

# Криобанк генетических ресурсов кошачьих

С.Я. Амстиславский<sup>1</sup>✉, В.И. Мокроусова<sup>1,2</sup>, В.В. Кожевникова<sup>1,2</sup>, Е.А. Кизилова<sup>1,2</sup>, Е.Ю. Брусенцев<sup>1</sup>,  
К.А. Окотруб<sup>3</sup>, В.А. Напримеров<sup>1,4</sup>, С.В. Найденко<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт автоматизации и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

Многие из существующих видов кошачьих находятся под угрозой исчезновения или уязвимы. Остальные представители этого семейства включают в себя исчезающие подвиды. Лишь очень немногие из кошачьих, кроме домашней кошки, не входят в группу риска. Криоконсервация эмбрионов и гамет является современным подходом к сохранению генетических ресурсов млекопитающих *ex situ*. Замораживание семени было применено к домашнему коту и более чем к 25 диким представителям этого семейства. Однако криоконсервация эмбрионов и ооцитов была успешной для небольшого числа видов кошек. Только у домашнего кота и у четырех диких представителей семейства кошачьих получено потомство после криоконсервации и последующей трансплантации эмбрионов. В отношении ооцитов разные способы замораживания и криоконсервации до сих пор экспериментально отрабатываются только на домашней кошке. В Новосибирске в ИЦиГ СО РАН создан криобанк генетических ресурсов, содержащий замороженные образцы семени дальневосточного лесного кота, красной и евразийской рыси. В результате разработаны оригинальные методы замораживания семени кошачьих. Заморожены эмбрионы домашней кошки, разрабатываются подходы к замораживанию ооцитов кошачьих. По отношению к эмбрионам и гаметам кошачьих использованы биологические и физические методы. В частности, в ходе процесса замораживания эмбрионов и ооцитов ведется мониторинг происходящих в них изменений при помощи метода комбинационного рассеяния света. В данном исследовании использованы различные способы оценки жизнеспособности замороженно-оттаянных сперматозоидов и эмбрионов, включающие в себя прижизненное окрашивание и последующие флуоресцентную и световую микроскопию, а также гетерологичное экстракорпоральное оплодотворение.

Ключевые слова: кошачьи; криоконсервация генетических ресурсов; комбинационное рассеяние света; репродуктивные технологии.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Амстиславский С.Я., Мокроусова В.И., Кожевникова В.В., Кизилова Е.А., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Напримеров В.А., Найденко С.В. Криобанк генетических ресурсов кошачьих. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):561-568. DOI 10.18699/VJ17.27-o

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Amstislavsky S.Ya., Mokrousova V.I., Kozhevnikova V.V., Kizilova E.A., Brusentsev E.Yu., Okotrub K.A., Naprimerov V.A., Naidenko S.V. Genome resource banking in the family Felidae. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):561-568. DOI 10.18699/VJ17.27-o (in Russian)

УДК 569.742.7: 576.37

Поступила в редакцию 17.01.2017 г.

Принята к публикации 06.02.2017 г.

Опубликована онлайн 23.06.2017 г.

© АВТОРЫ, 2017

✉ e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

## Genome resource banking in the family Felidae

S.Ya. Amstislavsky<sup>1</sup>✉, V.I. Mokrousova<sup>1,2</sup>,  
V.V. Kozhevnikova<sup>1,2</sup>, E.A. Kizilova<sup>1,2</sup>,  
E.Yu. Brusentsev<sup>1</sup>, K.A. Okotrub<sup>3</sup>,  
V.A. Naprimerov<sup>1,4</sup>, S.V. Naidenko<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

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

<sup>3</sup> Institute of Automation and Electrometry SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

<sup>5</sup> Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia

Many of the extant Felidae species are endangered or vulnerable. Others being not endangered as a whole species contain endangered subspecies. Only a very few cat species, besides domestic cats, are not in the risk group. Cryopreservation of embryos and gametes is a modern approach for *ex situ* mammalian genetic resources conservation. Freezing of semen has been successfully applied to the domestic cat and to more than 25 wild members of this family. However, embryos/oocytes cryopreservation was successful for only a small number of felids. Domestic cat and four wild Felidae species produced offspring after cryopreservation and subsequent embryo transfer. Regarding freezing of oocytes, so far different cryopreservation methods are still being experimentally tried exclusively for domestic cat. Genome Resource Bank (GRB) containing frozen semen of Amur leopard cat, bobcat and Eurasian lynx was established at the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. As a result of this project, original methods of feline semen freezing have been developed; embryos of domestic cat have been successfully frozen as well. Approaches to freeze domestic cat's oocytes have also been tried. During this work, we combined biological and physical methods. In particular, the process of freezing embryos and oocytes was monitored with Raman spectroscopy. Different methods of frozen-thawed spermatozoa and embryonic viability testing were used in this study, including vital staining and subsequent fluorescent and light microscopy, and heterologous *in vitro* fertilization.

Key words: Felidae; cryopreservation of genome resources; Raman spectroscopy; reproductive technologies.

