

УДК 577.95;575;591.3;592/599

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЭМБРИОНОВ И ГАМЕТ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2015 г. С. Я. Амстиславский*, **, Е. Ю. Брусенцев*, К. А. Окотруб***, И. Н. Рожкова*

*Институт цитологии и генетики СО РАН

630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 10

**Новосибирский государственный университет

630090 Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

***Институт автоматики и электрометрии СО РАН

630090 Новосибирск, пр. Коптюга, д. 1

E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 17.08.2014 г.

Окончательный вариант получен 03.11.2014 г.

Обзор посвящен различным аспектам применения криоконсервации эмбрионов и гамет для создания криобанков лабораторных животных. Особое внимание уделено рассмотрению механизмов криоповреждений и криозащиты при замораживании и витрификации. Обсуждаются проблемы, возникающие при создании криобанков различных видов животных и перспективы их преодоления.

Ключевые слова: криоконсервация, преимплантационные эмбрионы, гаметы, лабораторные животные.

DOI: 10.7868/S0475145015020020

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; 2010; Yoshiki, 2009) 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; 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 появлени-

ем большого числа линий мышей и других приоритетных лабораторных животных, организация криобанков стало одним из основных атрибутов современных генетических центров (Agca, 2012). Целью данной статьи является обзор современных методов сохранения генетических ресурсов лабораторных животных значимых для биомедицинских исследований в связи с проблемами теоретической криобиологии и практическими аспектами создания криобанков.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ ПРИОРИТЕТНЫЕ 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), Данио-рерио (Howe et al., 2013), свиньи (Groenen et al., 2012) и других. Эти достижения расширили возможность выбора соответствующих лабораторных животных для

определения функций генов и тестирование 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 является наиболее адекватным 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 Artiñano, Castro, 2009). Помимо мышей и крыс, приоритетными лабораторными животными для биомедицинских исследований являются собаки, кошки, свиньи, овцы, обезьяны и данио-рерио, последние известны 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 собака все еще выступает 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).

Данио-рерио (*Danio rerio*) является тропической пресноводной рыбкой, которая в природе обитает в Индии и некоторых соседних с ней странах (Беляева и др., 2010). Этот известный аквариумистам вид рыб стал за последние десятилетия очень значимым, так как оказалось, что геном данио-рерио 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. Данио-рерио используют в исследованиях по генетике и биологии развития, а также в качестве экспериментального объекта при создании новых лекарственных препаратов и моделировании патологических процессов (Verghmans 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 успеш-

ного 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).

ЗАДАЧИ КРИБАНКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

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, Трушкин, 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).

Применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) 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 данио-рерио (Ekker, 2008) и ряда других видов животных. 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).

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, которые 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.

КЛЮЧЕВЫЕ АСПЕКТЫ ЗАМОРАЖИВАНИЯ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Биологический материал может храниться при температуре -196°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 (Arag, 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 ($0.3-2^{\circ}\text{C}$ в минуту) (Leibo, Songsasen, 2002). Под витрификацией же обычно понимают процесс сверхбыстрого охлаждения, когда кристаллов льда вообще не образуется (Saragusty, Aray, 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°C до -45°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; Hübalek, 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; Hübalek, 2003). Ко второй группе криопротекторов относятся, главным образом, различные олиго-, моно- и полисахариды: сахароза, трегалоза, фикола, рафиноза, фруктоза и другие сахара (McGann, 1978; Hübalek, 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 (Hübalek, 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; Hübalek, 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., 2014), 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; 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 ее 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 лед. 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°C/мин, для ооцитов и эмбрионов млекопитающих – не более 1°C/мин, а для эритроцитов человека она оценивается в 3000°C/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°C в минуту до –7°C...–12°C, в зависимости от вида животных и типа криопротектора (Leibo, Songsasen, 2002; Tsai et al., 2009). По достижении данной температуры, образец выдерживается 5–10 мин. 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 лед, 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°C в мин, 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 лед (рис. 1), 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°C...–40°C (Leibo, Songsasen, 2002). При его применении с использованием криопротекторов в концентрациях 1–2 моля 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 (Бар Харбор, США).

