

УДК 577.95;575;592/599

КРИБАНК ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ВЫБОР ПРИОРИТЕТОВ И ОПТИМАЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ¹

© 2010 г. С. Я. Амстиславский, И. С. Трукшин*

*Институт цитологии и генетики СО РАН
630090 Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д. 10*

** ООО “Криогентех”*

195030 Санкт-Петербург, ул. Химиков, д. 28

E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.03.09 г.

Окончательный вариант получен 02.07.09 г.

Обзор посвящен использованию криобанков эмбрионов для сохранения и консервации линий, пород и видов животных. Рассмотрены современные достижения по отношению к основным группам лабораторных и сельскохозяйственных животных. Рассматриваются альтернативные подходы к решению проблем, возникающих при создании криобанков, и обосновываются приоритеты. Особое внимание уделено обсуждению роли криобанков и сопутствующих репродуктивных технологий в программах сохранения генетических ресурсов диких и исчезающих видов млекопитающих.

Ключевые слова: криобанк эмбрионов, сохранение генетических ресурсов, млекопитающие, репродуктивные технологии.

Метод трансплантации эмбрионов был впервые применен с исследовательскими целями британским зоологом Уолтером Хипом на кроликах в конце XIX в. (Неар, 1891). Этот год можно считать годом рождения эмбриотехнологии. Чуть позже была показана возможность вызывать суперовуляцию у разных видов животных путем воздействия на них гонадотропными препаратами (Cole, Hart, 1930). В 1972 г. было сделано открытие, положившее начало “эре криобанков эмбрионов”. Была разработана технологичная криоконсервация эмбрионов млекопитающих с помощью жидкого азота (Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972). Эти так называемые “репродуктивные технологии первого поколения” уже позволяли в своей совокупности успешно решать задачи сохранения генофонда линий и пород многих видов лабораторных и сельскохозяйственных животных. В последние два десятилетия имели место многочисленные попытки применения этого подхода и по отношению к исчезающим и диким видам млекопитающих, а история применения этих методов к человеку тоже насчитывает более четверти века (Trounson, Mohr, 1983). Публикация представляет собой краткий обзор приоритетных направлений создания криобанков преимплантационных эмбрионов для сохранения и обмена генетическими ресурсами млекопитающих, условно подразделяемых на лабораторных, домашних и диких животных.

Особое внимание уделено современному состоянию научно-технологических разработок в области криоконсервации этих объектов и ключевых репродуктивных технологий, формирующих современный “генетический банк”.

СОЦИАЛЬНЫЙ ЗАКАЗ НА КРИБАНКИ КАК РЕАКЦИЯ НА ВОЗРАСТАНИЕ ЧИСЛА ЛИНИЙ МЫШЕЙ

В настоящее время в мире уже имеется более десяти тысяч линий мышей (FIMRe ..., 2006) и более тысячи линий крыс (Lasar et al., 2005). Мышь является удобным объектом для применения технологии трансгенеза, а в результате создания линий стволовых клеток мыши (Saito et al., 2004) отпала необходимость в многолетней селекционной работе, поэтому новые линии мышей появляются особенно быстро (Abbott, 2004). В конечном счете причиной резкого увеличения числа линий мышей является возрастание спроса на новые модели/трансгенные линии. Поскольку геном мыши был расшифрован уже в 2002 г. (Waterston et al., 2002), это создало предпосылки для успешного использования мышей в экспериментах по моделированию различного рода патологий человека и поиску лекарственных средств для борьбы с ними.

По прогнозам экспертов, в ближайшие 20 лет общее число линий мышей достигнет трехсот тысяч (Abbott, 2004). В связи с этим есть потребность перевода этих линий в более компактное состояние, а

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-00147).

именно перемещение большинства линий в криобанки (FIMRe ..., 2006). В Джексонской лаборатории (США), в которой поддерживается самая крупная в мире коллекция линий мышей, общее число сохраняемых генотипов составляет более трех тысяч. Характерно, что около двух с половиной тысяч из них поддерживаются исключительно в виде криобанки эмбрионов и/или семени. Лишь восемьсот наиболее востребованных линий поддерживаются в виде живой коллекции, однако и они имеют архив в криобанке. История создания этого крупнейшего архива и современное его состояние отражены в соответствующих публикациях его создателей (Mobraaten, 1986; Landel, 2005).

Осознание того факта, что криобанки являются ключевыми структурами современных генетических центров в условиях стремительного возрастания числа линий мышей, привело к созданию международной сети мышинных ресурсов, в которую входят 17 генетических центров, имеющих криобанки (FIMRe ..., 2006).

КРИБАНКИ ВИДОВ ПАРНОКОПЫТНЫХ: КОРОВ, ОВЕЦ, КОЗ, СВИНЕЙ

Подотряд жвачные

К жвачным относятся такие важные сельскохозяйственные животные, как крупный рогатый скот, овцы, козы. Процедуры криоконсервации и трансплантации эмбрионов для представителей этой группы хорошо отработаны (Massip, 2001; Dobrinsky, 2002), более детально об этом см. ниже. Следует, однако, подчеркнуть, что каждый из перечисленных видов животных имеет свою репродуктивную специфику. Для крупного рогатого скота, овец и коз хорошо отработаны репродуктивные технологии как первого поколения, связанные с получением эмбрионов *in vivo*, так и второго и третьего поколений, связанные соответственно с получением эмбрионов *in vitro* и введением генетического материала в яйцеклетку или зиготу (трансгенез, клонирование и др.) (Wilmut et al., 1997; Galli, Lazzari, 2008). Вместе с хорошо отработанными процедурами замораживания/оттаивания эмбрионов эти репродуктивные технологии создают возможность гибкого и адекватного использования такого инструмента, как “генетический банк”, по отношению не только к этим сельскохозяйственным объектам, но и к их диким сородичам (Ptak et al., 2002; Dixon et al., 2007).

Крупный рогатый скот. Уже через год после того, как была показана возможность криоконсервации зародышей мышей, этот же подход был успешно применен и к зародышам крупного рогатого скота (Wilmut, Rowson, 1973). Следует отметить, что в наше время трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота представляет собой наиболее мощную индустрию в сельскохозяйственной эмбриотехнологии, и криобанки занимают в этой технологии

важное, если не ключевое, место. По данным Международного общества по трансплантации эмбрионов (International Embryo Transfer Society, IETS) во всем мире в год трансплантируют около пятисот тысяч эмбрионов крупного рогатого скота, причем около 50% после процедур криоконсервации (Thibier, 2002, 2004). В 2003 г. лишь в Канаде в результате трансплантации эмбрионов (как свежих, так и после криоконсервации) было рождено двенадцать тысяч телят (Betteridge, 2006). Поскольку число трансплантируемых ежегодно эмбрионов, прошедших криоконсервацию, превышает двести тысяч, то можно сделать вывод о том, что замораживание и криоконсервация эмбрионов заняли прочное место в арсенале эмбриотехнологических методов, применяемых на крупном рогатом скоте.

Прогресс в деле создания криобанков эмбрионов крупного рогатого скота существенно ускорился после того, как были разработаны нехирургические методы извлечения и трансплантации эмбрионов. Вначале применяли как хирургические, так и нехирургические методы (Umbaugh, 1951; Rowson et al., 1969). Благодаря исследованиям, начатым в Кембридже под руководством Тима Роусона, последние со временем стали доминировать для крупного рогатого скота, а также для буйволов и бизонов в силу их меньшей травматичности. Усовершенствование обоих подходов привело к тому, что эффективность процедуры при трансплантации свежих эмбрионов составляет в настоящее время 60–80% (Hasler, 2001). Результат трансплантации эмбрионов после криоконсервации существенным образом зависит от выбранного способа замораживания/оттаивания, стадии развития зародышей, подвергавшихся криоконсервации, квалификации персонала и т.д. Тем не менее если рассматривать результаты полевых исследований, имеющих достаточно репрезентативные выборки, то обычно эффективность процедуры трансплантации эмбрионов после криоконсервации у крупного скота составляет примерно 50%, причем этот показатель обычно выдерживается как после традиционного программно замораживания, так и после витрификации (van Wagten donk et al., 1997; Nibart, Humblot, 1997).

