

**Гипотермическое хранение ооцитов амфибий.
Как долго можно сохранять овулированные ооциты
травяной лягушки (*Rana temporaria*) (Ranidae, Amphibia)?**

**В. К. Утешев^{1✉}, С. А. Каурова¹, Н. В. Шишова¹,
Л. И. Крамарова², Э. Н. Гахова¹**

¹ Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

Информация о статье

Краткое сообщение

УДК 597.851

<https://doi.org/10.18500/1814-6090-2025-25-3-4-221-225>

EDN: TRIGLG

Поступила в редакцию 12.02.2025,
после доработки 04.03.2025,
принята 23.03.2025

Аннотация. В настоящее время наблюдается недопустимо высокий темп сокращения биоразнообразия позвоночных животных и, в первую очередь, амфибий. Данная ситуация требует принятия экстренных мер для спасения исчезающих видов этих животных. Одна из них – развитие вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе технологии криоконсервации и создания криобанков репродуктивных клеток (сперматозоидов и ооцитов). Однако технологии криоконсервации, успешно применяемые для криобанков сперматозоидов, до сих пор не удается адаптировать для сохранения ооцитов амфибий. Это подстегнуло интерес к исследованию возможности гипотермического хранения ооцитов амфибий при низких положительных температурах. Задачей данной статьи является рассмотрение и анализ результатов гипотермического хранения овулированных ооцитов бесхвостых амфибий. Анализ литературы свидетельствует, что длительность хранения овулированных ооцитов лягушек в каких-либо водных растворах не превышает десятков часов. Длительность хранения ооцитов «сухим» способом в закрытых бьюксах возрастает до 9 дней, а их сохранность в тушках самок может достигать 9 – 10 суток. Применение усовершенствованного «сухого» метода с использованием газовых смесей под давлением, увеличивает срок хранения ооцитов до 12 – 15 дней. Максимальная длительность (до 2 – 2.5 месяцев) наблюдалась при хранении ооцитов в яйцеводах живых лягушек.

Ключевые слова: амфибии, овулированные ооциты, гипотермическое хранение, криоконсервация

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного научно-исследовательского задания № 075-00609-24-02 и 075-00224-24-05, а также частично поддержано Экспериментальным генетическим криобанком Института биофизики клетки РАН.

Образец для цитирования: Утешев В. К., Каурова С. А., Шишова Н. В., Крамарова Л. И., Гахова Э. Н. 2025. Гипотермическое хранение ооцитов амфибий. Как долго можно сохранять овулированные ооциты травяной лягушки (*Rana temporaria*) (Ranidae, Amphibia)? // Современная герпетология. Т. 25, вып. 3/4. С. 221 – 225. <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2025-25-3-4-221-225>, EDN: TRIGLG

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Введение. В последние десятилетия скорость сокращения биоразнообразия амфибий резко увеличилась. Данные комиссии по выживанию видов МСОП свидетельствуют, что пятая часть ныне живущих позвоночных животных находятся в угрожаемом состоянии, в том числе к амфибиям отно-

сится наибольшее число видов (41%), имеющих такой статус (IUCN, 2024). Основными причинами резкого сокращения биоразнообразия амфибий являются, в частности, разрушение среды обитания, загрязнение нерестовых водоемов, болезни и чрезмерный вылов (González-Del-Pliego et al., 2019;

✉ Для корреспонденции. Лаборатория криобиологии Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

ORCID и e-mail адреса: Утешев Виктор Константинович: <https://orcid.org/0000-0002-4357-7577>, uteshev-cryobank@mail.ru; Каурова Светлана Анатольевна: <https://orcid.org/0000-0002-2298-1597>, sakaurova@mail.ru; Шишова Наталья Владимировна: <https://orcid.org/0000-0001-8449-0286>, cryopreservation@list.ru; Крамарова Людмила Ивановна: <https://orcid.org/0000-0003-2749-7371>, luda_kramarova@rambler.ru; Гахова Эдит Николаевна: <https://orcid.org/0000-0002-0640-8141>, gakhova@gmail.com.

