

Влияние унитиола на показатели жизнеспособности экстраовариально витрифицированных клеток гранулезы *Sus scrofa domestica*

А. О. ПРИТУЖАЛОВА, Т. И. КУЗЬМИНА

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московское ш., 55а, Санкт-Петербург, 196601, Российская Федерация

Резюме. Исследования проводили с целью оценки перспектив использования унитиола в качестве антиоксиданта при витрификации клеток гранулезы (КГ) из овариальных фолликулов свиней. КГ из *post mortem* фолликулов (диаметром 3...5 мм) отмывали и разделяли на 5 групп: 1 – нативные; 2 – витрифицированные после поэтапного экспонирования в криопротекторных агентах (КПА), приготовленных на среде ТС-199 (КПА-1 – 0,7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0,9 М этиленгликоля (ЭГ), экспозиция в растворе 3 мин; КПА-2 – 1,4 М ДМСО + 1,8 М ЭГ, экспозиция 3 мин.; КПА-3 – 2,8 М ДМСО + 3,6 М ЭГ + 0,65 М трегалозы, экспозиция 5 мин.). Состав КПА-3 в 3, 4 и 5 группах дополняли унитиолом в концентрациях соответственно 0,42 мг/мл, 0,84 мг/мл и 1,68 мг/мл. После извлечения из жидкого азота клетки оттаивали в водяной бане, отмывали и культивировали в среде ТС-199. Уровень апоптозов, внутриклеточный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi_m$) и генерацию АФК оценивали до начала и через 44 ч и 66 ч культивирования. После девитрификации выявлено снижение доли жизнеспособных КГ (на 39...55 %) и клеток с высоким $\Delta\Psi_m$ (на 40...52 %), в сравнении с нативными КГ ($p < 0,001$), а также снижение уровня (на 29...38 %) девитрифицированных клеток с повышенной генерацией АФК в 3, 4 и 5 группах, в сравнении со 2 ($p < 0,001$). При пролонгированном культивировании всех исследуемых групп девитрифицированных КГ достоверных различий между контролируемые показателями жизнеспособности и функциональной активности не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о негативном эффекте унитиола в исследованных концентрациях на изучаемые показатели, что не позволяет рассматривать его как перспективный компонент криопротекторных сред в технологии витрификации клеток гранулезы свиней.

Ключевые слова: унитиол, клетки гранулезы, *Sus scrofa domestica*, витрификация, культивирование *in vitro*, АФК, жизнеспособность.

Сведения об авторах: А. О. Притужалова, младший научный сотрудник (e-mail: aklevakina14@mail.ru); Т. И. Кузьмина, доктор биологических наук, главный научный сотрудник

Для цитирования: Притужалова А. О., Кузьмина Т. И. Влияние унитиола на показатели жизнеспособности экстраовариально витрифицированных клеток гранулезы *Sus scrofa domestica* // Достижения науки и техники АПК. 2024. Т. 38. № 9. С. 76–81. doi: 10.53859/02352451_2024_38_9_76

Effect of unithiol on viability parameters of extraovarian vitrified granulosa cells of *Sus scrofa domestica*

A. O. Prituzhalova, T. I. Kuz'mina

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals, branch of Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Moskovskoe sh., 55a, Sankt-Peterburg, 196601, Russian Federation

Abstract. The study was conducted to assess the prospects of using unithiol as an antioxidant in the vitrification of granulosa cells (GC) from porcine ovarian follicles. GC from *post mortem* follicles (3-5 mm in diameter) were washed and divided into 5 groups: 1 – native; 2 – vitrified after step-by-step exposure to cryoprotective agents (CPA) prepared on the TS-199 medium (CPA-1 – 0.7 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0.9 M ethylene glycol (EG), exposure in solution for 3 min; CPA-2 – 1.4 M DMSO + 1.8 M EG, exposure for 3 min; CPA-3 – 2.8 M DMSO + 3.6 M EG + 0.65 M trehalose, exposure for 5 min). The composition of CPA-3 in groups 3, 4 and 5 was supplemented with unithiol at concentrations of 0.42 mg/ml, 0.84 mg/ml and 1.68 mg/ml, respectively. After removal from liquid nitrogen, the cells thawed in a water bath, washed and cultured in TC-199 medium. The level of apoptosis, intracellular mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) and ROS generation were assessed before and after 44 h and 66 h of cultivation. After devitrification, a decrease in the proportion of viable GC (by 39-55%) and cells with high $\Delta\Psi_m$ (by 40-52%) was revealed, compared with native GC ($p < 0.001$), as well as a decrease in the level (by 29-38%) of devitrified cells with increased ROS generation in groups 3, 4 and 5, compared with 2 ($p < 0.001$). With prolonged cultivation of all studied groups of devitrified GC, no reliable differences were found between the controlled indicators of viability and functional activity. The obtained results indicate a negative effect of unithiol in the studied concentrations on the studied indicators, which does not allow to consider it as a promising component of cryoprotective media in the technology of vitrification of porcine granulosa cells.

Keywords: unithiol; granulosa cells; *Sus scrofa domestica*; vitrification; *in vitro* cultivation; ROS; viability.

