

ОЦЕНКА ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ООЦИТОВ *SUS SCROFA DOMESTICUS*, ВИТРИФИЦИРОВАННЫХ В ПРИСУТСТВИИ ТТР_{EG}*10PEG

Анна Олеговна Притужалова¹, Татьяна Ивановна Кузьмина², Антон Алексеевич Курочкин³
^{1,2,3} Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»,
Российская Федерация

¹ науч. сотрудник, лаборатория биологии развития, orcid.org/0000-0002-2865-9582

² д-р биол. наук, проф., глав. науч. сотрудник, зав. лабораторией биологии развития, orcid.org/0000-0002-4218-6080

³ мл. науч. сотрудник, лаборатории биологии развития, orcid.org/0000-0003-4430-4770

РЕФЕРАТ

Витрификация незрелых ооцитов является одним из ключевых способов сохранения репродуктивных клеток *Sus scrofa domestica* для экспериментальной работы и интенсификации внедрения вспомогательных репродуктивных технологий в ветеринарию, инновационных исследований в биомедицине и фармацевтике. В связи с этим, возникает необходимость совершенствования уже имеющихся и формирования новых протоколов витрификации женских гамет свиней. Сегодня ведутся активные исследования, направленные на применение различных гидрогелей для витрификации в области вспомогательных репродуктивных технологий людей, экспериментальных и сельскохозяйственных животных. Появление новых синтезированных прекурсоров для формирования гидрогелей расширяет возможности криоконсервации, однако, требует предварительного анализа на их цитотоксичность. Данное исследование направлено на оценку цитотоксичности прекурсора гидрогеля тетраполиэтиленгликоля титана в 10 мольном избытке полиэтиленгликоля (ТТР_{EG}*10PEG), использованного в качестве добавки в криопротекторы в протоколе криоконсервации ооцитов свиней на стадии зародышевого пузырька. Ооцит-кумуляусные комплексы (ОКК) получали из фолликулов (диаметр 3-5 мм) постмортальных яичников свиней, ранжировали на 4 группы. Экспериментальные группы обрабатывали растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на основе среды ТС-199 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки: КПА-1 – 0,7 М диметилсульфоксида (ДМСО)+0,9 М этиленгликоля (ЭГ) (экспонирование 30 с); КПА-2 – 1,4 М ДМСО+1,8 М ЭГ (экспонирование 30с); КПА-3 – 2,8 М ДМСО+3,6 М ЭГ+0,65 М трегалозы (экспонирование 20с). Для создания условий опыта в КПА-3 трех экспериментальных групп добавляли ТТР_{EG}*10PEG в концентрациях 0,1, 0,01 и 0,001%. После обработки криопротекторами клетки загружали в соломины и помещали в сосуды Дьюара с LN2 (–196 °C) не менее чем на 1 ч. После девитрификации на водяной бане (120 сек. при 38 °C), проводили оценку статуса хроматина денудированных ооцитов (1,9 μM Hoechst33342), уровня активных форм кислорода (АФК) с помощью флуорохрома DCFH-DA (раб. концентрация 5 мкМ/мл) и митохондриальной активности (500 nM MitoTracker Orange CMTMRos). Выявлено, что добавление в КПА 0,1, 0,01 и 0,001% ТТР_{EG}*10PEG не вызывало достоверного снижения доли клеток с признаками дегенерации после витрификации, отмечено повышение генерации АФК (на 29,5 усл. ед., 34,1 усл. ед. и 15,8 усл. ед. ИФ DCFH-DA) и уровня митохондриальной активности (на 49,21 усл. ед., 31,89 усл. ед., 37,22 усл. ед. ИФ Mito Tracker Orange CMTMRos), что не позволяет рекомендовать применение ТТР_{EG}*10PEG в концентрациях 0,1, 0,01, 0,001% при моделировании состава криопротекторных сред для витрификации ооцитов ввиду отсутствия положительного эффекта на показатели жизнеспособности и морфофункциональной активности девитрифицированных клеток. Мониторинг всех вышеуказанных контролируемых показателей в исследованных концентрациях (0,1, 0,01 и 0,001%) выявил цитотоксичные эффекты на криосохранность женских гамет, что указывает на нецелесообразность использования прекурсора ТТР_{EG}*10PEG в технологии витрификации донорских ооцитов свиней.

Ключевые слова: витрификация, ооцит-кумуляусный комплекс, *Sus scrofa domestica*, гидрогелевые прекурсоры, гидрогели, активные формы кислорода, ядерное созревание.