Однако самое первое успешное замораживание эмбрионов производили согласно протоколу, при котором их охлаждали до гораздо более низких температур – до -80°C или до -110°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 $500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. При проведении витрификации используют те же самые криопротекторы, что и при программном замораживании, но в концентрации от 4 до 7 молей (Vajta, 2009; Saragusty, Agar, 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 blastomeres 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, Agar, 2011). Наиболее распространенными контейнерами для проведения программного замо-

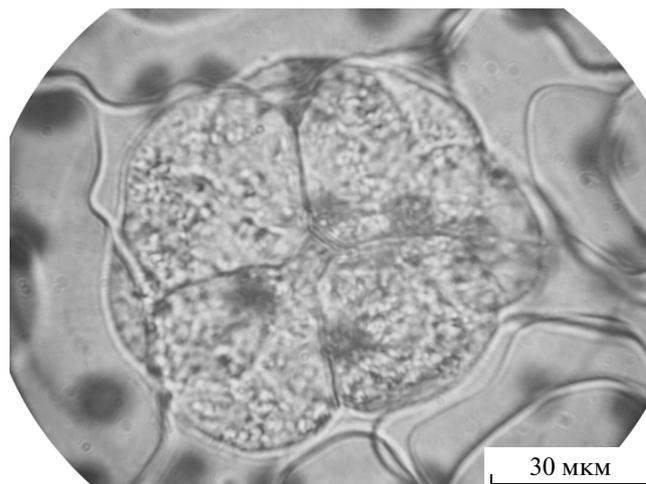


Рис. 1. Эмбрион мыши в процессе охлаждения. После проведения сидинга во внеклеточном пространстве стали образовываться кристаллы льда, и лишь небольшой объем жидкости вокруг эмбриона остается не замерзшим.

раживания 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 в минуту) (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 размораживании клеток *in situ*. Наиболее распространенным методом второго типа являются исследования с помощью криомикроскопа.

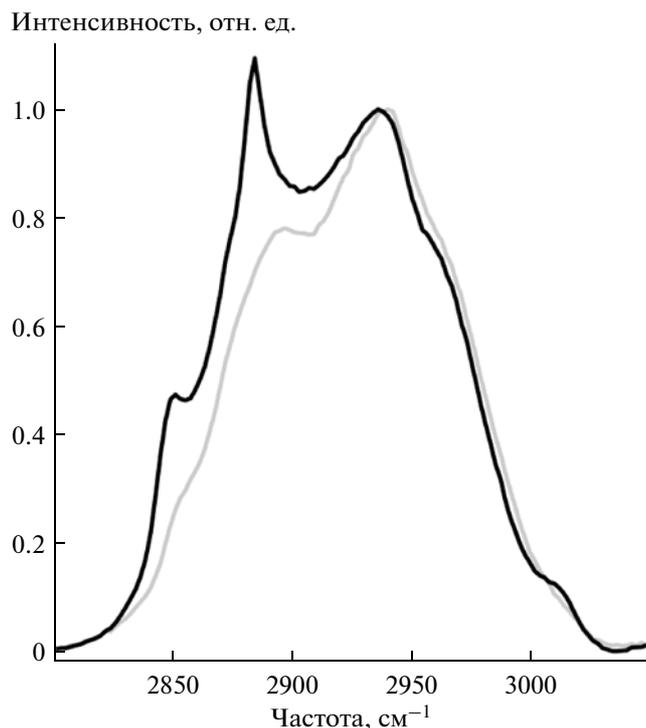


Рис. 2. Спектры КРС полученные от эмбриона мыши при $T = +18^\circ\text{C}$ (серая линия) и при $T = -120^\circ\text{C}$ (черная линия). Спектры нормированы по интенсивности линии на частоте 2935 см^{-1} .

Криомикроскопия достаточно давно используется для исследования процессов протекающих при замораживании биологических объектов (Rall et al., 1983; Diller, 1996). Этот метод позволяет бесконтактным образом проводить наблюдения за замораживаемыми клетками, причем результаты криомикроскопических исследований легко сопоставить с оценками 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 (ДСК) (Han, Bischof, 2004; Mori et al., 2012). С этой целью создаются даже экспериментальные установки, совмещающие ДСК и криомикроскоп (Yuan, Diller, 2005). ДСК 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 (КРС); в англоязычной литературе КРС часто называется Рамановской (Raman) спектроскопией (Dong et al., 2010; Okotrub et al., 2013). Суть метода спектроскопии КРС 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} – 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, спектр КРС оказывается чувствителен к различным факторам, таким как агрегатное состояние вещества.

