

материала. Разработанный нами ранее способ «сухой» гипотермической консервации в закрытых бьюксах позволил увеличить длительность рефрижераторного хранения неоплодотворенных ооцитов травяной лягушки, *Rana temporaria*, с нескольких часов до семи суток (оплодотворено 40%; выклев 20%) (Uteshev et al., 2019).

При этом перед авторами встал вопрос: возможно ли улучшить результаты консервации, увеличив время хранения и количество жизнеспособных ооцитов? Положительные результаты, полученные при гипотермической консервации органов теплокровных с помощью биологически активных газов (Фесенко и др., 2020), натолкнули авторов на мысль о возможной адаптации данного подхода к методу «сухого» хранения ооцитов.

Цель данного исследования – изучение возможности применения консервирующей газовой смеси на основе монооксида углерода и кислорода для пролонгации гипотермического хранения ооцитов амфибий.

Материалы и методы. Самцов и самок травяной лягушки, *Rana temporaria*, отлавливали в период зимовки в декабре в водоеме площадью 14355 м² с впадающей в него р. Любужиха в окрестностях г. Пушкино Московской области. Эксперименты проводили в 2022 и 2023 гг. Для получения овулированных ооцитов и уринальной спермы внутрибрюшинно вводили гонадотропный гормон «Сурфагон» (Мосагроген, Россия): самцам – 25 мкг/особь, самкам – 50 мкг/особь. Опыты по хранению ооцитов включали 2 экспериментальные группы в 2022 г. и 3 – в 2023 г.

2022 г.: 1. Группа «СО+О₂ 6.5» – ооциты хранили под давлением смеси газов СО+О₂ (в соотношении 1:1) 6.5 атм. 2. Группа «Контроль» – ооциты хранили при атмосферном давлении воздуха. Экспериментальная группа состояла из 9 повторов, один повтор содержал не менее 10 яйцеклеток ($n = 9$, где n – количество повторов для каждой ячейки в таблице). Условия хранения: камера «Vivog» (Premex, Швейцария) в холодильнике с температурой 4°C, длительность хранения: 1, 4, 7 и 12 дней.

2023 г.: 1. Группа «СО+О₂ 6.5» – ооциты хранили под давлением смеси газов СО+О₂ (в соотношении 1:1) 6.5 атм. 2. Группа «СО+О₂ 2.5» – ооциты хранили под давлением смеси газов СО+О₂ (в соотношении 1:1) 2.5 атм. 3. Группа «Контроль» – ооциты хранили при атмосферном давлении воздуха. Экспериментальная группа состояла из 6 повторов, один повтор содержал не менее 10 яйцеклеток ($n = 6$, где n – количество повторов для каждой ячейки в таблице). Условия хранения: камера «Vivog» в холодильнике с температурой 4°C, длительность хранения: 4 и 7 дней.

Долю оплодотворенных ооцитов подсчитывали по отношению дробящихся икринок к общему числу ооцитов, взятых в эксперимент, и выражали в процентах. Долю выклева подсчитывали по отношению числа личинок к начальному количеству ооцитов и выражали в процентах. Нативные ооциты (0-й день) оценивали у каждой самки, взятой в исследование, сразу после получения.

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, США). Показатели выражали в виде среднего значения и стандартного отклонения. Значимость различий определяли с использованием *U*-критерия Манна – Уитни ввиду малого размера рядов данных.

Результаты и их обсуждение. Фертильность ооцитов в контрольной группе плавно снижалась на всём протяжении эксперимента: к 12-му дню хранения не наблюдали способных к оплодотворению ооцитов. В группе «СО+О₂ 6.5» снижение качества сохраняемых ооцитов по показателям оплодотворения произошло лишь на 7-е сутки консервации. Аналогичная картина наблюдалась и при анализе выклева в обеих группах (таблица, 2022 г.). При этом важно отметить, что на 4-е сутки после гипотермической консервации ооциты в группе «СО+О₂ 6.5» в 1.6 раза превосходили контрольную по показателям успешности оплодотворения и в 2.2 раза – по количеству дошедших до стадии выклева эмбрионов, что позволяет говорить о более высокой степени сохранности ооцитов. Данные различия могут быть связаны с патологическими изменениями, происходящими в неоплодотворенных ооцитах амфибий. Известно, что в течение первых дней в ооцитах протекают процессы, приводящие к гибели посредством индукции апоптоза по митохондриальному пути (Sato, Tokmakov, 2020). Центральную роль в этом процессе играет цитохром *C*. Высвобождаясь через внешнюю мембрану митохондрий в цитоплазму, он участвует в формировании апоптосомного комплекса с последующей активацией каспаз. Монооксид углерода, входящий в состав газовой смеси, способен в значительной мере купировать данные патологические изменения. Так, воздействие монооксидом углерода приводит к снижению активности каспазы-3, что значительно уменьшает количество апоптотических ооцитов свиней *in vitro* (Němeček et al., 2017). В работе на первичной культуре астроцитов данный протекторный эффект достигается благодаря ингибированию высвобождения цитохрома *C* из митохондрий (Queiroga et al., 2010).

