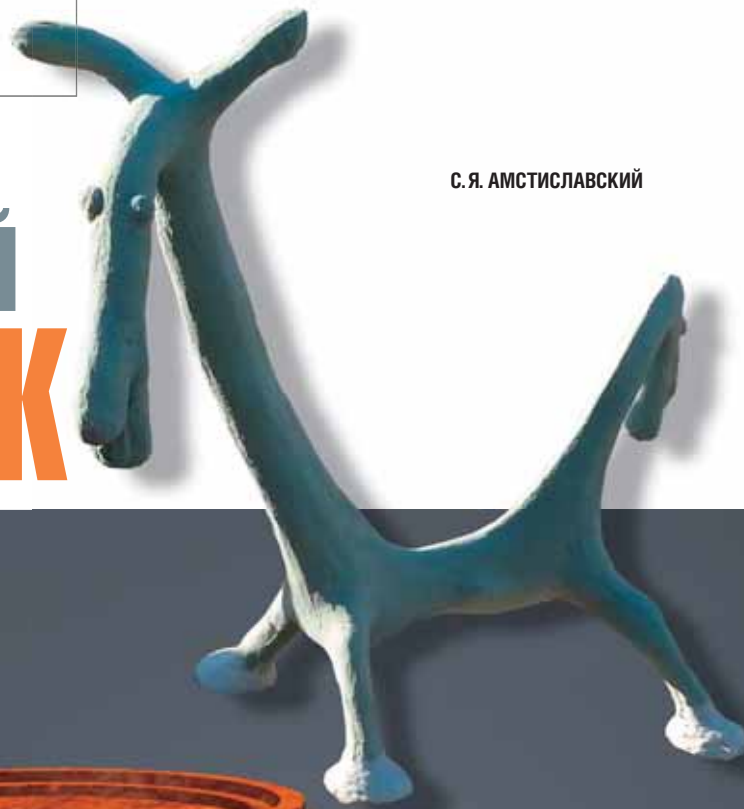


Замороженный ЗООПАРК

Введение
в криоархивирование

С. Я. АМСТИСЛАВСКИЙ



© С. Я. Амтиславский, 2014

Подобно тому как в знаменитой сказке Р. Киплинга человеческий детеныш, не имевший ни клыков, ни когтей, в конце концов уничтожил могучего тигра Шер-Хана, в реальном мире человек, вольно или невольно, оказался причиной вымирания не только нескольких подвидов тигра, но и многих других видов диких животных. Однако занявшему место «царя зверей» человеку следует взять и ответственность за сохранение своего «царства». Современные биотехнологии, основанные на достижениях репродуктивной биологии, предоставляют новые, неведомые ранее возможности для сохранения генетического биоразнообразия животного мира и дают шанс на выживание тем видам, которым грозит вымирание

Сейчас на планете обитает около 5,0–5,5 тыс. видов млекопитающих, причем пятая часть их находится под угрозой исчезновения. Далеко не последнюю роль в этом сыграл стремительный рост численности человечества, достигшей уже 7 млрд человек, и постоянное расширение сферы его хозяйственной деятельности.

Наиболее ярким примером служит семейство кошачьих, в котором из 37 известных на сегодняшний день видов вполне процветает лишь один – домашняя кошка. Как правило, вымирают определенные подвиды, а близкие к ним – «стоят в очереди». Так, из восьми подвидов тигра сохранилось всего пять. Исчезли туранский (каспийский), яванский и балийский подвиды. Однако и положение существующих пяти подвидов нельзя назвать стабильным: по последним оценкам, в дикой природе осталось менее 3,5 тыс. особей тигра, хотя еще в начале XX в. их численность превышала 100 тыс.

Каким же образом можно остановить этот губительный процесс? Традиционные методы, заключающиеся в создании охраняемых территорий, далеко не всегда оказываются эффективными. Например, тому же тигру для полноценной жизни в природе требуются огромные пространства: в Уссурийском крае охотничьи угодья тигра могут достигать около 900 км², а в Манчжурии – даже 4 тыс. км²! Предоставить животным подобные условия в неволе чрезвычайно сложно, а зачастую вообще невозможно.