Домашняя кошка – пожалуй, самый распространенный питомец, в мире обитает более 600 млн представителей этого вида. В семейство кошачьих (Felidae) помимо домашней кошки входят еще дикие виды. Систематика семейства кошачьих разработана достаточно подробно (Johnson et al., 2006; O'Brien et al., 2008). Из 38 видов современных диких кошачьих имеется только семь крупных кошек, пять из которых составляют «большую пятерку» и объединены в род пантер: ирбис, леопард, ягуар, лев, тигр (вес от 55 кг у ирбиса, до 300 кг и более – у тигра), к ним примыкают по размеру пума и гепард (их вес достигает 40–60 кг). Поскольку для больших кошек необходима достаточно обширная территория для охоты и обитания, становится понятным, почему такие крупные виды кошачьих, как тигр, азиатский лев, ирбис и некоторые подвиды леопарда, стали исчезающими. Фонды сохранения диких животных оказывают основное внимание этим большим кошкам. Остальные представители диких кошек имеют вес тела не более 30 кг (Mattern, McLennan, 2000). Средним и мелким кошкам уделяется несравненно меньше средств и усилий со стороны научного сообщества и фондов, занимающихся сохранением дикой природы, хотя 13 из 31 вида мелких кошачьих находятся под угрозой вымирания (Brodie, 2009).

Традиционные способы сохранения популяций исчезающих видов, к сожалению, не всегда применимы для кошачьих. Разведение их в неволе крайне трудоемко, более того, выращенные в неволе животные теряют способность выживать в дикой природе (Amstislavsky et al., 2008). Для создания же охраняемых территорий обитания кошачьим необходимо выделить очень большие площади, что затруднительно в условиях расширяющейся хозяйственной деятельности человека. Выходом в такой ситуации может быть криоконсервация генетических ресурсов, благодаря которой можно сохранять генетическое разнообразие диких видов кошачьих *ex situ* (Абрамова и др., 2014; Амстиславский и др., 2017).

### **Замороженные сперматозоиды – основа криобанка кошачьих**

Успешная криоконсервация семени домашнего кота была впервые продемонстрирована еще в 1970-е годы прошлого столетия. В первом эксперименте семя замораживали в гранулах, охлаждая его при температуре сухого льда, без какого-либо контейнера, и после этого погружали в жидкий азот (Platz et al., 1978). Семя кошачьих обычно подвергают замораживанию и криоконсервации в специальных соломинах, изготовленных из пластика, выдерживающего охлаждение до температуры жидкого азота (Gañán et al., 2009a, b; Амстиславский и др., 2017).

К настоящему времени было заморожено семя не только от домашних, но и от многих видов диких кошачьих (таблица). Однако, поскольку с дикими видами работать приходится вне привычного окружения лаборатории, это может создавать определенные сложности.

В настоящее время в ИЦиГ СО РАН (Новосибирск) активно ведутся работы по созданию криобанка генетических ресурсов кошачьих. Кроме семени нескольких пород домашних котов, здесь в замороженном виде сохраняется семя дальневосточного лесного кота, рыжей и евразийской

рыси. Семя получено и заморожено нами в содружестве с группой С.В. Найдено (ИПиЭ РАН им. А.Н. Северцова, Москва) и помещено в криобанк в Новосибирске. При замораживании семени этих видов мы успешно использовали криопротекторные смеси, разработанные для других млекопитающих. Так, CaniPlusFreeze (Minitube, Германия) была изначально разработана для замораживания семени псовых, а SpermFreeze (FertiPro, Бельгия) используют в клиниках экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) для замораживания семени человека. Обе криопротекторные смеси были впервые применены нами по отношению к кошачьим.

Качество семени оценивали как до, так и после замораживания. В своей практике мы использовали методы оценки сперматозоидов кошачьих с помощью компьютеризированного анализатора спермы (Абрамова и др., 2014), а также применяли методы двойной окраски – флуорохромами (SYBR Green I и PI) с последующей конфокальной микроскопией либо эозином-нигрозином в сочетании со световой микроскопией. Последний метод наиболее удобен для использования в полевых условиях, в которых иногда приходится работать с дикими котами. В настоящее время окрашивание эозином-нигрозином используется нами применительно к семени домашнего кота, дальневосточного лесного кота, красной и евразийской рыси (рис. 1).

Для оценки оплодотворяющей способности семени проводится тестовое гомологическое или гетерологическое оплодотворение яйцеклеток своего или близкородственного вида соответственно. Существует два метода такого оплодотворения – искусственное осеменение (ИО) предварительно простимулированной гормонами самки и экстракорпоральное оплодотворение яйцеклеток, извлеченных из яичника. Тестовое оплодотворение наиболее точно показывает жизнеспособность семени и успешность его криоконсервации.

### **Криоконсервация эмбрионов кошек**

Эмбриотехнологии, используемые на кошачьих, ориентированы главным образом на сохранение исчезающих видов этого семейства. Соответственно, работы по криоконсервации эмбрионов Felidae сводятся к их получению, хранению и трансплантации.

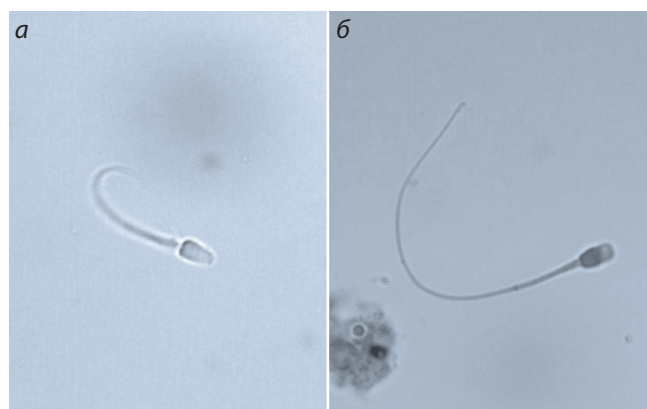
Общий период преимплантационного развития у домашней кошки чуть менее двух недель, т. е. имплантация происходит через 12 дней после спаривания или на 11-й день после овуляции яйцеклетки (Denker et al., 1978; Swanson et al., 1994). Хорошо известна динамика развития эмбрионов домашней кошки в течение первой недели, за этот период они успевают достичь стадии морулы и бластоцисты. Первый цикл дробления завершается через сутки после оплодотворения. Затем дробление становится асинхронным, и на следующие сутки можно видеть эмбрионы, состоящие из 3, 4 и 5 клеток. На 5–6-е сут культивирования эмбрионы становятся многоклеточными. При развитии *in utero* на 6-е сутки после спаривания эмбрионы достигают морулы и даже ранней бластоцисты и попадают из яйцеводов в матку (Swanson et al., 1994). Сходный график развития сохраняется при получении и культивировании эмбрионов *in vitro* (Roth et al., 1994).

