

УДК 581.351

## СРАВНЕНИЕ КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ТЕСТИКУЛЯРНЫХ И УРИНАЛЬНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЖАБЫ *Bufo bufo* (Amphibia, Anura, Bufonidae) В ПРОЦЕССЕ МЕДЛЕННОГО ЗАМОРАЖИВАВАНИЯ

© 2023 г. Н. В. Шишова<sup>а</sup>, \*, С. А. Каурова<sup>а</sup>, В. К. Утешев<sup>а</sup>, Э. Н. Гахова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук Пушчинского научного центра биологических исследований Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., Россия

\*e-mail: cryopreservation@list.ru

Поступила в редакцию 03.10.2022 г.

После доработки 30.11.2022 г.

Принята к публикации 05.12.2022 г.

Проведено сравнительное исследование морфофункциональных показателей тестикулярных (неактивированных) и уринальных (активированных) сперматозоидов обыкновенной жабы *Bufo bufo* (L., 1758) до и после криоконсервации. Криоконсервацию осуществляли медленным способом. В качестве криопротекторов использовали 10%-ную сахарозу и 12%-ный диметилформаид. Показано, что пул тестикулярных сперматозоидов содержит значительно больше клеток с аномальной морфологией и до, и после криоконсервации. Осмотичность базовой среды для криозащитного раствора (раствор Рингера для амфибий – 230 мОсм или уринальная плазма – 45 мОсм) оказывала незначительное влияние на выживаемость тестикулярных и уринальных сперматозоидов в процессе криоконсервации. Сравнение морфофункциональных характеристик сперматозоидов до и после замораживания–оттаивания свидетельствует, что криорезистентность тестикулярных и активированных уринальных сперматозоидов различается слабо.

**Ключевые слова:** сперматозоиды, криоконсервация, бесхвостые амфибии, *Bufo bufo*

**DOI:** 10.31857/S0320965223040204, **EDN:** SEFTEQ

Амфибии – неотъемлемая часть биоценозов пресноводных водоемов России. В течение нескольких последних десятилетий и в России, и во всем мире наблюдается беспрецедентно быстрое и глобальное сокращение численности и биоразнообразия амфибий, превышающей скорость сокращения биоразнообразия прочих таксонов позвоночных<sup>1</sup> (Beebe and Griffiths, 2005). Среди причин вымирания называют сокращение пригодных для амфибий биотопов и фрагментацию ареалов, происходящую вследствие антропогенных воздействий, изменение климата, загрязнение внутренних водоемов тяжелыми металлами, эпидемии и другие факторы (Beebe, Griffiths, 2005; Gardner et al., 2009; Юшкова и др., 2018). Перечисленные негативные процессы делают крайне актуальной разработку методов сохранения биоразнообразия амфибий, в том числе и создание генетических криобанков. Хранящаяся в

криобанках гермоплазма редких и исчезающих видов амфибий может служить гарантом сохранения генофонда и вспомогательным инструментом для поддержания биоразнообразия в искусственно разводимых популяциях (Clulow J., Clulow S., 2016; Uteshev et al., 2019). Разработка методов криоконсервации спермы бесхвостых амфибий началась в 90-х годах прошлого столетия, генетический материал для криоконсервации в этих исследованиях получали из семенников декапитированных самцов (Browne et al., 1998). Такой способ взятия биоматериала крайне нежелателен при работе с малочисленными и редкими видами. Альтернативный вариант – прижизненное получение уринальной спермы амфибий методом гормонально индуцированной спермации (Guy et al., 2020). В связи с этим, вслед за первыми успехами по криоконсервации сперматозоидов, полученных из семенников, появились исследования, посвященные криоконсервации уринальной спермы амфибий (Hopkins, Herr, 2008; Shishova et al., 2011).

