

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.5.920-929>



УДК 576.53:636.033

Биотестирование тетраполиэтиленгликолята титана в 10-мольном избытке на культуре клеток гранулезы свиней

© 2024. А. О. Притужалова^{1✉}, Т. И. Кузьмина¹, Т. Г. Хонина², У. С. Никулина¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»,

г. Санкт-Петербург, Российская Федерация,

²ФГБУН Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Оценен эффект воздействия тетраполиэтиленгликолята титана, растворенного в полиэтиленгликоле (соотношение 1:10) (сокращ. $TPEG*10PEG$) на клетки гранулезы (КГ) антральных овариальных фолликулов *Sus scrofa domestica* в динамике культивирования *in vitro*. КГ, аспирированные из овариальных фолликулов (в 3–5 мм) свиней, полученных *post mortem* на мясоперерабатывающем комбинате «Тосненский», культивировали без и в присутствии 0,1, 0,01 и 0,001 % $TPEG*10PEG$. Спустя 22 и 44 часа КГ анализировали методом проточной цитометрии. Комплексный анализ показателей жизнеспособности (митохондриальная активность, доля мертвых клеток) и генерации активных форм кислорода (АФК) в КГ после воздействия $TPEG*10PEG$ выявил, что добавление в среду для культивирования 0,1 % $TPEG*10PEG$ спустя 22 и 44 часа вызывает нарушения функциональной активности КГ, сопровождающиеся снижением митохондриального потенциала мембраны по сравнению с контролем (на 8 и 9 % соответственно, $p < 0,05$) и клеточной гибелью (доля мертвых клеток составила 45 и 41 % соответственно, $p < 0,001$). В группах, культивируемых в присутствии 0,01 и 0,001 % $TPEG*10PEG$, достоверных различий в уровне жизнеспособных КГ при культивировании как на 22, так и 44 часа не выявлено. При этом показано повышение митохондриальной активности в указанных группах в сравнении с контролем и группой, содержащей 0,1 % $TPEG*10PEG$ (на 11 и 13 % соответственно через 22 часа, $p < 0,001$ и на 15 и 27 % через 44 часа, $p < 0,001$). Не обнаружено достоверных различий между исследуемыми группами в показателе генерации АФК в клетках. В целом, идентифицирован дозозависимый негативный эффект $TPEG*10PEG$ (0,1 %). $TPEG*10PEG$ в концентрации 0,01 и 0,001 % не оказал деструктивного влияния на исследуемую популяцию клеток, что свидетельствует о возможности использования $TPEG*10PEG$ в вышеобозначенных концентрациях (0,01 и 0,001 %) для моделирования состава сред, используемых в системах культивирования гранулезных клеток свиней.

Ключевые слова: глицерогели, цитотоксичность, культивирование, *Sus scrofa domestica*, АФК, митохондриальная активность, жизнеспособность

Благодарности: работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (тема № 124020200127-7).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Притужалова А. О., Кузьмина Т. И., Хонина Т. Г., Никулина У. С. Биотестирование тетраполиэтиленгликолята титана в 10-мольном избытке на культуре клеток гранулезы свиней. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2024;25(5):920–929. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.5.920-929>

Поступила: 15.05.2024

Принята к публикации: 26.09.2024

Опубликована онлайн: 30.10.2024

Biotesting of titanium tetrapolyethylene glycolate in 10 molar excess on granulosa cell culture of porcine follicles

© 2024. Anna O. Prituzhalova¹✉, Tatyana I. Kuzmina¹, Tatiana G. Khonina², Ulyana S. Nikulina¹

¹All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Saint Petersburg, Russian Federation

²I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

*The effect of titanium tetrapolyethylene glycolate dissolved in polyethylene glycol (ratio 1:10) (abbreviated TTP_{EG}*10PEG) on granulosa cells (GC) of the antral ovarian follicles of *Sus scrofa domestica* in the dynamics of in vitro culture was assessed. Granulosa cells aspirated from post mortem ovarian porcine follicles (ø 3-5 mm) obtained at the Tosnensky Meat Processing Plant, were cultured without and in the presence of 0.1, 0.01 and 0.001 % TTP_{EG}*10PEG. After 22 and 44 hours, the GC were analyzed by flow cytometry. A comprehensive analysis of viability indicators (mitochondrial activity, apoptosis), as well as the generation of reactive oxygen species (ROS) in the GC after exposure to TTP_{EG}*10PEG, revealed that the addition of 0.1 % TTP_{EG}*10PEG to the culture medium after 22 and 44 hours causes disturbances in the functional activity of the GC, accompanied by a decrease of mitochondrial membrane potential compared to control (by 8 and 9 %, respectively, $p < 0.05$) and cell death (the proportion of cells in apoptosis was 45 and 41 %, respectively, $p < 0.001$). In the groups cultured in the presence of 0.01 % and 0.001 % TTP_{EG}*10PEG, no significant differences in the level of GC in the state of apoptosis were detected when cultured for either 22 or 44 hours. At the same time, an increase in mitochondrial activity was shown in these groups in comparison with the control and the group containing 0.1 % TTP_{EG}*10PEG (by 11 and 13 %, respectively, after 22 hours, $p < 0.001$ and by 15 and 27 % after 44 hours, $p < 0.001$). No significant differences were found between the study groups in the rate of ROS generation in cells. In general, a dose-dependent negative effect of TTP_{EG}*10PEG (0.1 %) was identified. TTP_{EG}*10PEG at concentrations of 0.01 and 0.001% did not have a destructive effect on the studied cell population, which indicates the possibility of using TTP_{EG}*10PEG at the above concentrations (0.01 and 0.001 %) to simulate the composition of media used in porcine granulosa cells culture systems.*

Keywords: glycerogels, cytotoxicity, cultivation, *Sus Scrofa Domestica*, ROS, mitochondrial activity, viability

Acknowledgments: the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst (№ 124020200127-7).

