

УДК 574/577,576.37,591.16,57.085.23,575.86

## РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ И КОНСЕРВАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ КОШАЧЬИХ

© 2017 г. С. Я. Амстиславский<sup>а, \*</sup>, В. В. Кожевникова<sup>а, b</sup>, В. В. Музыка<sup>а</sup>, Е. А. Кизилова<sup>а, b</sup>

<sup>а</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 10

<sup>б</sup>Новосибирский государственный университет  
630090 Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

\*E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.04.2016 г.

Окончательный вариант получен 18.10.2016 г.

В обзоре представлены основные результаты применения традиционных и современных репродуктивных технологий с целью сохранения генетических ресурсов кошачьих. Произведен анализ классификации видов и подвидов кошачьих с учетом результатов молекулярно-биологических исследований. Особое внимание уделено таким ключевым технологиям, как получение и криоконсервация семени с последующим искусственным осеменением, а также технологиям, связанным с дозреванием ооцитов *in vitro*, экстракорпоральным оплодотворением и последующим развитием эмбрионов кошачьих в культуре.

**Ключевые слова:** кошачьи, консервация генетических ресурсов, гаметы, эмбрионы, культивирование *in vitro*

**DOI:** 10.7868/S0475145017020021

### КЛАССИФИКАЦИЯ КОШАЧЬИХ И СОВРЕМЕННЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Все ныне существующие виды кошек объединены в 8 родов (Johnson et al., 2006). Общий план строения тела и характерные для семейства особенности присущи всем видам кошачьих, независимо от их размера (Macdonald et al., 2010; Kitchen et al., 2010). Постоянное сужение мест обитания в связи с расширением хозяйственной деятельности человека привели к тому, что многие виды данного семейства приобрели статус “находящегося под угрозой исчезновения” или “исчезающего” вида (табл. 1).

Большинство представителей диких кошек – небольшого размера, 32 вида из 39 существующих имеют массу тела не более 30 кг (Sunquist and Sunquist, 2002). Имеется лишь семь видов крупных кошек: лев, тигр, леопард, ягуар, снежный барс, а также пума и гепард. Перечисленные виды крупных кошек представлены весьма многочисленными популяциями, разводимыми в неволе (табл. 1). Именно на сохранение этих видов направляются основные средства из соответствующих фондов, связанных с сохранением дикой фауны (Wilting et al., 2015). Следует отметить, что и среди мелких кошачьих также имеются исчезающие или находящиеся под угрозой исчезнове-

ния виды (Nowell, 2002), однако эти виды привлекали гораздо меньше внимания исследователей по сравнению с крупными видами этого семейства (Brodie, 2009). Лишь у нескольких видов мелких кошек (весом до 30 кг) разводимая в неволе популяция превышает 200–300 особей (табл. 1).

Крупные кошки представлены, главным образом, родом *Panthera*: лев, леопард, ягуар, тигр и снежный барс, или ирбис. Эти виды являются хорошо изученными в плане их биологии, экологии и систематики (Mattern, McLennon, 2000; Macdonald et al., 2010). Особенности репродуктивной биологии каждой из пяти больших кошек изучены достаточно основательно, что позволило применять по отношению к этим видам репродуктивные технологии (Donoghue et al., 1990, 1992; Roth et al., 1994; Morato et al., 2000; Jayaprakash et al., 2001; Goeritz et al., 2012).

Роды *Neofelis*, *Pardofelis* и *Prionailurus* представлены исключительно азиатскими видами (Johnson et al., 2006; Macdonald et al., 2010). Дымчатый и борнейский леопард составляют род *Neofelis* (Buckley-Beason et al., 2006). Репродуктивная биология этих двух видов изучалась, и к ним применялись репродуктивные технологии (Howard et al., 1996; Pukazhenthil et al., 2006b). Род *Pardofelis* представлен относительно небольшими по размеру видами семейства кошачьих: калимантанской

Таблица 1. Современная классификация кошачьих и их консервационный статус

Название	Статус	Число особей <i>ex situ</i>	Подвиды (число)	Ссылки на ключевые работы по отдельным видам <sup>a</sup>
Подсемейство <i>Pantherinae</i>				
Род <i>Panther</i>				
Лев ( <i>P. leo</i> )	Vu	~500 <sup>b</sup>	2	Barnett et al., 2006
Ирбис ( <i>P. uncia</i> )	EN	477	1	Jackson et al., 2010
Ягуар ( <i>P. onca</i> )	NT	~100	1	Ruiz-Garcia et al., 2006
Тигр ( <i>P. tigris</i> )	EN	1626	6	Wilting et al., 2015
Леопард ( <i>P. pardus</i> )	NT	610	9	Uphyrkina et al., 2001
Род <i>Neofelis</i>				
Дымчатый леопард ( <i>N. nebulosi</i> )	VU	366	1	Buckley-Beason et al., 2006
Борнейский дымчатый леопард ( <i>N. diardi</i> )	VU		1	
Подсемейство <i>Felinae</i>				
Род <i>Pardofelis</i>				
Калимантанская кошка ( <i>P. babia</i> )	EN	–	1	Sastramidjaja et al., 2015
Кошка Темминка ( <i>P. temminckii</i> )	VU	52	3	Lueders et al., 2014
Мраморная кошка ( <i>P. marmorata</i> )	NT	мало <sup>c</sup>	3	Luo et al., 2014
Род <i>Prionailurus</i>				
Бенгальская кошка ( <i>P. bengalensis</i> )	LC	~150	12	Tamada et al., 2008
Суматранская кошка ( <i>P. planiceps</i> )	EN	мало	1	Wilting et al., 2010
Кошка-рыболов ( <i>P. viverrinus</i> )	EN	246	1	Mukherjee et al., 2012
Пятнисто-рыжая кошка ( <i>P. rubiginosus</i> )	Vu	56	2	Dmoch, 1997
Род <i>Caracal</i>				
Золотая кошка ( <i>C. aurata</i> )	VU	мало	2	Bahaa-el-din et al., 2014
Каракал ( <i>C. caracal</i> )	LC	233	1	Macdonald et al., 2010
Сервал ( <i>C. serval</i> )	LC	~200	18	Sunquist, Sunquist, 2002
Род <i>Lynx</i>				
Обыкновенная рысь ( <i>L. lynx</i> )	LC	~100	6	Найденко, Ерофеева, 2004
Иберийская рысь ( <i>L. pardinus</i> )	En	мало	1	Leon-Quinto et al., 2009
Канадская рысь ( <i>L. canadensis</i> )	LC	~50	2	Poole, 2003
Рыжая рысь ( <i>L. rufus</i> )	LC	~100	12	Lariviere, Walton, 1997
Род <i>Puma</i>				
Пума ( <i>Puma concolor</i> )	LC	~300	6	Culver et al., 2000
Ягуарунди ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> )	LC	~50	8	De Oliveira, 1998a
Гепард ( <i>Acinonyx jubatus</i> )	VU	1663	5	Krausman, Morales, 2005
Род <i>Leopardus</i>				
Андская кошка ( <i>L. jacobita</i> )	EN	–	1	Yensen, Seymour, 2000
Кот Жоффруа ( <i>L. geoffroyi</i> )	LC	~50	1	Nascimento, 2014
Чилийская кошка ( <i>L. guigna</i> )	VU	–	2	Napolitano et al., 2014

Таблица 1. Окончание

Название	Статус	Число особей <i>ex situ</i>	Подвиды (число)	Ссылки на ключевые работы по отдельным видам <sup>a</sup>
Оцелот ( <i>L. pardalis</i> )	LC	~100	10	Murray, Gardner, 1997
Маргай ( <i>L. wiedii</i> )	NT	~100	10	De Oliveira, 1998b
Пампасский кот ( <i>L. colocolo</i> )	NT	мало	5	Bagno et al., 2004
Онцилла ( <i>L. tigrinus</i> )	VU	мало	4	Trigo et al., 2013
Род <i>Felis</i>				
Манул ( <i>F. manul</i> )	NT	175	3	Swanson et al., 2007
Китайская кошка ( <i>F. bieti</i> )	Vu	мало	1	He et al., 2004
Лесная кошка ( <i>F. silvestris</i> )	LC	66	5	Driscoll et al., 2007
Барханная кошка ( <i>F. margarita</i> )	NT	174	4	Cole, Wilson, 2015
Черноногая кошка ( <i>F. nigripes</i> )	VU	75	2	Renard et al., 2015
Камышовый кот ( <i>F. chaus</i> )	LC	~100	10	Duckworth et al., 2005

<sup>a</sup> Базовыми работами, на которых основана принятая в данной таблице классификация, являются Wozencraft, 2005 и Johnson et al., 2006. Наиболее полное описание по каждому из видов в соответствующих ссылках данной колонки. <sup>b</sup> В случае, если число особей *ex situ* не известно с точностью до одного животного стоит значок приблизительно “~”. <sup>c</sup> В тех случаях, когда в мире имеются лишь отдельные особи в зоопарках и других коллекциях и воспроизводимая популяция отсутствует, число особей *ex situ* обозначено как “мало”.

