

УДК 636.4, 606, 602.42

Научная статья

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-385-8-139-144

Д.А. Старикова ✉  
Т.И. Кузьмина

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального исследовательского центра животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ livebavis@mail.ru

Поступила в редакцию:  
14.05.2024Одобрена после рецензирования:  
12.07.2024Принята к публикации:  
28.07.2024

Research article

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-385-8-139-144

Darya A. Starikova ✉  
Tatiana I. Kuzmina

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ dastarikova27@mail.com

Received by the editorial office:  
14.05.2024Accepted in revised:  
12.07.2024Accepted for publication:  
28.07.2024

# Анализ морфологии ооцит-кумулюсных комплексов *Sus scrofa domestica*, подвергшихся воздействию низких и сверхнизких температур

## РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Приоритетная задача репродуктивных технологий в животноводстве — разработка эффективных протоколов хранения женских гамет. Одним из способов их сохранения является витрификация, снижающая повреждение внутриклеточных органелл за счет увеличения вязкости при охлаждении и минимизации кристаллизации. Для оптимизации используются различные добавки к криопротекторам.

**Методы.** В данной работе использован тетраполиэтиленгликолят титана в 10-кратном мольном избытке полиэтиленгликоля (TTP<sub>EG</sub>\*10PEG), характер действия которого на клетки исследовали при краткосрочном хранении в условиях низких (5 °C) и сверхнизких (-196 °C) температур.

**Цель исследования** — комплексный анализ морфологии половых и соматических клеток (кумулюс) овариальных фолликулов свиней после воздействия низких и сверхнизких температур (витрификация) при включении в протокол низкотемпературного хранения и витрификации TTP<sub>EG</sub>\*10PEG.

**Результаты.** Воздействие 2% TTP<sub>EG</sub>\*10PEG при 5 °C вызывало снижение уровня ооцитов с признаками морфологической дегенерации в сравнении с контролем (с 13 до 5%,  $p = 0,005$ ). После витрификации с TTP<sub>EG</sub>\*10PEG: уровень гамет с низкой экспансией клеток кумулюса увеличился до 35% в сравнении с долей контрольных гамет (23%); доля денудированных гамет была снижена до 50% в сравнении с контрольными 65% ( $p < 0,05$ ); уровень морфологически дегенерированных гамет соответствовал таковому у нативных ооцитов (8%) и был ниже, чем в контроле (17%,  $p < 0,005$ ). Полученные данные свидетельствуют о протекторном и криопротекторном эффектах TTP<sub>EG</sub>\*10PEG в концентрации 2%, что предполагает возможность его использования в технологии интраовариальной витрификации женских репродуктивных клеток.

**Ключевые слова:** витрификация, ооцит-кумулюсный комплекс, *Sus scrofa domestica*, кумулюсные клетки, низкие температуры, морфология.

**Для цитирования:** Старикова Д.А., Кузьмина Т.И. Анализ морфологии ооцит-кумулюсных комплексов *Sus scrofa domestica*, подвергшихся воздействию низких и сверхнизких температур. *Аграрная наука*. 2024; 385(8): 139–144.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-385-8-139-144>

© Старикова Д.А., Кузьмина Т.И.

# Analysis of the morphology of *Sus scrofa domestica* oocyte-cumulus complexes exposed to low and ultra-low temperatures

## ABSTRACT

**Relevance.** The priority task of reproductive technologies in animal husbandry is the development of effective storage protocols for female gametes. One way to preserve gametes is vitrification, which reduces damage to intracellular organelles by increasing viscosity upon cooling and minimizing crystallization.

**Methods.** Various additives to cryoprotectants are used for optimization. In our work, titanium tetrapolyethylene glycolate was used in a 10-fold molar excess of polyethylene glycol (TTP<sub>EG</sub>\*10PEG), the nature of the effect of which on cells was studied during short-term storage at low (5 °C) and ultra-low temperatures (-196 °C).

*The purpose of the study* is a comprehensive analysis of the morphology of gametes and somatic cells (cumulus) of ovarian follicles of pigs after exposure to low and ultra-low temperatures (vitrification) when included in the TTP<sub>EG</sub>\*10PEG low-temperature storage and vitrification protocol.

**Results.** Exposure to TTP<sub>EG</sub>\*10PEG at 5 °C caused an increase in the level of oocytes with subsequent morphological degenerations in points with control (from 13% to 5%,  $p = 0.005$ ). After vitrification with TTP<sub>EG</sub>\*10PEG: the level of gametes with low cumulus cells expansion increased to 35% in terms of the proportion of control gametes (23%); the proportion of denuded gametes was reduced to 50% compared to the control 65% ( $p < 0.05$ ); the level of morphologically degenerated gametes corresponded to that of native oocytes (8% each) and was lower than in the control (17%),  $p < 0.005$ . The obtained data indicate the protective and cryoprotective effects of TTP<sub>EG</sub>\*10PEG at a concentration of 2%, which suggests the possibility of its use in the technology of intraovarian vitrification of female reproductive cells.