Scheele et al., 2019). Вышесказанное требует принятия экстренных мер для сохранения уязвимых и исчезающих видов амфибий.

Одной из таких мер является создание вспомогательных репродуктивных технологий длительного сохранения репродуктивных клеток (сперматозоидов и овулированных ооцитов) амфибий (Ananjeva et al., 2017). Наиболее успешным методом длительного хранения биологического материала является криоконсервация – хранение материала при сверхнизких температурах (Clulow J., Clulow S., 2016). Технологии криоконсервации сперматозоидов сельскохозяйственных животных, а также рыб и амфибий разработаны и успешно применяются (Yáñez-Ortiz et al., 2022; Tiersch, Green, 2011). В то же время надежных методов криоконсервации овулированных ооцитов или ранних зародышей амфибий со стабильно воспроизводимыми результатами к настоящему времени создать пока не удается (Derakhshan et al., 2017). Отсутствие надежных технологий криоконсервации стимулировало интерес к изучению возможностей гипотермического хранения овулированных ооцитов при низких положительных температурах (Anastas et al., 2023).

Задача данной публикации – обобщение полученных результатов исследований по гипотермическому хранению в жизнеспособном состоянии овулированных ооцитов амфибий.

Результаты и их обсуждение. В ранних исследованиях ооциты сохраняли в воде, а затем – в физиологических растворах, в частности в растворе Рингера для амфибий (SAR) (Elinson, 1986; Browne et al., 2001). Было показано, что при хранении ооцитов в растворах с низкой осмоляльностью (5 мОсм кг^{-1}) их способность быть оплодотворенными снижалась до нуля через 0.5 – 1 час (Elinson, 1986). При хранении в SAR овулированные ооциты *Rhinella (Bufo) marinus* теряли способность к оплодотворению через 8 ч (Browne et al., 2001), а ооциты *Limnodynastes tasmaniensis* – через 12 – 16 ч хранения (Edwards et al., 2004).

Причины относительно быстрого снижения оплодотворения ооцитов при их хранении в различных водных растворах, как с низкой, так и высокой осмоляльностью, изучены не достаточно полно (Clulow et al., 2019). Предполагается, что одной из возможных причин такого снижения оплодотворения ооцитов является насыщение студенистой оболочки ооцитов водой из растворов хранения, что приводит к её значительному набуханию и изменению ее структуры и свойств (Elinson, 1986; Pavlov, Emel'yanova, 2007). Поэтому в недавно опубликованных исследованиях было предложено сохранять овулированные ооциты «сухим» методом в небольших, плотно закры-

тых бюксах без использования каких-либо растворов (Uteshev et al., 2018, 2019). В плотно закрытых бюксах не происходит высыхание ооцитов, а при отсутствии каких-либо растворов студенистая оболочка ооцитов не разбухает. Упомянутые исследования (Uteshev et al., 2018, 2019) были выполнены на ооцитах травяной лягушки (*Rana temporaria*), нерестящейся ранней весной. Ооциты хранили в холодильнике при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Анализ полученных результатов свидетельствует, что для успешного сохранения ооцитов палеарктических видов амфибий, нерестящихся ранней весной, необходимо соблюдение как минимум двух условий: сохранение ооцитов без использования водных растворов («сухой» способ хранения) и низкие положительные ($0 - +4^{\circ}\text{C}$) температуры хранения.

Проведенные эксперименты показали, что при хранении овулированных ооцитов травяной лягушки *R. temporaria* в плотно закрытых бюксах без каких-либо растворов в холодильнике при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ способность к оплодотворению через 7 дней сохранялась у 40% ооцитов. Половина этих оплодотворенных ооцитов успешно развивалась до стадии выклева. Практически полная потеря способности к оплодотворению у этих ооцитов наблюдалась лишь к девятому дню эксперимента (Uteshev et al., 2019).