Следует отметить, что, хотя и на несколько десятилетий позже по сравнению с криоконсервацией семени, криоконсервация эмбрионов крупного рогатого скота стала весьма рутинной процедурой, причем в солидных центрах при достаточно представительной выборке доноров и реципиентов результат вполне надежен и предсказуем (Dobrinsky, 2002).

Мы не имеем возможности подробно рассмотреть другие достижения репродуктивной технологии последних двух десятилетий по отношению к крупному рогатому скоту – такие как неинвазивное извлечение ооцитов, созревание ооцитов в условиях *in vitro*, экстракорпоральное оплодотворение. Все это, а также новые аспекты культивирования эмбри-

онов и клонирования хорошо описано в литературе (Hansen, Block, 2004; Galli, Lazzari, 2008). В подавляющем большинстве случаев развитие этих новых направлений требует для своего осуществления наличия криобанка эмбрионов и семени, лишь в этом случае они становятся технологичными и могут быть применены в полевых условиях.

Овцы и козы. Эта группа животных стоит на втором месте после крупного рогатого скота по значению для индустрии трансплантации эмбрионов (Cognie, 2003). В целом, по данным IETS, в год во всем мире трансплантируют более трех тысяч свежих эмбрионов овец и столько же эмбрионов, прошедших процедуру криоконсервации (Thibier, 2002). По этим же данным, за 1997 г., например, было трансплантировано около восьми тысяч свежих и более тысячи замороженно-оттаянных эмбрионов коз (Thibier, 1998). Таким образом, масштаб деятельности по этим двум видам животных сопоставим, хотя некоторые отличия имеются. Как следует из приведенных цифр, примерно половину овечьих зародышей пересаживают после криоконсервации, в то время как у коз приблизительно лишь каждый девятый эмбрион взят из криобанка. В целом же можно констатировать, что так же, как и в случае крупного рогатого скота, метод криоконсервации зародышей широко и успешно применяется на овцах и козах.

Успехи клонирования, трансплантации и криоконсервации эмбрионов, а также криоконсервации семени овец позволили провести цикл работ по созданию “интегрированного пакета репродуктивных технологий”, направленного на сохранение исчезающего вида овец – муфлона (*Ovis orientalis mussimon*) (Ptak et al., 2002).

Таким образом, криоконсервация эмбрионов прочно заняла свое место в арсенале средств сельскохозяйственной биотехнологии в отношении крупного рогатого скота, овец и коз. Однако для других сельскохозяйственных животных, например для лошадей, пока отсутствует надежный метод криоконсервации эмбрионов, который можно применять в полевых условиях. Особо следует рассмотреть историю криоконсервации эмбрионов свиней, так как определенному успеху, который удалось достичь к настоящему времени, предшествовали неудачи и длительный и сложный путь их преодоления.

Подотряд нежвачные

Свиньи. Криоконсервацию эмбрионов свиньи можно рассматривать как серьезный вызов, с которым столкнулись репродуктивная биотехнология и криобиология, так как уже в самых первых работах выяснилось, что эмбрионы не выдерживают охлаждения ниже +15°C (Wilmut, 1972). Потребовалось 25 лет интенсивных экспериментов, чтобы наконец добиться первых положительных результатов (Vajta et al., 1997). К этому времени уже давно существова-

ли криобанки эмбрионов крупного рогатого скота и овец, не говоря уже о лабораторных животных. В чем же проблема зародышей свиньи с точки зрения возможности их охлаждения и криоконсервации?

Особенностью зародышей свиньи является обилие липидных гранул на преимплантационной стадии развития (Kikuchi et al., 2002). Как выяснилось, именно эти липидные гранулы особо чувствительны к снижению температуры ниже +15°C (Niemann, 1985).

Высказывались различные предложения, направленные на преодоление проблемы чувствительности зародышей свиньи к околонулевым температурам, в частности, предлагалось применить витрификацию. Основной идеей этого подхода было то, что при витрификации те температуры, которые убийственны для зародышей свиньи, преодолеваются практически мгновенно и не успевают необратимо повредить их.

В 1997 г. Вайта предложил свою знаменитую разновидность метода витрификации, названную методом OPS (Open Pulled Straw) и опробовал ее на зародышах свиньи (Vajta et al., 1997). С этого года наступает перелом в изучении возможности замораживания эмбрионов свиньи, и через три года две независимые исследовательские группы сообщили о рождении поросят после витрификации и последующей трансплантации свиных зародышей (Bertchelot et al., 2000; Dobrinsky et al., 2000).

Интересный результат был получен в Мэрилэнде, США (Dobrinsky et al., 2000). В этой группе применили другую разновидность метода витрификации, отличную от OPS-метода, но в сочетании с использованием цитохалазина В для стабилизации цитоскелета. Этот подход увенчался успехом, но только для эмбрионов, находящихся на стадии вылупившейся бластоцисты; было получено много поросят, особенно в серии, в которой трансплантировали эмбрионы, подвергавшиеся и витрификации, и воздействию цитохалазина (Dobrinsky et al., 2000).

В другой исследовательской группе использовали методику OPS и получили живое потомство после витрификации еще не вылупившихся бластоцист (Bertchelot et al., 2000).

Серия работ была направлена на разработку другого подхода – “делипацию” зародышей свиньи перед их замораживанием/витрификацией. Идея состояла в следующем. Если липидные гранулы столь чувствительны к охлаждению, следует удалить их перед этой процедурой. Для этого успешно применяли такие подходы, как центрифугирование и микроманипуляции с отсасыванием липидных гранул (Nagashima et al., 1994, 1995). Относительно недавно этому же коллективу удалось успешно витрифицировать зародыши свиньи, полученные после экстракорпорального оплодотворения созревших *in vitro* ооцитов (Nagashima et al., 2007).

Особенно впечатляющими были недавние эксперименты, когда эмбрионы свињи на стадии морулы—ранней бластоцисты были центрифугированы (для делипации), витрифицированы, а затем после криохранения у них удаляли прозрачную оболочку и трансплантировали самкам-реципиентам. В результате этого довольно сложного комплексного подхода девять из одиннадцати самок-реципиентов дали потомство, причем общее число поросят, родившихся и выживших после рождения, составило 61 (Dobrinsky, 2002).

Таким образом, в результате экспериментального подтверждения нескольких биотехнологических идей и применения комплексного подхода удалось добиться того, что эмбрионы свињи в настоящее время можно успешно закладывать в криобанк, причем тогда, когда эти эмбрионы находятся в удобном для работы периоде — на стадии морулы—ранней бластоцисты. Тем не менее, уже из краткого описания, приведенного выше, ясно, что технология закладки криобанка эмбрионов свињи пока сложнее, требует комплексного подхода и более высокой квалификации персонала, чем, например, создание криобанков лабораторных животных или таких сельскохозяйственных видов, как крупный рогатый скот.

ПОПЫТКИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НЕПАРНОКОПЫТНЫХ: ЛОШАДИ

Запрос на эмбрионы лошади (Equidae) в мире весьма велик (Long et al., 2003), поэтому, несмотря на то что схемы супероуляции для лошадей до сих пор не отработаны, достаточно много эмбрионов ежегодно вымывают и трансплантируют. Так, по данным IETS, в мире получают в год до десяти и более тысяч зародышей лошадей (Thibier, 2002, 2004; Betteridge, 2006). Однако лишь очень небольшой процент зародышей лошадей трансплантируют после прохождения процедур криоконсервации (Thibier, 2002). Несмотря на успехи клонирования лошадей (Galli et al., 2003) и прогресс в налаживании систем культивирования зародышей лошади *in vitro* (Galli et al., 2008), криоконсервация так и не стала пока для этих животных рутинной практикой. Именно с отсутствием надежного способа замораживания и со сложностью транспортировки свежих эмбрионов лошади отчасти связано то, что их трансплантация пока не является международным бизнесом и этим в основном занимаются на американском континенте. В 2003 г., например, 64% всех трансплантаций эмбрионов лошади было произведено в США и 31% — в Бразилии, т. е. 95% этих работ сделано на американском континенте (Thibier 2004; Betteridge, 2006).

