

Новые подходы к получению репродуктивного материала амфибий для его использования в искусственном оплодотворении

В. К. Утешев¹, Э. Н. Гахова¹, Л. И. Крамарова²,
Н. В. Шишова¹, С. А. Каурова¹

¹Институт биофизики клетки РАН

Россия, 142290, Московская область, Пущино, Институтская, 3

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Россия, 142290, Московская область, Пущино, Институтская, 3

E-mail: uteshev-cryobank@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2019 г., после доработки 29.03.2019 г., принята 4.04.2019 г.

В данной работе описаны новые способы получения жизнеспособных овулированных ооцитов и тестикулярной спермы из тушек самок и самцов травяной лягушки *Rana temporaria*, хранившихся при +4°C в течение 1–9 суток. Кроме того, приведен новый подход к отсроченному получению (от 1 до 30 суток) овулированных ооцитов от живых самок лягушки этого вида. Показано, что даже после 6 суток хранения при температуре +4°C в тушках самцов часть тестикулярных сперматозоидов сохраняют подвижность (21.0±5%) и оплодотворяющую способность (13.2±1.9%). Овулированные ооциты, хранившиеся в тушках самок при +4°C в течение восьми дней, сохраняют способность к оплодотворению (39.2±4.2%) и последующему развитию до выклева (16.0±6.2%). Наши результаты свидетельствуют также о возможности отсроченного до 30 дней прижизненного получения ооцитов, способных к оплодотворению (46.4±3.0%) и дальнейшему развитию до выклева (49.2±7.7%). Результаты данной статьи являются очередным этапом в развитии современных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: травяная лягушка, *Rana temporaria*, ооциты, сперматозоиды, репродуктивные технологии, криоконсервация.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-46-55>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вымирание многих видов животных, особенно амфибий, происходит с беспрецедентной скоростью. Согласно критериям, разработанным Международным союзом охраны природы, амфибии гораздо больше, чем птицы и млекопитающие, подвержены угрозе исчезновения на нашей планете (Stuart et al., 2004). По некоторым оценкам, предполагаемые темпы вымирания амфибий могут быть в 211 раз выше фоновой скорости вымирания животных во всем мире (Blaustein, Kiesecker, 2002). Одной из основных стратегий сохранения исчезающих видов амфибий является их разведение в неволе (в зоопарках и специализированных питомниках). Надежность, безопасность и низкая стоимость являются основными составляющими данного подхода.

Успехи, связанные с разведением амфибий, в значительной степени обусловлены развитием репродуктивных технологий. В ранее опубликованной нами теоретической схеме (Apanjeva et al., 2017) обобщены достигнутые в этой области успехи. К настоящему времени значительная часть элементов этой схемы уже экспериментально обоснована. К примеру, показана возможность отло-

женного на годы проведения искусственного оплодотворения с использованием криоконсервированной тестикулярной или уринальной спермы, хранящейся месяцы или годы в криобанках (Kouba et al., 2012, 2013; Clulow J., Clulow S., 2016). Кроме того, возможность хранения тестикулярной или уринальной спермы *in vitro* при температуре + 4°C позволяет осуществлять отсроченное на несколько дней искусственное оплодотворение с использованием этой сохраненной спермы (Browne et al., 2001, 2002; Kouba et al., 2012). Хранение ооцитов амфибий *in vitro* в физиологическом растворе описано, но время хранения ограничивалось лишь несколькими часами (Browne et al., 2001). Поэтому время отсрочки проведения оплодотворения с использованием сохраненных ооцитов было крайне коротким.

Целью настоящего исследования является суммирование данных, полученных нами в последние годы, и представление новых методов и подходов для более надежного и эффективного разведения и сохранения амфибий. В данной статье показано, что извлечение овулированных ооцитов для искусственного оплодотворения или семенников для приготовления постмортальной

тестикулярной спермы возможно не только сразу после декапитации животных. Новый подход к получению репродуктивного материала заключается в сохранении овулированных ооцитов и зрелых сперматозоидов травяной лягушки *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 в тушках самцов или самок при околонулевой температуре для отсроченного их извлечения через 1 – 9 суток после декапитации. Показана также возможность отсроченного получения овулированных ооцитов от живых самок травяной лягушки на срок от 1 до 30 суток. Кроме того, показана новая возможность отсроченного искусственного оплодотворения с использованием овулированных ооцитов, сохраненных *in vitro* в небольших бюксах при +4°C от 1 до 9 суток.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на травяной лягушке *R. temporaria*. Самцы и самки были собраны в природе из мест зимовки в декабре и до начала экспериментов содержались в лаборатории в темной комнате при +4°C. В экспериментах использовали тестикулярную и уринальную сперму и овулированные ооциты, полученные от этих лягушек.

Получение гамет. Тестикулярная сперма. Для приготовления тестикулярной спермы из тушек декапитированных лягушек извлекали семенники (тестикулы). Семенники измельчали, и к измельченным семенникам добавляли дистиллированную воду, доводя концентрацию сперматозоидов в образце до 30×10^6 /мл. Полученную тестикулярную сперму применяли для искусственного оплодотворения овулированных ооцитов (Дабагян, Слепцова, 1975; Rugh, 1962). Для оплодотворения использовали 25 – 30 икринок и 0.3 мл приготовленной тестикулярной спермы.