Для цитирования: Притужалова А.О., Кузьмина Т.И., Курочкин А.А. Оценка оксидативного стресса и морфофункционального статуса ооцитов *Sus scrofa domestica*, витрифицированных в присутствии ТТР_{EG}*10PEG. Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. 2026;2:123-129. <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2026.2.123>

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS AND MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF *SUS SCROFA DOMESTICUS* OOCYTES VITRIFIED IN THE PRESENCE OF ТТР_{EG}*10PEG

Anna O. Prituzhalova¹, Tatiana I. Kuzmina², Anton A. Kurochkin³
^{1,2,3} All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Research Center for Animal Husbandry – All-Russian Research In-

ABSTRACT

Vitrification of immature oocytes is a key method for preserving *Sus scrofa domesticus* reproductive cells for experimental work and for advancing implementation of assisted reproductive technologies in veterinary medicine, as well as innovative research in biomedicine and pharmaceuticals. Therefore, there is a need to improve existing protocols and develop new ones for vitrification of female porcine gametes. Active research is currently underway aimed at using various hydrogels for vitrification in assisted reproductive technologies for humans, experimental animals and farm animals. The emergence new synthesized precursors for hydrogel formation expands possibilities cryopreservation; however, preliminary analysis their cytotoxicity is required. This study aims to evaluate the cytotoxicity of a titanium tetrapolyethylene glycolate hydrogel precursor in a 10-molar excess of polyethylene glycol (TTP_{EG}*10PEG), used as a cryoprotectant additive in cryopreservation protocol for porcine oocytes at germinal vesicle stage. Oocyte-cumulus complexes (OCCs) were obtained from follicles (3-5 mm in diameter) of postmortem porcine ovaries and divided into 4 groups. The experimental groups were treated with cryoprotective agents (CPA) prepared using the TS-199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum: CPA -1: 0,7 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0,9 M ethylene glycol (EG) (30 sec exposure); CPA -2: 1,4 M DMSO + 1,8 M EG (30 sec exposure); CPA -3: 2,8 M DMSO + 3,6 M EG + 0,65 M trehalose (20 sec exposure). To create experimental conditions in CPA -3, TTP_{EG}*10PEG was added to three experimental groups at concentrations of 0,1, 0,01, and 0,001%. After treatment with cryoprotectants, the cells were loaded into straws and placed in Dewar flasks with LN2 (-196 °C) for at least 1 h. After devitrification in water bath (120 sec at 38°C), the chromatin status of denuded oocytes was assessed (1,9 µM Hoechst33342), the level of reactive oxygen species (ROS) using the fluorochrome DCFH-DA (working concentration 5 µM/ml), and mitochondrial activity (500 nM MitoTracker Orange CMTMRos). It was found that the addition of 0,1, 0,01 and 0,001% TTPEG*10PEG to the CPA did not cause a reliable decrease in the proportion of cells with signs of degeneration after vitrification, an increase in ROS generation (by 29,5 conventional units, 34,1 conventional units and 15,8 conventional units of DCFH-DA IF) and level of mitochondrial activity (by 49,21 conventional units, 31,89 conventional units, 37,22 conventional units of Mito Orange CMTMRos IF) was noted, which does not allow us to recommend use of TTP_{EG}*10PEG in concentrations 0,1, 0,01, 0,001% when modeling the composition cryoprotective media for oocyte vitrification due to the lack a positive effect on viability and morphofunctional activity devitrified cells. Monitoring all the above-mentioned controlled parameters at studied concentrations (0,1, 0,01, and 0,001%) revealed cytotoxic effects on cryopreservation female gametes, indicating inappropriateness using the TTP_{EG}*10PEG precursor in vitrification technology donor porcine oocytes.

Key words: vitrification, oocyte-cumulus complex, *Sus scrofa domesticus*, hydrogel precursors, hydrogels, reactive oxygen species, nuclear maturation.

For citation: Prituzhalova A.O., Kuzmina T.I., Kurochkin A.A. Evaluation of oxidative stress and morphofunctional status of *Sus scrofa domesticus* oocytes vitrified in the presence of TTP_{EG}*10PEG. Legal regulation in veterinary medicine. 2026;2:123-129. (in Russ) <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2026.2.123>

ВВЕДЕНИЕ

Вспомогательные репродуктивные технологии свиней являются одним из важнейших направлений воспроизводства в сельском хозяйстве и биомедицинских технологиях. Свиньи являются важным объектом биомедицины для моделирования инфекционных заболеваний, проверки новых синтезированных веществ и фармакологических препаратов [1,2]. В связи с вышесказанным, встает вопрос о получении и длительного хранении генетического материала свиней, в частности женской гаметы.

Витрификация ооцитов — метод, получивший широкое распространение в области вспомогательных репродуктивных технологий сельскохозяйственных животных и обладающий большими возможностями для длительного хранения женских гамет, исчезающих видов и формирования криобанков [3,4]. Данный способ криоконсервации имеет быстрый и простой протокол, не требует специализированного оборудования, способствует блокированию образования точек роста

кристаллов льда в ооплазме, снижая тем самым, повреждения внутриклеточных компартментов [5]. Тем не менее, метод витрификации имеет свои недостатки и самый главный — высокие концентрации криопротекторных агентов. Применение таких веществ, как ДМСО и этиленгликоль в концентрациях, используемых в протоколе витрификации, имеет высокую токсичность, пагубно влияющую на внутриклеточный гомеостаз, проницаемость зоны пеллюцида, компетентность ооцита к оплодотворению [6,7,8]. Ввиду этого ведется активный поиск компонентов, способных стать альтернативой имеющимся криопротекторным агентам и модифицировать уже имеющиеся протоколы витрификации ооцитов свиней.