Однако представленные выше данные не объясняли возможные причины резкого снижения

Свойства ооцитов *Rana temporaria* после их консервации в газовых смесях (доля от общего числа в виде среднего \pm стандартное отклонение, %)

Table. Properties of *Rana temporaria* oocytes after their preservation in the gas mixtures (of the total number as an average \pm standard deviation, %)

Показатели жизнеспособности / Viability indicators	Группа / Group	Дни консервации / Days of preservation				
		0	1	4	7	12
Фертильность, % / Fertility, %	2022					
	Нативные / Native	95±4	—			
	СО+О ₂ 6.5	—	90±10	91±8 [#]	66±8 [#]	39±14 [#]
	Контроль / Control		80±13	58±19	41±12%	0
Развитие до выклева личинок, % / Development until larvae hatching, %	Нативные / Native	91±5	—			
	СО+О ₂ 6.5	—	83±11 [*]	80±15 [#]	19±6	1±2
	Контроль / Control		66±16	37±19	13±5	0
Фертильность, % / Fertility, %	2023					
	Нативные / Native	89±4	—	—		—
	СО+О ₂ 2.5	—		88±5 [#]	68±8 [#]	
	СО+О ₂ 6.5			61±11 [*]	34±21 [*]	
	Контроль / Control			41±20	11±12	
Развитие до выклева личинок, % / Development until larvae hatching, %	Нативные / Native	61±21		—		
	СО+О ₂ 2.5	—	51±8 [#]	23±10 [#]		
	СО+О ₂ 6.5		42±9 [#]	12±10		
	Контроль / Control		19±6	5±5		

Примечание. Достоверность различий между экспериментальными группами и контрольной группой на одинаковом временном промежутке гипотермической консервации обозначена: * при $P < 0.05$, # при $P < 0.01$.

Note. The reliability of differences between the experimental groups and the control group at the same time interval of hypothermic preservation is indicated: * at $P < 0.05$, # at $P < 0.01$.

количества ооцитов, дошедших до выклева в группе «СО+О₂ 6.5 атм.» на 7-е сутки консервации. Это позволило предположить негативное влияние давления газовой смеси на сохранность ооцитов, что подтвердилось в экспериментах 2023 г.: снижение избыточного давления в камере на 4 атм. привело к повышению количества фертильных ооцитов в 2 раза (см. таблицу, 2023 г.). Количество оплодотворенных ооцитов, дошедших до личиночной стадии развития, также возросло.

Влияние давления на сохранность ооцитов в условиях воздействия гипотермии остается малоизученным. В работе на мышинных яйцеклетках продемонстрировано благотворное влияние небольшого избыточного давления (Nagamatsu et al., 2019). Повышение давления на 0.33 атмосферы обеспечивало поддержание покоя ооцитов в примордиальных фолликулах. Предполагается, что механическое напряжение, сопровождаемое вращением ядра, является одним из критических факторов, необходимых для поддержания состояния покоя ооцитов. Кроме того, показано, что сохранность биологических объектов может снижаться при воздействии избыточного давления продолжительное время. Так, на клеточной линии феохромоцитомы крысы (РС-12) наблюдался самый высокий уровень апоптоза и активности каспазы-3 и каспазы-9 в группе

максимального давления, составлявшего 0.09 атм. (избыточное давление), при 24-часовой консервации (Tök et al., 2014). При оценке влияния высокого гидростатического давления (до 1480 атм.) на сохранность бластоцист мышей выявлено, что с увеличением показателей давления время его воздействия должно сокращаться (Pribenszky et al., 2004).

Приведенные данные сложно сопоставить с полученными авторами статьи результатами ввиду разницы в диапазонах используемых давлений и времени воздействия. Снижение давления газовой смеси на 4 атмосферы в наших экспериментах привело к сохранению большего числа жизнеспособных ооцитов, что, вероятно, связано с уменьшением механического стресса, оказываемого на клетку.