кошкой (историческое название *Catopuma badia*), кошкой Темминка (историческое название *Catopuma temminckii*) и мраморной кошкой. Если к мраморной кошке (Thongphakdee et al., 2010) и кошке Темминка (Lueders et al., 2014) репродуктивные технологии применяли, то каких-либо попыток их применения к калимантанской кошке не производилось. Род *Prionailurus* – это бенгальская кошка, кошка-рыболов, суматранская и пятнисто-рыжая кошка (Johnson et al., 2006). Репродуктивные технологии применяли по отношению к пятнисто-рыжей кошке (Mellen, 1993; Gomez et al., 2009; Wiedemann et al., 2013), суматранской кошке (Thongphakdee et al., 2010; Thuwanut et al., 2011), коту-рыболову (Mellen, 1993; Thiangtum et al., 2006; Pore et al., 2006) и бенгальской кошке (Wildt et al., 1992; Ha et al., 2011).

Род каракалов включает в себя три вида африканских и афро-азиатских среднего размера кошек – африканскую золотистую кошку, каракала и сервала (Mattern, McLennon, 2000; Johnson et al., 2006). Репродуктивные технологии были применены только по отношению к двум видам этого рода, а именно – к каракалу (Pore et al., 2001, Pore et al., 2006) и сервалу (историческое название *Lep-tailurus serval*) (Pore et al., 2005; Wiedemann et al., 2013). Что касается африканской золотистой кошки (историческое название *Profelis aurata*), то она остается малоизученной, что, отчасти обусловлено тем, что в неволе этот вид не имеет устойчивой популяции (табл. 1).

Род рыси (*Lynx*) представлен четырьмя видами: рысь евразийская, канадская, иберийская и красная (Macdonald et al., 2010). Репродуктивная биология этих видов в большей или меньшей мере изучена (Lariviere, Walton, 1997; Найденко, Ерофеева, 2004; Henriksen et al., 2005). В отличие от других видов рыси, которые моноэстричны, красная рысь сезонно полиэстрична (Lariviere, Walton, 1997). Репродуктивные технологии применялись, главным образом, по отношению к красной рыси (Ganan et al., 2009a) и к иберийской рыси (Ganan et al., 2009b; Ganan et al., 2010). Более того, по отношению к иберийской рыси предпринимаются попытки создания банка генетических ресурсов этого вида (Leon-Quinto et al., 2009).

Род *Puma* объединяет двух весьма крупных кошек (пума и гепард) и один мелкий вид кошачьих – ягуарунди (Johnson et al., 2006). Особенности биологии размножения всех трех видов изучены достаточно полно (Mellen, 1993; de Oliveira et al., 1998a; Krausman, Morales, 2005; Pukazhenth et al., 2006). Репродуктивные технологии применялись по отношению к каждому из них (Johnston et al., 1991; Swanson, Brown, 2004; Terrell et al., 2012).

Род *Leopardus* (тигровых кошек), как считалось ранее, включает в себя семь видов (Johnson et al., 2006), однако, недавние исследования показали наличие восьми видов (Trigo et al., 2013). Многие кошки рода *Leopardus* весьма слабо представлены в неволе (табл. 1). Например, андская кошка (историческое название *Oreailurus jacobita*) и чилийская кошка (историческое название *Oncifelis guig-*

на) вообще не имеют разводимых в неволе популяций, а онцилла и пампасский кот представлены лишь единичными особями (табл. 1). Имеется относительно крупная популяция оцелота (Nowell, Jackson, 1996), однако, сестринский оцелоту вид — маргай весьма сложен для разведения в зоопарках в силу высокой степени приспособленности к арбореальному (древесному) образу жизни и низкой плодовитости (De Oliveira, 1998b). Из кошек рода *Leopardus* репродуктивная биология лучше всего изучена у оцелота и совершенно не изучена у андской кошки (Murray, Gardner, 1997; Yensen, Seymour, 2000; Swanson et al., 2003; Swanson, Brown, 2004). По остальным представителям рода *Leopardus* имеются отдельные наблюдения за их репродуктивной биологией и отдельные попытки применения репродуктивных технологий (Mellen, 1993; Swanson et al., 2003; 2007; Swanson, Brown, 2004).

Род *Felis* включает домашнюю кошку и шесть ближайших к ней родственных видов (Johnson et al., 2006). Домашнюю кошку (*F. catus*) иногда признают отдельным видом рода (Wozencraft, 2005), хотя генетически она практически идентична степному коту (*F. silvestris lybica*) (Driscoll et al., 2007). В неволе лучше всего представлены популяции манула и барханной кошки, несколько хуже — лесной, черноногой и камышового кота; китайская же кошка практически вообще не представлена в неволе (табл. 1; Nowell, Jackson, 1996; Swanson et al., 2007; International studbooks, 2014; Cole, Wilson, 2015).

В литературе имеются работы по применению вспомогательных репродуктивных технологий на мануле (Swanson et al., 2007), лесной (Gomez et al., 2004, 2009), черноногой (Gomez et al., 2006; Swanson et al., 2007; Herrick et al., 2010a, 2010b; Pope et al., 2012) и барханной (Herrick et al., 2005; 2010a; Gomez et al., 2008) кошках, а также на камышовом коте (Thuwanut et al., 2013).

#### ПОЛУЧЕНИЕ И ЗАМОРАЖИВАНИЕ СЕМЕНИ КОШАЧЬИХ. ИСКУССТВЕННОЕ ОСЕМЕНЕНИЕ

У кошачьих семя получают, преимущественно, двумя универсальными способами, либо при помощи электрорэякуляции, либо из эпидидимисов, полученных в результате орхиэктомии и/или *post mortem* (Zambelli, Cunto, 2006; Luvoni, 2006). Наряду с этим, иногда применяют мануальное взятие семени при помощи искусственной вагины (Sojka et al., 1970; Platz et al., 1978; Johnston et al., 2001). В своей классической работе Платц с соавторами показали, что характеристики семени, полученного при помощи электрорэякуляции хуже, чем при использовании искусственной вагины (Platz et al., 1978). Мануальное взятие семени с помощью искусственной вагины применяют лишь по отношению к домашним, но не диким кошачьим (Johnston et al., 2001; Zambelli, Cunto,

2006). Относительно недавно стали применять способ получения семени как у самцов домашнего кота (Zambelli, Cunto, 2006), так и у диких видов кошачьих (Lueders et al., 2012, 2014), в условиях воздействия медитомедина, под наркозом, при помощи катетера, вводимого через уретру.

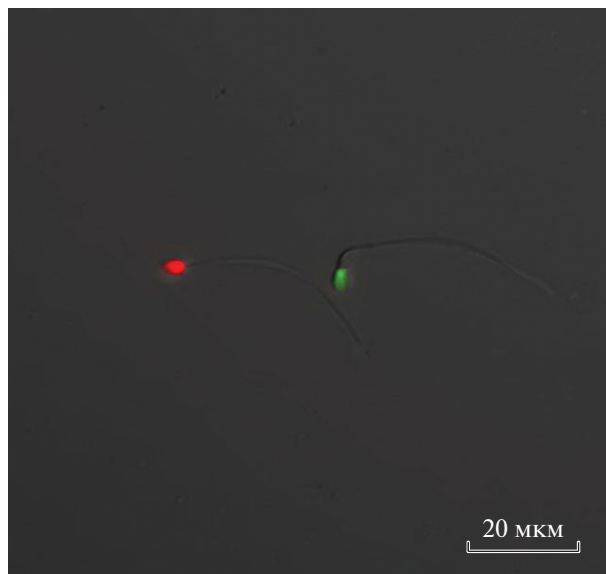
Возможность успешного замораживания семени была впервые продемонстрирована на домашнем коте (Platz et al., 1978; Luvoni, 2006). Семя кошачьих замораживают либо в гранулах, охлаждая дозы семени без какого-либо контейнера, при температуре сухого льда и после этого погружая в жидкий азот (Platz et al., 1978), либо в соломинах (Luvoni, 2006); причем последний способ используют гораздо чаще (Pukazhenthithi et al., 2006; Thiangtum et al., 2006; Terrell et al., 2012). При этом сначала производят инкубирование семени при температуре +5°C не менее 20 мин и охлаждают соломины с суспензией сперматозоидов в криопротективной смеси в парах азота 10–30 мин со скоростью около 10°C/мин до –80°C; по окончании периода охлаждения погружают соломины в жидкий азот (Luvoni, 2006).