Исследования, направленные на применение различных гидрогелей в криоконсервации, на данный момент времени активно ведутся и широко распространены в области вспомогательных репродуктивных технологий людей [9], экспериментальных [10] и сельскохозяйственных животных [11]. Показано, что инкапсулирование кле-

ток в гидрогелях в процессе криоконсервации способно ингибировать точки роста льда за счет связывания свободной воды, снижая тем самым повреждения клеточных структур [12], а также позволяет использовать более низкие концентрации криопротекторных агентов [13]. Появление новых синтезированных прекурсоров для формирования гидрогелей расширяет возможности криоконсервации, однако, требует предварительного анализа на цитотоксичность.

Тетраполиэтиленгликолят титана в 10 мольном избытке полиэтиленгликоля (ТТР_{EG}*10PEG) синтезирован в лаборатории органических материалов на базе института органического синтеза им. И. Я. Постовского (г. Екатеринбург). Прекурсор имеет высокую вязкость, имеет светложелтый цвет, легко растворим в воде и полиэтиленгликоле. В результате реакции ТТР_{EG}*10PEG с водой (молярное содержание воды (y) от 20 до 600) получают прозрачные монолитные гидрогели, устойчивые к синерезису, при этом избыток ПЭГ в составе прекурсора сдвигает равновесие гидролиза в сторону исходных соединений, приводя к увеличению вязкости раствора и образованию трехмерной полимерной сетки [14]. Вышеуказанные свойства определяют данный прекурсор, как перспективный компонент для моделирования нового состава криопротекторных сред для витрификации ооцитов свиней.

Цель исследования - оценить генерацию АФК, митохондриальную активность и деструктивные процессы в ооцитах *Sus scrofa domesticus*, витрифицированных с ТТР_{EG}*10PEG (концентрации 0,1%; 0,01%; 0,001%).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ооцит-кумулусные комплексы (ОКК), выделяли из антральных фолликулов яичников *Sus scrofa domesticus* породы ландрас *post mortem* (возраст 6–8 месяцев). ОКК отбирали из антральных фолликулов с высоким тургором, высокой степенью васкуляризации, диаметром от 3 до 6 мм. В экспериментах использовали ооциты с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюциды, окруженные компактными слоем кумулусных клеток (не менее 5–6 слоев). Для процедуры витрификации ОКК обрабатывали тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на основе среды ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Nu-Clone, Великобритания): КПА-1 – 0,7 М диметилсульфоксида (ДМСО)+0,9 М этиленгликоля (ЭГ); КПА-2 – 1,4 М ДМСО+1,8 М ЭГ; КПА-3 – 2,8 М ДМСО+3,6 М ЭГ+0,65 М трегалозы. Для создания условий опыта в КПА-3 трех экспериментальных групп добавляли ТТР_{EG}*10PEG в концентрациях 0,1, 0,01 и 0,001%. Клетки поэтапно экспонировали в течение 30 с в КПА-1, затем 30 с в КПА-2 и 20 с – в КПА-3, загружали в соломины, после чего помещали в сосуды Дьюара с LN2 (–196 °C) не менее чем на 1 ч. В процессе размораживания соломины с витрифицированными ОКК помещали на водяную баню (37°C), инкубировали в течение 120 с., извлекали из соломины и поэтапно экспонировали в 0,25 М растворе трегалозы (3 мин) на основе среды ТС-199 с добавлением 10 %

ФБС при 37 °C, 0,19 М растворе (3 мин) и затем в 0,125 М растворе трегалозы (3 мин).

Для определения доли ооцитов с повышенной генерацией АФК клетки очищали от кумулуса, дважды отмывали в стерильном фосфатно-солевом буфере PBS (t = 38,0 °C), переносили в раствор 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата (DCFH-DA, рабочая концентрация 5 мкМ/мл) и инкубировали в течение 30 мин (t = 38,5 °C), после чего проводили двойную отмывку от остатков флуорохрома [15]. Краситель начинает флуоресцировать только после отщепления ацетильных групп и окисления внутри клетки, превращаясь в 2',7'-дихлорфлуоресцеин.

Для определения уровня митохондриальной активности денудированные ооциты дважды отмывали в стерильном PBS (t = 38,0 °C), переносили в раствор MitoTracker Orange CMTMRos (рабочая концентрация 500 нМ) и инкубировали в темноте при температуре 37 °C в течение 30 минут, после чего проводили двойную отмывку от остатков флуорохрома.