Как сухие цифры отчетов IETS (Thibier, 2002, 2004), так и специальные обзоры, посвященные криоконсервации эмбрионов лошадей (Squires et al., 1999, 2003), свидетельствуют о том, что для этого важного вида сельскохозяйственных животных пока

не существует надежного комплекса биотехнологических методик, который в совокупности с запасом замороженных эмбрионов, надежно хранящихся в криохранилище, можно было бы назвать “криобанком”.

Попытаемся разобраться, в чем же причина такого контраста с ситуацией, описанной нами выше для крупного рогатого скота или овец. Ниже эти причины разбираются подробно, однако сразу следует оговорить, что эмбрионы лошади имеют множество особенностей в преимплантационном развитии и по некоторым характеристикам совершенно не похожи на таковые других сельскохозяйственных животных (Betteridge et al., 1982; Allen, 2001; Betteridge, 2007).

Результаты экспериментов указывают на то, что когда размер зародыша лошади не превышает 200—250 мкм (это примерно 6-й день развития), то их удается иногда вполне эффективно подвергать замораживанию с последующим получением беременности или живого потомства после размораживания и трансплантации (Squires et al., 1999, 2003). При этом традиционное программное замораживание и витрификация примерно одинаково эффективны (Nochi et al., 1994). Если же размер зародыша лошади, отбираемого для замораживания, составляет 300 мкм и более, то эффективность процедуры криоконсервации близка к нулю. Этот результат вполне предсказуем, так как, согласно двухфакторной теории Мэйзура, соотношение объема и поверхности замораживаемого объекта при традиционном программном замораживании существенно влияет на результат такой процедуры (Mazur et al., 1972; Mazur, 1984), т. е. чем больше размер эмбриона, тем при прочих равных условиях хуже прогноз на его выживание после замораживания. Однако кроме ухудшения поверхностно-объемных характеристик крупные эмбрионы лошади имеют еще одну видоспецифичную характеристику, которая может пагубно отражаться на их выживаемости. На 6—7-й дни развития у зародыша лошади помимо прозрачной оболочки (*zona pellucida*), характерной для эмбрионов млекопитающих, образуется так называемая “капсула”, состоящая из гликопротеидов (Betteridge et al., 1982; Betteridge, 2007). Она может отрицательным образом влиять на проницаемость криопротекторов и таким образом резко ухудшать результаты криоконсервации.

Эмбрион лошади мигрирует в матку на стадии 6—6.5 дней развития (Betteridge et al., 1982) и становится доступен для нехирургического вымывания. Для прямой трансплантации наиболее предпочтительной является стадия 7—8-дневного зародыша. Обычно между 6-м и 7-м днями развития наряду с прозрачной оболочкой появляется упомянутая выше капсула (Betteridge et al., 1982; Betteridge, 2007), и эмбрион бурно растет, будучи на 7-й день развития в среднем 0.5 мм в диаметре и почти в три раза больше — на 8-й (Squires et al., 2003). Капсула утолщается и постепенно замещает прозрачную оболочку.

Таким образом, существует лишь очень узкое “окно” между 6-м и 6.5 днями развития, когда эмбрионы лошади уже находятся в матке, но пока еще не слишком велики и у них еще нет мощной капсулы, затрудняющей замораживание. На 6-й день развития эмбрион лошади обычно находится на стадии морулы—ранней бластоцисты и именно эта стадия является предпочтительной для криоконсервации (Squires et al., 1999, 2003).

Таким образом, главными барьерами для создания криобанка лошадей являются крайняя специфичность успешной криоконсервации и слишком узкое временное окно, в течение которого можно использовать эмбрионы этой стадии развития. Если еще учесть, что методы супероуляции для лошадей по-прежнему не отработаны, становится понятным, почему до сих пор не приходится говорить о криобанке эмбрионов лошадей, несмотря на то что эффективность трансплантации свежих эмбрионов лошади весьма высока (70–80%) и не уступает таковой у крупного рогатого скота (Squires et al., 2003).

ПЕРСПЕКТИВЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ХИЩНЫХ

Отряд хищных (Carnivora) объединяет такие известные семейства, как кошачьи, псовые, кунцеобразные и некоторые другие. Иными словами, к этому отряду принадлежат как кошки и собаки с их дикими родственниками, так и разводимые на фермах пушные звери — хорьки, норки, лисицы, песцы и другие. Уже из этого перечисления столь значимых для человека видов понятно, что разработка технологии создания криобанков многих из них представляет собой важную задачу и на эти технологии имеется запрос (Long et al., 2003).

Во всех семействах отряда хищных имеются исчезающие виды, которым уделяется пристальное внимание; ведутся разработки репродуктивных технологий, направленных на их консервацию. Наиболее остро проблема исчезающих видов стоит в семействе кошачьих (Myers, 1984). Это обстоятельство послужило причиной того, что множество проектов было направлено на разработку репродуктивных технологий именно для представителей семейства Felidae (Farstad, 2000) и именно в этом семействе на сегодняшний день есть наибольший успех в применении технологий, которые являются базовыми при создании криобанка эмбрионов, — криоконсервации эмбрионов и их трансплантации (Dresser et al., 1988; Farstad, 2000; Swanson, Brown, 2004; Swanson, 2006; Gómez et al., 2009).

Одной из важных причин того, что эмбрионы животных, принадлежащих к отряду Carnivora, являются весьма проблематичными объектами для криоконсервации, является обилие липидных гранул в бластомерах преимплантационных эмбрионов у всех представителей этого большого отряда. Эту

особенность хищных могут засвидетельствовать все те, кто видел эмбрионы кошачьих, псовых или куньих в световом микроскопе и при этом наблюдал их характерную темную окраску.

Как описано выше в соответствующем разделе, эмбрионы свиней, которые к отряду хищных не относятся, но которые также содержат в избытке липидные гранулы в бластомерах, на протяжении десятилетий были проблемным объектом для криоконсервации именно по этой причине (Dobrinsky, 2002). Другим обстоятельством, свойственным всем представителям отряда хищных, является то, что после завершения движения по яйцеводам и выхода в матку эмбрионы начинают достаточно быстро увеличиваться и достигают размера нескольких миллиметров. Это характерно и для собачьих (Holst, Phe-mister, 1971), и для кошачьих (Swanson et al., 1994), и для кунцеобразных (Amstislavsky et al., 1993; Lindeberg, Jarvinen, 2003; Amstislavsky et al., 2006a). В этом отношении они похожи на другой проблемный для криобанка объект — эмбрионы лошадей.

Несмотря на то что существует целая индустрия по криоконсервации семени у собак и это направление имеет уже достаточно длительную и успешную историю (Linde-Forsberg et al., 1999; Thomassen, Farstad, 2009), отсутствуют какие-либо литературные указания на положительные результаты экспериментов по криоконсервации эмбрионов псовых. Это связано, прежде всего, с особенностями биологии псовых, у которых ооциты овулируют не на стадии метафазы второго деления мейоза, как у большинства млекопитающих, а на более ранних этапах (Farstad et al., 1993). С этой “незрелостью” овулировавших яйцеклеток связаны сложности культивирования их *in vitro* и другие проблемы при разработке технологий, направленных на криоконсервацию эмбрионов псовых (Farstad, 2000; Songsasen, Wildt, 2007).