## Дикие кошки, семя которых подвергалось криоконсервации

Вид / подвид	Литературный источник
Лев ( <i>Panthera leo</i> )	Thuwanut et al., 2013
Ирбис ( <i>Panthera uncia</i> )	Fickel et al., 2007
Ягуар ( <i>Panthera onca</i> )	Swanson et al., 2003
Тигр ( <i>Panthera tigris</i> )	Donoghue et al., 1993
Леопард ( <i>Panthera pardus</i> )	Thuwanut et al., 2013
Северо-китайский леопард ( <i>Panthera pardus japonensis</i> )	Fickel et al., 2007
Дальневосточный леопард ( <i>Panthera pardus orientalis</i> )	»
Дымчатый леопард ( <i>Neofelis nebulosa</i> )	Pukazhenthii et al., 2006
Кот-рыболов ( <i>Prionailurus viverrinus</i> )	Thiangtum et al., 2006
Суматранская кошка ( <i>Prionailurus planiceps</i> )	Thuwanut et al., 2011
Бенгальская кошка ( <i>Prionailurus bengalensis</i> )	Ha et al., 2011
Дальневосточный лесной кот ( <i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i> )	Амтиславский и др., 2017
Евразийская рысь ( <i>Lynx lynx</i> )	Fickel et al., 2007; Амтиславский и др., 2017
Пиренейская рысь ( <i>Lynx pardinus</i> )	Gañán et al., 2009a
Рыжая рысь ( <i>Lynx rufus</i> )	Gañán et al., 2009b; Амтиславский и др., 2017
Пума ( <i>Puma concolor</i> )	Swanson et al., 2003
Гепард ( <i>Acinonyx jubatus</i> )	Terrell et al., 2012
Ягуарунди ( <i>Herpailurus yagouaroundi</i> )	Swanson et al., 2003
Оцелот ( <i>Leopardus pardalis</i> )	Swanson et al., 2003; Stoops et al., 2007; Baudi et al., 2008
Онцилла ( <i>Leopardus tigrinus</i> )	Swanson et al., 2003; Baudi et al., 2008
Пампасский кот ( <i>Leopardus colocolo</i> )	Swanson et al., 2003
Маргай ( <i>Leopardus wiedii</i> )	»
Кот Жоффруа ( <i>Leopardus geoffroyi</i> )	»
Манул ( <i>Felis manul</i> )	Fickel et al., 2007
Черноногая кошка ( <i>Felis nigripes</i> )	Herrick et al., 2010
Барханная кошка ( <i>Felis margarita</i> )	»
Камышовый кот ( <i>Felis chaus</i> )	Thuwanut et al., 2013

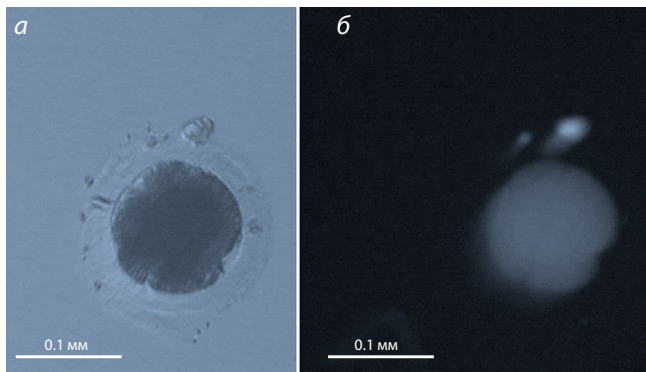
С целью криоконсервации эмбрионов кошачьих обычно применяют медленное программное замораживание (Dresser et al., 1988; Gómez et al., 2003; Swanson, Brown, 2004; Pore et al., 2012). В первом эксперименте по замораживанию эмбрионов кошачьих, проведенном нами в нашей лаборатории по модифицированному протоколу программного замораживания, предложенного М.С. Gómez с коллегами (2003), заморожено пять эмбрионов домашней кошки. Эмбрионы были получены после гомологического оплодотворения и последующего культивирования в течение двух суток. После оттаивания два эмбриона были окрашены флуорохромами FDA/PI для оценки их жизнеспособности. Один из двух эмбрионов, как показано на рис. 2, после процедуры замораживания-оттаивания остался живым (флуоресцентный сигнал в бластомерах).

Наряду с относительно медленным программным замораживанием, в настоящее время очень популярным



**Рис. 1.** Пример окрашивания семени эозин-нигрозином после криоконсервации: а – живой сперматозоид дальневосточного лесного кота (неокрашенный); б – мертвый сперматозоид евразийской рыси (окрашенный).