Уринальная сперма. Уринальную сперму получали от живых гормонально стимулированных самцов (Kouba et al., 2012; Ananjeva et al., 2017). Для этой цели использовали гонадотропный гормон (аналог лютеинизирующего релизинг гормона) российского производства (сурфагон) в дозе 25 мкг на лягушку. Через 1 – 3 ч после инъекции гормона уринальную сперму вместе с уриной сцеживали путем мягкого массажа брюшной области по направлению к клоаке (Kouba et al., 2012; Ananjeva et al., 2017). Измеряли объем полученных порций уринальной спермы и концентрацию сперматозоидов в каждой из них. Для оплодотворения использовали образцы объемом 0.25 – 0.35 мл с концентрацией сперматозоидов не ниже 15×10^6 /мл урины. Качество тестикулярных и уринальных сперматозоидов оценивали по их подвижности и оплодотворяющей способности.

Овулированные ооциты. Для стимулирования овуляции ооцитов каждой самке инъецировали сурфагон по 50 мкг на лягушку, и их в течение 36 – 48 часов содержали при 17 – 18°C. Для проверки успешности овуляции у каждой самки сцеживали небольшую контрольную порцию ооцитов посредством мягкого массажа брюшной области по направлению к клоаке (Kouba et al., 2012; Ananjeva et al., 2017). Извлечение овулированных ооцитов проводили двумя способами: постмортально и прижизненно. Постмортальные ооциты извлекали из декапитированных самок, вскрывая брюшную полость и нижнюю часть яйцевода. От живых самок ооциты получали путем мягкого массажа брюшной области. Полученные ооциты оплодотворяли свежеполученной уринальной спермой. Успешность оплодотворения оценивали по появлению первых борозд дробления, проценту оплодотворенных ооцитов и по развитию полученных личинок до выклева.

Отсроченное получение гамет. Отсроченное получение тестикулярной спермы. Эксперименты выполнены на 40 самцах. Тестикулярная сперма, полученная из семенников пяти лягушек немедленно после их декапитации, использовалась для оплодотворения и служила в качестве контроля (0 дней хранения). Остальные 35 тушек поместили в холодильник при температуре +4°C. Затем ежедневно на протяжении 7 суток из 5 тушек извлекали семенники, готовили тестикулярную сперму и исследовали ее качество.

Отсроченное постмортальное получение овулированных ооцитов. В экспериментах использованы 50 самок лягушек с овулированными ооцитами. Всех животных декапитировали, а извлеченные ооциты из 5 лягушек оплодотворяли свежеполученной уринальной спермой и использовали в качестве контроля (0 дней хранения). Тушки остальных 45 самок поместили в холодильник при температуре +4°C. Затем ежедневно в течение 1 – 9 суток из 5 тушек хирургически извлекали ооциты, оплодотворяли их свежеполученной уринальной спермой и через 3 – 4 часа оценивали результат оплодотворения. Успешность оплодотворения определяли по появлению первых борозд дробления и развитию личинок до выклева.

Отсроченное прижизненное получение овулированных ооцитов. Эксперименты были выполнены на 5 самках травяной лягушки. У всех самок первая порция ооцитов собрана прижизненно и оплодотворена сразу после завершения овуляции ооцитов (через 48 часов после инъекции гормона). Эти ооциты служили контролем (0 дней хранения). После получения первой порции ооцитов все самки были помещены в холодильник

(+4°C). Через 10, 20 и 30 суток лягушек доставали из холодильника для прижизненного отбора очередной порции ооцитов для оплодотворения. Затем животных возвращали в холодильник до следующей процедуры забора материала. Успешность оплодотворения определяли по проценту оплодотворенных ооцитов и по развитию личинок до выклева.

Отсроченное искусственное оплодотворение. Оплодотворение с использованием сохраненной уринальной спермы. В опытах использовали 25 порций уринальной спермы. Часть образцов (5 порций) были взяты для искусственного оплодотворения ооцитов сразу после получения спермы (0 дней хранения). Эти эксперименты служили контролем. Остальные порции спермы были помещены в холодильник при +4°C. Через 3, 5, 7 и 9 суток хранения сперму использовали для отсроченного оплодотворения свежеполученных ооцитов. По результатам оплодотворения оценивали качество этих сохраненных сперматозоидов.

Оплодотворение с использованием сохраненных овулированных ооцитов. Эксперименты выполнены на 10 самках травяной лягушки. Полученные от каждой самки овулированные ооциты были разделены на 6 порций по 25 – 30 ооцитов в каждой. Первая порция ооцитов от каждой самки была немедленно использована для оплодотворения уринальной спермой (0 дней хранения). Остальные порции ооцитов расфасованы без физиологического раствора в 50 небольших плотно закрытых бюксов, которые были помещены в холодильник при +4°C. Через 1, 3, 5, 7 и 9 суток хранения доставали по 10 бюксов, и сохраненные ооциты оплодотворяли свежеполученной уринальной спермой.

Статистический анализ. Для построения графиков использовалась программа Kaleidagraph, версия 4.0. Результаты представлены как величина средней ± стандартная ошибка средней из обозначенного количества экспериментов. Статистическую значимость различий определяли с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отсроченное получение посмертных тестикулярных сперматозоидов. В данной серии опытов исследовали изменения качества тестикулярных сперматозоидов в процессе их хранения при температуре +4°C в тушках декапитированных самцов. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 1, где изображены две кривые: динамика снижения в процессе хранения подвижности сперматозоидов и динамика их способности оплодотворять свежеполученные ооциты.