Следует сразу отметить, что на протяжении многих лет единственным представителем отряда хищных, у которого удалось получить живое потомство после криоконсервации эмбрионов, была домашняя кошка (*Felis catus*) (Dresser et al., 1988). Попытки криоконсервации эмбрионов других представителей этого многочисленного отряда заканчивались неудачей (что зачастую даже не публикуется).

Лишь недавно технологию криоконсервации эмбрионов удалось применить по отношению к диким видам кошачьих. Усилия совместной команды исследователей из США и Бразилии привели к тому, что у нескольких видов диких кошек, обитающих в Бразилии, у такой, например, как оцелот (*Leopardus pardalis*), удалось заморозить достаточно много эмбрионов (Swanson, Brown, 2004). Причем позднее было получено живое потомство оцелота после трансплантации эмбрионов этого вида, взятых из криобанка (Swanson, Brown, 2004; Swanson, 2006). Таким образом, оцелот оказался первым диким видом семейства кошачьих (и первым диким видом от-

ряда Carnivora), эксперименты по созданию криобанка которого можно признать вполне успешными, поскольку было получено живое потомство как после осеменения взятым из криобанка семенем, так и после трансплантации взятых из криобанка эмбрионов (Swanson, Brown, 2004; Swanson, 2006). Этот несомненный успех позволяет утверждать, что создание криобанка эмбрионов будет играть важную роль в программах консервации диких кошек.

В результате нашего проекта, осуществленного совместно с коллегами из университета Куопио (Финляндия), удалось получить положительный результат на представителях другого семейства хищных — куницеобразных (Mustelidae).

Применив так называемый “стандартный протокол” замораживания эмбрионов хорька (*Mustela putorius*) и два традиционных криопротектора — глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), мы получили достаточно противоречивые результаты. Серьезных механических повреждений в подвергавшихся криоконсервации зародышах обнаружено не было, но их трансплантация не приводила к рождению потомства (Кизилова и др., 1998; Amstislavsky et al., 1996). В дальнейшем изменив некоторые важные детали метода, заменив глицерин и ДМСО на менее токсичный криопротектор этиленгликоль, а также начав замораживать эмбрионы хорька на программном замораживателе FREEZE CONTROL CL5500 (“Cryo Logic”, Австралия), мы с удовлетворением обнаружили, что отдельные зародыши сохраняют жизнеспособность после криоконсервации. Сначала это было подтверждено результатами культивирования зародышей *in vitro* (Amstislavsky et al., 2000), а вскоре нам удалось получить живое потомство с помощью эмбрионов хорька, которые были заморожены этим методом. Зародыши хранили в криобанке, затем они были разморожены и трансплантированы в матку самок-реципиентов, лишь 11% зародышей хорька успешно пережили полный цикл этой процедуры и родились (Lindeberg et al., 2003). Впоследствии был применен метод витрификации в OPS-модификации, в результате чего также родилось живое потомство, однако эффективность такой методики составила всего лишь 6% (Piltti et al., 2004). Безусловно, метод замораживания зародышей хищных нуждается в дальнейшем развитии, прежде чем его можно будет применять в практическом звероводстве. Однако в цитированных работах нашей группы (Amstislavsky et al., 2000; Lindeberg et al., 2003; Piltti et al., 2004) впервые было показано, что применение этого подхода успешно не только для семейства кошачьих, но и для другого семейства отряда хищных — куницеобразных.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Криоконсервация зародышей с применением современных методов репродуктивной биотехноло-

гии активно используется по отношению к человеку. Со времени первой успешной беременности, зарегистрированной после трансплантации прошедших через криоконсервацию зародышей, прошло уже более четверти века (Toumson, Mohr, 1983), и сейчас по отношению к зародышам человека применяют как традиционное программное замораживание, так и витрификацию (Michelmann, Nayudu, 2006; Loutradi et al., 2008). Наряду с эмбрионами часто замораживают ооциты и сперматозоиды человека (Hardy et al., 2002; Maher, 2007). Успешны и эксперименты по замораживанию генеративных органов — семенников и яичников. Накапливается все больше экспериментальных и клинических данных о том, что ткань семенника или яичника вполне реально подвергать криоконсервации, и этот подход даже рекомендован как одна из реальных возможностей восстановления плодовитости у людей, перенесших химио- и лучевую терапию в связи с лечением рака в раннем возрасте (Novatta, 2003). Например, показана возможность рождения ребенка у пациентки, у которой до начала химиотерапии были удалены и подвергнуты криоконсервации яичники. После окончания курса лечения и полного выздоровления этой молодой женщине была проведена трансплантация ее же собственной яичниковой ткани, взятой из криобанка, где кусочки этой ткани сохраняли при температуре жидкого азота в течение ряда лет. Через некоторое время эта женщина смогла родить собственного ребенка, зачатого естественным путем (Donnez et al., 2004).

ВЫБОР ПРИОРИТЕТОВ И РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ СОЗДАНИИ КРИОБАНКА

Что же делает криобанк эмбрионов столь популярным для поддержания и разведения коллекций лабораторных и сельскохозяйственных животных, сохранения генофонда диких и исчезающих видов млекопитающих и решения репродуктивных проблем человека? Ниже перечислены некоторые из преимуществ, которые дает создание криобанка эмбрионов. Эти аспекты исследованы преимущественно на мышах, но верны и для других видов млекопитающих.

Криобанк дает возможность быстро восстановить коллекцию животных после эпидемий, стихийных бедствий и т.д. Например, создание криоархива в Джексоновской лаборатории было инициировано пожаром 1947 г., и когда в 1989 г. в этой же лаборатории случился еще более разрушительный пожар, криобанк действительно очень помог (Mobraaten, 1986; Landel, 2005). Некоторые из уничтоженных в ходе пожара линий существовали только в коллекции Джексоновской лаборатории и более нигде в мире, так что восстановить их можно было лишь из собственного криоархива.

Криоконсервация и трансплантация эмбрионов необходимы не только для восстановления линий мышей или крыс, но и для очистки этих линий от инфекций. Показано, что при помощи этих методов можно избавиться от вирусов мышиногепатита и Сендая, мышиногепатита аденовируса и многих других (Glenister, Thornton, 2000). Трансплантировав “чистой” самке-реципиенту эмбрионы, взятые из криобанка, размороженные и отмытые в стерильных средах, получают уже вполне здоровых мышей желаемой линии. Причем самку-реципиента можно взять от малоценной в генетическом отношении, но плодовой линии или, что еще лучше, от гибрида первого поколения, полученного при скрещивании родителей двух различных плодовых линий. В своей собственной практике мы, например, успешно использовали в качестве самок-реципиентов гибриды первого поколения между аутбредной ICR и инбредной WR/у линиями (обе они отличаются высокой плодовитостью). Более того, в экспериментах на сельскохозяйственных животных, таких как козы и крупный рогатый скот, было продемонстрировано, что даже сама по себе трансплантация эмбрионов без криоконсервации при правильном ее проведении позволяет избавиться от целого ряда инфекций (Bielanski et al., 2001; Ali Al Ahmad et al., 2008).

Еще один важный аргумент в пользу криобанков – упрощение пересылки обмена генетическим материалом (Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005), так как замороженные эмбрионы, в отличие от живых особей, не подвержены стрессу и инфекциям, а кроме того, при пересылке замороженного материала упрощаются бюрократические процедуры при пересечении границ большинства государств. Появившиеся на рынке специальные транспортные сосуды “dry shippers” сделали пересылку замороженного генетического материала удобной и безопасной. Жидкий азот в них удерживается на специальном адсорбенте, следовательно, в таких сосудах нет жидкой фазы азота и поэтому отпадают юридические проблемы, связанные с транспортировкой сосудов самолетами.

