

Александр Германович СЕЛЮКОВ¹
Мария Владимировна КИБАЛОВА²
Светлана Александровна СЕЛЮКОВА³

УДК 502.74/574.23

СОХРАНЕНИЕ ЦЕННЫХ, РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ.

1. ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ

¹ доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии и эволюционной экологии животных, Тюменский государственный университет
ags-bios@yandex.ru

² студентка бакалавриата, кафедра зоологии и эволюционной экологии животных, Тюменский государственный университет
makib-ichthy@mail.ru

³ старший преподаватель кафедры математики и информатики, Государственный аграрный университет Северного Зауралья (г. Тюмень)
lucretias@yandex.ru

Аннотация

Интенсивное антропогенное давление на экосистемы ведет к сокращению биоразнообразия. В настоящее время для сохранения видового разнообразия и дублирования ценных образцов мировых коллекций широко применяется глубокое замораживание биоматериала — криоконсервация.

В обзоре приводятся традиционные способы криоконсервации клеток, тканей и эмбрионов позвоночных животных. Рассматриваются ключевые моменты истории криобиологии и криоконсервации. Приводятся сведения о режимах замораживания-дефростации и методах криосохранения биологических объектов с использованием проникающих

Цитирование: Селюков А. Г. Сохранение ценных, редких и исчезающих видов животных. 1. Проблемы и методы / А. Г. Селюков, М. В. Кибалова, С. А. Селюкова // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2017. Том 3. № 1. С. 61-76.

DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-1-61-76

и непроникающих криопротекторов. Излагаются способы медленной (аппаратно-программной) и быстрой (витрификации) заморозки биообъектов. Акцентируется внимание на витрификации как наиболее приемлемом способе в полевых условиях.

Описано явление криообновления, в основе которого лежит стимулирующее, трансформирующее и мутагенное (с гетерозисным эффектом) действие процесса криоконсервации. Обращено внимание на отсутствие гарантированной сохранности высоких показателей криоконсервированного биоматериала после его дефростации. Рассматривается способ сохранения биоматериалов с применением CAS-технологии, использующей слабые электромагнитные поля.

Прогнозируется возможность разработки альтернативных общепринятым инновационных биотехнологий с использованием сверхслабых импульсных магнитных полей для сохранения биологических объектов без применения криопротекторов.

Ключевые слова

Криоконсервация биообъектов, криопротекторы, криообновление, гипоконсервация.

DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-1-61-76

Введение

Интенсивное антропогенное давление на экосистемы ведет к снижению естественных возможностей самовосстановления видов и ограничивает их воспроизводство. Численность и разнообразие ценных и редких, но низкоустойчивых видов снижается; они замещаются немногими малоценными или вредными, но высокопродуктивными и резистентными видами (серая крыса, серая ворона и др.). Значительное количество рыб, птиц, зверей (сибирский осетр, нельма, муксун, стерх, краснозобая казарка, барс и др.) оказалось на грани исчезновения. Каждый вид обладает уникальным генотипом, и быстрое сокращение численности ведет к снижению генетического разнообразия, что делает его уязвимым к переловам, загрязнению среды и сопровождается депрессией с последующим исчезновением.

Устойчивое снижение биоразнообразия угрожает тем, что скрыто протекающие в естественных популяциях процессы деградации проявляются внезапно и ведут к полному исчезновению самых обычных видов. Такая динамика нарастает лавинообразно, и уже в настоящее время катастрофически сократилась численность таких ценных в хозяйственном и экологическом отношениях видов рыб, как нельма, муксун, обская популяция сибирского осетра и др. Их экологические ниши занимают более устойчивые и менее востребованные промыслом ерш, ротан и др.

Для целей устойчивого развития, современной и будущей селекции важнейшими задачами являются поддержание видового разнообразия, сохранение ценных видов, разработка подходов и организация длительного хранения генофонда.

Для разрешения этих проблем в настоящее время имеются соответствующие технологические возможности. В ряде стран (США, Япония, Франция, Германия и др.) успешно функционируют криобанки генетических ресурсов

[17]. Криобанк представляет собой спецхранилище, в котором с использованием методов глубокого замораживания в жидком азоте сохраняются половые продукты и зародыши ценных организмов. Такой комплекс позволяет сохранять ценный биоматериал и осуществлять безопасное дублирование образцов известных мировых коллекций с целью обеспечения максимальной сохранности вида и минимизации рисков потерь [6; 29]. В нем криоконсервированный биологический материал может сохраняться десятилетиями, пока не будет востребован для практического использования.

Криоконсервация является методом перевода биологических объектов в состояние глубокого холодового анабиоза в жидком азоте при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; в этом случае становится возможным хранение биоматериала (клетки, ткани, эмбрионы) в течение длительного времени без потери их морфологических и функциональных свойств. Криоконсервация позволяет получать неограниченный объем генетического материала без ущерба для природной популяции, хранить его продолжительное время, а также легко транспортировать и при необходимости сравнительно быстро восстановить видовую численность.

Однако при всех достоинствах данного метода он не лишен ряда весьма существенных недостатков. Но прежде рассмотрим историю становления криоконсервации в ее ключевых моментах.

Краткая история криоконсервации

Проблему сохранения половых клеток животных и человека было необходимо разрешить для селекции животных и лечения бесплодия. Отдельные попытки сохранения в замороженном состоянии яйцеклеток и спермы животных предпринимались еще 200 лет назад. Однако научные основы криобиологии были заложены в конце XIX в. русским ученым П. И. Бахметьевым, изучавшим явление переохлаждения у насекомых и анабиоз у летучих мышей [11]. Им же в 1899 г. установлено носящее имя автора правило, согласно которому при резком снижении температуры среды у пойкилотермных животных происходит внезапный скачок температуры с последующим ее падением. Температурный скачок приурочен к моменту замерзания тканевой жидкости с выделением скрытой теплоты плавления.