Однако, применение разработанных методов замораживания тестикулярных сперматозоидов настоящих жаб (Bufonidae) для криоконсервации

**Сокращения:** ДМФА – диметилформаид; РА – раствор Рингера для амфибий; УП – уринальная плазма.

<sup>1</sup> IUCN. 2021. The IUCN Red List of threatened species. Version 2020-3. Available at <https://www.iucnredlist.org>.

уринальной спермы показало низкую эффективность (Langhorne et al., 2013; Poo, Hinkson, 2019; Burger et al., 2022). Даже в наиболее удачных вариантах оплодотворяющая способность криоконсервированной уринальной спермы жаб не превышает 15%, что недостаточно для применения метода в практике искусственного разведения этих животных. Исследователи связывают такой результат с различием физиологического состояния сперматозоидов в семенниках и уринальной сперме. В семенниках сперма неподвижна, в то время как в момент спермиации происходит резкая смена физико-химических параметров окружающей среды, что инициирует ряд физиологических и биохимических событий, приводящих к активации подвижности. Предполагается, что данные физиологические и биохимические изменения могут снижать толерантность сперматозоидов жаб к замораживанию и быть причиной низкого качества криоконсервированной уринальной спермы (Kouba et al., 2003; Kouba, Vance, 2009). Помимо этого, в процессе криоконсервации уринальной спермы клетки подвергаются двойному циклу активации-реактивации, что также может негативно влиять на физиологическое состояние сперматозоидов (Kouba, Vance, 2009).

Сравнительный анализ жизнеспособности и морфофизиологических характеристик тестикулярных и уринальных сперматозоидов проводили до и после криоконсервации. Самцов обыкновенной (серой) жабы отлавливали во время естественного нереста на юге Московской обл. Уринальную сперму собирали через 3–5 ч после введения гонадотропного гормона (подкожно 25 мкг “Сурфагон”, Россия). Тестикулярную сперму получали мацерированием изолированных семенников, к мацерату добавляли либо раствор “Рингер для амфибий” (РА: 0.113 М NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM KCl, 3.6 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH – 7.4; осмоляльность 230 мОсм), либо УП в объеме 0.2–0.4 мл.

УП получали центрифугированием уринальной спермы (5 мин, 4000g), супернатант отбирали и использовали для приготовления криозащитных растворов или суспендирования тестикулярных сперматозоидов. Осмоляльность заготовленного пула УП была 45 мОсм. Осмоляльность измеряли на криоосмометре KNAUER.

Криозащитные среды готовили либо на основе РА, либо УП. В качестве криопротекторов использовали ДМФА и сахарозу, конечная концентрация в криосуспензии достигала 12 и 10% соответственно. В криозащитный раствор на основе РА дополнительно добавляли 0.5% бычьего сывороточного альбумина.

Для приготовления криосуспензии к суспензии тестикулярных сперматозоидов либо к уринальной сперме добавляли равный объем криозащитного раствора с удвоенной концентрацией

криопротекторов при температуре 0°C. Криосуспензию фасовали в соломинки по 0.2 мл и замораживали в парах азота (–45°C) в течение 10 мин. Средняя скорость охлаждения была ~4–5°C/мин. Затем соломинки погружали в жидкий азот. Образцы спермы оттаивали на водяной бане (38°C) в течение 9 с до момента таяния льда. Образец извлекали из соломинки, помещали на охлажденное (0°C) часовое стекло и добавляли 5 объемов активирующего раствора (1 часть РА, 9 частей дистиллированной воды) в несколько этапов.