The authors thank the reviewers for their contribution to the expert evaluation of this work.

Conflict of interest: the authors stated that there was no conflict of interest.

For citations: Prituzhalova A. O., Kuzmina T. I., Khonina T. G., Nikulina U. S. Biotesting of titanium tetrapolyethylene glycolate in 10 molar excess on granulosa cell culture of porcine follicles. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2024;25(5):920–929. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2024.25.5.920-929>

Received: 15.05.2024

Accepted for publication: 26.09.2024

Published online: 30.10.2024

Клетки гранулезы (КГ) свиней являются одним из важнейших структурных единиц овариальных фолликулов продуктивных животных, что обуславливает их использование в качестве дополнительного компонента при культивировании ооцитов *in vitro*. Гранулезные клетки продуцируют стероиды, синтезируют факторы роста, белки и сигнальные молекулы для передачи женской гамете. Благодаря этим функциям, клетки гранулезы опосредуют реинициацию мейоза ооцита и дальнейшее успешное приобретение ими компетентности к оплодотворению. Применение КГ в системе кокультивирования ооцитов *in vitro* является одним из эффективных методов повышения доли выхода женских гамет на стадии МП [1, 2]. Добавление новых синтезированных химических соединений может способствовать

улучшению условий культивирования соматических и половых клеток в системе *in vitro*.

Тетраполиэтиленгликолят титана является прекурсором, который хорошо растворим в ПЭГ-400 и воде. Он не является индивидуальным веществом. Полиолаты титана аналогично полиолатам кремния склонны к реакциям межмолекулярной конденсации с выделением полиола и образованием олигомерных продуктов конденсации – олигоэфиров [3]. Избыток полиола в системе сдвигает равновесие реакции в сторону исходного соединения. При растворении полиэтиленгликолятов титана в большом количестве воды ($\gamma > 1000$) происходит их быстрый обратимый гидролиз с выпадением осадка TiO_2 [4].

В наших экспериментах применяли тетраполиэтиленгликолят титана, растворенный

в полиэтиленгликоле (соотношение 1:10) (сокр. ТТР_{EG}*10PEG), разработанный в ФГБУН Института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН. Тетраполиэтиленгликолят в настоящее время активно применяется в разработках гидрогелевых каркасов, является одним из лучших гомогенных биоматериалов, обладающих высокой биосовместимостью [5, 6]. Данное вещество активно используется в системе пролонгированной доставки лекарственных препаратов и способствует активному росту и пролиферативной активности клеток (мезенхимальные стволовые клетки) [7].

Активные формы кислорода (АФК) способны изменять функциональный статус клетки, переводя ее из гомеостатического в условия оксидативного стресса, вследствие чего может происходить изменение мембранного потенциала митохондрий, и, как следствие, инициируется процесс клеточной гибели в результате выхода цитохрома С в цитозоль и активацию каспазного пути [8]. Помимо этого, АФК посредством перекисного окисления липидов (ПОЛ) влияют на мембрану клеток, в результате чего нарушается ее целостность и текучесть [9, 10]. Вышесказанное вызывает необходимость контроля данных показателей в процессе культивирования клеток при воздействии *de novo* синтезированных химических соединений.

Цель исследования – оценить эффекты тетраполиэтиленгликолята титана, растворенного в полиэтиленгликоле (соотношение 1:10) (сокр. ТТР_{EG}*10PEG) на показатели жизнеспособности (доля мертвых клеток, митохондриальная активность) и генерацию активных форм кислорода клеток гранулезы антральных овариальных фолликулов *Sus scrofa domestica* в динамике культивирования *in vitro*.

Научная новизна – впервые оценены и охарактеризованы эффекты ТТР_{EG}*10PEG на показатели жизнеспособности и функциональной активности (митохондриальная активность, генерация АФК) клеток гранулезы овариальных фолликулов свиней, что позволило выявить его оптимальную концентрацию для включения в состав среды для пролонгированного культивирования и, в будущем, моделирования состава криопротекторных сред при витрификации ооцитов вида *Sus scrofa domestica*, а также, в перспективе, для его возможного использования при модификации 3D систем культивирования женских гамет (капсулирование ооцитов) и клеток гранулезы.

Материал и методы. В экспериментах использовали *post mortem* яичники свиней,

породы ландрас в возрасте 6 мес., транспортированные с мясокомбината «Тосненский» в течение 1 часа. Клетки гранулезы аспирировали из фолликулов диаметром 3–5 мм с высоким тургором и обширной сетью капилляров. Популяцию аспирированных клеток гранулезы подвергали отмывке от фолликулярной жидкости в фосфатно-солевом буфере (PBS) («ПанЭко», Россия), после чего разделили на 4 группы: контрольная – культивирование КГ проводили в среде ТС-199 с добавлением фетальной бычьей сыворотки (10 %) (Gibco, USA), 100х антибиотик-антимикотик (Gibco, USA) (содержащий в конечной концентрации 100 мкг/мл стрептомицина, 100 единиц/мл пенициллина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В) при температуре 38,5 °С, с 5 %-ным содержанием CO₂ в 24-луночных планшетах; 3 экспериментальные группы, культивируемые при тех же условиях добавляли 0,1, 0,01 и 0,001 % тетраполиэтиленгликолята титана, растворенного в полиэтиленгликоле (соотношение 1:10) (сокр. ТТР_{EG}*10PEG) соответственно. Спустя 22 и 44 часа клетки гранулезы отделяли от культурального пластика обработкой 0,05%-го раствора трипсина-ЭДТА, промывали в PBS для дальнейшего цитологического анализа.