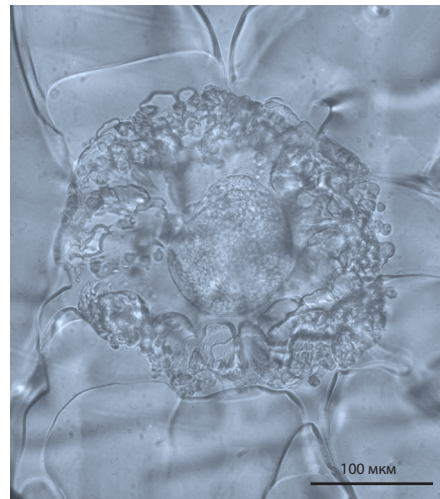


**Рис. 2.** Эмбрион домашней кошки, полученный после ЭКО семенем домашнего кота (из криобанка), замороженный на второй день развития, размороженный и окрашенный смесью флуорохромов FDA/PI. *a* – световая микроскопия; *б* – флуоресцентная микроскопия после двойного окрашивания флуорохромами FDA/PI.

является сверхбыстрое охлаждение, называемое витрификацией. Несмотря на то что при витрификации используют обычно такие же криопротекторы, как и при программном замораживании, концентрация их в 4–5 раз выше (Shaw, Jones, 2003). Если при программном замораживании скорость охлаждения составляет обычно один градус в минуту или даже десятые доли градуса в минуту, то при витрификации скорость охлаждения биологического материала составляет обычно от 200 до 20 тыс. градусов в минуту (Shaw, Jones, 2003). По отношению к эмбрионам домашней кошки программное замораживание пока дает лучшие результаты, чем витрификация (Pore et al., 2012). Возможной причиной этого является повышенная чувствительность эмбрионов кошачьих к высоким дозам криопротектора, что, по всей видимости, обусловлено высоким содержанием липидных гранул в цитоплазме эмбрионов и ооцитов кошачьих (Karja et al., 2006).

В первой успешной работе по замораживанию кошачьих эмбрионов (Dresser et al., 1988) применяли глицерин в качестве криопротектора и стандартную программу замораживания эмбрионов, используемую для домашнего скота (Leibo, Songsasen, 2002). В наши дни для криоконсервации эмбрионов кошачьих чаще всего применяют этиленгликоль (Swanson, Brown, 2004) или пропиленгликоль (Gómez et al., 2003). Эти два криопротектора лучше проникают через клеточные мембраны, чем глицерин (Pedro et al., 2005).

В дальнейшем успешной криоконсервации подвергались эмбрионы домашней кошки (Dresser et al., 1988), африканской дикой кошки (Pore, 2000), оцелота (Conforti et al., 2008), каракала (Pore et al., 2006). Относительно недавно опубликован результат работы по успешной криоконсервации эмбрионов исчезающего вида кошачьих, обитающего на юге Африки, – черноногой кошки (*Felis nigripes*), причем после криоконсервации эмбрионы были успешно трансплантированы реципиентам не только своего, но и другого вида, т. е. домашней кошке (Pore et al., 2012). После криоконсервации эмбрионы были разморожены и трансплантированы самкам-реципиентам, что закончилось получением живого потомства.



**Рис. 3.** Ооцит домашней кошки, окруженный клетками кумулюса (КОК – кумулюс-ооцитный комплекс) в процессе замораживания и исследования с применением комбинационного рассеяния света. Вокруг ооцита видны кристаллики льда ( $T = -47^\circ\text{C}$ ).

### Замораживание яйцеклеток кошек: технология будущего

Криоконсервация ооцитов для всех видов млекопитающих обычно менее эффективна, чем криоконсервация эмбрионов. Одно из осложнений при этом – затвердевание прозрачной оболочки, что препятствует успешному проникновению спермиев при проведении последующего ЭКО (Амстиславский и др., 2015). Однако существуют и другие осложнения; для зрелых ооцитов наиболее существенно нарушение веретена деления (Амстиславский и др., 2017). С незрелыми ооцитами проблем еще больше. Они окружены несколькими слоями кумулюсных клеток (рис. 3). В данном случае низкая проницаемость мембраны и наличие слоев кумулюса препятствуют насыщению их криопротектором, что осложняет процесс замораживания (Cocchia et al., 2010). Кроме того, для незрелых ооцитов серьезным негативным последствием криоконсервации может быть нарушение связей между ооцитом и клетками кумулюса, окружающими и питающими ооцит. Ооциты кошачьих содержат большое количество липидных капель, которые тоже могут негативно влиять на результаты криоконсервации.

Несмотря на описанные сложности криоконсервации яйцеклеток кошек, имеются отдельные обнадеживающие работы. Так, например, С.Е. Поре с коллегами из центра по исследованию исчезающих видов (Новый Орлеан, США) удалось успешно витрифицировать созревшие ооциты домашней кошки, затем оплодотворить их при помощи интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) и после трансплантации реципиентам получить живых котят (Pore et al., 2012). Недавно при помощи традиционного ЭКО и трансплантации эмбрионов реципиенту удалось получить живого котенка из подвзгнуттого липидной поляризации и витрификации ооцита (Galiguís et al., 2014).