Конечно, тигров можно содержать и в зоопарках, на специальных тигриных фермах, как это делается, например, в Юго-Восточной Азии. Но подобные условия неизбежно приводят к так называемой «адаптации к неволе»: животным, выросшим на ферме, потом крайне сложно вернуться в дикую природу. Общее правило таково: с каждым новым поколением звери, выросшие в неволе, все более и более одомашниваются и теряют навыки выживания в естественной среде.

Примером этого может служить европейская норка, сегодня являющаяся исчезающим видом в отличие от другого представителя куньих – американской норки. В Эстонии проводились широкомасштабные эксперименты по возвращению в дикую природу европейских норок, рожденных в условиях фермы. Однако эти попытки закончились неудачей: выпущенные на волю,



АМСТИСЛАВСКИЙ Сергей Яковлевич – доктор биологических наук, заведующий сектором криоконсервации и репродуктивных технологий отдела генофондов экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 90 научных работ

Ключевые слова: сохранение генетических ресурсов, репродуктивная биология, эмбриотехнология, криоконсервация эмбрионов и гамет.
Key words: genome resource banking, reproductive biology, embryotechnology, cryopreservation of embryos and gametes



животные массово гибли. Кроме того, некоторые виды животных в неволе испытывают трудности с размножением, примером чего могут служить гепарды.

Так неужели же дикие виды животных обречены на постепенное обеднение своего генофонда и, в конечном счете, на вымирание? Выход из такой, казалось бы, безвыходной ситуации предлагает репродуктивная биология – новое направление, выросшее на стыке эмбриологии, генетики, зоологии и ветеринарии.

Оказалось, что репродуктивные клетки, являющиеся носителями бесценной генетической информации, можно подвергнуть криоконсервации (замораживанию). Из таких клеток – гамет, эмбрионов и эмбриональных стволовых клеток, сохраняемых в криобанке, можно впоследствии восстановить тот или иной вид во всем его генетическом многообразии. Этот же подход можно применять и для создания банков генетических ресурсов лабораторных животных.

Все живое из яйца...

Началом репродуктивной биологии можно считать далекий 1702 г., когда знаменитый изобретатель микроскопа, нидерландский естествоиспытатель Антони ван Левенгук открыл феномен «воскрешения» удивительных «зверушек», который он наблюдал при добавлении капли воды к пыли, собранной с крыши собственного дома. Действительно, эти мельчайшие многоклеточные организмы, в которых ученые признали один из видов коловраток – обычных обитателей наших прудов, спо-

собны длительно сохраняться в высушенном состоянии, не теряя жизнеспособности, и «оживать» при создании подходящих условий.

Наблюдения Левенгука дали первые свидетельства, что некоторые живые существа обладают способностью находиться в состоянии «латентной жизни», т. е. своеобразной консервации. Осталось лишь найти практичный и легковоспроизводимый способ достижения этого состояния и выхода из него – на его поиски человечество потратило последующие 250 лет.

Уже через восемьдесят лет после открытия Левенгука выдающийся итальянский ученый Л. Спалланцани блестяще продемонстрировал возможность искусственного осеменения собак. Это открытие в числе других привело научную общественность к убеждению, что в практическом отношении наиболее подходящими для консервации объектами являются репродуктивные клетки, например, сперматозоиды, мужские гаметы. Именно на них и сосредоточили свои усилия первые криобиологи.

Среди них нужно особо отметить выдающегося российского ученого И. И. Иванова, который на рубеже

Познать тайны репродуктивной биологии, заглянуть в удивительную жизнь эмбрионов и гамет современным исследователям помогают мощные микроскопы, гораздо более совершенные, чем микроскоп Левенгука.

На фото – сотрудники сектора криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН к. б. н. Т. О. Абрамова, к. б. н. И. Н. Рожкова и аспирант Е. Ю. Брусенцев около микроскопа DM2500 производства фирмы «Leica microsystems»



XIX–XX вв. не только успешно занимался искусственным осеменением лошадей и других животных, но и сделал множество удачных попыток сохранения семени млекопитающих при низких температурах. После революции Иванов загорелся идеей скрестить человека с обезьяной, для чего даже совершил поездку в Африку и основал в Сухуми питомник обезьян. Не исключено, что если бы Иванов не растратил весь свой талант и силы в бесплодных попытках получить «человекообезьяну», а остался верен исследованиям эффектов воздействия холода на сперматозоиды, он, возможно, смог бы открыть криоконсервацию биологических ресурсов в ее современном виде.