Author Details: A. O. Prituzhalova, junior research fellow (e-mail: aklevakina14@mail.ru); T. I. Kuz'mina, D. Sc. (Biol.), chief research fellow

For citation: Prituzhalova AO, Kuz'mina TI. [Effect of unithiol on viability parameters of extraovarian vitrified granulosa cells of *Sus scrofa domestica*]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2024;38(9):76–81. Russian. doi: 10.53859/02352451_2024_38_9_76

В последние годы все более актуальной становится проблема сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных с целью дальнейшего повышения их биоразнообразия. В связи с этим, криоконсервация остается одним из значимых подходов к ее решению. Один из методов долговременного сохранения половых и соматических клеток сельскохозяйственных животных – витрификация. Воздействие сверхнизких температур провоцирует повреждение клеточных компартментов кристаллами льда в процессе перепадов температур; изменение градиента осмолярности между клеткой и внешней средой, оксидативный стресс, возникающий вследствие избыточной генерации активных

форм кислорода (АФК) [1]. Использование криопротекторных агентов уменьшает негативное влияние первых двух факторов, но оксидативный стресс по-прежнему остается одним из негативных эффектов, имеющих отсроченную природу в процессе культивирования. Оксидативный стресс – результат дисбаланса между производством и накоплением АФК в клетках и тканях и снижением способности к детоксикации этих продуктов [2]. АФК могут воздействовать на клеточный механизмы, выступая в роли сигнальных молекул [3]. Однако их избыточная генерация в процессе криоконсервации способна вызывать окисление внутриклеточных белков, запускать перекисное окисление липидов, генерировать ультра-

структурные изменения митохондрий (пермеабиллизация и повышение пористости мембраны, вследствие чего происходит утечка электронов и цитохромов), запуская таким образом необратимые изменения в клетках, что влечет за собой гибель клеток [4]. В связи с этим возникает необходимость подбора и дальнейшего использования экзогенных антиоксидантных веществ в системах витрификации для соматических клеток.

Тиолы – химические соединения, содержащие в своей структуре сульфгидрильную группу (SH-). В организме такие соединения активно участвуют во множестве физиологических процессов, среди которых можно назвать формирование структурной целостности белков путем образования дисульфидных связей, действие в качестве коферментов и кофакторов, участие в окислительно-восстановительных реакциях [5]. В клетках имеются собственные эндогенные ферментативные антиоксиданты на основе тиолов, которые принимают непосредственное участие в работе антиоксидантного механизма. Однако в результате окислительного стресса при воздействии сверхнизких температур может происходить значительное их истощение, что, в свою очередь, влечет смещение антиоксидантного равновесия [6], поэтому добавление экзогенных тиолов – перспективное направление предотвращения окислительного стресса клеток в процессе криоконсервации.

Результаты изучения тиоловых соединений свидетельствуют о их эффективности не только в качестве хелаторов тяжелых металлов, но и при снижении окислительного стресса в результате воздействий этих металлов. Так, Sachdeva S. et al. определили успешное антиоксидантное воздействие моноизола-2,3-димеркаптоянтарной кислоты при отравлении вольфрамом, который вызывает снижение эффективности антиоксидантов ферментативной природы в крови и тканях (печень, почки) у крыс [7]. Benov et al. выявили положительный эффект унитиола при отравлении ртутью, показав его ингибирующее воздействие на перекисное окисление липидов у крыс [8]. В связи с низкой токсичностью этого соединения (унитиола) представляет интерес изучение возможности его использования в качестве антиоксиданта в протоколе криоконсервации.

2,3-димеркаптопропансульфонат натрия (ДМПС, унитиол, $C_3H_7NaO_3S_3$) – дитиоловый активный хелатирующий агент с низкой токсичностью, в сравнении с другими представителями соединений с сульфгидрильными (тиоловыми) группами. Будучи гидрофильными по своей природе, унитиол может распределяться во внеклеточном пространстве, а также посредством мембранного транспорта в некотором количестве проникать внутрь клетки. Содержащиеся в его молекуле свободные SH-группы способны с высокой скоростью окисляться в дисульфидные (SS-), обрывая свободнорадикальные цепи

и выступать как хелатор редокс-активных ионов металлов, способных катализировать перекисное окисление липидов [9, 10]. Введение унитиола в среду культивирования клеток почек опоссума после воздействия хлорида ртути оказало положительное влияние на показатели жизнеспособности, митохондриальную активность и морфологию клеток [11].

Цель исследования – оценить перспективы использования унитиола в составе КПА при витрификации соматических клеток овариальных фолликулов *Sus scrofa domestica* как потенциального ингибитора избыточной генерации активных форм кислорода (оксидативного стресса).

Для ее достижения был проведен мониторинг показателей жизнеспособности клеток гранулезы (апоптоз, митохондриальная активность), витрифицированных с использованием различных концентраций унитиола, после оттаивания и пролонгированного культивирования.

Условия, материалы и методы. В эксперименте использовали клетки гранулезы, аспирированные из антральных фолликулов яичников свиней породы ландрас в возрасте 6...8 мес. Яичники отбирали у животных *post mortem* и транспортировали в лабораторию из мясокомбината «Тосненский» (Ленинградская область). Для отбора клеток гранулезы (КГ) использовали яичники на стадии фолликулярного роста без видимых патологических изменений (рис. 1). Аспирированную фолликулярную жидкость, содержащую КГ, центрифугировали 6 мин при 300 об/мин. Суспензию клеток в виде осадка дважды промывали в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) и оценивали жизнеспособность с использованием трипанового синего (в конечной концентрации красителя 0,05 %). Для эксперимента отбирали популяции клеток, в которых доля живых составляла не менее 50...60 % от общего пула. Затем полученную суспензию КГ разделяли на 5 групп: 1 – нативные; 2 – витрифицированные после поэтапного экспонирования в криопротекторных агентах (КПА), приготовленных на среде ТС-199 (КПА-1 – 0,7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0,9 М этиленгликоля (ЭГ) (экспозиция в растворе 3 мин); КПА-2 – 1,4 М ДМСО + 1,8 М ЭГ (экспозиция в растворе 3 мин.); КПА-3 – 2,8 М ДМСО +