При эффективно работающем криобанке оптимизируется процесс разведения мышей и крыс. Для хранения криоархива нужно относительно небольшое помещение (несравненно меньшее по площади, чем площадь вивария), а единственный компонент, необходимый для поддержания жизни в биоматериале, – жидкий азот. Конечно, перевод линии в криобанк и обратно требует работы квалифицированных биотехнологов, покупки дорогостоящих программных замораживателей, криохранилищ, инкубаторов и другого оборудования – иными словами, создание и поддержание современного криобанка невозможно без начальных инвестиций и работы хорошо оснащенной лаборатории. Тем не менее, по расчетам Лэндэла (Landel, 2005), затраты по переводу той или иной линии животных в криобанк во всех случаях оказываются существенно

меньшими, чем при поддержании этой же линии в питомниках.

Предположим, решение о создании криобанка принято. Следует, однако, хорошо представлять ответы на некоторые важные вопросы. Что будет основной единицей-носителем генетической информации при создании криобанка? То есть, что собственно предстоит замораживать? Сколько биоматериала необходимо сохранять для создания надежного криоархива? Каковы цели криобанка? Как организовать надежную систему криохранения? Какой метод замораживания (и соответственно размораживания) избрать? Кого использовать в качестве реципиентов при возвращении линии в состояние *in vivo* из криобанка и т.д.

Попробуем ответить на эти вопросы, исходя из нашего собственного опыта и проанализировав мировую. Итак, что же собственно лучше сохранять в криобанке: эмбрионы, сперматозоиды, ооциты, яичниковую ткань? Ответ на этот вопрос отчасти зависит от вида животных, с которым предстоит работать, однако есть и соображения общего характера. Традиционно центры, в которых поддерживали большие коллекции лабораторных животных, прежде всего накапливали замороженные эмбрионы, если нужно было надежно архивировать ту или иную линию (Mobraaten, 1986), хотя криобанки семени во время классической работы Смит, Полджа и Паркса (Smith et al., 1950) широко использовали в сельском хозяйстве. Поскольку с хранением и восстановлением генетической информации при создании криобанка ооцитов и яичниковой ткани существует гораздо больше проблем, чем при сохранении эмбрионов и семени (Massip, 2001), современные криобанки лабораторных и сельскохозяйственных животных ориентированы, прежде всего, на криоконсервацию эмбрионов и сперматозоидов, но не ооцитов или яичниковой ткани (Landel, 2005).

Для полноценного архивирования линии можно консервировать либо эмбрионы, либо гаметы (т.е. сперматозоиды и/или яйцеклетки). Первый путь более прост и достаточно надежен, тогда как второй требует еще одного технологического этапа – из замороженных сперматозоидов или яйцеклеток нужно сначала получить эмбрионы и лишь затем восстановить линию. При работе с семенем мышей и крыс проще этап собственно архивирования, так как требуется меньше животных и трудозатрат (Nakagata, 2000; Nakatsukasa et al., 2003). Причиной этого является то, что от одного самца мыши можно получить от десяти до тридцати миллионов сперматозоидов, которые достаточно легко заморозить, а после размораживания оплодотворить много ооцитов и получить много эмбрионов. Именно благодаря этой возможности такой способ наряду с замораживанием эмбрионов в последнее время становится весьма популярным при создании криоархивов мыши, особенно при архивировании трансгенных линий (Nakagata, 2000; Nakatsukasa et al., 2003).

Однако при замораживании семени этапы по переводу криоархива в живую коллекцию по сравнению с ситуацией, когда заморожены эмбрионы, более трудоемки, так как для воссоздания линии предполагается дополнительный технологический этап: после размораживания необходимо произвести оплодотворение ооцитов *in vitro* (так называемое ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение) и трансплантировать уже полученные эмбрионы (Nakagata, 2000; Nakatsukasa et al., 2003). И, наоборот, при криоконсервации эмбрионов обычно требуется больше животных-доноров и трудозатрат на этапе перевода линии в криобанк, но зато упрощается перевод криоархива в живую коллекцию (Landel, 2005). Эмбрион — это уже особь. Правда, эта особь состоит из небольшого числа клеток, но у нее уже есть четкая программа развития, и достаточно лишь трансплантировать эмбрионы самкам-реципиентам, чтобы родилось живое потомство и линия была восстановлена. Если в криобанке заморожено двести — пятьсот эмбрионов какой-либо мутантной, трансгенной или инбредной линии мышей, то считается, что эта линия надежно архивирована (Glenister, Thornton, 2000) и нужно лишь разморозить эмбрионы и трансплантировать их подходящим реципиентам.

Что же касается яйцеклеток, то при их замораживании и криоконсервации возникает максимальное число проблем, поэтому замораживание яйцеклеток и яичниковой ткани пока еще не стало рутинной практикой и применяется лишь в наиболее технологически продвинутых центрах (Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005). Однако в медицинской практике в силу биологической и этической специфики работы с человеком интенсивно разрабатываются технологии сохранения ооцитов, а также тканей яичников в криобанке (Oehninger, 2005; Bedaiwy et al., 2006).

Существует вполне аргументированное убеждение, что наиболее надежной формой сохранения линии, породы или вида животных является криобанк, в котором сохраняются как эмбрионы, так и семя (Landel, 2005). Была разработана математическая модель создания криобанков исчезающих пород животных исходя из таких приоритетов, как надежность сохранения породы, оптимальная стоимость криобанка и др. (Boettcher et al., 2005). Причем авторы этой модели предложили дифференцированный подход к разным видам в зависимости от особенностей репродукции (например, существенно различен подход к много- и одноплодным видам). В зависимости от этих и других характеристик рекомендовано оптимальное соотношение эмбрионов/сперматозоидов в криобанке (Boettcher et al., 2005). Эти расчеты подтверждают, что число эмбрионов не должно быть слишком малым, в противном случае существенно возрастает риск потерять породу, даже если число сперматозоидов достаточно велико.

Следующий принципиально важный вопрос: как долго можно сохранять замороженные эмбрионы в

жидком азоте? Сейчас накоплен обширный мировой опыт, который позволяет уверенно утверждать: если эмбрионы были грамотно заморожены, а подача азота — бесперебойной, то неважно, хранились ли они в жидком азоте несколько секунд или десятки лет. Так, например, группа Уиттингема (Великобритания) продолжает получать потомство от эмбрионов, замороженных в начале 1970-х гг. Именно тогда был открыт способ заморозки эмбрионов мышей (Whittingham et al., 1972), и они были заморожены впрямую. С этого времени прошло уже несколько десятилетий, а эмбрионы, хранящиеся в криобанке, не потеряли жизнеспособности после размораживания и трансплантации (Glenister, Thornton, 2000).

При закладке стационарного криобанка эмбрионов и семени следует серьезно позаботиться о системах защиты. В настоящее время выпускаются хранилища с индикатором уровня азота и звуковым сигналом в случае его недостатка в хранилище. Что более существенно — эти сосуды могут дозаправляться азотом в автоматическом режиме, если они соединены трубопроводом с танком (при этом танк тоже должен иметь возможность автоматической дозаправки). Рекомендовано также распределять материал по нескольким криохранилищам и иметь дополнительный резервуар, куда можно переместить сохраняемый материал в случае, если одно из хранилищ потеряет герметичность (Landel, 2005).

Приоритетным вопросом является также выбор стратегии замораживания. Будет ли это программное замораживание или витрификация? Витрификация, теоретические основы которой разрабатывались еще в 1930-х гг. Льюетом и его учениками (Luyet, 1937), стала популярной альтернативой традиционному программному замораживанию эмбрионов и применяется достаточно широко. Например, в криобанках генетических центров университетов Кумамото и Тсукуба (Япония) зародыши мыши подвергают витрификации (Nakao et al., 1997). В то же время два крупнейших мировых криобанка — Джексонская лаборатория (Бар Харбор, США) и Центр ресурсов млекопитающих (Харвелл, Великобритания) — применяют программное замораживание (Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005).