Заключение. Использование газовой смеси (монооксида углерода и кислорода) повышает количество жизнеспособных ооцитов при длительной гипотермической консервации. Данный подход потенциально может найти применение в сохранении ооцитов других классов позвоночных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кидов А. А., Кидова Е. А., Дроздова Л. С., Вяткин Я. А., Иволга Р. А., Кондратова Т. Э., Африн К. А., Иванов А. А. 2021. Обзор методик зоокультуры редких и исчезающих земноводных России и сопредельных стран:

опыт Тимирязевской академии // Труды Института зоологии Республики Казахстан. Т. 1, вып. 1. С. 89 – 104. <https://doi.org/10.54944/oc260ot24>

Фесенко Е. Е., Гагаринский Е. Л., Аверин А. С., Грудинин Н. В., Гурин А. Е., Шишова Н. В., Швирст Н. Э., Гольтяев М. В., Ковтун А. Л. 2020. Оценка сохранности миокарда крысы и изолированного сердца барана после пролонгированной 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода // Биофизика. Т. 65, вып. 4. С. 780 – 791. <https://doi.org/10.31857/S0006302920040213>

Catenazzi A. 2005. State of the world's amphibians // Annual Review of Environment and Resources. Vol. 40, № 1. P. 91 – 119. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102014-021358>

McCallum M. L. 2007. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate // Journal of Herpetology. Vol. 41, № 3. P. 483 – 491. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[483:ADOECD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[483:ADOECD]2.0.CO;2)

Nagamatsu G., Shimamoto S., Hamazaki N., Nishimura Y., Hayashi K. 2019. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes // Science Advances. Vol. 5, iss. 6. Article no. eaav9960. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9960>

Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Chmelíková E., Sedmíková M. 2017. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during *in*

vitro aging // PeerJ. Vol. 5. Article no. e3876 <https://doi.org/10.7717/peerj.3876>

Queiroga C. S., Almeida A. S., Martel C., Brenner C., Alves P. M., Vieira H. L. 2010. Glutathionylation of adenine nucleotide translocase induced by carbon monoxide prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis // Journal of Biological Chemistry. Vol. 285, iss. 22. P. 17077 – 17088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065052>

Pribenszky C., Molnár M., Cseh S., Solti L. 2005. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge // Animal Reproduction Science. Vol. 87, iss. 1 – 2. P. 143 – 150. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.007>

Sato K. I., Tokmakov A. A. 2020. Toward the understanding of biology of oocyte life cycle in *Xenopus laevis*: No oocytes left behind // Reproductive Medicine and Biology. Vol. 19, iss. 2. P. 114 – 119. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12314>

Tök L., Nazıroğlu M., Uğuz A. C., Tök O. 2014. Elevated hydrostatic pressures induce apoptosis and oxidative stress through mitochondrial membrane depolarization in PC12 neuronal cells: A cell culture model of glaucoma // Journal of Receptors and Signal Transduction. Vol. 34, iss. 5. P. 410 – 416. <https://doi.org/10.3109/10799893.2014.910812>

Uteshev V. K., Gakhova E. N., Kramarova L. I., Shishova N. V., Kaurova S. A. 2019. New approaches to collecting reproductive material from amphibians for its use in artificial fertilization // Current Studies in Herpetology. Vol. 19, iss. 1–2. P. 46 – 55.

Storage of grass frog *Rana temporaria* (Ranidae, Amphibia) oocytes in a carbon monoxide and oxygen mixture under pressure

E. L. Gagarinskiy ✉, V. K. Uteshev, E. E. Fesenko (Jr.)

*Institute of Cell Biophysics RAS – A Separate Subdivision of Federal Research Centre
“Pushchino Scientific Centre for Biological Research RAS”
3 Institutskaya St., Pushchino 142290, Moscow region, Russia*

Article info

Short Communication

<https://doi.org/10.18500/1814-6090-2025-25-3-4-159-164>
EDN: FMKMOE

Received February 11, 2025,
revised August 14, 2025,
accepted August 25, 2025

Abstract: The development of a technology for hypothermic preservation of amphibian oocytes is one of the urgent tasks for cryobiology. The previously proposed method of “dry” hypothermic preservation in small sealed containers allowed us to increase the duration of refrigerated storage of unfertilized oocytes of the grass frog *Rana temporaria* up to 7 days (fertilization 40%; hatching 20%). The aim of this study was to increase the effectiveness of the previously proposed approach using the technology of storing biological objects under pressure of a gas mixture (oxygen and carbon monoxide), usually used for warm-blooded animal organs. In the CO+O₂ 6.5 atm group, a decrease in the quality of preserved oocytes occurred only on the 7th day of storage. The number of fertile oocytes (91±8%) and larvae (80±14%) during preservation for up to 4 days in the CO+O₂ 6.5 atm group did not significantly differ from the values obtained in the native control group of 95±4% and 91±5%, respectively. On the 7th day of preservation, a sharp decrease in the hatching rates was observed in the CO+O₂ 6.5 atm group compared to the control group. A series of additional experiments showed that reducing the pressure from 6.5 down to 2.5 atm (over atmospheric) increased fertility from 34±21% in the CO+O₂ 6.5 atm group up to 68±8% in the CO+O₂ 2.5 atm group, and the number of larvae from 12±11 to 23±10% during the seven days preservation of oocytes. Thus, we have demonstrated the possibility of using the gas preservation technology with a CO+O₂ mixture to prolong hypothermic storage of amphibian oocytes for up to 12 days. The recommended pressure of the gas mixture in the chamber is 2.5 atm (over atmospheric).