Для определения доли мертвых клеток применяли пропидия йодид (PI). Для этого клетки гранулезы дважды отмывали в PBS (при 1200 об./мин., 7 мин), для всех образцов довели концентрацию клеток до 1*10⁶/мл, добавляли PI в рабочей концентрации 5 мкг/мл, образцы инкубировали 5–7 минут при 37 °С и анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

Генерацию АФК в клетках анализировали с использованием флуоресцентного красителя 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA). После отмывки КГ и разведения всех образцов до концентрации клеток 1*10⁶/мл в PBS к образцам добавляли DCFH-DA в рабочей концентрации 5 мкМ, инкубировали в течение 30 мин (t = 38,5 °С). Спустя обозначенное время, КГ отмывали от остатков красителя в PBS и анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии. При анализе выделяли две популяции клеток – с высоким и низким содержанием пероксида водорода [11].

Митохондриальную активность клеток исследовали с помощью флуоресцентного красителя LumiTracker Mito Orange CMTMRos (Lumiprobe). К КГ после отмывки в PBS и разведения всех образцов до концентрации

1*10⁶/мл добавляли краситель до конечной концентрации 100 нМ, инкубировали образцы в течение 30 мин при $t = 38,5^{\circ}\text{C}$. После этого клетки дважды отмывали от остатков флуорохрома посредством двукратной отмычки в PBS и проводили анализ методом проточной цитофлуориметрии [12].

Все вышеуказанные цитологические анализы проводили с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences, USA).

Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich. Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™.

Эксперимент проводили в 5 повторностях, результаты исследования обрабатывали с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона при трех уровнях значимости: $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$. На рисунке 1 представлена схема эксперимента.

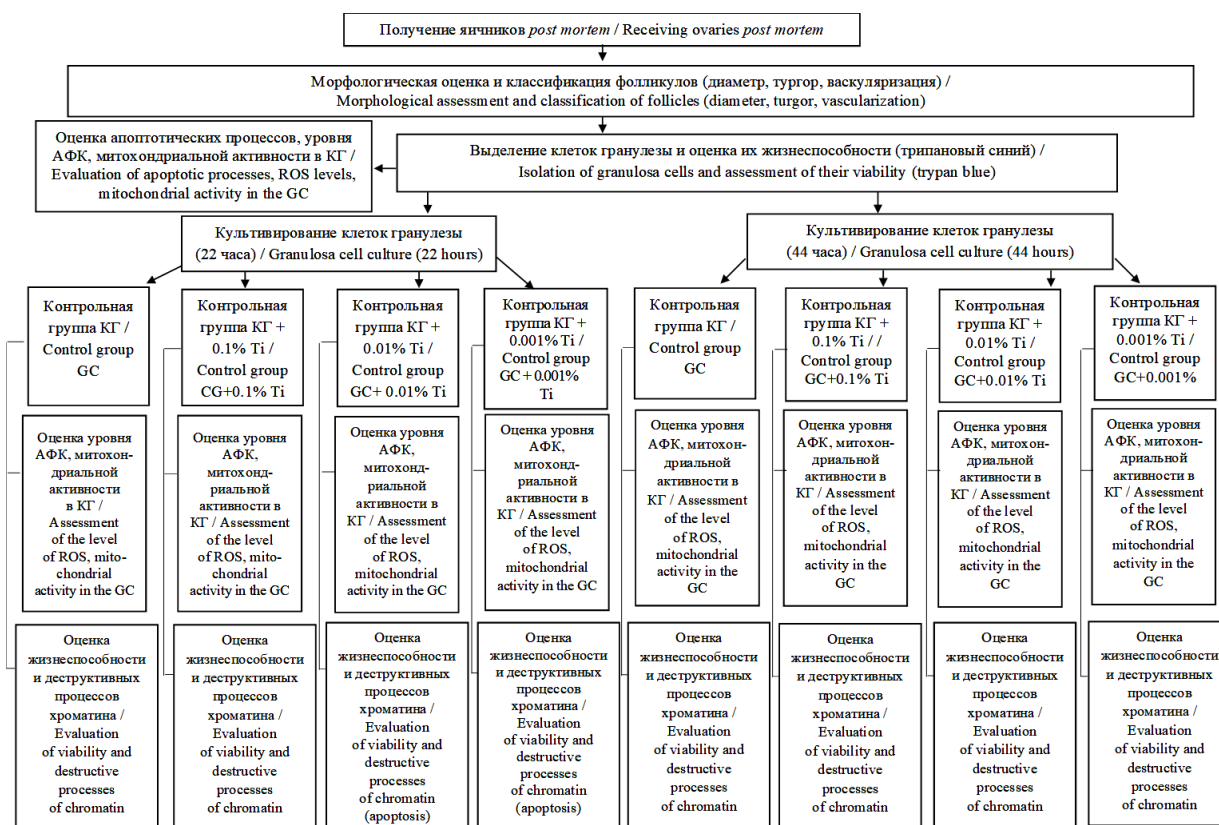


Рис. 1. Схема эксперимента биотестирования тетраполиэтиленгликоля титана в 10-мольном избытке на культуре клеток гранулезы свиней /

Fig. 1. Experimental design for biotesting of titanium tetrapolyethyleneglycolate in 10-molar excess on a culture of pig granulosa cells

Результаты и их обсуждение. Адгезивные и пролиферативные свойства клеток в процессе культивирования являются одним из возможных стартовых показателей оценки эффектов различных биологически активных веществ, в т. ч. и вновь синтезированных инновационных материалов на жизнеспособность и функциональную активность клеток различных биологических объектов. На рисунке 2 представлены изображения образцов клеток

гранулезы в контрольной и экспериментальных средах в динамике культивирования (22 и 44 часа). Морфология клеток контрольной группы (рис. 2, А, Е) представлена умеренно вытянутой формой, наличием 2, 3 ламеллоподий, точечными локализациями на поверхности клеток мест прикрепления к культуральному пластику. Спустя 44 часа наблюдали монослой клеточной культуры с более вытянутой формой клеток.

