

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА ХРОМОСОМНЫЙ АППАРАТ ООЦИТОВ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ

© 2023 г. И. О. Боголюбова^{1, 2}, Д. С. Боголюбов^{1, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: dbogol@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 19.05.2023 г.

Принята к публикации 25.05.2023 г.

Поздние вителлогенные ооциты травяной лягушки *Rana temporaria* представляют собой перспективную модель для изучения поведения мейотических хромосом, поскольку на стадии диплотены происходит объединение хромосом в кариосферу, которая у *R. temporaria*, как считают, имеет экстрахромосомную капсулу, — в отличие от *Xenopus laevis*, классического модельного объекта клеточной биологии и биологии развития. Однако по сравнению с *Xenopus* строгая сезонность размножения *R. temporaria* существенно ограничивает возможность использования ее ооцитов в качестве экспериментальной модели. Благодаря адаптации классических протоколов гормональной стимуляции бесхвостых амфибий, включая *Xenopus*, нам удалось получить ооциты *R. temporaria* с полностью развитой кариосферой вне сезона размножения (декабрь–январь). Выраженные изменения хромосомного аппарата ооцитов мы наблюдали при двукратном введении хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в дозе 500 МЕ. В этом случае хромосомы претерпевают выраженное уплотнение и агрегацию, что приводит к формированию характерного хромосомного “клубка” (кариосферы), морфологические признаки которого соответствуют таковым в ооцитах *R. temporaria* в начале естественного сезона размножения. Предлагаемый нами протокол использования ХГЧ для внесезонной стимуляции оогенеза у *R. temporaria* в дальнейшем может быть уточнен для получения более стабильных результатов и повышения качества ооцитов.

Ключевые слова: оогенез, ядро ооцита, зародышевый пузырек, хромосомный аппарат, кариосфера, хорионический гонадотропин человека, *Rana temporaria*

DOI: 10.31857/S0869813923070026, **EDN:** XUYXZF

ВВЕДЕНИЕ

Травяная лягушка *Rana temporaria* является весьма популярным объектом биологических исследований, на котором получен целый пласт данных в области физиологии, биологии развития, экологии. Несмотря на длительную историю использования этого животного в научных целях, изучение различных аспектов биологии *R. temporaria* в полной мере сохраняет свою актуальность и сегодня. Так,

Используемые сокращения: ЛГ-РГ — рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (люлиберин), ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; GV — зародышевый пузырек (ядро ооцита на стадии диплотены мейоза, germinal vesicle).

травяных лягушек продолжают активно использовать как объект экологических [1, 2] и физиологических исследований [3]. Однако, не умаляя значимости этого вида бесхвостых амфибий для решения задач экологического мониторинга и физиологии, следует отметить, что *R. temporaria* является также и классическим объектом биологии развития [4]. При этом ооциты *R. temporaria*, а точнее, их ядра на стадии диплотены мейоза (зародышевые пузырьки, GV) представляют собой уникальную биологическую систему, строение которой по ряду признаков при наличии общих черт отличается от GV другого модельного объекта – шпорцевой лягушки *Xenopus*.

В GV поздних вителлогенных ооцитов *R. temporaria* происходит формирование кариосферы – особой мейоз-специфической структуры, которая является результатом агрегации конденсированных и транскрипционно инактивированных хромосом (бивалентов) в ограниченной области GV [5]. Кариосфера описана у представителей 12 классов, принадлежащих к 4 типам беспозвоночных и позвоночных животных [6]. Она может иметь или не иметь специфической капсулы (karyosphere capsule), однако вариант кариосферы, в котором хромосомный материал окружен внешней экстрахромосомной капсулой, традиционно считают характерным для GV *R. temporaria* по данным световой [7, 8] и электронной микроскопии [9].

У *X. laevis*, в отличие от *R. temporaria*, хромосомы вителлогенных ооцитов не формируют компактного “клубка” (chromosomal knot), хотя и собираются в ограниченной области GV. По-видимому, они заключены только в конгломерат амплифицированных ядрышек (nucleolar cloud), но не ассоциированы с экстрахромосомным фибриллярным материалом [10], известным как “волоконистый компонент капсулы кариосферы” [11]. Вопрос о природе и функциях капсулы кариосферы, по существу, остается открытым, а ее существование у *R. temporaria* как стабильно-структурного скаффолда мейотических хромосом в последнее время подвергается сомнению [12].

Дальнейшее изучение GV поздних ооцитов *R. temporaria* с использованием современных методических возможностей, несомненно, позволит расширить наши представления об универсальных и видоспецифических закономерностях организации мейотических хромосом, в частности о взаимодействии хроматина и экстрахромосомных компартментов в процессе роста и созревания женских половых клеток.