**Key words:** vitrification, oocyte-cumulus complex, *Sus scrofa domestica*, cumulus cells, low temperature, morphology.

**For citation:** Starikova D.A., Kuzmina T.I. Morphology analysis of *Sus scrofa domestica* oocyte-cumulus complexes exposed to low and ultra-low temperatures. *Agrarian science*. 2024; 385(8): 139–144 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-385-8-139-144>

© Starikova D.A., Kuzmina T.I.

## Введение/Introduction

В настоящее время одной из важнейших целей животноводства является сохранение генофонда особо ценных пород и особей. Реализация поставленной задачи осуществляется путем создания банков криоконсервированных репродуктивных клеток и эмбрионов животных. Однако выход донорских декриоконсервированных ооцитов с высокими качественными характеристиками, способными к созреванию, в отличие от эмбрионов, низкий (до 33%) [1]. Тем не менее женский генетический материал является важным составляющим в рамках сохранения генофонда и использования в инновационных клеточных репродуктивных технологиях для получения трансгенных или клонированных животных.

В технологиях хранения женских гамет используются методы экстра- или интрафолликулярной криоконсервации. Оптимизированным вариантом этого вида замораживания является витрификация, при которой образцы хранятся в жидком азоте (-196 °С) и сохраняют жизнеспособность после оттаивания. При витрификации происходит мгновенный переход из жидкого состояния в твердое с минимизацией кристаллизации за счет увеличения вязкости при охлаждении, что приводит к снижению повреждения внутриклеточных органелл [2].

Для модернизации протоколов замораживания ооцитов с целью исключения внутриклеточных повреждений применяются различные вещества, обладающие криопротекторными свойствами, подобно традиционному криопротектору — глицерину.

Одним из таких веществ является тетраполиэтиленгликолят титана в 10-кратном мольном избытке полиэтиленгликоля (ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG) [3], синтезированный в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского (УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия). Данное вещество прозрачное, светло-желтого цвета, легко растворяется в воде и полиэтиленгликолях. При растворении ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG в воде происходит быстрый обратимый гидролиз, возрастает вязкость раствора, формируется полимерный пространственный каркас с образованием прозрачного монолитного геля [4].

Хранение ооцита при воздействии низких и сверхнизких температур осуществляют в комплексе с окружающими его кумулюсными клетками. Соматические клетки в составе ооцит-кумулюсного комплекса, взаимодействуя с ооцитом, снабжают гамету важными биомолекулами, транспортируют их в цитозоль [5, 6]. С другой стороны, ооцит-секретируемые факторы роста (OSF) индуцируют пролиферацию соматических клеток фолликула [7].

Взаимодействие кумулюсных и половых клеток осуществляется через тесные межклеточные связи. Функциональное состояние данных соматических клеток оказывает влияние на качество гаметы, в связи с чем является важным маркером прогнозирования качества ооцита на любом этапе развития или в процессе низкотемпературного хранения и замораживания (оттаивания). Следуя вышесказанному, комплексное тестирование морфологии гаметы и окружающих ее клеток кумулюса при воздействии различных факторов, в частности низких и сверхнизких температур, представляет интерес для разработки оптимальных протоколов технологий хранения овариальных клеток.

Наиболее подходящими вариантами для оценки качества клеток являются гаметы от многоплодных сельскохозяйственных животных свиней, ввиду чего можно получить большое количество гамет из одного яйчника. Кроме того, ооциты свиней содержат высокий уровень интрацеллюлярных липидных капель, препятствующих

процессу замораживания, в связи с чем именно этот объект служит хорошей моделью для оценки качества гаметы.

**Цель исследования** — комплексный анализ морфологии половых и соматических клеток (кумулюс) овариальных фолликулов свиней после воздействия низких (краткосрочное хранение при температуре 5 °С) и сверхнизких температур (витрификация) при включении в протокол низкотемпературного хранения и витрификации ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG.

## Материалы и методы исследования / Materials and methods

Исследования проводились на базе ВНИИГРЖ. Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) из фрагментов яйчников (ФЯ) свиней. Яйчники от 6–8-месячных свиной породы ландрас получали *post mortem* на мясокомбинате ОАО «Тосненский». Яйчники на стадии фолликулярного роста без видимых патологических изменений разделяли скальпелем на 6–8 фрагментов размером примерно 15 × 20 мм.

Для низкотемпературного хранения (5 °С) ФЯ помещали в фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко (ФСБ, Россия) и хранили в холодильнике в течение 3 часов при 5 °С (контроль).

Опытные группы ооцитов содержали в ФСБ с добавлением ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG в концентрации 2%. ОКК выделяли путем резекции из ФЯ для анализа морфологии и проницаемости мембран клеток.