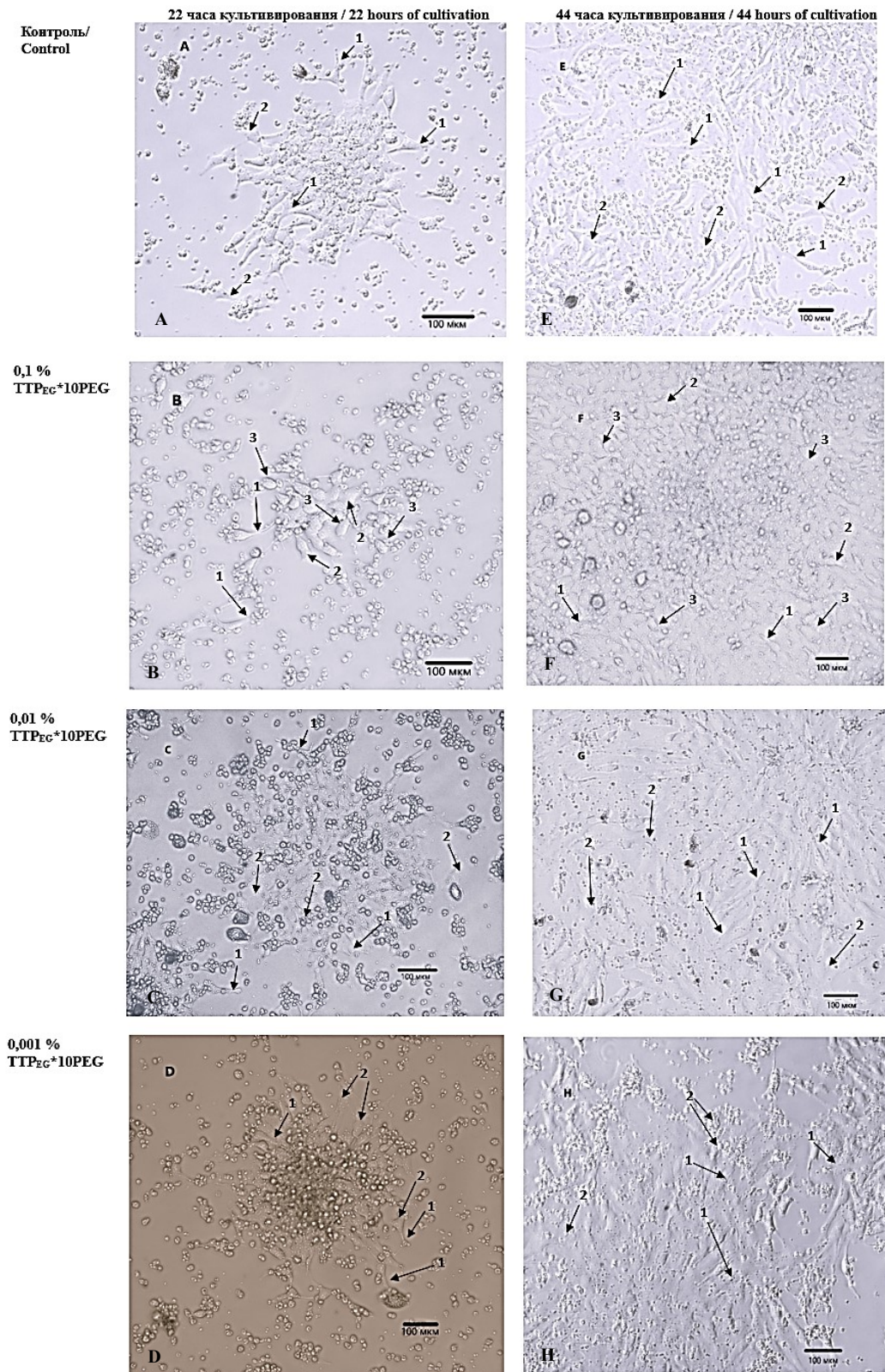


Рис. 2 Репрезентативные изображения КГ *Sus scrofa domesticus* в контрольной среде и с ТТР_{EG}*10PEG в различных концентрациях в динамике культивирования. Стрелка, циф. 1 – ламеллоподии клеток; Стрелка, циф. 2 – места прикрепления клеток к культуральному пластику; стрелка циф. 3 – округлые клетки со слабо выраженными или отсутствующими аллелоподиями, сниженной адгезивной способностью. (Микроскоп МИБ2-ФЛ, ЛОМО) /

Fig. 2. Representative images of GC *Sus scrofa domesticus* in control medium and with TTP_{EG}*10PEG at various concentrations during culture dynamics. Arrow, digital 1 – lamellipodia of cells; Arrow, digital 2 – places of cell attachment to culture plastic; digital arrow 3 – round cells with weakly expressed or absent allelopodia, reduced adhesive ability. (MIB2-FL microscope, LOMO)

Клетки, выращенные в среде в присутствии 0,1 ТТР_{EG}*10PEG % (рис. 2, В, F), более округлые, набухшие, ламеллоподии слабо выражены или отсутствуют, адгезивная способность снижена. Спустя 44 часа также отмечен монослой клеточной культуры, но морфология клеток не изменилась. В присутствии 0,01 % ТТР_{EG}*10PEG (рис. 2, С, G) клетки также имели незначительно округлую форму, идентифицировались ламеллоподии, спустя 44 часа монослой имел высокие адгезивные свойства и четко выраженный межклеточный контакт. Добавление 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG (рис. 2, D, H)

не вызвало морфологических изменений клеток, пролиферативная активность и адгезивные свойства были без существенных изменений и на уровне контрольной группы. При этом спустя 44 часа культивирования монослой клеток был плотно прикреплен к поверхности культурального пластика, клетки имели множество ламеллоподий и тесные межклеточные контакты.