Микроскопный объектив позволяет фокусировать излучение в малые объемы. Поэтому совмещение КРС с микроскопом позволяет исследовать состав и состояние вещества с высоким ($\sim 1\text{ мкм}$) пространственным разрешением. В настоящее время уже продемонстрирована возможность детектирования внутриклеточного льда в клетках млекопитающих методом КРС (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 КРС, позволяет получать информацию не только об окружении, но и о состоянии самих клеток. Например, КРС оказывается чувствителен к упорядочению липидов в мембранах клетки и липидных каплях. На рис. 2 показаны спектры КРС в диапазоне соответствующем валентным колебаниям $\text{C}-\text{H}_2$ связи, полученные от эмбриона мыши при комнатных условиях и при температуре -120°C . Из сравнения видно, что в спектре замороженного эмбриона мыши наблюдаются острые пики на частотах 2849 и 2882 см^{-1} (1 см^{-1} равняется 30 ГГц), относящиеся колебаниям $\text{C}-\text{H}_2$ связи. Эти спектральные изменения связаны с упорядочением неполярных углеродных цепочек липидов при низких температурах.

Таким образом, применение КРС 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 емкости 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 размороженных 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 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 флуорохромом диацетатом флуоресцеина (ФДА) 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 ФДА и йодистым пропицием, 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 (ФДА), мы получили первые подтверждения того, что эмбрионы этого вида куньих 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*), успешно пережили криоконсервацию (Амстиславский и др., 2014). Окончательные выводы можно сделать, лишь убедившись в способности размороженных объектов развиваться *in vitro* или *in vivo*. Так, например, после теста с витальным красителем, мы получили 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.

СОХРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ВИДЕ КРИБАНКА ЭМБРИОНОВ И ГАМЕТ

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).

Замораживание семени

Замораживание мужских гамет – сперматозоидов является одним из основных методов, применяемых для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных (Landel, 2005; Mazur et al., 2008; Agca, 2012). После оттаивания замороженного семени можно получить зиготы и развивающиеся зародыши с использованием процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО); последующая же трансплантация полученных *in vitro* зародышей позволяет восстановить ту или иную линию лабораторных мышей (Landel, 2005). В частности, криоконсервация семени в сочетании с последующим ЭКО и трансплантацией полученных эмбрионов самкам-реципиентам является, на сегодняшний день, наиболее адекватным методом при сохранении генетических ресурсов трансгенных и нокаутных линий мышей (Agca, 2012).

Если же после оттаивания подвижность семени низкая, применяют интроцитоплазматическую инъекцию сперматозоидов или ИКСИ (Intra-cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) (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 интроцитоплазматическая инъекция селекционированных по морфологии сперматозоидов или ИМСИ (Intra-cytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection, IMSI) (Berkovitz et al., 2005).

Другим путем восстановления живых особей из замороженного семени является искусственное осеменение (ИО) (Foote et al., 2002). Несмотря на то, что ИО 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 мы-

шей 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 ИО. 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, чем традиционное ИО, однако широкого практического применения при работах связанных с сохранением генетических ресурсов лабораторных грызунов они пока не получили (Landel, 2005; Agca, 2012).

На сегодняшний день, наилучшие результаты при замораживании семени лабораторной мыши, получаются при использовании обезжиренного молока и раффинозы в качестве криопротекторов (Takeshima et al., 1991). Относительно недавно появились эффективные протоколы для замораживания семени крыс с использованием яичного желтка, моногидрата лактозы и трис-гидроксиметил-аминометана (Seita et al., 2011). Замораживание семени как мышей, так и крыс, обычно проводят без использования программного замораживателя, выдерживая соломинку с семенем в парах жидкого азота, после чего помещают ее в жидкий азот.

Помимо лабораторных мышей и крыс, в мире уже существуют криобанки, в которых хранятся сперматозоиды различных линий данио-рерио (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, способы замораживания семени псовых хорошо разработаны (Thomassen, Farstad, 2009). Семья кошачьих чаще всего замораживают используя глицерин и яичный желток в качестве криопротекторов (Luvoni, 2006). Наш собственный опыт свидетельствует о том, что сперматозоиды кошачьих можно успешно замораживать с использованием разбавителей семени, выпускаемых для замораживания семени псовых (Амстиславский и др., 2014). Опубликованы работы, свидетельствующие о возможности замораживания и 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 не столь воспроизводимы,

как на мышах; эксперименты по совершенствованию методов замораживания семени этих видов животных продолжают (Mazur et al., 2008).