Несмотря на кажущуюся простоту витрификации (не нужно программного замораживателя, относительная быстрота процедуры), перечислим ряд соображений в пользу выбора более традиционного программного замораживания. По нашим собственным наблюдениям, метод витрификации более капризен и зависит от “человеческого фактора”, а также от наличия стабильных условий в лаборатории. Именно по этой причине, по-видимому, подавляющее большинство полевых исследований, проводимых на большом поголовье, выполнено при помощи традиционного программного замораживания (Marsip, 2001), несмотря на то, что витрификация и традиционное программное замораживание эмбрионов крупного рогатого скота примерно одинаково эф-

фективны. В то же время для эмбрионов свиньи витрификация оказалась более предпочтительной в силу описанных выше особенностей развития (Dobrin-sky, 2002).

Эмбрионы, подвергнутые процедуре витрификации, более “капризны” при хранении по сравнению с замороженными традиционным методом программного замораживания. Витрификация, по определению, предполагает отсутствие кристалликов льда в образце. Однако при -130°C витрифицированный образец реструктурируется с образованием льда и разрушением образца соответственно (Landel, 2005). Такой перепад температур может, например, случиться, когда образец переносят из одного хранилища в другое. Замороженные традиционным (программным) способом медленного охлаждения эмбрионы более устойчивы и менее “капризны” при хранении. Кроме того, при витрификации применяют гораздо более высокие по сравнению с традиционным замораживанием концентрации криопротекторов, что может увеличить риск непредсказуемых отдаленных эффектов в поведении и физиологии развившихся после этой процедуры особей.

Следует отметить, что, несмотря на эти соображения, метод витрификации обладает и несомненными достоинствами, такими как быстрота замораживания образца и отсутствие необходимости приобретения программных замораживателей. Более подробно достоинства и недостатки этого метода обсуждаются в обзорах (Landel, 2005; Vajta, Nagy, 2006).

Вопрос о влиянии процедур криоконсервации эмбрионов и половых клеток человека на будущий организм является актуальным, поэтому он вызывал и продолжает вызывать дискуссии не только в технологическом плане, но и с этической точки зрения (Maheg, 2007). Общим является то, что при применении криотехнологий по отношению к эмбрионам и ооцитам человека частота возникновения явных аномалий развития не выше, чем при естественном размножении (Sutcliffe, 2000). Но поскольку витрификацию стали широко применять на практике относительно недавно и пока нет достаточных данных для окончательного вывода о влиянии этой процедуры на развитие родившихся после нее детей, заключение пока делать рано, тем более что отдаленные эффекты высоких концентраций криопротекторов при ранней экспозиции эмбрионов млекопитающих в процессе витрификации нуждаются в дальнейшем анализе.

Таким образом, мы считаем, что современный криобанк эмбрионов следует оснастить программными замораживателями. В настоящее время на рынке имеются относительно недорогие, простые и надежные в работе замораживатели с набором наиболее часто применяемых программ. Они хорошо зарекомендовали себя в работе с разными видами

животных, в том числе и с достаточно сложными в плане криоконсервации эмбрионов (Lindeberg et al., 2003; Amstislavsky et al., 2006b). Если же планируется проводить исследования и в перспективе ожидается криоконсервация эмбрионов таких видов животных, для которых пока не существует отработанного метода замораживания, можно предусмотреть закупку и более дорогого замораживателя, в котором у исследователя есть возможность самому задавать программу.

Современный криобанк укомплектован программными замораживателями, хранилищами для биоматериала, снабженными индикаторами жидкого азота. Стационарные хранилища часто соединяют вакуумным трубопроводом с танком жидкого азота, по которому он по мере необходимости закачивается в хранилище (возможна опция автоматической закачки); при наличии вакуумного трубопровода для поддержания его в рабочем состоянии необходимо иметь вакуум-насос. Следует предусмотреть транспортные сосуды для транспортировки биоматериала (в том числе “dry shippers”) и компьютеризированный блок для постоянного мониторинга криобанка. Кроме того, следует также предусмотреть возможность принудительной вентиляции и устройств слежения за содержанием кислорода в комнате.

Известно, что работа с эмбрионами, даже такие простые процедуры, как их вымывание, оценка и трансплантация, т.е. так называемые технологии “первого поколения”, требует стерильных условий. Необходимо иметь ламинарные шкафы, автоклавы, стерилизационные шкафы и, конечно, хорошие микроскопы. Для оценки эмбрионов подходят стереомикроскопы с большим фокусным расстоянием, для оценки семени применяют обычную световую микроскопию при увеличении в 200–400 раз, однако крайне желательно предусмотреть возможность оценки функциональных повреждений сперматозоидов при помощи флуоресцентной микроскопии. При использовании “технологий третьего поколения” (например ICSI (Intracytoplasmic sperm injection)), связанных с манипуляциями на эмбрионах, например при частичном разрушении прозрачной оболочки ооцитов и эмбрионов, следует в дополнение к хорошему инвертированному микроскопу иметь комплект микроманипуляторов, микроузел и другие приспособления для самостоятельного изготовления микроинструментов, если в перспективе предусматривается применять эти технологии.

Следует помнить, что репродуктивные технологии “второго поколения” основаны на культивировании ооцитов и зародышей и ЭКО, поэтому следует позаботиться о закупке установки для производства чистой воды, рН-метре, кондуктометре, наборе точных весов, CO_2 -инкубаторе и другом оборудовании.

При создании криобанка исчезающих видов животных возникают некоторые дополнительные во-

просы и проблемы, поэтому необходим длительный период накопления данных по особенностям репродукции каждого конкретного вида животных (Wildt et al., 1992). Только после этого можно решить, какие половые продукты хранить в криобанке, каких животных использовать для осеменения и/или в качестве реципиентов. Если, например, пересаживать эмбрионы из криобанка самкам того же вида, то на них возрастет репродуктивная нагрузка. Если же их пересадить самкам-реципиентам доместицированного близкородственного вида, то, как правило, межвидовой репродуктивный барьер создаст большие проблемы при трансплантации эмбрионов между разными видами млекопитающих (Амстиславский, 2006).

В 2002–2004 гг. мы трансплантировали в общей сложности 72 эмбриона европейской норки (*Mustela lutreola*) (исчезающий вид куньих) двенадцати межвидовым гибридам (самкам хонорика и нохорика). При этом родилось 36 детенышей. Таким образом, эффективность трансплантации составила 50% (Amstislavsky et al., 2004, 2006a). Эти исследования показали, что пересадка зародышей межвидовым гибридам может быть одним из путей преодоления межвидового репродуктивного барьера, однако он требует дополнительного технологического этапа — получения межвидовых гибридов, что не всегда является простым делом (Терновский, Терновская, 1994). Эксперименты же по прямой трансплантации эмбрионов от норки хорьку пока не увенчались рождением живого потомства (Amstislavsky et al., 2006b). В настоящее время эти эксперименты продолжаются, исследуются межвидовые репродуктивные различия между хорьками и норками и идет поиск путей преодоления межвидового репродуктивного барьера между этими видами. Результаты наших экспериментов 2007–2008 гг. свидетельствуют о том, что уровни прогестерона у европейской норки и хорька во время беременности существенно отличаются, и непосредственно перед имплантацией зародышей содержание прогестерона в фекалиях у самок хорьков существенно выше, чем у самок европейской норки, что в данном случае может быть одной из составляющих межвидового барьера.

Существует лишь небольшое число работ, в которых сообщается об успешных межвидовых трансплантациях эмбрионов млекопитающих, выполненных, главным образом, на представителях полорогих (Bovidae) (Bunch et al., 1977; Dresser, 1986; Fernandez-Arias et al., 1999; Ptak et al., 2002; Dixon et al., 2007), лошадей (Allen et al., 2005) и хищных (Pope et al., 1993; Gómez et al., 2009). Пока не существует универсальных путей преодоления межвидового барьера, приемлемого во всех случаях.