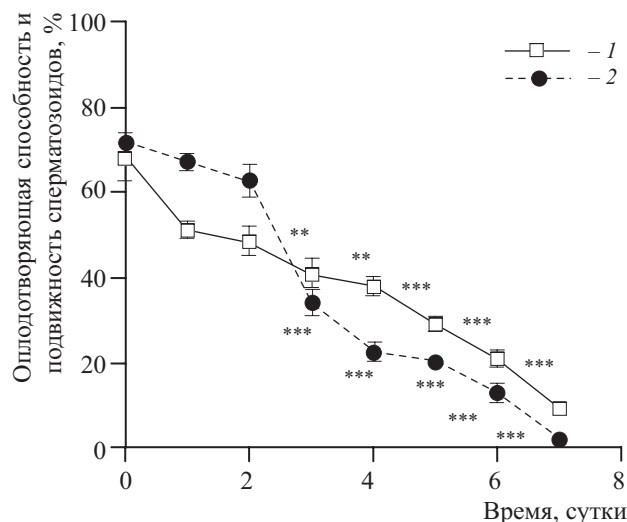


Рис. 1. Общая подвижность и оплодотворяющая способность тестикулярных сперматозоидов *Rana temporaria* после хранения тушек самцов при +4°C в течение 1 – 7 суток, %. Каждая точка на сплошной (1) и пунктирной (2) кривых является средней ±SE из пяти независимых экспериментов. Статистическая значимость различий была определена с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$ по сравнению с контрольными сперматозоидами. В качестве контроля использовались сперматозоиды, полученные немедленно после декапитации самцов (0 дней хранения)

Fig. 1. Total motility and fertilizing ability of *Rana temporaria* testicular spermatozooids after male carcass storage at +4°C for 1–7 days, %. Each point on the solid (1) and dotted (2) curves is the mean ±SE of five independent experiments. The statistical significance of the differences was evaluated using unpaired Student's *t*-test. ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$, compared with control spermatozooids. Spermatozooids obtained immediately after decapitation of males (0 days of storage) were used as a control

Приведенные данные свидетельствуют, что качество сохраняемых сперматозоидов достоверно снижается к 5 – 7-м суткам хранения. Однако даже после 7 суток хранения тестикулярные сперматозоиды все еще сохраняют подвижность (9.4%) и оплодотворяющую способность (2.2%).

Отсроченное постмортальное получение овулированных ооцитов. В экспериментах исследовали изменения качества овулированных ооцитов, сохраняемых в тушках самок в холодильнике от 1 до 9 суток (рис. 2). Установлено, что качество сохраняемых в тушках ооцитов достоверно снижается после пятого дня хранения, а к девятому дню наблюдается практически полная их деградация. В то же время даже после 4 – 7 суток ооциты в значительной степени сохраняют способность к оплодотворению и к дальнейшему развитию (см. рис. 2). Через 7 суток холододового хранения в тушках около 50% ооцитов были оплодотворены, и

практически 20% полученных из них личинок развились до выклева.

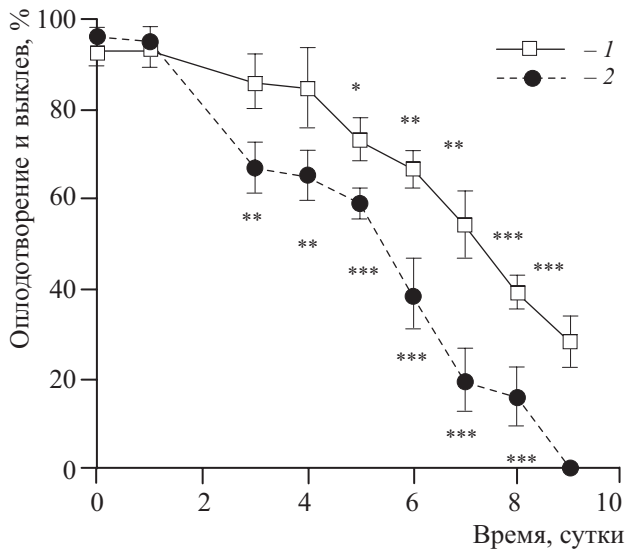


Рис. 2. Количество оплодотворенных ооцитов и количество личинок (выраженное в %), развившихся до выклева, после хранения ооцитов в тушках самок травяной лягушки *Rana temporaria* при +4°C в течение 1 – 9 суток. Каждая точка на сплошной (1) и пунктирной (2) кривых является средней ±SE из пяти независимых экспериментов. Статистическая значимость различий была определена с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$ по сравнению с контрольными ооцитами. В качестве контроля использовались ооциты, полученные немедленно после овуляции (0 суток хранения)

Fig. 2. Numbers of fertilized oocytes and the numbers of larvae (expressed in %), developed till hatching, after oocyte storage in female carcasses of *Rana temporaria* at +4°C for 1–9 days. Each point on the solid (1) and dotted (2) curves is the mean ±SE of five independent experiments. The statistical significance of the differences was evaluated using unpaired Student's *t*-test. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$, compared with control oocytes. Oocytes obtained immediately after ovulation (0 days of storage) were used as a control

Отсроченное прижизненное получение овулированных ооцитов. В эксперименте изучали последствия сохранения овулированных ооцитов в теле живых самок *R. temporaria*, содержащихся при +4°C (табл. 1). Анализ результатов показал, что качество сохраняемых овулированных ооцитов достоверно и последовательно снижается в процессе их хранения. Однако даже после 30 суток 46% ооцитов сохраняли способность быть оплодотворенными свежеполученной спермой, и из их числа около половины эмбрионов достигли стадии выклева. Исследование качества прижизненно сохраняемых ооцитов в более поздние сро-

ки оказалось невозможным, поскольку все самки на 31 – 35-е сутки их содержания в холодильнике спонтанно сбрасывали оставшиеся овулированные ооциты.

Таблица 1. Количество оплодотворенных ооцитов и количество личинок, развившихся из них до выклева, после хранения ооцитов в живых самках *R. temporaria* в холодильнике при +4°C в течение 30 суток

Table 1. Numbers of fertilized oocytes and larvae developed till hatching, after oocyte storage in live females at +4°C for 30 days

Хранение ооцитов, сутки	Оплодотворение, %	Выклев, %
0	94.2±1.49	95.6±1.32
10	72.2±1.42***	89.8±2.69
20	65.6±2.65***	72.4±2.22***
30	46.4±3.01***	49.2±7.73***

Примечание. Каждая цифра в таблице является средней ±SE из пяти независимых экспериментов. Статистическая значимость различий была определена с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. *** $P \leq 0.0001$ по сравнению с контрольными ооцитами. В качестве контроля использовались ооциты, полученные немедленно после овуляции (0 суток хранения).