На рубеже XIX–XX вв. были сделаны первые попытки замораживания половых клеток животных. П. Беккерель и Г. Рам в начале XX в. установили способность различных организмов (микроорганизмы, беспозвоночные: тихоходки, коловратки, нематоды), а также спор и семян переносить в высушенном состоянии глубокое охлаждение до $-269\dots-271\text{ }^{\circ}\text{C}$, т. е. почти до абсолютного нуля [32].

В 1930-х гг. Льюэтом были разработаны теоретические основы витрификации, а их успешная реализация в отношении эмбрионов млекопитающих пришла на 1980-е гг. [40].

В 1947 г. В. К. Милованов с соавторами [7] открыли возможность длительного сохранения в состоянии глубокого охлаждения спермы животных, что

стало основой для создания криобанка генетических ресурсов высокопродуктивных, редких и исчезающих видов животных.

В 1949 г. К. Польдж и О. Смит доказали возможность криоконсервации спермы благодаря открытию криопротекторных свойств глицерина [4].

В 1956 г. в опытах Л. Рэ [27] сердце куриного эмбриона стало биться после нескольких месяцев его пребывания в жидком азоте.

В 1964 г. вышло первое издание книги Р. Эттингера «Перспективы бессмертия», положившей начало современной крионике.

В начале 1970-х гг. Д. Уиттингемом с соавторами [43] впервые была осуществлена криоконсервация эмбрионов мышей. Через несколько лет были успешно проведены эксперименты по криоконсервированию ооцитов [3].

В 1983 г. рожден первый ребенок из замороженного эмбриона, полученного *in vitro* [1].

В 1999 г. состоялось рождение первого ребенка после криоконсервации яйцеклетки методом витрификации [13].

В 2008 г. после глубокой заморозки успешно дефростирована, а затем трансплантирована печень свиньи от одного животного другому [31].

Однако создание генетических криобанков и использования методов биологии развития для сохранения редких и исчезающих видов животных в России (СССР) были инициированы в 1970-е гг. Б. Н. Вепринцевым [7].

Методы криоконсервации

Известно, что в процессе замораживания и оттаивания (дефростации) в биосистемах развиваются в разной степени выраженные аномалии. Если повреждения нелетальны, они репарируются, как показано Цуцаевой с соавторами [33], при последующем культивировании.

Замораживание–дефростация клеток и зародышей позвоночных представляет собой взаимосвязанный комплекс физико-химических процессов. Его результатом является водо- и теплообмен между биологическим объектом и окружающей средой, когда происходит отвердевание жидких составляющих клетки или их возвращение в исходное состояние. Для сохранения высокого качества биологических объектов при их криоконсервации существенную роль играет разработка режимов замораживания–дефростации, поиск оптимальных сред, включая криопротекторы, а также выбор способов культивирования клеток и эмбрионов [12].

Общепринятыми считаются два основных метода криоконсервации половых клеток/эмбрионов: медленная заморозка и быстрая (витрификация).

Медленная (аппаратно-программная) заморозка — это традиционный метод криоконсервации с применением программного замораживателя (фризера) [34]. Его основой является искусственное вызывание кристаллизации переохлажденного раствора и последующее медленное охлаждение, по крайней мере, до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ перед непосредственным переносом в жидкий азот [22]. На *первом этапе* при таком способе криоконсервации в зависимости от вида животных и типа криопротектора температуру понижают до необходимой на определенное количество

градусов. Далее биообъект выдерживается определенный промежуток, в течение которого осуществляется сидинг, т. е. индукция образования льда внутри контейнера с криоконсервируемым образцом [10]. На *втором этапе* происходит более медленное охлаждение биообъекта, при котором чаще всего оптимальная скорость снижения температуры составляет 0,3...0,5 °С/мин. Было показано, что в зависимости от вида биологического объекта и проницаемости его клеточных мембран скорость охлаждения меняется [38], а кристаллизация воды начинается вне клетки [39]. Отметим, что при падении температуры ниже 0 °С возникает высокая частота кристаллизации, что является основной проблемой криоконсервации при медленной заморозке [14].

Витрификация (лат. vitreous — «подобный стеклу») — сверхбыстрый способ заморозки биологических объектов. Данный метод является модифицированным подходом, сложившимся при криоконсервации эмбрионов млекопитающих [40]. Витрификация осуществляется с использованием высоких концентраций криопротектора, вследствие чего происходит отвердевание биообъекта, исключающее внутри- и внеклеточную кристаллизацию [41], что устраняет основную причину криповреждений. Витрификацию чаще всего используют для криоконсервации зародышей представителей отряда хищные, а также свиней, в тканях которых присутствует большое количество чувствительных к охлаждению липидных гранул [10]. При данном подходе необходим строгий контроль температурного режима замороженных объектов и режима дефростации, что является одним из главных его недостатков [36]. Отмечается, что витрификация не требует сложного оборудования и является дешевым методом криоконсервации, позволяющим проводить сверхбыструю заморозку в полевых условиях и при отсутствии необходимого оборудования.

Криопротекторы

Оптимизация методов и технологий криоконсервации биологических объектов требует предварительных исследований механизмов криповреждения клеток и тканей и их криозащиты. Как правило, криповреждение биологического материала происходит на этапах замораживания и дефростации; их появление зависит от скорости кристаллизации и рекристаллизации, скоростей замораживания и отогрева, характера действия изменяющихся концентраций солей и т. д. [35].