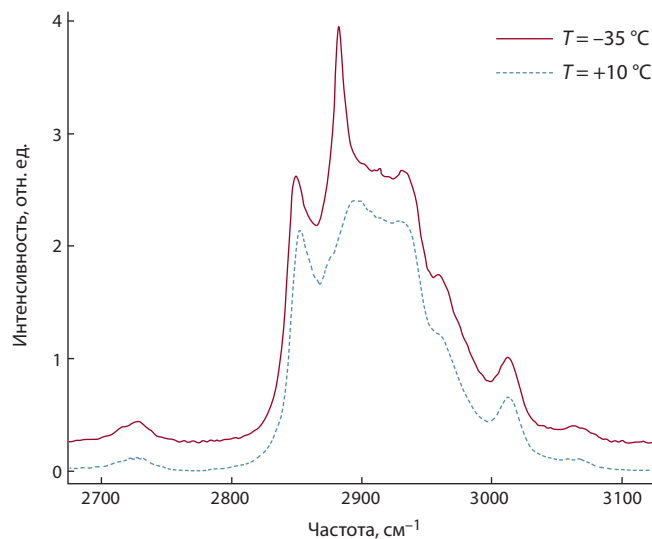
Криоконсервация незрелых ооцитов представляет собой наиболее заманчивую возможность для сохранения

генетических ресурсов, так как у самок большинства видов млекопитающих именно в виде незрелых ооцитов находится до 99 % всего запаса гамет. По некоторым оценкам, в яичнике молодой кошки имеется около 75000 ооцитов, из них лишь менее 1 % ооцитов находится в составе растущих фолликулов (Jewgenow, Paris, 2006). На практике же нам удавалось из двух яичников кошки извлекать в среднем 30–50 КОК, которые могут дозреть *in vitro*. Такое большое число способных к дозреванию ооцитов объясняет, почему замораживание незрелых ооцитов весьма перспективно при криоконсервации женских гамет кошачьих. Интересно, что сравнение витрификации и программного замораживания незрелых ооцитов домашней кошки, проведенное в лаборатории Г.С. Лювони в Милане (Италия), свидетельствует в пользу программного замораживания (Luciano et al., 2009), так же как и при криоконсервации эмбрионов.

Криоконсервация клетки неразрывно связана с физическими процессами, протекающими при глубоком охлаждении материалов. Таким образом, совершенно естественным подходом является привлечение физических методов для изучения криоконсервации гамет и эмбрионов кошачьих.

В настоящее время наиболее перспективной физической методикой для исследования замораживаемых клеток представляется спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС; в англоязычной литературе обычно используется термин “Raman spectroscopy”). Эффект КРС заключается в том, что если облучить исследуемое вещество монохроматическим излучением, то некоторая небольшая часть рассеянного света меняет свою длину волны. Это изменение вызвано молекулярными колебаниями, и, если измерить длины волн, то можно делать выводы о том, на каких частотах колеблются молекулы в исследуемом веществе. Поскольку спектры для многих веществ уже изучены, путем сравнения можно отслеживать концентрацию криопротектора, изучить агрегатное состояние и фазовые переходы замораживаемого вещества непосредственно в области, на которую направлен монохроматический лазерный луч. Поскольку свет можно сфокусировать в очень малый объем, метод КРС используют для исследования вещества, причем с высоким пространственным разрешением. Спектроскопия КРС хорошо сочетается с криомикроскопией и позволяет одновременно наблюдать за эмбрионом или ооцитом (см. рис. 3, 4) и получать дополнительную информацию о том, что с ним происходит на субклеточном уровне. В частности, с помощью КРС возможно изучать изменения, происходящие в отдельных липидных каплях эмбрионов.

На рис. 4 показаны спектры КРС от липидной капли эмбриона кошки, измеренные в начале процесса заморозки ( $T = +10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и на промежуточном этапе ( $T = -35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). В спектроскопии КРС принято строить спектры не в длинах волн (нанометрах), а в частотах, причем частоты измеряют в обратных сантиметрах ( $1\text{ см}^{-1}$  составляет 30 ГГц). При сравнении двух спектров видно, что при охлаждении возникает острый пик на частоте  $2880\text{ см}^{-1}$ . Эта линия, а также линия на  $2850\text{ см}^{-1}$  относятся к двум колебаниям C-H<sub>2</sub> связи в липидах. Но если линия на  $2850\text{ см}^{-1}$  (и соответствующее колебание) практически



**Рис. 4.** Спектры комбинационного рассеяния света, измеренные от липидной капли эмбриона кошки на разных стадиях процесса замораживания.

не чувствительна к температуре, то пик на  $2880\text{ см}^{-1}$  при плюсовых температурах незаметен, а с понижением температуры он становится более узким и визуально «заостряется». Наблюдаемый эффект объясняется тем, что с понижением температуры происходит упорядочение неполярных углеродных цепочек липидов, а когда все цепочки оказываются в приблизительно одинаковом конформационном состоянии, то и их колебания попадают на одну и ту же частоту ( $2880\text{ см}^{-1}$ ). То есть происходит фазовый переход липидов внутриклеточной липидной капли из состояния «флюид» в состояние «гель».

Эту информацию невозможно получить с помощью криомикроскопии, но она крайне важна, поскольку нормальное функционирование клеток происходит только при условии, если липиды (и в жировых каплях, и в мембранах) находятся в так называемом флюидном, неупорядоченном состоянии. Для понимания внутриклеточных процессов, происходящих в отдельных клетках эмбриона, очень важно знать, при каких температурах происходит это конформационное изменение состояния липидов жировых капель и мембран. Особенно это важно для кошачьих, поскольку в эмбрионах кошачьих таких липидных капель очень много и от их состояния зависит правильность хода процессов замораживания и криоконсервации.