Note. Each point in the table is mean ±SE of five independent experiments. The statistical significance of the differences was determined using unpaired Student's *t*-test. Oocytes obtained immediately after ovulation (0 days of storage) were used as control. *** $P \leq 0.0001$, compared with control oocytes

Отсроченное оплодотворение с использованием сохраненной уринальной спермы. В данной серии экспериментов исследовали характеристики уринальной спермы *R. temporaria*, сохраняемой в эппендорфах в течение 1 – 9 суток при температуре +4°C. Из результатов, приведенных на рис. 3, видно, что к пятому дню хранения способность сперматозоидов оплодотворять ооциты достоверно снижается с последующей полной потерей их функциональной активности к девятому дню. Однако даже через 7 суток хранения около 50% сперматозоидов все еще сохраняют подвижность, и более 20% свежеполученных ооцитов оказались оплодотворенными этими сперматозоидами в экспериментах с искусственным оплодотворением.

Отсроченное оплодотворение с использованием сохраненных овулированных ооцитов. В этих экспериментах исследовали изменения качества овулированных ооцитов, сохраняемых в небольших, плотно закрытых бюксах при температуре +4°C. Результаты приведены на рис. 4, где представлены 2 кривые: 1 – снижение в процессе хранения способности ооцитов быть оплодотворенными; 2 – изменение способности полученных ли-

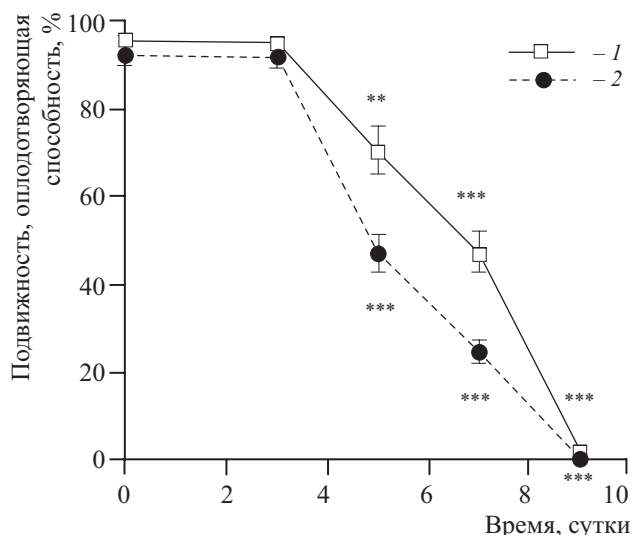


Рис. 3. Общая подвижность и оплодотворяющая способность (%) уринальных сперматозоидов *Rana temporaria* после их хранения при +4°C в течение 1–9 суток. Каждая точка на сплошной (1) и пунктирной (2) кривых является средней \pm SE из пяти независимых экспериментов. Статистическая значимость различий была определена с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$ по сравнению с контрольными сперматозоидами. В качестве контроля взяты сперматозоиды, использованные для оплодотворения немедленно после их получения (0 суток хранения)

Fig. 3. Total motility and fertilizing ability (%) of urinal spermatozooids of *Rana temporaria* after storage at +4°C for 1–9 days. Each point on the solid (1) and dotted (2) curves is the mean \pm SE of five independent experiments. The statistical significance of the differences was evaluated using unpaired Student's *t*-test. ** $P \leq 0.001$; *** $P \leq 0.0001$, compared with control spermatozooids. As a control, spermatozooids were taken immediately after isolation (0 days of storage) and used for fertilization

чинок к развитию до стадии выклева. Можно видеть, что качество ооцитов достоверно снижается в процессе хранения, а к 9-му дню наблюдается полная их деградация. Однако даже после 7 суток холодого хранения ооциты могут быть использованы для отсроченного искусственного оплодотворения свежеполученной уринальной спермой: 40% ооцитов оказались оплодотворенными и около 50% полученных из них личинок развились до выклева.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе нами подробно исследованы возможности отсроченного получения гамет (овулированных ооцитов и тестикулярных сперматозоидов) бесхвостых амфибий. В предыдущей публикации нами показана принципиальная возможность получения овулированных ооцитов, со-

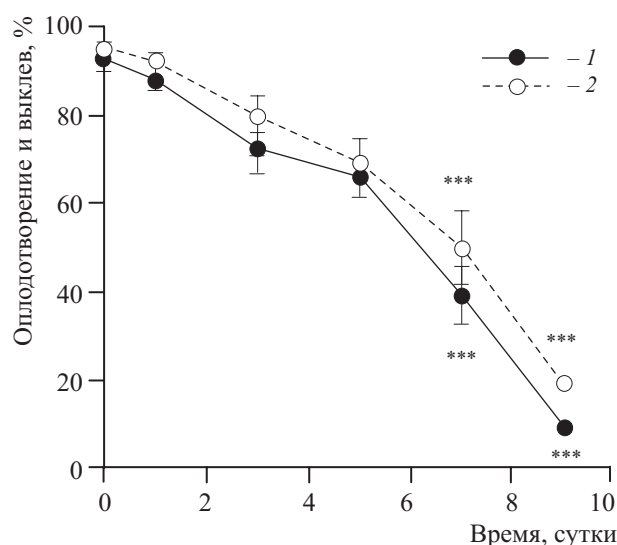


Рис. 4. Количество оплодотворенных ооцитов и количество личинок (выраженное в %), развившихся из них до выклева, после хранения неоплодотворенных ооцитов *Rana temporaria* в бюксах при +4°C в течение 1–9 суток. Каждая точка на сплошной (1) и пунктирной (2) кривых является средней \pm SE из десяти независимых экспериментов. Статистическая значимость различий была определена с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. *** $P \leq 0.0001$ по сравнению с контрольными ооцитами. В качестве контроля взяты ооциты, использованные для оплодотворения немедленно после их получения (0 суток хранения)

