

ПРИСУТСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ Фолликулярного ПРОИСХОЖДЕНИЯ В СРЕДЕ СОЗРЕВАНИЯ ДОНОРСКИХ ООЦИТОВ КОРОВ ПОВЫШАЕТ ИХ СПОСОБНОСТЬ К ЭМБРИОНАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ *in vitro**

Г.Н. СИНГИНА¹ ✉, Е.Н. ШЕДОВА¹, R. UZBEKOV^{2, 3}, Р.Ю. ЧИНАРОВ¹,
В.А. ЛУКАНИНА¹, S. UZBEKOVA⁴

Технология получения эмбрионов *in vitro* (*in vitro* embryo production, IVER) с использованием ооцитов, выделенных посредством трансвагинальной пункции фолликулов (ovum-pickup, OPU) позволяет получать большее число потомков от лучших матерей и все чаще используется в скотоводстве в программах по тиражированию и сохранению ценных генотипов. Для повышения эффективности OPU/IVER-технологии в представленной работе мы впервые культивировали OPU-ооциты коров в присутствии внеклеточных везикул (extracellular vesicles, EVs) из фолликулярной жидкости (ФЖ) яичников коров и определили способность таких ооцитов к эмбриональному развитию *in vitro* после экстракорпорального оплодотворения. Цель работы заключалась в изучении влияния EVs на OPU-ооциты коров с точки зрения их созревания и последующей способности развиваться до стадии бластоцисты, а также устойчивости полученных бластоцист к замораживанию. EVs из ФЖ выделяли методом дифференциального центрифугирования и ультрацентрифугирования при 100000 g. Образцы проанализировали с использованием трансмиссионной электронной микроскопии, которая подтвердила, что в выделенных препаратах присутствуют EVs, соответствующие по размерам экзосомам. Донорами ооцитов были половозрелые телки ярославской породы ($n = 6$) с естественным половым циклом. OPU проводили 2 раза в неделю. Для созревания выделенные ооциты культивировали в среде TC-199, дополненной фетальной бычьей сывороткой (10 %), фолликулостимулирующим и лютеинизирующим (10 мкг/мл) гормонами, эпидермальным фактором роста (10 нг/мл) в отсутствие (контроль) или в присутствии EVs (опыт). Везикулярный белок добавляли в среду *in vitro* созревания (*in vitro* maturation, IVM) в физиологической концентрации (на 1 мл среды — количество EVs, выделенное из 1 мл ФЖ). Через 24 ч созревания ооциты подвергали экстракорпоральному оплодотворению и культивированию для эмбрионального развития. На 3-и сут после оплодотворения изучали морфологию раздробившихся оплодотворенных ооцитов, на 7-е сут культивирования определяли число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты (Бл). Полученные Бл замораживали, некоторое время хранили при -196 °C, после чего размораживали и культивировали до стадии вылупления, определяя жизнеспособность эмбрионов. Всего провели 10 независимых экспериментов. Число ооцитов в контроле и опыте было одинаковым и составило соответственно 57 и 56 клеток. Мы не выявили влияния условий культивирования на завершение ядерного созревания. Доля созревших ооцитов была сходной в обеих группах и составила в контроле и опыте соответственно $90,4 \pm 5,6$ и $94,3 \pm 3,1$ %. Также присутствие EVs в среде IVM не изменяло долю раздробившихся ооцитов после оплодотворения *in vitro*, которая составила $78,6 \pm 7,3$ и $86,7 \pm 4,9$ % соответственно для контроля и опыта. Тем не менее обнаружено положительное влияние EVs на развитие созревших ооцитов до стадии Бл. При культивировании OPU-ооцитов в контрольной среде выход Бл составлял $26,6 \pm 5,81$ %. Введение EVs в среду IVM повышало этот показатель до $41,2 \pm 3,2$ % ($p < 0,05$). Также обнаружено влияние (на уровне тенденции) везикул на криоустойчивость полученных Бл. В контроле процент вылупления Бл после их размораживания и кратковременного культивирования составил $29,1 \pm 8,8$ %, в опыте он возрос до $53,3 \pm 9,2$ %. Таким образом, использование EVs из ФЖ яичников коров в процедуре IVM повышает качество ооцитов и, как следствие, их компетентность к эмбриональному развитию после экстракорпорального оплодотворения. Следовательно, EVs из ФЖ на этапе экстракорпорального созревания могут быть использованы для повышения эффективности OPU/IVER технологии у крупного рогатого скота.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, фолликулярная жидкость, ооциты коров, *in vitro* созревание, эмбриональное развитие.