Чаще всего при криоконсервации, вследствие кристаллизации внутри- и внеклеточной воды, в клетке происходит гиперконцентрация солей, вызывающая осмотический шок и разрушение клеточных и субклеточных структур [9]. Для защиты биообъекта от повреждающих воздействий при замораживании/дефростации применяются химические вещества — *криопротекторы*, вносимые в криоконсервирующую среду [34]. По способности проходить через клеточные мембраны Лавлок [37] предложил классифицировать их на проникающие и непроникающие. Этот подход не следует считать универсальным, т. к. для разных клеток характерна различная проницаемость веществ, а защитное воздействие может быть достигнуто при использовании тех и других криопротекторов [25].

Для *проникающих* криопротекторов характерна низкая молекулярная масса и высокая растворимость при больших концентрациях. К ним относятся одно- и многоатомные спирты (глицерин, метанол, этанол, этиленгликоль, ди-, три-, пропиленгликоль, маннит, сорбит), оксиды (ДМСО — диметилсульфоксид, пиридиноксид, диметилсульфон), некоторые из низкомолекулярных сахаров (глюкоза) и другие [9]. При криоконсервации вещества данной группы действуют на биообъект путем витрификации вне- и внутриклеточных жидкостей. Считается [20; 23], что этот процесс основан на образовании водородных связей между криопротектором и молекулами воды, тем самым нарушая формирование кристаллов льда.

Отметим, что высокая проницаемость криопротектора через плазматическую мембрану не предполагает такой же проницаемости через мембраны клеточных органелл, которые могут повреждаться в результате повышения концентрации криопротектора в клетке [8].

Непроникающие криопротекторы характеризуются более высокой молекулярной массой [23]. Считается, что они препятствуют воздействию «осмотического шока» при замораживании-дефростации объектов и снижают скорость кристаллизации [34]. Криопротекторы этой группы защищают от механических повреждений на наружной поверхности клеточной мембраны [26]. К непроникающим криопротекторам относятся амиды кислот (формамид, метилформаид, ацетаид, метилацетаид, диметилацетаид, пропилаид, мочеина, метилмочеина), белки (желатин, альбумин), некоторые моносахариды (галактоза), дисахариды (сахароза и трегалоза), использование которых даже при низких концентрациях снижает размеры кристаллов льда и др. [9; 42].

В составе криопротекторов могут присутствовать различные органические и неорганические добавки. При их добавлении к клеточным суспензиям физико-химические свойства вне- и внутриклеточных растворов изменяются таким образом, что последующие изменения клеточных структур в процессе замораживания-отогрева оказываются менее губительными, чем при их отсутствии [8]. Так, для замораживания спермы осетровых рыб и белорыбицы Красильникова [21] применяла криопротектор, состоящий из многокомпонентного базового раствора, сахарозы, маннита, желтка куриного яйца и ДМСО. Для криоконсервации семенной жидкости птиц Фисининым с соавторами [30] предложены криопротекторы, включающие аминокислоты, углеводы (моно-, ди- и полисахариды), соли органического (глутаматы, лактаты, цитраты, ацетаты) и неорганического (хлориды, сульфаты, фосфаты, карбонаты) происхождения, а также некоторые биологически активные соединения (альбумины, липиды, ферменты, гормоны, антиоксиданты и др.).

В заключение отметим, что криопротекторы оказывают также и токсическое действие на клетки. Токсичность глицерина, ДМСО, 1,2-пропандиола тормозит нормальную гидратацию белков и других макромолекул, связывая воду. Указывалось [23], что соотношение клетка–криопротектор должно строго дозироваться для предотвращения снижения качества биообъекта.

Криообновление

Криообновление является противоположным апоптозу процессом, представляя собой переход клетки на более высокий уровень гомеостаза [15]. Считается, что в основе этого процесса лежит стимулирующее, трансформирующее и мутагенное (с гетерозисным эффектом) действие процесса криоконсервации [24]. Криообновлению свойственна селективность, проявляющаяся в отборе и изменчивости [16].

В процессе криообновления под действием низких температур осуществляется регулирование генов, контролирующих цитохром С и НАД·Н, участвующие в его транспортной функции через наружную митохондриальную мембрану. Цитохром С блокирует процессы активации каспаз и снижает клеточный апоптоз [2; 15; 16]. Авторы полагают, что воздействие низких температур на гены, контролирующие цитохром С, активизирует процесс транспорта электронов, способствуя интенсификации подвижности спермиев и их оплодотворяющей способности (фертильности). Было экспериментально показано [15], что вследствие оплодотворения икры осетра и карпа размороженной спермой процент вылупления личинок и их средняя масса значительно возросли. В последующем такая молодежь отличалась от контрольной партии большей массой тела и более высоким уровнем гематологических, биохимических и иммунологических показателей.

После трансплантации криоконсервированных эмбрионов от гипертонзивных крыс нормотонзивным реципиентам Амстиславский с соавторами отмечали [5] существенное снижение артериального давления у потомства; данный эффект сохранялся и в следующем поколении.

Впрочем, криообновление нередко сопровождается негативным эффектом. Так, Козиковой и Яковлевым [19] у куриных эмбрионов, полученных от осеменения криоконсервированной спермой, сохранявшейся в течение 4 месяцев, были выявлены хромосомные нарушения: была увеличена частота встречаемости триплоидии и транслокаций.