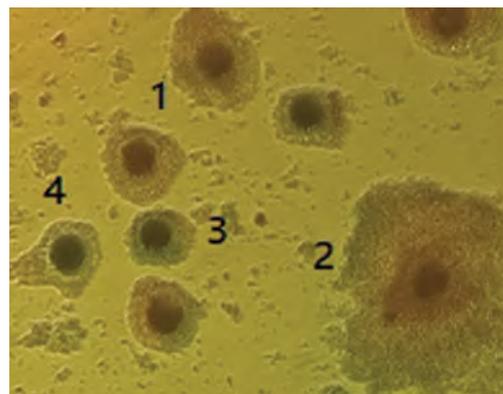
Оценку проницаемости мембраны проводили путем окрашивания ооцит-кумулюсных комплексов в течение 25 минут в красителе лиссаминовый зеленый (ContaCare, Индия) при 24 °С по модифицированной методике А. Bartkova [8]. Краситель проникает сквозь поврежденную мембрану клетки в цитоплазму и накапливается в цитозоле, следовательно, клетки с поврежденной мембраной окрашиваются в зеленый цвет, а клетки с целой мембраной остаются бесцветными.

ОКК ранжировали по группам:

- ✓ 1. ОКК без окраски;
- ✓ 2. ОКК с окраской менее 50% кумулюсных клеток, ооцит не окрашен;
- ✓ 3. ОКК с окраской кумулюсных клеток более 50%, ооцит не окрашен;
- ✓ 4. Окраска ооцита и кумулюсных клеток;
- ✓ 5. Окраска только ооцита (рис. 1).

**Рис. 1.** Ооциты с различной проницаемостью клеток: 1. ОКК без окраски; 2. ОКК с окраской менее 50% кумулюсных клеток, ооцит не окрашен; 3. ОКК с окраской более 50% кумулюсных клеток, ооцит не окрашен; 4. Окраска ооцита и кумулюсных клеток

**Fig. 1.** Oocytes with different cell permeability: 1. OCC without staining; 2. OCC with a stain of less than 50% of cumulus cells, the oocyte is not colored; 3. OCC with a stain of more than 50% of cumulus cells, the oocyte is not colored; 4. Coloring of the oocyte and cumulus cells



Для витрификации гамет готовили криопротекторные агенты (КПА) на основе ФСБ с 20% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ): КПА-1 — 7,5% ЭГ + 7,5% ДМСО, затем в КПА-2 — 15% ЭГ, 15% ДМСО и 0,5 М сахарозы. В КПА-2 внесли ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG в концентрации 2%. В отборе концентрации руководствовались рекомендациями разработчиков (Институт органического синтеза УрО РАН им. И.Я. Постовского) [9]. Экспонировали ФЯ в растворах КПА в соответствии с протоколом, описанным ранее [10], последовательно в течение 25 мин. и 15 мин. ФЯ в стерильных марлевых мешочках погружали в жидкий азот (-196 °С) для хранения — не менее чем на сутки. Образцы девитрифицировали поочередно: 1 мин. в растворе 80% ФСБ, 20% ФБС, 0,5 моль/л сахарозы, а затем 5 мин. в растворе: 80% ФСБ, 0,25 моль/л сахарозы.

После оттаивания ФЯ ооцит-кумулюсные комплексы выделяли резекцией фолликулов. Выделенные в ФСБ из ФЯ ооцит-кумулюсные комплексы оценивали по степени экспансии кумулюсных клеток и морфологии ооцитов. ОКК ранжировали по степени экспансии кумулюса: низкая степень экспансии — от 8 и более компактных слоев КК; средняя степень экспансии — неоднородный (компактный и рыхлый) кумулюс; высокая степень экспансии — более 8 рыхлых слоев КК.

К дегенерированным ооцитам относили гаметы с поврежденной или неравномерной по ширине зоной пеллюциды, гетерогенной, вакуолизированной, фрагментированной ооплазмой (рис. 2).

Для сравнения результатов экспериментов использовали критерий  $\chi^2$  с помощью программы Statistica 6.0 (США). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при четырех уровнях значимости:  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ;  $p < 0,005$  для трех независимых экспериментов.

### Результаты и обсуждение / Results and discussion

Начальный этап серии экспериментов по оценке криозащитных эффектов ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG — оценка проницаемости мембраны соматических и половых клеток, выделенных из нативных и экспонированных при низких температурах в течение 3 часов с ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG (рис. 3). Анализ проницаемости стенок клеточной мембраны показал, что краткосрочное воздействие низких температур (5 °С) негативно отражается на проницаемости мембраны ооцитов, что выражается в снижении доли неокрашенных ОКК, не имеющих окраски лиссаминовым зеленым красителем (48% против 30% соответственно,  $p < 0,01$ ).

