс оттаивания необходимо выполнять правильно, чтобы предотвратить перекристаллизацию воды (Mazur, 1990). Оттаивание также как и замораживание бывает двух типов: медленное и быстрое. В общем, если образец был заморожен медленно, то оттаивание должно происходить медленно, при быстром же способе замораживания рекомендовано и сравнительно быстрое оттаивание (Whittingham et al., 1972; Renard, Babinet, 1984; Mazur, 1990). Экспериментально показано, что если биологический материал был заморожен согласно “стандартного протокола” замораживания, описанного выше, то температура оттаивания должна составлять от 300 °C до 2500 °C в минуту (Renard, Babinet, 1984). При строго равновесном медленном охлаждении, оптимальная скорость оттаивания тоже очень низкая (20 °C/мин) (Whittingham et al., 1972).

Разработка конкретных протоколов замораживания требует диагностики. Можно выделить два типа экспериментальных работ по исследованию процессов замораживания клеток. К первому типу относятся работы, которые заключаются в сравнении состояния клеток до и после криоконсервации. Второй тип заключается в непосредственном наблюдении процессов протекающих при замораживании и оттаивании клеток *in situ*. Наиболее распространенным методом второго типа являются исследования с помощью криомикроскопа.

Криомикроскопия используется для исследования процессов протекающих при замораживании биологических объектов с середины девятнадцатого века (Sachs, 1860;

Pringsheim, 1932; Diller, 1996). В самом начале микроскопические наблюдения проводились в холодных помещениях, со временем стали использоваться микроскопы оборудованные криостатами. Криомикроскопия завоевала свою популярность среди криобиологов благодаря своей технической простоте, а также тому, что эта методика позволяет бесконтактным образом проводить наблюдения за замораживаемыми клетками *in situ*. Результаты криомикроскопических наблюдений легко сопоставить с оценками эффективности применяемых протоколов замораживания по жизнеспособности биологических объектов после криоконсервации (Rall et al., 1983).

Для получения дополнительной информации, криомикроскопию совмещают с другими методиками, например с дифференциальной сканирующей калориметрией (Han, Bischof, 2004; Mori et al., 2012). С этой целью создаются даже экспериментальные установки, совмещающие два этих метода (Yuan, Diller, 2005). Дифференциальная сканирующая калориметрия позволяет отслеживать количество льда в замораживаемом препарате, а также определять температуры, при которых происходят фазовые переходы.

В последнее время, стали появляться работы, в которых криомикроскопия совмещается со спектроскопией комбинационного рассеяния света; которое в англоязычной литературе часто называют Рамановской (Raman) спектроскопией (РС) (Dong et al., 2010; Okotrub et al., 2013). Суть метода РС заключается в фокусировке монохроматического излучения на образец и исследовании спектра света, рассеянного на других длинах волн. Изменение длины волны фотона (светового кванта) происходит из-за его взаимодействия с колебаниями молекул. В результате взаимодействия фотон может (с вероятностью $10^{-6} \div 10^{-10}$) поглотить или породить квант колебания молекулы, что скажется на его энергии (и связанной с ней длиной волны). Исследуя спектр рассеянного излучения можно определить энергию колебаний, на которых происходит рассеяние света. Поскольку каждое соединение обладает индивидуальным набором колебаний, то и спектр рассеянного этим веществом света будет также индивидуален. Кроме того, РС оказывается чувствительной к различным факторам, таким как агрегатное состояние вещества.

Микроскопный объектив позволяет фокусировать излучение в малые объемы. Поэтому совмещение РС с микроскопом позволяет исследовать состав и состояние вещества с высоким (~ 1 мкм) пространственным разрешением. В настоящее время уже продемонстрирована возможность детектирования внутриклеточного льда в клетках млекопитающих методом РС (Dong et al., 2010). Также, с помощью этой методики было исследовано распределение продуктов эвтектической кристаллизации физиологического раствора при замораживании суспензии дрожжевых клеток (Okotrub et al., 2013).

Применение криомикроскопии, совмещенной с методом РС, позволяет получать информацию не только об окружении, но и о состоянии самих клеток. Например, РС

оказывается чувствительной к упорядочению липидов в мембранах клетки и липидных каплях. В спектре замороженного эмбриона мыши наблюдаются острые пики на частотах 2849 и 2882 cm^{-1} (1 cm^{-1} равняется 30 ГГц), относящиеся колебаниям C-H₂ связи. Эти спектральные изменения связаны с упорядочением неполярных углеродных цепочек липидов при низких температурах.

Таким образом, применение РС позволяет значительно расширить экспериментальные возможности в диагностике процессов, протекающих при замораживании клеток. Криобиологические эксперименты *in situ* по большей части направлены на исследование механизмов криоповреждения. Как правило, условия, при которых проводятся эти эксперименты, немного отличаются от условий, в которых проводится замораживание и криоконсервация биологических объектов для реальных целей создания криобанков генетических ресурсов животных. Например, в условиях эксперимента *in situ* может использоваться не стандартные криопробирки или соломины, а другие криоемкости для замораживания, возможны небольшие отклонения в температурном режиме или концентрации криопротекторов (Dong et al., 2010; Okotrub et al., 2013). Поэтому более точную и достоверную информацию об эффективности того или иного протокола обычно получают в исследовании выживания и анализа состояния оттаянных клеток.

При наличии флуоресцентного микроскопа и витальных (пригодных для прижизненного окрашивания) флуорохромов можно достаточно быстро проверить, погиб эмбрион в процессе замораживания или выжил. Часто этот способ применяют при попытках заморозить и криоконсервировать тот или иной новый объект (Amstislavsky et al., 1996; Tsai et al., 2009; Амстиславский и др., 2014). Методы прижизненного окрашивания флуорохромами и последующая флуоресцентная и световая микроскопия позволяют делать выводы о сохранении жизнеспособности эмбрионов и гамет после криоконсервации. Впервые удобный и эффективный метод окрашивания эмбрионов млекопитающих витальным красителем – флуоресцеином диацетатом (FDA – fluorescein diacetate) с последующей оценкой их жизнеспособности при помощи флуоресцентной микроскопии был применен по отношению к мышинным эмбрионам австралийскими исследователями Линдой Мор и Аланом Троунсоном (Mohr, Trounson, 1980). Позже стали применять совместное окрашивание FDA и пропидием йодидом (PI – propidium iodide), что позволяет видеть при помощи флуоресцентного микроскопа, как живые, так и мертвые клетки (Ivan et al., 2011).

Окрасив пережившие криоконсервацию зародыши хорька витальным флуоресцентным красителем FDA, группой Амстиславского были получены первые подтверждения того, что эмбрионы этого вида кунных успешно пережили процедуры замораживания, криохранения и оттаивания (Amstislavsky et al., 1996). Подобным же образом, применив несколько иные флуорохромы, удалось показать, что сперматозоиды

амурского лесного кота (*Prionailurus bengalensis euptilurus*, Elliot, 1871), успешно пережили криоконсервацию (Амстиславский и др., 2014). Окончательные выводы можно сделать, лишь убедившись в способности оттаянных объектов развиваться *in vitro* или *in vivo*. Так, например, после теста с витальным красителем, группа Амстиславского получила убедительное доказательство способности эмбрионов хорька развиваться как *in vitro* (Amstislavsky et al., 2000), так и *in vivo* (Lindeberg et al., 2003), причем в последней работе было получено живое потомство после трансплантации эмбрионов взятых из криобанка.

1.2.4. Сохранение генетических ресурсов в виде гамет (семя, ооциты, яичниковая ткань) и преимплантационных эмбрионов

Генетические ресурсы лабораторных животных в современных криобанках сохраняют главным образом в виде криоконсервированных сперматозоидов (мужских гамет) и преимплантационных эмбрионов (Landel, 2005; Agca, 2012). Замораживание женских гамет – ооцитов применяют существенно реже (Agca, 2012).

1.2.4.1. Замораживание семени

Замораживание мужских гамет – сперматозоидов является одним из основных методов, применяемых для сохранения генетических ресурсов лабораторных мышей, а также крыс, собак, кошек, свиней и *Danio rerio* (Mazur et al., 2008; Agca, 2012). После оттаивания замороженного семени, в том случае, если процент подвижных сперматозоидов в образце достаточно велик, можно получить зиготы и развивающиеся зародыши с применением процедуры ЭКО; последующая же трансплантация полученных *in vitro* зародышей позволяет восстановить ту или иную линию лабораторных мышей или крыс (Landel, 2005).

Если же после оттаивания активность семени низкая, применяют интрацитоплазматическую инъекцию сперматозоида (Kimura, Yanagimachi, 1995). В этом случае сперматозоиды при помощи микроманипуляторов вводят внутрь яйцеклетки, прокалывая ее прозрачную оболочку. Наиболее современной разновидностью этого метода, который применяется в медицине, но пока не нашел широкого применения в работе с лабораторными животными является интрацитоплазматическая инъекция селекционированного по морфологии сперматозоида (Berkovitz et al., 2005).

Другим путем восстановления живых особей из замороженного семени является искусственное осеменение (Foote et al., 2002). Несмотря на то, что его широко используют по отношению к относительно редко применяемым лабораторным объектам, таким, как свиньи, собаки, кошки (Foote et al., 2002; Zambelli, Cunto, 2005; Thomassen, Farstad, 2009), этот путь

восстановления животных из замороженного семени используют по отношению к мышам гораздо реже. Тем не менее, еще с 1960-х гг была продемонстрирована возможность искусственного осеменения мышей путем введения семени непосредственно в матку (Wolfe, 1967), метод был существенно улучшен за прошедшие с этого времени полвека (Roos et al., 2008). Недостатком этого способа является то, что требуется большое число сперматозоидов для успеха искусственного осеменения. Позже были разработаны методы осеменения путем введения сперматозоидов в ампулу яйцевода (Nakagata, 1992) и в бурсу (сумку окружающую яичник и яйцевод) (Sato et al., 2002). Эти методы требуют существенно меньше сперматозоидов для успешного осеменения, однако наиболее широкое распространение при сохранении генетических ресурсов мышей получил способ, когда криобанк семени сочетают с ЭКО и последующей трансплантацией полученных *in vitro* эмбрионов (Landel, 2005; Agca, 2012).

Криоконсервация семени в сочетании с последующим ЭКО и трансплантацией полученных эмбрионов самкам-реципиентам является наиболее адекватным методом при сохранении трансгенных и нокаутных линий мышей (Agca, 2012). Получение семени из эпидидимисов самцов *post mortem* является относительно простой процедурой; для экстракорпорального оплодотворения большого числа ооцитов требуется получить эпидидимисы лишь нескольких животных (Agca, 2012).

На сегодняшний день, наилучшие результаты при замораживании семени лабораторной мыши, получаются при использовании обезжиренного молока и раффинозы в качестве криопротекторов; замораживание же осуществляют, выдерживая соломинку с семенем в парах жидкого азота, после чего помещают ее в жидкий азот. Этот протокол может быть успешно выполнен в большинстве лабораторий, так как он не требует программного замораживателя и эффективен по отношению к большинству изученных линий мышей (Takeshima et al., 1991).

Если замораживание семени мышей является рутинной и воспроизводимой процедурой, то с крысами ситуация несколько сложнее. Хотя протоколы замораживания мышей создавали в течение длительного времени, потребовалось еще десятилетие для того, чтобы разработать эффективные протоколы для замораживания семени крыс. Для данного способа требуются простые соединения, такие как яичный желток, моногидрат лактозы и трис-гидроксиметил-аминометан (Seita et al., 2011). Замораживание семени крыс, также как и мышей, обычно проводится без использования программного замораживателя, что сильно облегчает задачу.

В связи с тем, что создано множество линий такого популярного объекта генетических исследований как *Danio rerio*, в мире уже существует два криобанка, где в замороженном состоянии хранятся сперматозоиды этих линий (Agca, 2012). Для

замораживания семени этого вида рыб используют в качестве криопротекторов метанол или диметилацетамид (Morris et al., 2003; Yang, Tiersch, 2009).

Криоконсервацию семени применяют и при создании криобанков таких редко используемых лабораторных животных, как собаки, кошки и свиньи (Agca, 2012). Поскольку собаки являются распространенными домашними питомцами и искусственное осеменение псовых широко применяется в мире, способы замораживания семени псовых хорошо разработаны (Thomassen, Farstad, 2009). Семя кошачьих чаще всего замораживают, используя глицерин и яичный желток в качестве криопротекторов (Luvoni, 2006). Опыт группы Амстиславского свидетельствует о том, что сперматозоиды кошачьих можно успешно замораживать с использованием разбавителей семени, выпускаемые для замораживания семени псовых (Амстиславский и др., 2014). Имеются данные по эффективной криоконсервации семени свиней (Bwanga, 1991; Foote et al., 2002). Несмотря на то, что замораживание семени является достаточно рутинной процедурой по отношению к мышам, в отношении остальных видов лабораторных животных перечисленных выше, результаты замораживания сперматозоидов не столь хороши и воспроизводимы, как на мышах, и продолжают эксперименты по совершенствованию методов замораживания семени этих видов лабораторных животных (Mazur et al., 2008).

1.2.4.2. Замораживание ооцитов

Криоконсервация женских гамет большинства видов млекопитающих, в отличие от замораживания сперматозоидов и эмбрионов, до сих пор связана с большими сложностями. Поэтому генетические ресурсы лабораторных животных чаще сохраняют именно в виде замороженных эмбрионов или сперматозоидов, чем в виде ооцитов (яйцеклеток) (Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005; Agca, 2012).

Одна из основных проблем, возникающих при замораживании женских гамет, – затвердевание прозрачной оболочки (*zona pellucida*). Эта эластичная гликопротеиновая оболочка окружает яйцеклетку, отделяя ее от окружающей среды, и выполняет ряд жизненно важных функций (Рожкова и др., 2012). После проникновения сперматозоида в ооците запускается каскад биохимических реакций, который вызывает выброс наружу содержимого кортикальных гранул. Эти реакции модифицируют прозрачную оболочку, которая преобразуется в так называемую оболочку оплодотворения, препятствующую полиспермии – проникновению в яйцеклетку более одного сперматозоида. Процессы замораживания-оттаивания приводят к опорожнению кортикальных гранул, затрудняя или делая вовсе невозможным последующее оплодотворение таких ооцитов (Matson et al., 1997).

Другая не менее серьезная проблема заключается в том, что овулировавшие (вышедшие из фолликулов в фаллопиевы трубы) яйцеклетки большинства млекопитающих находятся в состоянии незавершенного мейоза, тонкие механизмы которого часто повреждаются процедурами криоконсервации, что также препятствует дальнейшему оплодотворению. В силу этих причин, методы замораживания ооцитов пока не стали рутинной процедурой даже для таких лабораторных животных, как мыши и крысы (Mullen, Critser, 2007). Технологии замораживания и криоконсервации яйцеклеток млекопитающих интенсивно разрабатываются, и, в последнее десятилетие, достигнут существенный прогресс (Noyes et al., 2010).

Следует особо остановиться на проблемах, связанных с замораживанием яйцеклеток (икры) рыб, поскольку среди рыб появился перспективный объект генетических исследований – *Danio rerio* (Агса, 2012). Криоконсервация яйцеклеток рыб, в том числе и этого вида, затруднена из-за структурных барьеров, которые мешают проникновению криопротекторов, а также повышенной чувствительности икринок к охлаждению (Robles et al., 2009).

1.2.4.3. Замораживание яичниковой ткани

Экспериментально было показано, что можно успешно трансплантировать яичниковую ткань мышей соответствующим реципиентам того, как до, так и после криоконсервации (Cox et al., 1996; Snow et al., 2002). Таким образом, трансплантация яичниковой ткани с последующей трансплантацией иммунодефицитным реципиентам другой линии или даже другого вида (Snow et al., 2002) либо генетически идентичным реципиентам той же линии (Cox et al., 1996) является перспективным подходом к сохранению генетических ресурсов мышей, особенно при сохранении трансгенных линий, имеющих репродуктивные проблемы (Dorsch, Wedekind, 2010). Замораживают яичниковую ткань мышей как при помощи программного замораживания (Cox et al., 1996), так и при помощи витрификации (Chen et al., 2006).

Результаты эксперимента, проведенного группой Амстиславского, показали, что яичниковая ткань мышей линии 129S2/SvPasCrl, которая была пересажена подкожно овариэктомированным реципиентам линии SCID/SHO-Prkdcscid, для которых характерен врожденный иммунодефицит и поэтому чужеродные ткани не отторгаются. Ткань успешно прижилась и видна в виде подкожного бугорка. О функциональной активности и успешном приживлении яичниковой ткани свидетельствовало восстановление эстральных циклов у этой самки-реципиента.

По отношению к другим видам лабораторных животных также проводятся эксперименты по замораживанию и трансплантации яичниковой ткани. Так, например, имеются сообщения об успешной трансплантации яичниковой ткани кошек иммунодефицитным мышам как без предварительного замораживания (Bosch et al., 2004), так и после криоконсервации (Fassbender et al., 2007). Однако живого потомства после такого рода ксеногенной трансплантации получено не было; были лишь получены свидетельства об успешном приживлении ткани яичников и ее физиологической активности в новом окружении. В целом, можно сказать, что на сегодняшний день, замораживание и трансплантация яичниковой ткани является весьма перспективным методом сохранения генетических ресурсов для различных лабораторных животных, но лишь по отношению к мышам этот способ разработан достаточно хорошо и используется при создании криобанков (Agca, 2012).

1.2.4.4. Замораживание преимплантационных эмбрионов

Создание криобанка преимплантационных зародышей является традиционным способом сохранения генетических ресурсов различных линий мышей (Mobraaten, 1986); лишь несколько позже, наряду с эмбрионами, для сохранения генетических ресурсов мышей стали применять и замороженное семя (Glenister, Thornton, 2000). Следует отметить, что при создании криобанков лабораторных животных, криоконсервация гамет обычно дополняет, но не заменяет криоконсервацию эмбрионов (Landel, 2005). Была разработана математическая модель создания криобанков, исходя из таких приоритетов, как надежность сохранения генетического материала, оптимальная стоимость криобанка и другие (Boettcher et al., 2005). Авторами этой модели был предложен дифференцированный подход к разным видам животных в зависимости от особенностей репродукции. Считается, что линию мышей или крыс можно надежно криоконсервировать, заморозив 200-500 эмбрионов (Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005).

На сегодняшний день, криобанки эмбрионов линий лабораторных мышей созданы при ведущих генетических центрах; таких крупных криобанков, в которых сохраняются ресурсы сотен и даже тысяч различных линий мышей в мире насчитывается около двух десятков (FIMRe, 2006; Agca, 2012). В генетических центрах Европы и Америки для создания криобанков эмбрионов предпочитают использовать программное замораживание (Glenister, Thornton, 2000; Rall et al., 2000; Landel, 2005; Landel, 2010). В криобанках Азии для этих целей используют витрификацию (Yoshiki, 2009).

Существенно меньше число криобанков, в которых в замороженном виде сохраняют эмбрионы крыс (Agca, 2012). Что касается других видов лабораторных животных

выделяемых в качестве приоритетных для биомедицинских исследований (Agca, 2012), то следует отметить кошку и собаку относящихся к отряду хищных. Эмбрионы этих видов млекопитающих были успешно заморожены экспериментально (Amstislavsky et al., 2012) однако пока не было создано крупных криобанков генетических ресурсов этих видов, где различные породы собак или кошек сохранялись бы в виде замороженных эмбрионов. То же самое относится и к свиньям. Лишь относительно недавно удалось найти адекватные способы замораживания эмбрионов свиней (Dobrinsky, 2001), однако криобанка эмбрионов свиней пока не создано (Agca, 2012). Что касается *Danio rerio*, то пока не известно успешных попыток замораживания эмбрионов этого вида рыб (Agca, 2012).

В криобанке, созданном в ИЦиГ СО РАН в Новосибирске сохраняются, главным образом в виде замороженных эмбрионов, 6 линий/сублиний крыс, а также 26 линий, сублиний и мутантных стоков мышей, большинство из которых являются уникальными моделями, полученными путем селекции либо трансгенеза/нокаута. В общей сложности, в криобанке ИЦиГ СО РАН сохраняется, на сегодняшний день, более 4000 эмбрионов лабораторных животных. Поскольку при ИЦиГ СО РАН создан современный виварий соответствующий самым высоким международным стандартам и поддерживающий линии мышей и крыс в состоянии SPF, криобанк территориально расположен на территории этого SPF-вивария и одной из его задач является оптимизация работы этого современного генетического центра. В частности, при помощи криобанка и репродуктивных технологий удалось получить потомство и редеривировать (Брусенцев и др., 2011; Амстиславский и др., 2013), то есть перевести из конвенционального в SPF-статус семь линий/сублиний крыс, а также четыре линии и один мутантный сток мышей.

1.2.5. Особенности криоконсервации эмбрионов и гамет различных зоологических таксонов

При замораживании преимплантационных эмбрионов и гамет различных видов лабораторных животных могут возникать всевозможные трудности. Наиболее полно и надежно процедуры связанные с криоконсервацией эмбрионов и гамет, а также последующим получением живых потомков отработаны на мышах (Landel, 2005; Mazur et al., 2008; Agca et al., 2012). С некоторыми модификациями, эти протоколы позволяют криоконсервировать преимплантационные эмбрионы и других видов лабораторных грызунов, таких, как крысы (Mazur et al., 2008; Agca et al., 2012).

При попытках создания криобанков других представителей животного царства, не относящихся к классу млекопитающих, возникают иногда более серьезные проблемы. Как уже говорилось выше, рыбки *Danio rerio* являются, в настоящее время, одним из самых

популярных лабораторных объектов востребованных для генетических и биомедицинских исследований. Между тем, эмбрионы или яйцеклетки рыб, в настоящее время, пока не удается криоконсервировать из-за их большого размера, высокого содержания липидов, плохой проницаемости мембран и высокой чувствительности к охлаждению (Zhang et al., 1993; Hagedorn et al., 1996; Robles et al., 2009). Подобная проблема, связанная с плохой проницаемостью мембран для криопротекторов характерна не только для эмбрионов рыб. В работе с эмбрионами плоских червей (*Macrostomum lignano*, Ladurner, Scharer, Salvenmoser, Rieger, 2005) было показано, что традиционные криопротекторы, такие как глицерин, этиленгликоль, метанол и ДМСО плохо проникают через мембраны эмбрионов и взрослых червей, что затрудняет проведение, как программного замораживания, так и витрификации (Амстиславский и др., 2015).

Делаются попытки обойти проблему, замораживая фолликулы яичников *Danio rerio* и осуществляя дозревание этих фолликулов *in vitro*; получены первые обнадеживающие результаты, хотя и предварительные (Tsai et al., 2009; Tsai et al., 2010). Интересный и оригинальный подход к замораживанию эмбрионов *Danio rerio* был предложен группой американских исследователей. Они ввели в эмбрионы мРНК аквапорина-3, которая, в свою очередь, является водным каналом. При этом удалось существенно повысить проницаемость мембран эмбрионов этого вида рыб (Hagedorn et al., 2002). Тем не менее, окончательной цели – успешной криоконсервации эмбрионов и яйцеклеток *Danio rerio* (и каких-либо других видов рыб) достичь, пока не удалось.

Группный червь (*Caenorhabditis elegans*, Maupas, 1900) стал востребован для исследований в различных областях биологии и появилась потребность в разработке способа криоконсервации этого важного для исследователей организма. В конце концов, удалось успешно криоконсервировать взрослых особей, которые являются многоклеточными организмами, состоящими из сотен клеток и обладающими нервной системой (Hayashi et al., 2013). Это является большим достижением, поскольку, чем больше и чем сложнее объект, тем более проблематична его успешная криоконсервация (Mazur, 1970; Mazur, 1990).

Если сравнивать медленное замораживание и витрификацию, то каждый из этих подходов имеет свои сильные и слабые стороны. Одним из плюсов витрификации является то, что при данном способе не происходит образования кристаллического льда (ни внутри, ни вне клеток), а это в свою очередь устраняет основную причину повреждений в результате замораживания. В связи с этим обстоятельством, витрификация становится все более популярной, особенно в тех случаях, когда эмбрионы в силу тех или иных причин плохо переносят традиционное программное замораживание (Saragusty, Arav, 2011). Как отмечалось в предыдущих разделах данного обзора, к приоритетным лабораторным животным, на которые нацелена программа создания криобанков, кроме мышей и крыс,

относятся свиньи, кошки и собаки (Mazur et al., 2008; Agca, 2012). У свиней (Dobrinsky, 2001) и у всех представителей отряда хищных, включая кошек и собак (Amstislavsky et al., 2012), в эмбрионах содержится большое число липидных гранул чувствительных к охлаждению. Для облегчения процедуры замораживания эмбрионов этих видов чаще всего применяют витрификацию, иногда в сочетании с другими специальными приемами, такими, как делипидизация (Men et al., 2011; Nakano et al., 2011; Galiguis et al., 2014).

Однако витрификация также имеет и свои негативные стороны. Так, например, практически все эффективные протоколы витрификации подразумевают открытое взаимодействие витрифицируемого образца и жидкого азота (Saragusty, Arav, 2011), при этом возможна контаминация образца через жидкий азот (Vajta, 2009). Более существенным недостатком витрификации является то, что сохраняемые образцы требуют жесткого контроля температурного режима хранения и специального режима оттаивания (Landel, 2005; Vajta, 2009). При колебании температуры в хранилище или недостаточно быстром оттаивании в образце может произойти летальная девитрификация (Mazur, 1990). Это повышает требования к условиям криохранения биологического материала. Следует отметить, что мониторингу условий криогенного хранения биологического материала в криобанке и компьютерного учета базы данных уделяется большое внимание и некоторые отечественные криобанки уже оснащены такими системами (Иволгин и др., 2013).