Таким образом, применение криотехнологий для длительного сохранения биоматериала не гарантирует его высокие характеристики после дефростации. Используемые для предотвращения повреждений клеточных и тканевых структур режимы замораживания и криопротекторы вызывают их частичную интоксикацию, а зародышевый материал после дефростации нередко погибает или обнаруживает патологии. В практическом отношении существует проблема постоянного пополнения хладагента, т. к. жидкий азот достаточно быстро испаряется из криохранилищ; наконец, массовое использование метода криоконсервации требует специально оборудованного и сертифицированного помещения с соответствующей измерительной и запорной аппаратурой, подготовленного обслуживающего персонала.

Альтернативные технологии консервации биообъектов

Возможной альтернативой глубокому замораживанию могут послужить появившиеся сравнительно недавно (1999 г.) т. н. CAS-технологии [18]. Разработанные

группой японских изобретателей (Овада и др.), они совершили революцию в области замораживания и сохранения продуктов питания и биологических тканей без снижения их качества после размораживания. Использование этих технологий основано на генерировании слабых электромагнитных полей (СЭМП) в специальном морозильном оборудовании. В нем молекулы воды, составляющие основу клеток и тканей, приводятся во вращение вокруг собственной оси, что предотвращает их кластеризацию и кристаллизацию, повреждающую клеточные стенки. При этом точка замерзания снижается до $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, а после отключения ЭМП биологический объект сразу промерзает по всему объему и без кристаллообразования. CAS-технологии применяются в медицине для сохранения биологических тканей (The Teeth Bank — Т. Kawata).

Учитывая перспективность новых подходов в области сохранения биообъектов, появились возможности для разработки альтернативных общепринятым инновационных биотехнологий с использованием сверхслабых импульсных магнитных полей [28] с целью *гипоконсервации* живых систем без применения криопротекторов при температуре среды стандартного морозильного оборудования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраменко Н. В. Современные возможности криобиологии при лечении бесплодия, сохранении и восстановлении фертильности / Н. В. Авраменко // Патология. 2013. № 3(29). С. 5–11.
2. Алексеевская Э. И. «Маркеры» раннего апоптоза гемопоэтических клеток требуют включения программы криообновления: реальность и перспективы / Э. И. Алексеевская, В. И. Грищенко // Проблемы криобиологии. 2005. Том 15. № 3. С. 526–528.
3. Амстиславский С. Я. Замороженный зоопарк. Введение в криоархивирование / С. Я. Амстиславский // Наука из первых рук. 2013. № 5/6(53/54). С. 34–45.
4. Амстиславский С. Я. О живой и мертвой воде / С. Я. Амстиславский, М. П. Мошкин // Химия и жизнь — XXI век. 2007. № 9. С. 35–41.
5. Амстиславский С. Я. Создание генетических криобанков и использование методов биологии развития как способ сохранения редких видов животных. III. Перспективы, проблемы и ограничения: селекция, модификации и мутации / С. Я. Амстиславский, А. С. Кривохарченко, Н. Н. Ротт // Онтогенез. 1997. Том 28. № 6. С. 412–420.
6. Багиров В. А. Сохранение генетических ресурсов редких, исчезающих и уникальных видов животных / В. А. Багиров, Л. К. Эрнст, П. М. Кленовицкий, Н. А. Зиновьева // Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 2004. Том 46. № 9. С. 767–768.
7. Багиров В. А. Сохранение и рациональное использование генетических ресурсов яка (*Bos mutus*) / В. А. Багиров, Е. А. Гладырь, Л. К. Эрнст, П. М. Кленовицкий, Н. А. Зиновьева, Ш. Н. Насибов // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 2. С. 37–42.

8. Белоус А. М. Биохимия мембран. Кн. 3. Замораживание и криопротекция / А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Розанов. М.: Высшая школа, 1987. 80 с.
9. Белоус А. М. Криобиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко. Киев: Наукова думка, 1994. 432 с.
10. Брусенцев Е. Ю. Основные подходы к созданию криобанка эмбрионов и гамет хомячков рода *Phodopus* (*P. sungorus* и *P. campbelli*) и воздействие факторов роста в их преимплантационном развитии: Дис. канд. биол. наук / Е. Ю. Брусенцев. Новосибирск, 2016. 111 с.
11. Брушков А. В. Мы живем на холодной планете / А. В. Брушков, М. Фукуда // Наука из первых рук. 2007. № 2(14). С. 74-85.
12. Будевич А. И. Приживляемость заморожено-оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота в связи с их подготовкой для прямой пересадки реципиентам / А. И. Будевич, С. Н. Пайтеров, С. А. Сапсалева, Ю. К. Кирикович, Т. Н. Лукашевич, И. В. Михедова, П. Е. Сахончик, В. В. Жданович // Зоотехническая наука Беларуси. 2014. Том 49. № 1. С. 32-44.
13. Витязева И. И. Исторические вехи развития методов вспомогательных репродуктивных технологий, основанных на оплодотворении *in vitro* / И. И. Витязева, И. И. Бармина, Г. А. Мельниченко // Вестник репродуктивного здоровья. 2011. № 1. С. 5-14.
14. Гайдуков С. Н. Критерии, определяющие клиническую эффективность витрификации эмбрионов / С. Н. Гайдуков, К. Ю. Боярский, И. Г. Фолькерт, В. Г. Баласанян // Фундаментальные исследования. 2014. № 10. С. 1081-1084.
15. Грищенко В. И. Апоптоз и криообновление как основа современной цитохромной терапии / В. И. Грищенко, Э. И. Алексеевская // Международный медицинский журнал. 2004. Том 10. № 4. С. 115-118.
16. Грищенко В. И. Криообновление как основа эффективного лечения мужского бесплодия / В. И. Грищенко, Э. И. Алексеевская // Международный медицинский журнал. 2005. Том 11. № 4. С. 68-71.
17. Грищенко В. И. Проблемы криобиологии и сохранение генетических ресурсов / В. И. Грищенко, Е. Ф. Копейка, М. П. Петрушко // Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 2004. Том 46. № 9. С. 784.
18. Дульнев Б. Блог Бориса Дульнева. URL: <http://boris-dulnev.livejournal.com>
19. Козикова Л. В. Цитогенетический анализ эмбрионов кур, полученных путем искусственного осеменения криоконсервированной спермой разных сроков хранения / Л. В. Козикова, А. Ф. Яковлев // Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 2004. Том 46. № 9. С. 803-804.
20. Конов К. Б. Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны: Дис. канд. физ.-мат. наук / К. Б. Конов. Казань, 2016. 137 с.
21. Красильникова А. А. Совершенствование процесса криоконсервации репродуктивных клеток самцов рыб: Дис. канд. биол. наук / А. А. Красильникова. Астрахань, 2015. 149 с.
22. Кривохарченко А. С. Сверхбыстрое замораживание эмбрионов мышей аутбредных и инбредных линий / А. С. Кривохарченко, Г. А. Серобян, А. К. Шахбазян, В. Б. Садовников // Онтогенез. 1996. Том 27. № 4. С. 300-304.