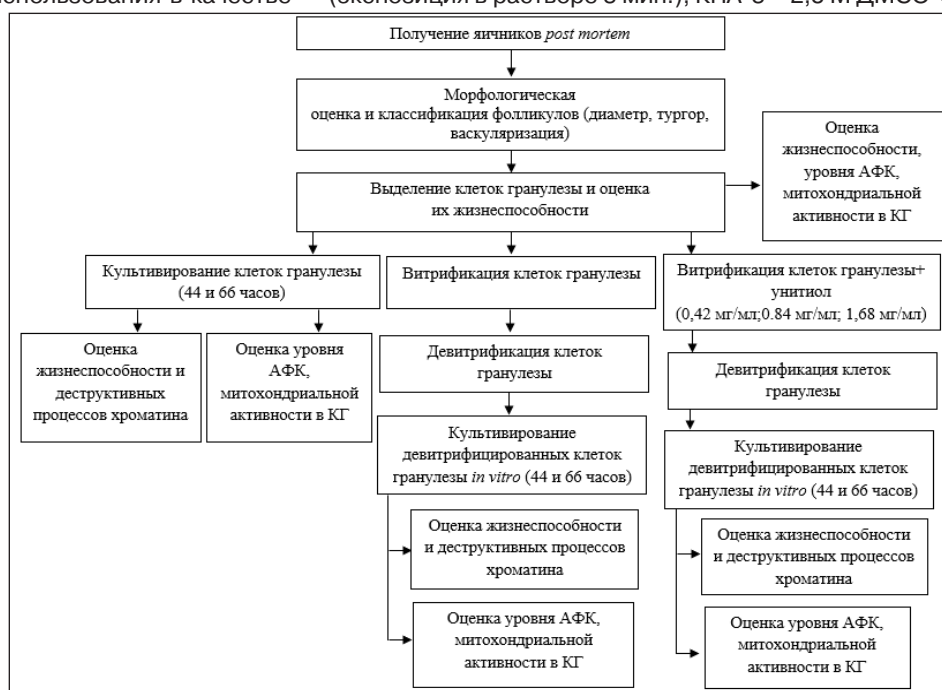


Рис. 1. Схема эксперимента.

3,6 М ЭГ + 0,65 М трегалозы (экспозиция в растворе 5 мин.). Клетки 3, 4 и 5 групп витрифицировали с применением аналогичного протокола, модернизированного введением в КПА-3 унитиола в концентрациях 0,42 мг/мл, 0,84 мг/мл и 1,68 мг/мл соответственно группе. Такие дозы были подобраны исходя из результатов ранее проведенных исследований. Так, на культуре клеток Vero E6 африканской зеленой мартовской рабочий диапазон концентрации унитиола был равен 1486,5 мкг/мл. При ее использовании спустя 96 ч культивирования жизнеспособность клеток не отличалась от контрольной [12]. В другой работе при добавлении к сперме унитиола в концентрации 0,42 мг/мл было отмечено значительное повышение оплодотворяющей способности быков [13]. Введение унитиола в среду для замораживания спермы хряков в концентрации 0,25 мг/мл обеспечило достоверное повышение подвижности сперматозоидов после оттаивания [14].

После каждой экспозиции в растворе КПА КГ осаждали центрифугированием в течение 4 мин на 1000 об/мин при комнатной температуре. Конечную суспензию клеток распределяли в маркированные, в соответствии с группой эксперимента, криопробирки и помещали в жидкий азот. Процедуру девитрификации проводили спустя не менее 60 мин. после внесения КГ в жидкий азот. Оттаивание клеток проводили на водяной бане (t 37°C) в течение 120 с, после чего каждую группу КГ поэтапно отмывали с использованием приготовленных на среде TC-199 растворов с понижающейся концентрацией трегалозы: 0,25 М (3 мин.), 0,19 М (3 мин.), 0,125 М (3 мин.). Конечным этапом была двойная отмывка в среде TC-199 без трегалозы. После каждой операции отмывки КГ осаждали в течение 4 мин. при 1000 об/мин. Все экспериментальные группы клеток культивировали в среде TC-199 с добавлением фетальной бычьей сыворотки (10 % от общего объема среды) и 100-кратного антибиотика-антимикотика (Gibco) (с конечной концентрацией 100 ЕД пенициллина, 100 мкг стрептомицина и 0,25 мкг Амфотерицина В в 1 мл среды). Условия культивирования – в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 при 38,5 °C в течение 44 и 66 ч.

Для определения доли мертвых клеток использовали пропидия йодид (PI, конечная концентрация 5 мкг/мл). Краситель добавляли в дважды отмытую PBS суспензию КГ и инкубировали 5...7 мин перед цитофлуориметрическим анализом.

Генерацию АФК идентифицировали с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA). Для этого КГ дважды промывали в стерильном PBS, добавляли флуорохром до конечной концентрации 5 мкМ/мл и инкубировали в течение 30 мин при t 38,5 °C. После этого суспензию клеток отмывали от остатков красителя и подвергали дальнейшему анализу [15].