Констатация клеточной гибели при воздействии различных исследуемых веществ является одним из основополагающих аспектов их проверки на цитотоксичность (рис. 3).

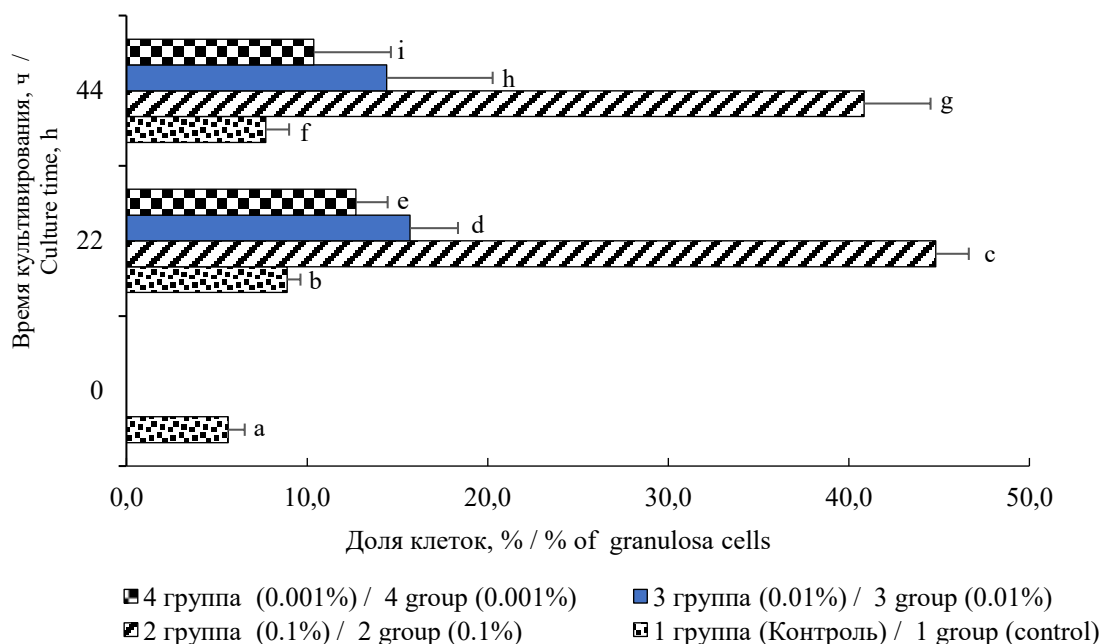


Рис. 3. Жизнеспособность клеток гранулезы *Sus scrofa domestica* в динамике культивирования с ТТР_{EG}*10PEG через 22 и 44 часа. a:c; a:g; b:c; b:g; c:d; c:e; c:f; c:h; c;i; d:g; e:g; f:g; g:h; g;i – p<0,001; a:d; a:e; a:h – p<0,05 /

Fig. 3. Viability of granulosa cells of *Sus scrofa domestica* in dynamics of culture with ТТР_{EG}*10PEG after 22 and 44 hours. a:c; a:g; b:c; b:g; c:d; c:e; c:f; c:h; c;i; d:g; e:g; f:g; g:h; g;i – p<0,001; a:d; a:e; a:h – p<0,05

В процессе культивирования спустя 22 часа в опытной группе с 0,1 % ТТР_{EG}*10PEG обнаружен самый высокий процент мертвых клеток в сравнении с контролем (на 35 %, p<0,001) и другими опытными группами (на 29 и 32 %, содержащими 0,01 % и 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG соответственно, p<0,001). Добавление к исследуемым группам 0,01 % и 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG не выявило достоверных различий в доле апоптотических клеток в сравнении с контрольной группой как на 22 ч, так и на 44 ч культивирования.

При оценке клеток с повышенным содержанием внутриклеточных АФК не было

выявлено достоверных различий между контрольной и исследуемыми группами в динамике культивирования. Хотя и наблюдалась тенденция к снижению исследуемого показателя в опытных группах по сравнению с контролем, тенденция к снижению в некоторых экспериментальных группах через 44 часа культивирования в сравнении с популяцией клеток, проанализированных через 22 часа (рис. 4).

Несмотря на данные, не указывающие на различия в генерации КГ АФК, нами были выявлены отличия в активности митохондрий исследуемых групп в процессе их культивирования (рис. 5).