Вместе с тем использование травяной лягушки в качестве модельного объекта для изучения ядерной компартиментализации вителлогенных ооцитов, то есть получение GV с хромосомным аппаратом нужных стадий развития кариосферы, без применения гормональной стимуляции затруднено ограниченным по времени периодом размножения этого вида.

Считают, что в осенне-зимний период в GV травяной лягушки начинает формироваться капсула кариосферы, которая достигает, как и сама кариосфера, своего максимального развития поздней весной – перед овуляцией [8, 9]. Иными словами, ооциты с полностью сформированной кариосферой можно получить только в течение нескольких недель (на севере Ленинградской области и в Санкт-Петербурге обычно в апреле–начале мая в зависимости от погодных условий). Подобная ситуация существенно ограничивает возможности экспериментальной работы с поздними вителлогенными ооцитами и делает травяную лягушку мало подходящей для роли лабораторного объекта.

Эффективным способом решения этой проблемы является искусственная стимуляция оогенеза с помощью введения гонадотропных гормонов. Первые протоколы стимуляции овуляции у амфибий разных видов были опубликованы уже в классических руководствах по биологии развития [4]. Однако использование синтетических аналогов гонадотропных гормонов или рилизинг-факторов в этих исходных протоколах предусмотрено только для тепловодных бесхвостых амфибий, в первую очередь африканской шпорцевой лягушки *Xenopus*, для которой протоколы

гормональной стимуляции оогенеза давно апробированы и стандартизированы [13]. К настоящему времени опубликовано большое число работ по гормональной стимуляции для получения половых продуктов у амфибий тропических и умеренных широт [14–16], однако нам не удалось обнаружить современных работ, в которых бы была использована гормональная стимуляция именно самок *R. temporaria*.

Для стимуляции самок *R. temporaria* исходные протоколы предусматривали введение животным гомогенизированных гипофизов особей того же вида [4]. В настоящее время, при наличии доступных синтетических гормональных препаратов, подобный подход неприемлем по этическим соображениям, поскольку предполагает умерщвление большого количества особей. Кроме того, как классические, так и современные протоколы ориентированы на получение зрелых яйцеклеток, завершивших мейотическое деление и готовых к оплодотворению, а также препаратов хромосомом — ламповых щеток из более молодых ооцитов. Данные о сроках формирования кариосферы в ооцитах *R. temporaria* после начала гормональной стимуляции и в целом о влиянии гормональной стимуляции на структурную организацию GV в литературе отсутствуют.

В связи с этим целью настоящей работы стала адаптация используемого для *Xenopus* протокола гормональной стимуляции овуляции с помощью синтетических аналогов хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) для получения вне сезона естественного размножения *R. temporaria* ооцитов, GV которых содержат позднюю кариосферу, а также анализ влияния экзогенного ХГЧ на состояние хромосомного аппарата ооцитов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Половозрелых самок травяной лягушки *Rana temporaria* L. отбирали из естественной среды обитания в окрестностях Санкт-Петербурга в октябре, до начала периода гибернации, и содержали в холодильнике при 4°C. Дважды в неделю лягушек промывали холодной водой.

Для стимуляции созревания ооцитов использовали хорионический гонадотропин человека (Хорулон, Интервет), который растворяли в 1 мл 0.65%-ного раствора NaCl и однократно или двукратно вводили в боковой лимфатический подкожный мешок. В случае двукратного введения гормона интервал между инъекциями составлял 24 ч. Контрольным животным вводили 0.65%-ный раствор NaCl в том же объеме и с той же периодичностью. После начала эксперимента лягушек содержали в отдельных аквариумах при комнатной температуре в условиях естественного освещения. Характерным внешним признаком животных, получавших гормон, вне зависимости от схемы стимуляции являлось изменение окраски тела, которое наблюдалось уже через 24 ч после первой инъекции и усиливалось в случае повторного введения гормона (рис. 1).

Животных выводили из эксперимента через 48 ч после первой или второй инъекции путем декапитации с немедленным последующим разрушением спинного мозга с обязательным контролем отсутствия спинномозговых рефлексов.