Замораживание ооцитов

Криоконсервация женских гамет большинства видов млекопитающих, в отличие от замораживания сперматозоидов, до сих пор вызывает сложности. 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/размораживания приводят к самопроизвольному 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 яйцеводы) 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; Agca, 2012). Между тем, 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 рыб, поскольку среди рыб появился перспективный объект генетических исследований – данио-рерио (Agca, 2012). Криоконсервация яйцеклеток рыб, однако, представляет особую сложность из-за структурных барьеров, которые мешают проникновению криопротекторов, а также повышенной чувствительности их к охлаждению (Robles et al., 2009); подробнее эти проблемы и подхо-

ды к их преодолению обсуждаются в последнем разделе нашего обзора.

Замораживание яичниковой ткани

Экспериментально было показано, что возможно успешно трансплантировать яичниковую ткань мышей соответствующим реципиентам как до, так и после криоконсервации (Cox et al., 1996; Snow et al., 2002). Как ортотопическая, так и гетеротопическая трансплантация яичниковой ткани иммунодефицитным реципиентам другой линии или даже другого вида являются перспективными подходами к сохранению генетических ресурсов лабораторных животных, особенно при сохранении трансгенных линий мышей, имеющих репродуктивные проблемы (Cox et al., 1996; Snow et al., 2002; Dorsch, Wedekind, 2010). В настоящее время яичниковую ткань мышей успешно замораживают как при помощи программного замораживания (Cox et al., 1996), так и при помощи витрификации (Chen et al., 2006).

На рис. 3 представлены результаты эксперимента по гетеротопической трансплантации яичниковой ткани мышей, проведенного в нашей лаборатории. Яичниковая ткань мышей линии 129S2/SvPasCrl 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 трансплантата 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 (Agca, 2012).

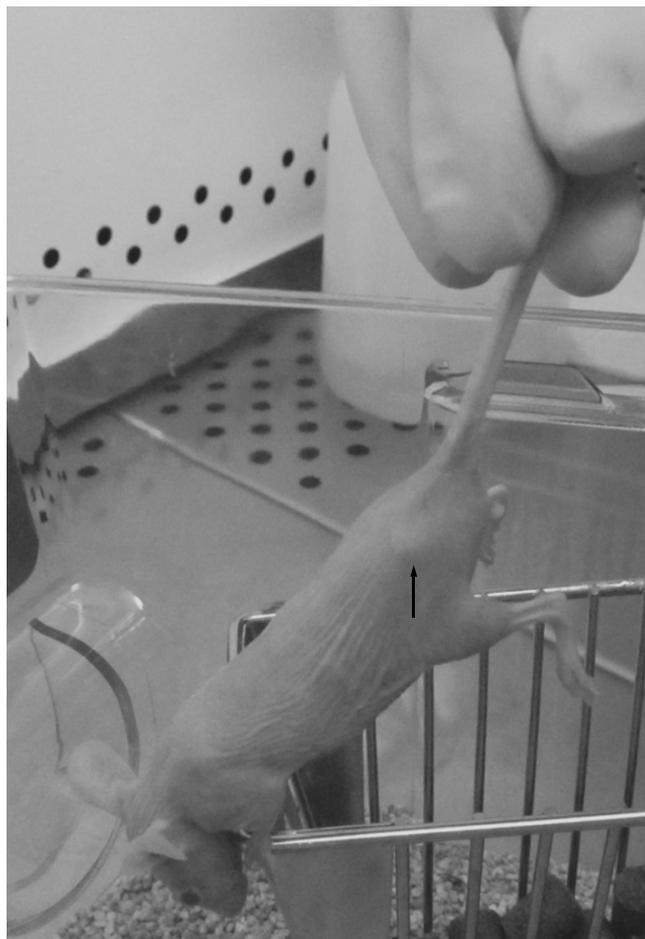


Рис. 3. Результат эксперимента по трансплантации яичниковой ткани у мышей. Яичниковая ткань мышей линии 129S2/SvPasCrl была пересажена овариэктомированным реципиентам линии SCID/SHO-Prkdcscid подкожно. Прижившаяся в результате гетеротопической трансплантации яичниковая ткань выделяется в виде бугорка (отмечено стрелкой).