Возможно, достаточно универсальным способом преодолеть межвидовой барьер при трансплантации эмбрионов является совместная трансплантация самке-реципиенту зародышей двух видов (с последующей смешанной беременностью). Во всяком

случае наши предыдущие эксперименты показали, что при совместной трансплантации зародышей европейской норки и хорька самке хонорика рождается выводок, в котором есть как норки, так и хорьки (Amstislavsky et al., 2006a), что указывает на перспективность этого подхода. Ранее подобный же метод был использован при межвидовой трансплантации эмбрионов индийского степного кота (*Felis silvestris ornata*) реципиентной самке домашней кошки (*Felis catus*) (Pope et al., 1993). Более подробно проблемы, возникающие при межвидовой трансплантации эмбрионов млекопитающих, обсуждаются в соответствующих обзорных статьях (Амстиславский, 2006; Anderson, 1988; Allen, 2005; Gómez et al., 2009).

Мы полностью разделяем мнение Вилдта (Wildt et al., 1992) о том, что криобанк — это не только “сосуды”, но, прежде всего, технология, т.е. соответствующее приборно-техническое оснащение и квалифицированные специалисты, имеющие опыт работы с теми или иными методиками и с теми или иными видами животных. Конфигурация криобанка и обслуживающей его лаборатории, которая обеспечивает набор необходимых для функционирования методов, зависит в конечном счете от целей его создания, от вида животных, на которых нацелен криобанк, от амбиций его организаторов и от возможностей закупить то или иное оборудование. Общей же тенденцией является неуклонное повышение запроса на криобанки, так как возрастание числа линий и пород лабораторных и домашних животных ставит вопрос об их криоархивировании, а исчезновение многих видов диких животных — о сохранении этих видов. Существенное возрастание числа криобанков в мире в последние десять лет является ответом на эти запросы практики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я. Межвидовая трансплантация эмбрионов и клеточных ядер как подход к сохранению исчезающих видов млекопитающих // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 1. С. 3–11.
- Кизилова Е.А., Байбородин С.И., Максимовский Л.Ф. и др. Влияние криоконсервации на морфологию бластоцист светлого хорька *Mustela eversmanni* // Там же. 1998. Т. 29. № 6. С. 429–436.
- Терновский Д.В., Терновская Ю.Г. Экология куницеобразных. Новосибирск: Наука, 1994. 223 с.
- Abbott A. Genetisists prepare for deluge of mutant mice // Nature. 2004. V. 432. P. 541.
- Ali Al Ahmad M.Z., Chebloune Y., Bouzar B.A. et al. Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure // Theriogenology. 2008. V. 69. P. 408–415.
- Allen W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy // Reproduction. 2001. V. 121. P. 513–527.
- Allen W.R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding // Reprod. Domest. Anim. 2005. V. 40. P. 310–329.

- Amstislavsky S., Maksimovsky L., Ternovskaya Yu., Ternovsky D.* Ermine reproduction and embryo development // *Scientifur*. 1993. V. 17. P. 293–298.
- Amstislavsky S., Amstislavskaya T., Stein M. et al.* Embryo cryobanking for conserving laboratory and wild animal species // *Scand. J. Lab. Animal Sci.* 1996. V. 23. P. 269–277.
- 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.
- Amstislavsky S., Aalto J., Jarvinen M. et al.* Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients // *Theriogenology*. 2004. V. 62. P. 458–467.
- Amstislavsky S., Kizilova E., Zudova G. et al.* Embryo development and embryo transfer in the European mink (*Mustela lutreola*), an endangered Mustelidae species // *Reprod. Fertil. Devel.* 2006a. V. 18. P. 459–467.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Aalto J. et al.* Embryo cryopreservation and transfer in Mustelidae: Approaches to ex situ conservation of endangered European mink // *Int. J. Refrigerat.* 2006b. V. 29. P. 396–402.
- Anderson G.B.* Interspecific pregnancy: barriers and prospects // *Biol. Reprod.* 1988. V. 38. P. 1–15.
- Bedaiwy M.A., Hussein M.R., Biscotti C., Falcone T.* Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. P. 3258–3269.
- Berthelot F., Martinat-Botte F., Locatelli A. et al.* Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method // *Cryobiology*. 2000. V. 41. P. 116–124.
- Betteridge K.J.* Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives // *Theriogenology*. 2006. V. 65. P. 905–913.
- Betteridge K.J.* Equine embryology: An inventory of unanswered questions // *Ibid.* 2007. V. 68. Suppl. 1. P. S9–S21.
- Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Mitchell D. et al.* Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens // *J. Anat.* 1982. V. 135. P. 191–209.
- Bielanski A., Nadin-Davis S., Simard C. et al.* Experimental collection and transfer of embryos from bovine immunodeficiency virus (BIV) infected cattle // *Theriogenology*. 2001. V. 55. P. 641–648.
- 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.
- Bunch T., Foote W., Whitaker B.* Interspecies ovum transfer to propagate wild sheep // *J. Wildl. Manage.* 1977. V. 41. P. 726–730.
- Cognie Y.* Current status of embryo technologies in sheep and goat // *Theriogenology*. 2003. V. 59. P. 171–188.
- Cole H.H., Hart G.H.* The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat // *Am. J. Physiol.* 1930. V. 93. P. 57–68.
- Dixon T.E., Hunter J.W., Soler J.P.* Interspecific embryo transfer from mouflon (*Ovis gmelini musimon*) to domestic Corriedale sheep in Argentina // *Anim. Reprod. Sci.* 2007. V. 101. P. 158–162.
- Dobrinsky J.R.* Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos // *Theriogenology*. 2002. V. 57. P. 285–302.
- Dobrinsky J.R., Pursel V.G., Long C.R., Johnson L.A.* Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification // *Biol. Reprod.* 2000. V. 62. P. 564–570.
- Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D. et al.* Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue // *Lancet*. 2004. V. 364. P. 1405–1410.
- Dresser B.L.* Embryo transfer in exotic bovines // *Int. Zool. Yearbook*. 1986. V. 24/25. P. 138–142.
- Dresser B.L., Gelwicks E.J., Wachs K.B., Keller G.L.* First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring // *J. Exp. Zool.* 1988. V. 246. P. 180–186.
- Farstad W.* Current state in biotechnology in canine and feline reproduction // *Anim. Reprod. Sci.* 2000. V. 60–61. P. 375–387.
- Farstad W., Hyttel P., Grondahl C. et al.* Fertilization and early embryonic development in the blue fox (*Alopex lagopus*) // *Mol. Reprod. Devel.* 1993. V. 36. P. 331–337.
- Fernandez-Arias A., Alabart J.L., Folch J., Beckers J.F.* Interspecies pregnancy of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) fetus in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy-associated glycoprotein // *Theriogenology*. 1999. V. 8. P. 1419–1430.
- FIMRe Board of Directors. FIMRe: Federation of international mouse resources: global networking of resource centers // *Mammal. Genome*. 2006. V. 17. P. 363–364.
- Galli C., Lazzari G.* The manipulation of gametes and embryos in farm animals // *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V. 43. Suppl. 2. P. 1–7.
- Galli C., Lagutina I., Crotti G. et al.* Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin // *Nature*. 2003. V. 424. P. 635.
- Galli C., Lagutina I., Duchi R. et al.* Somatic cell nuclear transfer in horses // *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V. 43. Suppl. 2. P. 331–337.
- Glenister P., Thornton C.* Cryoconservation – archiving for the future // *Mammal. Genome*. 2000. V. 11. P. 565–571.
- Gómez M.C., Pope C.E., Ricks D.M. et al.* Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer // *Reprod. Fertil. Devel.* 2009. V. 21. P. 76–82.
- Hansen P.J., Block J.* Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production // *Ibid.* 2004. V. 16. P. 1–14.
- Hardy K., Wright C., Rice S. et al.* Future developments in assisted reproduction in humans // *Reproduction*. 2002. V. 123. P. 171–183.
- Hasler J.F.* Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle // *Theriogenology*. 2001. V. 56. P. 1401–1415.
- Heap W.* Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother // *Proc. R. Soc. (L.)* 1891. V. 48. P. 457–458.