23. Леткевич Л. Л. Восстановление жизнеспособности деконсервированных эмбрионов коров, полученных вне организма, с использованием экзоцеллюлярных веществ / Л. Л. Леткевич, А. И. Ганджа, В. П. Симоненко, И. В. Кириллова, Е. Д. Ракович, О. П. Курак, Н. В. Журина, М. А. Ковальчук, О. В. Буракова // Зоотехническая наука Беларуси. 2014. Том 49. № 1. С. 122-131.
24. Обозная-Печенежская Э. И. Криобиология обновления: факты и перспективы / Э. И. Обозная-Печенежская, В. И. Грищенко, Е. Я. Панков // Проблемы криобиологии. 1993. № 4. С. 11-20.
25. Пономарева Е. Н. Новые биотехнологические методы криоконсервации репродуктивных клеток осетровых видов рыб / Е. Н. Пономарева, А. А. Красильникова, А. М. Тихомиров, А. В. Фирсова // Юг России: экология, развитие. 2016. Том 11. № 1. С. 59-68.
26. Похиленко В. Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009. № 4(12). С. 99-121.
27. Рэ Л. Консервация жизни холодом / Л. Рэ; пер. с франц. М.: Медгиз, 1962. 176 с.
28. Селюков А. Г. Слабые взаимодействия и рогомеостаз живых систем (прикладной аспект) / А. Г. Селюков, А. И. Солодилов, В. П. Елькин. Тюмень: ТюмГУ, 2008. 192 с.
29. Семенов Х. Х. Криоконсервация эмбрионов мышей инбредных линий гарантия сохранения их генофонда / Х. Х. Семенов, Е. Л. Игнатьева, Т. Б. Бескова // Биомедицина. 2005. Том 1. № 1. С. 96-102.
30. Фисинин В. И. Криоконсервация мужских половых клеток как метод сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы / В. И. Фисинин, В. А. Багиров, Н. А. Волкова, Н. А. Зиновьева, Я. С. Ройтер, М. А. Жилинский // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 8. С. 65-68.
31. Ханжи В. Детерминанты истории. Аттрактор жизни: криогенное замораживание и нанотехнологии / В. Ханжи // Вісник Інституту розвитку дитини. 2014. № 31. С. 34-40.
32. Хименков А. Н. Введение в структурную криологию / А. Н. Хименков, А. В. Брушков. М.: Наука, 2006. 406 с.
33. Цуцаева А. А. Механизмы индукции и репарации нелетальных криоповреждений / А. А. Цуцаева, Л. О. Котляров, О. В. Кудкоцева, А. Д. Гордиеню, О. И. Федец // Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов». Цитология. 2004. Том 46. № 9. С. 871-872.
34. Шурыгина О. В. Витрификация гамет и эмбрионов — эффективный инструмент повышения результативности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) / О. В. Шурыгина, М. Т. Тугушев, А. А. Байзарова, Н. В. Сараева // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 4. С. 1-7.
35. Farrant J. General Observations on Cell Preservation / J. Farrant // Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Kent: Pitman Medical Limited. 1980. Pp. 1-18.
36. Landel C. P. Archiving Mouse Strains by Cryopreservation / C. P. Landel // Lab Animal. 2005. Vol. 34. No 4. Pp. 50-57.
37. Lovelock J. E. Biophysical Aspects of the Freezing and Thawing of Living Cells / J. E. Lovelock // Proceedings of the Royal Society Medicine. 1954. Vol. 47. 60 pp.

38. Mazur P. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems / P. Mazur // *Science*. 1970. Vol. 168. No 3934. Pp. 939–949.
39. Rall W. F. Depression of the Ice-Nucleation Temperature of Rapidly Cooled Mouse Embryos by Glycerol and Dimethyl Sulfoxide / W. F. Rall, P. Mazur, J. J. McGrath // *Biophysical Journal*. 1983. Vol. 41, No 1. Pp. 1–12.
40. Rall W. F. Ice-Free Cryopreservation of Mouse Embryos at –196 Degrees C by Vitrification / W. F. Rall, G. M. Fahy // *Nature*. 1985. Vol. 313. Pp. 573–575.
41. Saragusty J. Current Progress in Oocyte and Embryo Cryopreservation by Slow Freezing and Vitrification / J. Saragusty, A. Arav // *Reproduction*. 2011. Vol. 141. No 1. Pp. 1–19.
42. Uchida T. Freezing Properties of Disaccharide Solutions: Inhibition of Hexagonal Ice Crystal Growth and Formation of Cubic Ice / ed. by E. Borisenko // *Rijeka: InTech*. 2004. No 9. Pp. 203–224.
43. Whittingham D. G. Survival of Mouse Embryos after Freezing and Thawing / D. G. Whittingham // *Nature*. 1971. Vol. 233. No 5315. Pp. 124–126.