Для оценки статуса хроматина денудированные ооциты помещали на 5–10 мин в теплый (37 °C) 0,9% гипотонический раствор 3-замещенного цитрата натрия, затем переносили на сухое обезжиренное стекло и фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1). Высушенные образцы ооцитов окрашивали раствором Hoechst33342 (рабочая концентрация 1,9 мМ), с добавлением раствора Дабко [16]. Визуализацию образцов, оценку хроматина, интенсивности флуоресценции (ИФ) DCFH-DA и (ИФ) CMTMRos, а также фотофиксацию проводили с помощью микроскопа МИБ2-ФЛ модель ICX41FLLED (Ломо МА) и программного обеспечения MCview. Результаты эксперимента были обработаны с использованием программы Sigma Stat. Все реагенты для исследований, за исключением вышеуказанных, были произведены компанией Sigma-Aldrich. Лабораторная посуда производства фирмы BD Falcon™. Для оценки статистической значимости различий между средними значениями применялся критерий χ^2 при трех уровнях значимости: $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Переживаемость женских гамет цикла витрификации является одним из главных показателей эффективности протокола криоконсервации ооцитов. Результаты оценки дегенеративных изменений хроматина ооцитов свиней представлены на рисунке 2.

Выявлено достоверное повышение доли клеток с дегенерированным хроматином в витрифицированной контрольной группе в сравнении с нативным контролем (на 28%, $p < 0,001$). Примечательно, что добавление в КПА ТТР_{EG}*10PEG не оказало достоверного влияния на сохранность ооцитов – процент клеток с дегенерированным хроматином был выше нативной популяции на 30, 35 и 24% при добавлении 0,1, 0,01 и 0,001% ТТР_{EG}*10PEG. Не обнаружено достоверных отличий по вышеуказанному показателю между контрольной витрифицированной группой и группами, витрифицированными в присутствии 0,1, 0,01 и 0,001% ТТР_{EG}*10PEG.

Активные формы кислорода (АФК) — это

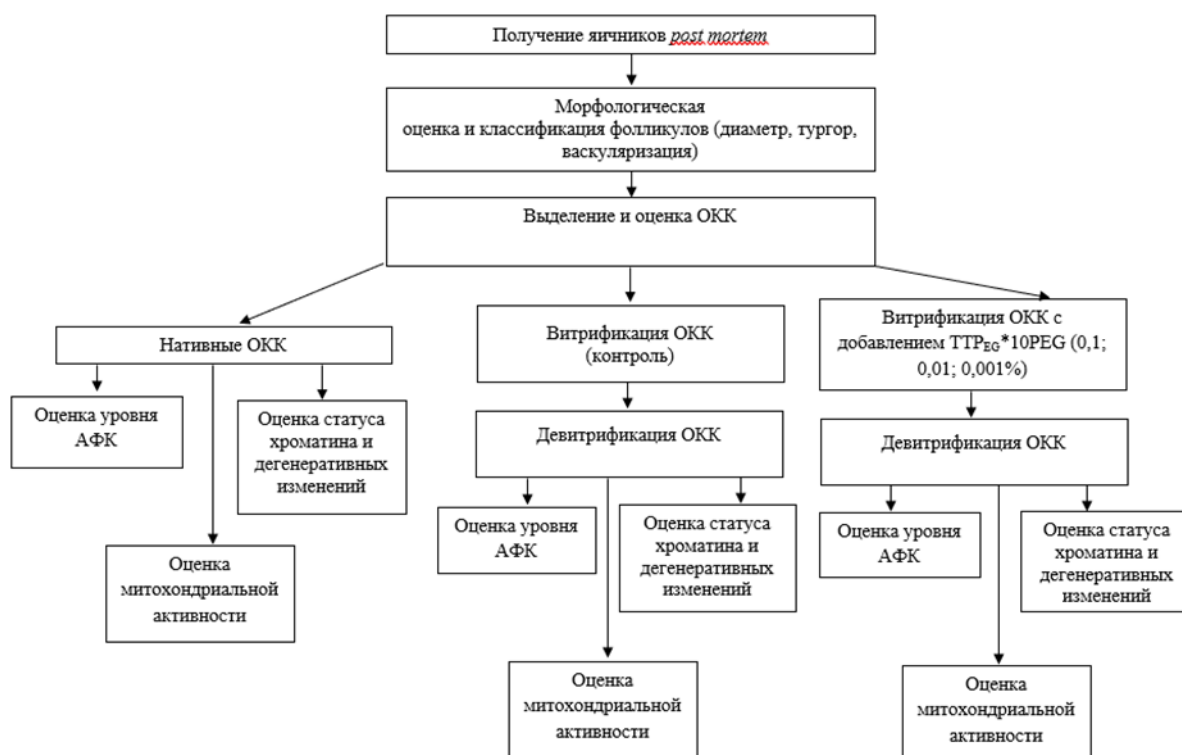


Рисунок 1. Структурно-логическая схема эксперимента. Примечание ОКК-ооцит-кумулюсный комплекс; АФК - активные формы кислорода.

Figure 1. Structural and logical scheme of the experiment. Note: OCC-oocyte-cumulus complex; ROS – reactive oxygen species.