Чсть открытия способа криоконсервации мужского семени принадлежит британским ученым К. Полджу и О. Смит. И помог им в этом счастливый случай. После второй мировой войны лаборатория, в которой работали ученые, переживала не лучшие времена. Даже у некоторых банок с реактивами,

Репродуктивная биология полна парадоксов: сперматозоид домашней мыши (справа) представляется монстром по сравнению со сперматозоидом домашней кошки (слева). При этом вес кота составляет несколько килограмм, а самца мыши – всего несколько десятков граммов...



На уникальном памятнике самому знаменитому лабораторному животному, поставленном в 2013 г. рядом с SPF-виварием ИЦиГ СО РАН, бронзовая лабораторная мышь, подобно богине судьбы, вяжет двойную «нить» ДНК, основу генетического кода жизни.

Автор и художник А. Харкевич
Скульптор А. Агриколянский





стоявшими в лабораторных шкафах, не было этикеток, утраченных в результате переездов, бомбежек и других перипетий военного времени. Одну из таких банок и взяли Полдж и Смит, однако вместо нужного вещества в ней оказался... глицерин, который и был по ошибке использован в эксперименте.

Вот так были открыты криопротекторные свойства этого третомного спирта, а Полдж и Смит совершили революцию в криобиологии, доказав, что под защитой глицерина сперматозоиды могут пережить охлаждение до температуры жидкого азота (-196°C). Публикация этого открытия в журнале «Nature» в 1949 г. открыла «эру искусственного осеменения» в животноводстве, и уже начиная с 1950-х г. во многих странах семья из криобанка стали использовать для размножения крупного рогатого скота. Следует отметить, что глицерин и в наши дни остается одним из лучших криопротекторов.

Но на этом криобиологи не остановились. Как известно, при оплодотворении, т.е. слиянии женских и мужских гамет, образуется зигота (оплодотворенная яйцеклетка), которая начинает дробиться на дочерние клетки-бластомеры. Такая стадия развития зародыша называется пре- или доимплантационной. Первые успешные результаты по замораживанию преимплантационных зародышей млекопитающих (лабораторных мышей) были получены в начале 1970-х гг. в Великобритании двумя независимыми группами под руководством Д. Уиттингема и Я. Уилмута. Через несколько лет в лаборатории Уиттингема успешно прошли эксперименты по замораживанию ооцитов (женских гамет).

К настоящему времени были успешно подвергнуты замораживанию и криоконсервации преимплантацион-

ные эмбрионы более чем сорока видов млекопитающих. Что же касается ооцитов, то до сих пор не существует эффективного метода замораживания большинства видов млекопитающих. Отдельные успехи в этой области пока не дают оснований считать замораживание и криоконсервацию яйцеклеток столь же рутинной технологией, какой она является по отношению к эмбрионам и семени.

Банк генетических ресурсов

Концепция «Genome Resource Banking» получила известность в нашей стране под названием «банк генетических ресурсов» более тридцати лет назад благодаря деятельности легендарного ученого-биофизика из Пущино Б.Н. Вепринцева, его соратников и последователей. Какие же виды животных представляют интерес для криоархивирования? Прежде всего это дикие животные, для которых банки генетических ресурсов являются залогом их выживания, а также породы домашних животных, прежде всего редкие и не востребованные в данный момент, но ценные в генетическом отношении.

И, наконец, лабораторные животные. Применительно к биомедицинским исследованиям концепцию «банк генетических ресурсов» принято трактовать именно как банк линий лабораторных животных, что подразумевает консервацию не только «дикого типа» того или иного вида, но и его искусственных, генетически закрепленных форм.

В наши дни основным объектом экспериментальных исследований на позвоночных является домовая мышь. Неудивительно, что именно геном мыши, секвенированный в 2002 г., стал одним из первых расшифрованных геномов, наряду с геномом человека.