Описанный «сухой» метод гипотермического хранения овулированных ооцитов амфибий дальнейшее развитие получил в исследованиях Е. Л. Гагаринского с соавторами (Gagarinskiy et al., 2023). Ими была использована камера для газовой консервации. Ооциты травяной лягушки *R. temporaria* хранили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в атмосфере газовой смеси ($\text{O}_2 + \text{CO}$) под давлением 6.5 атмосферы. При таком способе хранения через 12 дней у $39 \pm 14\%$ ооцитов наблюдали способность к оплодотворению (таблица). В контрольной серии экспериментов при хранении ооцитов в закрытых бюксах в холодильнике через 12 дней все ооциты полностью теряли способность к оплодотворению (Gagarinskiy et al., 2023).

Далее рассмотрим результаты исследований гипотермического хранения ооцитов травяной лягушки в яйцеводах живых или декапитированных самок. В обоих случаях для стимулирования процесса овуляции самкам вводили гонадотропный гормон (LHRH аналог). Через двое суток тестировали завершение овуляции и скопление овулированных ооцитов в нижней части яйцеводов. Для этого мягким массажем живота лягушки сцеживали небольшую порцию овулированных ооцитов, затем приступали к исследованию успешности хранения ооцитов в организме самки.

Длительность хранения овулировавших ооцитов амфибий
Table. Storage duration of ovulated amphibian oocytes

Способы хранения ооцитов / Oocyte storage methods	Длительность хранения ооцитов / Oocyte storage duration
В различных водных растворах / In various aqueous solutions	Часы или десятки часов / Hours or dozens of hours
«Сухим» методом в закрытых бюксах / “Dry” method in closed baskets	До 9 дней / Up to 9 days
В яйцеводах декапитированных самок / In the oviducts of decapitated females	До 9 – 10 дней / Up to 9–10 days
«Сухим» методом с использованием газовых смесей под давлением / “Dry” method using gas mixtures under pressure	До 12 – 15 дней / Up to 12–15 days
В яйцеводах живых самок / In the oviducts of live females	До 2 – 2.5 месяцев / Up to 2–2.5 months

В первой серии экспериментов изучали длительность сохранности ооцитов в яйцеводах живых самок травяной лягушки. После завершения овуляции самок содержали в холодильнике при температуре +4°C, что на 3 – 5 градусов ниже температуры естественного нереста этого вида амфибий. Пониженная температура приводила к торможению их репродуктивной активности и пролонгированию сохранения овулированных ооцитов в яйцеводах. Было обнаружено, что через 30 дней хранения в живых самках в холодильнике 46.4±3.0% ооцитов сохранили способность к оплодотворению. До стадии выклева успешно развивалось 49.2±8.0% этих оплодотворенных ооцитов (Uteshev et al., 2018, 2019). В более позднем исследовании авторы показали, что даже после 70 дней содержания самок травяной лягушки с овулированными ооцитами в холодильнике около 75.8±8.0% извлеченных ооцитов успешно оплодотворялись (см. таблицу) и 74.8±8.0% этих ооцитов развились до выклева (Uteshev et al., 2024). В этом исследовании авторы выявили, что, находясь в яйцеводе, овулированные ооциты не контактируют ни с какими физиологическими жидкостями организма самки. Таким образом, гипотермическое хранение неоплодотворенной икры в яйцеводах является своеобразным вариантом «сухого» способа хранения ооцитов (Uteshev et al., 2024).

Во второй серии экспериментов изучали возможность сохранения ооцитов в яйцеводах декапитированных самок *R. temporaria*. В этих экспериментах после завершения овуляции животных декапитировали, и тушки лягушек помещали в холодильник при температуре +4°C. Обнаружили, что при таком способе гипотермического хранения овулированных ооцитов травяной лягушки через 9 дней более 20% ооцитов были способны к оплодотворению (см. таблицу).