Fig. 4. Numbers of fertilized oocytes and the numbers of larvae of *Rana temporaria* (expressed in %) developed till hatching, after storage of unfertilized oocytes in a tube at +4°C for 1–9 days. Each point on the solid (1) and dotted (2) curves is the mean \pm SE of ten independent experiments. The statistical significance of the differences was evaluated using unpaired Student's *t*-test. *** $P \leq 0.0001$, compared with control oocytes. Oocytes used for fertilization immediately after isolation (0 days of storage) were taken as a control

храняемых до момента извлечения в течение 5 дней в тушках самок травяной лягушки в холодильнике при +4°C (Uteshev et al., 2018). В настоящем исследовании нами расширены временные границы исследования и показано, что максимальные возможности хранения постмортальных овулированных ооцитов, когда ооциты еще сохраняют способность к оплодотворению и последующему развитию, находятся в пределах 8–9 суток.

В представленном исследовании нами подтверждена ранее выявленная возможность (Uteshev et al., 2018) длительного сохранения (до 30 суток) овулированных ооцитов в яйцеводах живых самок *R. temporaria*, помещенных после завершения овуляции в холодильник при температуре +4°C. Это позволяет получать ооциты от живых самок не только сразу после овуляции, но спустя

10 – 30 суток. Однако следует отметить, что возможность удерживать овулированные ооциты в яйцеводах в течение нескольких дней свойственна, видимо, далеко не всем видам амфибий. В природе травяная лягушка нерестится ранней весной, поэтому возможность удерживать в яйцеводах овулированные ооциты в течение нескольких дней до достижения оптимальной для нереста температуры воды, является, видимо, эволюционно выработанной особенностью данного вида. Возможно, что такой же особенностью удерживать в яйцеводе овулированные ооциты в течение нескольких суток обладают и ряд других видов, нерестящихся ранней весной (например, остромордая лягушка *Rana arvalis* Nilsson, 1842). Степень универсальности этого явления необходимо исследовать экспериментально.

Ранее опубликована схема репродуктивных технологий, разработанная нами для разведения бесхвостых амфибий (Ananjeva et al., 2017). В данном исследовании нами продолжено заполнение этой схемы новыми экспериментальными данными. В табл. 2 приведены ссылки на источники, которые содержат результаты экспериментов, соответствующие каждому из звеньев предложенной схемы. Видно, что репродуктивный материал бесхвостых амфибий (овулированные ооциты или сперматозоиды) можно получать не только сразу

после завершения овуляции или декапитации животных, но и отсрочено на несколько дней.

Репродуктивный материал амфибий получают для проведения искусственного оплодотворения. Искусственное оплодотворение овулированных ооцитов амфибий в экспериментальной эмбриологии используют с начала прошлого века (Rugh, 1934). Обычно искусственное оплодотворение проводили сразу после получения репродуктивного материала (Дабагян, Слепцова, 1975; Rugh, 1962). Кроме того, в ранних работах овулированные ооциты или тестикулярную сперму получали посмертно, от декапитированных самцов или самок (Дабагян, Слепцова, 1975; Rugh, 1962). Развитие репродуктивных технологий привело к появлению методов получения уринальной спермы и неоплодотворенной икры от живых гормонально стимулированных самцов и самок (Kouba et al., 2012; Ananjeva et al., 2017).

В приведенной нами ранее схеме указана возможность отсроченного на дни или отложеного на годы искусственного оплодотворения (Ananjeva et al., 2017). Для реализации такой возможности нужны разработанные методы сохранения на дни или годы ооцитов или сперматозоидов. В настоящее время единственным надежным способом длительного хранения (месяцы или годы) репродуктивного материала амфибий является его

Таблица 2. Способы получения гамет бесхвостых амфибий
Table 2. Methods of obtaining gametes from anuran amphibians

Получение гамет		Гаметы	Источники
Посмертное	Немедленное получение [#]	Сперматозоиды	Дабагян, Слепцова, 1975; Rugh, 1934, 1962
		Ооциты	Дабагян, Слепцова, 1975; Rugh, 1962
	Отсроченное получение ^{###}	Сперматозоиды	Shishova et al., 2013; Наши данные
		Ооциты	Uteshev et al., 2018; Наши данные
Прижизненное	Немедленное получение [*]	Сперматозоиды	Kouba et al., 2012; Ananjeva et al., 2017
		Ооциты	Kouba et al., 2012; Ananjeva et al., 2017
	Отсроченное получение ^{**}	Сперматозоиды	Данные отсутствуют, поскольку нет методов удержания урины, содержащей сперматозоиды, в мочевом пузыре живых гормонально стимулированных самцов
		Ооциты	Uteshev et al., 2018; Наши данные

Примечание. [#] Немедленное посмертное получение гамет – это извлечение овулированных ооцитов или семенников для тестикулярной спермы, произведенное немедленно после декапитации самцов или самок лягушек. ^{###} Отсроченное посмертное получение гамет – извлечение овулированных ооцитов или семенников из тушек лягушек, хранящихся до момента извлечения гамет при температуре +4°C в течение нескольких суток. ^{*} Немедленное прижизненное получение гамет – получение ооцитов или уринальных сперматозоидов немедленно после окончания овуляции ооцитов или после образования уринальной спермы. ^{**} Отсроченное прижизненное получение овулированных ооцитов – это извлечение ооцитов небольшими порциями из живых самок, которые в промежутках между получением ооцитов содержались при температуре +4°C в течение нескольких суток или недель.