На этом животном прекрасно «работают» современные технологии трансгенеза, направленного выключения (нокаута) отдельных генов, мутагенеза. По прогнозам журнала «Nature» (2004), число мутантных, трансгенных и нокаутных линий мышей, созданных под конкретные научные задачи, возрастает настолько стремительно, что в ближайшие десять лет может достигнуть фантастической цифры – 300 тысяч! Поэтому содержание многих из них в криобанке в виде эмбрионов либо половых гамет является не только реальной возможностью, но и необходимостью.

Впервые мышинные эмбрионы были подвергнуты криоконсервации еще в 1972 г., а сегодня в мире существует девятнадцать крупных криобанков, в которых сохраняется генетический материал разных линий мышей.

Незаменимым лабораторным животным остается и крыса, особенно в исследованиях по моделированию заболеваний человека, имеющих полигенную (мультифакторную) основу, таких как артериальная гипертен-

зия. Криобанков, где сохраняют генетические ресурсы крыс, в мире существенно меньше – всего четыре (Agca *et al.*, 2012).

Помимо традиционных лабораторных животных – мышей, крыс, кроликов и хомячков, в экспериментах нередко задействуют и других млекопитающих, а также рыб и птиц. Например, знаменитый основатель этологии (науки о поведении животных), нобелевский лауреат К.З. Лоренц сделал свои главные открытия на птицах. Перспективными видами для криоархивирования являются аквариумная рыбка данио рерио, а также собаки и кошки. Все эти животные являются популярными объектами исследований, ориентированных на биомедицинские цели (Амстиславский, Трукшин, 2010; Agca, 2012).



Домашняя кошка представляет особый интерес для концепции «Genome Resource Banking», так как ее дикие родственники, большие и малые представители семейства кошачьих, находятся под угрозой исчезновения. Домашняя кошка помогает подобрать репродуктивные технологии для этих видов с учетом «кошачьей специфики»

Студентка-дипломница кафедры физиологии НГУ Д.С. Рагаева проводит трансплантацию суррогатной матери эмбрионов лабораторной крысы в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН



Известные каждому аквариумисту данио рерио стали за последние десятилетия очень знамениты, и не только из-за того, что в 1976 г. они побывали в космосе. После расшифровки их генома оказалось, что он имеет довольно много общих генов с человеком (Howe *et al.*, 2013). Эти небольшие рыбки хорошо размножаются в неволе, неприхотливы, требуют минимальных затрат на поддержание вида в культуре, а их зародыши прозрачны, что существенно облегчает работу исследователей.

На сегодняшний день создано уже несколько тысяч линий данио рерио. Генетические ресурсы этой рыбки сегодня хранятся в двух криобанках, в США и в Японии (Agca, 2012).

Что касается домашней кошки, то она представляет особый интерес для концепции «банк генетических ресурсов» по целому ряду причин. Это и поразительное сходство ее генома с геномом человека, и сложное поведение, и высокие репродуктивные способности, а также появление трансгенных моделей, например, знаменитого кота по имени Mr Green, в геном которого встроен инородный новый ген (трансген), который позволяет этому уникальному коту флуоресцировать в темноте под действием ультрафиолетового излучения загадочным зеленым светом. Недавно это достижение было блестяще подтверждено получением подобных котят (Amstislavsky *et al.*, 2012). И, конечно, домашняя кошка является незаменимой «моделью» для отработки и совершенствования репродуктивных технологий применительно к семейству кошачьих, учитывая, что практически все ее дикие родственники нуждаются в сохранении их генетических ресурсов.

Сегодня в мире имеется, по крайней мере 22 криобанка, в которых собирают и сохраняют генетический материал диких и исчезающих видов животных. Такие центры часто работают при крупных зоопарках, музеях, научных институтах и других организациях, в задачи которых входит «коллекционирование» генофондов диких животных. Например, в Германии такой центр находится при Институте зоологии и исследования диких животных им. Лейбница (Берлин). Именно здесь сохраняют семя, ооциты и зародыши редких видов семейства кошачьих.