Сохранение генетических ресурсов лабораторных животных в виде 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). Считается, что линию мышей 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 (Rall et al., 2000; Glenister, Thornton, 2000; Landel, 2005; 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, где различные породы собак или кошек сохранялись бы в виде замороженных эмбрионов. Лишь относительно недавно удалось найти адекватные способы замораживания эмбрионов свиней (Dobrinsky et al., 2001). Что касается данио-рерио, то пока не известно успешных попыток замораживания эмбрионов этого вида рыб (Agca, 2012).

В криобанке, созданном нами в ИЦиГ СО РАН в Новосибирске сохраняются, главным образом в виде замороженных эмбрионов, 6 линий/сублиний крыс, а также 30 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 (specific pathogen free), наш 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 вспомогательных репродуктивных технологий нам удалось получить потомство и редезивировать, то есть перевести из конвенционального в SPF-статус семь линий/сублиний крыс, а также четыре линии и один мутантный сток мышей (Амстиславский и др., 2013).

ПРОБЛЕМЫ ПРИ СОЗДАНИИ КРИБАНКОВ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

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, данио-рерио являются, в настоящее время, одним из самых популярных лабораторных объектов востребованных для генетических и биомедицинских исследований. Между тем, ни эмбрионы ни 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).

Делаются попытки обойти проблему путем замораживания фолликулов яичников данио-рерио и осуществляя дозревание этих фолликулов *in vitro*; получены первые обнадеживающие результаты (Tsai et al., 2009; 2010). Интересный и оригинальный подход к замораживанию эмбрионов данио-рерио был предложен группой американских исследователей. Они ввели в эмбрионы мРНК аквапорина-3, который 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 или яйцеклеток данио-рерио достичь пока не удалось.

Трупный червь (*Caenorhabditis elegans*) в последние десятилетия широко используется для исследований в различных областях биологии, в связи с чем появилась потребность в разработке способа криоконсервации этого вида. В конце концов, удалось успешно заморозить взрослых особей, которые являются многоклеточными организмами, состоящими из сотен клеток и обладающими нервной системой (Hayashi et al., 2013). Это, на наш взгляд, является существенным достижением, поскольку, чем больше и сложнее объект, тем более проблематичней осуществить его успешную криоконсервацию (Mazur, 1970; 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 (Dobrynsky, 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 может произойти летальная девитрификация образца (Mazur, 1990). 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.