Митохондриальную активность (мембранный потенциал, $\Delta\Psi_m$) определяли с использованием флуоресцентного зонда Tetramethylrhodamine (TMRE). Этот краситель селективно накапливается в гиперполяризованных митохондриях, демонстрируя, таким образом, функциональное состояние клеток. КГ дважды отмывали в стерильном PBS, добавляли краситель до конечной концентрации 200 нМ/мл [16]. После 30 минутной инкубации при t 38,5 °C клетки дважды отмывали от остатков красителя и анализировали.

Анализ клеток, окрашенных флуорохромом, осуществляли на проточном цитометре CytoFlex (BeckmanCoulter Life Sciences, USA).

Результаты обрабатывали с помощью программы Sigma Stat. Все использованные в исследовании реагенты, за исключением отдельно обозначенных, были произведены фирмой Sigma-Aldrich, пластиковая лабораторная посуда – фирмой BD Falcon™. Достоверность различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с использованием критерия χ^2 при трех уровнях значимости: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение. До культивирования девитрифицированных клеток гранулезы выявлено статистически значимое ($p < 0,001$) снижение доли клеток с высоким содержанием АФК в группе с 0,42 мг/мл унитиола, в сравнении с девитрифицированной группой без его внесения, на 30 %, с 0,84 мг/мл унитиола – на 29 %, с 1,68 мг/мл унитиола – на 38 % (рис.2). При этом самая низкая доля клеток с повышенной генерацией АФК отмечена в группе витрифицированных клеток с 1,68 мг/мл унитиола (на уровне нативной популяции – 8 %). Через 44 ч только в группе клеток, витрифицированных в присутствии 0,42 мг/мл, отмечено снижение доли клеток с повышенной генерацией АФК, в сравнении с контрольной группой девитрифицированных КГ (на 12 %, $p < 0,05$). При этом в популяции 3 и 4 групп количество клеток с повышенной генерацией АФК было меньше, чем в 5 группе (на 22 и 17 % соответственно, $p < 0,01$; $p < 0,05$). Через 66 ч достоверных различий по доле КГ с повышенной генерацией АФК между группами девитрифицированных клеток не

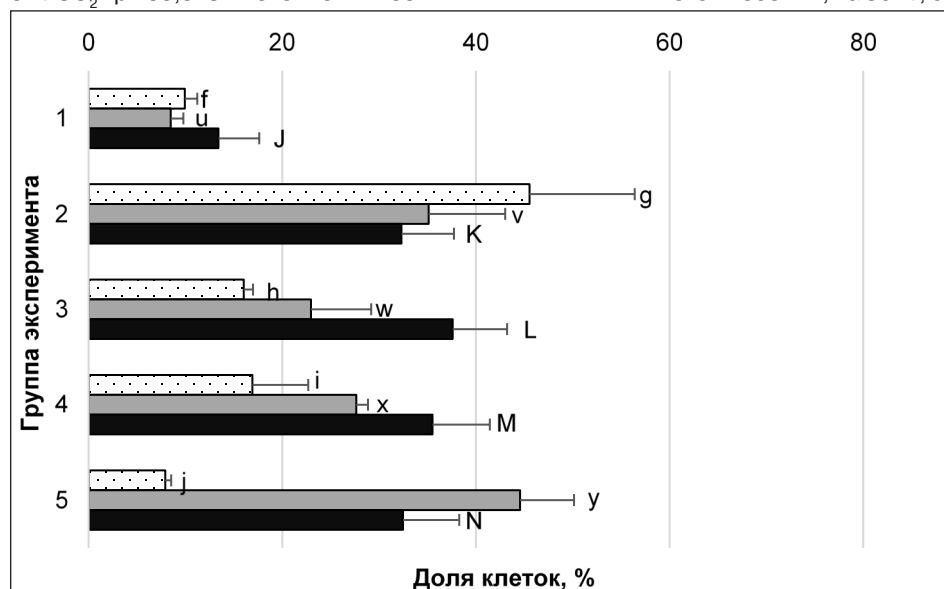


Рис. 2. Генерация активных форм кислорода в витрифицированных клетках гранулезы в зависимости от присутствия унитиола (0, 44 и 66 ч культивирования): 1 – популяция нативных клеток (n-6684); 2 – девитрифицированные клетки без добавления унитиола (n-6047); 3 – девитрифицированные клетки, обработанные 0,42 мг/мл унитиола (n-5703); 4 – девитрифицированные клетки, обработанные 0,84 мг/мл унитиола (n-5562); 5 – девитрифицированные клетки, обработанные 1,68 мг/мл унитиола (n-5468); достоверность – fg; uv; ux; uy; jL; jM; gh; gk; gj; hL; jy; jN $p < 0,001$, uw; jK; jN; iM $p < 0,01$, gK; wL $p < 0,05$; □ – 0 ч, ▒ – 44 ч, ■ – 66 ч.

с 1,68 мг/мл унитиола – на 38 % (рис.2). При этом самая низкая доля клеток с повышенной генерацией АФК отмечена в группе витрифицированных клеток с 1,68 мг/мл унитиола (на уровне нативной популяции – 8 %). Через 44 ч только в группе клеток, витрифицированных в присутствии 0,42 мг/мл, отмечено снижение доли клеток с повышенной генерацией АФК, в сравнении с контрольной группой девитрифицированных КГ (на 12 %, $p < 0,05$). При этом в популяции 3 и 4 групп количество клеток с повышенной генерацией АФК было меньше, чем в 5 группе (на 22 и 17 % соответственно, $p < 0,01$; $p < 0,05$). Через 66 ч достоверных различий по доле КГ с повышенной генерацией АФК между группами девитрифицированных клеток не