Яичники и ооциты изолировали в среде OR2 [17], содержащей 82.5 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.0 мМ CaCl₂, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ Na₂HPO₄, 5.0 мМ HEPES, pH ~ 7.8. Ядра ооцитов (GV) изолировали в растворе “5 : 1 + PO₄” [18], содержащем 83.0 мМ KCl, 17.0 мМ NaCl, 6.5 мМ Na₂HPO₄, 3.5 мМ KH₂PO₄, 1.0 мМ MgCl₂, 1.0 мМ DTT, pH 7.2. Визуализацию хроматина (кариосферы) проводили на свежеприготовленных нефиксированных препаратах изолированных GV в растворе “5 : 1 + PO₄” с добавлением DAPI в концентрации 0.5–1.0 мкг/мл с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss), оснащенного цифровой фотокамерой Axio-Cam ICm1. Для каждого животного было проанализировано не менее 10 ооцитов.

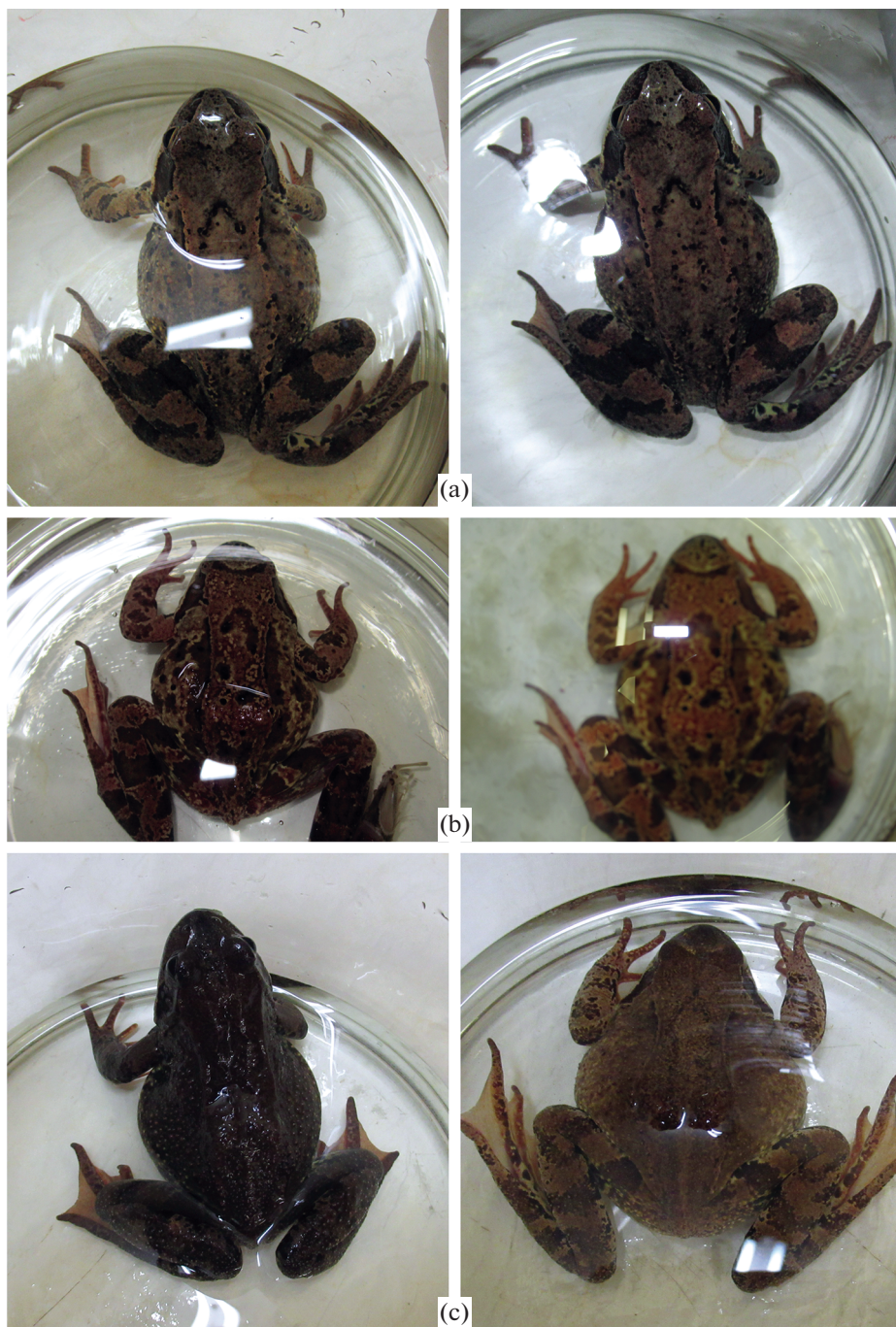


Рис. 1. Изменение окраски тела *Rana temporaria* после введения ХГЧ. Слева: лягушки до начала эксперимента, справа: перед выведением из эксперимента. (а) – контрольная особь, до и после двукратного введения 0.65%-ного NaCl; (б) – особь до и после двукратного введения 200 МЕ ХГЧ; (с) – особь до и после двукратного введения 500 МЕ ХГЧ.