Так называемые «вспомогательные репродуктивные технологии» бурно развиваются, и при помощи методов криоконсервации, искусственного осеменения, репродуктивного клонирования и трансплантации эмбрионов можно успешно воссоздавать живых особей при наличии в криобанке криоконсервированных гамет и (или) эмбрионов (Amstislavsky, 2006; Амстиславский, Трукшин, 2010). На сегодняшний день семя более чем шестидесяти видов диких животных было успешно заморожено и криоконсервировано хотя бы один раз. Такого же успеха удалось добиться и в отношении эмбрионов более чем сорока различных видов

млекопитающих, из которых более половины – дикие животные.

Сибирский Ноев ковчег

Не имеющий аналогов в Российской Федерации криобанк был недавно создан в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Наряду с работами по сохранению генетических ресурсов лабораторных животных, в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий проводятся также исследования, направленные на разработку подходов к сохранению диких и исчезающих видов животных при помощи современных методов репродуктивной биологии. Сегодня в сибирском криобанке сохраняются главным образом в виде замороженных эмбрионов генетические ресурсы трех десятков линий мышей и крыс, некоторые из которых больше нигде в мире не представлены. Общее число эмбрионов в криобанке уже превысило четыре тысячи.

Однако с помещением в криобанк эмбрионов или семени того или иного вида проблемы не заканчиваются. Создание криобанка – это не только поиск наименее травмирующего способа замораживания и криохранения материала, но, что не менее важно, способа размораживания и извлечения генетической информации.

Когда в криобанке заморожены эмбрионы лабораторных мышей или крыс, «превращение» замороженного материала в живое существо осуществляется достаточно просто: эмбрионы размораживают и трансплантируют самкам того же самого вида. Но как быть, если в криобанк удалось собрать гаметы или зародыши редкого, а тем более исчезающего вида? Какой суррогатной маме («реципиенту») их трансплантировать? Казалось бы, в этом качестве можно использовать близкородственный вид «домашних» животных. Однако, как показывает практика, эффективность межвидовой трансплантации обычно крайне низка (Амстиславский, 2011).

В конце концов к решению этой проблемы удалось найти интересный подход. Согласно исходной гипотезе, отличными реципиентами для эмбрионов двух «родительских» видов должны стать их межвидовые гибриды. Это предположение сразу же удалось проверить на исчезающем виде – вышеупомянутой европейской норке. Этот вид, некогда встречавшийся по всей Европе, ныне сохранился только на нескольких специализированных фермах (Amstislavsky *et al.*, 2008). Гибриды между европейской норкой и хорьком – еще одним представителем куньих, достаточно легко получают при совместном разведении этих животных (Терновский, Терновская, 1994).

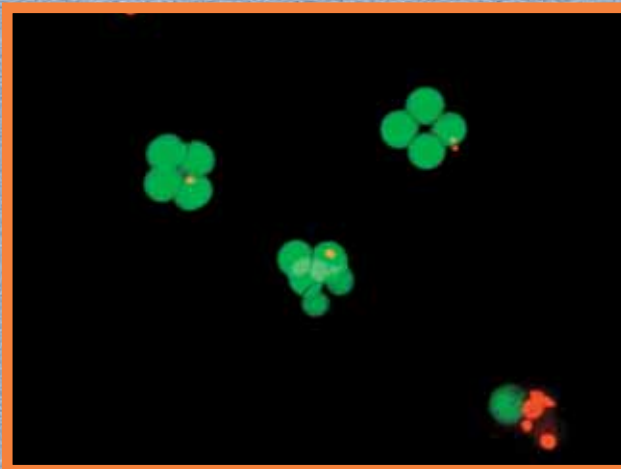
В эксперименте двенадцати гибридным самкам-реципиентам было трансплантировано в общей сложности



Идеальными суррогатными матерями для редких и исчезающих видов животных являются межвидовые гибриды, такие как эта самка хонорика – гибрид хорька и европейской норки (вверху). Внизу – выводок «единоутробных» братьев и сестер, полученных в результате имплантации эмбрионов самке-реципиенту. Детеныши являются представителями разных видов млекопитающих