В заключение хотелось отметить, что за те десятилетия, которые прошли с момента первого успешного замораживания эмбрионов мышей (Whittingham et al., 1972) и организации первых криобанков (Mobraaten, 1986) удалось достигнуть огромного прогресса (Mazur et al., 2008; Agca, 2012). Однако и в наши дни перед криобиологами и специалистами по созданию криобанка лабораторных животных встает немало проблем, особенно, если работать приходится не с мышами, а другими видами. Мультидисциплинарный подход, когда биологи объединяют усилия с физиками и представителями других наук позволяют более успешно решать эти проблемы, как в плане практических приложений, так и в плане фундаментальных криобиологических исследований.

1.3. Культивирование эмбрионов млекопитающих *in vitro*

1.3.1. Культивирование эмбрионов *in vitro* и другие репродуктивные технологии

Культивирование *in vitro* гамет и преимплантационных эмбрионов млекопитающих является основой современных РТ, таких как ЭКО, создание банков (криобанков) генетических ресурсов и многих других. Хотя исследования в этой области проводятся достаточно давно, до сих пор многие вопросы относительно влияния оплодотворения *in vitro*

и последующего культивирования на развитие эмбриона и фенотипические признаки в постнатальном онтогенезе остаются неясными.

После рождения первого ребенка, зачатого в результате ЭКО (Stephoe, Edwards, 1978), прошло уже 35 лет, а общее число детей, рожденных с применением РТ, достигло 5 миллионов (Sandin et al., 2013). В настоящее время наряду с традиционным вариантом ЭКО, предполагающим минимальные воздействия на зародыши и гаметы, а также относительно небольшое время пребывания их в культуральных средах, все большее значение приобретают более сложные технологии, такие как, например, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (Рожкова и др., 2012; Sandin et al., 2013). Более того, одной из основных тенденций в данной области, начиная с 2000-х гг., является более длительное культивирование полученных при помощи ЭКО зародышей человека (Hardy, Spanos, 2002). Все это порождает запрос на изучение возможных отдаленных эффектов воздействия *in vitro* на стадии преимплантационного зародыша на последующий онтогенез, склонность к тем или иным заболеваниям, а также на поиск новых подходов к культивированию эмбрионов вне организма.

Имеются определенные технические и клинические сложности в изучении детей, рожденных в результате ЭКО и других РТ, в сравнении с обычными детьми (Hansen et al., 2005), поскольку данные методики на протяжении 35 лет изменялись, и разные лаборатории придерживались не одинаковых протоколов, а также из-за молодого возраста подавляющего большинства детей, рожденных в результате ЭКО (Watkins, Fleming, 2009). В связи с этим, особое значение приобретают экспериментальные работы на лабораторных животных, которые позволяют, как изучать эффекты культивирования преимплантационных эмбрионов в условиях *in vitro*, так и исследовать факторы, способствующие оптимизации этих условий.

РТ активно применяют на лабораторных и сельскохозяйственных животных, что связано как с запросом на создание криобанков для сохранения генетических ресурсов редких и исчезающих видов животных, так и с ускорением генетического прогресса в сельском хозяйстве (Амстиславский, Трукшин, 2010; Amstislavsky et al., 2012). Эти технологии имеют своим элементом культивирование преимплантационных эмбрионов *in vitro*. Наряду с исследованием видовой специфики, то есть специальных требований к условиям развития вне организма, характерных для того или иного вида млекопитающих (Herrick et al., 2007), имеются общие принципы культивирования эмбрионов животных *in vitro*. В нижеследующих разделах дан критический анализ этих принципов, а также рассмотрена гипотеза о том, что здоровье и болезни определяются условиями пренатального онтогенеза. Наиболее полно представлены данные, полученные на традиционных лабораторных животных: мышах, крысах и золотистых хомячках. Кроме того, проанализированы эффекты субоптимальных условий *in vitro* на формирование фенотипа и

представлены современные подходы, направленные на оптимизацию развития *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих.

1.3.2. Питательные среды для культивирования преимплантационных эмбрионов

Выделяют три типа питательных сред по способу получения и составу используемых для этого компонентов: естественные, полусинтетические и синтетические. Важными свойствами любой питательной среды являются: постоянство pH (буферная емкость), осмолярность и стерильность. Для нормального развития преимплантационного эмбриона *in vitro* необходимо поддерживать pH в интервале от 7.2 до 7.4; содержание эндотоксинов не должно превышать нормы (не более 0.25 ЕЭ/мл); раствор должен быть изотоничным жидкости яйцевода; в нем должны отсутствовать патогены.

Естественные питательные среды готовят из продуктов природного происхождения, например, эмбрионального экстракта (Hare, Morgan, 1954). Качественный и количественный состав данного типа сред может сильно варьировать, и их практически не используют для культивирования преимплантационных эмбрионов млекопитающих (Summers, Biggers, 2003).

Полусинтетические питательные среды создаются на основе искусственных растворов с известным составом с добавлением естественных компонентов, например, фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Han, Niwa, 2003). Их можно рассматривать как модифицированные варианты синтетических питательных сред.

Наибольшее же распространение при культивировании эмбрионов получили синтетические питательные среды. Одной из их особенностей является точный качественный и количественный состав; они считаются “простыми”, если содержат менее 12 компонентов, и, соответственно “сложными”, если ингредиентов больше (Summers, Biggers, 2003; Lane, Gardner, 2007). При выборе компонентов и концентраций для их создания используются два основных подхода: “back-to-nature” и “let the embryo choose”.

При первом подходе – “back-to-nature” изучают состав среды, которая присутствует при развитии эмбриона в репродуктивных путях. Согласно этому подходу, концентрация веществ в создаваемой синтетической среде базируется на знании состава компонентов естественной среды, в которой развиваются преимплантационные эмбрионы, движущиеся от места оплодотворения (ампула яйцевода) в матку (Summers, Biggers, 2003).

Второй подход – “let the embryo choose”, основан на эмпирическом подборе компонентов сред и их концентраций с последующей проверкой в тестах с культивированием эмбрионов. Создание питательной среды связано с выбором концентраций всех отдельных компонентов, поскольку эффекты каждого из них могут

зависеть от концентрации других составляющих. Концентрация того или иного вещества, которая оказывает максимальный позитивный эффект на развитие эмбрионов отбирается при создании среды (Summers, Biggers, 2003).

Оба подхода к созданию синтетических питательных сред имеют свои ограничения. Подход “back-to-nature” ограничивается трудностью определения концентрации веществ в естественной среде развития преимплантационного эмбриона, а подход “let the embryo choose” определяет концентрацию конечного множества компонентов, которая приводит к максимальной реакции, но при этом сложно учесть эффекты взаимодействия между различными соединениями (Summers, Biggers, 2003). Большинство питательных сред для культивирования эмбрионов создают на основе сбалансированных солевых растворов с оптимальной буферной емкостью. Самыми распространенными из них являются: раствор Эрла, Кребса-Рингера, Хенкса и Тироде – сложные физиологические растворы, представляющего собой смесь неорганических солей (NaCl, KCl, CaCl₂, Na₂HPO₄ и другие) растворенных в воде, с добавлением глюкозы в качестве энергетического субстрата. Данные растворы незначительно отличаются друг от друга по качественному и количественному химическому составу.

Раствор Эрла (г/л): NaCl – 6.8; глюкоза – 1.0; KCl – 0.4; CaCl₂ – 0.2; Na₂HPO₄ – 0.125; MgSO₄·7H₂O – 0.1.

Раствор Кребса-Рингера (г/л): NaCl – 6.92; глюкоза – 1.0; KCl – 0.35; MgSO₄·7H₂O – 0.29; CaCl₂ – 0.28; KH₂PO₄ – 0.16; NaHCO₃ – 0.1.

Раствора Хенкса (г/л): NaCl – 8.0; глюкоза – 1.0; KCl – 0.4; CaCl₂ – 0.14; MgSO₄·7H₂O – 0.1; MgCl·6H₂O – 0.1; Na₂HPO₄ – 0.06; KH₂PO₄ – 0.06.

Раствор Тироде (г/л): NaCl – 8.0; глюкоза – 1.0; KCl – 0.2; CaCl₂ – 0.2; MgCl·6H₂O – 0.1; NaHCO₃ – 0.1; Na₂HPO₄ – 0.05.

Общим для всех этих растворов является обязательное присутствие: NaCl (6.8-8.0 г/л), глюкозы (1.0 г/л), KCl (0.2-0.4 г/л), CaCl₂ (0.14-0.2 г/л). По остальным компонентам наблюдается ряд отличий: MgSO₄·7H₂O (0.1-0.29 г/л) (отсутствует в растворе Тироде), Na₂HPO₄ (0.05-0.125 г/л) (отсутствует в растворе Кребса-Рингера), KH₂PO₄ (0.06-0.16 г/л) (отсутствует в растворе Эрла), MgCl·6H₂O (0.1 г/л) (содержится в растворе Хенкса и Тироде), NaHCO₃ (0.1 г/л) (содержится в растворе Кребса-Рингера и Тироде).

К примеру, для культивирования эмбрионов часто применяют среду 199, которая была создана еще в 1950-ом году (Morgan et al., 1950). Данная среда имеет очень сложный состав, который многократно корректировался. Она создана на основе раствора Хенкса, и успешно используется для культивирования эмбрионов на этапе развития преимплантационного эмбриона с 8 клеток до бластоцисты.

В состав современной среды 199 входят следующие компоненты (мг/л):

- 1) неорганические соли (NaCl – 8000.0; KCl – 400.0; MgSO₄·7H₂O – 200.0; CaCl₂·2H₂O – 185.5; KH₂PO₄ – 60.0; Na₂HPO₄ – 47.5; Fe(NO₃)₃·9H₂O – 0.01);
- 2) углеводы (глюкоза – 1000.0; рибоза – 0.5);
- 3) аминокислоты (глутамин – 100.0; аргинина хлорид – 70.0; лизина хлорид – 70.0; глутаминовая кислота – 66.82; лейцин – 60.0; глицин – 50.0; тирозина динатриевая соль – 49.72; пролин – 40.0; аспарагиновая кислота – 30.0; треонин – 30.0; аланин – 25.0; валин – 25.0; серин – 25.0; фенилаланин – 25.0; гистидина хлорид одноводный – 21.88; изолейцин – 20.0; метионин – 15.0; гидрооксипролин – 10.0; триптофан – 10.0; цистеина хлорид – 0.0987);
- 4) эмульгатор и модификатор вязкости: твин – 80.0;
- 5) органические соли (натрия ацетат – 36.71; натриевая соль фенола красного – 17.0; менафтона натрия бисульфат трехводный – 0.019; кальция пантотенат – 0.01);
- 6) нуклеотиды (аденина сульфат – 10.0; АТФ динатриевая соль – 10.0; 2-дезоксирибоза – 0.5; гуанина хлорид – 0.3; тимин – 0.3; урацил – 0.3; 5-АМФ – 0.2); липотропные вещества (холина хлорид – 0.5; холестерол – 0.2);
- 7) витамины (ретинол-ацетат – 0.1147; кальциферол – 0.1; аскорбиновая кислота – 0.05; пара-аминобензойная кислота – 0.05; никотинамид – 0.025; пиридоксальхлорид – 0.025; пиридоксинхлорид – 0.025; никотиновая кислота – 0.025; биотин – 0.01; рибофлавин – 0.01; тиамин хлорид – 0.01; токоферола фосфата динатриевая соль – 0.01; фолиевая кислота – 0.01);
- 8) производные пуринов (ксантин – 0.3; гипоксантин – 0.3);
- 9) витаминоподобное вещество: инозитол – 0.05;
- 10) антиоксидант: глутатион – 0.05.

К синтетическим питательным средам, предназначенным для культивирования преимплантационных эмбрионов млекопитающих, относят: M-16, KSOM, R1ECM, HECM, среду 199 и многие другие (таблица 1). Одной из первых и наиболее сложных сред, применявшихся для культивирования эмбрионов различных видов животных, является среда 199 (Morgan et al., 1950; Честков и др., 2010). Для улучшения состава среды, в качестве стимулирующего развитие эмбрионов фактора в нее могут добавлять 5-15 % сыворотки крови коровы и других млекопитающих (Han, Niwa, 2003; Graves et al., 2004). В качестве источника аминокислот иногда используют бычий сывороточный альбумин (Niwa et al., 1980; Parkening, Cisneros, 1988), хотя в некоторые среды добавляют свободные аминокислоты, которые являются необходимым субстратом, как для пластического, так и для энергетического обмена (McKiernan, Bavister, 1990; Barnett, Bavister, 1996).

В процессе катаболизма эмбрион перерабатывает аминокислоты с образованием аммония, который обладает высокой эмбриотоксичностью (Lane, Gardner, 1995). Существует два способа решения данной проблемы. Во-первых, можно перенести эмбрионы в каплю

свежей питательной среды (Summers, Biggers, 2003), а во-вторых, удалить вредный побочный продукт при помощи специально разработанного метода с использованием фермента глутаматдегидрогеназы, который осуществляет трансаминирование α -кетоглутарата, присоединяя к нему свободный аммоний, образуя в качестве продукта безвредный для клеток глутамат (Lane, Gardner, 1995).

Выбор среды зависит как от видовой принадлежности, так и от стадии развития преимплантационного эмбриона (Summers, Biggers, 2003; Lane, Gardner, 2007). У большинства видов млекопитающих зародыши на стадии морулы переходят из яйцевода в матку (Амстиславский, 2011), где среда несколько отличается по своему составу (Summers, Biggers, 2003). В силу того, что состав среды в яйцеводах и матке различен, зачастую, для ранних стадий развития эмбрионов используют один состав среды, а для более поздних, начиная с морулы и до поздней бластоцисты – другой состав (sequential media) (Summers, Biggers, 2003).

Таблица 1. Химический состав некоторых синтетических питательных сред.

Компоненты	mR1ECM-BSA	mR1ECM-PVA	HECM-1	P1	HTF	KSOM
NaCl	110.0 мМ	76.7 мМ	94.1 мМ	101.6 мМ	101.6 мМ	95.0 мМ
KCl	3.2 мМ	3.2 мМ	1.2 мМ	4.7 мМ	4.7 мМ	2.5 мМ
CaCl ₂	2.0 мМ	2.0 мМ	2.0 мМ	2.0 мМ	2.0 мМ	1.7 мМ
MgCl ₂	0.5 мМ	0.5 мМ	0.5 мМ	–	–	–
MgSO ₄	–	–	–	0.2 мМ	0.2 мМ	0.2 мМ
NaHCO ₃	25.0 мМ	25.0 мМ	25.0 мМ	25.0 мМ	25.0 мМ	25.0 мМ
KH ₂ PO ₄	–	–	–	–	0.37 мМ	0.35 мМ
Лактат натрия	10.0 мМ	10.0 мМ	10.0 мМ	21.4 мМ	21.4 мМ	10.0 мМ
Пируват натрия	0.5 мМ	0.5 мМ	0.25 мМ	0.3 мМ	0.3 мМ	0.2 мМ
Глюкоза	7.5 мМ	7.5 мМ	–	–	2.8 мМ	0.2 мМ
Глутамин	0.1 мМ	0.1 мМ	1.0 мМ	–	–	1.0 мМ
Таурин	–	–	–	0.05 мМ	–	–
Цитрат	–	–	–	0.5 мМ	–	–
ЭДТА	–	–	–	–	–	0.01 мМ
БСА ^а	4.0 мг/мл	–	–	–	–	–
ПВС ^б	–	1.0 мг/мл	1.0 мг/мл	–	–	–
ЗАК ^в	2 % (v/v)	2 % (v/v)	2 % (v/v)	–	–	–
НЗАК ^г	1 % (v/v)	1 % (v/v)	1 % (v/v)	–	–	–
Осмолярность	300 мОсм	246 мОсм	290 мОсм	275 мОсм	284 мОсм	256 мОсм

^а бычий сывороточный альбумин; ^б поливиниловый спирт; ^в заменимые аминокислоты;

^г незаменимые аминокислоты.

Добавление стимулирующих факторов может различным образом влиять на культивируемые зародыши в зависимости от стадии развития, на которой они находятся. Например, добавление фетальной сыворотки коровы стимулирует развитие зародышей крысы на стадии формирования бластоцисты, но угнетает развитие эмбрионов этого вида на более ранних этапах (Han, Niwa, 2003). Показано, что среды, которые содержат в своем составе свободные аминокислоты, благотворно влияют на процесс образования бластоцист. Они более предпочтительны при культивировании поздних стадий преимплантационных эмбрионов по сравнению с теми, которые имеют в своем составе альбумины (например, бычий сывороточный альбумин) (Zhang, Armstrong, 1990).

Согласно подходу “back-to-nature”, в среде должны содержаться питательные вещества, которые участвуют в процессах метаболизма (пластического и энергетического обмена). Энергетическим субстратом для эмбриона в матке является глюкоза, хотя в питательные среды можно добавлять и другие компоненты в качестве источников энергии (пируват, фруктозу, галактозу) (Brison, Leese, 1991; Ludwig et al., 2001). В процессе метаболизма эмбрион перерабатывает глюкозу с образованием в качестве побочного продукта лактата, увеличение концентрации которого в среде подавляет энергетический обмен. Зародыши млекопитающих при культивировании *in vitro* образуют большее количество лактата, чем в условиях *in vivo*, что приводит к увеличению его концентрации в капле питательной среды и тормозит их развитие (Brison, Leese, 1991). Это обстоятельство, наряду с тем, что разные стадии преимплантационного зародыша отличаются разными требованиями к среде, является одной из причин того, что при длительном культивировании производят замену среды более свежей (Summers, Biggers, 2003).

В синтетические питательные среды иногда добавляют некоторые вспомогательные вещества: феноловый красный в качестве индикатора pH, антибиотики с целью предотвращения бактериального заражения и другие. В качестве антибиотиков обычно используют пенициллин и/или стрептомицин, а также в некоторых случаях микостатин (против заражения спорами дрожжевых грибов рода *Candida*) (Summers, Biggers, 2003). Показано, однако, что пенициллин и его производные угнетают развитие эмбрионов некоторых видов млекопитающих; в этих случаях применяют другие антибиотики (Barnett, Bavister, 1996).

Витамины являются кофакторами многих ферментативных процессов, протекающих в быстро делящихся клетках преимплантационного эмбриона. Добавление их в питательную среду улучшает и стабилизирует метаболизм в бластомерах и способствует развитию зародыша (Bavister et al., 1983; Kane, Bavister, 1988; Честков и др., 2010).

Нуклеотиды необходимы для синтеза нуклеиновых кислот и особенно активно они потребляются, начиная со стадии морулы, когда происходит наиболее интенсивное деление клеток эмбриона (Wales, 1975; Leese, 2012).

Антиоксиданты, например глутатион, защищают клетки эмбриона от вредоносного воздействия образующихся в ходе метаболизма свободных радикалов (супероксидного аниона, перекиси водорода и других) (Choe et al., 2010).

Прозрачная оболочка (*zona pellucida*) выполняет важнейшую барьерную и структурную функцию во время преимплантационного развития млекопитающих (Рожкова и др., 2012). В питательную среду, в некоторых случаях, добавляют эмульгаторы и осмолиты, например: поливиниловый спирт, твин, таурин и другие. Эти вещества способны поддерживать клеточный гомеостаз за счет регуляции поступления воды через оболочку эмбриона и цитоплазматическую мембрану отдельных бластомеров, а также препятствовать нарушению структуры *zona pellucida* (Seshagiri, Bavister, 1989; Ludwig et al., 2001).

Преимплантационные эмбрионы мышей и других видов млекопитающих развиваются в атмосфере, состоящей из 95 % воздуха и 5 % углекислого газа. Это стандартные условия культивирования *in vitro* (Genbacev et al., 1996; Amstislavsky et al., 2000). Энергетический обмен в клетках преимплантационного эмбриона идет по пути гликолиза, то есть без участия кислорода, а присутствие в среде последнего оказывает угнетающее действие на клетки зародыша и тормозит его развитие (McKiernan, Bavister, 1990). Более того, образование свободных радикалов зависит от содержания кислорода в атмосфере закрытого сосуда, в котором происходит культивирование, что оказывает большое влияние на развивающиеся эмбрионы (Leese, 2012). При культивировании преимплантационных эмбрионов некоторых видов млекопитающих и человека иногда используют мультигазовые смеси, регулируя содержание в ней не только углекислого газа, но и кислорода, причем показано, что снижение содержания кислорода способствует лучшему развитию зародышей (Vajta et al., 2000; Santos et al., 2013).

1.3.3. Особенности культивирования эмбрионов лабораторных животных

При культивировании эмбрионов млекопитающих необходимо учитывать видовую специфику (Amstislavsky et al., 2012). Существенные различия наблюдаются при культивировании зародышей даже таких близкородственных видов лабораторных животных, как мыши (Summers, Biggers, 2003; Popova et al., 2011), крысы (Miyoshi et al., 1997; Han, Niwa, 2003) и хомячки (Barnett, Bavister, 1996; Ludwig et al., 2001; Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015). Для работы с эмбрионами мышей часто применяют такие среды, как BWW (среда для культивирования преимплантационных эмбрионов, названную по первым

буквам ее создателей Biggers, Whitten и Whittingham), M-16, среда 199, KSOM, хотя эмбрионы мыши способны развиваться и во многих других средах (Biggers et al., 1971; Gardner, Leese, 1990; Summers, Biggers, 2003; Честков и др., 2010). Если эмбрионы мышей могут развиваться и на самых простых культуральных средах (Taft, 2008), то для культивирования эмбрионов таких видов как крысы (Miyoshi et al., 1997), хомячки (Kane, Bavister, 1988) и некоторых других млекопитающих (Herrick et al., 2007) со стадии зиготы до морулы желательна наличие в среде аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

Для создания питательных сред различных видов лабораторных животных используют преимущественно принцип “let the embryo choose”. Это можно проиллюстрировать на истории создания сред для культивирования эмбрионов хомячков. При культивировании зародышей этого вида млекопитающих на средах, предназначенных для мышей, происходят блоки их развития на стадии 2-х и 4-х бластомеров (Schini, Bavister, 1988). Полный блок развития возникает при одновременном присутствии в питательной среде глюкозы и фосфатов, однако, среда с глюкозой, но без фосфатов оказывает угнетающее действие на развивающиеся эмбрионы хомячков гораздо меньше (Schini, Bavister, 1988).

Пользуясь принципом “let the embryo choose”, из среды для развития зародышей хомячков полностью удалили фосфаты, а содержание глюкозы существенно снизили, таким образом, появилась среда HECM-1 (hamster embryo culture medium) специально предназначенная для культивирования зародышей этого вида млекопитающих (Schini, Bavister, 1988; McKiernan, Bavister, 1990). Впоследствии, путем модификации, были получены различные варианты этой среды. Среда HECM-1, HECM-2 и HECM-4 содержат пируват, аминокислоты, витамины и поливинилловый спирт, что благоприятно сказывается на развитии эмбрионов хомячка (McKiernan, Bavister, 1990; Barnett, Bavister, 1996). Среда HECM-9 содержит в своем составе, помимо перечисленных компонентов, таурин, который выполняет функцию осмолита, а также может быть использован эмбрионами в качестве регулятора энергетического обмена, при этом появляется возможность снизить содержание глюкозы в среде. (Ludwig et al., 2001). Людвиг с соавторами (Ludwig et al., 2001) также показали, что в качестве энергетического субстрата при культивировании зародышей хомячков фруктоза предпочтительней, чем глюкоза, что соответствует более ранним выводам о блокирующем влиянии глюкозы на развитие эмбрионов этого вида животных (Schini, Bavister, 1988).

Исторически проблему культивирования зародышей крыс системно начали решать позже, чем проблему культивирования эмбрионов хомячков. Оказалось, что среды, которые используют для культивирования зародышей мышей, не подходят для крыс. В среде M-16, например, удастся культивировать эмбрионы крыс со стадии зиготы до стадии 2-х клеток,

после чего возникает блок и дальнейшего развития не происходит (Porova et al., 2011). Негативное влияние, вызывающее полную остановку развития эмбрионов крыс и хомячков, оказывают фосфаты, присутствующие во всех питательных средах, основанных на солевых растворах Эрла, Кребса-Рингера и Тироде (Miyoshi et al., 1997; Zhou et al., 2003). Полное удаление фосфатов из среды и снижение в ней содержания глюкозы способствует снятию блока с развивающихся эмбрионов крыс (Zhang, Armstrong, 1990). Исходя из этого, на основе раствора Кребса-Рингера была создана специализированная среда R1ECM (rat 1-cell embryo culture medium) (Miyoshi et al., 1995) и впоследствии ее модификация (mR1ECM) (Miyoshi et al., 1997).

При культивировании зародышей крыс со стадии дробления до поздней бластоцисты эмбрионы активно потребляют не только глюкозу, но и пируват в качестве энергетического субстрата (Brison, Leese, 1991). Причем пируват интенсивно потребляется дробящимися зародышами до морулы, а глюкоза – со стадии морулы до образования бластоцисты, особенно в период формирования бластоцеля (Brison, Leese, 1991; Lane, Gardner, 2007). Добавленные в питательную среду свободные аминокислоты могут использоваться клетками эмбриона в качестве энергетического ресурса, что позволяет удалить из среды глюкозу (Zhang, Armstrong, 1990). При снижении концентрации глюкозы в культуральной среде понижается синтез лактата, что приводит к улучшению характеристик развития эмбрионов крыс на стадии образования бластоцисты (Brison, Leese, 1991).