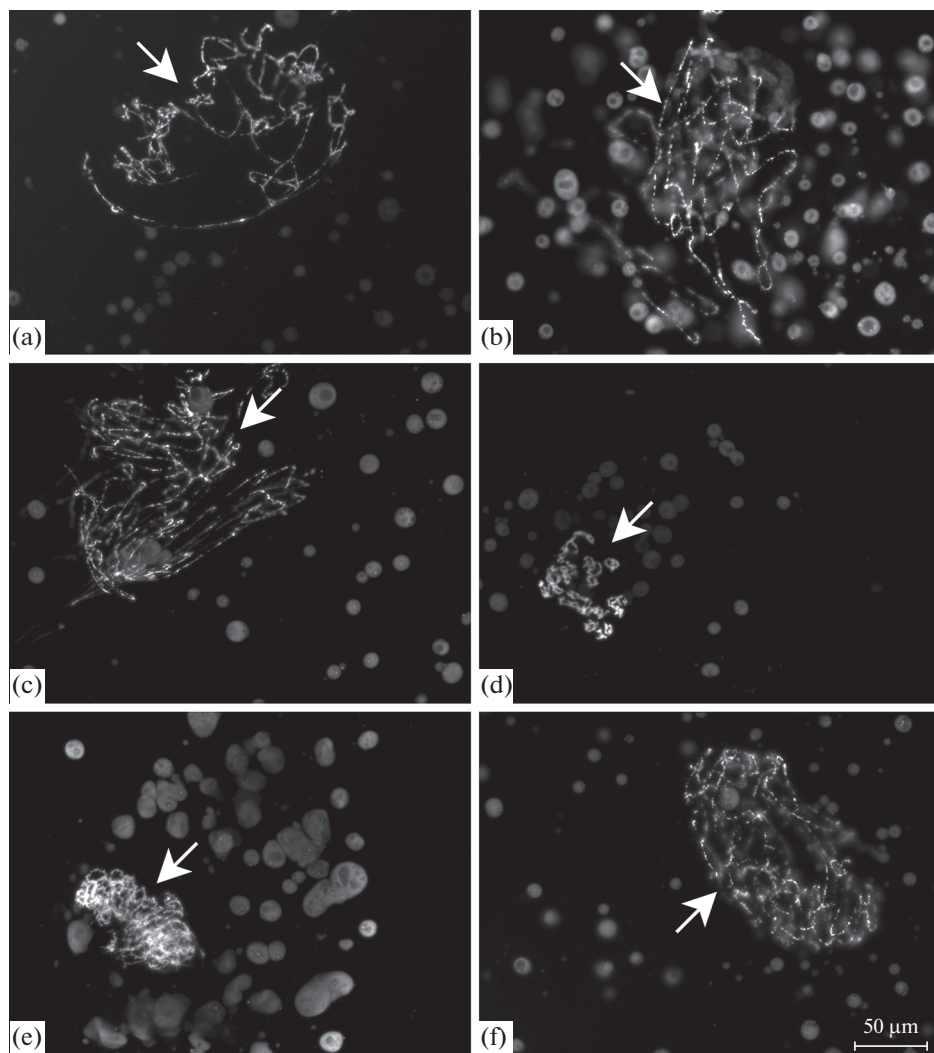


Рис. 2. Свежеприготовленные нефиксированные препараты хромосом ооцитов *Rana temporaria*. (a) – после двукратного введения лягушкам 0.65%-ного NaCl; (b) – после однократного введения 400 МЕ ХГЧ; (c) – после двукратного введения 200 МЕ ХГЧ; (d–f) – после двукратного введения 500 МЕ ХГЧ. Кариосфера (клубок хромосом среди амплифицированных ядрышек) указана стрелками. Окраска DAPI.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика изменения хромосомного аппарата вителлогенных ооцитов *R. temporaria*, тесно связанная с сезонностью размножения этого вида бесхвостых амфибий [7], подробно описана и проиллюстрирована в классической работе Дюрьи [19]. Для ооцитов, извлеченных у самок осенью, характерны начальные этапы формирования кариосферы, когда хромосомы уже демонстрируют отчетливую тенденцию к агрегации и локализируются в относительно ограниченной области GV, однако процессы их конденсации еще слабо выражены и кариосфера представляет собой весьма рыхлый клубок [20]. Подобную картину мы наблюдали в ооцитах контрольных животных (рис. 2a), где присутствовали рыхло расположенные хромосомы с