Второй способ замораживания кошачьего семени с небольшими модификациями был успешно проверен и верифицирован на основных группах диких кошачьих: из рода *Panthera* (Morato et al., 2001; Swanson et al., 2003); *Neofelis* (Pukazhenthithi et al., 2006); *Pardofelis* (Lueders et al., 2014); *Prionailirus* (Thiangtum et al., 2006; Ha et al., 2011); *Lynx* (Ganan et al., 2010); *Puma* (Swanson et al., 2003; Terrell et al., 2012); *Leopardus* (Swanson, Brown, 2004), *Felis* (Thuwanut et al., 2013). Как показатели результаты этих исследований, сперматозоиды диких видов кошачьих более чувствительны к охлаждению и криоконсервации по сравнению с домашним котом (Terrell et al., 2012) и требуют иногда специальных подходов при замораживании и оттаивании. В криобанке ИЦиГ СО РАН в настоящее время в замороженном виде хранится семя дальневосточного лесного кота, евразийской рыси и красной рыси.

Важным аспектом криоконсервации семени является выбор адекватного метода оценки его качества после замораживания и оттаивания. Весьма объективным способом является количественная и качественная оценка сперматозоидов с помощью компьютеризированного анализатора спермы (Filliers et al., 2008); этот способ был успешно применен и нашей группой (Абрамова и др., 2014). При отсутствии анализатора спермы можно применять более простые устройства, позволяющие производить количественную оценку сперматозоидов, такие как гемоцитометр Нэйбауэра, камера Маклера и др. По нашему мнению, последний является простым и удобным способом, который можно использовать как в лабораторных, так и в полевых условиях.



**Рис. 1.** Сперматозоиды домашнего кота после криоконсервации и проведения VitalScreen теста. Мертвые сперматозоиды окрашены, живой сперматозоид не окрашен.



**Рис. 2.** Сперматозоиды красной рыси после криоконсервации. Зеленая флуоресценция – живой сперматозоид (справа). Красная флуоресценция – мертвый сперматозоид (слева).

Особо следует остановиться на методах окрашивания, позволяющих дифференцировать живые и мертвые сперматозоиды, а также нарушения в отдельных их частях. Для выполнения этой задачи используют методы дифференциальной окраски, направленные на выявление целостности клеточной мембраны (Zambelli, Cunto, 2006; Thuwanut et al., 2008), состояния акросомы (Pukazhenthil et al., 2006; Ganani et al., 2009a), а также активности митохондрий и целостности ДНК (Buarpung et al., 2012). В своей практике работы с кошачьими мы с успехом использовали два метода подсчета соотношения живых и мертвых сперматозоидов: Eosin-nigrosin vitality test (Zambelli, Cunto, 2006) и Dead/Alive kit (Thuwanut et al., 2008). Первый способ основан на том, что эозин проникает через мембраны мертвых спермиев и окрашивает их, в отличие от живых. Нигрозин при этом создает фон, на котором различия между живыми и мертвыми сперматозоидами лучше заметны (рис. 1). Второй способ основан на том, что SYBR/green проникает в живые сперматозоиды и при использовании возбуждающего света с длиной волны 495 нм, такие сперматозоиды флуоресцируют в зеленой части спектра, в то время, как PI (йодистый пропидий) проникает в мертвые сперматозоиды и при использовании возбуждающего света с длиной волны 545 нм, такие сперматозоиды флуоресцируют в красной части спектра (Сайфитдинова, 2008) (рис. 2).

Возможность успешного искусственного осеменения (ИО) на домашней кошке была продемонстрирована при использовании как свежего

(Sojka et al., 1970), так и замороженно-оттаянного семени (Platz et al., 1978). В своей обзорной статье Тсутсуи провел сравнение внутривлагалищного и двух способов внутриматочного (хирургического и лапароскопического) осеменения у кошек (Tsutsui, 2006). Как следует из этого анализа, внутриматочное осеменение у домашней кошки было весьма эффективным и, во многих случаях, эффективность превышала 50%, но очень важными факторами успеха была правильно подобранная доза вводимого семени, способ провоцирования овуляции и интервал времени между овуляцией и осеменением.

Были проведены отдельные работы по искусственному осеменению диких кошачьих при помощи лапароскопа с использованием свежих или замороженно-оттаянных образцов спермы: на пумах (Barone et al., 1994), оцелоте и онцилле (Swanson, Brown, 2004), дымчатом леопарде (Howard et al., 1997), тигре (Donoghue et al., 1993), ирбисе (Roth et al., 1997), однако при этом, как правило, лишь единственная самка из многих осемененных принесла потомство.

Все приведенные выше исследования свидетельствуют о низкой эффективности ИО в отношении диких видов кошачьих. Однако в некоторых работах эффективность ИО была выше. При работе с гепардом, в частности, результат был несколько более убедительным: 32% осемененных свежим семенем, принесли потомство, причем размер выводка был 1–4 котенка (Howard et al., 1997). Еще больше оптимизма внушает недавно выполненное ИО кошки Темминка из зоо-

парка Мюнхена в Германии (Lueders et al., 2014). Единственный самец и единственная самка кошки Темминка в этом зоопарке не могли дать потомство в течение двух лет, поэтому пришлось прибегнуть к ИО. Осеменение проводили нехирургическим путем, трансцервикально внутриматочно, при помощи катетера. Эта попытка увенчалась успехом, и в результате родилось два котенка. Еще одна работа, которая является достаточно уникальной как по своему дизайну, так и по результативности, это осеменение свежим семенем бенгальской кошки самок домашней кошки. При этом 12 из 26 осемененных самок (46.2%) принесли потомство (Wildt et al., 1992).

### СОЗРЕВАНИЕ КОШАЧЬИХ ООЦИТОВ IN VITRO

В конце первого десятилетия XXI века исследователи репродуктивной биологии кошачьих стали активно применять методики созревания яйцеклеток *in vitro* (IVM — *in vitro* maturation) и их оплодотворения сначала на домашней кошке, а потом и на диких видах кошачьих. Важным аспектом культивирования яйцеклеток является создание сред для их созревания. Любая подобная среда состоит из четырех составляющих: (1) базовой среды с рН-регулирующими компонентами, (2) трофических компонентов, (3) антибиотиков, (4) гормонов и ростовых факторов.

В большинстве современных исследований для созревания ооцитов кошачьих использовали среду 199 (табл. 2): иногда вообще без добавок (Yildirim et al., 2013; Moro et al., 2014), иногда с солями Эрла (Luu et al., 2013; Fernandez-Gonzalez et al., 2015), либо с бикарбонатом натрия (Sananmuang, 2010; Rao et al., 2015). В некоторых работах была использована модификация среды 199, буферизованной HEPES (Uchikura et al., 2011; Luu et al., 2013). Альтернативно, в качестве базовой среды вместо среды 199 применяют MEM (Minimum Essential Medium) (Godard et al., 2009), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Martins et al., 2009) и mSOF (modified Synthetic Oviductal Fluid) (Evecen et al., 2009).

В некоторых исследованиях для созревания ооцитов кошек достаточно простых среды, в составе которых полностью отсутствуют (Evecen et al., 2009) или присутствуют лишь отдельные (Thiangtum et al., 2006; Naoi et al., 2007; Hermansson et al., 2007; Luu et al., 2013) трофические компоненты (табл. 3). Довольно универсальным компонентом сред для созревания яйцеклеток кошачьих является бычий сывороточный альбумин (БСА) в концентрации от 3 до 5 мг/мл (табл. 3), который служит для поддержания осмотического равновесия в среде, но может также рассматриваться и как трофический компонент (Брусенцев и др., 2014). В качестве трофических компонентов в среду для

дозревания *in vitro* ооцитов кошачьих, наряду с БСА, добавляют пируват, лактат, цистеин и L-глутамин (табл. 2), хотя набор и концентрации этих добавок сильно различаются, и они не являются необходимыми для полноценного созревания кошачьих ооцитов.

Даже при применении относительно бедных сред, не содержащих или почти не содержащих трофических добавок, достаточно много ооцитов может созреть в условиях *in vitro*. В одной из работ (Naoi et al., 2007), используемая для IVM кошечек среда не содержала никаких трофических компонентов кроме БСА, тем не менее, 40.8% незрелых ооцитов после дозревания *in vitro*, достигли стадии МII мейоза. В работе турецких исследователей трофические компоненты в среде для созревания ооцитов отсутствовали полностью (Evecen et al., 2009). Однако это не повлияло негативным образом на процесс созревания ооцитов и, в наиболее успешной группе, 50.7% ооцитов за 48 ч нахождения в культуре созрели, достигнув стадии МII.

В отношении выбора антибиотиков также нет единой общепризнанной комбинации (табл. 2). В работе Херманссон с соавторами (Hermansson et al., 2007) базовая среда для созревания ооцитов кошек не содержала антибиотика. В других работах в качестве антибиотика добавляли 50 мкг/мл гентамицина (Naoi et al., 2007), что послужило примером для более поздних работ (Tsujioka et al., 2008; Pope et al., 2012). Альтернативным вариантом антибиотической составляющей является сочетание пенициллина, в концентрации 100 единиц активности/мл со стрептомицином в концентрации 100 мкг/мл (Godard et al., 2009; Rao et al., 2015).