Alexander G. SELYUKOV¹

Mariya V. KIBALOVA²

Svetlana A. SELYUKOVA³

PRESERVATION OF VALUABLE, RARE AND ENDANGERED SPECIES OF ANIMALS.

1. PROBLEMS AND METHODS

¹ Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department
of Zoology and Evolution Ecology of Animals,
Tyumen State University
ags-bios@yandex.ru

² Undergraduate Student, Department of Zoology
and Evolution Ecology of Animals, Tyumen State University
makib-ichthy@mail.ru

³ Senior Lecturer, Department of Mathematics and Computer Science,
Northern Trans-Ural State Agricultural University (Tyumen)
lucretias@yandex.ru

Abstract

The intense human pressure on ecosystems leads to a reduction of biodiversity. Currently, for the conservation of species diversity and the duplication of samples of world collections the deep freezing of biological material — cryopreservation — is widely used.

The review provides the traditional methods of cryopreservation of cells, tissues and embryos of vertebrates. We consider the key moments in the history of cryobiology and cryopreservation. The information on the conditions of freezing and thawing and methods of cryopreservation of biological objects with the use of penetrating and non-penetrating cryoprotectants is presented. The article outlines ways of slow (hardware and software) and fast (vitrification) freezing of biological objects. The attention is focused on vitrification as the most acceptable method in the field condition.

The phenomenon of cryorenewal, which is based on stimulating, transforming and mutagenic (with heterosis effect) influence of cryopreservation process, is described.

Citation: Selyukov A. G., Kibalova M. V., Selyukova S. A. 2017. “Preservation of Valuable, Rare and Endangered Species of Animals. 1. Problems and Methods”. Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 3, no 1, pp. 61-76.

DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-1-61-76

Attention to the absence of guaranteed safety of high rates of cryopreserved biological material after it is defrosted is drawn. The paper contemplates a method of biomaterial's preservation of using CAS-technology based on a weak electromagnetic field.

The work predicts the possibility of developing alternative conventional biotechnology innovation with ultra-weak pulsed magnetic fields for the preservation of biological objects without the use of cryoprotectants.

Keywords

Cryopreservation of biological objects, cryoprotectants, cryorenewal, hypopreservation.

DOI: 10.21684/2411-7927-2017-3-1-61-76

REFERENCES

1. Alekseevskaya E. I., Grishchenko V. I. 2005. “‘Markery’ rannego apoptoza gemopoieticheskikh kletok trebuyut vkluyeniya programmy kriobnovleniya: real'nost' i perspektivy” [“The Markers” of Early Apoptosis of the Hematopoietic Cells Require the Inclusion of Programs Cryorenewal: Reality and Prospects]. *Problemy kriobiologii*, vol. 15, no 3, pp. 526-528.
2. Amstislavskiy S. Ya., Moshkin M. P. 2007. “O zhivoy i mertvoy vode” [About Alive and Dead Water]. *Khimiya i zhizn' — XXI vek*, no 9, pp. 35-41.
3. Amstislavskiy S. Ya. 2013. “Zamorozhennyy zoopark. Vvedenie v krioarkhivirovanie” [Frozen Zoo. Introduction to Cryoarchiving]. *Nauka iz pervykh ruk*, no 5/6(53/54), pp. 34-45.
4. Amstislavskiy S. Ya., Krivokharchenko A. S., Rott N. N. 1997. “Sozdanie geneticheskikh kriobankov i ispol'zovanie metodov biologii razvitiya kak sposob sokhraneniya redkikh vidov zhitovnykh. III. Perspektivy, problemy i ogranicheniya: selektsiya, modifikatsii i mutatsii” [Creation of Genetic Cryobanks and the Use of Techniques of Developmental Biology as a Way of Preserving Rare Species of Animals. III. Prospects, Problems and Limitations: Selection, Modifications and Mutations]. *Ontogenez*, vol. 28, no 6, pp. 412-420.
5. Avramenko N. V. 2013. “Sovremennye vozmozhnosti kriobiologii pri lechenii besplodiya, sokhraneni i vosstanovlenii fertil'nosti” [Modern Possibilities of Cryobiology in the Treatment of Infertility, Preservation and Restoration of Fertility]. *Patologiya*, no 3(29), pp. 5-11.
6. Bagirov V. A., Ernst L. K., Klenovitskii M. P., Zinovieva N. A. 2004. “Sokhranenie geneticheskikh resursov redkikh, ischezayushchikh i unikal'nykh vidov zhitovnykh” [Conservation of Genetic Resources of Rare, Endangered and Unique Species of Animals]. Proceedings of the international conference “Sokhranenie geneticheskikh resursov” [Preservation of Genetic Resources]. *Cytology*, vol. 46, no 9, pp. 767-768.
7. Bagirov V. A., Gladyr E. A., Ernst L. K., Klenovitskii M. P., Zinovieva N. A., Nasibov S. N. 2009. “Sokhranenie i ratsional'noe ispol'zovanie geneticheskikh resursov yaka (*Bos mutus*)” [Conservation and Sustainable Use of Genetic Resources of Yak (*Bos mutus*)]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*, no 2, pp. 37-42.