четко распознаваемыми бивалентами, на которых хорошо выражены хромомеры. Такие же морфологические признаки характеризовали состояние хромосомного аппарата (кариосферы) в *GV R. temporaria* как при однократном введении ХГЧ в дозе 400 МЕ (рис. 2b), так и при двукратном введении ХГЧ в дозе 200 МЕ (рис. 2c). Очевидно, что использование ХГЧ в данной дозировке является недостаточным для стимуляции созревания ооцитов, хотя и приводит к изменению окраски тела животных (рис. 1b).

Иная картина была характерна для ооцитов при двукратном введении ХГЧ в дозе 500 МЕ. В этом случае наблюдали выраженное уплотнение и агрегацию хромосом (рис. 2d), что приводило к формированию компактного хромосомного “клубка”, характерного для стадии VI по классификации Дюрьи [19]; такое состояние кариосферы характеризует *GV R. temporaria* в начале сезона их размножения. На данной стадии развития вителлогенных ооцитов уже не выявляются хромомеры, биваленты представлены конденсированными “пост-ламповыми щетками” (post-lampbrushes), утратившими латеральные петли. У некоторых особей в этой экспериментальной группе наблюдали еще более выраженную агрегацию хромосом, нежели описано Дюрьи для стадии VI (рис. 2e), когда становится сложно визуализировать отдельные биваленты в составе агрегата хромосом. Кстати, в исторической работе Вагнера [7] такая картина представлена, в то время как Дюрьи [19] считал, что стадия VI завершает период роста ооцита *R. temporaria*.

В то же время у отдельных особей *R. temporaria*, стимуляцию которых проводили с использованием той же схемы (двукратное введение 500 МЕ ХГЧ), процессы агрегации хромосом были выражены в меньшей степени и картин распределения хромосом, характерных для стадии VI по Дюрьи, не наблюдали (рис. 2f). В этом случае во всех ооцитах хромомеры бивалентов были хорошо различимы, некоторое утолщение хромосом наблюдали только в 30% *GV*. В 70% ооцитов, полученных от таких особей, состояние хромосом соответствовало стадии IV по Дюрьи, 30% – стадии V. Однако даже в этих случаях для всех проанализированных ооцитов было характерно более упорядоченное и компактное расположение хромосом, нежели наблюдаемое у контрольных особей или при использовании неэффективных схем стимуляции. По-видимому, такие картины можно расценивать как первые признаки процессов агрегации и компактизации хромосом, что в дальнейшем приведет к формированию компактной кариосферы. В целом картину, наблюдаемую в ядрах ооцитов отдельных особей *R. temporaria* при подобной схеме стимуляции и не укладывающуюся в классическую классификацию Дюрьи, можно охарактеризовать как “клубок тонких нитей”.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование гонадотропных гормонов для стимуляции созревания яйцеклеток у бесхвостых амфибий имеет уже почти столетнюю историю. В 1933 г. Беллерби [21] впервые сообщил о том, что инъекция кислого или щелочного экстракта передней доли гипофиза быка самкам лягушки *X. laevis* вызывает откладку яйцеклеток через 18 ч. В последующих исследованиях этот эффект гонадотропинов млекопитающих на репродуктивные функции бесхвостых амфибий был подтвержден, а также были дополнительно охарактеризованы видоспецифические особенности гонадотропинов в различных парах донор–реципиент [22]. В настоящее время для решения прикладных задач, связанных с воспроизводством редких видов амфибий, используются синтетические аналоги рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона и ХГЧ, однако эффективные дозы гормональных препаратов, как правило, подбираются методом проб и ошибок и могут существенно различаться у разных видов [23].

Для стимуляции оогенеза *R. temporaria* мы использовали ХГЧ. Следует отметить, что в настоящее время более широкое использование для стимуляции размножения амфибий получил сурфагон, который обладает рядом преимуществ (отсутствие выраженной видоспецифичности, безопасность, невысокая стоимость), однако синтетические гонадотропины также применяются в протоколах гормональной стимуляции амфибий [16], по некоторым данным преимущественно для лабораторных исследований [23]. Нам не удалось найти в литературе протоколов стимуляции *R. temporaria* с использованием синтетических препаратов ХГЧ, поэтому мы взяли за основу классический протокол, разработанный для *Xenopus* [4, 24], который предусматривает однократное введение ХГЧ в дозе от 100 до 600 МЕ в зависимости от размера лягушки. После однократного введения 400 МЕ ХГЧ мы не наблюдали изменений состояния хромосом ооцитов по сравнению с контрольными животными, то есть стандартная схема стимуляции *Xenopus* оказалась неэффективной в случае *R. temporaria*. Наиболее вероятно, что это обусловлено эколого-физиологическими особенностями травяной лягушки, в первую очередь четко выраженной сезонностью размножения и наличием длительного периода гибернации.