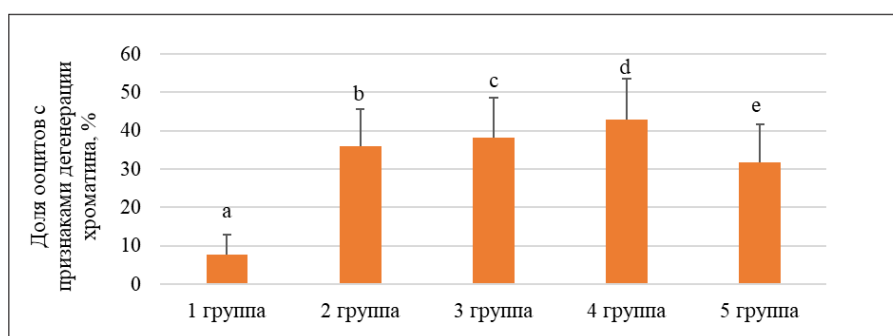


Рисунок 2. Оценка дегенеративных изменений хроматина ооцитов свиней, витрифицированных без и в присутствии ТТР_{EG}*10PEG (n=129). Примечание: 1 группа – нативные ооциты; 2 группа – витрифицированные клетки без ТТР_{EG}*10PEG (контроль); 3 группа - ооциты, витрифицированные с 0,1% ТТР_{EG}*10PEG; 4 группа - ооциты, витрифицированные с 0,01% ТТР_{EG}*10PEG; ооциты, витрифицированные с 0,001% ТТР_{EG}*10PEG. Достоверность сравниваемых значений: ^a:^b; ^a:^c; ^a:^d; ^a:^e - p<0,001.

Figure 2. Evaluation of degenerative changes in chromatin of porcine oocytes vitrified without and in the presence of ТТР_{EG}*10PEG (n=129). Note: Group 1 – native oocytes; Group 2 – vitrified cells without ТТР_{EG}*10PEG (control); Group 3 – oocytes vitrified with 0.1% ТТР_{EG}*10PEG; Group 4 – oocytes vitrified with 0.01% ТТР_{EG}*10PEG; oocytes vitrified with 0.001% ТТР_{EG}*10PEG. Reliability of compared values: ^a:^b; ^a:^c; ^a:^d; ^a:^e - p<0.001.

побочные продукты метаболизма кислорода, образующиеся в результате работы электронно-транспортной цепи клетки. В физиологических значениях АФК могут выступать сигнальными молекулами, контролирующими внутриклеточную и межклеточную сигнализацию. Превышение генерации АФК выше гомеостатического значения вызывает оксидативный стресс, способствует таким нарушениям, как повреждение структуры хроматина, перекисное окисление липидов, повреждение

митохондрий [17]. Оксидативный стресс в ооцитах после процедуры витрификации является одним из ключевых негативных факторов, влияющих на их дальнейшее мейотическое созревание [18].

Показатели генерации АФК и митохондриальной активности в исследуемых группах показан на рисунке 3.

Как видно из рисунка 3, воздействие сверхнизких температур как в контрольной витрифицированной, так и в экспериментальных группах

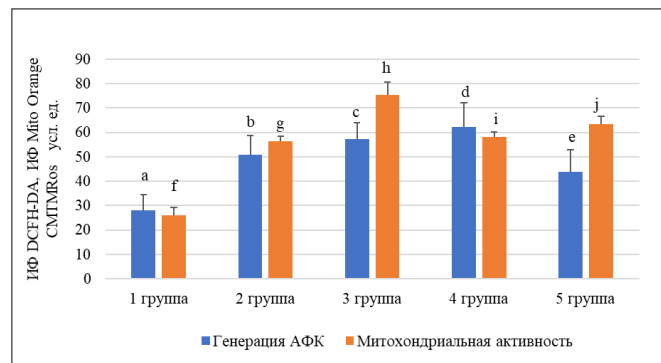


Рисунок 3. Генерация АФК и митохондриальная активность в ооцитах свиней после витрификации с ТТР_{EG}*10PEG (n=159). Примечание: 1 группа – нативные ооциты; 2 группа – витрифицированные клетки без ТТР_{EG}*10PEG; 3 группа – ооциты, витрифицированные с 0,1% ТТР_{EG}*10PEG; 4 группа – ооциты, витрифицированные с 0,01% ТТР_{EG}*10PEG; ооциты, витрифицированные с 0,001% ТТР_{EG}*10PEG. Достоверность сравниваемых значений: a:b - p<0,05; a:c; a:d; g:h; h:i - p<0,01; f:g; f:h; f:i; f:j - p<0,001.

Figure 3. ROS generation and mitochondrial activity in porcine oocytes after vitrification with ТТР_{EG}*10PEG (n=159). Note: Group 1 – native oocytes; Group 2 – vitrified cells without ТТР_{EG}*10PEG; Group 3 – oocytes vitrified with 0.1% ТТР_{EG}*10PEG; Group 4 – oocytes vitrified with 0.01% ТТР_{EG}*10PEG; oocytes vitrified with 0.001% ТТР_{EG}*10PEG. Significance of compared values: a:b - p<0.05; a:c; a:d; g:h; h:i - p<0.01; f:g; f:h; f:i; f:j - p<0.001.