Другой вариативной составляющей сред для созревания ооцитов кошачьих являются гормоны и ростовые факторы (табл. 2). Достаточно часто в качестве гормонов используют комбинацию человеческого хорионического гонадотропина (ЧХГ) и гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) (Hermansson et al., 2007; Pope et al., 2012; Moro et al., 2014). В некоторых работах вместо ГСЖК использовали человеческий менопаузный гонадотропин ЧМГ (Naoi et al., 2007; Luu et al., 2013). Альтернативой использования хорионических гонадотропинов является использование комбинации фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего гормонов (ЛГ) вместо ЧХГ + ГСЖК, причем диапазон используемых концентраций этих гормонов весьма велик (Thiangtum et al., 2006; Ganap et al., 2009a, 2009b; Rao et al., 2015). При сравнении эффективности этих двух альтернативных комбинаций гонадотропных гормонов становится очевидным, что различий нет; при использовании как гипофизарных, так и хорионических гонадотропинов, число созревших до стадии МII ооцитов обычно в пределах 30–60%.

**Таблица 2.** Среды, применяемые для созревания ооцитов кошачьих *in vitro*

Базовая среда	Трофические компоненты	Гормоны, ростовые факторы	Антибиотики	Ссылки
Среда 199 с солями Эрла	БСА <sup>a</sup>	ЧХГ <sup>b</sup> , ЧГМ <sup>c</sup> , эстрадиол	Гентамицин	Naoi et al., 2007
Среда 199 с солями Эрла и глутамином	БСА	ЧХГ, ГСЖК <sup>d</sup>	—	Hermansson et al., 2007
Среда 199 и бикарбонатом натрия	БСА, цистеин, пируват натрия, лактат кальция	ФСГ <sup>e</sup> , ЛГ <sup>f</sup> , эстрадиол	Гентамицин	Tsujioka et al., 2008
MEM	БСА, L-глутамин, пируват натрия	ФСГ, ЛГ, эстрадиол	Пенициллин, стрептомицин	Godard et al., 2009
mSOF	—	ФСГ, ЛГ	—	Evecen et al., 2009
DMEM	БСА, цистеин, L-глутамин, пируват натрия	ФСГ, ЛГ, эстрадиол, ИРФ-1 <sup>g</sup>	Пенициллин, стрептомицин	Martins et al., 2009
Среда 199 с бикарбонатом натрия	БСА, L-глутамин, пируват натрия	рчФСГ <sup>h</sup>	Пенициллин, стрептомицин	Sananmuang et al., 2010
Среда 199 с NEPES	БСА, пируват натрия	ФСГ, эстрадиол	Гентамицин	Uchikura et al., 2011
Среда 199	БСА, цистеин, L-глутамин, пируват натрия, лактат кальция	ЧХГ, ГСЖК, ЭРФ <sup>i</sup>	Гентамицин (50 мкг/мл)	Pope et al., 2012
Среда 199 с солями Эрла и NEPES	БСА	ЧХГ, ЧГМ, эстрадиол	Гентамицин	Luu et al., 2013
Среда 199	БСА, пируват натрия	ФСГ, ЧХГ, эстрадиол	Гентамицин	Yildirim et al., 2013
Среда 199	БСА, пируват натрия, лактат кальция	ЧХГ, ГСЖК	Пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В	Moro, 2014
Среда 199 с бикарбонатом натрия	БСА, L-глутамин, пируват натрия, лактат кальция	ФСГ, ЛГ, эстрадиол	Пенициллин, стрептомицин	Rao et al., 2015
Среда 199 с солями Эрла	БСА, цистеин, L-глутамин, пируват натрия, лактат натрия	ФСГ, ЛГ	Гентамицин	Fernandez-Gonzalez et al., 2015
MEM	BSA	ФСГ, ЛГ, эстрадиол		Thiangtum et al., 2006
Среда 199 с бикарбонатом натрия	BSA, цистеин, L-глутамин, пируват натрия, лактат кальция	ФСГ, ЛГ, эстрадиол, ЭРФ	Пенициллин, стрептомицин	Ganan et al., 2009a

<sup>a</sup> БСА – бычий сывороточный альбумин; <sup>b</sup> ЧХГ – человеческий хорионический гонадотропин; <sup>c</sup> ЧГМ – человеческий гонадотропин менопаузы; <sup>d</sup> ГСЖК – гонадотропин сыворотки жеребых кобыл; <sup>e</sup> ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; <sup>f</sup> ЛГ – лютеинизирующий гормон; <sup>g</sup> ИРФ-1 – инсулин-подобный ростовой фактор 1; <sup>h</sup> рчФСГ – рекомбинантный человеческий фолликулостимулирующий гормон; <sup>i</sup> ЭРФ – эпидермальный ростовой фактор.

В литературе описано несколько специфических с точки зрения гормональной составляющей сред для культивирования ооцитов. В работе Ша-

нанмуанг с соавторами (Sananmuang et al., 2010) единственным компонентом гормональной природы в составе среды для культивирования коша-

чьих ооцитов был рекомбинантный человеческий ФСГ в концентрации 0.05 IU/мл. В другом исследовании авторы использовали необычную комбинацию ФСГ (0.02 IU/мл) и ЧХГ (1 IU/мл) (Yildirim et al., 2013). Следует отметить, что многие исследователи добавляют в среду для созревания ооцитов наряду с гонадотропными гормонами и 17 $\beta$ -эстрадиол (табл. 2), наиболее распространенной дозой является доза 1 мкг/мл (Naoi et al., 2007; Godard et al., 2009; Ganan et al., 2009a; Martins et al., 2009; Uchikura et al., 2011; Luu et al., 2013; Yildirim et al., 2013).

Кроме этих базовых комбинаций гормонов иногда, дополнительно, добавляют и другие гормоны и факторы роста. Так, например, в одной из недавних работ, наряду с ЧХГ, ЧГМ и 17 $\beta$ -эстрадиолом, в качестве индуктора созревания в среду для яйцеклеток был добавлен релаксин, что практически не влияло на процент ооцитов, дозревших до стадии метафазы второго деления мейоза (МII), но существенно повысило последующую эффективность получения бластоцист (Luu et al., 2013). Иногда для улучшения условий созревания ооцитов в среду добавляют факторы роста, такие как ИРФ-1 (инсулино-подобный ростовой фактор 1) (Martins et al., 2009) или ЭРФ (эпидермальный ростовой фактор) (Pore et al., 2012).

В работе Мерло и др. (Merlo et al., 2005) не было обнаружено влияния ЭРФ на частоту созревания ооцитов, однако, при его добавлении в концентрации 10 нг/мл и 25 нг/мл повышалась способность ооцитов достигать стадии дробления и бластоцисты особенно при применении дозы 25 нг/мл. В более поздних работах было показано, что ИРФ-1 и ЭРФ как вместе, так и по отдельности, заметно повышают процент ооцитов успешно созревающих в довольно бедной по своему трофическому составу среде (Yildirim et al., 2013).

Наряду с рассмотрением состава сред, следует обсудить физические параметры, соблюдаемые при культивировании *in vitro* ооцитов кошек с целью их созревания. Ооциты традиционно культивируют при 38–38.5°C, с содержанием 5% CO<sub>2</sub> в воздухе (Naoi et al., 2007; Tsujioka et al., 2008). Иногда исследователи используют более высокую температуру: 39°C (Uchikura et al., 2011; Moro et al., 2014). Распространенной модификацией метода является изменение газового состава до 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> и 90% N<sub>2</sub> (Evecen et al., 2009; Martins et al., 2009). Считается, что сниженное парциальное давление кислорода благотворно влияет на развивающиеся эмбрионы и ооциты (Pore et al., 2012). Некоторые исследователи в попытках подобной оптимизации протоколов ИVM заходят еще дальше, изменяя содержание CO<sub>2</sub> в газовой смеси с общепринятых 5 до 6.5% (Moro et al., 2014).

Вольф и Вилдт (Wolfe, Wildt, 1996) сравнивали разные интервалы, в течение которых производи-

ли созревание ооцитов кошачьих *in vitro* (12, 24, 38 и 48 ч). Было показано, что более 60% ооцитов созревают через 24 ч после культивирования. Культивирование в течение 12 ч приводит к созреванию менее чем 4%, а культивирование более 24 ч достоверно не увеличивает процент созревших и готовых к оплодотворению ооцитов. Более поздние ультраструктурные исследования подтвердили данный вывод. Было показано, что после 24 ч *in vitro* происходит более полное созревание ооцитов кошек, чем после 12 ч. В частности, именно после 24 ч, но не после 12 ч созревания происходит окончательное разъединение ооцитов с фолликулярными клетками в ооцит-кумулюсных комплексах (Martins et al., 2009). В другом исследовании отмечается, что при сроках созревания в течение 30 ч, наблюдается наибольший процент ооцитов достигших стадии МII по сравнению со сроком 24 ч (Nagano et al., 2008). В работах, цитированных в табл. 2, сроки культивирования кошачьих ооцитов с целью их созревания *in vitro* варьируют от 24 до 48 ч, что является общепринятым для подавляющего большинства современных работ с кошачьими ооцитами.