Note. [#] Immediate post-mortem obtaining of gametes – immediate isolation of ovulated oocytes or testicles after decapitation of males or females of frogs. ^{###} Delayed post-mortem obtaining of gametes – isolation of ovulated oocytes or testicles from frogs carcasses stored at temperature + 4°C for several days. ^{*} Immediate gamete obtaining from live frogs – isolation of oocytes or urinal sperm immediately after the end of ovulation of the oocytes or after the formation of urinal sperm. ^{**} Delayed obtaining of ovulated oocytes from live frogs – the sampling of oocytes from live females, which were kept at a temperature of + 4°C for several days or weeks between isolation of oocytes.

криоконсервация и хранение при сверхнизких температурах, например в жидком азоте при температуре -196°C . Методы криоконсервации тестикулярной, а затем и уринальной спермы уже созданы. Публикации с описанием этих данных приведены в табл. 3 и обобщены в обзорах (Clulow J., Clulow S., 2016). В то же время методы криоконсервации ооцитов амфибий пока не разработаны. Тем не менее, приведенные данные подтверждают возможность проведения оплодотворения спустя годы после получения тестикулярной или уринальной спермы (отложенное оплодотворение).

Сохранение спермы или ооцитов в течение нескольких суток возможно не только в жидком азоте, но и при околонулевых температурах. Результаты успешного хранения тестикулярной и уринальной спермы при $+4^{\circ}\text{C}$ опубликованы (Browne et al., 2001, 2002; Kouba et al., 2012). В данной работе нами приведены результаты хранения при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 9 суток уринальной спермы еще одного вида – травяной лягушки. Перечисленные данные свидетельствуют о возможности проведения отсроченного на несколько дней искусственного оплодотворения с использованием сохраненной спермы. Возможность отсроченного искусственного оплодотворения с использованием ооцитов, сохраненных *in vitro*, вне организма живых или мертвых самок в небольших бюксах, впервые описано нами в предыдущей публикации (Uteshev et al., 2018) и успешно подтверждено в данном исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные эксперименты на примере травяной лягушки *Rana temporaria* показали возможность отсроченного до 9 суток получения посмертного репродуктивного материала (овулированные ооциты или сперматозоиды) из декапитированных бесхвостых амфибий, а также возможность отсроченного до 30 суток получения овулированных ооцитов у живых самок. Кроме того, показана возможность проведения отсроченного искусственного оплодотворения с использованием уринальной спермы, сохраненной в эпипиндорфах в холодильнике от 1 до 9 суток, или с использованием овулированных ооцитов, сохраненных до 9 суток *in vitro*, в небольших бюксах при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Генетического криобанка Института биофизики клетки РАН, Пущино.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дабагян Н. М., Слепцова Л. А. 1975. Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития / ред. Е. А. Астауров, Т. А. Детлаф. М.: Наука. С. 422–462.

Каурова С. А., Чекурова Н. Р., Мельникова Е. А., Утешев В. К., Гахова Э. Н. 1996. Сохранение оплодотворяющей способности спермы травяной лягушки

Таблица 3. Искусственное оплодотворение с использованием спермы и овулированных ооцитов бесхвостых амфибий
Table 3. Artificial fertilization with the use of sperm and ovulated oocytes of anuran amphibians

Варианты искусственного оплодотворения	Источники
Оплодотворение сразу после получения посмертных ооцитов и тестикулярной спермы	Дабагян, Слепцова, 1975; Rugh, 1962
Оплодотворение сразу после получения прижизненно извлеченных ооцитов и уринальной спермы	Kouba et al., 2012, 2013; Ananjeva et al., 2017
Отсроченное на дни оплодотворение с использованием сохраненных ооцитов*	Uteshev et al., 2018; Наши данные
Отсроченное на дни оплодотворение с использованием тестикулярной спермы*	Browne et al., 2001, 2002
Отсроченное на дни оплодотворение с использованием уринальной спермы	Kouba et al., 2012; Наши данные
Отложенное на годы оплодотворение с использованием криоконсервированных ооцитов **	Методов криоконсервации ооцитов амфибий пока не существует
Отложенное на годы оплодотворение с использованием криоконсервированной тестикулярной спермы **	Каурова и др., 1996, 2008; Browne et al., 1998; Mugnano et al., 1998; Mansour et al., 2009, 2010
Отложенное на годы оплодотворение с использованием криоконсервированной уринальной спермы **	Shishova et al., 2011; Uteshev et al., 2013; Langhorne et al., 2013

Примечание. * Отсроченное искусственное оплодотворение – оплодотворение, проведенное через несколько дней после получения ооцитов или сперматозоидов, при этом полученные гаметы хранятся *in vitro* при низких положительных температурах. ** Отложенное искусственное оплодотворение – оплодотворение, проведенное спустя месяцы или годы после получения гамет (пока только сперматозоидов). Криоконсервированная сперма до момента проведения оплодотворения обычно хранится в криобанках в жидком азоте при температуре -196°C .

Note. * Delayed artificial fertilization – fertilization, carried out a few days after obtaining of oocytes or sperm; the isolated gametes are stored *in vitro* at about zero temperatures. ** Delayed artificial fertilization – fertilization, carried out months or years after the gametes were isolated (so far only the sperm). Cryopreserved sperm is usually stored in cryobanks in liquid nitrogen till fertilization.