В настоящее время имеется только небольшое число работ по исследованию процессов, происходящих на субклеточном уровне в ходе программного замораживания или витрификации эмбрионов и ооцитов кошачьих. Перспективным способом «заглянуть внутрь» процесса замораживания является развиваемый нами подход с применением комбинационного рассеяния света как метода изучения замораживаемых объектов (Karpagina et al., 2016). В данном случае физический метод КРС помогает понять процессы, имеющие место в липидах мембран и внутриклеточных жировых каплях, но с помощью этого метода можно исследовать многие другие процессы в

клетках, например изменения во внутриклеточной дыхательной цепи, происходящие в ходе замораживания эмбрионов или ооцитов. Таким образом, спектроскопия КРС позволяет значительно расширить возможности в исследовании процесса замораживания преимплантационных эмбрионов и ооцитов кошачьих.

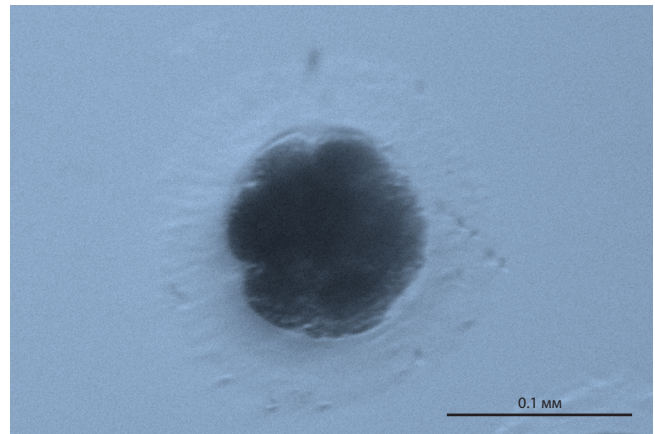
### Гибридизация – создание новых кошачьих пород и сохранение диких кошек

В зоопарках мира часто получают межвидовые гибриды крупных кошек, такие как лигр (гибрид льва и тигрицы), тигон (гибрид тигра и львицы), леопон (гибрид леопарда и львицы), и многие другие. Гибриды за пределами рода пантер известны меньше, но, тем не менее, возникают в самых различных комбинациях, в тех случаях, когда человек намеренно стремится их получить. Довольно часто эти случаи остаются неподтвержденными, однако имеются подтвержденные, описанные в научных журналах, случаи гибридизации, например, между самцом оцелота и самкой пумы (Dubost, Royère, 1993) или между самцом льва и самкой леопарда (Florio, 1983). При этом попытки получить межвидовой гибрид почти всегда сопряжены со сложностями, связанными с поведенческими и репродуктивными барьерами.

Межвидовая гибридизация кошачьих встречается не только в неволе, но и в дикой природе. Так, на севере США, в штате Миннесота часто обнаруживают гибриды канадской и рыжей рыси (Schwartz et al., 2004). В Южной Америке, в Бразилии, происходит гибридизация двух местных видов – онциллы и кота Жоффруа – там, где ареалы этих видов пересекаются (Trigo et al., 2013). Во многих европейских странах отмечается гибридизация домашнего и европейского дикого лесного кота (Oliveira et al., 2008; Randi, 2008).

Поскольку в настоящее время репродуктивные технологии применительно к кошачьим бурно развиваются, удалось получить гибриды кошачьих *in vitro* – в виде эмбрионов – путем гетерологического оплодотворения семенем одного вида кошачьих яйцеклеток другого вида. В подавляющем большинстве современных работ гетерологическое оплодотворение рассматривается лишь как тест для проверки оплодотворяющей способности семени диких видов кошачьих. Описаны дробящиеся гибридные эмбрионы при проведении ЭКО яйцеклеток домашней кошки семенем манулы, леопарда, гепарда, рыжей рыси. Особый интерес представляют работы, выполненные с участием исчезающих видов кошачьих, таких как пиренейская рысь (*Lynx pardinus*), кот-рыболов (*Prionailurus viverrinus*), суматранская кошка (*Prionailurus planiceps*). В этих случаях получены гибридные эмбрионы, развившиеся *in vitro* до стадии морулы и даже бластоцисты (Thiangtum et al., 2006; Gañán et al., 2009a, b; Thuwanut et al., 2011).

Данный способ может стать со временем одним из важных инструментов выведения новых гибридных пород, поскольку таким путем удается преодолеть межвидовые репродуктивные этологические барьеры. Наши собственные эксперименты по получению межродовых гибридов путем ЭКО семенем дальневосточного лесного кота яйцеклеток домашней кошки недавно увенчались успехом (рис. 5).



**Рис. 5.** Гибридный эмбрион домашней кошки и дальневосточного лесного кота, полученный *in vitro* в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН.

Как показано экспериментально, межвидовая трансплантация у кошачьих может приводить к рождению живого потомства (Gómez, 2009; Pope et al., 2012), однако эффективность этого метода весьма низкая. Межвидовые гибриды можно использовать для восстановления видов, поскольку, как показали наши собственные исследования на куньих (Amstislavsky et al., 2004) и мохноногих хомячках (Brusentsev et al., 2015), гибридные самки являются идеальными реципиентами для трансплантации эмбрионов обоих родительских видов, в том числе взятых из криобанка. При таком подходе (трансплантации эмбрионов межвидовым гибридам) метод становится эффективным и результативность достигает 50 % (Amstislavsky et al., 2004; Brusentsev et al., 2015), т. е. во много раз выше, чем во всех работах без применения гибридов. Особенно эффективен этот подход при наличии криобанка. Таким образом, криоконсервация генетических ресурсов в сочетании с набором других репродуктивных технологий – перспективный метод сохранения исчезающих видов кошачьих.

### Благодарности

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 15-04-03258 и 16-04-01221) и выполнена в рамках государственного задания по бюджетному проекту № 0324-2016-0002. Содержание животных на исследовательской станции в Черноголовке поддержано проектом «Живые коллекции диких животных».