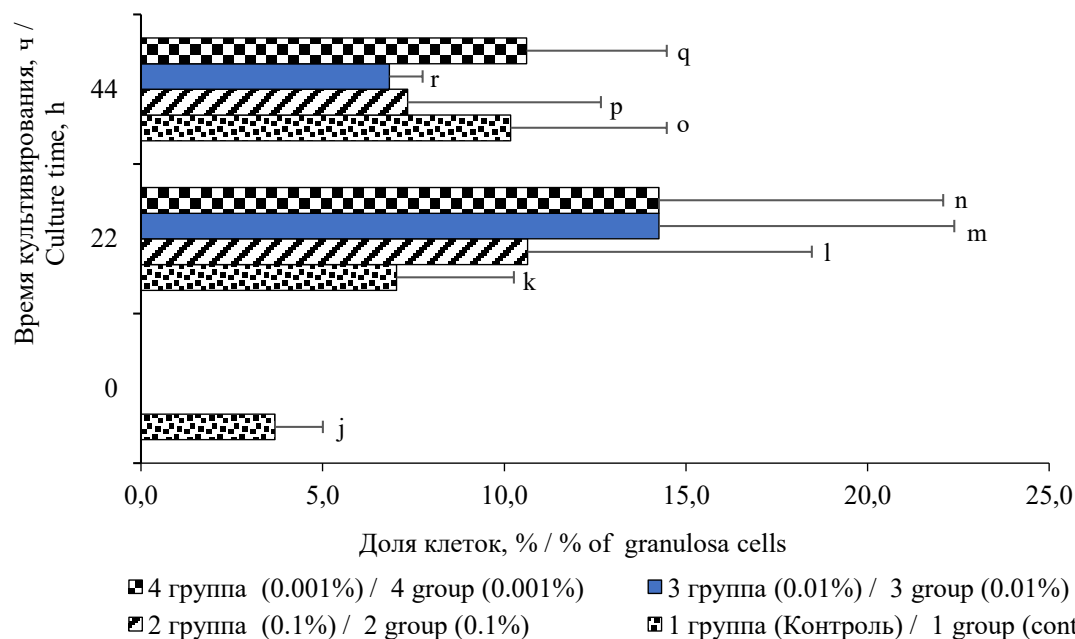


Рис. 4. Содержание АФК в клетках гранулезы *Sus scrofa domestica* при пролонгированном культивировании *in vitro* с ТТР_{EG}*10РЕG (22 и 44 ч). $j:m; j:n; j:o; j:r; k:q - p < 0,01$

Fig. 4. ROS content in granulosa cells of *Sus scrofa domestica* during prolonged *in vitro* culture ТТР_{EG}*10РЕG (22 and 44 h). $j:m; j:n; j:o; j:r; k:q - p < 0,01$

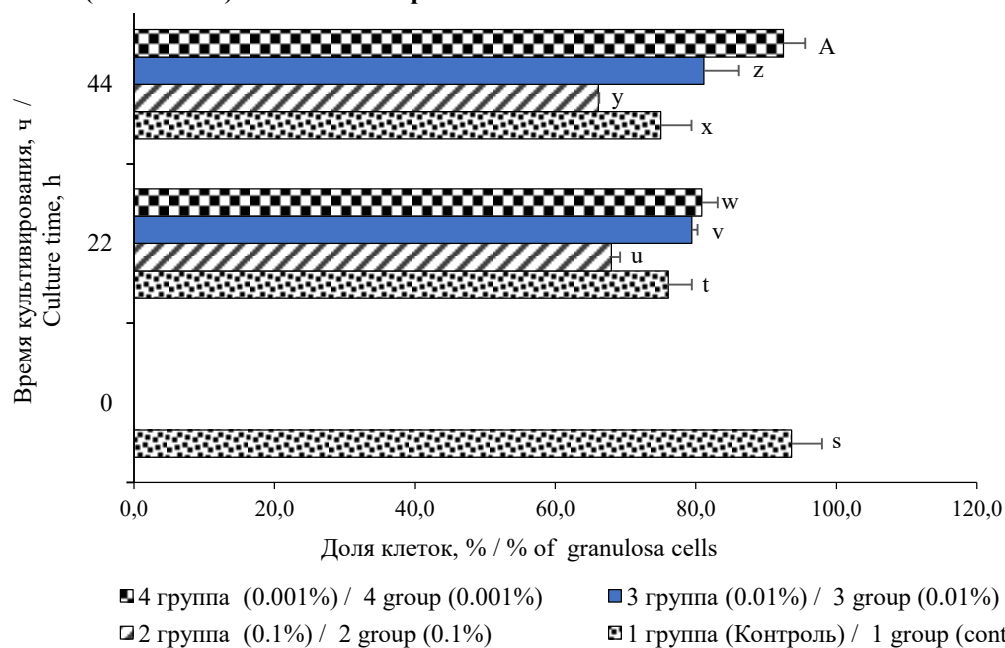


Рис. 5. Митохондриальная активность клеток гранулезы *Sus scrofa domestica* при культивирования *in vitro* с ТТР_{EG}*10РЕG (время культивирования 22 и 44 ч). $s:w; s:z; t:u; t:A; x:y; x:A; z:A - p < 0,05$; $s:t; s:x; t:y; u:z; v:A; w:A; y:z - p < 0,01$; $s:u; s:v; s:y; u:v; u:w; u:A; v:u; w:u; y:A - p < 0,001$

Fig. 5. Mitochondrial activity of *Sus scrofa domestica* granulosa cells during *in vitro* culture with ТТР_{EG}*10РЕG (cultivation time 22 and 44 h). $s:w; s:z; t:u; t:A; x:y; x:A; z:A - p < 0,05$; $s:t; s:x; t:y; u:z; v:A; w:A; y:z - p < 0,01$; $s:u; s:v; s:y; u:v; u:w; u:A; v:u; w:u; y:A - p < 0,001$

Как показано на рисунке 5, доля КГ с высокой митохондриальной активностью, культивируемых в присутствии 0,1 % ТТР_{EG}*10РЕG был ниже на 8 % ($p < 0,05$), чем в контрольной группе спустя 22 часа культивирования, почти не изменяя данное различие

и на 44 часа (на 9 %, $p < 0,05$). Также обнаружено, что группы КГ, культивируемые в присутствии 0,01 и 0,001 % ТТР_{EG}*10РЕG через 22 часа показали достоверно выше процент клеток с высокой митохондриальной активностью, чем с 0,1 % ТТР_{EG}*10РЕG (на 11 и 13 %

соответственно, $p < 0,001$). При этом не выявлено достоверных различий в исследуемом показателе между контрольной и опытными группами, содержащими 0,01 и 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG через 22 часа. Однако, спустя 44 часа была выявлена достоверная разница между группой, содержащей 0,1 и 0,01 % ТТР_{EG}*10PEG (на 15 %, $p < 0,01$), группой, культивируемой в присутствии 0,1 % и 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG (на 27 %, $p < 0,001$) и 0,01 и 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG (на 12 %, $p < 0,05$). Также обнаружено, что в динамике культивирования группа, содержащаяся в 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG, показала достоверное повышение доли клеток с высокой митохондриальной активностью (на 11 %, $p < 0,01$), тогда как у остальных исследуемых групп достоверных различий в процессе культивирования выявлено не было.