- Rana temporaria* после криоконсервации // Консервация генетических ресурсов : материалы рабочего совещания. Пушchino : Ин-т биофизики клетки РАН. С. 106 – 107.
- Каурова С. А., Утешев В. К., Гахова Э. Н. 2008. Криоконсервация тестикулярных сперматозоидов серой жабы *Bufo bufo* // Биофизика живой клетки. Консервация генетических ресурсов. Т. 9. С. 62.
- Ananjeva N. B., Uteshev V. K., Orlov N. L., Ryabov S. A., Gakhova E. N., Kaurova S. A., Kramarova L. I., Shishova N. V., Browne R. K. 2017. Comparison of the modern reproductive technologies for amphibians and reptiles // Russ. J. of Herpetology. Vol. 24, № 4. P. 1 – 16.
- Blaustein A. R., Kiesecker J. M. 2002. Complexity in conservation : lessons from the global decline of amphibian populations // Ecology Letters. Vol. 5. P. 597 – 608.
- Browne R. K., Clulow J., Mahony M., Clark A. 1998. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm // Cryobiology. Vol. 37, iss. 4. P. 339 – 345.
- Browne R. K., Clulow J., Mahony M. 2001. Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes // Reproduction. Vol. 121, № 1. P. 167 – 173.
- Browne R. K., Clulow J., Mahony M. 2002. The short-term storage and cryopreservation of spermatozoa from hylid and myobatrachid frogs // CryoLetters. Vol. 23, № 2. P. 129 – 136.
- Clulow J., Clulow S. 2016. Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles : bringing the ARTs up to Speed // Reproduction, Fertility and Development. Vol. 28, № 8. P. 1116 – 1132.
- Kouba A., Vance C., Calatayud N., Rowilson T., Langhorne C., Willard S. 2012. Assisted Reproduction Technologies (ART) for Amphibians // Amphibian Husbandry Resource Guide / eds. V. A. Poole, S. Grow. Maryland : Silver Spring. P. 60 – 118.
- Kouba A. J., Vance C. K. 2013. Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation // Reproduction, Fertility and Development. Vol. 21, № 6. P. 719 – 737.
- Langhorne C. J., Calatayud N. E., Kouba A. J., Feugang J. M., Vance C. K., Willard S. T. 2013. Cryoconservation : Successful sperm cryopreservation and developmental outcomes using endangered North American amphibians // Cryobiology. Vol. 67, № 3. P. 405 – 409.
- Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A. 2009. Optimization of the cryopreservation of African clawed frog (*Xenopus laevis*) sperm // Theriogenology. Vol. 72, iss. 9. P. 1221 – 1228.
- Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A. 2010. Motility and cryopreservation of spermatozoa of European common frog, *Rana temporaria* // Theriogenology. Vol. 74, iss. 5. P. 724 – 732.
- Mugnano J. A., Costanzo J. P., Beesley S. G., Lee R. E. 1998. Evaluation of glycerol and dimethyl sulfoxide for the cryopreservation of spermatozoa from the wood frog (*Rana sylvatica*) // CryoLetters. Vol. 19. P. 249 – 254.
- Rugh R. 1934. Induced ovulation and artificial fertilization in the frog // The Biological Bulletin. Vol. 66. P. 22 – 29.
- Rugh R. 1962. Experimental Embryology, Techniques and Procedures. Minneapolis : Burgess Publishing Company. 526 p.
- Shishova N. R., Uteshev V. K., Sirota N. P., Kuznetsova E. A., Kaurova S. A., Browne R. K., Gakhova E. N. 2013. The quality and fertility of sperm collected from European common frog (*Rana temporaria*) carcasses refrigerated for up to 7 days // ZooBiology. Vol. 32, iss. 4. P. 400 – 406.
- Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., Young B. E., Rodrigues A. S., Fischman D. L., Waller R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide // Science. Vol. 306. P. 1783 – 1786.
- Uteshev V. K., Shishova N. V., Kaurova S. A., Manokhin A. A., Gakhova E. N. 2013. Collection and cryopreservation of hormonally induced sperm of pool frog (*Pelophylax lessonae*) // Russ. J. of Herpetology. Vol. 20, № 2. P. 105 – 109.
- Uteshev V. K., Gakhova E. N., Kramarova L. I., Shishova N. V., Kaurova S. A., Browne R. 2018. Refrigerated storage of European common frog *Rana temporaria* oocytes // Cryobiology. Vol. 83. P. 56 – 59.

Образец для цитирования:

Утешев В. К., Гахова Э. Н., Крамарова Л. И., Шишова Н. В., Каурова С. А. 2019. Новые подходы к получению репродуктивного материала амфибий для его использования в искусственном оплодотворении // Современная герпетология. Т. 19, вып. 1/2. С. 46 – 55. DOI: <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-46-55>

**New Approaches to Collecting Reproductive Material from Amphibians
for its Use in Artificial Fertilization**

Viktor K. Uteshev¹, <https://orcid.org/0000-0002-4357-7577>; uteshev-cryobank@mail.ru,
Edith N. Gakhova¹, **Ludmila I. Kramarova**²,
Natalia V. Shishova¹, and **Svetlana A. Kaurova**¹

¹ *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences
3 Institutskaya St., Pushchino, Moscow Region 142290, Russia*

² *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences
3 Institutskaya St., Pushchino, Moscow Region 142290, Russia*

Received 19 February 2019, revised 29 March 2019, accepted 4 April 2019

This paper describes new methods for obtaining viable ovulated oocytes and testicular sperm from the carcasses of females and males of the common frog *Rana temporaria*, stored at +4°C for 1–7 days. In addition, a new approach to delayed collection (1 to 30 days) of ovulated oocytes from live female frogs of the same species is given. Part of the frog testicular spermatozoa is shown to retain motility (21.0±1.5%) and fertilizing ability (13.2±1.9%) even after 6 days of storage at +4°C in the carcasses of males. Ovulated oocytes stored in female frog carcasses at 4°C for eight days retained the ability for fertilization (39.2±4.2%) and subsequent development until hatching (16.0±6.2%). Our results also indicate the possibility of delayed (up to 30 days) *in vivo* obtaining oocytes capable to fertilization (46.4±3.0%) and further development until hatching (49.2±7.7%). The results of this paper are a further step in the development of modern reproductive technologies.