Биотехнологии, направленные на получение эмбрионов от живых доноров и их трансплантацию животным-реципиентам, широко используются в скотоводстве для увеличения числа потомков от лучших матерей с целью более полной реализации их генетического потенциала в последующих поколениях и ускорения генетического прогресса в селекции у крупного

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-16-00115-П).

рогатого скота (КРС) (1, 2).

Получают эмбрионы либо *in vivo*, используя технологию множественной овуляции и трансплантации эмбрионов (Multiple Ovulation and embryo transfer, МОЕТ), либо *in vitro*. В случае МОЕТ суть подхода заключается в индукции суперовуляции у коров-доноров посредством гормональной обработки, их искусственного осеменения с последующим вымыванием эмбрионов и пересадкой свежих либо заморожено-оттаянных эмбрионов реципиентам (1). Технология получения эмбрионов *in vitro* (*in vitro* embryo production, IVER), в свою очередь, включает выделение женских половых клеток (ооцитов), их созревание и оплодотворение *in vitro*, а также последующее культивирование образовавшихся зигот до эмбриональных стадий, пригодных к заморозке и трансплантации (2). Выделяют ооциты из фолликулов яичников живых коров и телок чаще всего методом трансвагинальной пункции фолликулов (*ovum pick up*, OPU). В отличие от МОЕТ, OPU можно проводить многократно и в течение сравнительно длительного времени (3, 4). Кроме того, для выделения ооцитов из фолликулов необязательно проводить гормональную стимуляцию яичников, а следовательно, процедуру можно повторять через более короткие интервалы времени (как правило, два или один раз в неделю) по сравнению с получением эмбрионов *in vivo* (не чаще одного раза в 2 мес). Согласно статистике последних лет, число *in vivo* эмбрионов, используемых на практике для трансплантации реципиентам, находится примерно на одном уровне (5, 6), а полученных *in vitro* (*in vitro* production, IVP) — продолжает увеличиваться со среднегодовым темпом роста 12 % (7). Связано это, в первую очередь, с тем обстоятельством, что технология IVER, предусматривающая использование донорских OPU-ооцитов (OPU/IVER-технология), стала в настоящее время альтернативой традиционной программе получения эмбрионов *in vivo* (6) и все чаще используется в коммерческих целях во многих странах (7, 8).

Важным условием для практического использования OPU/IVER-технологии остается ее эффективность, которая, несомненно, если сравнивать ретроспективно, существенно повысилась в последние годы, но тем не менее уступает по ряду показателей МОЕТ. В первую очередь, речь идет о снижении качества получаемых с использованием OPU-ооцитов эмбрионов и устойчивости OPU/IVER-эмбрионов к замораживанию, а также о снижении их жизнеспособности после трансплантации по сравнению с таковыми, полученными *in vivo* (9-11). Продолжение исследований по оптимизации этапов OPU/IVER-технологии и выявлению факторов, влияющих на ее эффективность, позволит решить эту проблему.

Как известно, эффективность OPU/IVER-технологии в первую очередь определяется качеством ооцитов перед процедурой экстракорпорального оплодотворения, приобретаемым ими в процессе созревания *in vitro* (*in vitro* maturation, IVM) (12, 13). При этом условия IVM все еще остаются субоптимальными и требуют усовершенствования.