Некой общей возможностью для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов мышей, крыс и хомячков является модифицированный раствор Кребса-Рингера, из которого удалены фосфаты (Niwa et al., 1980). Эта успешная попытка, выполненная более 30 лет назад, является хорошей основой для создания универсальной среды для культивирования всех трех перечисленных выше видов грызунов. Однако это направление еще нуждается в дальнейших экспериментах. Тем не менее, анализ литературы и опыт группы Амстиславского свидетельствует о том, что модифицированная среда R1ECM изначально созданная для культивирования преимплантационных эмбрионов крыс, может рассматриваться в качестве “универсальной”, так как на этой среде успешно развиваются как эмбрионы мышей и крыс (Porova et al., 2011; Рагаева и др., 2013), так и эмбрионы хомячков джунгарского (Брусенцев и др., 2013) и Кэмпбелла (Amstislavsky et al., 2013).

Исследования по культивированию преимплантационных эмбрионов проводят и на других видах млекопитающих, таких как куньи (Amstislavsky et al., 2000; Amstislavsky et al., 2012), кошачьи (Herrick et al., 2007), псовые (Lindeberg et al., 1993; Luvoni et al., 2006), крупный рогатый скот (Sugimura et al., 2012), приматы (Tkachenko et al., 2010) и другие. В основном, для подбора питательных сред, в данных случаях, используют принцип “let the

embryo choose”. Все эти материалы, полученные на “животных-моделях”, учитываются и при создании сред для культивирования эмбрионов человека.

Поскольку традиционные среды, не содержащие факторы роста, являются субоптимальными для развития эмбрионов млекопитающих (Sjöblom et al., 2005; Robertson, 2007), делаются попытки их оптимизации путем добавления в них фетальной сыворотки, содержащей природный комплекс ростовых факторов (Han, Niwa, 2003). В некоторых случаях, например, с исследовательскими целями, в культуральные среды добавляют не сыворотку, а отдельные очищенные факторы роста (Desai et al., 2000; Singh et al., 2011) или их комбинацию (Kawamura et al., 2012). Поскольку эти факторы в настоящее время начинают применять и при работе с зародышами человека, в частности в клиниках занимающихся ЭКО, детальное изучение эффектов воздействия этих факторов на преимплантационные эмбрионы становится актуальной задачей.

1.3.4. Влияние факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов

Добавление факторов роста в культуральную среду может оказывать стимулирующее влияние на развитие эмбрионов различных видов млекопитающих и повышать частоту имплантации эмбрионов (Seshagiri et al., 2002; Aflalo et al., 2007; Jessmon et al., 2009). По своему химическому составу все факторы роста являются пептидами либо небольшими молекулами глобулярных белков, которые можно отнести к цитокинам или гормонам (таблица 2).

Таблица 2. Эффекты отдельных ростовых факторов на развитие эмбрионов лабораторных животных и их имплантацию.

Название фактора	Эффекты на развитие зародышей	Вид животных	Ссылки
Цитокины			
<i>Группа воспалительных цитокинов</i>			
Фактор ингибирующий лейкемию (LIF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	человек хомячки	Dunglison et al., 1996 Seshagiri et al., 2002
	2. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов;	человек	Dunglison et al., 1996
	3. Снижает число резорбированных плодов после трансплантации самке-реципиенту	мыши	Lavranos et al., 1995
Фактор некроза опухолей α (TNF- α)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мыши	Gerwin et al., 1995
	2. Способствует клеточной дифференцировке во время эмбриогенеза;	мыши	Gerwin et al., 1995
	3. Усиливает процессы апоптоза в бластоцисте	мыши	Pampfer et al., 1997
<i>Группа противовоспалительных цитокинов</i>			
Эпидермальный фактор роста (EGF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мыши	Paria, Dey, 1990; Dadi et al., 2007
	2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте;	мыши	Desai et al., 2007
	3. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов	хомячки крысы мыши	Seshagiri et al., 2002 Aflalo et al., 2007 Morita et al., 1994
Гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	человек	Martin et al., 1998
	2. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов;	хомячки мыши	Seshagiri et al., 2002; Das et al., 1994; Lim, Dey, 2009
	3. Благоприятно влияет на образование контактов между клетками эндометрия и трофобласта	человек крысы мыши	Jessmon et al., 2009 Jessmon et al., 2009 Jessmon et al., 2009
Трансформирующий фактор роста α (TGF- α)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мыши хомячки КРС	Paria, Dey, 1990 Seshagiri et al., 2002 Larson et al., 1992
	2. Нормализует образование бластоцеля;	мыши	Dardik, Schultz, 1991
	3. Повышает синтез белка в трофэктодерме бластоцисты;	мыши	Dardik et al., 1992
	4. Предохраняет бластомеры от апоптоза;	мыши	Brison, Schultz, 1997

	5. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов	мышы	Singh et al., 2011
Трансформирующий фактор роста β (TGF- β)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты (в комбинации с другими факторами);	мышы хомячки	Paria, Dey, 1990 Seshagiri et al., 2002
	2. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов.	человек	Austgulen et al., 1995
<i>Группа регуляторов иммунитета</i>			
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мышы человек	Robertson et al., 2001; Elaimi et al., 2012 Sjöblom et al., 1999; 2002
	2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте;	КРС мышь	De Moraes, Hansen, 1997 Desai et al., 2007
	3. Усиливает транспорт глюкозы в клетки эмбриона;	человек мышы	Sjöblom et al., 1999; 2002 Robertson et al., 2001
	4. Предохраняет бластомеры от апоптоза;	мышы	Behr et al., 2005
	5. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов;	человек мышы	Sjöblom et al., 2002 Robertson et al., 2001
	6. Нормализует вес потомства при рождении после трансплантации полученных в результате культивирования <i>in vitro</i> эмбрионов	человек мышы	Sjöblom et al., 1999 Sjöblom et al., 2005
Гормоны			
Инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мышы	Desai et al., 2000
	2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте;	мышы	Rappolee et al., 1992
	3. Предохраняет бластомеры от апоптоза	кролики	Herrler et al., 1998
Инсулиноподобный фактор роста II (IGF-II)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мышы	Desai et al., 2000; Rappolee et al., 1992
	2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте;	мышы	Harvey, Kaye, 1992
	3. Повышает синтез белка в трофэктодерме бластоцисты	мышы	Rappolee et al., 1992
Инсулин	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мышы	Harvey, Kaye, 1990
	2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте;	мышы	Harvey, Kaye, 1990
	3. Повышает синтез белка в трофэктодерме бластоцисты;	мышы	Harvey, Kaye, 1988
	4. Усиливает транспорт глюкозы в клетки эмбриона	мышы	Kaye et al., 1992

β-эндорфин	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мышь	Чернов и др., 2012
	2. Снижает количество аномально развивающихся бластоцист	мышь	Чернов и др., 2012

1.3.4.1. Цитокины как факторы роста

Большинство факторов роста относится к цитокинам. Это пептиды и низкомолекулярные белки, которые регулируют различные взаимодействия между клетками организма, как в норме, так и при различных патологиях (Adamson, 1993; Jessmon et al., 2009). Продуцируются цитокины преимущественно лимфоцитами, клетками эндотелия, а также рядом других клеток, причем они оказывают воздействие уже в очень малых концентрациях (Metcalf, 1986; Paria, Dey, 1990; Adamson, 1993). Все цитокины можно разделить на три большие группы: воспалительные, противовоспалительные и группа регуляторов иммунитета. Факторы роста могут относиться к любой из этих трех групп.

1.3.4.1.1. Группа воспалительных цитокинов

К этой группе относятся вещества, которые запускают воспалительный процесс при негативном воздействии на ткань, орган или организм в целом, активируют молекулы адгезии на поверхности клеток эндотелия сосудов.

Фактор ингибирующий лейкемию – leukemia inhibitory factor (LIF), воспалительный цитокин, гликополипептид, который влияет на клеточную пролиферацию, подавляет спонтанную дифференцировку эмбриональных стволовых клеток (Gearing et al., 1987; Lavranos et al., 1995). LIF продуцируется клетками костного мозга, лейкоцитами и некоторыми злокачественными клетками (Gearing et al., 1987; Dunglison et al., 1996). Этот цитокин влияет на развитие преимплантационных эмбрионов. Показано, что при добавлении LIF в культуру *in vitro* существенно улучшаются характеристики развития зародышей человека, однако действие этого фактора проявляется лишь при работе со средами без добавления сыворотки (Dunlison et al., 1996). Данный фактор ускоряет развитие эмбрионов мыши, начиная со стадии 8-ми бластомеров и до стадии вылупившейся бластоцисты (Lavranos et al., 1995). LIF повышает частоту имплантации эмбрионов человека и увеличивает долю успешно развивающихся плодов (Dunlison et al., 1996). Более того, в мышинной бластоцисте обнаружены как рецепторы к этому цитокину, так и экспрессия самого этого фактора (Nichols et al., 1996). Эксперименты, проведенные на золотистых хомячках, подтверждают выводы, полученные на людях и мышах, так как при добавлении

этого ростового фактора в культуру *in vitro* улучшались характеристики развития эмбрионов хомячка (Seshagiri et al., 2002).

Фактор некроза опухолей – tumor necrosis factor (TNF- α) или кахексин – воспалительный цитокин, внеклеточный пептид, выделяющийся преимущественно лейкоцитами, клетками эндотелия и другими (Chu, 2013). Обладает сходным действием с эпидермальным фактором роста (Gerwin et al., 1995). Влияет на функционирование эндотелия (Chu, 2013). Исторически к фактору некроза опухолей относили также TNF- β . Между тем, в настоящее время, TNF- β классифицируется как регулятор иммунитета и называется лимфотоксин- α (Turnbull, Rivier, 1999). Как показано в экспериментах на мышах, TNF- α стимулирует рост преимплантационных эмбрионов в культуре *in vitro* и способствует клеточной дифференцировке в период эмбриогенеза (Gerwin et al., 1995). Между тем, в доступной литературе отсутствует информация о влиянии TNF- β на преимплантационное развитие млекопитающих.

1.3.4.1.2. Группа противовоспалительных цитокинов

Эта группа представляет собой низкомолекулярные белки и пептиды, тормозящие процесс воспаления. Они ингибируют транскрипцию генов воспалительных цитокинов и снижают количество рецепторов к ним. Эпидермальный фактор роста – epidermal growth factor (EGF), противовоспалительный цитокин, полипептид, который стимулирует пролиферацию различных клеток организма (Adamson, 1993). EGF синтезируется преимущественно слюнными железами (Fisher et al., 1989). Этот цитокин содержится в различных биологических жидкостях: слюне, плазме крови, молоке, моче и других (Fisher et al., 1989; Groschl, 2009; Dvorak, 2010). Данный фактор является важным элементом процессов ангиогенеза, регуляции артериального давления, восстановления тканей, а также канцерогенеза (Endres et al., 2011; Пыльник и др., 2012; Seshacharyulu et al., 2012). Как было показано во многих работах, EGF воздействует на преимплантационные эмбрионы различных видов млекопитающих и способствует процессу дробления (Seshagiri et al., 2002; Dadi et al., 2007). Добавление этого ростового фактора в питательную среду при культивировании эмбрионов мыши *in vitro* способствует их развитию до бластоцисты (Paria, Dey, 1990), стимулирует синтез ДНК и РНК, стимулирует метаболизм и пролиферацию клеток (Adamson, 1993). В экспериментах на мышах и золотистых хомячках было установлено, что этот фактор способствует формированию внутренней клеточной массы (ВКМ) и вылуплению (хэтчингу) бластоцисты (Seshagiri et al., 2002; Desai et al., 2007). К тому же этот цитокин повышает долю имплантирующихся зародышей как мышей (Morita et al., 1994), так и крыс (Aflalo et al., 2007).

Гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста – heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), противовоспалительный цитокин, гепарин-связывающий белок, который является сильным митогеном для клеток эндотелия (Miyata et al., 2012; Wang et al., 2012). Этот фактор выделяется макрофагами и способствует делению клеток (Tanida et al., 2010; Wang et al., 2012), повышает проницаемость кровеносных сосудов и способствует ангиогенезу (Dvorak, 2010; Miyata et al., 2012). Также как и EGF, данный белок способен оказывать влияние на клетки преимплантационных эмбрионов. В культуре *in vitro* этот цитокин ускоряет развитие зародышей человека, причем особенно это сказывалось на поздних стадиях преимплантационного развития (Martin et al., 1998). Этот фактор также улучшал характеристики развития эмбрионов золотистых хомячков, в частности способствовал их вылуплению (Seshagiri et al., 2002). Как показано в исследованиях на мышцах и других грызунах, HB-EGF играет важнейшую роль в имплантации эмбрионов (Das et al., 1994; Lim, Dey, 2009), способствуя образованию контактов между клетками эндометрия и трофобласта (Jessmon et al., 2009).

Трансформирующими факторами роста – transforming growth factors (TGF), являются низкомолекулярные белки, секретируемые клетками различных опухолей, которые стимулируют рост как видоизмененных, так и нормальных клеток (Sporn, Roberts, 1990; Groschl, 2009). Различают два типа TGF: TGF- α и TGF- β . Первый является противовоспалительным цитокином, ангиогенным пептидом, стимулирующим рост эндотелиальных клеток (Sporn, Roberts, 1990). TGF- α выделяется преимущественно клетками злокачественных опухолей, а также рядом нормальных клеток; регулирует пролиферацию клеток, стимулирует развитие эндотелия, способствует ангиогенезу, а также ускоряет рост опухолевых клеток (Groschl, 2009). TGF- β – это группа противовоспалительных цитокинов, низкомолекулярных белков продуцируемых лейкоцитами, клетками плаценты и некоторыми другими (Roberts et al., 1988); они обнаружены также в семенной плазме (Robertson, 2007). TGF- β оказывает тормозящее действие на иммунитет и синтез воспалительных цитокинов, стимулирует анаболизм и восстановление тканей, способствует ангиогенезу (Sporn, Roberts, 1990). Данные цитокины также оказывают благотворное влияние и на клетки развивающегося эмбриона. В исследованиях на мышцах (Paria, Dey, 1990), золотистых хомячках (Seshagiri et al., 2002), коровах (Larson et al., 1992) показано, что трансформирующие факторы роста (TGF- α и TGF- β) улучшали характеристики развития эмбрионов *in vitro*. TGF- α способствует образованию бластоцеля (Dardik, Schultz, 1991), стимулирует синтез белка в клетках бластоцисты (Dardik et al., 1992) и снижает апоптоз клеток эмбриона (Brison, Schultz, 1997). Как и перечисленные выше факторы, TGF играет важнейшую роль в имплантации эмбрионов млекопитающих (Austgulen et al., 1995; Singh et al., 2011).

1.3.4.1.3. Группа регуляторов иммунитета

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), является цитокином широкого спектра действия, который хорошо охарактеризован по его гемопоэтическим эффектам (Gasson, 1991). GM-CSF синтезируется и выделяется эпителиальными клетками репродуктивного тракта самки в ответ на попадание в него во время спаривания различных компонентов семенной плазмы (Robertson, 2007). Показано, что по отношению к развивающимся *in vitro* преимплантационным эмбрионам мышей этот цитокин обладает схожим с инсулином эффектом, повышая транспорт глюкозы в клетки эмбриона (Robertson et al., 2001). Более того, добавление в культуральную среду этого фактора снижало апоптоз, что продемонстрировано как на зародышах мыши (Behr et al., 2005), так и человека (Sjöblom et al., 2002). В большинстве исследований делается вывод о том, что присутствие в среде для культивирования GM-CSF в оптимальных концентрациях стимулирующее влияет на развитие преимплантационных эмбрионов млекопитающих (Sjöblom et al., 1999; Robertson et al., 2001; Sjöblom et al., 2002). При культивировании *in vitro* зародышей мыши добавление в среду этого цитокина повышало число эмбрионов развившихся до стадии бластоцисты, а также способствовало хэтчингу и последующему прикреплению эмбрионов ко дну чашки Петри (Robertson et al., 2001). Стимулирующий эффект был отмечен и при добавлении данного цитокина в среду при культивировании эмбрионов коровы (De Moraes, Hansen, 1997). В еще большей мере эти эффекты GM-CSF выражены при культивировании зародышей человека (Sjöblom et al., 1999). Между тем, недавние исследования показали, что при воздействии высоких доз этого цитокина, развитие эмбрионов мыши до бластоцисты, наоборот, угнеталось, и, в результате, бластоцисты содержали меньше бластомеров, чем в контроле, при этом существенно возрастал риск анеупloidии (Elaimi et al., 2012). GM-CSF способен оказывать воздействие на вес и развитие новорожденных (Sjöblom et al., 2005; Robertson, 2007) и корректировать некоторые негативные эффекты культивирования эмбрионов *in vitro*. Вес потомства полученного в результате трансплантации зародышей мышей развивавшихся в среде *in vitro* был ниже, чем в контроле. Однако добавление в культуральную среду GM-CSF существенным образом смягчало эти эффекты (Sjöblom et al., 2005).

1.3.4.2. Гормональные факторы роста

Факторами роста гормональной природы являются: инсулиноподобный фактор роста – IGF, инсулин, β -эндорфин и другие.

IGF – insulin like growth factors (IGF-I и IGF-II), называемые также соматомедины – белки, гормоны роста, которые по своей химической структуре схожи с инсулином, оказывают влияние на метаболизм, обладают митогенными свойствами, активно участвуют в процессе фолликулогенеза (Eden et al., 1988; Daughaday, Rotwein, 1989). Источником IGF являются, главным образом, гепатоциты и клетки развивающегося фолликула. Эти ростовые факторы гормональной природы обнаруживаются практически во многих биологических жидкостях: в сыворотке крови, амниотической жидкости, фолликулярной, семенной, цереброспинальной и других (Daughaday, Rotwein, 1989; Varewijck, Janssen, 2012). IGF-I или соматомедин С осуществляет регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма, является важнейшим эндокринным посредником действия соматотропного гормона (Daughaday, Rotwein, 1989). Этот гормон производится гепатоцитами, но может продуцироваться и в клетках скелетных мышц (Varewijck, Janssen, 2012). В больших концентрациях IGF-I содержится в доминантных фолликулах (Eden et al., 1988; Varewijck, Janssen, 2012). Этот фактор важен для репродуктивной системы, так как принимает активное участие в регуляции процессов эмбриогенеза, оптимизирует образование бластоцисты у мышей и стимулирует развитие ВКМ (Rappolee et al., 1992; Desai et al., 2000). В работе на кроликах показано, что при добавлении данного вещества в среду происходило снижение апоптоза клеток эмбриона (Herrler et al., 1998). IGF-II – пептид, выделяемый преимущественно яичниковой тканью (Gilmour et al., 1988; Daughaday, Rotwein, 1989). Содержится в гранулезных клетках доминантного фолликула и также как IGF-I участвует в процессах фолликуло- и эмбриогенеза (Gilmour et al., 1988; Daughaday, Rotwein, 1989). Данный гормон ускоряет темпы развития преимплантационного эмбриона, способствует формированию бластоцисты, стимулирует развитие ВКМ (Harvey, Kaye, 1992; Desai et al., 2000) и повышает синтез белка в трофэктодерме у мышей (Rappolee et al., 1992).

Инсулин – пептид, гормон поджелудочной железы, синтезирующийся β -клетками островков Лангерганса. Контролирует уровень глюкозы в крови, снижая ее концентрацию за счет увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны и активной ее утилизации клетками, запускает процесс образования гликогена в печени и мышцах (MacPherson, Feely, 1990; Varewijck, Janssen, 2012). В работах на мышах было показано, что инсулин способствует развитию бластоцисты, стимулирует образование ВКМ, повышает синтез белка в трофэктодерме, а также увеличивает транспорт глюкозы (Harvey, Kaye, 1988; Harvey, Kaye, 1990; Kaye et al., 1992).

β -эндорфин является нейропептидом, гормоном, относящимся к группе эндорфинов, который синтезируется кортикотропными клетками средней доли гипофиза и способен связываться с опиоидными рецепторами. Этот гормон обладает действием анальгетика, вызывает состояние эйфории, а также влияет на беременность и роды (Hartwig, 1991; Hall et al., 2011). В работе с мышинными эмбрионами было установлено, что добавление данного пептида способно оказывать воздействие на развитие преимплантационных эмбрионов и приводить к увеличению числа образующихся бластоцист мышей, при этом снижается доля аномально развивающихся эмбрионов (Чернов и др., 2012).

1.3.5. Эффекты субоптимальных условий культивирования эмбрионов лабораторных животных на формирование фенотипа рожденных особей

Отдаленные эффекты воздействия факторов роста на стадии преимплантационного эмбриона на постнатальный онтогенез изучены крайне скудно. Культивирование эмбрионов *in vitro* в субоптимальных условиях, согласно концепции: “stress-response models” (Leese, 2012), приводит к отклонениям в росте, специфическим аномалиям в течение фетального и постнатального развития (Bavister, 1995; Grace, Sinclair, 2009). При трансплантации эмбрионов овец и коров после их культивирования *in vitro* обнаружен “синдром больших новорожденных”, главная характеристика которого – повышенный фетальный рост, из-за чего при рождении такие телята и ягнята имеют большую массу, по сравнению с контролем (Young et al., 1998). На более поздних этапах онтогенеза характеристики роста выравнивались, но некоторые органы имели непропорционально большой вес (McEvoy et al., 2001). Питательные среды, с которыми связывали появление синдрома больших новорожденных, различались, однако, в большинстве из них присутствовала фетальная сыворотка (McEvoy et al., 2001).

Мыши, полученные из преимплантационных эмбрионов культивированных *in vitro* в субоптимальных условиях со стадии 8-ми клеток до бластоцисты, имели, наоборот, меньшую массу по сравнению с контролем (Bowman, McLaren, 1970). Кроме того, многочисленные исследования влияния культуральных сред на развитие эмбрионов мыши выявили нарушения экспрессии генов (Khosla et al., 2001; Fernandez-Gonzalez et al., 2004), изменение метаболизма эмбриона и снижение числа клеток в бластоцисте (Fleming et al., 2004; Sjöblom et al., 2005), а также долгосрочные изменения, затрагивающие фетальный/постнатальный рост, размер органов, структуру сердца, количество нейронов (Khosla et al., 2001; Calle et al., 2012) и поведение (Ecker et al., 2004). В результате всех этих изменений у мышей, полученных после культивирования эмбрионов *in vitro*, на определенных этапах постнатального онтогенеза наблюдалось повышенное кровяное

давление, другие сердечно-сосудистые заболевания (Watkins, Fleming, 2009), ожирение (Calle et al., 2012), возрастание тревожности и недостаток памяти (Fernandez-Gonzalez et al., 2004).

Таким образом, результаты экспериментов на лабораторных и сельскохозяйственных животных указывают на связь между ранним эмбриональным развитием и постнатальным здоровьем. Хотя механизмы, реализующие эту связь, остаются не вполне ясными, одной из возможных причин может быть то, что эмбрионы не получают некоторых необходимых сигналов (в виде ростовых факторов, цитокинов и т.д.) во время культивирования *in vitro*, что приводит к нарушению регуляции экспрессии генов (Lonergan et al., 2003) и отклонениям в ходе пренатального и постнатального онтогенеза, что сказывается на формировании фенотипа (Robertson, 2007).

Другим следствием, помимо изменений фенотипа, является низкая частота имплантации эмбрионов млекопитающих и человека после их культивирования *in vitro* в субоптимальных условиях и последующей трансплантации. Низкая частота имплантации эмбрионов представляется в качестве основной проблемы программы ЭКО, так как, в большинстве случаев, лишь 10-30 % трансплантированных эмбрионов человека успешно имплантируется (Hardy, Spanos, 2002).

В настоящее время появляются сведения по оптимизации сред предназначенных для ЭКО и последующего культивирования зародышей человека, в том числе и с использованием факторов роста. Более того, уже накопилось много экспериментальных результатов, полученных на различных видах млекопитающих, свидетельствующих о том, что изменение физических условий культивирования, либо добавление в культуральную среду гормонально активных компонентов, прежде всего – ростовых факторов, может существенно оптимизировать развитие преимплантационных эмбрионов *in vitro*. Эти новые подходы и приемы, призванные улучшить условия развития зародышей вне организма, описаны в следующем разделе.

1.3.6. Факторы и приемы позволяющие оптимизировать условия пребывания эмбрионов разных видов животных вне организма

На разных видах млекопитающих показано, что культивирование эмбрионов в группе оказывает благотворное воздействие на преимплантационное развитие в условиях *in vitro* (Paria, Dey, 1990; Spindler, Wildt, 2002). Зародыши кошек хорошего или отличного качества и, особенно, поздних стадий преимплантационного развития существенным образом стимулировали дробящиеся эмбрионы этого же вида млекопитающих при совместном культивировании в условиях *in vitro* (Spindler, Wildt, 2002). Интересно, что совместное культивирование эмбрионов кошек с эмбрионами других видов, в частности мышей и коров

тоже оказывало позитивное действие, несмотря на то, что все три перечисленных вида относятся к разным отрядам млекопитающих (Spindler et al., 2006). Авторы связывают улучшение характеристик развития эмбрионов при совместном культивировании их в группе с воздействием выделяемых каждым эмбрионом ростовых факторов. Имеются и прямые экспериментальные подтверждения, что эти факторы оказывают стимулирующее влияние на зародышевое развитие в условиях *in vitro*.