Keywords: hypothermia, oocytes, amphibians, preservation, oxygen, carbon monoxide

Funding: This work was carried out with financial support from the Ministry of Higher Education and Science of the Russian Federation. The research was conducted as part of State Tasks No. 075-00957-23-01 and No. 075-00609-24-01.

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

For citation: Gagarinskiy E. L., Uteshev V. K., Fesenko E. E. (Jr.) Storage of grass frog *Rana temporaria* (Ranidae, Amphibia) oocytes in a carbon monoxide and oxygen mixture under pressure. *Current Studies in Herpetology*, 2025, vol. 25, iss. 3–4, pp. 159–164 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2025-25-3-4-159-164>, EDN: FMKMOE

REFERENCES

Kidov A. A., Kidova E. A., Drozdova L. S., Vyatkin Ya. A., Ivolga R. A., Kondratova T. E., Afrin K. A., Ivanov A. A. A review of zooculture methods for studying rare and endangered amphibians from Russia and adjacent countries: The Timiryazev Academy experience. *Trudy of the Institute of Zoology RK*, 2021, vol. 1, iss. 1, pp. 89–104 (in Russian). <https://doi.org/10.54944/oc260ot24>

Fesenko E. E., Gagarinsky E. L., Averin A. S., Gurin A. E., Shishova N. V., Shvirst N. E., Goltyaev M. V., Grudin N. V., Kovtun A. L. The condition of the rat myocardium and isolated sheep heart after prolonged 24-hour hypothermic preservation in a pressurized carbon

monoxide–oxygen gas mixture. *Biophysics*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 666–675. <https://doi.org/10.1134/S0006350920040065>

Catenazzi A. State of the world's amphibians. *Annual Review of Environment and Resources*, 2005, vol. 40, no. 1, pp. 91–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102014-021358>

McCallum M. L. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 2007, vol. 41, no. 3, pp. 483–491. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[483:ADOECD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[483:ADOECD]2.0.CO;2)

Nagamatsu G., Shimamoto S., Hamazaki N., Nishimura Y., Hayashi K. Mechanical stress accompanied

✉ *Corresponding author.* Laboratory of Cryobiology, Institute of Cell Biophysics RAS – A Separate Subdivision of Federal Research Centre “Pushchino Scientific Centre for Biological Research RAS”, Russia.

ORCID and e-mail addresses: Evgeniy L. Gagarinskiy: <https://orcid.org/0000-0001-6101-9192>, E.L.Gagarinskiy@yandex.ru; Viktor K. Uteshev: uteshev-cryobank@mail.ru; Eugeny E. Fesenko, Jr.: eugeny.ef@gmail.com.

with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Science Advances*, 2019, vol. 5, iss. 6, article no. eaav9960. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9960>

Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Chmelíková E., Sedmíková M. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. *PeerJ*, 2017, vol. 5, article no. e3876. <https://doi.org/10.7717/peerj.3876>

Queiroga C. S., Almeida A. S., Martel C., Brenner C., Alves P. M., Vieira H. L. Glutathionylation of adenine nucleotide translocase induced by carbon monoxide prevents mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, iss. 22, pp. 17077–17088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065052>

Pribenszky C., Molnár M., Cseh S., Solti L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Animal Repro-*

duction Science, 2005, vol. 87, iss. 1–2, pp. 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.007>

Sato K. I., Tokmakov A. A. Toward the understanding of biology of oocyte life cycle in *Xenopus laevis*: No oocytes left behind. *Reproductive Medicine and Biology*, 2020, vol. 19, iss. 2, pp. 114–119. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12314>

Tök L., Nazıroğlu M., Uğuz A. C., Tök O. Elevated hydrostatic pressures induce apoptosis and oxidative stress through mitochondrial membrane depolarization in PC12 neuronal cells: A cell culture model of glaucoma. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2014, vol. 34, iss. 5, pp. 410–416. <https://doi.org/10.3109/10799893.2014.910812>

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.