В рутинных практиках репродуктивных биотехнологий КРС *in vitro* созревание ооцитов коров проводят в оптимизированных средах, содержащих, как минимум, ростовые факторы типа EGF и сыворотку зародышей коров (14), и также используют коммерческие бессывороточные среды. При разработке бессывороточных сред, исходно менее эффективных, использовали различные компоненты (гормоны, аминокислоты, антиоксиданты, жирные кислоты, витамины, ионы металлов и различные биологические препараты), добавление которых бы могло положительно повлиять на цитоплазматическое созревание яйцеклетки и увеличить число и качество

бластоцист *in vitro*, способных развиться в жизнеспособный плод (15, 16). Тем не менее качество OPU-ооцитов, созревающих *in vitro*, как правило, в маленьких группах, обычно ниже, чем в культуре с большим числом ооцит-кумулясных комплексов (ОКК), обычно от 25 до 50 в 0,5 мл среды. Также OPU-ооциты, полученные от некоторых коров, зачастую окружены меньшим количеством клеток кумулюса (КК), что может снизить результаты созревания *in vitro* (в первую очередь цитоплазматического). Добавление в среду IVМ 5 % фолликулярной жидкости (ФЖ), являющейся оптимальной средой для созревания ооцитов, повышает их способность к эмбриональному развитию *in vitro*, особенно в культуре индивидуальных ооцитов (17). Кроме гормональных и стероидных составляющих ФЖ, продукты секреции фолликулярных клеток и плазматические производные содержатся во внеклеточных везикулах (extracellular vesicles, EVs), в частности в нановезикулах диаметром 30-150 нм, называемых экзосомами. Такие EVs содержат различные регуляторные факторы, участвующие в молекулярном диалоге ооцита с фолликулярными клетками, и в первую очередь, с клетками кумулюса. EVs, сконцентрированные в фолликулярной жидкости, поглощаются целевыми клетками через межклеточные соединения и трансзональные проекции между ооцитом и окружающими его КК (18, 19). EVs ФЖ коров содержат различные белки (20), липиды (21) и нуклеиновые кислоты, в том числе микроРНК, регулирующие экспрессию генов в целевых клетках, в частности в ооците (22, 23). Эти компоненты необходимы для развития ооцита и формирования его способности к последующему эмбриональному развитию. Везикулярные факторы ФЖ вовлечены в регуляцию сигнальных путей, контролирующих развитие фолликула и ооцита в нем, служат медиаторами реакции клеток на гормональные и экологические стрессы, а также влияют на созревание ооцитов. *In vitro*, EVs из ФЖ усиливают пролиферацию фолликулярных гранулозных клеток, повышают осуществляемый ими синтез стероидов, увеличивают экспансию кумулюса, уменьшают апоптоз в КК и ооцитах и влияют на активацию различных сигнальных путей в ОКК (22). EVs ФЖ при добавлении в среду IVМ улучшают эффективность IVER и качество эмбрионов у коров *in vitro* (24, 25) и положительно влияют на развитие и выживание эмбрионов в условиях термического стресса у коров (25). Хотя механизмы этих эффектов изучены далеко не полностью, они включают регуляцию с помощью микроРНК функций специфических белков и липидов, которые опосредуют молекулярные сигналы в ооцитах и КК и таким образом влияют на процесс созревания ооцитов.

В представленной работе мы впервые исследовали влияние EVs ФЖ, добавленных в среду созревания, на способность OPU-ооцитов коров к эмбриональному развитию *in vitro*.

Цель работы заключалась в изучении влияния EVs ФЖ коров на созревание OPU-ооцитов в процессе IVМ и на их последующую способность развиваться *in vitro* до стадии бластоцисты. Также оценивали влияние тестируемых условий на устойчивость полученных бластоцист к замораживанию.

Методика. В работе применяли реагенты фирмы «Sigma-Aldrich» (США) (за исключением специально указанных случаев).