В связи с открытием влияния ростовых факторов на развивающиеся эмбрионы, особое внимание уделяется объему среды, в котором происходит их культивирование. В специальных исследованиях было показано, что скорость развития дробящихся зародышей до стадии морулы и бластоцисты различна при культивировании в каплях питательной среды разного объема (Paria, Dey, 1990; Lane, Gardner, 1992). При этом было показано, что уменьшение до определенного предела объема капли, в которой находятся зародыши в процессе культивирования *in vitro*, способствует более активному их развитию (Lane, Gardner, 1992).

На основании этих наблюдений Габором Вайта была предложена так называемая WOW (well of the well) система для оптимизации культивирования эмбрионов, которая представляет собой чашку Петри, с выплавленными на ее дне микроскопическими лунками, в которые помещают эмбрионы для культивирования (Vajta et al., 2000; Vajta et al., 2008). Было подтверждено, что при культивировании эмбрионов коров с применением данного метода, увеличивался процент развившихся бластоцист, снижался уровень апоптоза и возрастал процент имплантировавшихся зародышей (Vajta et al., 2000; Sugimura et al., 2010). В работе на свиньях показано, что применение WOW системы способствовало развитию эмбрионов после процедур дозревания яйцеклеток *in vitro* и последующего их оплодотворения при помощи интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (Taka et al., 2005). Эффективность этой системы была подтверждена и при проведении ЭКО и последующем культивировании эмбрионов человека (Vajta et al., 2008). Другим подходом к культивированию эмбрионов в малых объемах среды является так называемая система “стеклянный яйцевод” (GO – glass oviduct), суть которой состоит в том, что культивирование происходит в тонком стеклянном капилляре; при этом также улучшаются характеристики развития зародышей (Thouas et al., 2003).

В последние годы интенсивно развивается совершенно новое направление при культивировании эмбрионов и ооцитов, а именно: изучение физических факторов таких, как механические взаимодействия, градиент диффузии, движение эмбриона в среде и поверхностные эффекты, которые могут влиять на развитие зародыша в культуре (Smith et al., 2012). Выяснилось, что состав поверхности, на которой находятся эмбриональные клетки, оказывает большое влияние на их развитие (Villa-Diaz et al., 2010). Появляются работы, в

которых описаны положительные эффекты при культивировании эмбрионов и ооцитов на специально разработанных динамических платформах и в матриксах, которые помогают осуществлять различные манипуляции с микроокружением эмбриона или ооцита в культуре (Smith et al., 2012). К динамическим системам относятся поверхности с вибрацией, с наклоном и контролируемым потоком жидкости, а также специализированные шейкеры и роторы (Smith et al., 2012). Отдельно следует отметить попытки создания пространственного окружения эмбрионов и ооцитов при культивировании их в трехмерных матриксах, созданных, в частности, на основе гидрогелей (Xu et al., 2006).

Применение описанных выше технологических приемов, основанных на знании физических и биологических основ развития эмбрионов в культуре *in vitro*, позволяет увеличить эффективность этих методов применительно к лабораторным животным (Стойка и др., 2004; Smith et al., 2012), и дает новые возможности при работе с экзотическими и исчезающими видами млекопитающих (Amstislavsky et al., 2012; Брусенцев и др., 2013).

Таким образом, на основании изученной литературы, можно заключить, что создание криобанков эмбрионов и гамет, в совокупности с другими репродуктивными технологиями, является современным решением для сохранения биоразнообразия различных видов млекопитающих. Важным обстоятельством, которое подчеркивается ведущими мировыми экспертами в области сохранения исчезающих и редких видов млекопитающих, является то, что каждый зоологический таксон необходимо изучить и выявить особенности репродуктивной биологии, сперматогенеза и раннего развития эмбрионов, а также специфику применения таких важных технологий, как создание криобанков эмбрионов и гамет именно к этой таксономической группе. Поскольку ранее по отношению к *Cricetinae* такой работы проведено не было, настоящее исследование имеет целью именно восполнение данного пробела. Соответственно, основными задачами работы является разработка способов замораживания эмбрионов и семени *Cricetinae*, а также изучения особенностей развития эмбрионов этой таксономической группы и способов воздействия на это развитие с использованием двух видов рода *Phodopus* в качестве биологической модели.

ГЛАВА 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. Животных содержали в клетках 36 см × 25 см × 14 см (длина × ширина × высота) выложенных древесной стружкой. Все время, в том числе и во время эксперимента, животных содержали в специальной комнате конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН при температуре 20-22 °С. Животных содержали по графику – 12 часов день и 12 часов ночь. Обеспечивали их зерном, овощами в соответствии с их пищевыми предпочтениями (Ross, 1995; Феоктистова, 2008) и водой. Все эмбрионы, используемые в этом исследовании, были собраны от естественно спаренных как самок джунгарских хомячков, так и Кэмпбеллов. Перед спариванием самцов джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла содержали по одному в клетках отдельно от самок. Также получали гибридных самок F1 в результате скрещивания самок Кэмпбелла с джунгарскими самцами, которые в дальнейшем были использованы в ходе экспериментов по переносу эмбрионов, как описано ниже. Все эксперименты на животных были утверждены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 22.2 от 30.05.2014) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях. Эвтаназию животных осуществляли при помощи CO₂.

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 200 мкл раствора Human tubal fluid – HTF (Sigma, USA) на чашке Петри, после чего их измельчали. Чашки с содержимым выдерживали в термостате в течение 15 мин при 37 °С, после чего всю жидкость с собирали в 1.5 мл пробирку. Затем из пробирки забирали каплю объемом 50 мкл и смешивали с одной из комбинаций криопротекторов и замораживали согласно одному из приведенных ниже протоколов.

Протокол 1: Смешивали 50 мкл раствора семени со 150 мкл смеси 18 % раффинозы (Sigma, USA) и 3 % обезжиренного сухого молока (Nonfat dried milk powder, Applichem, Germany). Затем замораживали в парах азота в пластиковых соломинах объемом 0.25 мл (Cryo Bio System, France) согласно методу применяемого ранее на мышах (Takeshima et al., 1991; Nakagata, 1993; 2000).

Протокол 2: Смешивали 50 мкл раствора семени со 150 мкл раствора CaniPlus Chill (Minitube, Germany) содержащего 4 % глицерина и 20 % яичного желтка. После этого выдерживали образец в холодильнике при температуре +4 °C в течение двух часов. Добавляли 100 мкл раствора CaniPlus Chill (Minitube, Germany) содержащего 8 % глицерина и 20 % яичного желтка и выдерживали еще 1 час в тех же условиях. Таким образом, конечная концентрация глицерина составляла 6%. Затем заполняли пластиковые соломины, как и при выполнении первого протокола, и замораживали в парах азота согласно методу применяемого ранее по отношению к семени кошачьих (Абрамова и др., 2014).

Протокол 3: Добавляли в 50 мкл раствора семени 100 мкл CaniPlus Freeze (Minitube, Germany). Затем выдерживали смесь в холодильнике при температуре +4 °C в течение 2 часов. После этого заполняли пластиковые соломины для последующего замораживания согласно инструкции производителя (<http://www.minitube.de>).

Для каждого из приведенных выше протоколов процесс замораживания был один и тот же. Сначала 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 ИЦиГ СО РАН, где они хранились при температуре -196 °C не менее недели.

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 °C.

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 (Garner et al., 1994). Прижизненная двойная окраска этими флуорохромами, при которой живые сперматозоиды флуоресцируют зеленым свечением (SYBR Green I), мертвые флуоресцируют красным свечением (PI) позволяет получить информацию о доле жизнеспособных сперматозоидов (Siemieniuch, Woclawek-Potocka, 2008). Наша методика также позволяла выявить группу гибнущих сперматозоидов, которые флуоресцировали желтым. Изображения получены и

обработаны под микроскопом LSM 780 NLO AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Germany) на базе ЦКП МАБО СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113>).

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 (Carl Zeiss, Germany).

2.3. Криоконсервация эмбрионов хомячков рода *Phodopus*

2.3.1. Спаривание самок-доноров и получение эмбрионов

Все эмбрионы были собраны в период с мая по сентябрь. За две недели до спаривания, самки как джунгарских хомячков, так и Кэмпбелла находились в группах по 4-6 животных в клетке; влагалищные мазки брались ежедневно со слизистой оболочки стенок влагалища каждого животного с помощью шпателя, в течение одной недели, чтобы определить соответствующий этап эстрального цикла до спаривания. Этапы цикла были классифицированы следующим образом: эструс, только ороговевшие клетки; метэструс, ороговевшие клетки и лейкоциты; диэструс, лейкоциты и слизистые клетки; проэструс, ядерные клетки и ороговевшие клетки (Феоктистова, 2008).

На этапе проэструса, каждая самка была покрыта самцом того же вида с доказанной плодовитостью. Спаривание подтверждалось на следующее утро с помощью присутствия сперматозоидов в вагинальных мазках с помощью микроскопа Биомед-6 (Биомед, Россия) (x100). День, в который были обнаружены сперматозоиды, считался первым днем *post coitum* (pc). Покрытые самки (18) были гуманно умерщвлены при помощи дислокации шейных позвонков на 3 день pc в 13:00, с целью получения эмбрионов на стадии дробления. Также, три дополнительные самки скрещивали с самцами джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) проверенными на плодовитость с визуальным подтверждением коитуса и проверкой наличия сперматозоидов в вагинальных мазках, как описано выше. Эти самки были умерщвлены, как описано выше, но в конце второго дня pc (46-48 часов после полового акта), с целью получения 2-х клеточных эмбрионов.

Рога матки и яйцеводы были хирургически удалены и помещены в EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, USA) (Amstislavsky et al., 2006). Извлеченные эмбрионы были подсчитаны и оценены с помощью стереомикроскопа Leica S8 APO (Leica Microsystems, Germany) с увеличением до x80. Качество эмбрионов оценивали с использованием хорошо известных критериев, а именно: стадия развития эмбриона (фактической стадией развития на третий день беременности должны быть эмбрионы от 2 до

8 клеток при нормальном развитии) (Erb, Wynne-Edwards, 1993); целостность прозрачной оболочки (Рожкова и др., 2012); количество жизнеспособных клеток (Emiliani et al., 2000).

Эмбрионы плохого качества были элиминированы; эмбрионы хорошего качества, находящиеся на стадии 2-х клеток и более (до 8-ми клеток), без значительных дефектов и с неповрежденными прозрачной оболочкой, последовательно промывали в трех каплях EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, USA), 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* был использован 1.5 М этиленгликоль (ЭГ), в качестве одиночного криопротектора или в сочетании с 0.1 М сахарозой, как описано ниже. Эмбрионы переносили на чашку Петри (Corning, USA) в каплю 200 мкл EMCARE™ Ethylene Glycol 1.5 М (ICPBio Reproduction, USA) и выдерживали в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем помещали в пластиковую соломинку общим объемом 0.25 мл (Cryo Bio System, France) при помощи тонкого стеклянного капилляра. Количество эмбрионов в соломинах составляло от 5 до 9.

Когда использовали только один криопротектор, соломины заполняли путем аспирации трех секторов (столбцов) Ethylene Glycol 1.5 М (ICPBio Reproduction, USA), разделенных двумя воздушными пузырьками (10-20 мкл каждый).

В случае, когда использовали два разных криопротектора, соломины заполняли растворами также в три сектора, но различными по составу, разделенных двумя воздушными пузырьками (10-20 мкл каждого). Первый сектор: EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, USA). Второй сектор: раствор, полученный путем растворения 0.1 М сахарозы (Sigma, USA) в EMCARE™ Ethylene Glycol 1.5 М (ICPBio Reproduction, USA). Третий сектор: раствор, полученный путем растворения 0.3 М сахарозы (Sigma, USA) в EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, USA). Эмбрионы помещали в центральную часть (второй сектор) соломины, как и в первом случае.

Соломины с эмбрионами помещали в специальную ячейку программного замораживателя CL 8800 (CryoLogic, Australia). Эмбрионы внутри соломин охлаждали от 18 °С до температуры сидинга -7 °С со скоростью 1 °С/мин и выдерживали при данной температуре в течение 10 мин. Через 2 минуты после достижения этой температуры производили сидинг (искусственную кристаллизацию льда внутри соломы), которую индуцировали путем прикосновения к соломине (сначала верхней части первого сектора, а затем среднего сектора, содержащего эмбрионы) пинцетом, который был предварительно

охлажден в жидком азоте. Через 8 минут после сидинга, охлаждение продолжалось со скоростью 0.3 °C/мин до достижения температуры –35 °C. Соломины выдерживали 10 минут при этой температуре, после чего их сразу помещали в жидкий азот.

2.3.3. Оттаивание эмбрионов

Способ оттаивания заключался в следующем: 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). Этот метод был применен к замороженным эмбрионам с любым из используемых криопротекторов. Ранее было показано, что скорость оттаивания с использованием аналогичного метода составляет около 300 °C/мин (Renard, Babinet, 1984).

После оттаивания, всю жидкость, содержащуюся в соломинке, выдавливали на 35 мм чашку Петри (Corning, USA). Криопротектор удаляли при помощи промывания оттаянных эмбрионов; методы отмывания могут варьировать в зависимости от того, какой был использован криопротектор.

Соломины с оттаянными эмбрионами замороженные с ЭГ, которые не содержали секторов с раствором сахарозы промывали три раза в свежих 90 мкл каплях (в течение 5 минут в каждой капле) из EMCARE™ Holding Solution (ICPBio Reproduction, USA) при 37 °C на нагревательном столике HT 007 Heating System (Minitub GmbH, Germany).

Для оттаянных эмбрионов, замороженных в соломинах с ЭГ, которые содержали сектора с раствором сахарозы, все три содержащиеся раствора выдавливали из соломы на чашку Петри в одну каплю; в такой смешанной капле эмбрионы уравнивались в течение 15 минут при комнатной температуре, а затем переносили в свежие капли EMCARE™ Holding Solution (ICPBio Reproduction, USA) при 37 °C на HT 007 Heating System (Minitub GmbH, Germany), как и в предыдущем случае.

2.3.4. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов после процедур замораживания-оттаивания

2.3.4.1. Оценка жизнеспособности эмбрионов методом двойного окрашивания флуоресцеина диацетатом и пропидия йодидом

Флуоресцентная микроскопия в сочетании с двойным окрашиванием флуоресцеином диацетатом (FDA) и пропидия йодидом (PI) используется для оценки жизнеспособности преимплантационных эмбрионов млекопитающих (Ivan et al., 2011). Флуоресцентное свечение при окрашивании эмбрионов, испускаемые этими двумя красителями имеют различную длину волны, поэтому этот метод позволяет идентифицировать как

жизнеспособные, так и поврежденные (мертвые) клетки одновременно в одних и тех же эмбрионах (Jones, Senft, 1985; Ivan et al., 2011).

Жизнеспособность эмбрионов оценивали через 30-40 минут после оттаивания путем визуального осмотра с использованием световой и флуоресцентной микроскопии, а также фотосъемки с использованием микроскопа Leica M205FA (Leica Microsystems, Germany). Были изучены все замороженные-оттаянные эмбрионы из соломины, предназначенные для этого теста. Число эмбрионов в каждом тесте составляло от 5 до 9 (эквивалентно количеству замороженных-оттаянных эмбрионов в соломе), и 2-3 соломины были предназначены для каждой из трех различных комбинаций замораживания-оттаивания. Интактные эмбрионы из четырех отдельных вымываний (2-3 эмбриона в каждом вымывании) использовали в качестве контроля.

Для детекции флуоресценции после контакта с FDA использовали возбуждающий фильтр 470/40 нм и эмиссионный фильтр 525/50 нм. Для детекции флуоресценции после контакта с PI использовали возбуждающий фильтр 545/30 нм и эмиссионный фильтр 620/60 нм.

Были приготовлены исходные растворы флуорохромов 0.002 г FDA (Sigma, USA)/200 мкл ацетона на маточный раствор и 0.0125 г PI (Sigma, USA)/25 мл DPBS (Sigma, USA), которые хранили при -20°C . Эмбрионы промывали три раза в EMCARE™ Holding Solution (ICPBio reproduction, USA), два раза в DPBS (Sigma, USA) и помещают в свежую каплю DPBS (0.23 мл). Сразу же после этого 10 мкл исходного раствора PI добавляли к этой капле. После 2-3 мин, 10 мкл исходного раствора FDA добавляли к той же капле. После выдержки в течение 3-4 мин, эмбрионы подсчитывали, оценивали качество и фотографировали. Для этого теста были использованы эмбрионы только стадии 8-клеток. Эмбрионы с 75 % от интактных бластомеров считались живыми. Этот критерий основан на литературных данных (Emiliani et al., 2000) и на нашем собственном предыдущем опыте.

2.3.4.2. Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов

После процедур замораживания-оттаивания (интактные – контроль) эмбрионы переносили в каплю 50 мкл либо HECM (Barnett, Bavister, 1996), либо модифицированной среды R1ECM (Cozzi et al., 2010) на 35 мм чашки Петри (Corning, USA) и культивировали в течение 48 ч под минеральным маслом (Sigma, USA) в атмосфере в 5 % CO_2 при 37°C и высокой влажности в BINDER C 150-UL CO_2 -инкубаторе (BINDER, Germany). Интактные и замороженные-оттаянные эмбрионы культивировали при одинаковых условиях (подробнее см ниже). Эмбрионы культивировали в группах в количестве от 3 до 8.

Эмбрионы, которые были заморожены в ЭГ с сахарозой после оттаивания, отмывали от криопротектора, мертвые или некачественные эмбрионы удаляли, а живые эмбрионы хорошего или отличного качества, не имеющие никакого видимого повреждения культивировали с или без добавления GM-CSF rat (2 нг/мл) (Sigma, USA) или EGF rat (10 нг/мл) (Sigma, USA). Эти дозы были выбраны на основе литературных данных: максимальные эффекты GM-CSF на развитие преимплантационных эмбрионов мыши *in vitro* были получены при концентрации 2 нг/мл (Robertson et al., 2001), а в случае EGF 10 нг/мл в экспериментах на крысах (Aflalo et al., 2007).

Жизнеспособность эмбрионов джунгарского хомячка оценивали по их развитию через 24 часа культивирования *in vitro*. В конце этого периода в зависимости от стадии развития, их подразделяли на стадию дробления, морулы и бластоцисты.

Жизнеспособность замороженных-оттаянных эмбрионов хомячка Кэмпбелла и тех, которые не были заморожены (интактные – контроль) была оценена при помощи инвертированного микроскопа DM IL LED (Leica Microsystems, Germany) перед культивированием, после 24 часов, и после 48 часов культивирования *in vitro*. После 48 ч культивирования *in vitro*, мертвые эмбрионы были удалены, а развивающиеся бластоцисты, содержащие четко выраженную полость, внутриклеточную массу, и трофэктодерму фиксировали и окрашивали для ядерного подсчета (Amstislavsky et al., 2006). Тест по культивированию замороженных-оттаянных эмбрионов повторяли три раза для обоих условий (с или без добавления GM-CSF), после чего они забирались для последующего анализа. Тест по культивированию эмбрионов без замораживания (интактные – контроль) повторяли четыре раза, но только три из них были использованы для ядерного подсчета.

2.3.4.3. Подсчет интерфазных ядер

Бластоцисты помещали в 1 мл фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS) (Sigma, USA), содержащего 2.5 % формальдегида (Merk, Germany) при pH 7.4-7.6. После фиксации в течение 3 ч при комнатной температуре, эмбрионы промывали два раза DPBS в течение 15 мин и подвергали воздействию 2 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma, USA) в $2 \times SSC$ в течение 7 мин при комнатной температура и затем промывали три раза в $2 \times SSC$. Окрашенные эмбрионы помещали в каплю фиксирующей среды Vectashield (Vector Laboratories, USA) на чистое предметное стекло микроскопа. Стекла с препаратами были проанализированы и подсчитано число клеток под LSM 780 NLO AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Germany) с фильтрами соответствующими для окрашивания DAPI. Эмбрионы были обследованы с AxioCam MRM (Carl Zeiss, Germany) и проанализированы с использованием Zen программного обеспечения (Carl Zeiss, Germany) с использованием научно-

исследовательского центра микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113>).

Нормальные, а также мелкие ядра (ядерные фрагменты) были подсчитаны для каждого эмбриона. Митотические и ядерные индексы фрагментации были рассчитаны 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 R1ЕСМ 24 часа, как описано выше, после чего переносили в рога матки гибридных самок-реципиентов в возрасте 13 месяцев. Эти гибриды были получены в результате скрещивания самки *P. campbelli* с самцом *P. sungorus* проверенных на плодовитость. Трансплантацию эмбрионов джунгарского хомячка проводили на 3 день рс после спаривания гибридной самки-реципиента с фертильным самцом *P. campbelli*, с последующим генетическим анализом потомков-трансплантантов (Brusentsev et al., 2015). Спаривание было установлено по присутствию сперматозоидов в вагинальных мазках. Трансплантацию эмбрионов хомячка Кэмпбелла проводили на 3 день рс после спаривания гибридной самки-реципиента с вазэктомированным самцом *P. campbelli* проверенным на стерильность. Спаривание было установлено визуально. День спаривания считался 1-м днем беременности.

Перед операцией, реципиентов взвешивали и вводили анестезию 0.25 мг/кг гидрохлорида медетомидина (Domitor, 1 mg/ml, i.p., Orion-Corporation, Finland) и через 10 минут 50 мг/кг золетила (Zoletil, i.p., Virbac Sante Animale, France). Затем вводили подкожно 0.02 мл амоксициллина (тригидрат амоксициллина, 150 мг/мл) (Hemofarm, Serbia).

Процедура переноса эмбрионов в рог матки была аналогична той, что применялась ранее (Amstislavsky et al., 2006). Волосы в области операционного поля выбривали и обрабатывали кожу 70 % спиртом. Кожа и лежащие под ее основанием мышечные слои разрезались в области матки (спинно-брюшном направлении, в 5 мм от нижних ребер в каудальном направлении). Пинцетом захватывали верхнюю часть матки и извлекали жировую ткань вместе с яичником и рогом матки.

Для переноса эмбрионов использовали тонкие стеклянные капилляры, которые были заточены и стерилизованы при помощи нагревания перед использованием. Эмбрионы перед трансплантацией культивировали *in vitro* в течение 24 часов, как описано выше, и перед операцией брали из CO₂-инкубатора и дополнительно промывали три раза в каплях Holding Solution (EMCARE, ICPBio Reproduction, USA). Затем эмбрионы набирали в стеклянный

капилляр с минимальным количеством этой среды и вводили в правый рог матки. Одновременно с трансплантацией эмбрионов джунгаского хомячка накладывали лигатуру на правой маточной трубе, чтобы предотвратить миграцию собственных эмбрионов в этот рог матки, как описано ранее (Amstislavsky et al., 1996). В случае с трансплантацией эмбрионов хомячка Кэмпбелла, лигатуру не накладывали, поскольку самец был вазэктомирован. Разрез зашивали, посыпая порошком антибиотика – тригидрат амоксициллина (Hemofarm, Serbia), а хирургические швы покрывали бетадином (Egis, Hungary).

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 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 + сахароза) рассчитывали процент 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).

ГЛАВА 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

Общий вид сперматозоидов хомячков джунгарского и Кэмпбелла показан на рисунке 1А и 1Б. 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.

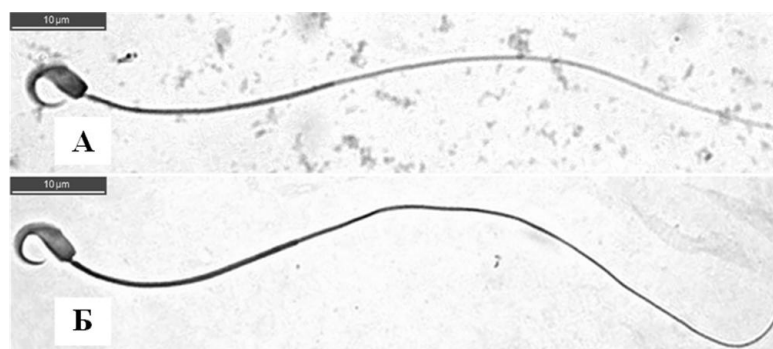


Рисунок 1. Индивидуальные сперматозоиды джунгарского хомячка (А) и хомячка Кэмпбелла (Б). Окраска гематоксилин + эозин. Масштабная полоска = 10 микрон.

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 (рисунок 2).



Рисунок 2. Повреждения акросомы у интактных сперматозоидов хомячков рода *Phodopus* (1-2 – норма; 3-5 – степень выраженности дефекта, по возрастающей; 6 – головка, полностью лишенная акросомы). Окраска гематоксилин + эозин. Масштабная полоска = 10 микрон.

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 (рисунок 3А).

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 (рисунок 3Б).