Хорчонок

Норчата



В Сибирском криобанке были впервые заморожены эмбрионы мохноногих хомячков, в том числе хомячка Кэмпбелла. Для оценки жизнеспособности эмбрионов мохноногих хомячков после криоконсервации, эмбрионы были окрашены флуорохромами, в том числе диацетатом флуоресцеина. Последний способен окрашивать только живые клетки, в которых он превращается во флуоресцеин, светящийся под действием УФ-излучения зеленым светом. Те эмбрионы, которые прошли все этапы замораживания и криоконсервации, светились ровным зеленым светом (вверху слева). *Флуоресцентная микроскопия*

Вверху справа – те же эмбрионы, но при использовании обычной световой микроскопии. Эмбрионы выглядят неповрежденными

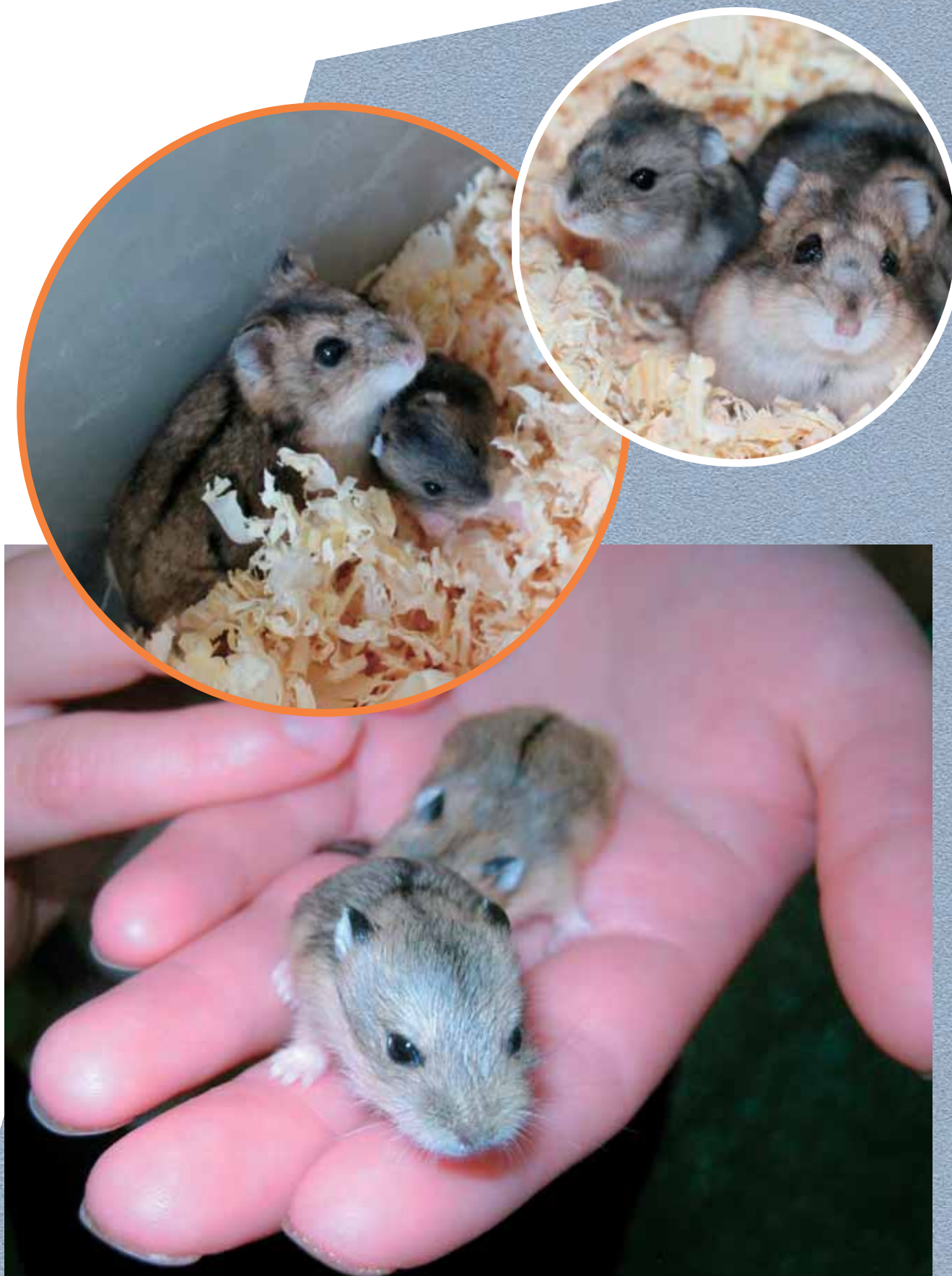
72 эмбриона (главным образом европейской норки), в результате чего родилось 36 детенышей. Эффективность составила 50 %, что считается хорошим показателем даже при работе с лабораторными животными, а для экспериментов с исчезающим видом и вообще является большой удачей, редко встречающейся в мировой практике (Amstislavsky *et al.*, 2006). А в одном эксперименте, где самке были одновременно пересажены эмбрионы и норки, и хорька, на свет появился смешанный выводок из хорьчонка и норчат.