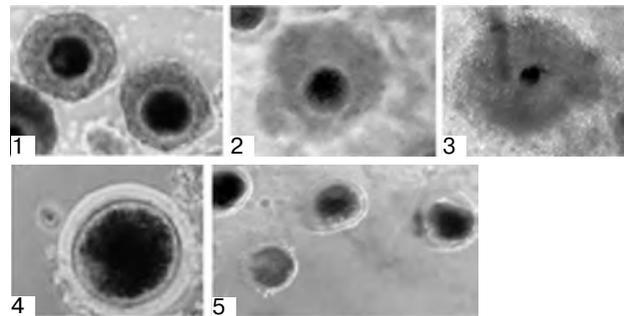
Воздействие низких температур в течение 3 часов увеличило выход ооцитов с интенсивной окраской лиссаминовым зеленым в сравнении с группой нативных гамет с 6 до 23% в контрольной группе ( $p < 0,001$ ) и до 17% в опытной группе ( $p = 0,005$ ).

В целом представленные данные свидетельствуют о негативном влиянии низких температур хранения (5 °С). Тем не менее введение в фосфатно-солевой буфер ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG не вызывало достоверного снижения уровня ОКК без окраски.

Наряду с проницаемостью клеточной мембраны важным показателем качества ОКК является наличие плотного кумулюса, окружающего ооцит. Кумулюсные клетки выполняют питательную функцию по отношению к

**Рис. 2.** Ооциты с разной степенью экспансии кумулюсных клеток и дегенерированные ооциты: 1 — ооциты с низкой степенью экспансии КК, 2 — ооцит со средней экспансией КК, 3 — ооцит с высокой экспансией КК, 4 — денудированный ооцит, 5 — дегенерированные ооциты

**Fig. 2.** Oocytes with varying degrees of expansion of cumulus cells and degenerated oocytes: 1 — oocytes with a low degree of CCs expansion, 2 — oocyte with medium CCs expansion, 3 — oocyte with high CCs expansion, 4 — denudated oocyte, 5 — degenerated oocytes



гамете, снабжая ее необходимыми питательными веществами и регуляторными молекулами через щелевые контакты. Кроме того, они регулируют процессы ингибирования и реинициации мейоза в ооцитах, поэтому необходимы для роста и созревания ооцитов [11].

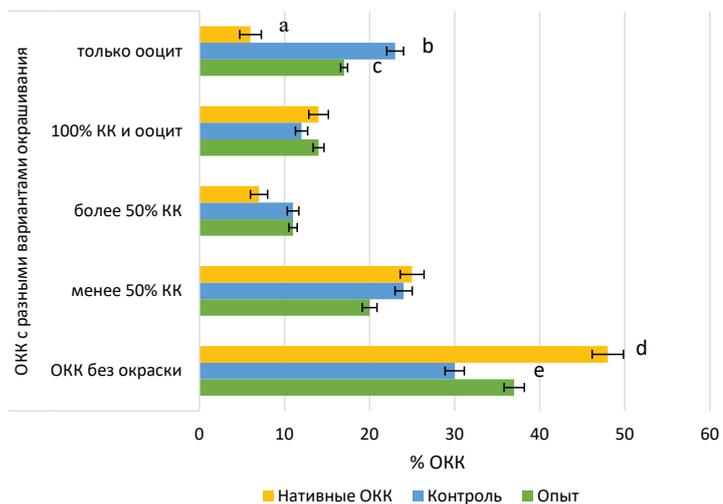
После экспозиции в течение 3 часов при температуре 5 °С с введением раствора ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG выявлено достоверное снижение ( $p < 0,05$ ) доли гамет с низкой экспансией кумулюсных клеток (до 18% в сравнении с группой нативных гамет (35%), а также контрольной группой (30%) (рис. 4).

Уровень нативных ооцитов со средним уровнем экспансии клеток кумулюса значительно превышал уровни гамет контрольной (26% против 11% соответственно,  $p < 0,05$ ) и опытной (26% против 10% соответственно,  $p < 0,005$ ) групп.

Аналогично доля нативных ооцитов с высокой экспансией клеток кумулюса значительно превышала доли гамет контрольной (18% против 2% соответственно,  $p < 0,005$ ) и опытной (18% против 3% соответственно,  $p < 0,005$ ) групп.

**Рис. 3.** Оценка проницаемости мембран ооцитов и кумулюсных комплексов после экспозиции краткосрочного низкотемпературного хранения (5 °С, 3 часа), ( $n = 234$ ): контроль — ОКК после экспозиции в ФСБ; опыт — ОКК после экспозиции в ФСБ с добавлением 2% ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG. Достоверные различия по критерию  $\chi^2$ : а:с  $p = 0,005$ , а:б  $p < 0,001$ , д:е  $p < 0,01$

**Fig. 3.** Assessment of the permeability of oocyte membranes and cumulus complexes after exposure to short-term low-temperature storage (5 °С, 3 hours), ( $n = 234$ ): control — COC after exposure to the FSB; experience — COC after exposure to PBS with the addition of 2% ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG. Significant differences by  $\chi^2$  test: а:с  $p = 0.005$ , а:б  $p < 0.001$ , д:е  $p < 0.01$



Экспозиция гамет в течение 3 часов при 5 °С приводила к увеличению доли денудированных гамет контрольной и опытной групп до 57% и 69%, соответственно, в сравнении с долей нативных ооцитов 21% ( $p < 0,001$ ).