Заключение. Анализ литературы свидетельствует, что длительность хранения овулированных ооцитов лягушек в каких-либо водных растворах не превышает десятков часов. Длительность хранения ооцитов «сухим» способом в закрытых бюксах возрастает до 9 дней, а их сохран-

ность в тушках самок может достигать 9 – 10 суток. Применение усовершенствованного «сухого» метода с использованием газовых смесей под давлением увеличивает срок хранения ооцитов до 12 – 15 дней. Максимальная длительность (до 2 – 2.5 месяцев) наблюдалась при хранении ооцитов в яйцеводах живых лягушек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Anastas Z. M., Byrne P. G., O’Brien J. K., Hobbs R. J., Upton R., Silla A. J. The increasing role of short-term sperm storage and cryopreservation in conserving threatened amphibian species. *Animals*, 2023, vol. 13, no. 13, pp. 2094–2098. <https://doi.org/10.3390/ani13132094>
- 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 Journal of Herpetology*, 2017, vol. 24, no. 4, pp. 1–16.
- Browne R. K., Clulow J., Mahony M. Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes. *Reproduction*, 2001, vol. 121, pp. 167–173.
- 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, iss. 8, pp. 1116–1132.
- Clulow J., Upton R., Trudeau V. L., Clulow S. Amphibian assisted reproductive technologies: Moving from technology to application. In: Comizzoli P., Brown J., Holt W., eds. *Reproductive Sciences in Animal Conservation. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham, Springer, 2019, pp. 413–463. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23633-5_14
- Derakhshan Z., Nokhbatolfighahai M., Zahiri S. Cryopreservation of *Bufo viridis* embryos by vitrification. *Cryobiology*, 2017, vol. 75, pp. 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.02.003>
- Edwards D. L., Mahony M. J., Clulow J. Effect of sperm concentration, medium osmolality, and oocyte storage on artificial fertilisation success in a myobatrachid frog (*Limnodynastes tasmaniensis*). *Reproduction, Fertility and Development*, 2004, vol. 16, iss. 3, pp. 347–354.
- Elinson R. P. Fertilization in amphibians: The ancestry of the block to polyspermy. *International Review of Cytology*, 1986, vol. 101, pp. 59–100.

- Gagarinskiy E. L., Uteshev V. K., Fesenko E. E. Jr. Prolonged hypothermic storage of oocytes of the European common frog *Rana temporaria* in a gas mixture of oxygen and carbon monoxide. *PLoS ONE*, 2023, vol. 18, no. 7, article no. e0288370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288370>
- González-Del-Pliego P., Freckleton R. P., Edwards D. P., Koo M. S., Scheffers B. R., Pyron R. A., Jetz W. Phylogenetic and trait-based prediction of extinction risk for data-deficient amphibians. *Current Biology*, 2019, vol. 29, iss. 9, pp. 1557–1563. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.005>
- IUCN 2024. *IUCN Red List of Threatened Species*. 2024. Available at: <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics> (accessed December 23, 2024).
- Pavlov D. A., Emel'yanova N. G. Fertility of ovulated oocytes after their short-term storage in water in several species of marine tropical fishes. *Journal of Ichthyology*, 2008, vol. 48, iss. 8, pp. 655–664. <https://doi.org/10.1134/S0032945208080122>
- Scheele B. C., Pasmans F., Skerratt L. F., Berger L., Beukema W., Acevedo A. A., Burrowes P. A., Carvalho T., Catenazzi A., De la Riva I., Fisher M. C., Flechas S. V., Foster C. N., Frias-Álvarez P., Garner T. W. J., Gratwicke B., Guayasamin J. M., Hirschfeld M., Kolby J. E., Kosch T. A. et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 2019, vol. 363, no. 6434, pp. 1459–1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
- Tiersch T. R., Green C. C. *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge, LA, World Aquaculture Society, 2011. 439 p.
- Uteshev V. K., Gakhova E. N., Kramarova L. I., Shishova N. V., Kaurova S. A., Browne R. K. Refrigerated storage of European common frog *Rana temporaria* oocytes. *Cryobiology*, 2018, vol. 83, pp. 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.004>
- 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). <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2019-19-1-2-46-55>
- Uteshev V. K., Gakhova E. N., Kramarova L. I., Shishova N. V., Kaurova S. A., Penkov N. V. Refrigerated storage of oviductal oocytes into live females common frog *Rana temporaria* from 1 to 70 days. *Russian Journal of Herpetology*, 2024, vol. 31, no. 4, pp. 239–245. <https://doi.org/10.30906/1026-2296-2024-31-4-239-245>
- Yáñez-Ortiz I., Catalán J., Rodríguez-Gil J. E., Miró J., Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 2022, vol. 246, pp. 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>