8. Belous A. M., Gordienko E. A., Rozanov L. F. 1994. Kriobiologiya [Cryobiology]. Kiev: Naukova Dumka.
9. Belous A. M., Gordienko E. A., Rozanov L. F. 1987. Biokhimiya membran. [Biochemistry of Membranes], vol. 3. Zamorazhivanie i krioproteksiya [Freezing and Cryoprotective]. Moscow: Vysshaya shkola.
10. Brusentsev E. Yu. 2016. "Osnovnye podkhody k sozdaniyu kriobanka embrionov i gamet khomyachkov roda Phodopus (*P. sungorus* i *P. campbelli*) i vozdeystvie faktorov rosta v ikh preimplantatsionnom razviti" [Main Approaches to the Creation of the Cryobank Embryo and Gamete Hamsters of the Genus Phodopus (*P. sungorus* and *P. campbelli*) and the Impact of Growth Factors in Their Preimplantation Development]. Cand. Sci. (Biol.) diss. Novosibirsk.
11. Brushkov A. B., Fukuda M. 2007. "We Live on a Cold Planet". Science First Hand, no 2 (14), pp. 74-85.
12. Budevich A. I., Payterov S. N., Sapsalev S. A., Kirikovich Yu. K., Lukashevich T. N., Mikhedova I. V., Sakhonchik P. E., Zhdanovich V. V. 2014. "Prizhivlyaemost' zamorozhenno-ottayannykh embrionov krupnogo rogatogo skota v svyazi s ikh podgotovkoy dlya pryamoy peresadki retsipientam" [Engraftment with Frozen and Melted Embryos of Cattle in Connection with Their Preparation for Direct Transplant Recipient]. Zootehnicheskaya nauka Belarusi, vol. 49, no 1, pp. 32-44.
13. Dulnev B. Blog Borisa Dulneva [Boris Dulnev's Blog]. <http://boris-dulnev.livejournal.com>
14. Farrant J. 1980. "General Observations on Cell Preservation". In: Low Temperature Preservation in Medicine and Biology, pp. 1-18. Kent: Pitman Medical Limited.
15. Fisinin V. I., Bagirov V. A., Volkova N. A., Zinovyeva N. A., Royter Ya. S., Zhilinskiy M. A. 2012. "Kriokonservatsiya muzhskikh polovykh kletok kak metod sokhraneniya geneticheskikh resursov sel'skokhozyaystvennoy ptitsy" [Cryopreservation of Male Germ Cells as a Method of Preservation of Genetic Resources of Poultry]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK, no 8, pp. 65-68.
16. Gaydukov S. N., Boyarskiy K. Yu., Folkert I. G., Balasanyan V. G. 2014. "Kriterii, opredelyayushchie klinicheskuyu effektivnost' vitrifikatsii embrionov" [Criteria That Determine the Clinical Efficiency of Embryos Vitrification]. Fundamental Research, no 10-6, pp. 1081-1084.
17. Grishchenko V. I., Kopeyka E. F., Petrushko M. P. 2004. "Problemy kriobiologii i sokhraneniya geneticheskikh resursov" [Problems of Cryobiology and Conservation of Genetic Resources]. Proceedings of the international conference "Sokhraneniya geneticheskikh resursov" [Preservation of Genetic Resources]. Cytology, vol. 46, no 9.
18. Grishchenko V. I., Alekseevskaya E. I. 2004. "Apoptoz i kriobnovlenie kak osnova sovremennoy tsitokhromnoy terapii" [Apoptosis and Cryorenewal as the Basis of Modern Cytochrome Therapy]. International Medical Journal, vol. 10, no 4. P. 115-118.
19. Grishchenko V. I., Alekseevskaya E. I. 2005. "Kriobnovlenie kak osnova effektivnogo lecheniya muzhskogo besplodiya" [Cryorenewal as the Basis for the Effective Treatment of Male Infertility]. International Medical Journal, vol. 11, no 4, pp. 68-71.
20. Khanzhi V. 2014. "Determinanty istorii. Attraktor zhizni: kriogennoe zamorazhivanie i nanotekhnologii" [Determinants of History. The Attractor of Life: Cryogenic Freezing and Nanotechnology]. Visnik Institutu rozvitku ditini, no 31, pp. 34-40.
21. Khimenkov A. N., Brushko A. V. 2006. Vvedenie v strukturnuyu kriologiyu [Introduction to Structural Cryology]. Moscow: Nauka.