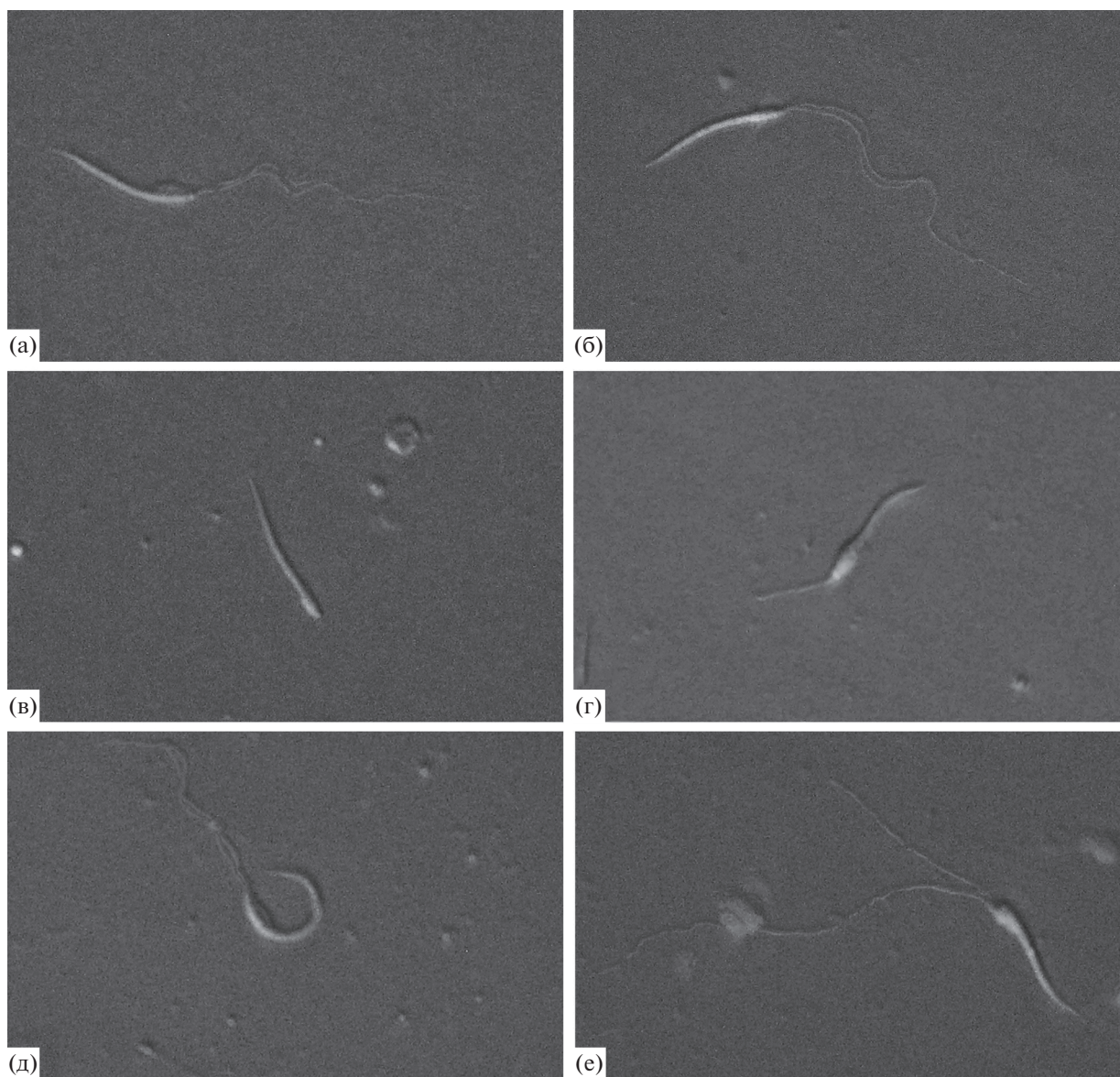
Жизнеспособность сперматозоидов оценивали по подвижности, целостности клеточных мембран и морфологическому состоянию. Целостность клеточных мембран определяли методом двойного флуоресцентного окрашивания с помощью набора Live/Dead Viability Kit (7007, Molecular Probes), по стандартной методике (Shishova et al., 2011). Подвижность оценивали визуально с помощью световой микроскопии (Axioscop 40FL, Carl-Zeiss; увеличение ×200). Морфологию исследовали под увеличением ×400. При анализе морфологии обращали внимание на наличие атипичных сперматозоидов (рис. 1).