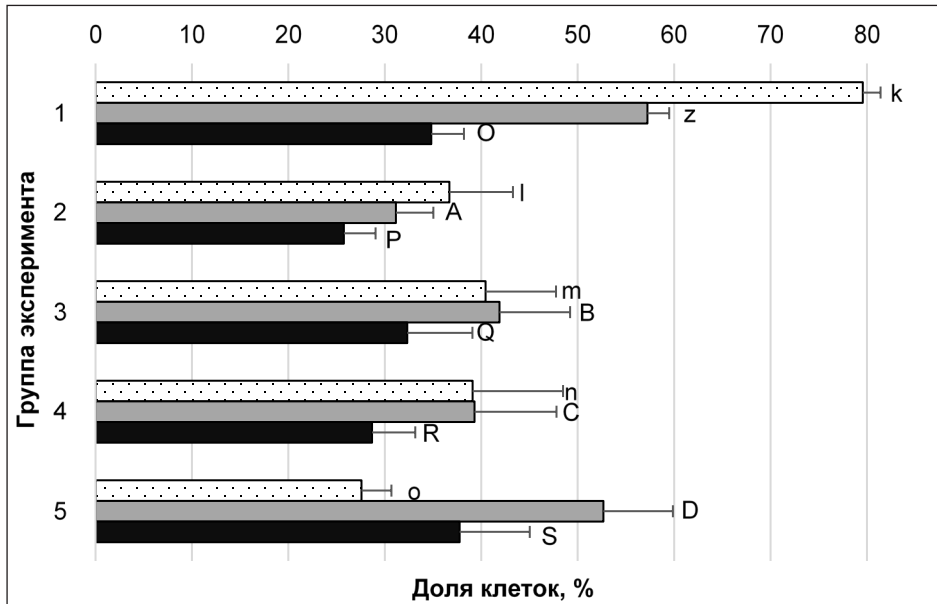


Рис. 3. Значения мембранного потенциала митохондрий в витрифицированных клетках гранулезы в зависимости от присутствия унитиола (0, 44 и 66 ч культивирования): 1 – популяция нативных клеток (n-8951); 2 – девитрифицированные клетки без добавления унитиола (n-6132); 3 – девитрифицированные клетки, обработанные 0,42 мг/мл унитиола (n-5842); 4 – девитрифицированные клетки, обработанные 0,84 мг/мл унитиола (n-5790); 5 – девитрифицированные клетки, обработанные 1,68 мг/мл унитиола (n-6084); достоверность – k,l; k,m; k,n; k,o; k,z; k,D; o; D; p<0,001, A,D p<0,01, D;S; C;D p<0,05; □ – 0 ч, ■ – 44 ч, ■ – 66 ч.

выявлено. При этом обнаружены значимые изменения в популяции клеток с повышенной генерацией АФК внутри исследуемых групп. В КГ, витрифицированных с 0,42 мг/мл унитиола, генерация АФК в период с 44 до 66 ч культивирования возросла на 15 % (p<0,05), а при добавлении 1,68 мг/мл унитиола за первые 44 ч увеличилась на 37 % (p<0,001).

Во всех экспериментальных группах в КГ после девитрификации до культивирования выявлен более низкий $\Delta\Psi_m$ (p<0,001), в сравнении с нативной популяцией (рис. 3). При этом спустя 44 ч в группе с добавлением 1,68 мг/мл унитиола величина этого показателя

тажных группах была выше (p<0,001), чем у нативной популяции (рис. 4). При этом в варианте с добавлением 1,68 мг/мл унитиола доля мертвых клеток была выше, чем в девитрифицированной контрольной группе, на 15 % (p<0,05), а в сравнении с группой с 0,84 мг/мл унитиола – на 16 % (p<0,05). Спустя 44 ч культивирования статистических различий по показателям жизнеспособности между группами девитрифицированных и нативных клеток не наблюдали. Через 66 ч культивирования отмечено достоверное увеличение доли апоптотических КГ в контрольной группе девитрифицированных клеток, в сравнении с группой нативных клеток, на 13 % (p<0,05), витри-