Оценка качества гамет по морфологии представлена в таблице 1.

Внесение TTP<sub>EG</sub>\*10PEG в контрольную среду для краткосрочного низкотемпературного хранения при температуре 5 °С в течение 3 часов обеспечило снижение доли дегенерированных гамет до 5% в сравнении с долей контрольных гамет 13% ( $p < 0,005$ ).

Вышеописанные данные свидетельствуют о цитопротекторном эффекте TTP<sub>EG</sub>\*10PEG, влияющем на качество кумулюсных и половых клеток свиней в условиях низкотемпературной обработки, представленных в методике настоящей публикации.

Известно, что TTP<sub>EG</sub>\*10PEG в водной среде создает сетчатую структуру полимерных гидрогелей в виде плотной пленки, образуя гидрогелевую оболочку вокруг исследуемой структурной единицы [12], возможно, снижающую процесс кристаллообразования.

Учитывая позитивные эффекты TTP<sub>EG</sub>\*10PEG на морфологические показатели ОКК в условиях обработки низкими температурами в следующей серии экспериментов, были проанализированы уровень экспансии и доля дегенерированных клеток из ФЯ, подвергшихся витрификации с использованием в качестве добавки во второй криопротектор TTP<sub>EG</sub>\*10PEG.

На рисунке 5 и в таблице 2 представлены результаты по оценке морфологии интраовариально витрифицированных соматических и половых клеток.

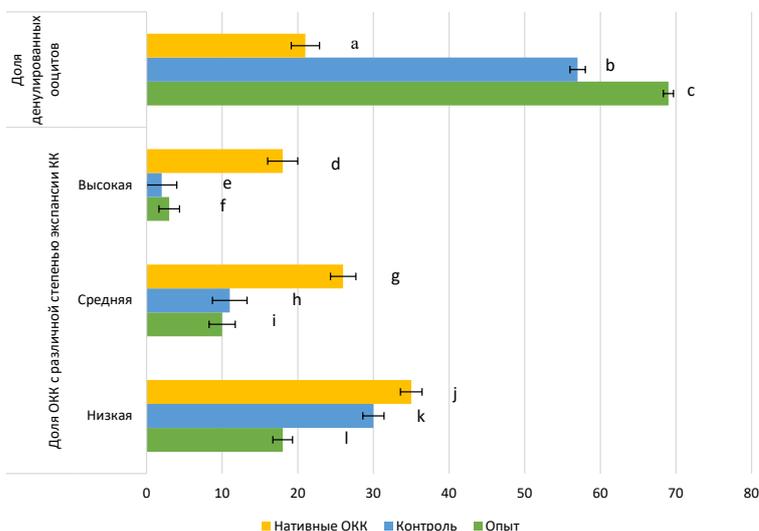
Минимальная доля ооцитов без кумулюса (21%) обнаружена в группе нативных гамет, что достоверно ниже доли денудированных ооцитов, интраовариально витрифицированных как без (65%,  $p < 0,001$ ), так и с использованием раствора в TTP<sub>EG</sub>\*10PEG в концентрации 2% (50%,  $p < 0,001$ ). Кроме того, внесение TTP<sub>EG</sub>\*10PEG в криопротектор снизило долю денудированных гамет на 15% в сравнении с контрольной группой (50% против 65% соответственно,  $p < 0,05$ ).

В контрольной группе достоверно снизился уровень гамет со средней экспансией КК до 8% по сравнению с нативными ОКК 26% ( $p < 0,001$ ).

После витрификации, вероятно, из-за быстрого снижения температуры, резко уменьшается доля гамет с высокой экспансией клеток кумулюса в сравнении с долей нативных клеток (18%) на 13% в контрольной и на 14% в опытной группах ( $p < 0,005$ ). Последнее может быть вызвано ростом денудированных клеток

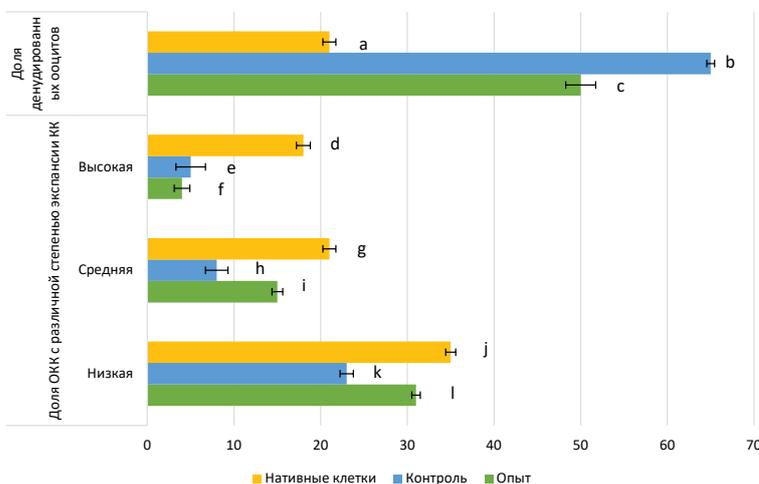
**Рис. 4.** Морфология кумулюса ооцит-кумулясных комплексов из фрагментов яичников, подвергшихся краткосрочному низкотемпературному хранению (5 °С, 3 часа), ( $n = 1014$ ): контроль — ОКК после экспозиции в ФСБ; опыт — ОКК после экспозиции в ФСБ с добавлением 2% TTP<sub>EG</sub>\*10PEG. Достоверные различия по критерию  $\chi^2$ :  $p < 0,05$ ; g,h, j;l, k;l,  $p < 0,005$ ; d:e, d:f, g;i,  $p < 0,001$  a:b, a:c