В литературе имеются данные о том, что для стимуляции *Xenopus* в июне–июле, когда шпорцевые лягушки в природе не размножаются, требуются большие дозы гормонов [24]. Кроме того, значимым фактором, определяющим особенности искусственной стимуляции оогенеза *R. temporaria*, могут быть температурные условия содержания этих амфибий. До начала эксперимента лягушек содержали при 4°C, после введения ХГЧ – при комнатной температуре, тогда как рекомендуемая температура воды для *Xenopus* составляет 22–25°C [13]. Можно полагать, что эти факторы в определенной степени определяют необходимость увеличения дозы ХГЧ при стимуляции *R. temporaria*.

Необходимость добавления в схему стимуляции *R. temporaria* повторного введения ХГЧ была в определенной степени ожидаемой, учитывая перечисленные выше эколого-физиологические особенности травяной лягушки и проведение эксперимента вне сезона размножения. В связи с этим следует также отметить, что ХГЧ довольно часто не вызывает эффекта у амфибий [25, 26] и требует дополнительных (праймирующих) инъекций гормональных препаратов, как показано, например, для самок вайомингской жабы *Anaxyrus baxteri* – редкого вида амфибий, обитающего лишь в неволе и в пределах одного национального парка США. Эти животные не реагировали на ХГЧ без предварительного введения праймирующей смеси ЛГ-РГ и ХГЧ [27].

Выраженные эффекты ХГЧ на состояние хромосомного аппарата ооцитов *R. temporaria* мы наблюдали при двукратном введении ХГЧ в дозе 500 МЕ. Для оценки степени агрегации хромосом мы использовали такие критерии, как толщина хромосом, наличие видимых хромомеров, наличие идентифицируемых бивалентов, а также компактность локализации хромосом. При использовании данной схемы стимуляции наблюдали уменьшение площади, занимаемой хромосомами, утолщение хромосом и исчезновение хромомеров. В некоторых случаях было невозможно визуализировать отдельные биваленты, которые агрегировали в плотный клубок. Отметим, что в подобных случаях степень агрегации хромосом была выше, нежели в случае стадии VI развития кариосферы, которая была описана Дюрьи [19] для ооцитов *R. temporaria* непосредственно перед откладкой икры. Таким образом, у некоторых особей двукратное введение ХГЧ приводило к “гиперагрегации” хромосом. Напротив, при использовании этой же схемы стимуляции у отдельных особей признаки агрегации хромосом в ооцитах были выражены слабее, что может объясняться индивидуальными особенностями реакции животных на гормон. Меньшие дозы гормонов (200 МЕ) даже при двукратном введении не оказывали влияния на состояние кариосферы.

Таким образом, ХГЧ может использоваться для стимуляции созревания ооцитов *R. temporaria in vivo*, в частности для получения ооцитов с полностью сформированной кариосферой. Тем не менее, предлагаемый нами протокол требует дальнейшего уточнения для получения более стабильных результатов и повышения качества ооцитов. В частности, перспективным направлением нам представляется включение в схему стимуляции прогестерона, который традиционно используется для созревания ооцитов амфибий *in vitro* [4]. В литературе также имеются данные об эффективности включения прогестерона в протоколы стимуляции бесхвостых амфибий. Хотя сам по себе прогестерон не вызывает овуляцию даже при повторных введениях, он существенно повышает эффективность стимуляции овуляции у *Anaxyrus fowleri* при совместном использовании с ЛГ-РГ [28].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации, принципам Базельской декларации, рекомендациям по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке РФФИ, и позиции Комитета по этике при работе с животными Института цитологии РАН (лицензия F18-00380). В исследовании не использовали исчезающие или охраняемые виды, все образцы были собраны за пределами охраняемых природных территорий. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00380).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Д.С.Б.), планирование эксперимента, получение, анализ интерпретация данных для работы (И.О.Б.), написание манускрипта (И.О.Б.), редактирование статьи, согласие нести ответственность за все аспекты работы, а также гарантия того, что все вопросы по достоверности и надежности любой части работы надлежащим образом проанализированы и решены (Д.С.Б.), одобрение финальной версии статьи, подлежащей публикации (И.О.Б., Д.С.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kaurova SA, Shvirst NE, Shishova NV, Uteshev VK, Fesenko EE* (2021) Influence of xenon on survival of sperm of common frog *Rana temporaria* during slow freezing. *Bull Exp Biol Med* 171: 596–600.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05276-3>
2. *Ruthsatz K, Bartels F, Stützer D, Eterovick PC* (2022) Timing of parental breeding shapes sensitivity to nitrate pollution in the common frog *Rana temporaria*. *J Therm Biol* 108: 103296.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103296>
3. *Karanova MV* (2021) Low-temperature adaptation of the *Rana temporaria* gastrocnemius muscle at the onset of anabiosis. *J Evol Biochem Physiol* 57(2): 165–171.
4. Объекты биологии развития (1975) М. Наука. [[Objects of Developmental Biology] (1975) M. Nauka]. (In Russ)].