с 0,1, 0,01% и 0,001% ТТР_{EG}*10PEG вызывает повышение генерации АФК в ооцитах, что выражается в его повышении на 22,7, 29,5, 34,1 и 15,8 усл. ед. ИФ DCFH-DA в сравнении с нативным контролем (p<0,05; p<0,01). При этом было выявлено и повышение митохондриальной активности в девитрифицированных ооцитах (как в контрольной, так и в экспериментальных группах) в сравнении с нативными клетками: на 30,15 усл. ед. в контрольной витрифицированной группе (p<0,001); на 49,21 усл. ед. при добавлении 0,1% ТТР_{EG}*10PEG (p<0,001); на 31,89 усл. ед. при 0,01% ТТР_{EG}*10PEG (p<0,001) и на 37,22 усл. ед. при 0,001% ТТР_{EG}*10PEG (p<0,001). При этом, добавление в КПА 0,1% ТТР_{EG}*10PEG вызвал повышение данного показателя в сравнении с витрифицированным контролем на 19,08 усл. ед. (p<0,01) и клетками, витрифицированными с 0,01% ТТР_{EG}*10PEG на 17,32 усл. ед. (p<0,01).

Применение новых синтезированных веществ в технологии витрификации ооцитов свиней является важным направлением ввиду низкой переживаемости незрелых женских гамет и нарушения их дальнейшего мейотического созревания и получения эмбрионов [19]. В нашем исследовании применение в качестве дополнительного компонента нового синтезированного вещества тетраполиэтиленгликоля титана в 10 мольном избытке полиэтиленгликоля не оказало положительного влияния на криотолерантность ооцитов свиней. Прекурсор ТТР_{EG}*10PEG имеет в своем составе такие компоненты, как полиэтиленгликоль и оксид титана (TiO₂) в связанной форме, однако, при низких концентрациях (1% и ниже), данный гидрогель имеет склонность к гидролизу, вследствие чего происходит выпадение в осадок TiO₂. Частицы оксида титана имеют свойство накапливаться в клеточном цитозоле, вызывая избыточную генерацию активных форм кислорода и инициируя, таким образом, оксидативный стресс в клетке [20]. В наших исследованиях до-