Однако насколько универсальным является такое решение? Ведь то, что хорошо для кунных, может оказаться неприемлемым для представителей других семейств млекопитающих. Кроме того, при работе с хорьками и норками пересаживались «свежие» эмбрионы, не подвергавшиеся криоконсервации. Но ведь конечная цель изысканий – найти надежный способ получать полноценных животных из хранящихся в криобанке эмбрионов редких и исчезающих видов.

Для дальнейших исследований были выбраны экзотические хомячки рода *Phodopus*, что означает «мохноногие». Этот род состоит из трех видов, причем в лабораторных исследованиях используют два: джунгарских хомячков и хомячков Кэмпбелла. Джунгарские хомячки известны своей способностью при резком снижении температуры окружающей среды впадать в торпор (оцепенение), становясь недвижимыми и почти безжизненными.

Эти молодые межвидовые гибриды хомячков, джунгарского и Кэмпбелла, – будущие суррогатные мамы

Эти мохноногие хомячки от момента зачатия «прожили» фантастическую жизнь: на стадии эмбриона, состоящего всего из нескольких клеток, они неделями «купались» при температуре жидкого азота в одном из криохранилищ сектора криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН. Затем с помощью водяной бани они были «оживлены». Так современные репродуктивные технологии воплощают в жизнь старую сказку о «живой и мертвой воде»





Хомячки Кэмпбелла знамениты своим отношением к потомству: мало можно найти в природе видов млекопитающих, у которых отец отличался бы такой заботливостью к своему потомству. Он даже принимает участие в родах, а после рождения детенышей нежно о них заботится.

Важно, что эти близкородственные виды способны к гибридизации, т. е. они способны скрещиваться (Feoktistova *et al.*, 2013), хотя получение таких гибридов и является непростым занятием. В секторе криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН также научились замораживать и культивировать эмбрионы мохноногих хомячков – впервые в мировой практике. В результате весьма сложных и трудоемких экспериментов сотрудники сектора убедились, что замороженные эмбрионы остаются жизнеспособными и впоследствии успешно развиваются в суррогатных матерях.

Итак, шесть эмбрионов джунгарского хомячка, прошедшие через процедуры замораживания, криоконсервации при температуре жидкого азота и размораживания были пересажены гибридной самке-реципиенту, и в нужный срок на свет появилось долгожданное потомство. Таким образом, была подтверждена гипотеза, что межвидовые гибриды могут быть хорошими реципиентами для эмбрионов родительских видов.

На сегодняшний день менее одного процента от 5-ти тыс. современных видов млекопитающих когда-либо успешно подвергались криоконсервации на стадии преимплантационного эмбриона. И если для мышей, крыс и нескольких видов сельскохозяйственных животных эта технология стала массовой и применяется буквально в промышленных масштабах, то для диких, в том числе исчезающих, редких и экзотических млекопитающих, успешные попытки криоконсервации эмбрионов и гамет крайне немногочисленны. Более того, даже в случае успеха эти попытки, как правило, даже не пытались повторить.

В чем же суть проблемы? Почему столь перспективный метод сохранения биоразнообразия исчезающих видов так редко применяют для достижения практических целей, ради которых этот метод и был создан?