- Hochi S., Fujimoto T., Braun J., Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification // *Theriogenology*. 1994. V. 42. P. 483–488.
- Holst P., Phemister R.D. The prenatal development of the dog: preimplantation events // *Biol. Reprod.* 1971. V. 5. P. 194–206.
- Hovatta O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2003. V. 17. P. 331–342.
- Kikuchi K., Ekwall H., Tienthai P. et al. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst *in vivo* and *in vitro* // *Zygote*. 2002. V. 10. P. 355–366.
- Landel C. Archiving mouse strains by cryopreservation // *Lab. Anim.* 2005. V. 34. P. 50–57.
- Lasar J., Moreno C., Jacob H., Kwitek A. Impact of genomics on research in rats // *Genome Res.* 2005. V. 15. P. 1717–1728.
- Lindeberg H., Järvinen M. Early embryonic development and *in vitro* culture of *in vivo* produced embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*) // *Theriogenology*. 2003. V. 60. P. 965–975.
- 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*) // *Ibid.* 2003. V. 60. P. 1515–1526.
- Linde-Forsberg C., Ström Holst B., Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study // *Ibid.* 1999. V. 52. P. 11–23.
- Long C.R., Walker S.C., Tang R.T., Westhusin M.E. New commercial opportunities for advanced reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals // *Ibid.* 2003. V. 59. P. 139–149.
- Loutradi K.E., Kolibianakis E.M., Venetis C.A. et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis // *Fertil. Steril.* 2008. V. 90. P. 186–193.
- Luyet B.J. The vitrification of organic colloids and protoplasm // *Biodynamica*. 1937. V. 1. P. 1–14.
- Maher B. Little consensus on egg freezing // *Nature*. 2007. V. 449. P. 958.
- Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals // *Reprod. Domest. Anim.* 2001. V. 36. P. 49–55.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications // *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 1984. V. 16. P. C125–C142.
- Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell. Res.* 1972. V. 71. P. 345–355.
- Michelmann H.W., Nayudu P. Cryopreservation of human embryos // *Cell Tiss. Bank.* 2006. V. 7. P. 135–141.
- Mobraaten L. Mouse embryo cryobanking // *In vitro Fertil. Embry. Transfer*. 1986. V. 3. P. 28–32.
- Myers N. Cats in crisis // *Int. Wildl.* 1984. V. 14. P. 42–52.
- Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J. et al. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 374–416.
- Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J. et al. Cryopreservation of porcine embryos // *Nature*. 1995. V. 374. P. 416.
- Nagashima H., Hiruma K., Saito H. et al. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from *in vitro*-matured oocytes // *Biol. Reprod.* 2007. V. 76. P. 900–905.
- Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa // *Mammal. Genome*. 2000. V. 11. P. 572–576.
- Nakao K., Nakagata N., Katsuki M. Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos // *Exp. Anim.* 1997. V. 46. P. 231–234.
- Nakatsukasa E., Kashiwazaki N., Takizawa A. Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats // *Comp. Med.* 2003. V. 53. P. 639–641.
- Nibart M., Humblot P. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved embryos // *Theriogenology*. 1997. V. 47. P. 371. (Abstr.)
- Niemann H. Sensitivity of pig morulae to DMSO/PVP or glycerol treatment and cooling to 10°C // *Ibid.* 1985. V. 23. P. 213.
- Oehninger S. Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors // *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2005. V. 12. P. 222–231.
- Piltti K., Lindeberg H., Aalto J., Korhonen H. Live cubs born after transfer of OPS vitrified-warmed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*) // *Theriogenology*. 2004. V. 18. P. 459–467.
- Pope C.E., Keller G.L., Dresser B.L. *In vitro* fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development *in vitro*, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer // *J. Reprod. Fertil.* 1993. Suppl. 47. P. 189–201.
- Prak G., Clinton M., Barboni B. Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies // *Biol. Reprod.* 2002. V. 66. P. 796–801.
- Rowson L.E., Moor R.M., Lawson R.A. Fertility following egg transfer in the cow; effect of method, medium and synchronization of oestrus // *J. Reprod. Fertil.* 1969. V. 18. P. 517–523.
- Saito S., Liu B., Yokoyama K. Animal embryonic stem (ES) cells: self-renewal, pluripotency, transgenesis and nuclear transfer // *Hum. Cell*. 2004. V. 3. P. 107–115.
- Smith A.U., Polge C., Parkes A.S. Survival of spermatozoa at low temperatures // *Nature*. 1950. V. 166. P. 668–669.
- Songsasen N., Wildt D.E. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog // *Anim. Reprod. Sci.* 2007. V. 98. P. 2–22.
- Squires E.L., McCue P.M., Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer // *Theriogenology*. 1999. V. 51. P. 91–104.
- Squires E.L., Carnevale E.M., McCue P.M., Bruemmer J.E. Embryo technologies in the horse // *Ibid.* 2003. V. 59. P. 151–170.
- Sutcliffe A.G. Follow-up of children from cryopreserved embryos // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000. V. 169. P. 91–93.

- Swanson W.F.* Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats // *Theriogenology*. 2006. V. 66. P. 49–58.
- Swanson W.F., Brown J.L.* International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids // *Anim. Reprod. Sci.* 2004. V. 82–83. P. 21–34.
- Swanson W.F., Roth T.L., Wildt D.E.* *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 452–464.
- Thibier M.* The 1997 embryo transfer statistics from around the world: a data retrieval committee report // *Embr. Transfer Newslett.* 1998. V. 16. P. 17–20.
- Thibier M.* A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry. A report from the IETS data retrieval committee // *Ibid.* 2002. V. 20. P. 13–18.
- Thibier M.* Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world // *Ibid.* 2004. V. 22. P. 12–19.
- Thomassen R., Farstad W.* Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation // *Theriogenology*. 2009. V. 71. P. 190–199.
- Trounson A., Mohr L.* Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo // *Nature*. 1983. V. 305. P. 707–709.
- Umbaugh R.E.* Superovulation and ovum transfer in cattle // *Fertil. Steril.* 1951. V. 2. P. 243–252.
- Vajta G., Nagy Z.P.* Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification // *Reprod. Biomed. Online*. 2006. V. 12. P. 779–796.
- Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H.* Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method // *Acta Vet. Scand.* 1997. V. 38. P. 349–352.
- Van Wagtenonk A.M., Den Daas J.H.G., Rall W.F.* Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution // *Theriogenology*. 1997. V. 48. P. 1071–1085.
- Waterston R., Lindblad-Toh K., Birney E. et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome // *Nature*. 2002. V. 420. P. 520–562.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P.* Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C // *Science*. 1972. V. 178. P. 411–414.
- Wildt D.E., Monfort S.L., Donoghue A.M.* Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo // *Theriogenology*. 1992. V. 37. P. 16–84.
- Wilmut I.* The low temperature preservation of mammalian embryos // *J. Reprod. Fertil.* 1972. V. 31. P. 513–514.
- Wilmut I., Rowson L.E.* The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos // *Ibid.* 1973. V. 33. P. 352–353.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature*. 1997. V. 385. P. 810–813.

Cryobanking Mammalian Embryos: Priorities and the Optimal Choice of Reproductive Technologies

S. Ya. Amstislavsky and I. S. Trukshin

Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Division of Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

ООО "Cryogentech", ul. Himikov 28, St.-Petersburg, 195030 Russia

e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Abstract—This article reviews the main achievements in embryo cryobanking in conservation and preservation of animal strains, breeds, and species. Modern advances in this technology with respect to the main groups of laboratory and farm animals are discussed. Alternative approaches to solving the problems associated with cryobanking are considered and the priorities are substantiated. Special attention is given to discussing the role of cryobanks and respective reproductive technologies in programs aimed at conservation of genetic resources of wild and endangered mammalian species.

Key words: embryo cryobank, conservation of genetic resources, mammals, reproductive technologies