**Fig. 4.** Morphology of cumulus of oocyte-cumulus complexes from ovarian fragments subjected to short-term low-temperature storage (5 °C, 3 hours), ( $n = 1014$ ): control — COC after exposure to the FSB; experience — COC after exposure to PBS with the addition of 2% TTP<sub>EG</sub>\*10PEG. Significant differences according to the  $\chi^2$  criterion: g:h, j;l, k;l  $p < 0.05$ , d:e, d:f, g:i  $p < 0.005$ , a:b, a:c  $p < 0.001$



**Рис. 5.** Оценка морфологии ОКК после витрификации фрагментов яичников свиней (-196 °С, 24 часа) с использованием TTP<sub>EG</sub>\*10PEG ( $n = 740$ ): контроль — ОКК после витрификации; опыт — ОКК после витрификации с добавлением 2% TTP<sub>EG</sub>\*10PEG. Достоверные различия по критерию  $\chi^2$ : a:b, a:c, g:h  $p < 0,001$ , d:e, d:f  $p < 0,005$ , b:c  $p < 0,05$

**Fig. 5.** Assessment of the morphology of COC after vitrification of fragments of pig ovaries (-196 °C, 24 hours) using TTP<sub>EG</sub>\*10PEG ( $n = 740$ ): control — COC after vitrification; experience — COC after vitrification with the addition of 2% TTP<sub>EG</sub>\*10PEG. Significant differences according to the  $\chi^2$  criterion: a:b, a:c, g:h  $p < 0.001$ , d:e, d:f  $p < 0.005$ , b:c  $p < 0.05$



**Таблица 1.** Влияние TTP<sub>EG</sub>\*10PEG на морфологию ооцитов из фрагментов яичников, подвергшихся краткосрочному низкотемпературному хранению (5 °С, 3 часа), ( $n = 793$ )

**Table 1.** Effect of TTP<sub>EG</sub>\*10PEG on the morphology of oocytes from ovarian fragments subjected to short-term low-temperature storage (5 °C, 3 hours), ( $n = 793$ )

Группы эксперимента	n (%) ооцитов с признаками морфологической дегенерации	Всего, n
Нативные клетки	20(8) <sup>a</sup>	258
Контроль	39(13) <sup>b</sup>	309
Опыт	11(5) <sup>c</sup>	226

Примечание: контроль — ОКК после экспозиции в ФСБ; опыт — ОКК после экспозиции в ФСБ с добавлением 2% TTP<sub>EG</sub>\*10PEG. Достоверные различия по критерию  $\chi^2$ : b:c  $p < 0,005$   
 Note: control — COC after exposure to the FSB; experience — COC after exposure to PBS with the addition of 2% TTP<sub>EG</sub>\*10PEG. Significant differences according to the  $\chi^2$  criterion: b:c  $p < 0.005$

в результате драматического разрыва ооцит-кумулясных коммуникаций.

Обнаружены достоверные различия между долями нативных и витрифицированных в контрольных условиях гамет с признаками морфологической дегенерации (8% против 17% соответственно,  $p < 0,005$ ).

Показано снижение доли дегенерированных гамет, витрифицированных в опытных условиях в сравнении с долей ооцитов, замороженных в контрольных условиях (8% против 17% соответственно,  $p < 0,005$ ). При этом доля морфологически дегенерированных гамет опытной группы соответствовала уровню нативных ооцитов (8%).

Внесение ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG в фосфатно-солевой буфер для экспозиции при температуре 5 °С в течение 3 часов оказывает криозащитный эффект на проницаемость клеточных мембран как кумулюсных клеток, так и ооцитов. Проявление данного свойства выразилось в тенденции к увеличению доли ооцит-кумулясных комплексов без окраски лиссаминовым зеленым на 7%. Кроме того, воздействие ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG не оказывает токсического воздействия на гаметы, что подтверждается снижением долей выделенных ооцитов с признаками морфологической дегенерации в условиях как низких, так и сверхнизких температур.