Hypothermic storage of amphibian oocytes. How long can ovulated oocytes of the common frog *Rana temporaria* (Ranidae, Amphibia) be stored?

V. K. Uteshev ^{1✉}, S. A. Kaurova ¹, N. V. Shishova ¹,
L. I. Kramarova ², E. N. Gakhova ¹

¹ Institute of Cell Biophysics RAS – A Separate Subdivision of Federal Research Centre
“Pushchino Scientific Centre for Biological Research RAS”

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

Article info

Short Communication

[https://doi.org/10.18500/1814-6090-2025-25-](https://doi.org/10.18500/1814-6090-2025-25-3-4-221-225)

3-4-221-225

EDN: TRIGLG

Received February 12, 2025,

revised March 4, 2025,

accepted March 23, 2025

Abstract: Currently, there is an unacceptably high rate of decline in the biodiversity of vertebrates, and, first of all, amphibians. This situation requires emergency measures to save the endangered species of these animals. One of such measures is the development of assisted reproductive technologies, including cryopreservation and cryobanking of reproductive cells (sperm and oocytes). However, cryopreservation technologies, successfully used for banking sperm, have not yet been adapted for cryobanking amphibian oocytes. This has spurred interest in studying the possibility of hypothermic storage of amphibian oocytes at low positive temperatures. The objective of this article is to consider and analyze the results of hypothermic storage of ovulated oocytes of tailless amphibians. Our analysis of the literature shows that the duration of storage of ovulated frog oocytes in any aqueous solutions does not exceed tens of hours. The storage duration of oocytes by the “dry” method in closed containers increases up to 9 days, and their preservation in female carcasses can reach 9–10 days. The use of an improved “dry” method employing gas mixtures under pressure increases the storage period of oocytes up to 12–15 days. The maximum duration (2–2.5 months) was observed when storing oocytes in the oviducts of live frogs.

Keywords: amphibians, ovulated oocytes, hypothermic storage, cryopreservation

Funding: The work was carried out as part of the state research task No. 075-00609-24-02 and 075-00224-24-05, and was partially supported by the Experimental Genetic Cryobank of the Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences.

For citation: Uteshev V. K., Kaurova S. A., Shishova N. V., Kramarova L. I., Gakhova E. N. Hypothermic storage of amphibian oocytes. How long can ovulated oocytes of the common frog *Rana temporaria* (Ranidae, Amphibia) be stored? *Current Studies in Herpetology*, 2025, vol. 25, iss. 3–4, pp. 221–225 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2025-25-3-4-221-225>, EDN: TRIGLG

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

✉ *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: Viktor K. Uteshev: <https://orcid.org/0000-0002-4357-7577>, uteshev-cryobank@mail.ru; Svetlana A. Kaurova: <https://orcid.org/0000-0002-2298-1597>, sakaurova@mail.ru; Natalya V. Shishova: <https://orcid.org/0000-0001-8449-0286>, cryopreservation@list.ru; Lyudmila I. Kramarova: <https://orcid.org/0000-0003-2749-7371>, luda_kramarova@rambler.ru; Edith N. Gakhova: <https://orcid.org/0000-0002-0640-8141>, gakhova@gmail.com.