бавление в КПА 0,1, 0,01 и 0,001% ТТР_{EG}*10PEG дозозависимо повысило генерацию АФК, а также снизило показатели жизнеспособности ооцитов. Кроме того, присутствие ТТР_{EG}*10PEG в криопротекторе инициировало повышение митохондриальной активности женских гамет (особенно в присутствии 0,1%), что в динамике мейотического созревания ооцитов могло спровоцировать дальнейший оксидативный стресс в клетках, за счет образования побочных продуктов окисления в результате интенсивной работы митохондриальных комплексов I и III в дыхательной цепи клетки [21]. Кроме того, избыток таких криопротекторов, как ДМСО или полиэтиленгликоль также способствуют образованию избытка генерации АФК за счет инициации высвобождения большого количества ионов кальция (Ca²⁺) из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму, а затем поглощению большого количества Ca²⁺ митохондриями, что, возможно, в нашем исследовании также стало причиной повышения высокого содержания АФК и снижении жизнеспособности ооцитов после цикла витрификации [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований показано, что добавление в криопротектор 0,1, 0,01 и 0,001% ТТР_{EG}*10PEG не вызвало достоверного снижения доли клеток с признаками дегенерации после воздействия сверхнизких температур, при этом вызывая повышение генерации АФК (на 29,5, 34,1 и 15,8 усл. ед. ИФ DCFH-DA) и митохондриальной активности (на 49,21, 31,89, 37,22 усл. ед. ИФ Mito Orange CMTMRos). Полученные экспериментальные данные не позволяют рекомендовать применение ТТР_{EG}*10PEG в концентрациях 0,1, 0,01, 0,001% при моделировании криопротекторных сред для витрификации ооцитов ввиду отсутствия положительного эффекта на показатели жизнеспособности и морфофункциональной активности девитрифицированных клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения государственного задания НИОКТР 124020200127-7.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Deręowska A., Solarska-Ściuk K., Wnuk M., Schwarzbacherová V. Pig as an interorgan communication model and its applications in biomaterials, drug delivery, and bioengineering research. *Comprehensive Physiology*. 2025; 15(5):70043. doi: 10.1002/cph4.70043
2. Wei J., Zhang W., Li J., Jin Y., Qiu Z. Application of the transgenic pig model in biomedical research: A review. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022;10:1031812. doi: 10.3389/fcell.2022.1031812
3. Кузьмина Т. И. Влияние витрификации на функционирование актинового цитоскелета в ооцитах свиней. *Ветеринария*. 2025;12:44-49. DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.12.44-49
4. Кузьмина Т. И., Станиславович Т. И. Влияние витрификации на статус хроматина ооцит-кумулюсных комплексов *Sus Scrofa Domesticus*. *Генетика и разведение животных*. 2019;1; 27-33.
5. López A., Ducolomb Y., Casas E., Retana-Márquez S., Betancourt M., F. Casillas. Effects of porcine immature oocyte vitrification on actin microfilament distribution and chromatin integrity during early embryo development in vitro. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021; 9:636765. doi: 10.3389/fcell.2021.636765
6. Nohalez A., Martinez C. A., Gil M. A., Almiñana C., Roca J., Martinez E. A., Cuello C. Effects of two combinations of cryoprotectants on the in vitro developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes. *Theriogenology*. 2015;84(4):545-52. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.04.004
7. Wiltshire A., Schaal R., Wang F., Tsou T., McKerrow W., Keefe D. Vitrification with dimethyl sulfoxide induces transcriptomic alteration of gene and transposable element expression in immature human oocytes. *Genes*. 2023;14:1232. <https://doi.org/10.3390/genes14061232>
8. Zhu Y., Liu H., Zheng L., Luo Y., Zhou G., Li J., Hou Y., Fu X. Vitrification of mammalian oocytes: recent studies on mitochondrial dysfunction. *bioreserve biobank*. 2024;22(5):428-440. doi: 10.1089/bio.2023.0062
9. Tian C., Shen L., Gong C., Cao Y., Shi Q., Zhao G. Microencapsulation and nanowarming enables vitrification cryopreservation of mouse preantral follicles. *Nature communications*. 2022. 15;13(1):7515. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34549-2>
10. Desai N., Attard M., Spangler M., Gishto A., Brown A., Wirtjes M. Application of a novel hyaluronan hydrogel for three-dimensional follicle culture and methodology for mouse ovarian follicle cryopreservation. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2025;(219):10.3791/67786. doi:10.3791/67786
11. Francés-Herrero E., Lopez R., Campo H., de Miguel-Gómez L., Rodríguez-Eguren A., Faus A., Pellicer A., Cervelló I. Advances of xenogeneic ovarian extracellular matrix hydrogels for in vitro follicle development and oocyte maturation. *Biomaterials advances*. 2023;151:213480. doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213480
12. Chang T., Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany)*. 2021;8(6):2002425. doi:10.1002/advs.202002425
13. Huang M., Hu M., Cai G., Wei H., Huang S., Zheng E., Wu Z. Overcoming ice: cutting-edge materials and advanced strategies for effective cryopreservation of biosample. *Journal of nanobiotechnology*. 2025;23(1):187. <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03265-6>
14. Khonina 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. doi:10.1007/s11772-014-0647-y
15. Dikalov S. I., Harrison D. G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(2):372-382. DOI:10.1089/ars.2012.4886
16. Sato A., Sarentonglaga B., Ogata K., Yamaguchi M., Hara A., Atchalalt K., Sugane N., Fukumori R., Nagao Y. Effects of insulin-like growth factor-1 on the in vitro maturation of canine oocytes. *The Journal of reproduction and development*. 2018;64(1):83-88. doi:10.1262/jrd.2017-145
17. Momeni A., Haghpahan T., Nematollahi-Mahani S. N., Ashourzadeh S., Eftekhari-Vaghefi S. H. Comparing the effects of vitrification, before and after mouse oocyte in vitro maturation on developmental competence, changes in epigenetic regulators and stress oxidative response. *Biochemical and biophysical research communications*. 2023;679:179-190. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.09.005
18. Ren J., Liu G., Cui H., Dong X., Mao S., Liu Y., Dai Y. Effect of glutathione addition on vitrification of ovine oocytes. *Theriogenology*. 2025;240:117412. doi: 10.1016/j.theriogenology.2025.117412
19. López A., Ducolomb Y., Casas E., Retana-Márquez S., Betancourt M., Casillas F. Effects of Porcine Immature Oocyte Vitrification on Actin Microfilament Distribution and Chromatin Integrity During Early Embryo Development in vitro. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:636765. doi: 10.3389/fcell.2021.636765
20. Santacruz-Márquez R., Solorio-Rodríguez A., González-Pesos S., García-Zepeda S. P., Santoyo-Salazar J., De Vizcaya-Ruiz A., Hernández-Ochoa I. Comparative effects of TiO2 and ZnO nanoparticles on growth and ultrastructure of ovarian antral follicles. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*. 2020;96:399-412. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.08.003
21. Cao B., Qin J., Pan B., et al. Oxidative Stress and Oocyte Cryopreservation: Recent Advances in Mitigation Strategies Involving Antioxidants. *Cells*. 2022;11(22):3573. Published 2022 Nov 11. doi:10.3390/cells11223573
22. Xu X., Cowley S., Flaim C. J., James W., Seymour L., Cui Z. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnology progress*. 2010;26:827-837. doi: 10.1002/btpr.368

REFERENCES

1. Deręowska A., Solarska-Ściuk K., Wnuk M., Schwarzbacherová V. Pig as an interorgan communication model and its applications in biomaterials, drug delivery, and bioengineering research. *Comprehensive Physiology*. 2025; 15(5):70043. doi: 10.1002/cph4.70043.
2. Wei J., Zhang W., Li J., Jin Y., Qiu Z. Application of the transgenic pig model in biomedical research: A review. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022;10:1031812. doi: 10.3389/fcell.2022.1031812.
3. Kuzmina T.I. Effect of vitrification on the functioning of the actin cytoskeleton in porcine oocytes. *Veterinary medicine*. 2025;12:44-49. DOI:10.30896/0042-4846.2025.28.12.44-49. (In Russ.)
4. Kuzmina T.I., Stanislavovich T.I. Effect of vitrification on the chromatin status in *Sus Scrofa Domesticus* cumulus -