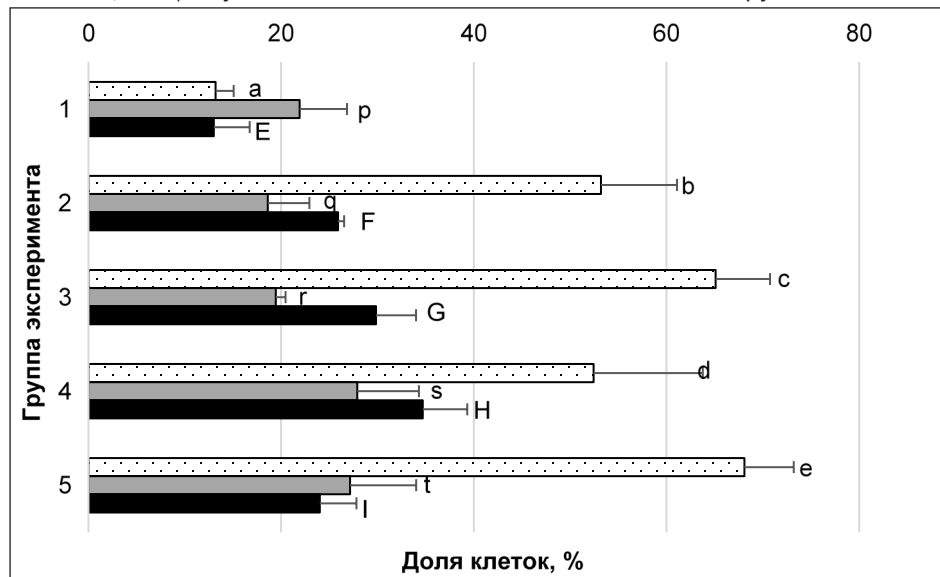


Рис. 4. Жизнеспособность клеток гранулезы, витрифицированных без и в присутствии унитиола (0, 44 и 66 ч культивирования): 1 – популяция нативных клеток (n-9107); 2 – девитрифицированные клетки без добавления унитиола (n-6654); 3 – девитрифицированные клетки, обработанные 0,42 мг/мл унитиола (n-6755); 4 – девитрифицированные клетки, обработанные 0,84 мг/мл унитиола (n-6653); 5 – девитрифицированные клетки, обработанные 1,68 мг/мл унитиола (n-6806); достоверность – a,b; a,c; a,e; b,q; b,F; c,r; c,G; d,s; e,t; e,l p<0,001, b,e; r;G; d;e; d,H p<0,05; □ – 0 ч, ■ – 44 ч, ■ – 66 ч.

возросла, в сравнении с контролем, на 22 % (p<0,01), с 4 группой (0,84 мг/мл унитиола) – на 14 % (p<0,05), приблизившись к уровню нативных клеток. Кроме того, при анализе групп КГ, витрифицированных с 1,68 мг/мл унитиола, обнаружена достоверная разница по доле клеток с высоким $\Delta\Psi_m$. Так, в динамике культивирования зафиксировано увеличение количества таких клеток с начала культивирования до 44 ч (p<0,001) на 23 %. После 66 ч экспозиции доля клеток с высоким $\Delta\Psi_m$ уменьшилась, по сравнению с показателями на 44 ч культивирования, на 15 % (p<0,05). Через 66 ч достоверных различий по уровню $\Delta\Psi_m$ между группами не выявлено.

Жизнеспособность клеток, подвергшихся витрификации, во всех экспериментальных группах была выше (p<0,001), чем у нативной популяции (рис. 4). При этом в варианте с добавлением 1,68 мг/мл унитиола доля мертвых клеток была выше, чем в девитрифицированной контрольной группе, на 15 % (p<0,05), а в сравнении с группой с 0,84 мг/мл унитиола – на 16 % (p<0,05). Спустя 44 ч культивирования статистических различий по показателям жизнеспособности между группами девитрифицированных и нативных клеток не наблюдали. Через 66 ч культивирования отмечено достоверное увеличение доли апоптотических КГ в контрольной группе девитрифицированных клеток, в сравнении с группой нативных клеток, на 13 % (p<0,05), витри-

Антиоксидантная система клетки имеет свои множественные пути восстановления после гипергенерации АФК [17]. Но в процессе витрификации внешние факторы (температура, криопротекторы, осмотическое равновесие) способны истощать собственные резервы окислительно-восстановительного потенциала, что свидетельствует о необходимости применения антиоксидантов неферментативной природы, способствующих поддержанию клеточного гомеостаза, в том числе истощенной тиоловой антиоксидантной системы клеток [18]. При использовании некоторых видов тиоловых соединений в качестве дополнительного криопротекторного компонента отмечен антиоксидантный эффект при криоконсервации мужских половых клеток [19]. В нашем исследовании применение унитиола сразу после процедуры витрификации вызывало снижение генерации АФК ($p < 0,001$), в сравнении с вариантом без его использования. Кроме того, наличие унитиола в системе криоконсервации значительно снизило долю жизнеспособных клеток и девитрифицированных клеток с высоким митохондриальным потенциалом, в сравнении с нативной группой ($p < 0,001$). Имеются некоторые данные, что унитиол может связывать жизненно важные ионы клеток, в том числе ионы кальция (Ca^{2+}) [20, 21]. Возможно также, унитиол, вовлекаясь в механизмы функционирования митохондрий, запускает апоптотические процессы в клетке. Вероятно, значительное уменьшение уровня АФК в клетке снижает ее реактивную способность на оксидативный стресс, что запускает апоптотические процессы.

Спустя 44 ч в экспериментальных группах, витрифицированных с унитиолом, не отмечали статистически значимых различий со 2 группой. Это может объясняться кратковременным влиянием унитиола на клетки с последующим снижением его воздействия, что приводит к восстановлению клеточных функций. Уровень генерации АФК в КГ на этом этапе (44 ч) значимо ($p < 0,05$) снижался в 3 группе, в сравнении с контрольной девитрифицированной популяцией клеток, а в 5 группе достоверно различался от величины этого показателя в 3 и 4 группах ($p < 0,01$; $p < 0,05$). При этом митохондриальная активность в КГ спустя 44 ч куль-

тивирования в 5 группе была достоверно выше, чем во 2 и 4 группах ($p < 0,01$; $p < 0,05$), оставаясь на уровне группы нативных клеток. Через 66 ч культивирования статистически значимых различий между экспериментальными группами по исследуемым показателям не выявлено.

Выводы. В результате мониторинга показателей жизнеспособности и функциональной активности нативных и экстраовариально витрифицированных соматических клеток антральных фолликулов свиней при использовании в протоколе витрификации унитиола идентифицированы особенности функционирования клеток гранулезы, выразившиеся в снижении их жизнеспособности и $\Delta\Psi\text{m}$. Выявлен отрицательный эффект воздействия унитиола на КГ сразу после процедуры витрификации, что выражалось в резком повышении во всех экспериментальных группах, в сравнении с нативной, доли мертвых клеток (на 39...55 %), снижении $\Delta\Psi\text{m}$ – (на 40...52 %) и уменьшении генерации АФК в КГ, в сравнении с контрольной девитрифицированной группой (на 29...38 %). В процессе пролонгированного культивирования обработанные унитиолом в различных концентрациях группы клеток не показали положительной динамики, которая отличала бы их от контрольной девитрифицированной группы по исследуемым показателям.