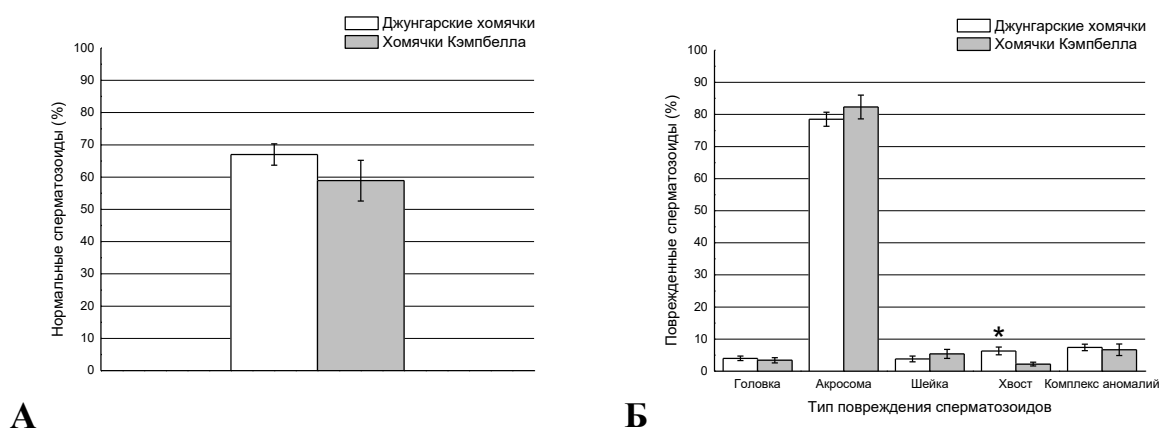


Рисунок 3. Доля нормальных сперматозоидов (А) и анализ типичных повреждений сперматозоидов (Б) (по результатам морфологического анализа сухих мазков, после окрашивания гематоксилином с эозином) в интактных образцах эпидидимального семени джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла.

Достоверность отличий: *, $P < 0.05$ – сравнение между двумя видами хомячков.

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

Сравнительные данные по жизнеспособности сперматозоидов в интактных образцах приведены в таблице 3. В интактных образцах семени доля живых сперматозоидов согласно методу двойного окрашивания SYBR Green I + PI у обоих видов хомячков не превышает 30 % (рисунок 4, таблица 3). Таким образом, интактные образцы эпидидимального семени у джунгарского хомячка и хомячка Кэмпбелла характеризуются сравнительно небольшой долей живых сперматозоидов.

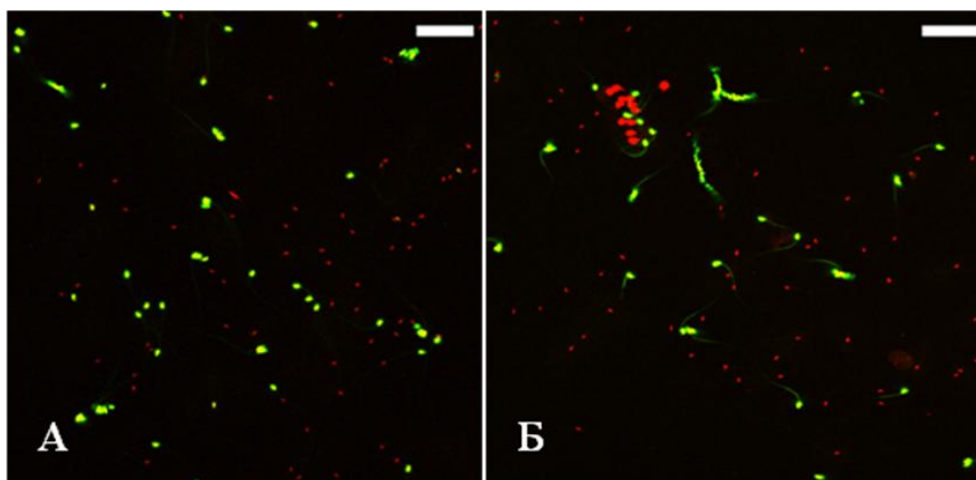


Рисунок 4. Общий вид препаратов эпидидимального семени джунгарского хомячка (А) и хомячка Кэмпбелла (Б) после прижизненной окраски SYBR Green I + PI.

Масштабная полоска = 50 микрон.

Таблица 3. Жизнеспособность интактных сперматозоидов (после окрашивания SYBR Green I + PI)

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

Достоверность отличий: ^a^b, P < 0.05.

3.3. Криоконсервация эпидидимального семени хомячков

Морфологический анализ сухих мазков эпидидимального семени джунгарского хомячка после процедур замораживания и оттаивания показал, что при реализации протокола 1 (т.е. при использовании в качестве криопротекторов смеси рафинозы с сухим молоком) практически все сперматозоиды имеют грубые повреждения, а доля нормальных сперматозоидов была наиболее низкой и не превышала 10 % (рисунок 5А). При использовании криопротектора CaniPlus Chill с модификацией сперматозоиды обоих видов демонстрируют большую сохранность клеточных структур (рисунок 5Б, В).

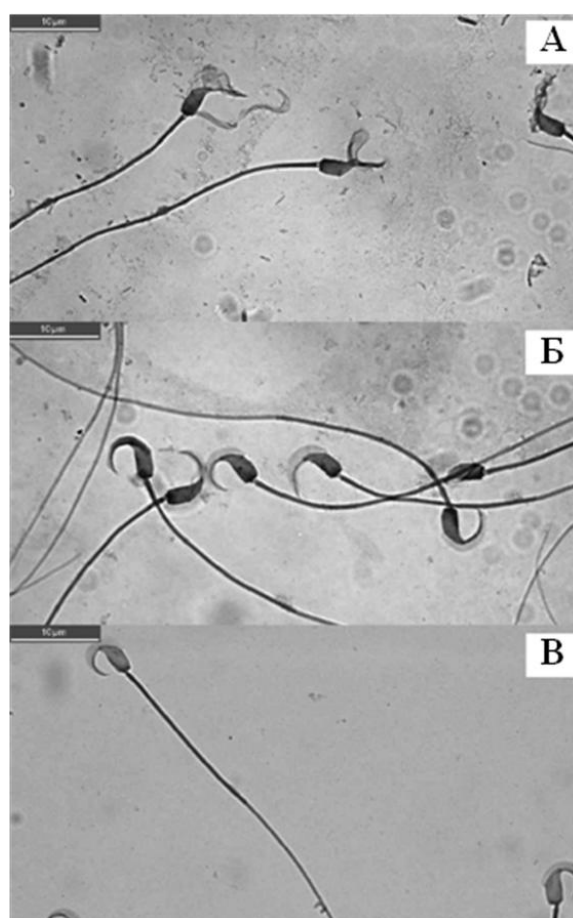


Рисунок 5. Влияние разных протоколов замораживания-оттаивания на морфологию сперматозоидов эпидидимального семени (после окрашивания гематоксилином с эозином).

А – молоко + рафиноза (джунгарский хомячок);

Б – CaniPlus Chill (джунгарский хомячок);

В – CaniPlus Chill (хомячок Кэмпбелла).

Масштабная полоска = 10 микрон.

При применении протокола с использованием CaniPlus Chill с модификацией доля морфологически нормальных сперматозоидов была достоверно выше, что показали исследования на джунгарском хомячке (рисунок 6А).

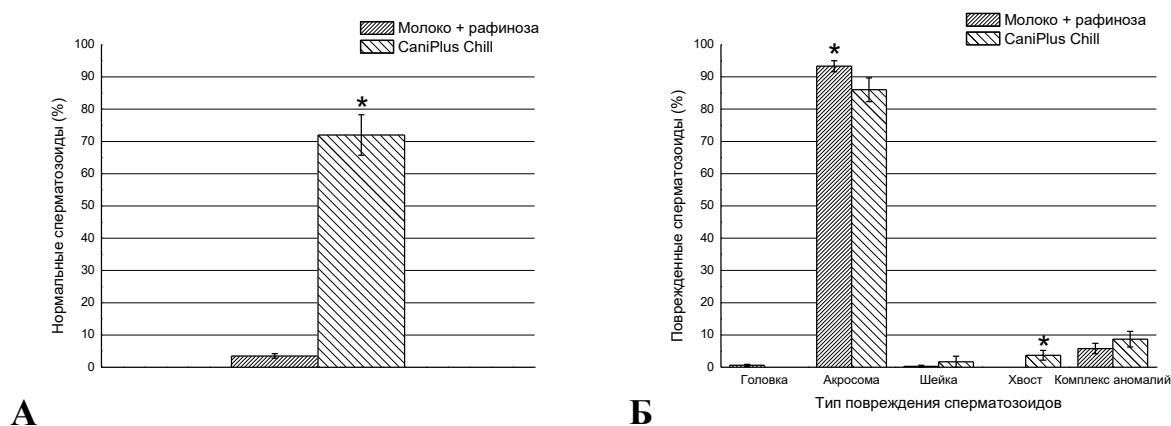


Рисунок 6. Сравнение влияния разных протоколов замораживания и оттаивания на морфологию сперматозоидов эпидидимального семени джунгарского хомячка (после окрашивания гематоксилином с эозином).

А – доля сперматозоидов, имеющих нормальную морфологию;

Б – анализ типичных повреждений структуры сперматозоидов после криоконсервации с использованием разных криопротекторов.

Достоверность отличий: *, $P < 0.05$ – сравнение между двумя криопротекторами.

Сравнение двух криопротекторов, а именно: CaniPlus Freeze и CaniPlus Chill проведенный на хомячках Кэмпбелла показал, что доля морфологически нормальных сперматозоидов была достоверно выше при применении протокола CaniPlus Chill (рисунок 7А). Анализ типичных повреждений структуры сперматозоида после процедур замораживания-оттаивания показывает, что во всех проведенных экспериментах наиболее уязвимой частью сперматозоида хомячка является акросома (рисунок 6Б; рисунок 7Б).

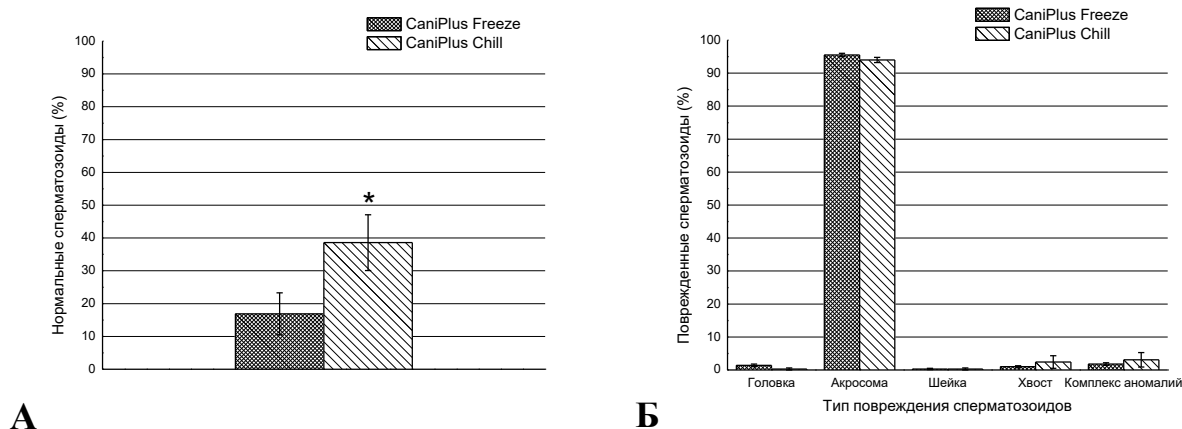


Рисунок 7. Сравнение влияния разных протоколов замораживания и оттаивания на морфологию сперматозоидов эпидидимального семени хомячка Кэмпбелла (после окрашивания гематоксилином с эозином).

А – доля сперматозоидов, имеющих нормальную морфологию;

Б – анализ типичных повреждений структуры сперматозоидов после криоконсервации с использованием разных криопротекторов.

Достоверность отличий: *, $P < 0.05$ – сравнение между двумя криопротекторами.

Согласно результатам прижизненной окраски SYBR Green I + PI, процедуры замораживания и оттаивания приводят к снижению доли живых сперматозоидов (рисунок 8А, Б). 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, а доля живых выше при применении CaniPlus Chill в качестве криопротектора (рисунок 8А). Сравнение эффективности применения CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze было проведено на хомячках Кэмпбелла (рисунок 8Б). 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 жизнеспособных сперматозоидов 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% (рисунок 8А, Б).

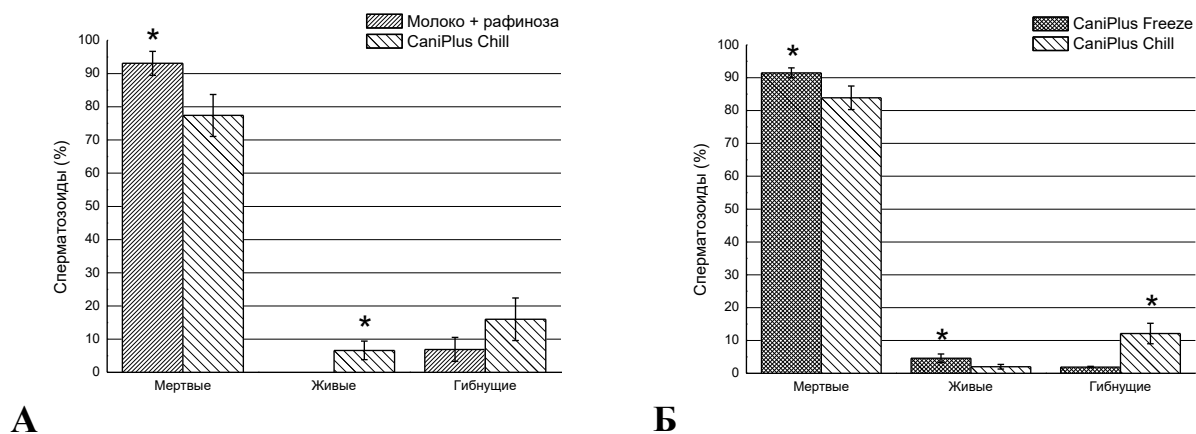


Рисунок 8. Сравнение влияния разных протоколов замораживания-оттаивания на жизнеспособность сперматозоидов эпидидимального семени хомячков джунгарского (А) и Кэмпбелла (В), после окрашивания SYBR Green I и PI.

Достоверность отличий: *, $P < 0.05$ – сравнение между двумя криопротекторами.

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 . За исключением 7 эмбрионов (7.8 % от общего количества) хомячков Кэмпбелла, которые имели явные признаки деградации и в эксперимент взяты не были, остальные эмбрионы были на стадии дробления, и содержали от двух до восьми бластомеров. Большинство из вымытых эмбрионов (55.6 %) были на 8-клеточной стадии развития. Две другие группы имели эмбрионы на стадии 2-х (12.2 %) и 4-х (17.8 %) бластомеров. Тем не менее, некоторые эмбрионы имели 3 (3.3 %) и 6 (3.3 %) бластомеров.

3.5. Замораживание, криоконсервация и оттаивание эмбрионов хомячков рода

Phodopus

В ходе этого этапа эксперимента на хомячках Кэмпбелла было выяснено, какой способ замораживания-оттаивания является наиболее щадящим по отношению к эмбрионам рода *Phodopus*. На первом этапе данного эксперимента дробящиеся эмбрионы хомячка Кэмпбелла на стадии 2-8 бластомеров замораживали и оттаивали одним из 2-х способов

описанных в таблице 4 с последующей оценкой их качества при помощи световой микроскопии и сравнением с контрольной группой эмбрионов, не подвергавшихся этим процедурам. Было показано, что при замораживании эмбрионов хомячка Кэмпбелла “стандартным” способом с использованием смеси этиленгликоля и сахарозы в качестве криопротекторов, после оттаивания доля жизнеспособных эмбрионов не отличается от таковой в контроле (когда эмбрионы не подвергали процедурам замораживания и оттаивания).

Таблица 4. 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) ^а
Эмбрионы замороженные с ЭГ в качестве криопротектора	21 (3)	15 (71.4) ^б
Эмбрионы замороженные с ЭГ+сахароза в качестве криопротекторов	13 (3)	12 (92.3) ^в

Достоверность отличий: ^{аб}, $P < 0.01$; ^{бв}, $P < 0.05$.

На следующем этапе эксперимента было показано, что сохранность эмбрионов джунгарских хомячков после криоконсервации также как с хомячками Кэмпбелла лучше всего в том случае, когда используется сочетание криопротекторов (ЭГ + сахароза) и “стандартный” метод замораживания (таблица 5).

Таблица 5. 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) ^а
Эмбрионы замороженные с ЭГ в качестве криопротектора	14 (3)	9 (64.3) ^б
Эмбрионы замороженные с ЭГ+сахароза в качестве криопротекторов	14 (3)	13 (92.9) ^в

Достоверность отличий: ^{аб}, $P < 0.01$; ^{бв}, $P < 0.05$.

3.5.1. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов методом двойного окрашивания флуорохромами FDA + PI

На данном этапе эксперимента, проводимом на джунгарских хомячках, нами был отработан метод оценки жизнеспособности преимплантационных эмбрионов при помощи двойной флуоресцентной окраски FDA + PI и последующей оценке на флуоресцентном микроскопе M205 FA (Leica microsystems, Germany). FDA окрашивает живые бластомеры, которые светятся зеленым, PI (пропидиум йодид) окрашивает мертвые бластомеры, которые светятся красным (рисунок 9).

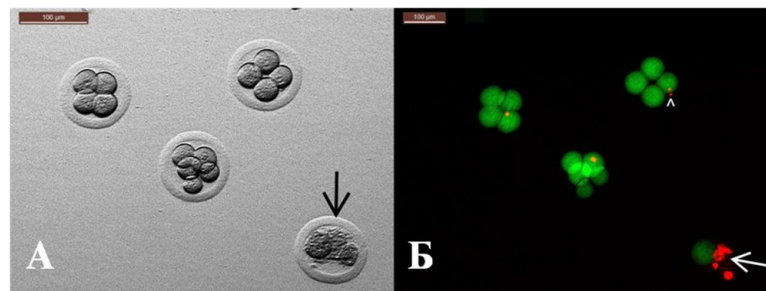


Рисунок 9. Эмбрионы джунгарского хомячка исследованные при помощи световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе M205 FA (Leica microsystems, Germany).

А – 4 эмбриона джунгарского хомячка (стрелкой указан зародыш, в котором имеются мертвые бластомеры);

Б – те же эмбрионы после окраски двумя флуорохромами (FDA + PI) и последующей оценке при помощи флуоресцентной микроскопии. Стрелкой показаны мертвые бластомеры (красное свечение). Отдельные светящиеся красные точки на живых эмбрионах представляют собой полярные тела, которые к этой стадии развития (4 бластомера) являются (естественным образом) мертвыми.

Масштабная полоска = 100 микрон.

Чтобы проверить различные варианты замораживания-оттаивания на хомячках Кэмпбелла, были выбраны эмбрионы на стадии 8 клеток. Интактные эмбрионы показывают нормальную морфологию (рисунок 10А) и флуоресцируют ярко-зеленым в ультрафиолетовом свете после двойного окрашивания FDA + PI, указывая на то, что они являются жизнеспособными (рисунок 10Б). Использование стандартного протокола замораживания-оттаивания, например, с одним криопротектором привело к меньшему количеству живых эмбрионов, по сравнению с контрольной группой (таблица 4). Некоторые эмбрионы в этой группе содержат поврежденные, либо полностью разрушенные бластомеры (рисунок 10В, Г). Наличие в качестве дополнительного криопротектора сахарозы улучшило результаты замораживания-оттаивания. Процент жизнеспособных эмбрионов в последнем случае не отличается от такового в контрольной группе (рисунок 10Д, Е, таблица 4).

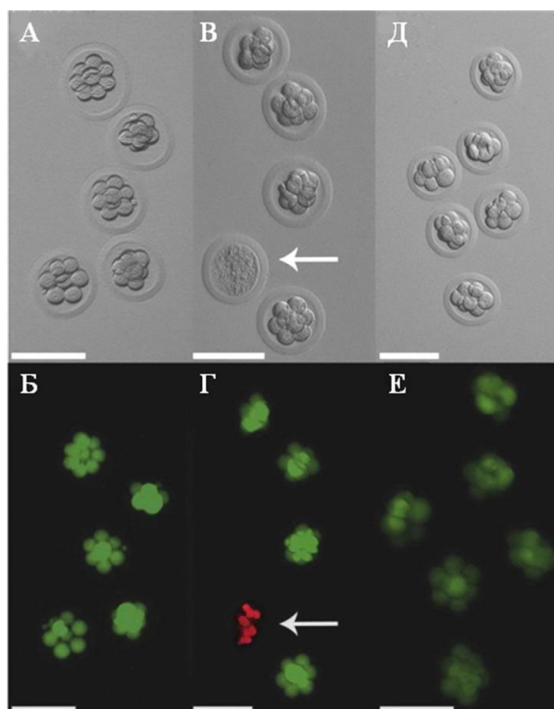


Рисунок 10. Эмбрионы хомячка Кэмпбелла подвергавшиеся замораживанию и оттаиванию, и контрольные (не подвергавшиеся этим процедурам) исследованные при помощи световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе M205 FA (Leica microsystems, Germany).

Белыми стрелками показаны мертвые бластомеры.

Верхний ряд (А, В, Д) – световая микроскопия.

Нижний ряд (Б, Г, Е) – флуоресцентная микроскопия тех же самых эмбрионов.

Окраска двумя флуорохромами: FDA + PI.

Зеленое свечение – живые клетки. Красное свечение – мертвые клетки.

(А, Б) – контрольная группа;

(В, Г) – эмбрионы замороженные с ЭГ в качестве криопротектора;

(Д, Е) – эмбрионы замороженные с ЭГ + сахара в качестве криопротекторов.

Масштабная полоска = 100 микрон.

3.5.2. Оценка жизнеспособности преимплантационных эмбрионов хомячков *P. sungorus* и *P. campbelli* путем культивирования *in vitro*

Результаты культивирования *in vitro* интактных (контроль) и замороженных-оттаянных эмбрионов джунгарского хомячка представлены в таблице 6. Некоторые из замороженных и интактных эмбрионов успешно развивались до стадии морулы независимо от используемой среды. Следует отметить, что НЕСМ не содержал антибиотиков, в то время как R1ЕСМ имеет гентамицин и стрептомицин. Тем не менее, скорость развития на R1ЕСМ была выше, хотя и не значительно по сравнению с НЕСМ. Это послужило причиной для того, чтобы мы использовали R1ЕСМ в наших последующих экспериментах.

Скорость развития *in vitro* замороженных-оттаянных эмбрионов была подобна той, что и в контрольной группе (рисунок 11, таблица 6). Некоторые из эмбрионов в этой группе развились до стадии морулы, но не дальше.

Таблица 6. Результаты культивирования *in vitro* 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
НЕСМ (интактные)	11 (3)	2 (18,2) ^a	0 (0)
R1ЕСМ (интактные)	9 (3)	6 (66,7) ^b	0 (0)
R1ЕСМ (“крио”)	17 (6)	11 (64,7) ^b	0 (0)

Достоверность различий: ^{ab} и ^{bb}, $p < 0.05$.

Расшифровка по группам:

НЕСМ (интактные): интактные эмбрионы джунгарского хомячка культивировали в НЕСМ, минуя этап замораживания;

R1ЕСМ (интактные): интактные эмбрионы джунгарского хомячка культивировали в R1ЕСМ, минуя этап замораживания;

R1ЕСМ (“крио”): то же что предыдущая группа, но эмбрионы перед культивированием подвергали замораживанию и криоконсервации.

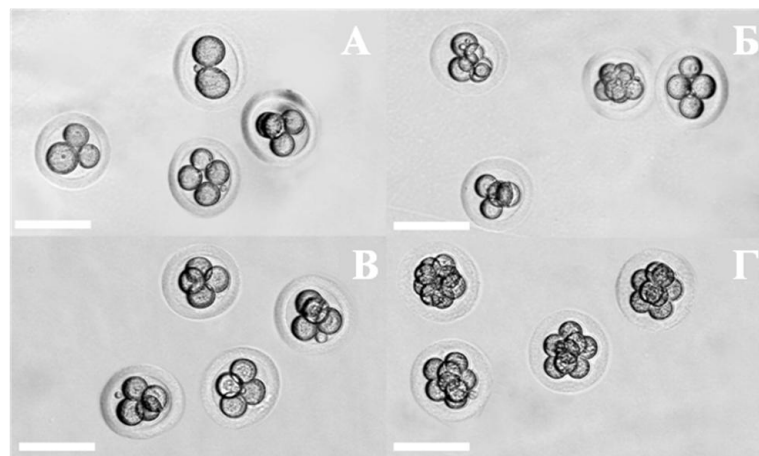


Рисунок 11. Результаты культивирования в течение 24 часов интактных эмбрионов джунгарского хомячка и эмбрионов этого же вида после замораживания, криохранения и оттаивания при использовании R1ЕСМ в качестве питательной среды.

А – интактные эмбрионы до культивирования;

Б – те же эмбрионы после 24 часов культивирования;

В – эмбрионы после оттаивания;

Г – те же эмбрионы после 24 часов культивирования.

Масштабная полоска = 100 микрон.

Развитие интактных эмбрионов *in vitro* хомячка Кэмпбелла со стадии 2-х клеток успешно происходит на среде R1ЕСМ (рисунок 12). Всего 15 эмбрионов было вымыто у 3-х самок-доноров хомячка Кэмпбелла в конце 2 дня рс (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 и оттаяных различными способами подтвердил, что именно способ замораживания-оттаивания с использованием ЭГ с сахарозой является наиболее оптимальным (рисунок 13).