Результаты представляли в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ). Различия между группами оценивали по критерию Стьюдента (непарный анализ) в составе пакета статистических программ Prizm 5.0 для Windows (GraphPadSoftware, США). Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

В первом эксперименте сравнивали морфофункциональные показатели нативных (незамороженных) образцов спермы. Уринальные сперматозоиды находились в естественной среде – УП. Тестикулярные образцы исследовали в виде суспензий, используя две среды суспендирования. В первом случае средой суспендирования служил РА, раствор, приближенный по составу солей и осмотичности к плазме крови и межклеточным жидкостям амфибий (~230 мОсм), во втором – УП (~45 мОсм), что позволяло сравнить физиологию тестикулярных и уринальных сперматозоидов в идентичной среде.

Полученные результаты показали, что и подвижность, и целостность клеточных мембран сперматозоидов в уринальной сперме значительно превышали подвижность тестикулярных сперматозоидов, независимо от среды суспендирования последних (табл. 1). Не отмечено различий в целостности клеточных мембран тестикулярных сперматозоидов, суспендированных в различных средах, в то же время подвижность тестикулярных образцов в УП была ожидаемо выше, чем в РА.

Анализ морфологических характеристик тестикулярного пула сперматозоидов выявил значительное количество клеток с дефектами независимо от среды суспендирования, общее количество ано-



**Рис. 1.** Сперматозоиды обыкновенной жабы (*Bufo bufo*): а, б – морфологически нормальные, в – лишенные хвоста, г – с обломанным хвостом, д – свернутые в кольцо, е – с продольным разрывом ундулирующей мембраны.

мальных сперматозоидов достигало 27–47%. В уринальной сперме количество аномальных сперматозоидов не превышало 2.0–2.5%.

В следующем эксперименте исследовали криорезистентность сперматозоидов серой жабы, для чего проводили криоконсервацию тестикулярных и уринальных сперматозоидов. Для криоконсервации использовали два криозащитных раствора, идентичных по составу и концентрации криопротекторов (сахароза и ДМФА), но различающихся по составу и осмоляльности базовых сред (РА и УП). РА по осмоляльности соответствует естественному окружению тестикулярных сперматозоидов в организме животного, УП – более физиологична для уринальных образцов.

Такой подход позволяет сравнить криорезистентность образцов, хотя оптимальная базовая среда для криозащиты тестикулярных и уринальных сперматозоидов может различаться.

Подвижность замороженно-оттаянных уринальных сперматозоидов была достоверно выше по сравнению с тестикулярными (табл. 1). Однако, сопоставление подвижности до и после криоконсервации показало, что снижение этого параметра в процессе криоконсервации для тестикулярной спермы меньше, чем для уринальной. Показатели целостности клеточных мембран уринальных и тестикулярных сперматозоидов после криоконсервации не различались, также не выявлено достоверных различий в снижении это-

**Таблица 1.** Функциональные и морфологические показатели нативных и замороженно-оттаянных тестикулярных и уринальных сперматозоидов *Bufo bufo*, суспендированных и замороженных в растворе на основе РА или в УП