Дело в том, что биология размножения и раннего развития исчезающих видов, как правило, полна загадок и «белых пятен», да и работать с ними крайне сложно. Чтобы «раскусить» этот «крепкий орешек» необходимо применить все современные знания и технологии, которые были получены на мышах и других типично «лабораторных» животных. При этом многочисленных представителей исчезающих

видов оберегают от всякого рода стрессовых воздействий, к которым относится и исследовательская работа. Поэтому каждый новый успех в криоконсервации эмбрионов и гамет на каком-либо новом виде млекопитающих, в том числе и на мохноногих хомячках, является значимым событием на пути воплощения в жизнь концепции «банка генетических ресурсов».

Нужно добавить, что поскольку при создании криобанка эмбрионов и гамет диких, экзотических или исчезающих видов животных приобретаются новые знания по репродуктивной биологии этих видов, именно эта научная область и ее разновидность – эмбриотехнология,

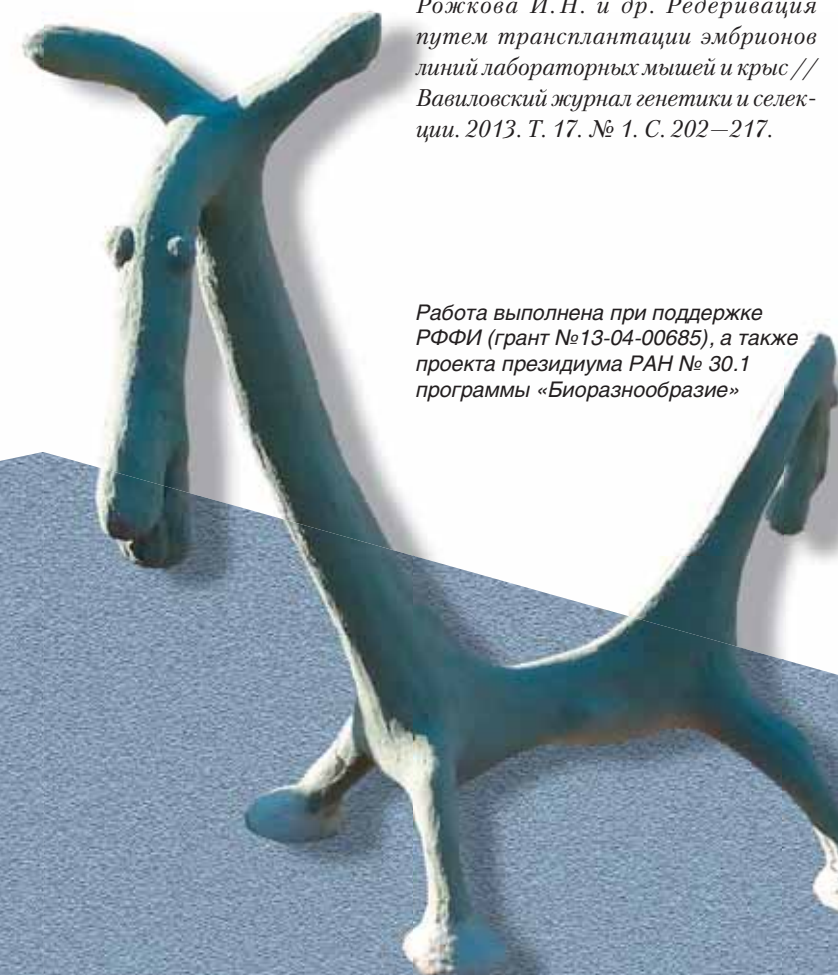
в содружестве с более традиционными методами и подходами может реально помочь в таком важнейшем деле, как сохранение неповторимой фауны планеты Земля.

Литература

Амстиславский С.Я. *Репродуктивная биология и эмбриотехнология млекопитающих*. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrücken, Germany, 2011.

Амстиславский С.Я., Трушкин И.С. *Криобанк эмбрионов млекопитающих: выбор приоритетов и оптимальных репродуктивных технологий // Онтогенез*. 2010. № 1. С. 19–31.

Амстиславский С.Я., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н. и др. *Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс // Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17. № 1. С. 202–217.



Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №13-04-00685), а также проекта президиума РАН № 30.1 программы «Биоразнообразие»

В статье использованы фото скульптур галереи под открытым небом (Ялыкавак, Турция)