Выявленные показатели опытных клеток, по всей видимости, зависят от структурных особенностей глицероля, содержащего титан, поскольку глицероаль имеет свойство хорошо растворяться в воде с выделением содержащих титан структур. В организме титан может выполнять противомикробную функцию за счет уникального свойства при УФ-облучении, приводящего к образованию синглетного кислорода и супероксид-аниона, которые способны повреждать клеточные оксиданты [13].

Однако в свободном виде титан используется организмами редко, несколько чаще встречаются варианты металлопротеинов, в том числе содержащих титан [14]. В целом в организме больше используются формы растворимых гидроксидов в виде органических или минеральных комплексов.

Таблица 2. Влияние ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG на показатели морфологической дегенерации ооцитов из девитрифицированных фрагментов яичников свиней (-196 °С, 24 часа), ( $n = 740$ )

Table 2. Effect of ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG on indicators of morphological degeneration of oocytes from devitrified fragments of pig ovaries (-196 °C, 24 hours), ( $n = 740$ )

Группа эксперимента	Доля ооцитов с признаками морфологической дегенерации, $n$ (%)	Всего, $n$
Нативные ОКК	20 (8) <sup>a</sup>	258
Контроль	38 (17) <sup>b</sup>	230
Опыт	19 (8) <sup>c</sup>	252

Примечание: контроль — ОКК после витрификации; опыт — ОКК после витрификации с добавлением 2% ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG. Достоверные различия по критерию  $\chi^2$ :  $p < 0,005$  <sup>a,b,c</sup>.

Note: control — COC after vitrification; experience — COC after vitrification with the addition of 2% ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG. Significant differences according to the  $\chi^2$  criterion: <sup>a,b,c</sup>  $p < 0,005$

Основываясь на вышесказанном, можно предполагать, что при взаимодействии с фосфатно-солевым буферным раствором или криопротектором из глицероля образуются содержащие титан компоненты, которые оказывают непосредственное протекторное воздействие на содержимое клетки, проникая через поры клетки или же обволакивая оболочку клетки.

### Выводы/Conclusions

В результате исследования проведен комплексный анализ морфологии ооцит-кумулясных комплексов овариальных фолликулов свиней после воздействия низких и сверхнизких температур при введении ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG в схему протокола.

Выявлены протекторный и криопротекторный эффекты тетраполиэтиленгликоля титана в 10-кратном мольном избытке полиэтиленгликоля на морфологические показатели соматических и половых клеток овариальных фолликулов свиней. Данные выражались в снижении уровней дегенерированных ооцитов, а также высоких показателях ОКК с низкой экспансией кумулюсных клеток.

Таким образом, результаты эксперимента могут быть использованы в технологии интраовариальной витрификации женских репродуктивных клеток на основе углубленного анализа воздействия ТТР<sub>EG</sub>\*10PEG на структурные компартменты ооцитных гамет.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные. Все авторы внесли равный вклад в работу. Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data. All authors made an equal contribution to the work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена в рамках выполнения научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме ГЗ № НИОКТР 124020200127-7.

### FUNDING

The study was funded by scientific research of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation on the topic No. НИОКТР 124020200127-7.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Kuzmina T.I., Chistyakova I.V. Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domestica* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021; 25(6): 613–619. <https://doi.org/10.18699/VJ21.069>
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. *Biopreservation and Biobanking*. 2019; 17(1): 76–83. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0039>
- Хонина Т.Г., Сафронов А.П., Иваненко М.В., Чупахин О.Н., Пушин В.Г. Полиэтиленгликоляты титана и гидрогели на их основе. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2014; 7: 1639–1642. <https://elibrary.ru/takvjf>
- Иваненко М.В., Хонина Т.Г., Чупахин О.Н. Фармакологически активные кремний-титансодержащие гидрогели на основе полиолатов. *Материалы XIV молодежной конференции по органической химии*. Екатеринбург. 2011; 109–112.

### REFERENCES

- Kuzmina T.I., Chistyakova I.V. Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domestica* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021; 25(6): 613–619. <https://doi.org/10.18699/VJ21.069>
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. *Biopreservation and Biobanking*. 2019; 17(1): 76–83. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0039>
- Honina T.G., Safronov A.P., Ivanenko M.V., Chupakhin O.N., Pushin V.G. Titanium polyethylene glycolates and hydrogels on the basis of the glycolates. *Russian Chemical Bulletin*. 2014; 63(7): 1639–1642. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0647-y>
- Ivanenko M.V., Khonina T.G., Chupakhin O.N. Pharmacologically active silicon-titanium-containing hydrogels based on polyolates. *Proceedings of the XIV youth conference on organic chemistry*. Yekaterinburg. 2011; 109–112.