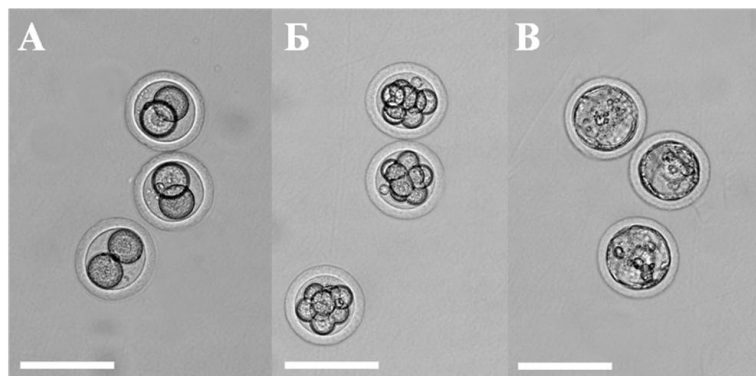


Рисунок 12. Развитие *in vitro* интактных 2-х клеточных эмбрионов хомячка Кэмпбелла на среде R1ЕСМ.

А – три 2-х клеточных эмбриона после вымывания на 2 день рс;

Б – через 24 ч после культивирования *in vitro* три эмбриона развились до стадии 8-ми клеток;

В – через 48 ч после культивирования *in vitro* три эмбриона развились до стадии бластоцисты.

Масштабная полоска = 100 микрон.

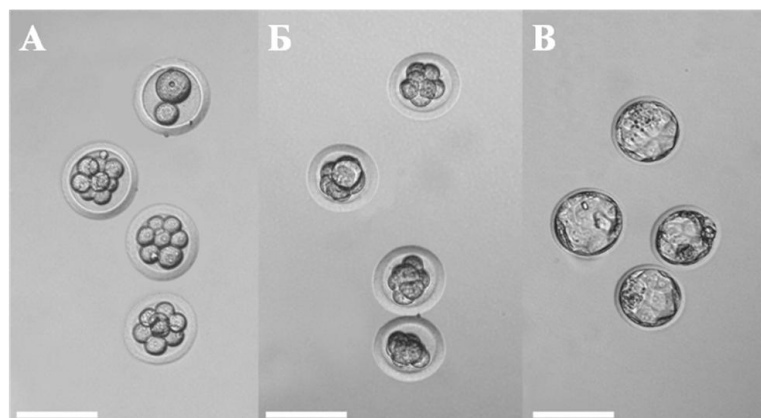


Рисунок 13. Результаты культивирования в течение 48 часов эмбрионов хомячка Кэмпбелла после замораживания и оттаивания (использование этиленгликоля и сахарозы в качестве криопротектора) при использовании среды R1ЕСМ в качестве питательной среды.

А – эмбрионы хомячка Кэмпбелла непосредственно после замораживания-оттаивания;

Б – те же эмбрионы через 24 ч культивирования;

В – те же эмбрионы через 48 ч культивирования.

Масштабная полоска = 100 микрон.

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 гранулоцитарного-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и эпидермального ростового фактора (EGF). Дозы этих факторов были выбраны на основании изучения литературы по воздействию этих факторов на развитие эмбрионов мышей, крыс и сирийских хомячков (Robertson et al., 2001; Seshagiri et al., 2002; Aflalo et al., 2007; Elaimi et al., 2012) и собственных экспериментов (GM-CSF: 2 нг/мл; EGF: 10 нг/мл).

Данные этого эксперимента на эмбрионах джунгарских хомячков и Кэмпбелла дали четкие результаты (таблица 8, таблица 9). Было подтверждено, что большая часть эмбрионов этих видов успешно переживает замораживание и криоконсервацию, и такие эмбрионы способны к последующему развитию *in vitro*. Новым результатом было то, что в выбранной дозе GM-CSF способен стимулировать развитие *in vitro* эмбрионов джунгарского хомячка, достоверно повышая образование бластоцист. Интересно, что этот фактор роста, именно в данной дозе, активно начали применять в клиниках ЭКО для повышения эффективности процедур РТ по отношению к человеку.

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 9. При добавлении этого ростового фактора все эмбрионы, взятые из криобанка, развились до бластоцисты. Однако без добавления GM-CSF до бластоцисты развилось 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 (рисунок 14, таблица 9). Наряду с этим, был показан протективный эффект GM-CSF. Индекс фрагментации был наименьшим именно в этой группе (таблица 9).

Таблица 8. 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}, $p < 0.05$.

Расшифровка по группам:

R1ECM: эмбрионы перед культивированием подвергали замораживанию и криоконсервации;

R1ECM + GM-CSF: то же что и R1ECM, но в среду культивирования был добавлен GM-CSF в дозе 2 нг/мл;

R1ECM + EGF: то же что и R1ECM, но в среду культивирования был добавлен EGF в дозе 10 нг/мл.

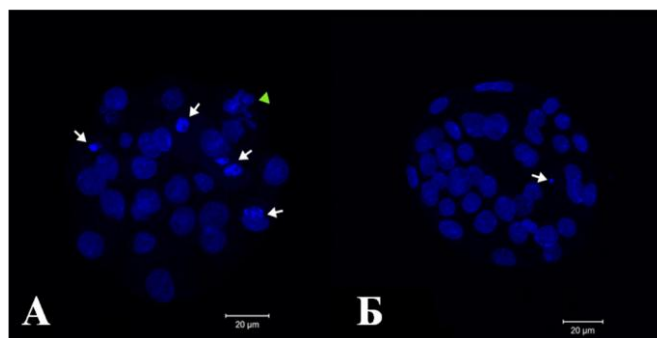


Рисунок 14. Препараты бластоцист хомячка Кэмпбелла после их криоконсервации и последующего культивирования *in vitro* в течение 48 часов.

Окраска DAPI, флуоресцентная микроскопия.

А – культивирование в среде R1ECM;

Б – культивирование в среде R1ECM с добавлением GM-CSF (2 нг/мл).

Стрелками показано фрагментации ядер. Треугольник указывает на веретено деления.

Масштабная полоска = 20 микрон.

Таблица 9. 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 ^ж	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

Проведен эксперимент по трансплантации эмбрионов джунгарского хомячка подвергавшихся криоконсервации и культивированию *in vitro* (в среде R1ЕСМ, 24 часа) межвидовым гибридам полученных скрещиванием этих двух видов.

Шесть эмбрионов джунгарского хомячка замороженных на стадии 4-х клеток были взяты из криобанка, оттаяны и культивированы (рисунок 15А). Через 24 часа пять из них уже были на стадии морулы (рисунок 15Б). Все шесть эмбрионов были трансплантированы гибридной самке по методу описанному нами ранее (Amstislavsky et al., 2006). В результате родилось 3 потомка (рисунок 16А); генетическая идентификация показала, что все три потомка являются джунгарскими хомячками (Brusentsev et al., 2015).

Позже эксперимент удалось повторить уже с эмбрионами хомячка Кэмпбелла. Пять эмбрионов этого вида замороженных 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 по тому же методу, как в случае с джунгарскими хомячками. В результате родилось 2 потомка (рисунок 16Б).

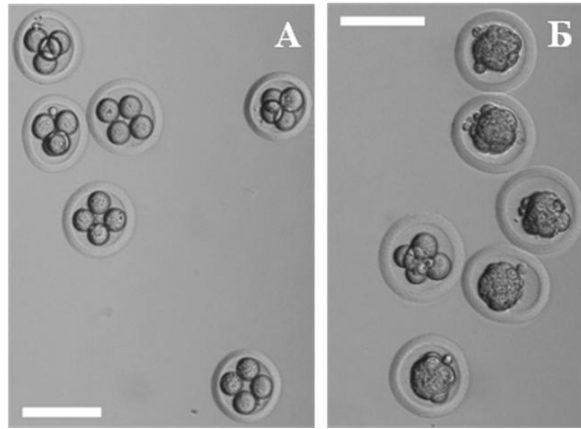


Рисунок 15. Культивирование *in vitro* эмбрионов джунгарского хомячка взятых из криобанка перед их трансплантацией.

А – шесть эмбрионов джунгарского хомячка взятых из криобанка перед культивированием *in vitro*;

Б – те же самые эмбрионы после культивирования в среде R1ECM непосредственно перед трансплантацией гибридной самке-реципиенту.

Масштабная полоска = 100 микрон.

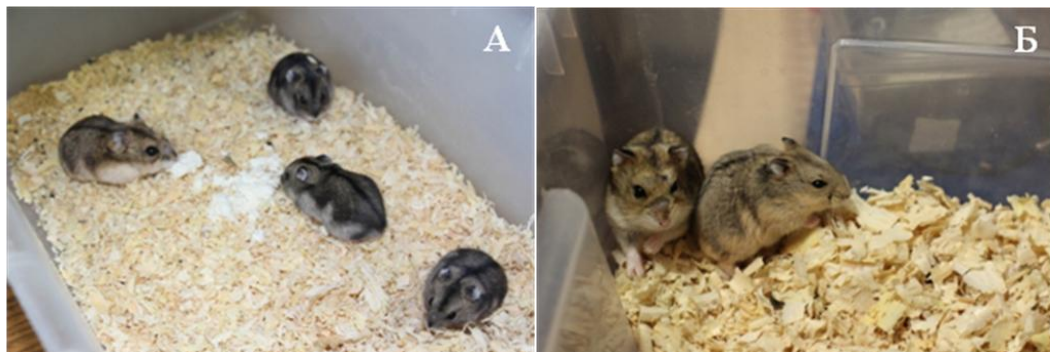


Рисунок 16. Хомячки, рожденные после трансплантации эмбрионов.

А – гибридная самка-реципиент с тремя развившимися до рождения и выжившими потомками-трансплантантами джунгарского хомячка;

Б – два развившихся до рождения потомка-трансплантанта 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 яйцевом (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

Криоконсервация семени лабораторных животных является важным звеном при создании современных криобанков генетических ресурсов (Амстиславский и др., 2015). Хотя на сегодняшний день заморожено семя нескольких десятков видов млекопитающих (Fickel et al., 2007), однако до сих пор не было данных по замораживанию семени хомячков рода *Phodopus*.

В мировой практике, по лабораторным животным, наилучший результат при замораживании семени был получен на лабораторной мыши (Takeshima et al., 1991; Nakagata, 1993; Nakagata, 2000), для которой в качестве криопротекторов используют обезжиренное молоко и раффинозу. Само замораживание осуществляют путем погружения соломины с раствором семени и криопротектора в жидкий азот, перед этим выдерживая образец в его парах в течение нескольких минут. У данного протокола есть целый ряд преимуществ, поскольку он не требует программного замораживателя и эффективен по отношению к большинству изученных линий мышей, причем после размораживания процент живых сперматозоидов для разных линий мышей составляет 40-70 % (Nakagata, 1993; Nishizono et al., 2004).

Гораздо сложнее обстоит ситуация с криоконсервацией крысиного семени (Seita et al., 2011). Несмотря на то, что крыса является вторым по степени востребованности

лабораторным животным (Agca, 2012), потребовалось ещё десятилетие с момента успешных работ по замораживанию семени мышей, для того, чтобы получить первый положительный результат замораживания семени у крыс. Ранее был разработан криопротектор, который состоит из яичного желтка, моногидрата лактозы и трис-гидроксиметил-аминометана (Seita et al., 2011). Также как и для мышей, замораживание семени крыс, проводится без использования программного замораживателя. При этом процент жизнеспособного семени после размораживания составляет около 10 % (Seita et al., 2011). Этих сперматозоидов вполне достаточно для классического экстракорпорального оплодотворения (Landel, 2005), либо интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (Kimura, Yanagimachi, 1995). Из анализа литературы следует, что из значимых для биомедицинских исследований лабораторных животных лишь по отношению к мышам разработан общепринятый метод замораживания сперматозоидов, который признаётся большинством исследователей, и применение которого приводит к воспроизводимому результату. По отношению же к другим лабораторным животным такого общепринятого метода не существует (Agca, 2012; Амстиславский и др., 2015).

Замораживание семени представителей рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*) описанное в данной работе, было выполнено впервые в мировой практике. При этом протоколы, которые успешно используют для мышей и крыс оказались малоэффективными. Наилучшие результаты удалось получить при использовании криопротектора на основе разбавителя семени CaniPlus Chill Extender (Minitube, Germany) (<http://www.minitube.de>), в который был добавлен глицерин и яичный желток. Сходный результат был получен и при использовании фирменного криопротектора CaniPlus Freeze Extender (Minitube, Germany), который предназначен для замораживания семени сельскохозяйственных животных (<http://www.minitube.de>). Криопротективные смеси на основе разбавителей CaniPlus/CaniPRO используются для замораживания семени собак (Hidalgo et al., 2014), дальневосточного лесного кота (Абрамова и др., 2014) и даже бурого медведя (Gomes-Alves et al., 2014). Как было показано в данном исследовании CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze подходят и для замораживания семени хомячков рода *Phodopus*, хотя эффективность процедуры была не велика.

По результатам морфологического анализа мазков и анализа жизнеспособности сперматозоидов методом двойного окрашивания SYBR Green I и PI после процедур замораживания-оттаивания можно заключить, что для эпидидимального семени двух исследованных видов хомячков CaniPlus Chill и CaniPlus Freeze являются более эффективными криопротекторами по сравнению со смесью рафиноза + молоко. У обоих видов хомячков типичным криоповрежденем сперматозоидов можно считать различные нарушения со стороны акросомы. Наш анализ показывает, что разрывы и деформации

акросомы довольно часто встречаются и в интактных образцах эпидидимального семени данных видов (Амстиславский и др., 2016). Процедуры замораживания-оттаивания усиливают “хрупкость” акросомы, что существенным образом снижает жизнеспособность сперматозоидов после криоконсервации.

В существующих в мире криобанках семени исчезающих и экзотических видов млекопитающих не представлены хомячки рода *Phodopus* (Fickel et al., 2007). 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 смесь ЭГ и сахарозы в качестве криопротектора для замораживания эмбрионов хомячка Кэмпбелла и джунгарского. ЭГ часто применяется как криопротектор для замораживания эмбрионов различных линий мышей и крыс из-за короткого инкубационного периода, необходимого для охлаждения эмбрионов и быстрого удаления криопротектора по сравнению с большинством других криопротекторов (Emiliani et al., 2000; Pfaff et al., 2000; Kasai, Mukaida, 2004). Хорошо известно, что этот криопротектор обладает высокой способностью проникновения через клеточные мембраны; например бластомеры эмбриона, по крайней мере, у мышей, имеют

высокую проницаемость для ЭГ в течение всего периода преимплантационного развития (Pedro et al., 2005).

Последние результаты показали, что добавление сахарозы, приводит к повышению выживаемости эмбрионов мышей после процедур замораживания-оттаивания (Amstislavsky et al., 2013). Сахароза выступает в качестве осмотического буфера (Liebermann et al., 2003), а добавление ее к основному криопротектору обеспечивает защиту blastomeres от обезвоживания и, таким образом, сохраняет структурную целостность эмбриона (Moore, Bonilla, 2006).

Так называемый “стандартный метод” замораживания (Willadsen, 1977) был применен в настоящем исследовании для эмбрионов хомячка Кэмпбелла и джунгарского. Наши данные по эмбрионам хомячков рода *Phodopus* подтверждают предыдущие результаты, полученные на мышах (Renard, Babinet, 1984) и золотистых хомячках (Ridha, Dukelow, 1985), что относительно медленное оттаивание является более выгодным для выживания эмбрионов, замороженных с использованием “стандартного метода” и для поддержания целостности зоны пеллюцида.

Результаты по сохранению 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 (Willadsen, 1977), а затем успешно использующийся для различных видов млекопитающих (Renard, Babinet, 1984; Dobrinsky, 2002; Leibo, Songsassen, 2002), может быть успешно применен и к эмбрионам хомячков рода *Phodopus*. Выживаемость эмбрионов при использовании в этом исследовании методов замораживания и оттаивания была относительно высокой. Как правило, результаты данного исследования подтвердили наблюдения, которые были получены на мышах (Renard, Babinet, 1984), и свидетельствует о том, что относительно медленный режим оттаивания аналогичный тому, который используется в настоящем исследовании, способствует выживанию замороженных эмбрионов.

В настоящем исследовании, тест двойного окрашивания FDA + PI продемонстрировал самые высокие показатели выживаемости эмбрионов хомячка Кэмпбелла и джунгарского после криоконсервации, при добавлении к основному криопротектору (ЭГ) сахарозы. После оттаивания эмбрионов группы, при замораживании которых использовалась смесь проникающего (ЭГ) и непроникающего (сахароза) криопротекторов, их выживаемость не отличалась от контрольной группы. Жизнеспособность этих эмбрионов была подтверждена их развитием в культуре *in vitro*. Сахара выступают в качестве осмотического буфера (Liebermann et al., 2003), о чем свидетельствуют данные, о том, что добавление сахарозы к

основному криопротектору защищает эмбриональные клетки от обезвоживания и, таким образом, сохраняет структурную целостность эмбрионов (Moore, Bonilla, 2006).

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 (Popova 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 HECM эта среда содержит глюкозу, хотя и в низкой концентрации.

Есть только единичное сообщение о развитии *in vitro* морул и ранних бластоцист джунгарского хомячка (Nieder, Caprio, 1990). Наши результаты показывают успешное развитие 2-клеточных эмбрионов хомячка Кэмпбелла до стадии бластоцисты на среде R1ECM. Таким образом, было установлено, что система культивирования, которая надежно поддерживает развитие *in vitro* эмбрионов крыс (Miyoshi et al., 1995; Popova et al., 2011), также подходит для развития эмбрионов хомячков Кэмпбелла и джунгарского *in vitro*.

4.5. Влияние факторов роста на развитие преимплантационных эмбрионов млекопитающих

В результате проведенных экспериментов впервые на хомячках рода *Phodopus* (*P. campbelli*; *P. sungorus*) удалось продемонстрировать, что добавление GM-CSF в питательную среду при культивировании существенно улучшает развитие эмбрионов: приводит к возрастанию процента успешно развивающихся бластоцист, существенно увеличивает число бластомеров в бластоцистах и оказывает защитное действие – снижает индекс фрагментации.

Результаты данного исследования являются первым доказательством того, что GM-CSF ускоряет развитие преимплантационных эмбрионов джунгарского хомячка *in vitro* и способствует образованию бластоцисты. Эти результаты подтверждают предыдущие наблюдения, сделанные на мышинных эмбрионах о том, что GM-CSF положительно влияет на развитие преимплантационных зародышей *in vitro*, но по-разному. То есть, данный фактор ускоряет образование и рост внутренней клеточной массы в бластоцисте, способствует хэтчингу и имплантации бластоцист и улучшает развитие эмбриона в течение всего периода культивирования (Robertson et al., 2001; Desai et al., 2007). Доза 2 нг/мл являлась наиболее эффективной в предыдущих исследованиях на мышах (Robertson et al., 2001; Sjöblom et al., 2005; Elaimi et al., 2012). Интересно также отметить, что этот фактор роста, именно в данной дозе, активно начали применять в клиниках ЭКО для повышения эффективности репродуктивных технологий по отношению к человеку (Ziebe et al., 2013). Именно в выбранной дозе GM-CSF в условиях культивирования *in vitro*, достоверно повышает образование бластоцист и увеличивает в них число бластомеров при культивировании эмбрионов хомячков рода *Phodopus*.

Влияние EGF добавленного к культуральной среде на развитие преимплантационных эмбрионов джунгарского хомячка *in vitro* было не так очевидно, как с GM-CSF, лишь один эмбрион в EGF группе, развился до стадии бластоцисты. Хотя та же доза EGF улучшает преимплантационное развитие эмбрионов *in vitro* и в частности способствует хэтчингу у золотистых хомячков (Seshagiri et al., 2002), этот фактор роста, который использовался в настоящем исследовании, существенно не увеличивал скорость образования бластоцисты у джунгарского хомячка. Это расхождение наших наблюдений с предыдущими результатами можно объяснить видоспецифичностью как джунгарского хомячка принадлежащего роду *Phodopus*, так и золотистого хомячка рода *Mesocricetus*.

Результаты настоящего исследования также показали, что на этапе дробления эмбрионов хомячка Кэмпбелла развивающихся *in vitro* на среде R1ECM некоторые из них достигали стадии бластоцисты. Следует отметить, что формирование бластоцисты у хомячков происходит уже на стадии 16-клеток после 4-го дробления (Reese et al., 2008).

Наши результаты показали, значительное ускорение развития эмбрионов *in vitro* у хомяков Кэмпбелла после добавки в культуральную среду GM-CSF: среднее число клеток у хомячка в бластоцисте было больше чем в два раза, а индекс фрагментация ядер значительно снизился после такого дополнения. Индекс фрагментации ядер, часто используется как мера целостности ядерной ДНК и эмбриональной жизнеспособности (Brison, Schultz, 1997; Grygoruk et al., 2011). Уменьшение гибели клеток и увеличение общего количества клеток в бластоцисте при культивировании *in vitro* в среде содержащей GM-CSF, свидетельствует о том, что данный фактор роста играет важную роль в развитии преимплантационных эмбрионов хомячка Кэмпбелла.

Роль некоторых факторов роста в развитии эмбрионов хомячков была изучена с эмбрионами сирийских хомячков. В частности, гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF) и фактор ингибирующий лейкемию (LIF) повышают хэтчинг бластоцисты (Seshagiri et al., 2002), и принимают участие в имплантации эмбрионов хомячков этого вида (Seshagiri et al., 2002; Wang et al., 2006). Тем не менее, наше исследование является первым, которое подтвердило последствия GM-CSF на развитие преимплантационных эмбрионов у хомячков рода *Phodopus*. Результаты нашего исследования подтверждают и расширяют предыдущие наблюдения на эмбрионах мышей (Robertson et al., 2001; Desai et al., 2007) и человека (Sjoblom et al., 1999), показывая, что GM-CSF положительно влияет на преимплантационные эмбрионы *in vitro* и улучшает их развитие в течение всего периода культивирования.

4.6. Трансплантация эмбрионов видов *Cricetinae*

Впервые на хомячках рода *Phodopus* удалось провести успешную трансплантацию эмбрионов (причем после криоконсервации и культивирования *in vitro*). Удалось получить живое потомство как после трансплантации эмбрионов джунгарского хомячка, так и после трансплантации эмбрионов хомячка Кэмпбелла. В данной работе, впервые на грызунах, и второй раз в мировой практике после работы С.Я. Амстиславского на куньих (Amstislavsky et al., 2006), удалось показать, что межвидовые гибриды являются адекватными 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.

Успех трансплантации во многом был обусловлен адекватным выбором реципиентов. При трансплантации эмбрионов, вообще, большое значение имеет выбор подходящего реципиента. Так в работах на мышях 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).

Рождение четырёх щенков после трансплантации шести замороженных-оттаяных эмбрионов джунгарского хомячка было окончательным доказательством их жизнеспособности после криоконсервации. Хотя один щенок умер вскоре после рождения, три остальные выжили. Эти данные подтверждают предыдущие результаты С.Я. Амстиславского на куньих, когда межвидовые гибриды F1 между хорьками и европейскими норками были успешно использованы в качестве реципиентов для трансплантации эмбрионов, как хорька, так и европейской норки, что считалось перспективным инструментом для сохранения редких видов (Amstislavsky et al., 2006). Текущие результаты с хомячками, описанные здесь, доказывают возможность расширения этого подхода для других родов млекопитающих, а не только куньих.

До нашего исследования трансплантация эмбрионов хомячков была сделана только на золотистых хомячках (*Mes. auratus*) (Seshagiri, Bavister, 1990; Ain, Seshagiri, 1997). Мы сообщаем о первой в мире успешной трансплантации эмбрионов джунгарского хомячка. Аналогичный эксперимент был проведен и на *P. campbelli*. В случае с хомячками Кэмпбелла после трансплантации 5 эмбрионов, родилось 2 щенка.

Успех экспериментов по трансплантации эмбрионов, связан с принятием во внимание такого понятия как “окно имплантации” (Song et al., 2007). Согласно данным других исследователей окно имплантации совпадает с максимальной восприимчивостью матки (Paria et al., 1993). Развитие преимплантационных эмбрионов было изучено на золотистых (Sato, Yanagimachi, 1972), Кэмпбелла (Erb, Wyne-Edwards, 1993) и джунгарских (Murray, Messinger, 1994) хомячках. У всех этих видов хомячков эмбрионы были трансплантированы в матку на стадии морулы на 3 день pc для того чтобы они успели попасть в “окно имплантации”, поскольку имплантация происходит на стадии бластоцисты на 4 день pc (Sato, Yanagimachi, 1972; Erb, Wyne-Edwards, 1993; Murray, Messinger, 1994). Модель, используемая в данном исследовании, когда эмбрионы культивировали *in vitro* 24 часа, достигают стадии морулы и переносят в полость матки, хорошо вписывается в эти сроки; это объясняет относительно высокий процент успеха.