Биотестирование различных инновационных химически синтезированных веществ активно используется в области создания костных имплантов, новых методов адресной доставки лекарственных препаратов в структуры тканей и клеток, а также в области онкологии, биотехнологий и ветеринарии [13, 14, 15, 16]. Исследование получаемых веществ на цитотоксичность, а также выявление оптимальных концентраций для работы с ними является одним из начальных этапов перед дальнейшим их применением. В наших экспериментах мы определяли влияние прекурсора ТТР_{EG} в 10-мольном избытке ПЭГ на морфологические изменения и показатели жизнеспособности КГ *Sus scrofa domesticus* в динамике культивирования *in vitro* (22 и 44 часа). В результате обнаружено, что добавление в среду для культивирования 0,1 % ТТР_{EG}*10PEG спустя 22 и 44 часа провоцировало нарушения функциональной активности КГ, сопровождающиеся снижением митохондриального потенциала мембраны по сравнению с контролем (на 8 и 9 % соответственно, $p < 0,05$) и клеточной гибелью (доля нежизнеспособных клеток составила 45 и 41 % соответственно, $p < 0,001$). В группах, культивируемых в присутствии 0,01 и 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG не показано достоверных различий в показателях жизнеспособности КГ при культивировании как на 22, так и 44 часа. При этом было выявлено повышение митохондриальной активности в указанных группах в сравнении с контролем и группой, содержащей 0,1 % ТТР_{EG}*10PEG

(на 11 и 13 % соответственно через 22 часа, $p < 0,001$ и на 15 и 27 % через 44 часа, $p < 0,001$). Повышение митохондриальной активности в группе, содержащей 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG по нашему предположению может объясняться значительным разбавлением данного вещества в среде, что может повлечь за собой значительный гидролиз гидрогеля и распад ПEGа и, как следствие, продукты гидролиза могли косвенно воздействовать на митохондриальную активность. Однако для более конкретных выводов необходимы дополнительные исследования.

На морфологию и показатели жизнеспособности соматических и половых клеток влияет химический состав веществ, используемых в системах их культивирования [17, 18]. Так, по данным ряда исследователей, при введении наночастиц серебра, они могут накапливаться в кумулюсных клетках свиней, тогда как частицы золота избирательно накапливаются в ооцитах и не имеют столь выраженного токсического эффекта [19]. В нашем случае выпадение осадка в виде TiO₂, возможно, оказывало негативное воздействие на клетки гранулезы в группе с 0,1 % ТТР_{EG}*10PEG, что могло привести к клеточной гибели, тогда как гораздо меньшие концентрации (0,01 и 0,001 %) выраженной токсичности не показали. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, показавших, что частицы TiO₂ в высоких концентрациях способны вызывать клеточную гибель [20]. Обнаруженные морфологические изменения КГ в присутствии 0,1 % ТТР_{EG}*10PEG могут указывать на возможное изменение поверхности культурального пластика, вследствие чего проявляется низкая адгезивная способность клеток гранулезы или инкапсуляцию клетки указанным веществом или его производными в результате распада в культуральной среде [21]. В наших экспериментах не было выявлено достоверных различий между исследуемыми группами в показателях генерации АФК в клетках.

Заключение. При анализе воздействия тетраполиэтиленгликолят титана, растворенного в полиэтиленгликоле (соотношение 1:10) (сокращ ТТР_{EG}*10PEG) на жизнеспособность (доля мертвых клеток, митохондриальная активность) и генерацию активных форм кислорода в клетках гранулезы *Sus scrofa domesticus* в системе культивирования *in vitro* был выявлен его дозозависимый негативный эффект в концентрации 0,1 % ТТР_{EG}*10PEG. В концент-

рациях 0,01 и 0,001 % ТТР_{EG}*10PEG не оказал цитотоксического влияния на исследуемую популяцию клеток, что свидетельствует о возможности использования ТТР_{EG}*10PEG

в обозначенных выше концентрациях (0,01 и 0,001 %) для моделирования состава сред, используемых в системах культивирования гранулезных клеток свиней.