- oocyte complexes. Genetics and breeding of animals. 2019;(1):27-33. (In Russ.)
5. López A., Ducolomb Y., Casas E., Retana-Márquez S., Betancourt M., F. Casillas. Effects of porcine immature oocyte vitrification on actin microfilament distribution and chromatin integrity during early embryo development in vitro. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021; 9:636765. doi: 10.3389/fcell.2021.636765.
 6. Nohalez A., Martínez C. A., Gil M. A., Almiñana C., Roca J., Martínez E. A., Cuello C. Effects of two combinations of cryoprotectants on the in vitro developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes. *Theriogenology*. 2015;84(4):545-52. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.04.004.
 7. Wiltshire A., Schaal R., Wang F., Tsou T., McKerrow W., Keefe D. Vitrification with dimethyl sulfoxide induces transcriptomic alteration of gene and transposable element expression in immature human oocytes. *Genes*. 2023;14:1232. <https://doi.org/10.3390/genes14061232>.
 8. Zhu Y., Liu H., Zheng L., Luo Y., Zhou G., Li J., Hou Y., Fu X. Vitrification of mammalian oocytes: recent studies on mitochondrial dysfunction. *bioreserve biobank*. 2024;22(5):428-440. doi: 10.1089/bio.2023.0062.
 9. Tian C., Shen L., Gong C., Cao Y., Shi Q., Zhao G. Microencapsulation and nanowarming enables vitrification cryopreservation of mouse preantral follicles. *Nature communications*. 2022. 15;13(1):7515. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34549-2>.
 10. Desai N., Attard M., Spangler M., Gishto A., Brown A., Wirtjes M. Application of a novel hyaluronan hydrogel for three-dimensional follicle culture and methodology for mouse ovarian follicle cryopreservation. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2025;(219):10.3791/67786. doi:10.3791/67786.
 11. Francés-Herrero E., Lopez R., Campo H., de Miguel-Gómez L., Rodríguez-Eguren A., Faus A., Pellicer A., Cervelló I. Advances of xenogeneic ovarian extracellular matrix hydrogels for in vitro follicle development and oocyte maturation. *Biomaterials advances*. 2023;151:213480. doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213480.
 12. Chang T., Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced science* (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany). 2021;8(6):2002425. doi:10.1002/adv.202002425.
 13. Huang M., Hu M., Cai G., Wei H., Huang S., Zheng E., Wu Z. Overcoming ice: cutting-edge materials and advanced strategies for effective cryopreservation of biosample. *Journal of nanobiotechnology*. 2025;23(1):187. <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03265-6>.
 14. Khonina 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. doi:10.1007/s11172-014-0647-y.
 15. Dikalov S. I., Harrison D. G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(2):372-382. DOI:10.1089/ars.2012.4886.
 16. Sato A., Sarentonglaga B., Ogata K., Yamaguchi M., Hara A., Atchalalt K., Sugane N., Fukumori R., Nagao Y. Effects of insulin-like growth factor-1 on the in vitro maturation of canine oocytes. *The Journal of reproduction and development*. 2018;64(1):83-88. doi:10.1262/jrd.2017-145.
 17. Momeni A., Haghpahan T., Nematollahi-Mahani S. N., Ashourzadeh S., Eftekhari-Vaghefi S. H. Comparing the effects of vitrification, before and after mouse oocyte in vitro maturation on developmental competence, changes in epigenetic regulators and stress oxidative response. *Biochemical and biophysical research communications*. 2023;679:179-190. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.09.005.
 18. Ren J., Liu G., Cui H., Dong X., Mao S., Liu Y., Dai Y. Effect of glutathione addition on vitrification of ovine oocytes. *Theriogenology*. 2025;240:117412. doi: 10.1016/j.theriogenology.2025.117412.
 19. López A., Ducolomb Y., Casas E., Retana-Márquez S., Betancourt M., Casillas F. Effects of Porcine Immature Oocyte Vitrification on Actin Microfilament Distribution and Chromatin Integrity During Early Embryo Development in vitro. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:636765. doi: 10.3389/fcell.2021.636765.
 20. Santacruz-Márquez R., Solorio-Rodríguez A., González-Posos S., García-Zepeda S. P., Santoyo-Salazar J., De Vizcaya-Ruiz A., Hernández-Ochoa I. Comparative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on growth and ultrastructure of ovarian antral follicles. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.). 2020;96:399-412. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.08.003.
 21. Cao B., Qin J., Pan B., et al. Oxidative Stress and Oocyte Cryopreservation: Recent Advances in Mitigation Strategies Involving Antioxidants. *Cells*. 2022;11(22):3573. Published 2022 Nov 11. doi:10.3390/cells11223573.
 22. Xu X., Cowley S., Flaim C. J., James W., Seymour L., Cui Z. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnology progress*. 2010;26:827-837. doi: 10.1002/btpr.368.

Поступила в редакцию / Received: 12.03.2026

Поступила после рецензирования / Revised: 30.04.2026

Принята к публикации / Accepted: 30.06.2026