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 R1ЕСМ 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 ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амстиславский С.Я., Трукшин И.С. Криобанк эмбрионов млекопитающих: выбор приоритетов и оптимальных репродуктивных технологий // *Онтогенез*. 2010. № 1. С. 19–31.
2. Амстиславский С.Я. Репродуктивная биология и эмбриотехнология млекопитающих // LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrucken, Germany. 2011. 284 с.
3. Амстиславский С.Я., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н. и др. Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17. № 1. С. 147–161.
4. Амстиславский С.Я., Абрамова Т.О., Брусенцев Е.Ю., Кизилова Е.А. Криоконсервация и сохранение биоразнообразия // *Природа*. 2014. № 9. С. 24–33.
5. Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных // *Онтогенез*. 2015. Т. 46. № 2. С. 67–81.
6. Амстиславский С.Я., Кизилова Е.А., Брусенцев Е.Ю., Абрамова Т.О., Напримеров В.А. Криоконсервация эпидидимального семени хомячков джунгарского (*Phodopus sungorus*) и Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*, *Cricetinae*) // *Зоологический журнал*. 2016. Т. 95. № 5. С. 604–613.
7. Беляева Н.Ф., Каширцева В.Н., Медведева Н.В. и др. Зебрафиш как модель в биомедицинских исследованиях // *Биомедицинская химия*. 2010. Т. 56. № 1. С. 120–131.
8. Брусенцев Е.Ю., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011. Т. 15. № 1. С. 102–113.
9. Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Абрамова Т.О., Амстиславский С.Я. Криоконсервация эмбрионов джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) и влияние факторов роста на их последующее развитие // III ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными. Новосибирск, 2013. С. 13.
10. Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Традиционные и современные подходы к культивированию преимплантационных эмбрионов *in vitro* // *Онтогенез*. 2014а. Т. 45. № 2. С. 73–88.
11. Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н. и др. Поиск способов замораживания и оттаивания преимплантационных эмбрионов млекопитающих направленных на сохранения целостности их прозрачных оболочек // *Материалы международной заочной научно-практической конференции “Теоретические и практические аспекты современной криобиологии”*. 2014б. С. 247–248.
12. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Проблема сохранения генофонда // *Пушино: ОНТИ НЦБИ*

АН СССР. 1984. 47 с.

13. Воронцов Н.Н., Раджабли С.И., Ляпунова Е.А. Кариологическая дифференциация аллопатрических форм подвидов хомяков и гетероморфизм женских половых хромосом // ДАН. 1967. Т. 172. № 3. С. 703–705.

14. Евсиков В.И., Морозова Л.М. Роль генетико-физиологических взаимоотношений мать-потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости млекопитающих. I. Эмбриональное развитие мышей при межлинейных трансплантациях бластоцист // Генетика. 1977. Т. 13. С. 826–839.

15. Евсиков В.И., Морозова Л.М. Роль генетико-физиологических взаимоотношений мать-потомок в становлении жизнеспособности и плодовитости млекопитающих. II. Вес зародышей мышей линий BALB, CBA и DBA, развивающихся из пересаженных бластоцист // Генетика. 1978. Т. 14. С. 1264–1271.

16. Жмакин А.И. Физические основы криобиологии // Успехи физических наук. 2008. Т. 178. № 3. С. 243–266.

17. Иволгин Д.А., Смолянинов А.Б., Багаутдинов Ш.М. и др. Современные системы IT-мониторинга условий криогенного хранения биологического материала в банке пуповинной крови // Вестник Международной академии холода. 2013. № 1. С. 48–50.

18. Кизилова Е.А., Абрамова Т.О., Волков О.А., Масленникова С.О., Байбородин С.И., Амстиславский С.Я., Напримеров В.А. Криоконсервация эпидидимального семени у иглистой мыши (*Acomys kahirinus*) // Биофизика живой клетки. 2014. Т. 10. С. 97–99.

19. Мясенкова И.Ю. Лабораторная собака // Лабораторные животные. 1994. Т. 4. № 4. С. 234–246.

20. Осадчук Л.В., Тупикин А.Е., Морозов И.В., Клещев М.А., Бондарь А.А., Осадчук А.В. Фенотипическая вариабельность сперматогенеза и поиск ассоциаций с генным полиморфизмом у мышей 13 инбредных линий // Генетика. 2012. Т. 48. № 8. С. 966–975.

21. Погосянц Е.Е., Сокова О.И., Пригожина Е.Л. Новое животное для экспериментально-онкологических исследований – джунгарский хомячок // Вопросы онкологии. 1970. Т. 16. № 3. С. 90–98.

22. Пыльник Т.О., Редина О.Е., Смоленская С.Э. и др. Особенности экспрессии генов *Egf* и *Egfr* в ткани почки гипертензивных крыс линии НИСАГ (ISIAH) // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2012. Т. 98. С. 69–76.

23. Рагаева Д.С., Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н. и др. Криоконсервация и культивирование эмбрионов гипертензивных крыс НИСАГ: физиологические и поведенческие эффекты // III ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными. Новосибирск, 2013. С. 40.

24. Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий // Онтогенез. 2012. № 5. С. 1–11.
25. Стойка Р.С., Панчук Р.Р., Стойка Б.Р. Полипептидные факторы роста в процессах эмбрионального развития и опухолевого роста // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 4. С. 254–272.
26. Суров А.В., Феоктистова Н.Ю. Биология мохноногих хомячков и их использование в лабораторной практике // Биомедицина. 2006. № 2. С. 52–70.
27. Тихонов В.Н., Бобович В.Е. Генетика и приобретенные возможности использования супермелких мини-свиней для медико-биотехнологических целей // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 3. С. 600–609.
28. Феоктистова Н.Ю. Хомячки *Phodopus*. Систематика, филогеография, экология, физиология, поведение, химическая коммуникация. Москва: Товар. Науч. Изд. КМК; 2008. 411 с.
29. Феоктистова Н.Ю., Чернова О.Ф., Мещерский И.Г. Декоративные формы хомячков рода *Phodopus* (*Mammalia, Cricetinae*) – анализ распространения генетических линий и особенности изменения волосяного покрова // Журнал общей биологии. 2012. Т. 73. № 2. С. 138–154.
30. Чернов А.С., Давыдова Г.А., Ковалицкая Ю.А. Исследование неопиоидной рецепции β -эндорфина в доимплантационном развитии эмбрионов мыши *in vitro* // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. № 2. С. 206–213.
31. Честков В.В., Мартынов А.В., Калинина Е.С., Щепкина Ю.В. Питательные среды для ЭКО: сравнение роли основных компонент // Проблемы репродукции. 2010. № 3. С. 53–56.
32. Abbott A. Geneticists prepare for deluge of mutant mice // Nature. 2004. V. 432. P. 541.
33. Adams D.J., van der Weyden L. Contemporary approaches for modifying the mouse genome // Physiol. Genomics. 2008. V. 34. P. 225–238.
34. Adamson E.D. Activities of growth factors in preimplantation embryos // J. Cell Biochem. 1993. V. 53. № 4. P. 280–287.
35. Aflalo E.D., Sod-Moriah U.A., Potashnik G., Har-Vardi I. EGF increases expression and activity of PAs in preimplantation rat embryos and their implantation rate // Reprod. Biol. Endocrinol. 2007. 5:4.
36. Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals // Theriogenology. 2012. V. 78. P. 1653–1665.
37. Ain R., Seshagiri P.B. Succinate and malate improve development of hamster eight-cell embryos *in vitro*: confirmation of viability by embryo transfer // Mol. Reprod. Dev. 1997. V. 47. № 4. P. 440–447.

38. Amstislavsky S., Amstislavskaya T., Stein M. et al. Embryo cryobanking for conserving laboratory and wild animal species // *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. 1996. V. 23. P. 269–277.
39. Amstislavsky S., Lindeberg H., Jarvinen M. et al. Ex-situ preservation of Mustelidae: primer of application of genetic resource bank concept with the use of polecats as the model species // *Scientifur*. 2000. V. 24. P. 45–58.
40. Amstislavsky S., Kizilova E., Ternovskaya Y., Zudova G., Lindeberg H., Aalto J., Valtonen M. Embryo development and embryo transfer in the European mink (*Mustela lutreola*), an endangered mustelid species // *Reprod. Fertil. Dev.* 2006. V. 18. P. 459–467.
41. Amstislavsky S., Lindeberg H., Aalto J., Kennedy M. Conservation of the European mink (*Mustela lutreola*): focus on reproduction and reproductive technologies // *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V.43. P. 502–513.
42. Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in crnivora // *Reprod. Dom. Anim.* 2012. V. 47. P. 164–175.
43. Amstislavsky S., Brusentsev E., Rozhkova I., Igonina T. Cryopreservation of Campbell's dwarf hamster embryos as a model for exotic hamster species cryobanking // *Proceedings of 9th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife*. Ed.: Schumann A., Watcher B., Ortmann S., Hofer H. 18th-21th September 2013, Berlin, Germany, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research. P. 22.
44. Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al. Embryo cryopreservation and in vitro culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*) // *Theriogenology*. 2015. V. 83. P. 1056–1063.
45. Andrabi S.M., Maxwell W.M. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species // *Anim. Reprod. Sci.* 2007. V. 99. № 3. P. 223–243.
46. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos // *Theriogenology*. 2014. V. 81. № 1. P. 96–102.
47. Austgulen R., Arntzen K.J., Vatten L.J. et al. Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor- β) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in-vitro fertilization // *Hum. Reprod.* 1995. V. 10. № 1. P. 171–176.
48. Barnett D.K., Bavister B.D. Inhibitory effect of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos: is it linked to metabolism? // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. № 1. P. 177–183.
49. Bartness T.J., Elliott J.A., Goldman B.D. Control of torpor and body weight patterns by a seasonal timer in Siberian hamsters // *Am. J. Physiol.* 1989. V. 257. P. 142–149.
50. Bavister B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts // *Hum. Reprod. Update*. 1995. V. 1. № 2. P. 91–148.

51. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium // Biol. Reprod. 1983. V. 28. № 1. P. 235–247.
52. Behr B., Mooney S., Wen Y. et al. Preliminary experience with low concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a potential regulator in preimplantation mouse embryo development and apoptosis // J. Assist. Reprod. Genet. 2005. V. 22. № 1. P. 25–32.
53. Berghmans S., Butler P., Goldsmith P. et al. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function-potential safety screens for early drug discovery // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2008. V. 58. P. 59–68.
54. Berkovitz A., Eltes F., Yaari S. et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm // Hum. Reprod. 2005. V. 20. № 1. P. 185–190.
55. Biggers J.D., Whitten W.K., Whittingham D.G. The culture of mouse embryos *in vitro* // Methods in Mammalian Embryology. 1971. P. 86–116.
56. Bockamp E., Maringer M., Spangenberg C. et al. Of mice and models: improved animal models for biomedical research // Physiol. Genomics. 2002. V. 11. P. 115–132.
57. Boettcher P.J., Stella A., Pizzi F., Gandini G. The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources // Genet. Sel. Evol. 2005. V. 37. P. 657–675.
58. Bosch P., Hernandez-Fonseca H., Miller D. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. Theriogenology. 2004. V. 61. P. 581–594.
59. Bowman P., McLaren A. Viability and growth of mouse embryos after *in vitro* culture and fusion // J. Embryol. Exp. Morphol. 1970. V. 23. № 3. P. 693–704.
60. Brison D.R., Schultz R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha // Biol. Reprod. 1997. V. 56. № 5. P. 1088–1096.
61. Brison D.R., Leese H.J. Energy metabolism in late preimplantation rat embryos // J. Reprod. Fertil. 1991. V. 93. № 1. P. 245–251.
62. Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Abramova T.O. et al. Cryopreservation, *in vitro* culture and transfer of preimplantation embryos in Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) // Reprod. Dom. Anim. 2015. V. 50. P. 677–683.
63. Bwanga C.O. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review // Acta. Vet. Scand. 1991. V. 32. № 4. P. 431–453.
64. Calle A., Fernandez-Gonzalez R., Ramos-Ibeas P. et al. Long-term and transgenerational effects of *in vitro* culture on mouse embryos // Theriogenology. 2012. V. 77. № 4. P. 785–793.

65. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line // *Nature*. 1996. V. 380. P. 64–66.
66. Chen S.U., Chien C.L., Wu M.Y. et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. № 11. P. 2794–2800.
67. Choe C., Shin Y.W., Kim E.J. et al. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine // *J. Reprod. Dev.* 2010. V. 56. № 6. P. 575–582.
68. Chu W.M. Tumor necrosis factor // *Cancer Lett.* 2013. V. 328. № 2. P. 222–225.
69. Comizzoli P., Crosier A.E., Songsasen N. et al. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44. P. 47–52.
70. Cox S.L., Shaw J., Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice // *J. Reprod. Fertil.* 1996. V. 107. № 2. P. 315–322.
71. Cozzi J., Wang E., Jacquet C., Fraichard A., Cherifi Y., Zhou Q. Procedures for somatic cell nuclear transfer in the rat // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 597. P. 137–150.
72. Groschl M. The physiological role of hormones in saliva // *Bioessays*. 2009. V. 31. № 8. P. 843–852.
73. Dadi T.D., Li M.W., Lloyd K.C. EGF and TGF- α supplementation enhances development of cloned mouse embryos // *Cloning. Stem. Cells*. 2007. V. 9. № 3. P. 315–326.
74. Dardik A., Smith R.M., Schultz R.M. Colocalization of transforming growth factor- α and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst // *Dev. Biol.* 1992. V. 154. № 2. P. 396–409.
75. Dardik A., Schultz R.M. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulatory effect of TGF- α and EGF // *Development*. 1991. V. 113. № 3. P. 919–930.
76. Das S.K., Wang X.N., Paria B.C. et al. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation // *Development*. 1994. V. 120. № 5. P. 1071–1083.
77. Daughaday W.H., Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations // *Endocr. Rev.* 1989. V. 10. № 1. P. 68–91.
78. De Artinano A., Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome // *Br. J. Nutr.* 2009. V. 102. № 9. P. 1246–1253.
79. De Moraes A.A., Hansen P.J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes

development of *in vitro* produced bovine embryos // Biol. Reprod. 1997. V. 57. № 5. P. 1060–1065.

80. Desai N., Lawson J., Goldfarb J. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage // Hum. Reprod. 2000. V. 15. № 2. P. 410–418.

81. Desai N., Kattal N., AbdelHafez F.F. et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and co-culture can affect post-thaw development and apoptosis in cryopreserved embryos // J. Assist. Reprod. Genet. 2007. V. 24. № 6. P. 215–222.

82. Devroey P., Staessen C., Camus M. et al. Zygote intrafallopian transfer as a successful treatment for unexplained infertility // Fertil. Steril. 1989. V. 52. P. 246.

83. Diedrich V., Steinlechner S. Spontaneous Daily Torpor Versus Fasting-Induced Torpor in the Djundarian Hamster (*Phodopus sungorus*): Two Sides of a Medal or Distinct Phenomena? // Living in a Seasonal World. (Eds T. Ruf et al.,) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012. P. 231–242.

84. Diller K.R. Pioneers in Cryobiology: Julius von Sachs (1832–1897) // Cryo-Letters. 1996. V. 17. P. 201–212.

85. Dobrinsky J.R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future // Theriogenology. 2001. V. 56. № 8. P. 1333–1344.

86. Dobrinsky J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos // Theriogenology. 2002. V. 57. P. 285–302.

87. Dong J., Malsam J., Bischof J.C. et al. Spatial distribution of the state of water in frozen mammalian cells // Biophys. J. 2010. V. 99. № 8. P. 2453–2459.

88. Dorsch M., Wedekind D. Cryopreservation and orthotopic transplantation of rat ovaries // Methods Mol. Biol. 2010. V. 597. P. 301–310.

89. Driscoll C.A., Clutton-Brock J., Kitchener A.C., O'Brien S.J. The Taming of the cat. Genetic and archaeological findings hint that wildcats became housecats earlier – and in a different place – than previously thought // Sci. Am. 2009. V. 300. № 6. P. 68–75.

90. Dvorak B. Milk epidermal growth factor and gut protection // J. Pediatr. 2010. V. 156. № 2. S. 31–35.

91. Dunlison G.F., Barlow D.H., Sargent I.L. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium // Hum. Reprod. 1996. V. 11. № 1. P. 191–196.

92. Ecker D.J., Stein P., Xu Z. et al. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 6. P. 1595–1600.

93. Eden J.A., Jones J., Carter G.D., Alagband-Zadeh J. A comparison of follicular fluid levels of insulin-like growth factor-1 in normal dominant and cohort follicles, polycystic and multicystic ovaries // Clin. Endocrinol. (Oxf). 1988. V. 29. № 3. P. 327–336.

94. Ekker S.C. Zinc finger-based knockout punches for zebrafish genes // *Zebrafish*. 2008. V. 5. P. 121–123.
95. Elaimi A., Gardner K., Kistnareddy K., Harper J. The effect of GM-CSF on development and aneuploidy in murine blastocysts // *Hum. Reprod*. 2012. V. 27. № 6. P. 1590–1595.
96. Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramane J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts // *Hum. Reprod*. 2000. V. 4. P. 905–910.
97. Endres N.F., Engel K., Das R., Kovacs E., Kuriyan J. Regulation of the catalytic activity of the EGF receptor // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2011. V. 21. № 6. P. 777–784.
98. Erb G.E., Wynne-Edwards K.E. Preimplantation endocrinology in the Djungarian hamster (*Phodopus campbelli*): progesterone, estrogen, corpora lutea, and embryonic development // *Biol. Reprod*. 1993. V. 49. P. 822–830.
99. Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.A., Meryman H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation // *Cryobiology*. 1984. V. 21. P. 407–426.
100. Fassbender M., Hildebrandt T., Paris M. et al. Monitoring of xenografted cortex tissue using high resolution ultrasonography. *J. Reprod. Dev*. 2007. V. 53. P. 1023–1034.
101. Feoktistova N.Yu., Chernova O.F., Meshcherskii I.G. Decorative forms of hamsters of the genus *Phodopus* (*Mammalia, Cricetinae*): Analysis of genetic lines distribution and features of hair changes // *Biol. Bull. Rev*. 2013. V. 3. P. 57–72.
102. Fernandez-Gonzalez R., Moreira P., Bilbao A. et al. Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 16. P. 5880–5885.
103. Festing M. F.W., Baumans V., Combes R. D. et al. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions // *ATLA*. 1998. V. 26. P. 283–301.
104. Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species // *Eur. J. Wildl. Res*. 2007. V. 53. P. 81–89.
105. Filliers M., Rijsselaere T., Bossaert P., De Causmaecker V., Dewulf J., Pope C.E., Van Soom A. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 degrees C) on sperm quality // *Theriogenology*. 2008. V. 70. № 9. P. 1550–1559.
106. FIMRe Board of Directors. FIMRe: Federation of international mouse resources: global networking of resource centers // *Mammal. Genome*. 2006. V. 17. P. 363–364.
107. Fisher D.A., Salido E.C., Barajas L. Epidermal growth factor and the kidney // *Annu. Rev. Physiol*. 1989. V. 51. P. 67–80.
108. Fleming T.P., Kwong W.Y., Porter R. et al. The embryo and its future // *Biol. Reprod*. 2004. V. 71. № 4. P. 1046–1054.

109. Flint J., Eskin E. Genome-wide association studies in mice // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. P. 807–817.
110. Foote R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables // *J. Anim. Sci.* 2002. V.80. P. 1–10.
111. Frankham R. Genetics and conservation biology // *C. R. Biol.* 2003. V. 326. P. 22–29.
112. Galiguis J., Gomez M.C., Leibo S.P., Pope C.E. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized *in vitro* matured oocytes // *Cryobiology.* 2014. V. 68. № 3. P. 459–466.
113. Gardner D.K., Leese H.J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro* // *J. Reprod. Fertil.* 1990. V. 88. № 1. P. 361–368.
114. Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland R.P. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide // *J. Androl.* 1994. V. 15. № 6. P. 620–629.
115. Gasson J.C. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Blood.* 1991. V. 77. № 6. P. 1131–1145.
116. Gearing D.P., Gough N.M., King J.A., Hilton D.J., Nicola N.A., Simpson R.J., Nice E.C., Kelso A., Metcalf D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 13. P. 3995–4002.
117. Genbacev O., Joslin R., Damsky C.H. et al. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion *in vitro* and models the placental defects that occur in preeclampsia // *J. Clin. Invest.* 1996. V. 97. № 2. P. 540–550.
118. Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Influence of genetic dissimilarity of mother and fetus on progesterone concentrations in pregnant mice and adaptive features of offspring // *Reprod.* 2001. V. 121. P. 409–417.
119. Gerwin N., Jia G.Q., Kulbacki R., Gutierrez-Ramos J.C. Interleukin gene expression in mouse preimplantation development // *Dev. Immunol.* 1995. V. 4. № 3. P. 169–179.
120. Gilmour R.S., Prosser C.G., Fleet I.R., Cocco L., Saunders J.C., Brown K.D., Corps A.N. From animal to molecule: aspects of the biology of insulin-like growth factors // *Br. J. Cancer Suppl.* 1988. V. 9. P. 23–30.
121. Glenister P., Thornton C. Cryoconservation – archiving for the future // *Mammal. Genome.* 2000. V. 11. P. 565–571.
122. Gomes-Alves S., Alvarez M., Nicolas M., Lopez-Uruena E., Martínez-Rodríguez C., Borragan S., de Paz P., Anel L. Use of commercial extenders and alternatives to prevent sperm agglutination for cryopreservation of brown bear semen // *Theriogenology.* 2014. V. 82. № 3. P. 469–474.

123. Gondo Y., Fukumura R., Murata T., Makino S. Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics // *BMB Reports*. 2009. V. 42. P. 315–323.
124. Grace K.S., Sinclair K.D. Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking // *Semin. Reprod. Med.* 2009. V. 27. № 5. P. 409–416.
125. Graves J.E., Higdon H.L., Johnson J.E. et al. Longevity of donor serum // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2004. V. 21. № 2. P. 51–53.
126. Gregg J.K., Wynne-Edwards K.E. Placentophagia in native adults, new fathers, and new mothers in the biparental dwarf hamster, *Phodopus campbelli* // *Dev. Psychobiol.* 2005. V. 47. P. 179–188.
127. Gregg J.K., Wynne-Edwards K.E. In uniparental *Phodopus sungorus*, new mothers, and fathers present during the birth of their offspring, are the only hamsters that readily consume fresh placenta // *Dev. Psychobiol.* 2006. V. 48. P. 528–536.
128. Griffin B., Baker H.J. Domestic cats as laboratory animals // New York: Academic Press. 2002. Chapter 12 in *Laboratory Animal Medicine*. 2nd edition.
129. Groenen M.A., Archibald A.L., Uenishi H. et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution // *Nature*. 2012. V. 491. P. 393–398.
130. Grygoruk C., Sieczynski P., Modlinski J.A., Gajda B., Greda P., Grad I. et al. Pressure induced nucleus DNA fragmentation // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2011. V. 28. P. 363–368.
131. Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U. et al. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartmental biological system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 15. P. 7454–7459.
132. Hagedorn M., Lance S.L., Fonseca D.M., et al. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation // *Biol. Reprod.* 2002. V. 67. № 3. P. 961–966.
133. Hall R.J., Shenkin S.D., Maclulich A.M. A systematic literature review of cerebrospinal fluid biomarkers in delirium // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2011. V. 32. № 2. P. 79–93.
134. Han M.S., Niwa K. Effects of BSA and fetal bovine serum in culture medium on development of rat embryos // *J. Reprod. Dev.* 2003. V. 49. № 3. P. 235–242.
135. Han B., Bischof J.C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing // *Cryobiology*. 2004. V. 48. № 1. P. 8–21.
136. Hansen M., Bower C., Milne E. et al. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systematic review // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 2. P. 328–338.
137. Hardy K., Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo // *J. Endocrinol.* 2002. V. 172. № 2. P. 221–236.
138. Hare J.D., Morgan H.R. Studies on the factors essential to the initiation and maintenance of multiplication of psittacosis virus (6BC strain) in deficient cells in tissue culture // *J. Exp. Med.*

1954. V. 99. № 5. P. 461–479.

139. Hartwig A.C. Peripheral beta-endorphin and pain modulation // *Anesth. Prog.* 1991. V. 38. № 3. P. 75–78.

140. Harvey M.B., Kaye P.L. Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos // *Endocrinology.* 1988. V. 122. № 3. P. 1182–1184.

141. Harvey M.B., Kaye P.L. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts *in vitro* // *Development.* 1990. V. 110. № 3. P. 963–967.

142. Harvey M.B., Kaye P.L. IGF-2 stimulates growth and metabolism of early mouse embryos // *Mech. Dev.* 1992. V. 38. № 3. P. 169–173.

143. Hayashi M., Amino H., Kita K., Murase N. Cryopreservation of nematode *Caenorhabditis elegans* in the adult stage // *Cryo. Letters.* 2013. V. 34. № 4. P. 388–395.

144. Heldmaier G., Steinlechner S., Rafael J., Vsiansky P. Photoperiodic control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue // *Science.* 1981. V. 212. P. 917–919.

145. Herrick J.R., Bond J.B., Magarey G.M. et al. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of *in vitro* fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown *in vivo* // *Biol. Reprod.* 2007. V. 76. № 5. P. 858–870.

146. Herrler A., Krusche C.A., Beier H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis // *Biol. Reprod.* 1998. V. 59. № 6. P. 1302–1310.

147. Hidalgo M., Portero J.M., Demyda-Peyras S., Ortiz I., Dorado J. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time // *Vet. Rec.* 2014. V. 175. № 1. P. 20.

148. Hoffmann K. Photoperiod, pineal, melatonin and reproduction in hamsters // *Prog. Brain. Res.* 1979. V. 52. P. 397–415.

149. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome // *Nature.* 2013. V. 496. P. 498–503.

150. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology.* 2003. V. 46. № 3. P. 205–229.

151. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome // *Nature.* 2004. V. 431. P. 931–945.

152. Ivan A, Pacala N, Cean A, Caraba V. Practical methods to assess mammalian embryo quality – staining tests comparative study // *Animal Science and Biotechnologies.* 2011. V.44. P. 420–423.