Морфофункциональные показатели, %	Образец, раствор суспендирования			
	Тестикулярные сп.		Уринальные сп.	
	РА	УП	РА	УП
Нативные образцы				
Подвижность	20.1 ± 3.4**	30.8 ± 5.8*. **	—	90.4 ± 2.4*
ЦКМ	91.3 ± 1.5	92.5 ± 1.3*	—	98.3 ± 0.3*
Бесхвостые сп.	20.4 ± 4.7	25.1 ± 5.8	—	0.3 ± 0.2
Сломанные хвосты	4.6 ± 4.1	8.9 ± 3.5*	—	1.2 ± 0.8*
ПРУМ	Нет	Нет	—	Нет
Кольца	2.7 ± 1.9**	12.6 ± 3.6*. **	—	0.6 ± 0.4*
Замороженно-оттаянные образцы				
Подвижность	17.3 ± 3.1*	15.2 ± 3.3*	26.5 ± 3.8*	30.3 ± 4.3*
ЦКМ	45.5 ± 2.2	46.7 ± 4.4	40.8 ± 4.1	38.3 ± 3.3
Бесхвостые сп.	48.3 ± 4.9*	48.3 ± 2.8*	10.8 ± 1.2*	11.6 ± 3.1*
Сломанные хвосты	23.3 ± 2.1	25.0 ± 3.7	5.2 ± 2.6	7.3 ± 3.2
ПРУМ	Нет	Нет*	0.7 ± 0.5*	3.5 ± 1.5*. **
Кольца	4.3 ± 1.3*	5.3 ± 1.3*	Нет*	0.3 ± 0.3*

Примечание. РА – раствор Рингера для амфибий; УП – уринальная плазма; сп – сперматозоиды, ЦКМ – целостность клеточной мембраны (определение методом окрашивания витальными красителями), ПРУМ – продольный разрыв ундулирующей мембраны (рис. 1ж). Даны средние и их ошибка при  $n = 10$ .

\* Достоверные различия в показателях разных образцов спермы (тестикулярной или уринальной), суспендированных в идентичной среде.

\*\* Достоверные различия в показателях идентичных образцов, суспендированных в разных средах.

го показателя в процессе криоконсервации, хотя наблюдалась тенденция более высокой сохранности мембран в тестикулярных образцах. Морфология уринальных сперматозоидов в процессе криоконсервации сохранялась лучше, чем тестикулярных (табл. 1). Все это свидетельствует, что криорезистентность уринальных сперматозоидов в целом сопоставима с тестикулярными.

Базовая среда криозащитного раствора оказала слабое влияние на выживаемость сперматозоидов в процессе криоконсервации. Анализ различных морфологических aberrаций показал, что в тестикулярной сперме достоверно выше количество бесхвостых сперматозоидов (рис. 1в), сперматозоидов с обломанным хвостом (рис. 1г) и сперматозоидов, свернутых в кольцо (рис. 1д). В то же время, повреждение сперматозоидов, которое назвали “продольным разрывом ундулирующей мембраны” (рис. 1ж), зафиксировано исключительно в замороженно-оттаянных образцах уринальной спермы. Причем, при криоконсервации в криопротектирующем растворе на основе УП количество таких сперматозоидов было достоверно выше, чем в образцах, криоконсервированных в криозащитном растворе на основе РА (табл. 1).

Можно предположить, что криорезистентность данной клеточной структуры снижается при пониженной осмоляльности раствора.