Показателем хорошего качества ооцита является выраженность клеток кумулюса, которые окружают, питают и передают гормональные сигналы ооциту. По выраженности кумулюсного слоя и морфологии цитоплазмы ооциты классифицируют на 3 группы. К первой группе относятся ооциты с темной гомогенной цитоплазмой и кумулюсом, состоящим более чем из 5 слоев, вторая группа – частичная пигментация цитоплазмы и менее 5 слоев клеток кумулюса, третья группа – ооциты со светлой цитоплазмой, нарушениями формы и частичным или полным отсутствием кумулюсных клеток (Wood, Wildt, 1997; Johnston et al., 1991). Критерием успешного созревания ооцитов является выделение первого полярного тела (рис. 3), что является индикатором того, что ооциты достигли стадии метафазы II (Fernandez-Gonzalez et al., 2015).

## ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ КОШАЧЬИХ *IN VITRO*: ЭКО И ИКСИ

После того, как успешно пройден этап созревания ооцитов, встает задача получения эмбрионов *in vitro*. Существует два способа осуществления этой задачи – традиционное экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и интроцитоплазматическая инъекция сперматозоидов (ИКСИ) (Pore et al., 2006, 2012).

В случае традиционного ЭКО (экстракорпоральное оплодотворение, IVF – *in vitro* fertilization) сперматозоиды добавляют в среду, в которой содержится ооцит, и оплодотворение происходит “естественным” образом. Классическая методика заключается в том, что примерно 10 кошачьих

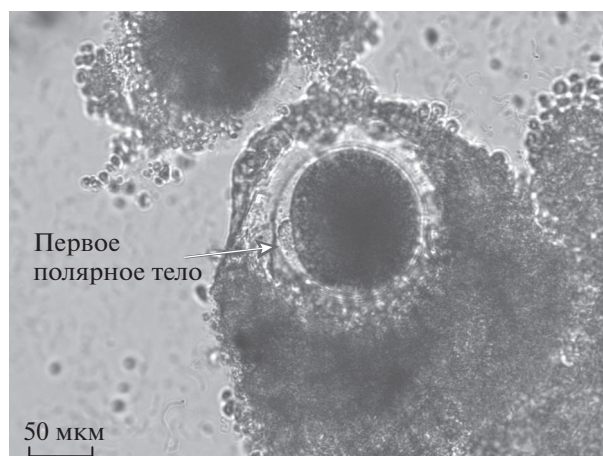


ооцитов помещают в 50–100 мкл культивационной среды с концентрацией подвижных сперматозоидов от  $2 \times 10^4$  до  $5 \times 10^5$  в миллилитре (Goodrowe et al., 1988; Wood, Wildt, 1997). Большим преимуществом ЭКО перед ИО является то, что сперматозоидов для проведения ЭКО требуется в 100 раз меньше, чем для ИО. Для большинства исследованных видов диких кошачьих дозы семени, полученной при электроэякуляции, хватает на 1–7 искусственных осеменений. В то же время, у этих видов диких кошачьих семени, полученного в результате одной электроэякуляции, хватает на 290–1470 процедур ЭКО (Swanson et al., 2007).

Для ЭКО кошачьих используют более простые среды по сравнению с теми, в которых проводят дозревание ооцитов, главным отличием является отсутствие гормональных добавок. Достаточно часто эти среды готовят на основе раствора Тироде (Tsujioka et al., 2008; Ganai et al., 2009a, 2009b). Например, для экстракорпорального оплодотворения вполне успешно используется среда TALP, название которой составлено из первых букв основных компонентов: Т – Тироде, А – альбумин, L – лактат, Р – пируват (Tsujioka et al., 2008). Иногда, однако, в эти достаточно простые среды добавляют фетальную сыворотку (Thuwanut et al., 2011).

Смесь ооцитов и сперматозоидов и ооцитов обычно культивируется в этих средах около 24 ч при температуре  $\sim 38^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в атмосфере (Pore et al., 1998). Важно иметь четкие критерии того, что оплодотворение произошло. При проведении ЭКО в клиниках на человеке через  $17 \pm 1$  ч после инкубации ооцитов со сперматозоидами, о наличии оплодотворения могут свидетельствовать два полярных тела и два пронуклеуса, мужской и женский (Papale et al., 2012). Однако у кошачьих увидеть пронуклеусы на световом микроскопе достаточно сложно из-за темной гомогенной цитоплазмы, поэтому проверка оплодотворения производится по наличию второго полярного тела, а чаще по началу дробления (Goodrowe et al., 1988).

У некоторых видов кошачьих семя настолько низкого качества, что проведение традиционного ЭКО невозможно. В частности, у многих диких представителей этого семейства имеет место тератоспермия, при которой более 60% сперматозоидов оказываются с аномальной морфологией (Pukazhenti et al., 2006a, 2006b). Это связывают со сниженным генетическим разнообразием отдельных видов или подвидов этого семейства, что, чаще всего, объясняется инбридингом (Pukazhenti et al., 2006a). Чаще всего это имеет место, когда в результате тех или иных событий, численность особей вида или подвида снижается до критического уровня и происходит потеря генетического разнообразия, а затем число особей возрастает, в том числе за счет инбридинга (Pukazhenti et al.,



**Рис.3.** Ооцит домашней кошки с первым полярным телом через 24 часа после культивирования *in vitro* в модифицированной среде 199, содержащей гормоны: ФСГ, ЛГ.

2006a). Самыми яркими примерами такого рода среди кошачьих являются гепарды (*Acinonyx jubatus*), дымчатые леопарды (*Neofelis nebulosa*) и подвид пумы (*Puma concolor coryi*) – последний известен больше как “пантеры Флориды”; у этих видов/подвидов процент аномальных сперматозоидов может составлять 80% и более (Pukazhenti et al., 2006a, 2006b).

ИКСИ на кошачьих применяют иногда как альтернативу традиционному ЭКО, особенно при работе с дикими видами кошачьих, в тех случаях, когда процент морфологически нормальных сперматозоидов настолько низкий, что их не хватает для классического оплодотворения *in vitro* (Moro et al., 2014; Fernandez-Gonzalez et al., 2015). В ходе осуществления ИКСИ с помощью микроинъектора и микроманипулятора сперматозоид вводят в цитоплазму ооцита (Pore et al., 2006). Кроме низкого качества и/или малого числа сперматозоидов, показанием к проведению ИКСИ может служить, например, то, что яйцеклетки подвергались криоконсервации, поскольку в процессе замораживания яйцеклеток млекопитающих могут происходить изменения прозрачной оболочки препятствующие естественному оплодотворению (Амстиславский и др., 2015). В 2012 году была произведена первая успешная попытка ИКСИ на витрифицированных ооцитах домашней кошки: в результате из полученных эмбрионов, пересаженных реципиенту, родились 3 котенка (Pore et al., 2012).

В результате применения ЭКО или ИКСИ образуются зиготы, которые очищают от кумулюсных клеток и помещают в среду для культивирования, с этого и начинается наиболее вариabельный с точки зрения температурных, временных и других параметров этап работы, касающийся соб-

ственно культивирования полученных эмбрионов *in vitro*. Вариации по большей части касаются не только состава сред как такового, но также частоты и периодичности их смены (Naoi et al., 2007; Tsujioka et al., 2008; Luu et al., 2013; Moro et al., 2014).

В качестве базовой среды часто применяют среду Хэма F-10 (Ham's F-10) (Godard et al., 2009; Fernandez-Gonzalez et al., 2015), либо SOF и ее модификации (Nagano et al., 2008; Luu et al., 2013; Moro et al., 2014). В качестве белковой компоненты в среду обычно добавляют БСА (~4 мг/мл) (Luu et al., 2013), либо FCS (fetal calf serum, фетальная телячья сыворотка) от 2.5% (Moro et al., 2014) до 10% (Buarpong et al., 2015). Иногда исследователи добавляют в среду трофические компоненты, такие как пируват натрия, глюкоза и глутамин (Tsujioka et al., 2008; Fernandez-Gonzalez et al., 2015). При культивировании эмбрионов кошачьих в среду добавляют те же антибиотики, что и в среды для культивирования кошачьих ооцитов в сходных концентрациях (Naoi et al., 2007).