References

1. Кузьмина Т. И., Чистякова И. В., Притужалова А. О., Татарская Д. Н. Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулезы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus scrofa domestica*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(3):234–239. DOI: <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-30> EDN: GYCTSQ
2. Kuzmina T. I., Chistyakova I. V., Prituzhalova A. O., Tatarskaya D. N. The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica*. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2022;26(3):234–239. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-30>
3. Кузьмина Т. И., Новичкова Д. А., Волкова Н. А. Моделирование систем созревания ооцитов свиней *in vitro*. Сельскохозяйственная биология. 2013;48(2):52–57. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2013.2.52rus> EDN: PZAXND
4. Kuzmina T. I., Novichkova D. A., Volkova N. A. Modelling of maturation systems for porcine oocyte *in vitro*. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* = Agricultural Biology. 2013;48(2):52–57. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2013.2.52rus>
5. 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. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22593634> EDN: TAKVJF
6. 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. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya* = Russian Chemical Bulletin. 2014;(7):1639–1642. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22593634>
7. 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):5490–5500. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5tb00480b>
8. Li D., Zhou J., Zhang M., Ma Y., Yang Y., Han X., Wang X. Long-term delivery of alendronate through an injectable tetra-PEG hydrogel to promote osteoporosis therapy. *Biomaterials Science*. 2020;8:3138–3146. DOI: <https://doi.org/10.1039/d0bm00376j>
9. Zhu T., Wang H., Jing Z., Fan D., Liu Z., Wang X., Tian Yu. High efficacy of tetra-PEG hydrogel sealants for sutureless dural closure. *Bioactive Materials*. 2022;8:12–19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.022>
10. Chang S., Li C., Xu N., Wang J., Jing Z., Cai H., Tian Y., Wang S., Liu Z., Wang X. A sustained release of alendronate from an injectable tetra-PEG hydrogel for efficient bone repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:961227. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.961227>
11. Villalpando-Rodriguez G. E., Gibson S. B. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;(1):9912436. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9912436>
12. Rems L., Viano M., Kasimova M. A., Miklavčič D., Tarek M. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electroporation: A molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry*. 2019;125:46–57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.07.018>
13. Banerjee A., Chattopadhyay A., Bandyopadhyay D. Melatonin and biological membrane bilayers: a never ending amity. *Melatonin Research*. 2021;4(2): 232–252. DOI: <https://doi.org/10.32794/mr11250093>
14. Dikalov S., Harrison D. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(2):372–382. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>
15. Carafa V., Russo R., Della Torre L., Cuomo F., Dell'Aversana C., Sarno F., et al. The Pan-Sirtuin Inhibitor MC2494 Regulates Mitochondrial Function in a Leukemia Cell Line. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:00820. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00820>
16. Okata S., Hoshina K., Hanada K., Kamata H., Fujisawa A., Yoshikawa Y., Sakai T. Hemostatic capability of a novel tetra-polyethylene glycol hydrogel. *Annals of Vascular Surgery*. 2022;84:398–404. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2022.01.016>
17. Buxadera-Palomero J., Calvo C., Torrent-Camarero S., Gil F. J., Mas-Moruno C., Canal C., Rodriguez D. Biofunctional polyethylene glycol coatings on titanium: an *in vitro* -based comparison of functionalization methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;152:367–375. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.042>
18. Чупахин О. Н., Хонина Т. Г., Кунгуров Н. В., Зильберберг Н. В., Евстигнеева Н. П., Кохан М. М., Полищук А. И., Шадрина Е. В., Ларченко Е. Ю., Ларионов Л. П., Карабаналов М. С. Кремнийборсодержащий глицерогидрогель, обладающий ранозаживляющей, регенерирующей и антимикробной активностью. Известия Академии наук. Серия химическая. 2017;(3):558–563. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=28862630> EDN: YHPPZN

Chupakhin O. N., Khonina T. G., Kungurov N. V., Zilberberg N. V., Evstigneeva N. P., Kokhan M. M., Polishchuk A. I., Shadrina E. V., Larchenko E. Yu., Larionov L. P., Karabanalov M. S. Silicon–boron-containing glycerohydrogel having wound healing, regenerative, and antimicrobial activity. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya* = Russian Chemical Bulletin. 2017;(3):558–563. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=28862630>

16. Barkova A. S., Shurmanova E. I., Khonina T. G., Millstein I. M. Possibilities of using functional biologically active organosilicon compounds in veterinary practice. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2020;(11(202)):53–58. DOI: <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2020-202-11-53-58>

17. Camaioni A., Massimiani M., Lacconi V., Magrini A., Salustri A., Sotiriou G. A., et al. Silica encapsulation of ZnO nanoparticles reduces their toxicity for cumulus cell-oocyte-complex expansion. *Particle and Fibre Toxicology*. 2021;18(1):33. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00424-z>

18. Lei R., Bai X., Chang Y., Li J., Qin Y., Chen K., et al. Effects of fullerene nanoparticles on rat oocyte meiosis resumption. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3):699. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19030699>

19. Tiedemann D., Taylor U., Rehbock C., Jakobi J., Klein S., Kues W. A., et al. Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *The Analyst*. 2014;139(5):931–942. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/c3an01463k>

20. Minghui F., Ran S., Yuxue J., Minjia S. Toxic effects of titanium dioxide nanoparticles on reproduction in mammals. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1183592. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1183592>

21. Groll J., Fiedler J., Engelhard E., Ameringer T., Tugulu S., Klok H. A., et al. A novel star PEG-derived surface coating for specific cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2005;74A(4):607–617. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30335>

Сведения об авторах

✉ **Притужалова Анна Олеговна**, младший научный сотрудник лаборатории биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», Московское шоссе, д. 55а, пос. Тярлево, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196625, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2865-9582>, e-mail: aklevakina14@mail.ru,

Кузьмина Татьяна Ивановна, доктор биол. наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», Московское шоссе, д. 55а, пос. Тярлево, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196625, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4218-6080>

Хонина Татьяна Григорьевна, доктор хим. наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории органических материалов, ФГБНУ Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, ул. Софьи Ковалевской, д. 22/20, г. Екатеринбург, Российская Федерация, 620108, e-mail: verbitsky@ios.uran.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8746-7046>

Никулина Ульяна Сергеевна, биолог лаборатории биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», Московское шоссе, 55а, пос. Тярлево, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, 196625, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2649-2590>

Information about the authors

✉ **Anna O. Prituzhalova**, junior researcher, the Laboratory of Developmental Biology, All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Pushkin, Moscow highway, 55a, village Tyarlevo, St. Petersburg, Russian Federation, 196625, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2865-9582>, e-mail: aklevakina14@mail.ru

Tatyana I. Kuzmina, DSc in Biological Science, professor, chief researcher, Head of the Laboratory of Developmental Biology, All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Pushkin, Moscow highway, 55a, village Tyarlevo, St. Petersburg, Russian Federation, 196625, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4218-6080>

Tatiana G. Khonina, DSc in Chemistry, senior researcher, leading researcher at the Laboratory of Organic Materials, I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, st. Sofia Kovalevskaya, 22/20, Ekaterinburg, Russian Federation, 620108, e-mail: verbitsky@ios.uran.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8746-7046>

Ulyana S. Nikulina, biologist, the Laboratory of Developmental Biology, All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Pushkin, Moscow highway, 55a, village Tyarlevo, St. Petersburg, Russian Federation, 196625, e-mail: spbvniigen@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2649-2590>

✉ – Для контактов / Corresponding author