5. *Bogolyubov DS* (2018) Karyosphere (karyosome): a peculiar structure of the oocyte nucleus. *Int Rev Cell Mol Biol* 337: 1–48.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.001>
6. *Gruzova MN, Parfenov VN* (1993) Karyosphere in oogenesis and intranuclear morphogenesis. *Int Rev Cytol* 144: 1–52.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61512-0](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61512-0)
7. *Wagner K* (1923) Über die Entwicklung des Froscheies. *Arch Zellforsch* 17: 1–44.
8. *Gruzova MN, Parfyonov VN* (1973) The karyosphere in late oogenesis of frogs. *Monit Zool Ital* 7: 225–242.
<https://doi.org/10.1080/00269786.1973.107362>
9. *Gruzova MN, Parfenov VN* (1977) Ultrastructure of late oocyte nuclei in *Rana temporaria*. *J Cell Sci* 28: 1–13.
<https://doi.org/10.1242/jcs.28.1.1>
10. *Dumont JN* (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153–179.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203>
11. *Почукалина ГН, Парфенов ВН* (1994) Организация кариосферы с капсулой перед созреванием ооцитов травяной лягушки. *Цитология* 36: 1027–1034. [*Pochukalina GN, Parfenov VN* (1994) Organization of karyosphere with the capsule in oocytes of *Rana temporaria* before maturation. *Tsitologiya* 36: 1027–1034. (In Russ)].
12. *Bogolyubov DS, Travina AO, Bogolyubova IO* (2022) Karyosphere capsule in oocytes of the grass frog: to be or not to be? A critical view. *Cell Tiss Biol* 16: 521–539.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X22060013>
13. *Callan HG, Gall JG, Berg CA* (1987) The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis*: preparation, identification, and distribution of 5S DNA sequences. *Chromosoma* 95: 236–250.
<https://doi.org/10.1007/BF00294780>
14. *Кидов АА, Матушкина КА, Блинова СА, Африн КА, Коврина ЕГ, Бакшеева АА* (2015) Размножение гирканской лягушки (*Rana macrocnemis pseudodalmatina* Eiselt et Schmidler, 1971) в лабораторных условиях. *Совр герпетол* 15: 109–113. [*Kidov AA, Matushkina KA, Blihnova SA, Afrin KA, Kovrina EG, Baksheeva AA* (2015) Reproduction of the Iranian long-legged frog (*Rana macrocnemis pseudodalmatina* Eiselt et Schmidler, 1971) in laboratory conditions. *Sovr Herpetol* 15: 109–113. (In Russ)].
15. *Утешев ВК, Гахова ЭН, Крамарова ЛИ, Шишова НВ, Каурова СА* (2019) Новые подходы к получению репродуктивного материала амфибий для его использования в искусственном оплодотворении. *Совр герпетол* 19: 46–55. [*Uteshev VK, Gakhova EN, Kramarova LI, Shishova NV, Kaurova SA* (2019) New approaches to collecting reproductive material from amphibians for its use in artificial fertilization. *Sovr Herpetol* 19: 46–55. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-46-55>
16. *Uteshev VK, Gakhova EN, Kramarova LI, Shishova NV, Kaurova SA, Kidova EA, Kidov AA, Browne RK* (2023) Russian collaborative development of reproduction technologies for the sustainable management of amphibian biodiversity. *Asian Herpetol Res* 14: 103–115.
<https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.220043>
17. *Wallace RA, Jared DW, Dumont JN, Segal MW* (1973) Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum incubation conditions. *J Exp Zool* 184: 321–333.
<https://doi.org/10.1002/jez.1401840305>
18. *Gall JG, Stephenson EC, Erba HP, Diaz MO, Barsacchi-Pilone G* (1981) Histone genes are located at the sphere loci of newt lampbrush chromosomes. *Chromosoma* 84: 159–171.
<https://doi.org/10.1007/BF00399128>
19. *Duryee WR* (1950) Chromosomal physiology in relation to nuclear structure. *Ann N Y Acad Sci* 50: 920–953.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1950.tb39892.x>
20. *Цветков АГ, Парфенов ВН* (1994) Сезонные преобразования хромосом-ламповых щеток и морфогенез капсулы кариосферы в ооцитах травяной лягушки, выявляемые при анализе выделенных ядерных структур. *Цитология* 36: 64–70. [*Tsvetkov AG, Parfenov VN* (1994) Transformation of lampbrush chromosomes and morphogenesis of the karyosphere capsule in diplotene oocytes of *Rana temporaria* (seasonal changes observed in isolated nuclear structures). *Tsitologiya* 36: 64–70. (In Russ)].
21. *Bellerby CW* (1933) The endocrine factors concerned in the control of the ovarian cycle: *Xenopus laevis* as a test animal. *Biochem J* 27: 615–620.
<https://doi.org/10.1042/bj0270615>
22. *Creaser CW, Gorbman A* (1939) Species specificity of the gonadotropic factors in vertebrates. *Quart Rev Biol* 14: 311–331.
23. *Kouba AJ, Vance CK, Willis EL* (2009) Artificial fertilization for amphibian conservation: Current knowledge and future considerations. *Theriogenology* 71: 214–227.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.055>