В целом, применение унитиола в исследуемых концентрациях при витрификации КГ негативно сказывается на их криосохранности, что не дает возможности рекомендовать его в технологии витрификации клеток гранулезы в составе криопротекторных сред.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема государственного задания НИОКТР 124020200127-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Литература.

- Кузьмина Т. И., Притужалова А. О. Оксидативный стресс и апоптотические процессы в клетках гранулезы свиней при воздействии сверхнизких температур // Свиноводство. 2022. № 6. С. 23–26. doi: 10.37925/0039-713X-2022-6-23-26.
- Oxidative stress: Harms and benefits for human health / G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, et al. // Oxidative medicine and cellular longevity. 2017. Vol. 2017. Article 8416763. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2017/8416763> (дата обращения: 13.02.2024). doi: 10.1155/2017/8416763.
- Len J. S., Koh W. S. D., Tan S. X. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation // Bioscience reports. 2019. Vol. 39. No. 8. Article BSR20191601. URL: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/39/8/BSR20191601/219404/The-roles-of-reactive-oxygen-species-and> (дата обращения: 13.02.2024). doi: 10.1042/BSR20191601.
- Chen W., Li D. Reactive oxygen species (ROS)-responsive nanomedicine for solving ischemia-reperfusion injury. Front. Chem. 2020. Vol. 8. Article 732. URL: <https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2020.00732/full> (дата обращения: 16.02.2024). doi: 10.3389/fchem.2020.00732.
- Ulrich K., Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems // Free radical biology & medicine. 2019. Vol. 140. P. 14–27. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035.
- Benhar M. Oxidants, antioxidants and thiol redox switches in the control of regulated cell death pathways // Antioxidants. 2020. Vol. 9. No. 4. Article 309. URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/4/309> (дата обращения: 21.02.2024). doi: 10.3390/antiox9040309.
- Sachdeva S., Sharma A., Flora S. J. S. MiADMSA abrogates sodium tungstate-induced oxidative stress in rats. Drug and Chemical Toxicology. 2021. Vol. 45. No. 6. P. 2448–2453. doi: 10.1080/01480545.2021.1957560.
- Benov L. C., Benchev I. C., Monovich O. H. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. Chemico-biological interactions. 1990. Vol. 76. No. 3. P. 321–332. doi: 10.1016/0009-2797(90)90099-9.
- Тагирова З. Г. Окислительный стресс и антиоксидантные системы при острой бактериальной дизентерии // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016. № 1. С. 48–51.
- Accenting lipid peroxidation / A. Kukurt, V. Gelen, O. Baser et al. Turkey: Istanbul University Cerrahpasa, 2021. 158 p. doi: 10.5772/intechopen.96682.
- DMPS reverts morphologic and mitochondrial damage in OK cells exposed to toxic concentrations of HgCl_2 / P. Carranza-Rosales, N. E. Guzman-Delgado, D. E. Cruz-Vega, et al. // Cell Biology and Toxicology. 2006. Vol. 23. No. 3. P. 163–176. doi: 10.1007/s10565-006-0132-y.
- Васильев А. Н. Оценка влияния антиоксидантов на специфическую противовирусную активность интерферона

альфа-2b человеческого рекомбинантного в отношении вируса простого герпеса в культуре клеток // Антибиотики и Химиотерапия. 2010. Т. 55. № 7-8. С. 20–25.

13. Кузьмина Т. И. Оценка генетической полноценности овоцитов коров при их культивировании вне организма: дисс. на соискание уч. ст. кандидата биологических наук. Ленинград, 1983. 130 с.

14. Корбан Н. В., Шапиев И. Ш., Мороз Л. Г. Среда для замораживания спермы животных // Патент СССР SU540634A1, 30.12.1976.

15. Kim H., Xue X. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining // Journal of visualized experiments. 2020. No. 160. Article e60680. URL: <https://app.jove.com/t/60682> (дата обращения: 18.04.2024). doi: 10.3791/60682.

16. Triple fluorescence staining to evaluate mechanism-based apoptosis following chemotherapeutic and targeted anti-cancer drugs in live tumor cells / P. De, J. H. Carlson, B. Leyland-Jones, et al. // Scientific reports. 2018. Vol. 8. Article 13192. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31575-3> (дата обращения: 18.04.2024). doi: 10.1038/s41598-018-31575-3.

17. Gal Le K., Schmidt E. E., Sayin V. I. Cellular redox homeostasis // Antioxidants. 2021. Vol. 10. No. 9. Article 1377. URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/9/1377> (дата обращения: 26.03.2024). doi: 10.3390/antiox10091377.

18. Bird S. L-Cysteine improves survival and growth of mesothelial cells after freezing // Cell biology international. 2009. Vol. 33. No. 11. P. 1155–1164. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.08.

19. Mineral nutrients and male fertility / E. Tvrdá, P. Sikeli, J. Lukacova, et al. // The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2013. Vol. 1. No. 3. P. 1–14. URL: <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7068> (дата обращения: 26.03.2024).

20. Synthetic amphoteric cryogels as an antidote against acute heavy metal poisoning / A. Z. Baimenov, I. R. Fakhradiyev, D. A. Berillo, et al. // Molecules. 2021. Vol. 26. No. 24. Article 7601. URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/24/7601> (дата обращения: 28.03.2024). doi: 10.3390/molecules26247601.