153. Jacob H.J., Lazar J., Dwinell M.R. et al. Gene targeting in the rat: advances and opportunities // Trends Genet. 2010. V. 26. P. 510–518.
154. Jessmon P., Leach R.E., Armant D.R. Diverse functions of HBEGF during pregnancy // Mol. Reprod. Dev. 2009. V. 76. № 12. P. 1116–1127.
155. Jochem M., Korber C.H. Extended phase diagrams for the ternary solutions H₂O-NaCl-hydroxyethylstarch (HES) determined by DSC // Cryobiology. 1987. V. 24. P. 513–536.
156. Jones J.S., Wynne-Edwards K.E. Paternal hamsters mechanically assist the delivery, consume amniotic fluid and placenta, remove fetal membranes and provide parental care during the birth process // Horm. Behav. 2000. V. 37. P. 116–125.
157. Jones K.H., Senft J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide // J. Histochem. Cytochem. 1985. V. 33. P. 77–79.
158. Kimura Y., Yanagimachi R. Intracytoplasmic Sperm Injection in the Mouse// Biol. Reprod. 1995. V.52. P. 709–720.
159. Kane M.T., Bavister B.D. Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro* // Biol. Reprod. 1988. V. 39. № 5. P. 1137–1143.
160. Kasai M., Niwa K., Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos // J. Reprod. Fert. 1981. V. 3. P. 175–180.
161. Kasai M., Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification // Reprod. Biomed. Online. 2004. V. 9. № 2. P. 164–170.
162. Kawamura K., Chen Y., Shu Y., Cheng Y., Qiao J., Behr B., Pera R.A., Hsueh A.J. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth *in vitro* using autocrine/paracrine growth factors // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. e49328.
163. Kaye P.L., Bell K.L., Beebe L.F. et al. Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development // Reprod. Fertil. Dev. 1992. V. 4. № 4. P. 373–386.
164. Khosla S., Dean W., Reik W., Feil R. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype // Hum. Reprod. Update. 2001. V. 7. № 4. P. 419–427.
165. Kimura Y., Yanagimachi R. Intracytoplasmic Sperm Injection in the Mouse// Biol. Reprod. 1995. V.52. P. 709–720.
166. Landel C.P. Archiving mouse strains by cryopreservation // Lab. Anim. 2005. V. 34. № 4. P. 50–57.
167. Landel C.P. Cryopreservation of mouse gametes and embryos // Methods Enzymol. 2010. V. 476. P. 85–105.
168. Lane M., Gardner D.K. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro* // Hum. Reprod. 1992. V. 7. № 4. P. 558–562.

169. Lane M., Gardner D.K. Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by in situ enzymatic conversion to glutamate // *J. Exp. Zool.* 1995. V. 271. № 5. P. 356–363.
170. Lane M., Forest K.T., Lyons E.A., Bavister B.D. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique // *Theriogenology.* 1999. V. 51. P. 167.
171. Lane M., Gardner D.K. Embryo culture medium: which is the best? // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2007. V. 21. № 1. P. 83–100.
172. Larson R.C., Igotz G.G., Currie W.B. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle // *Development.* 1992. V. 115. № 3. P. 821–826.
173. Lavranos T.C., Rathjen P.D., Seamark R.F. Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos // *J. Reprod. Fertil.* 1995. V. 105. № 2. P. 331–338.
174. Leibo S. P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // *Theriogenology.* 2002. V. 57. № 1. P. 303–326.
175. Leese H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on // *Reproduction.* 2012. V. 143. № 4. P. 417–427.
176. Liard J.F., Cowley A.W.Jr., McCaa R.E., et al. Renin, aldosterone, body fluid volumes, and the baroreceptor reflex in the development and reversal of Goldblatt hypertension in conscious dogs // *Circ. Res.* 1974. V. 34. № 4. P. 549–560.
177. Liebermann J., Dietl J., Vanderzwalmen P., Tucker M.J. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? // *Reprod. Biomed. Online.* 2003. V. 7. P. 623–633.
178. Lim H.J., Dey S.K. HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation // *Exp. Cell. Res.* 2009. V. 315. № 4. P. 619–626.
179. Lindeberg H., Jalkanen L., Savolainen R. *In vitro* culture of silver fox embryos // *Theriogenology.* 1993. V. 40. № 4. P. 779–788.
180. Lindeberg H., Aalto J., Amstislavsky S. et al. Surgical recovery and successful surgical transfer of conventionally frozen-thawed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*) // *Theriogenology.* 2003. V. 60. P. 1515–1526.
181. Lonergan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Fair T., Boland M.P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies // *Reprod. Biomed. Online.* 2003. V. 7. № 6. P. 657–663.
182. Ludwig T.E., Squirrell J.M., Palmenberg A.C., Bavister B.D. Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate // *Biol. Reprod.* 2001. V. 65. № 6. P. 1648–1654.
183. Luvoni G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology.* 2006. V. 66. P. 101–111.

184. Luvoni G.C., Chigioni S., Beccaglia M. Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning // *Reprod. Domest. Anim.* 2006. V. 41. № 4. P. 286–290.
185. Luyet B.J. The vitrification of organic colloids and protoplasm // *Biodynamica*. 1937. № 29. P. 1–14.
186. MacPherson J.N., Feely J. Insulin // *BMJ*. 1990. V. 300. № 6726. P. 731–736.
187. Mahabir E., Bauer B., Schmidt J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world // *ILAR J.* 2008. V. 49. № 3. P. 347–355.
188. Martin K.L., Barlow D.H., Sargent I.L. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium // *Hum. Reprod.* 1998. V. 13. № 6. P. 1645–1652.
189. Mason B.A. Simple techniques past and present as an alternative to in-vitro fertilization and GIFT // *British Medical Bulletin*. 1990. V. 46. № 3. P. 783–795.
190. Matson P.L., Graefling J., Junk S.M. et al. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme // *Hum. Reprod.* 1997. V. 12. № 7. P. 1550–1553.
191. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems // *Science*. 1970. V. 168. № 3934. P. 939–949.
192. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell Biophys.* 1990. V. 17. № 1. P. 53–92.
193. Mazur P., Leibo S. P., Seidel G. E. Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions // *Biol. Reprod.* 2008. V. 78. № 1. P. 2–12.
194. McEvoy T.G., Robinson J.J., Sinclair K.D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals // *Reproduction*. 2001. V. 122. № 4. P. 507–518.
195. McGann L.E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents // *Cryobiology*. 1978. V. 15. № 4. P. 382–390.
196. McKiernan S.H., Bavister B.D. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage // *Biol. Reprod.* 1990. V. 43. № 3. P. 404–413.
197. McLaren A., Biggers J.D. Successful development and birth of mice cultivated *in vitro* as early as early embryos // *Nature*. 1958. V. 182. № 4639. P. 877–878.
198. Men H., Zhao C., Si W. et al. Birth of piglets from *in vitro*-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system // *Theriogenology*. 2011. V. 76. P. 280–289.
199. Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors // *Blood*. 1986. V. 67. № 2. P. 257–267.
200. Miyata K., Yotsumoto F., Nam S.O., Kuroki M., Miyamoto S. Regulatory mechanisms of the HB-EGF autocrine loop in inflammation, homeostasis, development and cancer // *Anticancer*

Res. 2012. V. 32. № 6. P. 2347–2352.

201. Miyoshi K., Abeydeera L.R., Okuda K., Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos // *J. Reprod. Fertil.* 1995. V. 103. № 1. P. 27–32.

202. Miyoshi K., Kono T., Niwa K. Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization *in vivo* and *in vitro* // *Biol. Reprod.* 1997. V. 56. № 1. P. 180–185.

203. Mobraaten L. Mouse Embryo Cryobanking // *J. of in vitro Fertilization and Embryo Transfer.* 1986. V. 3. P. 28–32.

204. Mohr L.R., Trounson A.O. Cryopreservation of human embryos // *Ann NY Acad. Sci.* 1985. V. 442. P. 536–543.

205. Mohr L., Trounson A. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse // *J. Reprod. Fert.* 1980. V. 58. P. 189–196.

206. Molinia F.C., Evans G., Maxwell W. M. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa // *Theriogenology.* 1994. V. 42. P. 849–858.

207. Moore K., Bonilla A.Q. Cryopreservation of mammalian embryos: the state of the art // *ARBS Annu. Rev. Biomed. Sci.* 2006. V. 8. P. 19–32.

208. Morgan J.F., Morton H.J., Parker R.C. Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950. V. 73. № 1. P. 1–8.

209. Mori S., Choi J., Devireddy R.V., Bischof J.C. Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions // *Cryobiology.* 2012. V. 65. P. 242–255.

210. Morita Y., Tsutsumi O., Taketani Y. *In vitro* treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994. V. 171. № 2. P. 406–409.

211. Morris J.P., Berghmans S., Zahrieh D. et al. Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide // *Biotechniques.* 2003. V. 35. P. 956–958.

212. Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome // *Nature.* 2002. V. 420. P. 520–562.

213. Mullen S.F., Critser J.K. The science of cryobiology // *Cancer Treat Res.* 2007. V. 138. P. 83–109.

214. Murray M.K., Messinger S.M. Early embryonic development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is accompanied by alterations in the distribution and intensity of an estrogen (E2)-dependent oviduct glycoprotein in the blastomere membrane and zona pellucida and in its association with F-actin1 // *Biology of Reproduction.* 1994. V. 51. P. 1126–1139.

215. Nakagata N. Production of normal young following insemination of frozen-thawed mouse spermatozoa into Fallopian tubes of pseudopregnant females // *Exp. Anim.* 1992. V. 41. P. 519–522.
216. Nakagata N. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization between cryopreserved gametes // *J. Reprod. Fertil.* 1993. V. 99. № 1. P. 77–80.
217. Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa // *Mamm. Genome.* 2000. V. 11. P. 572–576.
218. Nakano K., Matsunari H., Nakayama N. et al. Cloned porcine embryos can maintain developmental ability after cryopreservation at the morula stage // *J. Reprod. Dev.* 2011. V. 57. P. 312–316.
219. Nichols J., Davidson D., Taga T., Yoshida K., Chambers I., Smith A. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis // *Mech. Dev.* 1996. V. 57. № 2. P. 123–131.
220. Nieder G.L., Caprio T.L. Early embryo development in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) // *Mol. Reprod. Dev.* 1990. V. 27. P. 224–229.
221. NISC Comparative Sequencing Program. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome // *Genome Res.* 2007. V. 17. № 11. P. 1675–1689.
222. Nishizono H., Shioda M., Takeo T., Irie T., Nakagata N. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. № 3. P. 973–978.
223. Niwa K., Imai H., Kim C. I., Iritani A. Fertilization *in vitro* of hamster and mouse eggs in a chemically defined medium // *J. Reprod. Fertil.* 1980. V. 58. № 1. P. 109–114.
224. Noyes N., Boldt J., Nagy Z.P. Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010. V. 27. P. 69–74.
225. Okotrub K.A., Surovtsev N.V. Raman scattering evidence of hydrohalite formation on frozen yeast cells // *Cryobiology.* 2013. V. 66. P. 47–51.
226. Palermo G., Joris H., Devroey P. et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte // *Lancet.* 1992. V. 340. P. 17–18.
227. Pampfer S., Vanderheyden I., McCracken J. et al. Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor- α *in vitro* // *Development.* 1997. V. 124. P. 4827–4836.
228. Paria B.C., Dey S.K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 12. P. 4756–4760.
229. Parkening T.A., Cisneros P.L. Fertilization of Chinese hamster ova *in vitro* and *in vivo* and their subsequent development in culture // *Biol. Reprod.* 1988. V. 39. № 2. P. 409–418.

230. Pedro P.B., Yokoyama E., Zhu S.E. et al. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants // *J. Reprod. Dev.* 2005. V. 51. P. 235–246.
231. Pfaff R.T., Agca Y., Liu J., Woods E.J., Peter A.T., Critser J.K. Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients for water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods // *Biol. Reprod.* 2000. V. 63. P. 1294–1302.
232. Pinto Y.M., Paul M., Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering // *Cardiovasc. Res.* 1998. V. 39. № 1. P. 77–88.
233. Pringsheim E.G. Julius Sachs: Founder of Modern Plant Physiology, 1832–1897. Verlag von Gustav Fischer. Jena. 1932.
234. Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed *in vitro* // *Genes.* 2011. № 2. P. 332–344.
235. Rall W.F., Mazur P., McGrath J.J. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide // *Biophys. J.* 1983. V. 41. № 1. P. 1–12.
236. Rall W.F., Fahy G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 degrees C by vitrification // *Nature.* 1985. V. 313. P. 573–575.
237. Rall W.F., Schmidt P.M., Lin X. et al. Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models // *ILAR J.* 2000. V. 41. P. 221–227.
238. Rappolee D.A., Sturm K.S., Behrendtsen O. et al. Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos // *Genes. Dev.* 1992. V. 6. № 6. P. 939–952.
239. Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution // *Nature.* 2004. V. 428. P. 493–521.
240. Reese J., Wang H., Ding T., Paria B.C. The hamster as a model for embryo implantation // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008. V. 19. P. 194–203.
241. Renard J.P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant // *J. Exp. Zool.* 1984. V. 230. P. 443–448.
242. Ridha M.T., Dukelow W.R. The developmental potential of frozen-thawed hamster preimplantation embryos following embryo transfer: viability of slowly frozen embryos following slow and rapid thawing // *Animal Reproduction Science.* 1985. V. 9. P. 253–259.
243. Roberts A.B., Thompson N.L., Heine U., Flanders C., Sporn M.B. Transforming growth factor-beta: possible roles in carcinogenesis // *Br. J. Cancer.* 1988. V. 57. № 6. P. 594–600.
244. Robertson S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007. V. 18. № 3. P. 287–298.

245. Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos // *Biol. Reprod.* 2001. V. 64. № 4. P. 1206–1215.
246. Robles V, Cabrita E, Herraes M.P. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species // *Zebrafish.* 2009. V. 6. P. 281–293.
247. Ross P.D. *Phodopus campbelli* // *Am. Soc. Mammol. Mammalian Species.* 1995. V. 503. P. 1–7.
248. Roos A., Liljander M., Forslid A., Mattsson R. Protocol for Providing Additional Pseudo-Pregnant Recipient Mice for Embryo Transfer and Intra-Uterine Insemination by Plugging in the Middle of the Day // *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 2008. V. 35. P. 305–310.
249. Sachs J. Crystal Formation during Freezing and Alteration of the Cell Membrane during Thawing of Juicy Plant Sections // *Berichte uber die Verhandlungen der koniglich sachsichen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. Mathematisch-Physische Classe.* 1860. V. 12. P. 1–50.
250. Sandin S, Nygren K.G., Iliadou A. et al. Autism and mental retardation among offspring born after *in vitro* fertilization // *JAMA.* 2013. V. 310 № 1. P. 75–84.
251. Santos M. J., Gámiz P., Albert C. et al. Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles // *Fertil. Steril.* 2013. V. 100. № 2. P. 402–407.
252. Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // *Reproduction.* 2011. V. 141. № 1. P. 1–19.
253. Sato A., Yanagimachi R. Transplantation of preimplantation hamster embryos // *J. Reprod. Fertil.* 1972. V. 30. № 2. P. 329–332.
254. Sato M., Nagashima A., Watanabe T., Kimura M. Comparison of Intrabursal Transfer of Spermatozoa, A New Method for Artificial Insemination in Mice, with Intraoviductal Transfer of Spermatozoa // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2002. V. 19. P. 523–530.
255. Schini S.A., Bavister B.D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose // *Biol. Reprod.* 1988. V. 39. № 5. P. 1183–1192.
256. Seita Y., Fujiwara K., Takizawa A. et al. Full-term development of rats from oocytes fertilized *in vitro* using cryopreserved ejaculated sperm // *Cryobiology.* 2011. V. 63. P. 7–11.
257. Seok J., Warren H.S., Cuenca A.G. et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. V. 110. № 9. P. 3507–3512.
258. Seshacharyulu P., Ponnusamy M.P., Haridas D., Jain M., Ganti A.K., Batra S.K. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2012. V. 16. № 1. P. 15–31.
259. Seshagiri P.B., Bavister B.D. Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro* // *Biol. Reprod.* 1989. V. 40. № 3. P. 607–614.

260. Seshagiri P.B., Bavister B.D. Assessment of hamster blastocysts derived from eight-cell embryos cultured in hamster embryo culture medium-2 (HECM-2): cell numbers and viability following embryo transfer // *J. In Vitro Fert. Embryo. Transf.* 1990. V. 7. № 5. P. 229–235.
261. Seshagiri P.B., Mishra A., Ramesh G., Rao R.P. Regulation of peri-attachment embryo development in the golden hamster: role of growth factors // *J. Reprod. Immunol.* 2002. V. 53. № 1–2. P. 203–213.
262. Shek W.R. Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents // *ILAR J.* 2008. V. 49. № 3. P. 316–325.
263. Sherman J.K. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying // *Fertil. Steril.* 1963. V. 14. P. 49–64.
264. Siemieniuch M.J., Woclawek-Potocka I. Assessment of selected quality parameters of epididymal cat (*Felis catus s. domestica*, L. 1758) sperm using flow cytometry method and computer assisted sperm analyser // *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V. 43. № 5. P. 633–637.
265. Singh M., Chaudhry P., Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors // *J. Endocrinol.* 2011. V. 210. № 1. P. 5–14.
266. Sjöblom C., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro* // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 12. P. 3069–3076.
267. Sjöblom C., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos // *Biol. Reprod.* 2002. V. 67. № 6. P. 1817–1823.
268. Sjöblom C., Roberts C.T., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis // *Endocrinology.* 2005. V. 146. № 5. P. 2142–2153.
269. Smith G.D., Takayama S., Swain J.E. Rethinking *in vitro* embryo culture: new developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies // *Biol. Reprod.* 2012. V. 86. № 3. P. 1–10.
270. Snow M., Cox S.L., Jenkin G. et al. Generation of live young from xenografted mouse ovaries // *Science.* 2002. V. 297. № 5590. P. 2227.
271. Song H., Han K., Lim H. Progesterone supplementation extends uterine receptivity for blastocyst implantation in mice // *Reproduction.* 2007. V. 133. P. 487–493.
272. Spindler R.E., Wildt D.E. Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture // *Biol. Reprod.* 2002. V. 66. № 1. P. 167–173.

273. Spindler R.E., Crichton E.G., Agca Y. et al. Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions // *Theriogenology*. 2006. V. 66. № 1. P. 82–92.
274. Sporn M.B., Roberts A.B. TGF-beta: problems and prospects // *Cell Regul.* 1990. V. 1. № 12. P. 875–882.
275. Steiman R.P., Taymor M.L. Artificial insemination homologous and its role in the management of infertility // *Fertil. Steril.* 1977. V. 28. №2. P. 146–150.
276. Steinlechner S. Djungarian hamster and/or Siberian hamster: who is who? // *European Pineal. Society NEWS*. 1998. V. 38. P. 7–11.
277. Steinlechner S., Stieglitz A., Ruf T. Djungarian hamsters: a species with a labile circadian pacemaker? Arrhythmicity under a light-dark cycle induced by short light pulses // *J. Biol. Rhythms*. 2002. V. 17. P. 248–258.
278. Steptoe P.C., Edwards R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo // *Lancet*. 1978. V. 312. P. 366.
279. Sugimura S., Akai T., Somfai T. et al. Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos // *Biol. Reprod.* 2010. V. 83. № 6. P. 970–978.
280. Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y. et al. Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 5. P. 1–12.
281. Summers M.C., Biggers J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues // *Hum. Reprod. Update*. 2003. V. 9. № 6. P. 557–582.
282. Taft R.A. Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system // *Theriogenology*. 2008. V. 69. № 1. P. 10–16.
283. Taka M., Iwayama H., Fukui Y. Effect of the well of the well (WOW) system on *in vitro* culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection // *J. Reprod. Dev.* 2005. V. 51. № 4. P. 533–537.
284. Takeshima T., Nakagata N., Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa // *Jikken Dobutsu*. 1991. V. 40. P. 493–497.
285. Tanida S., Kataoka H., Mizoshita T., Shimura T., Kamiya T., Joh T. Intranuclear translocation signaling of HB-EGF carboxy-terminal fragment and mucosal defense through cell proliferation and migration in digestive tracts // *Digestion*. 2010. V. 82. № 3. P. 145–149.
286. The Canine Genome Sequencing Project. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog // *Nature*. 2005. V. 438. P. 803–819.
287. Thomassen R., Farstad W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation // *Theriogenology*. 2009. V. 71. P. 190–199.

288. Thouas G.A., Jones G.M., Trounson A.O. The “GO” system – a novel method of microculture for *in vitro* development of mouse zygotes to the blastocyst stage // *Reproduction*. 2003. V. 126. № 2. P. 161–169.
289. Tkachenko O.Y., Delimitreva S., Isachenko E. et al. Epidermal growth factor effects on marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocyte *in vitro* maturation, IVF and embryo development are altered by gonadotrophin concentration during oocyte maturation // *Hum. Reprod*. 2010. V. 25. № 8. P. 2047–2058.
290. Tsai S., Rawson D.M., Zhang T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling // *Theriogenology*. 2009. V. 71. P. 1226–1233.
291. Tsai S., Rawson D.M., Zhang T. Development of *in vitro* culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies // *Theriogenology*. 2010. V. 74. P. 290–303.
292. Turnbull A.V., Rivier C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action // *Physiol. Rev*. 1999. V. 79. № 1. P. 1–71.
293. Vajta G., Nagy Z.P., Cobo A. et al. Vitricification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion // *Reprod. Biomed. Online*. 2009. V. 19. № 3. P. 1–7.
294. Vajta G., Peura T.T., Holm P. et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system // *Mol. Reprod. Dev*. 2000. V. 55. № 3. P. 256–264.
295. Vajta G., Korösi T., Du Y. et al. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development // *Reprod. Biomed. Online*. 2008. V. 17. № 1. P. 73–81.
296. Varendijk A.J., Janssen J.A. Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor // *Endocr. Relat. Cancer*. 2012. V. 19. № 5. P. 63–75.
297. Veeck L.L., Wortham J.W.Jr, Witmyer J. et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization // *Fertility and Sterility*. 1983. V. 39. № 5. P. 594–602.
298. Vella E.T., Evans C.C., Ng M.W., Wynne-Edwards K.E. Ontogeny of the transition from killer to caregiver in dwarf hamsters (*Phodopus campbelli*) with biparental care // *Dev. Psychobiol*. 2005. V. 46. P. 75–85.
299. Villa-Diaz L.G., Nandivada H., Ding J. et al. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol*. 2010. V. 28. № 6. P. 581–583.
300. Wales R.G. Maturation of the mammalian embryo: biochemical aspects // *Biol. Reprod*. 1975. V. 12. № 1. P. 66–81.
301. Wang X., Wang H., Matsumoto H., Roy S.K., Das S.K., Paria B.C. Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster // *Annu. Rev. Biomed. Sci*. 2006. V. 8. P. 19–32.

302. Wang N., Geng L., Zhang S., He B., Wang J. Expression of PRB, FKBP52 and HB-EGF relating with ultrasonic evaluation of endometrial receptivity // PLoS One. 2012. V. 7. № 3. e34010.
303. Watkins A.J., Fleming T.P. Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter // J. Anat. 2009. V. 215. № 1. P. 52–59.
304. Willadsen S.M. Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing // Ciba. Found. Symp. 1977. № 52. P. 175–201.
305. Wilson D.E., Reeder D. Mammal species of the world // A taxonomic and geographic reference. Third edition. 2005. Baltimore: The J. Hopkins University Press 2.
306. Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to –196 degrees and –269 degrees C // Science. 1972. V. 178. P. 411–414.
307. Whyte J.J., Prather R.S. Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture // Mol. Reprod. Dev. 2011. V. 78. P. 879–891.
308. Wolfe H.G. Artificial insemination of the laboratory mouse (*Mus musculus*) // Lab. Anim. Care. 1967. V. 17. P. 426–432.
309. Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring // Tissue Eng. 2006. V. 12. № 10. P. 2739–2746.
310. Yang H., Tiersch T.R. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka, and *Xiphophorus* // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2009. V. 149. P. 224–232.
311. Yoshiki A., Ike F., Mekada K. et al. The mouse resources at the RIKEN BioResource center // Exp. Anim. 2009. V. 58. № 2. P. 85–96.
312. Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep // Rev. Reprod. 1998. V. 3. № 3. P. 155–163.
313. Yuan S., Diller K.R. An optical differential scanning calorimeter cryomicroscope // J. Microsc. 2005. V. 218. P. 85–93.
314. Zambelli D., Cunto M. Transcervical artificial insemination in the cat // Theriogenology. 2005. V. 64. P. 698–705.
315. Zhang X., Armstrong D.T. Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo* // Biol. Reprod. 1990. V. 42. № 4. P. 662–668.
316. Zhang T., Kawson D.M., Morris G.J. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish // Aquar. Living Resour. 1993. V. 6. P. 145–153.
317. Zhang W., Yi K., Yan H., Zhou X. Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos // Anim. Reprod. Sci. 2012. V. 132. № 3-4. P. 115–122.
318. Zhou Y., Galat V., Garton R. et al. Two-phase chemically defined culture system for preimplantation rat embryos // Genesis. 2003. V. 36. № 3. P. 129–133.

319. Ziebe S., Loft A., Povlsen B.B. et al. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization // Fertil. Steril. 2013. V. 99. P. 1600–1609.