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Абрамова Т.О., Кизилова Е.А., Масленникова С.О., Рожкова И.Н., Байбородин С.И., Брусенцев Е.Ю., Найдено С.В., Амстиславский С.Я. Криоконсервация семени кошачьих. *Биофизика живой клетки*. 2014;10:17-19.
- Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Окоотруб К.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных. *Онтогенез*. 2015;46(2): 67-81. DOI 10.7868/S0475145015020020.



- Амстиславский С.Я., Кожевникова В.В., Музыка В.В., Кизилова Е.А. Репродуктивная биология и консервация генетических ресурсов кошачьих. *Онтогенез*. 2017;48(2):93-106. DOI 10.7868/S0475145017020021.
- Amstislavsky S., Aalto J., Järvinen M., Lindeberg H., Valtonen M., Zudova G., Ternovskaya Y. Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients. *Theriogenology*. 2004;62(3):458-467. DOI 10.1016/j.theriogenology.2003.10.011.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Aalto J., Kennedy M.W. Conservation of the European mink (*Mustela lutreola*): focus on reproduction and reproductive technologies. *Reprod. Dom. Anim.* 2008;43(4):502-513. DOI 10.1111/j.1439-0531.2007.00950.x.
- Baudi D.L.K., Jewgenow K., Pukazhenthil B.S., Spercoski K.M., Santos A.S., Reghelin A.L.S., Candido M.V., Javorouski M.L., Muller G., Morais R.N. Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive *in vitro* binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*. 2008;69(2):204-211. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.09.013.
- Brodie J.F. Is research effort allocated efficiently for conservation? Felidae as a global case study. *Biodivers. Conserv.* 2009;18(11):2927-2939. DOI 10.1007/s10531-009-9617-3.
- Brusentsev E., Abramova T.O., Rozhkova I.N., Igonina T.N., Naprimеров V.A., Feoktistova N., Amstislavsky S. Cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Reprod. Dom. Anim.* 2015;50(4):677-683. DOI 10.1111/rda.12564.
- Cocchia N., Ciani F., Russo M., El Rass R., Rosapane I., Avallone L., Tortora G., Lorzio R. Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture. *Cryobiology*. 2010;60(2):229-234. DOI 10.1016/j.cryobiol.2010.01.003.
- Conforti V.A., Adania C.H., Gonzalez P.G., de Oliveira C., Swanson W.F. 155 novel recipient synchronization regimens for successful embryo transfer in the Brazilian ocelot following long-term frozen embryo storage. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008;21(1):176-177. DOI 10.1071/RDv21n1Ab155.
- Denker H.W., Eng L.A., Hamner C.E. Studies on the early development and implantation in the cat. *Anat. Embryol.* 1978;154(1):39-54. DOI 10.1007/BF00317953.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Armstrong D.L., Simmons L.G., Wildt D.E. Birth of a Siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. *J. Zoo Wild. Med.* 1993;24(2):185-189. DOI 10.1638/1042-7260(2000)031[0566:BOSTPT]2.0.CO;2.
- Dresser B.L., Gelwicks E.J., Wachs K.B., Keller G.L. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. *J. Exp. Zool.* 1988;246(2):180-186. DOI 10.1002/jez.1402460210.
- Dubost G., Royère J.Y. Hybridization between ocelot (*Felis pardalis*) and puma (*Felis concolor*). *Zoo Biol.* 1993;12(3):277-283. DOI 10.1002/zoo.1430120305.
- Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildlife Res.* 2007;53(2):81-89. DOI 10.1007/s10344-007-0089-z.
- Florio P.L. Birth of a lion × leopard hybrid in Italy. *Int. Zoo News.* 1983;178(30/2):4-6.
- Galiguis J., Gómez 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;68(3):459-466. DOI 10.1016/j.cryobiol.2014.02.012.
- Gañán N., González R., Garde J.J., Martínez F., Vargas A., Gomenadio M., Roldan E.R. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 2009a;21(7):848-859. DOI 10.1071/RD08226.
- Gañán N., González R., Sestelo A., Garde J.J., Sánchez I., Aguilar J.M., Gomenadio M., Roldan E.R.S. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous *in vitro* fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology*. 2009b;72(3):341-352. DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.03.002.
- Gómez M.C., Pope E., Harris R., Mikota S., Dresser B.L. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology*. 2003;60(2):239-251. DOI 10.1016/S0093-691X(03)00004-9.
- Ha A.N., Jo A.R., Kim Y.G., Yoon J.H., Bang J.I., Deb G.K., Fakruzaman M., Lim Y.M., Yong H.Y., Kong I.K. Establishment of cryopreservation of leopard cat semen collected by electro-ejaculation method. *J. Embryo Transfer*. 2011;26(4):245-250. DOI 10.1292/jvms.15-0439.
- Herrick J.R., Campbell M., Levens G., Moore T., Benson K., D'Agostino J., West G., Okeson D.M., Coke R., Portacio S.C., Kreider C., Polumbo P.J., Swanson W.F., Leiske K. In vitro fertilization and sperm cryopreservation in the black-footed cat (*Felis nigripes*) and sand cat (*Felis margarita*). *Biol. Reprod.* 2010;82(3):552-562. DOI 10.1095/biolreprod.109.081034.
- Jewgenow K., Paris M.C. Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology*. 2006;66(1):93-100. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.03.010.
- Johnson W.E., Eizirik E., Pecon-Slattery J., Murphy W.J., Antunes A., Teeling E., O'Brien S.J. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science*. 2006;311(5757):73-77. DOI 10.1126/science.1122277.
- Karja N.W.K., Otoi T., Wongsrikeao P., Murakami M., Agung B., Fahrudin M., Nagai T. *In vitro* development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats. *Theriogenology*. 2006;65(2):415-423. DOI 10.1016/j.theriogenology.2005.04.029.
- Karpegina Y.A., Okotrub K.A., Brusentsev E.Y., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Cryoprotectant redistribution along the frozen straw probed by Raman spectroscopy. *Cryobiology*. 2016;72(2):148-153. DOI 10.1016/j.cryobiol.2016.01.002.
- Leibo S.P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. 2002;57(1):303-326. DOI 10.1016/S0093-691X(01)00673-2.
- Luciano A.M., Chigioni S., Lodde V., Franciosi F., Luvoni G.C., Modina S.C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology*. 2009;59(1):90-95. DOI 10.1016/j.cryobiol.2009.05.002.
- Mattern M.Y., McLennan D.A. Phylogeny and speciation of felids. *Cladistics*. 2000;16(2):232-253. DOI 10.1111/j.1096-0031.2000.tb00354.x.
- O'Brien S.J., Johnson W., Driscoll C., Pontius J., Pecon-Slattery J., Menotti-Raymond M. State of cat genomics. *Trends Genet.* 2008;24(6):268-279. DOI 10.1016/j.tig.2008.03.004.
- Oliveira R., Godinho R., Randi E., Ferrand N., Alves P.C. Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conserv. Genet.* 2008;9(1):1-11. DOI 10.1007/s10592-007-9297-z.
- Pedro P.B., Yokoyama E., Zhu S.E., Yoshida N., Valdez Jr. D.M., Tanaka M., Edashige K., Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J. Reprod. Dev.* 2005;51(2):235-246. DOI 10.1262/jrd.16079.
- Platz C.C., Wildt D.E., Seager S.W.J. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1978;52(2):279-282. DOI 10.1530/jrf.0.0520279.
- Pope C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*. 2000;53(1):163-174. DOI 10.1016/S0093-691X(99)00249-6.
- Pope C.E., Gómez M.C., Dresser B.L. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology*. 2006;66(6):1518-1524. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.01.026.
- Pope C.E., Gómez M.C., Galiguis J., Dresser B.L. Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats. *Reprod. Dom. Anim.* 2012;47(s6):125-129. DOI 10.1111/rda.12053.