Авторы благодарят Н.В. Суровцева и Т.О. Абрамову за обсуждение рукописи статьи и ценные замечания. Работа выполнена при поддержке РФФИ № 13-04-00685, а также бюджетного проекта VI.53.2.1. Института Цитологии и Генетики СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я., Абрамова Т.О., Брусенцев Е.Ю., Кизилова Е.А.* Криоконсервация и сохранение био-разнообразия // Природа. 2014. № 5. С. 24–33.
- 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.
- Амстиславский С.Я., Трушкин И.С.* Криобанк эмбрионов млекопитающих: выбор приоритетов и оптимальных репродуктивных технологий // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 1. С. 19–31.
- 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.
- 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.
- 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”. 2014. С. 247–248.
- Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н.* Проблема сохранения генофонда // Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР. 1984. 47 с.
- Жмакин А.И.* Физические основы криобиологии // Успехи физических наук. 2008. Т. 178. № 3. С. 243–266.
- Иволгин Д.А., Смолянинов А.Б., Багаутдинов Ш.М. и др.* Современные системы ИТ-мониторинга условий криогенного хранения биологического материала в банке пуповинной крови // Вестник Международной академии холода. 2013. № 1. С. 48–50.
- Мяленкова И.Ю.* Лабораторная собака // Лабораторные животные. 1994. Т. 4. № 4. С. 234–246.
- Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я.* Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий // Онтогенез. 2012. № 5. С. 1–11.
- 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.
- Abbott A. Geneticists prepare for deluge of mutant mice // Nature. 2004. V. 432. P. 541.
- Adams D.J., van der Weyden L. Contemporary approaches for modifying the mouse genome // Physiol. Genomics. 2008. V. 34. P. 225–238.
- Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals // Theriogenology. 2012. V. 78. P. 1653–1665.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in *Carnivora* // Reprod. Dom. Anim. 2012. V. 47. P. 164–175.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Aalto J., Kennedy M. Conservation of the European mink (*Mustela lutreola*): focus on reproduction and reproductive technologies // Reprod. Dom. Anim. 2008. V. 43. P. 502–513.
- 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., Amstislavskaya T., Stein M. et al. Embryo cryobanking for conserving laboratory and wild animal species // Scand. J. Lab. Anim. Sci. 1996. V. 23. P. 269–277.
- 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.
- Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos // Theriogenology. 2014. V. 81. P. 96–102.
- 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.
- 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. P. 185–190.
- 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.
- 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.
- Bwanga C.O. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review // Acta. Vet. Scand. 1991. V. 32. P. 431–453.
- 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.
- 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. P. 2794–2800.
- Comizzoli P., Crosier A.E., Songsasen N. et al. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation // Reprod. Dom. Anim. 2009. V. 44. P. 47–52.
- Cox S.L., Shaw J., Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice // J. Reprod. Fertil. 1996. V. 107. P. 315–322.
- De Artiñano A., Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome // Br. J. Nutr. 2009. V. 102. P. 1246–1253.
- Diller K.R. Pioneers in Cryobiology: Julius von Sachs (1832–1897) // Cryo-Letters. 1996. V. 17. P. 201–212.
- Dobrinsky J.R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future // Theriogenology. 2001. V. 56. P. 1333–1344.
- 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. P. 2453–2459.
- Dorsch M., Wedekind D. Cryopreservation and orthotopic transplantation of rat ovaries // Methods Mol. Biol. 2010. V. 597. P. 301–310.
- 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.
- Ekker S.C. Zinc finger-based knockout punches for zebrafish genes // Zebrafish. 2008. V. 5. P. 121–123.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species // Eur. J. Wildl. Res. 2007. V. 53. P. 81–89.
- FIMRe Board of Directors. FIMRe: Federation of international mouse resources: global networking of resource centers // Mammal. Genome. 2006. V. 17. P. 363–364.
- Flint J., Eskin E. Genome-wide association studies in mice // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. P. 807–817.
- Foote R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables // J. Anim. Sci. 2002. V. 80. P. 1–10.
- Frankham R. Genetics and conservation biology // C. R. Biol. 2003. V. 326. P. 22–29.
- 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. P. 459–466.
- Glenister P., Thornton C. Cryoconservation – archiving for the future // Mammal. Genome. 2000. V. 11. P. 565–571.
- 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.