24. Wolf DP, Hedrick JL (1971) A molecular approach to fertilization: II. Viability and artificial fertilization of *Xenopus laevis* gametes. Dev Biol 25: 348–359.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(71\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(71)90036-4)
25. Гончаров БФ, Сербинова ИА, Утешев ВК, Шубравый ОИ (1989) Разработка методов гормональной стимуляции процессов размножения у амфибий. В сб.: Проблемы доместикации амфибий. М. ИЭМЭЖ. 197–201. [Goncharov BF, Serbinova IA, Uteshev VK, Shubravoy OI (1989) Development of methods for hormonal stimulation of reproductive processes in amphibians. In: Problems of domestication of amphibians. M. AN Severtsov Inst Ecol Evol 197–201. (In Russ)].
26. Arregui L, Diaz-Diaz S, Alonso-López E, Kouba AJ (2019) Hormonal induction of spermiation in a Eurasian bufonid (*Epidalea calamita*). Reprod Biol Endocrinol 17: 92.
<https://doi.org/10.1186/s12958-019-0537-0>
27. Browne RK, Seratt J, Vance C, Kouba A (2006) Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). Reprod Biol Endocrinol 4: 34.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-34>
28. Browne RK, Li H, Seratt J, Kouba A (2006) Progesterone improves the number and quality of hormone induced Fowler toad (*Bufo fowleri*) oocytes. Reprod Biol Endocrinol 4: 3.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-3>

Influence of Hormonal Stimulation on the Oocyte Chromosome Apparatus of the Common Frog

I. O. Bogolyubova^{a, b}, and D. S. Bogolyubov^{a, *}

^a*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: dbogol@mail.ru*

Late vitellogenic oocytes of the common frog, *Rana temporaria*, represent a promising model for studying the behavior of meiotic chromosomes, since at the diplotene stage, they unite into a karyosphere, which in *R. temporaria* is believed to have an extrachromosomal capsule – unlike in *Xenopus laevis*, a classic model object of cell biology and developmental biology. However, in comparison with *Xenopus*, the strict breeding seasonality of *R. temporaria* significantly limits the possibility of using its oocytes as an experimental model. By adapting classical hormonal stimulation protocols proposed for anurans including *Xenopus*, we were able to obtain *R. temporaria* oocytes with a fully developed karyosphere outside the breeding season, namely in December–January. We observed pronounced changes in the chromosomal apparatus of oocytes with a double injection of human chorionic gonadotropin (hCG) at a dose of 500 IU. In this case, chromosomes undergo compaction and aggregation, leading to the formation of a characteristic chromosomal “knot” (karyosphere), the morphological features of which corresponded to those in *R. temporaria* oocytes at the beginning of the natural breeding season. Based on the proposed protocol for the use of hCG for out-of-season stimulation of oogenesis in *R. temporaria*, it can be further refined to obtain more stable results and improve the quality of oocytes.

Keywords: oogenesis, oocyte nucleus, germinal vesicle, chromosomal apparatus, karyosphere, human chorionic gonadotropin, *Rana temporaria*