- Pukazhenthil B., Laroe D., Crosier A., Bush L.M., Spindler R., Pelican K.M., Bush M., Howard J.G., Wildt D.E. Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2006;66(6):1790-1796. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.02.020.
- Randi E. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Mol. Ecol.* 2008;17(1):285-293. DOI 10.1111/j.1365-294X.2007.03417.x.
- Roth T.L., Howard J.G., Donoghue A.M., Swanson W.F., Wildt D.E. Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 1994;101(3):563-569. DOI 10.1530/jrf.0.1010563.
- Schwartz M.K., Pilgrim K.L., McKelvey K.S., Lindquist E.L., Claar J.J., Loch S., Ruggiero L.F. Hybridization between Canada lynx and bobcats: genetic results and management implications. *Conserv. Genet.* 2004;5(3):349-355. DOI 10.1023/B:COGE.0000031141.47148.8b.
- Shaw J.M., Jones G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update*. 2003;9(6):583-605. DOI 10.1093/humupd/dmg041.
- Stoops M.A., Bond J.B., Bateman H.L., Campbell M.K., Levens G.P., Bowsler T.R., Shannon T.F., Swanson W.F. 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;19(5):685-694. DOI 10.1071/RD06078.
- Swanson W.F., Brown J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Anim. Reprod. Sci.* 2004;82:21-34. DOI 10.1016/j.anireprosci.2004.05.008.
- Swanson W.F., Johnson W.E., Cambre R.C., Citino S.B., Quigley K.B., Brousset D.M., Morais R.N., Moreira N., O'Brien S.J., Wildt D.E. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for *ex situ* conservation. *Zoo Biol.* 2003;22(5):421-441. DOI 10.1002/zoo.10093.
- Swanson W.F., Roth T.L., Wildt D.E. *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 1994;51(3):452-464.
- Terrell K.A., Wildt D.E., Anthony N.M., Bavister B.D., Leibo S.P., Penfold L.M., Marker L.L., Crosier A.E. Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa. *Cryobiology*. 2012;64(2):110-117. DOI 10.1016/j.cryobiol.2011.12.006.
- Thiangtum K., Swanson W.F., Howard J., Tunwattana W., Tongthainan D., Wichasilpa W., Patumrattanathan P., Pinyopoommintr T. Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous *in vitro* fertilisation in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 2006;18(3):373-382. DOI 10.1071/RD05098.
- Thuwanut P., Chatdarong K., Bergqvist A.S., Söderquist L., Thiangtum K., Tongthainan D., Axner E. The effects of antioxidants on semen traits and *in vitro* fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*). *Theriogenology*. 2011;76(1):115-125. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.01.024.
- Thuwanut P., Srisuwatanasagul S., Wongbandue G., Tanpradit N., Thongpakdee A., Tongthainan D., Manee-In S., Chatdarong K. Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. *Cryobiology*. 2013;67(2):244-247. DOI 10.1016/j.cryobiol.2013.07.002.
- Trigo T.C., Schneider A., de Oliveira T.G., Lehugeur L.M., Silveira L., Freitas T.R., Eizirik E. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. *Curr. Biol.* 2013;23(24):2528-2533. DOI 10.1016/j.cub.2013.10.046.