Методика культивирования эмбрионов кошачьих принятая некоторыми исследовательскими группами вообще не предполагает замены среды от начала культивирования зигот до получения бластоцист (Fernandez-Gonzalez et al., 2015). Однако зачастую кошачьи эмбрионы культивируют, учитывая их трофические запросы в зависимости от стадии развития. В одной из работ среду меняли дважды – на 2-ой день, и на 5-ый с добавлением 10% FCS вместо изначальных 2.5% (Moro et al., 2014). В другой работе среду меняли единожды, на 3-ий день, при этом заменяя БСА на 5% FCS, и далее культивировали эмбрионы еще 5 дней, до получения бластоцист (Luu et al., 2013). Схожую манипуляцию проделывал другой исследовательский коллектив, после смены сред с добавлением 5% FCS они продолжали культивировать эмбрионы в течение 4 дней (Naoi et al., 2007). В другой работе среда вместо FCS или БСА изначально содержала 5% ECS (oestrous cow serum, сыворотку коровы в эструсе). Авторы меняли среду после 3-го дня, не изменяя ее состав, при этом получали бластоцисты на 6–7 день (Tsujioka et al., 2008).

В некоторых работах для получения гибридных эмбрионов кошачьих *in vitro*, яйцеклетки домашней кошки оплодотворяли семенем диких видов *Felidae*. Во всех этих случаях получение гибридных зародышей не было самоцелью, но генетическое оплодотворение рассматривалось как убедительный способ проверить жизнеспособность семени того или иного вида кошачьих, поскольку яйцеклетки домашней кошки добыть много легче, чем яйцеклетки диких видов кошачьих. В настоящее время, такие гибридные эмбрионы получены для девяти видов кошачьих: тигра, гепарда, леопарда, кота рыболова, суматранской кошки, оцелота, манула, а также крас-

ной и пиренейской рыси (Donoghue et al., 1992; Thiangtum et al., 2006; Stoops et al., 2007; Swanson et al., 2007; Ganan et al., 2009a, 2009b; Thuwanut et al., 2011; Moro et al., 2014). Наряду с этим, производили и обратное осеменение яйцеклеток диких видов млекопитающих семенем домашнего кота (Johnston et al., 1991). В этой ранней работе удалось произвести успешное ЭКО яйцеклеток леопарда, тигра, ирбиса, кота Жоффруа, сервала и пумы, при этом дробящиеся эмбрионы наблюдали лишь с яйцеклетками леопарда и пумы (эффективность процедуры была 5% для леопарда и 46.2% для пумы) (Johnston et al., 1991).

Следует иметь в виду, что при получении кошачьих эмбрионов *in vitro* достаточно большой процент ооцитов может развиваться партеногенетически. Число ооцитов начавших дробиться партеногенетически может достигать 10% и даже более 20% (Murakami et al., 2002; Nagano et al., 2008), Согласно Нагано и др. (Nagano et al., 2008) ни один из партеногенов не достигает у кошек стадии бластоцисты. В другом исследовании, однако, было показано, что 90% искусственно активированных к партеногенезу ооцитов кошек проходят стадии дробления, и более 13% достигают стадии бластоцисты (Lorthongpanich et al., 2003). Стадии естественного и партеногенетического дробления весьма сложно различать морфологически.

Поэтому при работе с ооцитами необходимо исключать факторы, способные вызвать их партеногенетическую активацию, контролировать состав культивационных сред и осуществлять аккуратную денудацию ооцитов – очистку от клеток кумулюса. Чтобы удостовериться в отсутствии партеногенеза, часть яйцеклеток помещают в одинаковую по составу культивационную среду, но без добавления сперматозоидов (Nagano et al., 2008).

Авторы благодарят С.И. Байбородина за помощь в получении фотографий, а В.И. Мокроусову за помощь в подготовке рукописи статьи. Работа выполнена при поддержке РФФИ № 13-04-00685, а также комплексной программы П.2 Сибирского отделения РАН (проект 0324-2015-0007).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамова Т.О., Кизилова Е.А., Масленникова С.О. и др. Криоконсервация семени кошачьих (*Feline semen cryopreservation*) // Биофизика живой клетки. 2014. Т. 10. С. 17–19.
- Амстиславский С.Я., Кожевникова В.В., Казак Е.А., Рожкова И.Н. Перспективы преимплантационной медицины // Природа. 2015. № 11. С. 37–45.
- Найденко С.В., Ерофеева М.Н. Размножение евразийской рыси и особенности репродуктивной стратегии самок // Зоологический журнал. 2004. Т. 83. № 2. С. 261–269.

- Сайфутдинова А.Ф.* Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. СПб.: "СОЛО", 2008. 2-е изд. 73 с.
- Bagno M.A., Rodrigues F.G.H., Villalobos M.P. et al.* Notes on the natural history and conservation status of pampas cat, *Oncifelis colocolo*, in the Brazilian Cerrado // *Mammalia*. 2004. V. 68. P. 75–79.
- Bahaa-el-din L., Henschel P., Butinski T. et al.* The African golden cat *Caracal aurata*: Africa's least-known felid // *Mammal Rev.* 2015. V.45. P. 63–77.
- Barnett R., Yamaguchi N., Barnes I., Cooper A.* Lost populations and preserving genetic diversity in the lion *Panthera leo*: Implications for its ex situ conservation // *Conserv. Genet.* 2006. V. 7. № 4. P. 507–514.
- Barone M.A., Wildt D.E., Byers A.P. et al.* Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*) // *J. Reprod. Fertil.* 1994. V. 101. P. 103–108.
- Brodie J.F.* Is research effort allocated efficiently for conservation? Felidae as a global case study // *Biodivers. Conserv.* 2009. V. 18. P. 2927–2939.
- Buarbung S., Tharasanit T., Comizzoli P., Techakumphu M.* Effects of cold storage on plasma membrane, DNA integrity and fertilizing ability of feline testicular spermatozoa // *Anim. Reprod. Sci.* 2012. V. 131. P. 219–227.
- Buarbung S., Tharasanit T., Comizzoli P., Techakumphu M.* Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection // *Theriogenology*. 2015. V. 79. № 1. P. 149–158.
- Buckley-Beason V.A., Johnson W.E., Nash W.B. et al.* Molecular evidence for species-level distinctions in clouded leopards // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. P. 2371–2376.
- Cole F.R., Wilson D.E.* *Felis margarita* (Carnivora: Felidae) // *Mammalian Species*. 2015. V. 47. P. 63–77.
- Culver M., Johnson W.E., Pecon-Slattery J., O'Brien S.J.* Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*) // *J. Hered.* 2000. V. 91. P. 186–197.
- De Oliveira T.G.* *Herpailurus yagouaraundi* // *Mammalian Species*. 1998a. № 578. P. 1–6.
- De Oliveira T.G.* *Leopardus wiedii* // *Mammalian Species*. 1998b. № 579. P. 1–6.
- Dmoch R.* Husbandry, breeding and population development of the Sri Lankan Rusty-spotted cat // *Int. Zoo Yb.* 1997. V. 35. P. 115–120.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Seal U.S. et al.* In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*) // *Biol. Reprod.* 1990. V. 43. P. 733–744.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Seal U.S. et al.* Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro // *J. Reprod. Fertil.* 1992. V. 96. P. 555–564.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Armstrong D.L. et al.* Birth of a Siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination // *J. Zoo Wildl. Med.* 1993. V. 24. P. 185–189.
- Driscoll C.A., Menotti-Raymond M., Roca A.L. et al.* The Near Eastern origin of cat domestication // *Science*. 2007. P. 317. P. 519–523.
- Duckworth J.W., Poole C.M., Tizard R.J. et al.* The Jungle Cat *Felis chaus* in Indochina: a threatened population of a widespread and adaptable species // *Biodivers. Conserv.* 2005. V. 14. P. 1263–1280.
- Evecen M., Cirit U., Demir K. et al.* Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4 degrees C temperature // *Anim. Reprod. Sci.* 2009. V. 116. P. 169–172.
- Fernandez-Gonzalez L., Hribal R., Stagegaard J., Jewgenow K.* Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after in vitro maturation of oocytes and ICSI // *Theriogenology*. 2015. V. 8. P. 995–999.
- Filliers M., Rijsselaere T., Bossaert P. et al.* Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 degrees C) on sperm quality // *Theriogenology*. 2008. V. 70. P. 1550–1559.
- Ganan N., González R., Garde J.J. et al.* Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) // *Reprod. Fertil. Dev.* 2009b. V. 21. P. 848–859.
- Ganan N., González R., Sestelo A. et al.* Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*) // *Theriogenology*. 2009a. V. 72. P. 341–352.
- Ganan N., Sestelo A., Garde J.J. et al.* Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) // *Reproduction*. 2010. V. 139. P. 275–285.
- Godard N.M., Pukazhenthil B.S., Wildt D.E., Comizzoli P.* Paracrine factors from cumulus-enclosed oocytes ensure the successful maturation and fertilization in vitro of denuded oocytes in the cat model // *Fertil. Steril.* 2009. V. 91. Suppl. 5. P. 2051–2060.
- Goeritz F., Painer J., Jewgenow K. et al.* Embryo retrieval after hormonal treatment to control ovarian function and non-surgical artificial insemination in African lions (*Panthera leo*) // *Reprod. Dom. Anim.* 2012. V. 47. P. 156–160.
- Gómez M.C., Pope C.E., Dresser B.L.* Nuclear transfer in cats and its application // *Theriogenology*. 2006. V. 66. P. 72–81.
- Gómez M.C., Pope C.E., Giraldo A. et al.* Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats // *Cloning Stem. Cells*. 2004. V. 6. P. 247–258.
- Gómez M.C., Pope C.E., Kutner R.H. et al.* Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells // *Cloning Stem. Cells*. 2008. V. 10. P. 469–483.
- Gómez M.C., Pope C.E., Ricks D.M. et al.* Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer // *Reprod. Fertil. Dev.* 2009. V. 21. P. 76–82.
- Goodrowe K.L., Wall R.J., O'Brien S.J. et al.* Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro // *Biol. Reprod.* 1988. V. 39. P. 355–372.
- Ha A., Jo A., Kim Y. et al.* Establishment of cryopreservation of leopard cat semen collected by electro-ejaculation method // *J. Emb. Trans.* 2011. V. 26. P. 245–250.