21. Paradoxical effect of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on enhancing antitumor activity of cisplatin in ascites sarcoma 180 cells / T. Sato, M. Okubo, K. Sawaki, et al. // Journal of pharmacological sciences. 2010. Vol. 112. No. 3. P. 361–368. doi: 10.1254/jphs.09323fp.

References

1. Kuz'mina TI, Prituzhalova AO. [Oxidative stress and apoptotic processes in porcine granulosa cells exposed to ultra-low temperatures]. Svinovodstvo. 2022;(6):23-6. Russian. doi: 10.37925/0039-713X-2022-6-23-26.

2. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. Oxidative medicine and cellular longevity [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 13];2017: Article 8416763. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2017/8416763>. doi: 10.1155/2017/8416763.

3. Len JS, Koh WSD, Tan SX. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. Bioscience reports [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 13];39(8): Article BSR20191601. Available from: <https://portlandpress.com/bioscierep/article/39/8/BSR20191601/219404/The-roles-of-reactive-oxygen-species-and>. doi: 10.1042/BSR20191601.

4. Chen W, Li D. Reactive oxygen species (ROS)-responsive nanomedicine for solving ischemia-reperfusion injury. Front. Chem [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 16];8: Article 732. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2020.00732/full>. doi: 10.3389/fchem.2020.00732.

5. Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. Free radical biology & medicine. 2019;140:14-27. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035.

6. Benhar M. Oxidants, antioxidants and thiol redox switches in the control of regulated cell death pathways. Antioxidants [Internet]. 2020 [cited 2024 Feb 21];9(4): Article 309. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/4/309>. doi: 10.3390/antiox9040309.

7. Sachdeva S, Sharma A, Flora SJS. MiADMSA abrogates sodium tungstate-induced oxidative stress in rats. Drug and Chemical Toxicology. 2021;45(6):2448-53. doi: 10.1080/01480545.2021.1957560.

8. Benov LC, Benchev IC, Monovich OH. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. Chemico-biological interactions. 1990;76(3):321-32. doi: 10.1016/0009-2797(90)90099-9.

9. Tagirova ZG. [Oxidative stress and antioxidant systems in acute bacterial dysentery]. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. 2016;(1):48-51. Russian.

10. Kukurt A, Gelen V, Baser O. et al. Accenting lipid peroxidation. Turkey: Istanbul University Cerrahpasa; 2021. 158 p. doi: 10.5772/intechopen.96682.

11. Carranza-Rosales P, Guzman-Delgado NE, Cruz-Vega DE, et al. DMPS reverts morphologic and mitochondrial damage in OK cells exposed to toxic concentrations of HgCl2. Cell Biology and Toxicology. 2006;23(3):163-76. doi: 10.1007/s10565-006-0132-y.

12. Vasil'ev AN. [Evaluation of the effect of antioxidants on the specific antiviral activity of human recombinant interferon alpha-2b against herpes simplex virus in cell culture]. Antibiotiki i Khimioterapiya. 2010;55(7-8):20-5. Russian.

13. Kuz'mina TI. Otsenka geneticheskoi polnotsennosti ovotsitov korov pri ikh kul'tivirovaniy vne organizma [Evaluation of the genetic integrity of bovine oocytes during their cultivation outside the body] [dissertation]. Leningrad (USSR): [place unknown]; 1983. 130 p. Russian.

14. Korban NV, Shapiev ISH, Moroz LG. Sreda dlya zamorazhivaniya spermy zhivotnykh [Animal sperm freezing medium]. USSR patent SU540634A1. 1976 Dec 30. Russian.

15. Kim H, Xue X. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. Journal of visualized experiments [Internet]. 2020 [cited 2024 Apr 18];(160): Article e60680. Available from: <https://app.jove.com/t/60682>. doi: 10.3791/60682.

16. De P, Carlson JH, Leyland-Jones B, et al. Triple fluorescence staining to evaluate mechanism-based apoptosis following chemotherapeutic and targeted anti-cancer drugs in live tumor cells. Scientific reports [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 18];8: Article 13192. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31575-3>. doi: 10.1038/s41598-018-31575-3.

17. Gal Le K, Schmidt EE, Sayin VI. Cellular redox homeostasis. Antioxidants [Internet]. 2021 [cited 2024 Mar 26];10(9): Article 1377. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/9/1377>. doi: 10.3390/antiox10091377.

18. Bird S. L-Cysteine improves survival and growth of mesothelial cells after freezing. Cell biology international. 2009;33(11):1155-64. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.08.

19. Tvrdá E, Sikeli P, Lukacova J, et al. Mineral nutrients and male fertility. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences [Internet]. 2013 [cited 2024 Mar 26];1(3):1-14. Available from: <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7068>.

20. Baimenov AZ, Fakhradiyev IR, Berillo DA, et al. Synthetic amphoteric cryogels as an antidote against acute heavy metal poisoning. Molecules [Internet]. 2021 [cited 2024 Mar 28];26(24): Article 7601. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/24/7601>. doi: 10.3390/molecules26247601.

21. Sato T, Okubo M, Sawaki K, et al. Paradoxical effect of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on enhancing antitumor activity of cisplatin in ascites sarcoma 180 cells. Journal of pharmacological sciences. 2010;112(3):361-8. doi: 10.1254/jphs.09323fp.

Поступила в редакцию 17.06.2024 После доработки 26.07.2024 Принята к публикации 20.08.2024