- Griffin B., Baker H.J. Domestic cats as laboratory animals // New York: Academic Press. 2002. Chapter 12 in Laboratory Animal Medicine. 2nd edition.
- 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.
- 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. P. 961–966.
- Hagedorn M., Hsu E.W., Pilatus U. et al. Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartimental biological system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7454–7459.
- Han B., Bischof J.C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing // Cryobiology. 2004. V. 48. P. 8–21.
- Hayashi M., Amino H., Kita K., Murase N. Cryopreservation of nematode *Caenorhabditis elegans* in the adult stage // Cryo. Letters. 2013. V. 34. P. 388–395.
- 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.
- Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. 2003. V. 46. P. 205–229.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome // Nature. 2004. V. 431. P. 931–945.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kimura Y., Yanagimachi R. Intracytoplasmic Sperm Injection in the Mouse // Biol. Reprod. 1995. V. 52. P. 709–720.
- Landel C.P. Cryopreservation of mouse gametes and embryos // Methods Enzymol. 2010. V. 476. P. 85–105.
- Landel C.P. Archiving mouse strains by cryopreservation // Lab. Anim. 2005. V. 34. P. 50–57.
- Leibo S. P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species // Theriogenology. 2002. V. 57. P. 303–326.
- 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. P. 549–560.
- 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.
- Luvoni G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat // Theriogenology. 2006. V. 66. P. 101–111.
- Luyet B.J. The vitrification of organic colloids and protoplasm // Biodynamica. 1937. № 29. P. 1–14.
- 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. P. 347–355.
- 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. P. 1550–1553.
- 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. P. 2–12.
- Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // Cell Biophys. 1990. V. 17. P. 53–92.
- Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems // Science. 1970. V. 168. P. 939–949.
- McGann L. E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents // Cryobiology. 1978. V. 15. P. 382–390.
- 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.
- Mobraaten L. Mouse Embryo Cryobanking // J. of in vitro Fertilization and Embryo Transfer. 1986. V. 3. P. 28–32.
- 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.
- 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.
- 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.
- Morris J.P., Berghmans S., Zahrieh D. et al. Zebrafish sperm cryopreservation with N,N-dimethylacetamide // Biotechniques. 2003. V. 35. P. 956–958.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome // Nature. 2002. V. 420. P. 520–562.
- Mullen S.F., Critser J.K. The science of cryobiology // Cancer Treat Res. 2007. V. 138. P. 83–109.
- 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.
- 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.
- NISC Comparative Sequencing Program.* Initial sequence and comparative analysis of the cat genome // *Genome Res.* 2007. V. 17. P. 1675–1689.
- 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.
- Okotrub K.A., Surovisev N.V.* Raman scattering evidence of hydrohalite formation on frozen yeast cells // *Cryobiology.* 2013. V. 66. P. 47–51.
- 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.
- Pinto Y.M., Paul M., Ganten D.* Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering // *Cardiovasc. Res.* 1998. V. 39. P. 77–88.
- 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.
- 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.
- 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. P. 1–12.
- Rat Genome Sequencing Project Consortium.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution // *Nature.* 2004. V. 428. P. 493–521.
- 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.
- Robles V., Cabrita E., Herraiz M.P.* Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species // *Zebrafish.* 2009. V. 6. P. 281–293.
- 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.
- Saragusty J., Arav A.* Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // *Reproduction.* 2011. V. 141. P. 1–19.
- 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.
- 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.
- 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. P. 3507–3512.
- Shek W.R.* Role of housing modalities on management and surveillance strategies for adventitious agents of rodents // *ILAR J.* 2008. V. 49. P. 316–325.
- Snow M., Cox S.L., Jenkin G. et al.* Generation of live young from xenografted mouse ovaries // *Science.* 2002. V. 297. № 5590. P. 2227.
- Takehima T., Nakagata N., Ogawa S.* Cryopreservation of mouse spermatozoa // *Jikken Dobutsu.* 1991. V. 40. P. 493–497.
- The Canine Genome Sequencing Project.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog // *Nature.* 2005. V. 438. P. 803–819.
- Thomassen R., Farstad W.* Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation // *Theriogenology.* 2009. V. 71. P. 190–199.
- 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.
- 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.
- Vajta G., Nagy Z.P., Cobo A. et al.* Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion // *Reprod. Biomed. Online.* 2009. V. 19. P. 1–7.
- Willadsen S.M.* Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing // *Ciba. Found. Symp.* 1977. № 52. P. 175–201.
- 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.
- Whyte J.J., Prather R.S.* Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture // *Mol. Reprod. Dev.* 2011. V. 78. P. 879–891.
- Wolfe H.G.* Artificial insemination of the laboratory mouse (*Mus musculus*) // *Lab. Anim. Care.* 1967. V. 17. P. 426–432.
- 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.
- Yoshiki A., Ike F., Mekada K. et al.* The mouse resources at the RIKEN BioResource center // *Exp. Anim.* 2009. V. 58. P. 85–96.
- Yuan S., Diller K.R.* An optical differential scanning calorimeter cryomicroscope // *J. Microsc.* 2005. V. 218. P. 85–93.
- Zambelli D., Cunto M.* Transcervical artificial insemination in the cat // *Theriogenology.* 2005. V. 64. P. 698–705.
- Zhang W., Yi K., Yan H., Zhou X.* Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos // *Anim. Reprod. Sci.* 2012. V. 132. P. 115–122.
- Zhang T., Kawson D.M., Morris G.J.* Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish // *Aquar. Living Resour.* 1993. V. 6. P. 145–153.

Embryos and Gametes Cryopreservation for Genetic Resources Conservation of Laboratory Animals

S. Ya. Amstislavsky^{a, b}, E. Yu. Brusentsev^a, K. A. Okotrub^c, I. N. Rozhkova^a

*^aInstitute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
pr. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

*^bNovosibirsk State University, ul. Pirogova 2,
Novosibirsk, 630090 Russia*

*^cInstitute of Automation and Electrometry, the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
pr. Koptuga 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Received August 17, 2014; in final form, November 3, 2014

Article reviews the use of embryos and gametes cryopreservation for cryobanking the laboratory animal species. The special emphasis is made on the mechanisms of cryoinjury and cryoprotection during program freezing and vitrification. The species specific cryobanking problems are discussed and the prospects to overcome these problems are outlined.

Keywords: cryopreservation, preimplantation embryos, gametes, laboratory animals