- He L., Garcia-Perea R., Li M., Wei F. Distribution and conservation status of the endemic Chinese mountain cat *Felis bieti* // *Oryx*. 2004. V. 38. P. 55–61.
- Henriksen H.B., Andersen R., Hewison A.J.M. et al. Reproductive biology of captive female Eurasian lynx, *Lynx lynx* // *Eur. J. Wildl. Res.* 2005. V. 51. P. 151–156.
- Hermansson U., Axné E., Holst B.S. Application of a zona pellucida binding assay ZBA in the domestic cat benefits from the use of in vitro matured oocytes // *Acta. Vet. Scand.* 2007. V. 49. P. 28.
- Herrick J., Leiske K., Magarey G., Swanson W. Basal seminal traits and in vitro fertilization in the sand cat (*Felis margarita*) // *Reprod. Fert. Dev.* 2005. V. 18. P. 218–219.
- Herrick J.R., Bond J.B., Campbell M. et al. Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*) // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010b. V. 165. P. 204–214.
- Herrick J.R., Campbell M., Levens et al. In vitro fertilization and sperm cryopreservation in the black-footed cat (*Felis nigripes*) and sand cat (*Felis margarita*) // *Biol. Reprod.* 2010a. V. 82. P. 552–562.
- Howard J.G., Byers A.P., Brown J.L. et al. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) // *Zoo Biol.* 1996. V. 15. P. 55–69.
- Howard J.G., Roth T.L., Byers A.P. et al. Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard // *Biol. Reprod.* 1997. V. 56. P. 1059–1068.
- International studbooks for Rare Species of Wild Animals in Captivity // *Int. Zoo Yearbook*. 2014. V. 48. P. 424–449.
- Jackson R.M., Mishra C., McCarthy T.M., Ale S.B. Snow leopards: conflict and conservation / In: *Biology and Conservation of Wild Felids*. Loveridge A., Macdonald D. (eds). Chapter 19 in 1st edition. Oxford: Oxford University Press, 2010. P. 417–430.
- Jayaprakash D., Patil S.B., Kumar M.N. et al. Semen characteristics of the captive Indian leopard, *Panthera pardus* // *J. Androl.* 2001. V. 22. P. 25–33.
- Johnson W.E., Eizirik E., Pecon-Slattery J. et al. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment // *Science*. 2006. V. 311. P. 73–77.
- Johnston L.A., Donoghue A.M., O'Brien S.J., Wildt D.E. Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats // *J. Reprod. Fert.* 1991. V. 92. P. 377–382.
- Johnston S.D., Kustritz M.V.R., Olson P.S. *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia, PA: Saunders, 2001. 1st edition.
- Kitchener A.C., Van Valkenburgh B., Yamaguchi N. Felid form and function / In: *Biology and Conservation of Wild Felids*. Macdonald D., Loveridge A., (eds). Chapter 3 in 1st edition. Oxford: Oxford University Press, 2010. P. 83–106.
- Krausman P.R., Morales S.M. *Acinonyx jubatus* // *Mammalian Species*. 2005. P. 1–6.
- Larivière S., Walton L.R. *Lynx rufus* // *Mammalian Species*. 1997. P. 1–8.
- Leon-Quinto T., Simon M.A., Cadenas R. et al. Developing biological resource banks as a supporting tool for wild-life reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species // *Anim. Reprod. Sci.* 2009. V. 112. P. 347–361.
- Lorthongpanich C., Laowtammathron C., Muenthaisong S., Parnpai R. In vitro development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cat // *Reprod. Fert. Dev.* 2003. V. 16. P. 149–150.
- Lueders I., Luther I., Scheepers G., van der Horst G. Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*) // *Theriogenology*. 2012. V. 78. P. 696–701.
- Lueders I., Ludwig C., Schroeder M. et al. Successful non-surgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temminckii*) // *J. Zoo Wildl. Med.* 2014. V. 45. P. 372–379.
- Luo S.J., Zhang Y., Johnson W.E. et al. Sympatric Asian felid phylogeography reveals a major Indochinese–Sundaic divergence // *Mol. Ecol.* 2014. V. 23. P. 2072–2092.
- Luu V.V., Hanatate K., Tanihara F. et al. The effect of relaxin supplementation of in vitro maturation medium on the development of cat oocytes obtained from ovaries stored at 4°C // *Reprod. Biol.* 2013. V. 13. P. 122–126.
- Luvoni G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat // *Theriogenology*. 2006. V. 66. P. 101–111.
- Macdonald D.W., Loveridge A.J., Nowell K. *Dramatis personae: an introduction to the wild felids* / In: *Biology and Conservation of Wild Felids*. Loveridge A., Macdonald D. (eds). Chapter 1 in 1st edition. Oxford: Oxford University Press, 2010. P. 3–58.
- Martins L.R., Fernandes C.B., Minto B.W. et al. Ultrastructural characteristics of non-matured and in vitro matured oocytes collected from pre-pubertal and adult domestic cat ovaries // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. Suppl. 2. P. 251–254.
- Mattern M.Y., McLennan D.A. Phylogeny and speciation of felids // *Cladistics*. 2000. V. 16. P. 232–253.
- Mellen J.D. A comparative analysis of scent-marking, social and reproductive behavior in 20 species of small cats (*Felis*) // *Amer. Zool.* 1993. V. 33. P. 151–166.
- Merlo B., Iacono E., Zambelli D. et al. Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes // *Theriogenology*. 2005. V. 63. P. 2032–2039.
- Morato R.G., Conforti V.A., Azevedo F.C. et al. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*) // *Reproduction*. 2001. V. 122. P. 745–751.
- Morato R.G., Crichton E.G., Paz R.C.R. et al. Ovarian stimulation and successful in vitro fertilization in the jaguar (*Panthera onca*) // *Theriogenology*. 2000. V. 53. P. 339.
- Moro L.N., Sestelo A.J., Salamone D.F. Evaluation of cheetah and leopard spermatozoa developmental capability after interspecific ICSI with domestic cat oocytes // *Reprod. Dom. Anim.* 2014. V. 49. P. 693–700.
- Mukherjee S., Adhya T., Thatte P., Ramakrishnan U. Survey of the Fishing Cat *Prionailurus viverrinus* Bennett, 1833 (Carnivora: Felidae) and some aspects impacting its conservation in India // *J. Threatened Taxa*. 2012. V. 4. P. 3355–3361.