Key words: common frog, *Rana temporaria*, oocytes, spermatozooids, reproductive technologies, cryopreservation.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-46-55>

Acknowledgements: This work was supported by the Experimental Genetic Cryobank of the Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region.

REFERENCES

Dabagyan N. V., Sleptsova L. A. Common frog *Rana temporaria* L. In: E. A. Astaurov and T. A. Detlaf, eds. *Objects for Developmental Biology*. Moscow, Nauka Publ., 1975, pp. 422–462 (in Russian).

Kaurova S. A., Chekurova N. R., Melnikova E. V., Uteshev V. K., Gakhova E. N. Cryopreservation of frog *Rana temporaria* sperm without loss of fertilizing capacity. In: *Genetic Resource Conservation: Proc. of XIV Working Meeting*. Pushchino, Institut biofiziki kletki RAN Publ., 1996, pp. 106–108 (in Russian).

Kaurova S. A., Uteshev V. K., Gakhova E. N. Cryopreservation of testicular sperm of common toad *Bufo bufo*. *Biophysics of living cells. Genetic Resource Conservation*, 2008, vol. 9, pp. 62 (in Russian).

Ananjeva N. B., Uteshev V. K., Orlov N. L., Ryabov S. A., Gakhova E. N., Kaurova S. A., Kramarova L. I., Shishova N. V., Browne R. K. Comparison of the modern reproductive technologies for amphibians and reptiles. *Russian J. of Herpetology*, 2017, vol. 24, no. 4, pp. 1–16.

Blaustein A. R., Kiesecker J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*, 2002, vol. 5, pp. 597–608.

Browne R. K., Clulow J., Mahony M., Clark A. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm. *Cryobiology*, 1998, vol. 37, iss. 4, pp. 339–345.

Browne R. K., Clulow J., Mahony M. Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes. *Reproduction*, 2001, vol. 121, no. 1, pp. 167–173.

Browne R. K., Clulow J., Mahony M. The short-term storage and cryopreservation of spermatozoa from hylid and myobatrachid frogs. *CryoLetters*, 2002, vol. 23, no. 2, pp. 129–136.

Clulow J., Clulow S. Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles: bringing the ARTs up to Speed. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016, vol. 28, no. 8, pp. 1116–1132.

Kouba A., Vance C., Calatayud N., Rowilson T., Langhorne C., Willard S. Assisted Reproduction Technologies (ART) for Amphibians. In: V. A. Poole, S. Grow, eds. *Amphibian Husbandry Resource Guide*. Maryland, Silver Spring, 2012, pp. 60–118.

Kouba A. J., Vance C. K. Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian

conservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 2013, vol. 21, no. 6, pp. 719–737.

Langhorne C. J., Calatayud N. E., Kouba A. J., Feugang J. M., Vance C. K., Willard S. T. Cryoconservation: Successful sperm cryopreservation and developmental outcomes using endangered North American amphibians. *Cryobiology*, 2013, vol. 67, no. 3, pp. 405–409.

Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A. Optimization of the cryopreservation of African clawed frog (*Xenopus laevis*) sperm. *Theriogenology*, 2009, vol. 72, iss. 9, pp. 1221–1228.

Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R. A. Motility and cryopreservation of spermatozoa of European common frog, *Rana temporaria*. *Theriogenology*, 2010, vol. 74, iss. 5, pp. 724–732.

Mugnano J. A., Costanzo J. P., Beesley S. G., Lee R. E. Evaluation of glycerol and dimethyl sulfoxide for the cryopreservation of spermatozoa from the wood frog (*Rana sylvatica*). *CryoLetters*, 1998, vol. 19, pp. 249–254.

Rugh R. Induced ovulation and artificial fertilization in the frog. *The Biological Bulletin*, 1934, vol. 66, pp. 22–29.

Rugh R. *Experimental Embryology, Techniques and Procedures*. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1962. 526 p.

Shishova N. R., Uteshev V. K., Sirota N. P., Kuznetsova E. A., Kaurova S. A., Browne R. K., Gakhova E. N. The quality and fertility of sperm collected from European common frog (*Rana temporaria*) carcasses refrigerated for up to 7 days. *ZooBiology*, 2013, vol. 32, iss. 4, pp. 400–406.

Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., Young B. E., Rodrigues A. S., Fischman D. L., Waller R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 2004, vol. 306, pp. 1783–1786.

Uteshev V. K., Shishova N. V., Kaurova S. A., Manokhin A. A., Gakhova E. N. Collection and cryopreservation of hormonally induced sperm of pool frog (*Pelophylax lessonae*). *Russian J. of Herpetology*, 2013, vol. 20, no. 2, pp. 105–109.

Uteshev V. K., Gakhova E. N., Kramarova L. I., Shishova N. V., Kaurova S. A., Browne R. Refrigerated storage of European common frog *Rana temporaria* oocytes. *Cryobiology*, 2018, vol. 83, pp. 56–59.

Cite this article as:

Uteshev V. K., Gakhova E. N., Kramarova L. I., Shishova N. V., Kaurova S. A. New Approaches to Collecting Reproductive Material from Amphibians for its Use in Artificial Fertilization. *Current Studies in Herpetology*, 2019, vol. 19, iss. 1–2, pp. 46–55 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-46-55>