22. Konov K. B. 2016. "Issledovanie metodami EPR vozdeystviya krioprotektorov sakharozy, tregalozy, glitserina i sorbita na strukturu i dinamiku model'noy lipidnoy membrany" [Study of the Effects of Cryoprotectants Sucrose, Trehalose, Glycerol and Sorbitol on Structure and Dynamics of Model Lipid Membrane Using the EPR Methods]. Cand. Sci. (Phys-Math.) diss. Kazan.
23. Kozikova L. V., Yakovlev A. F. 2004. "Tsitogeneticheskiy analiz embrionov kur, poluchennykh putem iskusstvennogo osemneniya kriokonservirovannoy spermoy raznykh srokov khraneniya" [Cytogenetic Analysis of Embryos of Chickens, Obtained through Artificial Insemination of Cryopreserved Semen from Different Periods of Storage]. *Tsytology*, vol. 46, No 9, pp. 803-804.
24. Krasilnikova A. A. 2015. "Sovershenstvovanie protsessa kriokonservatsii reproduktivnykh kletok samtsov ryb" [Improving the Process of Cryopreservation of the Reproductive Cells of Male Fish]. Cand. Sci. (Biol.) diss. Astrakhan.
25. Krivokharchenko A. S., Serobyanyan G. A., Shakhbazyan A. K., Sadovnikov V. B. 1996. "Sverkhbystroe zamorazhivanie embrionov myshey autbrednykh i inbrednykh liniy" [Ultra-Fast Freezing of Mouse Embryos of Outbred and Inbred Lines]. *Ontogenez*, vol. 27, no 4, pp. 300-304.
26. Landel C. P. 2005. "Archiving Mouse Strains by Cryopreservation". *Lab Animal*, vol. 34, no 4, pp. 50-57.
27. Letkevich L. L., Gandzha A. I., Simonenko V. P., Kirillova I. V., Rakovich E. D., Kurak O. P., Zhurina N. V., Kovalchuk M. A., Burakova O. V. 2014. "Vosstanovlenie zhiznesposobnosti dekonservirovannykh embrionov korov, poluchennykh vne organizma, s ispol'zovaniem ekzotsellyulyarnykh veshchestv" [Restore the Viability of Cows Embryos, Obtained In Vitro, Using Exocellular Substances]. *Zootekhnicheskaya nauka Belarusi*, vol. 49, no 1, pp. 122-131.
28. Lovelock J. E. 1954. "Biophysical Aspects of the Freezing and Thawing of Living Cells". *Proceedings of the Royal Society Medicine*, vol. 47.
29. Mazur P. 1970. "Cryobiology: The Freezing of Biological Systems". *Science*, vol. 168, no 3934, pp. 939-949.
30. Oboznaya-Pechenezhskaya E. I., Grishchenko V. I., Pankov E. Ya. 1993. "Kriobiologiya obnoveniya: fakty i perspektivy" [Cryobiology Update: Facts and Perspectives]. *Problemy kriobiologii*, no 4, pp. 11-20.
31. Pokhilenko V. D., Baranov A. M., Detushev K. V. 2009. "Metody dlitel'nogo khraneniya kolleksiionnykh kul'tur mikroorganizmov i tendentsii razvitiya" [Methods of Long-Term Storage of Collection Cultures of Microorganisms and Trends]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki*, no 4(12), pp. 99-121.
32. Ponomareva E. N., Krasilnikova A. A., Tikhomirov A. M., Firsova A. V. 2016. "Novye biotekhnologicheskie metody kriokonservatsii reproduktivnykh kletok osetrovykh vidov ryb" [New Biotechnological Methods of Cryopreservation of Sturgeon's Reproductive Cells]. *Yug Rossii: ekologiya, razvitie*, vol. 11, no 1, pp. 59-68.
33. Rall W. F., Fahy G. M. 1985. "Ice-Free Cryopreservation of Mouse Embryos at -196 Degrees C by Vitrification". *Nature*, vol. 313, pp. 573-575.
34. Rall W. F., Mazur P., McGrath J. J. 1983. "Depression of the Ice-Nucleation Temperature of Rapidly Cooled Mouse Embryos by Glycerol and Dimethyl Sulfoxide". *Biophysical Journal*, vol. 41, no 1, pp. 1-12.
35. Re L. 1962. *Preservation of life cold*, transl. from French. Moscow: Medgiz.

36. Saragusty J., Arav A. 2011. "Current Progress in Oocyte and Embryo Cryopreservation by Slow Freezing and Vitrification". *Reproduction*, vol. 141, no 1, pp. 1–19.
37. Selyukov A. G., Solodilov A. I., Elkin V. P. 2008. "Slabye vzaimodeystviya i regomeostaz zhivykh sistem (prikladnoy aspekt)" [Weak Interaction and Rigolotes Living Systems (Applied Aspect)]. Tyumen: Tyumen State University.
38. Semenov H. H., Ignatieva E. A., Beskova T. B. 2005. "Kriokonservatsiya embrionov myshey inbrednykh liniy garantiya sokhraneniya ikh genofonda" [Cryopreservation of Mouse Embryos of Inbred Lines is the Guarantee of Preservation of Their Genofund]. *Biomedicine*, vol. 1, no 1, pp. 96-102.
39. Shurygina O. V., Tugushev M. T., Bayzarova A. A., Saraeva N. V. 2016. "Vitrifikatsiya gamet i embrionov — effektivnyy instrument povysheniya rezul'tativnosti programm vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologiy (VRT)" [Vitrification of Gametes and Embryos — An Effective Tool for Increasing the Effectiveness of Programs Assisted Reproductive Technologies (ART)]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, no 4, pp. 1-7.
40. Tsutsaeva A. A., Kotlyarov O. L., Kadomtseva O. V., Gordiano A. D., Fedez O. I. 2004. "Mekhanizmy induktsii i reparatsii neletal'nykh kriopovrezhdeniy" [Mechanisms of Induction and Repair of Non-Lethal Tripolidine]. *Proceedings of the international conference "Sokhranenie geneticheskikh resursov"* [Preservation of Genetic Resources]. *Cytology*, vol. 46, no 9, pp. 871-872.
41. Uchida T. 2004. "Freezing Properties of Disaccharide Solutions: Inhibition of Hexagonal Ice Crystal Growth and Formation of Cubic Ice". Edited by E. Borisenko. Rijeka: InTech, no 9, pp. 203–224.
42. Vityazeva I. I., Barmina I. I., Melnichenko G. A. 2011. "Istoricheskie vekhi razvitiya metodov vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologiy, osnovannykh na oplodotvorenii in vitro" [Historical Milestones in the Development of Methods of Assisted Reproductive Technology, Based on In Vitro Fertilization]. *Vestnik reproduktivnogo zdorov'ya*, no 1, pp. 5-14.
43. Whittingham D. G. 1971. "Survival of Mouse Embryos after Freezing and Thawing". *Nature*, vol. 233, no 5315, pp. 124-126.