5. Albertini D.F., Combelles C.M., Benecchi E., Carabatsos M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 2001; 121(5): 647–653. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210647>
6. Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 2002; 61(3): 414–424. <https://doi.org/10.1002/mrd.10102>
7. Gilchrist R.B., Lane M., Thompson J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*. 2008; 14(2): 159–177. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>
8. Bartkova A. *et al.* Characterization of porcine oocytes stained with Lissamine Green B and their developmental potential *in vitro*. *Animal reproduction*. 2020; 17(4): e20200533. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0533>
9. Хонина Т.Г., Чупахин О.Н., Ларионов Л.П., Бояковская Т.Г., Суворов А.Л. Сольватоконплексы глицератов кремния и титана, обладающие транскутанной активностью, и гидрогели на их основе. Патент № 2322448 Российская Федерация. Дата начала отсчета срока действия патента: 10.01.2006. Опубликовано: 20.04.2008. <https://elibrary.ru/urbray>
10. Старикова Д.А., Кузьмина Т.И., Хонина Т.Г. Оценка цитотоксичности гидрогелей кремния на ооцитах свиней при интраовариальной витрификации. *Ветеринария и кормление*. 2023; 6: 71–74. <https://doi.org/10.30917/ATT-VK-1814-9588-2023-6-16>
11. Coticchio G. *et al.* Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*. 2015; 21(4): 427–454. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011>
12. Khonina T.G., Safronov A.P., Ivanenko M.V., Shadrina E.V., Chupakhin O.N. Features of silicon- and titanium-polyethylene glycol precursors in sol-gel synthesis of new hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015; 3(27): 5490–5550. <https://doi.org/10.1039/C5TB00480B>
13. Zierden M.R., Valentine A.M. Contemplating a role for titanium in organisms. *Metallomics*. 2016; 8(1): 9–16. <https://doi.org/10.1039/c5mt00231a>
14. Paredes A., Loh B.M., Peduzzi O.M., Reig A.J., Buettner K.M. DNA Cleavage by a *De Novo* Designed Protein-Titanium Complex. *Inorganic Chemistry*. 2020; 59(16): 11248–11252. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01707>
5. Albertini D.F., Combelles C.M., Benecchi E., Carabatsos M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 2001; 121(5): 647–653. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210647>
6. Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 2002; 61(3): 414–424. <https://doi.org/10.1002/mrd.10102>
7. Gilchrist R.B., Lane M., Thompson J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*. 2008; 14(2): 159–177. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>
8. Bartkova A. *et al.* Characterization of porcine oocytes stained with Lissamine Green B and their developmental potential *in vitro*. *Animal reproduction*. 2020; 17(4): e20200533. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0533>
9. Khonina T.G., Chupakhin O.N., Larionov L.P., Boyakovskaya T.G., Suvorov A.L. Solvate complexes of silicon and titanium glycerates manifesting transcutan activity and hydrogels based thereon. *Patent No. 2322448 Russian Federation*. Starting date of the patent validity period: 10.01.2006. Published: 20.04.2008 (in Russian). <https://elibrary.ru/urbray>
10. Starikova D.A., Kuzmina T.I., Khonina T.G. Evaluation of the cytotoxicity of silicon hydrogels on porcine oocytes at intraovarian vitrification. *Veterinaria i kormlenie*. 2023; 6: 71–74 (in Russian). <https://doi.org/10.30917/ATT-VK-1814-9588-2023-6-16>
11. Coticchio G. *et al.* Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*. 2015; 21(4): 427–454. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011>
12. Khonina T.G., Safronov A.P., Ivanenko M.V., Shadrina E.V., Chupakhin O.N. Features of silicon- and titanium-polyethylene glycol precursors in sol-gel synthesis of new hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015; 3(27): 5490–5550. <https://doi.org/10.1039/C5TB00480B>
13. Zierden M.R., Valentine A.M. Contemplating a role for titanium in organisms. *Metallomics*. 2016; 8(1): 9–16. <https://doi.org/10.1039/c5mt00231a>
14. Paredes A., Loh B.M., Peduzzi O.M., Reig A.J., Buettner K.M. DNA Cleavage by a *De Novo* Designed Protein-Titanium Complex. *Inorganic Chemistry*. 2020; 59(16): 11248–11252. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01707>

#### ОБ АВТОРАХ

##### Дарья Андреевна Старикова

научный сотрудник лаборатории биологии развития, кандидат биологических наук  
live8avis@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-5324-4090>

##### Татьяна Ивановна Кузьмина

главный научный сотрудник лаборатории биологии развития, профессор, доктор биологических наук  
prof.kouzmina@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4218-6080>

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального исследовательского центра животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Московское шоссе, 55А, пос. Тярлево, Пушкин, Санкт-Петербург, 196625, Россия

#### ABOUT THE AUTHORS

##### Darya Andreevna Starikova

Researcher at the Laboratory of Developmental Biology, Candidate of Biological Sciences  
live8avis@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-5324-4090>

##### Tatyana Ivanovna Kuzmina

Chief Researcher of the Laboratory of Developmental Biology, Professor, Doctor of Biological Sciences  
prof.kouzmina@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4218-6080>

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 55A Moskovskoe shosse, village Tyarlevo, Pushkin, St. Petersburg, 196625, Russia