- Murakami M., Otoi T., Karja N. W. et al.* Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization // *Reprod. Dom. Anim.* 2002. V. 37. P. 352–356.
- Murray J.L., Gardner G.L.* *Leopardus pardalis* // *Mammalian Species*. 1997. P. 1–10.
- Nagano M., Uchikura K., Takahashi Y., Hishinuma M.* Effect of duration of in vitro maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes // *Theriogenology*. 2008. V. 69. P. 231–236.
- Naoi H., Otoi T., Shimamura T. et al.* Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h // *J. Reprod. Dev.* 2007. V. 53. P. 271–277.
- Napolitano C., Johnson W.E., Sanderson J. et al.* Phylogeography and population history of *Leopardus guigna*, the smallest American felid // *Conserv. Gen.* 2014. V. 15. P. 631–653.
- Nascimento F.O.* On the morphological variation and taxonomy of the Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi* (d'Orbigny & Gervais, 1844) (Carnivora, Felidae) // *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*. 2014. V. 54. P. 129–160.
- Nowell K., Jackson P.* *Wild Cats Status Survey and Conservation Action Plan* // Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN/SSC Cat Specialist Group. 1996.
- Nowell K.* Revision of the Felidae red list of threatened species // *Cat News*. 2002. V. 37. P. 4–6.
- Papale L., Fiorentino A., Montag M., Tomasi G.* The zygote // *Hum. Reprod.*, 2012. V. 27. P. 22–49.
- Platz C.C., Wildt D.E., Seager S.W.* Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.* 1978. V. 52. P. 279–282.
- Poole K.G.* A review of the Canada Lynx, *Lynx canadensis*, in Canada // *Can. Field-Nat.* 2003. V. 117. P. 360–376.
- Pope C.E., Johnson C.A., McRae M.A. et al.* Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes // *Anim. Reprod. Sci.* 1998. V. 53. P. 221–236.
- Pope C.E., Gomez M.C., Davis A.M. et al.* Oocyte retrieval, in vitro fertilization and embryo transfer in the caracal (*Caracal caracal*) // *Theriogenology*. 2001. V. 55. P. 397.
- Pope C.E., Gomez M.C., Cole A. et al.* Oocyte recovery, in vitro fertilization and embryo transfer in the serval (*Lepailurus serval*) // *Reprod. Fert. Dev.* 2005. V. 18. P. 223–223.
- Pope C.E., Gomez M.C., Dresser B.L.* In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats // *Theriogenology*. 2006. V. 66. P. 1518–1524.
- Pope C.E., Gomez M.C., Galiguis J., Dresser B.L.* Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats // *Reprod. Dom. Anim.* 2012. V. 6. P. 125–129.
- Pukazhenthil B., Neubauer K., Jewgenow K. et al.* The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives // *Theriogenology*. 2006a. V. 66. P. 112–121.
- Pukazhenthil B., Laroe D., Crosier A. et al.* Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa // *Theriogenology*. 2006b. V. 66. P. 1790–1796.
- Rao B.S., Mahesh Y.U., Suman K. et al.* Meiotic maturation of oocytes recovered from the ovaries of Indian big cats at postmortem // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2015. V. 51. P. 19–25.
- Renard A., Lavoie M., Pitt J.A., Larivière S.* *Felis nigripes* (Carnivora: Felidae) // *Mammalian Species*. 2015. V. 47. P. 78–83.
- Roth T.L., Howard J.G., Donoghue A.M. et al.* Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa in vitro // *J. Reprod. Fertil.* 1994. V. 101. P. 563–569.
- Roth T.L., Armstrong D.L., Barrie M.T., Wildt D.E.* Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and successful artificial insemination in the snow leopard (*Uncia uncia*) // *Reprod. Fertil. Dev.* 1997. V. 9. P. 285–295.
- Ruiz-Garcia M., Payan E., Murillo A., Alvarez D.* DNA microsatellite characterization of the jaguar (*Panthera onca*) in Colombia // *Genes & Genetic Systems*. 2006. V. 81. P. 115–127.
- Sananmuang T., Techakumphu M., Tharasanit T.* The effects of roscovitine on cumulus cell apoptosis and the developmental competence of domestic cat oocytes // *Theriogenology*. 2010. V. 73. P. 199–207.
- Sastramidjaja W.J., Cheyne S.M., Loken B., Mscdonald D.M.* The bay cat in Kalimantan, new information from recent sightings // *Cat News*. 2015. P. 10–12.
- Sojka N.J., Jennings L.L., Hamner C.E.* Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.) // *Lab. Anim. Care*. 1970. V. 20. P. 198–204.
- Stoops M.A., Bond J.B., Bateman H.L.* Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*) // *Reprod. Fertil. Dev.* 2007. V. 19. P. 685–694.
- Sunquist M., Sunquist F.* *Wild Cats of the World*. Chicago: University of Chicago Press, 2002.
- Swanson W.F.* Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids // *ILAR J.* 2003. V. 44. P. 307–316.
- 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., Maggs D.J., Clarke H.E. et al.* Assessment of viral presence in semen and reproductive function of frozen-thawed spermatozoa from Pallas' cats (*Otocolobus manul*) infected with feline herpesvirus // *J. Zoo Wildl. Med.* 2006. V. 37. P. 336–346.
- Swanson W.F., Stoops M.A., Magarey G.M., Herrick J.R.* Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations // *Soc. Reprod. Fertil.* 2007. V. 65. P. 417–432.
- Tamada T., Siriaroonrat B., Subramaniam V. et al.* Molecular diversity and phylogeography of the Asian leopard cat, *Felis bengalensis*, inferred from mitochondrial and Y-chromosomal DNA sequences // *Zool. Sci.* 2008. V. 25. P. 154–163.
- Terrell K.A., Wildt D.E., Anthony N.M. et al.* Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa // *Cryobiology*. 2012. V. 64. P. 110–117.

- Thiangtum K., Swanson W.F., Howard J. et al.* Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous in vitro fertilization in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) // *Reprod. Fertil. Dev.* 2006. V. 18. P. 373–382.
- Thongphakdee A., Siriaronrat B., Manee-in S. et al.* Intergerm somatic cell nucleus transfer in marbled cat and flat-headed cat // *Theriogenology*. 2010. V. 73. P. 120–128.
- Thuwanut P., Chatdarong K., Bergqvist A.S. et al.* The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*) // *Theriogenology*. 2011. V. 76. P. 115–125.
- Thuwanut P., Chatdarong K., Techakumphu M., Axnér E.* The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa // *Theriogenology*. 2008. V. 70. P. 233–240.
- Thuwanut P., Srisuwatanasagul S., Wongbandue G. et al.* Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species // *Cryobiology*. 2013. V. 67. P. 244–247.
- Trigo T.C., Schneider A., de Oliveira T.G. et al.* Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat // *Curr. Biol.* 2013. V. 23. P. 2528–2533.
- Tsujioka T., Otdorff C., Braun J., Hochi S.* Effect of post-IVF developmental kinetics on in vitro survival of vitrified-warmed domestic cat blastocysts // *Reprod. Dom. Anim.* 2008. V. 43. P. 323–327.
- Tsutsui T.* Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*) // *Theriogenology*. 2006. V. 66. P. 122–125.
- Uchikura K., Nagano M., Hishinuma M.* The effect of ovarian status and follicular diameter on maturational ability of domestic cat oocytes // *J. Vet. Med. Sci.* 2011. V. 73. P. 561–566.
- Uphyrkina O., Johnson W.E., Quigley H. et al.* Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus* // *Molecular Ecol.* 2001. V. 10. P. 2617–2633.
- Wiedemann C., Zahmel J., Jewgenow K.* Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation // *BMC Vet. Res.* 2013. V. 22. P. 9–37.
- Wildt D.E., Monfort S.L., Donoghue A.M. et al.* Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo // *Theriogenology*. 1992. V. 37. P. 161–184.
- Wilting A., Cord A., Hearn A.J. et al.* Modelling the species distribution of flat-headed cats (*Prionailurus planiceps*), an endangered South-East Asian small felid // *PLoS One*. 2010. V. 5. P. e9612.
- Wilting A., Courtiol A., Christiansen P. et al.* Planning tiger recovery: Understanding intraspecific variation for effective conservation // *Science Advances*. 2015. V. 1. P. 1–15.
- Wolfe B.A., Wildt D.E.* Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage // *J. Reprod. Fertil.* 1996. V. 106. P. 135–141.
- Wood T.C., Wildt D.E.* Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro // *J. Reprod. Fertil.* 1997. V. 110. P. 355–360.
- Wozencraft W.C.* Family Felidae / In: *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Wilson D.E., Reeder D.M. (eds). Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. 3rd edition. P. 532–548.
- Yensen E., Seymour K.L.* *Oreailurus jacobita* // *Mammalian Species*. 2000. P. 1–6.
- Yildirim K., Vural M.R., Küplülü S. et al.* The effects of EGF and IGF-1 on FSH-mediated in vitro maturation of domestic cat oocytes derived from follicular and luteal stages // *Reprod. Biol.* 2013. V. 14. P. 122–127.
- Zambelli D., Cunto M.* Semen collection in cats: techniques and analysis // *Theriogenology*. 2006. V. 66. P. 159–165.

## Reproductive Biology and a Genome Resource Bank of Felidae

S. Ya. Amstislavsky<sup>1,\*</sup>, V. V. Kozhevnikova<sup>1,2</sup>, V. V. Muzika<sup>1</sup>, and E. A. Kizilova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>2</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

\*e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Received April 25, 2016; in final form, October 25, 2016

The main achievements in applying modern reproductive technologies to the banking of the genetic resources of the Felidae family are reviewed. The classification of felids at the level of species and subspecies is revised in the light of recent molecular data. Special emphasis is made on such mainstream technologies as semen collection and cryopreservation followed by artificial insemination, as well as on in vitro maturation and fertilization of oocytes combined with the culture of in vitro-derived felid embryos.

**Keywords:** Felidae, genetic resource banking, embryos, in vitro culture