**Выводы.** Криорезистентность тестикулярных и уринальных сперматозоидов обыкновенной жабы приблизительно одинакова, следовательно, предположение, что активированная (уринальная) сперма хуже выдерживает криоконсервацию, не подтвердилось. При этом пул тестикулярных сперматозоидов имеет в своем составе значительное количество незрелых и дефектных клеток, т.е. качество замороженно-оттаянной тестикулярной спермы ниже, чем уринальной. Кроме того, показано, что осмоляльность базовой среды криозащитного раствора оказывает незначительное влияние на выживаемость сперматозоидов обыкновенной жабы в процессе криоконсервации.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного проекта № 122041100276-0.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Юшкова Е.А., Боднарь И.С., Шадрин Д.М. и др. 2018. Цитогенетические и молекулярно-генетические показатели в популяциях бесхвостых амфибий (*Rana arvalis* Nilsson) в условиях радиоактивного и химического загрязнения водной среды // Биология внутр. вод. № 3. С. 83.  
https://doi.org/10.1134/S0320965218030233
- Beebee T.J.C., Griffiths R.A. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? // Biol. Conserv. V. 125. P. 271.  
https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009
- Browne R.K., Clulow J., Mahony M., Clark A. 1998. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm // Cryobiology. V. 37. P. 339.  
https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2129
- Burger I.J., Lampert S.S., Kouba C.K. et al. 2022. Development of an amphibian sperm biobanking protocol for genetic management and population sustainability // Cons. Physiol. V. 10. Iss. 1. coac032.  
https://doi.org/10.1093/conphys/coac032
- 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 // Reprod. Fertil. Devel. V. 28. № 8. P. 1116.  
https://doi.org/10.1071/RD15466
- Gardner T.A., Barlow J., Chazdon R. et al. 2009. Prospects for tropical forest biodiversity in a human-modified world // Ecol. Lett. V. 12. P. 561.  
https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01294.x
- Guy E.L., Gillis A.B., Kouba A.J. et al. 2020. Sperm collection and cryopreservation for threatened newt species // Cryobiology. V. 94. P. 80.  
https://doi.org/10.1016/j
- Hopkins B.K., Herr C. 2008. Cryopreservation of frog (*Ranapipeus*) sperm cells collected by non-lethal methods // Reprod. Fertil. Devel. V. 20. № 1. P. 120.  
https://doi.org/10.1071/RDv20n1Ab78
- Kouba A.J., Vance C.K. 2009. Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation // Reprod. Fertil. Devel. V. 21. № 6. P. 719.  
https://doi.org/10.1071/RD09038
- Kouba A.J., Vance C.K., Frommeyer M.A., Roth T.L. 2003. Structural and functional aspects of *Bufo americanus* spermatozoa: Effects of inactivation and reactivation // J. Exp. Zool. V. 295. № 2. P. 172.  
https://doi.org/10.1002/jez.a.10192
- Langhorne C.J., Calatayud N.E., Kouba A.J. et al. 2013. Cryoconservation: successful sperm cryopreservation and developmental outcomes using endangered North American amphibians // Cryobiology. V. 67. № 3. P. 405.  
https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.09.032
- Poo S., Hinkson K.M. 2019. Applying cryopreservation to anuran conservation biology // Conserv. Sci. Pract. V. 1. e91.  
https://doi.org/10.1111/csp2.91
- Shishova N.V., Uteshev V.K., Kaurova S.A. et al. 2011. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species // Theriogenol. V. 75. № 2. P. 220.  
https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.008
- Uteshev V.K., Gakhova E.N., Kramarova L.I. et al. 2019. Cryobanking of amphibian genetic resources in Russia: past and future // Russ. J. Herpetol. V. 26. № 6. P. 319.  
https://doi.org/10.30906/1026-2296-2019-26-6-319-324

## Comparison of Cryoresistance of Testicular and Urinal Spermatozoa of the Toad *Bufo bufo* (Amphibia, Anura, Bufonidae) during Slow Freezing

N. V. Shishova<sup>1</sup>\*, S. A. Kaurova<sup>1</sup>, V. K. Uteshev<sup>1</sup>, and E. N. Gakhova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia

\*e-mail: cryopreservation@list.ru

A comparative study of the morphofunctional parameters of testicular (non-activated) and urinal (activated) spermatozoa of the common toad *Bufo bufo* (L., 1758) before and after cryopreservation was carried out. Cryopreservation was performed by a slow method. Sucrose (10%) and dimethylformamide (12%) were used as cryoprotectants. It was shown that the pool of testicular spermatozoa contains significantly more cells with abnormal morphology both before and after cryopreservation. The osmoticity of the base medium for the cryoprotective solution (Ringer's solution for amphibians – 230 mOsm or urinal plasma – 45 mOsm) had little effect on the survival of testicular and urinal spermatozoa during cryopreservation. Comparison of the morphological and functional characteristics of spermatozoa before and after freezing-thawing indicates that the cryoresistances of testicular and urinal spermatozoa differ slightly.

**Keywords:** cryopreservation, sperm, anurans, *Bufo bufo*