Для выделения EVs полученные с мясокомбината яичники коров доставляли в лабораторию на льду. Далее их освобождали от окружающих тканей и отмывали в стерильном физиологическом растворе, который был предварительно охлажден до +4 °С и содержал антибиотики (100 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина; «БиоФармГарант», Россия). Для получения EVs ФЖ отсасывали из антральных фолликулов диаметром 3-6 мм

и центрифугировали 15 мин при +20 °С и 300 g для удаления соматических клеток. Все последующие центрифугирования проводили также при температуре +20 °С. Далее супернатант повторно центрифугировали 15 мин при 2000 g для удаления апоптотических телец размером 1-5 мкм. Третье центрифугирование (15 мин при 12000 g) было проведено для удаления крупных микровезикул размером 200-1000 нм. После этой предварительной очистки ФЖ EVs осаждали ультрацентрифугированием в течение 90 мин при 100000 g (центрифуга CS 150 NX, «Hitachi», Япония). Супернатант разводили стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (pH 7,4) и повторно центрифугировали 90 мин при 100000 g для более полного выделения EVs. Осадки двух ультрацентрифугирований объединяли и разводили ФСБ. Из полученных образцов отбирали две аликвоты по 5 мкл. Одну из аликвот использовали для определения количества EVs по концентрации белка на приборе Qubit™ 4 Fluorometer с использованием набора Qubit Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific», США) и белкового стандарта Qubit с концентрацией от 0,125 до 5 мг/мл. Вторую аликвоту использовали для ультраструктурного анализа препарата частиц с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), для чего ее смешивали с равным объемом 2 % раствора глутарового альдегида (качество для электронной микроскопии, ЭМ) на ФСБ («Agar Scientific, Ltd.», Великобритания) и фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре. По 2 мкл фиксированных образцов EVs наносили на никелевые ЭМ сеточки («Agar Scientific, Ltd.», Великобритания), покрытые формваровой пленкой с углеродным напылением, и инкубировали 60 мин во влажной камере. Далее сеточки с осажденными на поверхность пленки EVs промывали дистиллированной водой для удаления солей, содержащихся в ФСБ. Для этого на поверхность пленки 3 раза наносили каплю объемом 10 мкл, через 10 с ее удаляли, касаясь фильтровальной бумаги краем сеточки. Негативное контрастирование 2 % водным раствором уранилацетата («Electron Microscopy Science», США) проводили аналогичным образом (3 раза по 10 с), удаляя каплю раствора касанием краем сеточки фильтровальной бумаги. После удаления последней капли сеточку сушили на воздухе. Для ультраструктурного исследования использовали трансмиссионный электронный микроскоп JEOL 1011 («JEOL, Ltd.», Япония). Образцы фотографировали с помощью цифровой камеры GATAN RIO 9 с использованием программы DigitalMicrograph3 («Gatan, Inc.», США). По результатам электронно-микроскопического анализа устанавливали наличие EVs в полученных образцах и оценивали их морфологию.

Концентрацию EVs определяли с использованием аппарата анализа наночастиц ZetaView («Particle-Metrix», Германия), откалиброванного контрольными частицами размером 100 нм. Препараты EVs из ФЖ коров разводили в соотношении с 1:1000 до 1:5000 в стерильном ФСБ (фильтр 0.1 мкм) и исследовали в режиме лазерного ($\lambda = 488$ нм) измерения, используя 1 мл разведенного препарата. Концентрацию рассчитывали с помощью специализированной программы ZetaView (версия 8.05.14 SP7).

При получении IVER эмбрионов с использованием OPU-технологии донорами ооцитов были половозрелые клинически здоровые телки (*Bos taurus*) ярославской породы ($n = 6$) в возрасте 3,2-3,5 года. Рационы доноров были сбалансированы по энергии, питательным и биологически активным веществам в соответствии с нормами потребностей животных. OPU выполняли 2 раза в неделю с интервалом 3 или 4 сут.

Трансвагинальную пункцию фолликулов проводили, используя систему для OPU, в комплект которой входил ультразвуковой сканер Versana

Active с конвекциональным широкополосным зондом (частота 5 МГц) и держателем зонда («GE HealthCare», США), а также вакуумный насос («Minutube», Германия). Животных индивидуально фиксировали в станке и выполняли эпидуральную анестезию 2 % раствором новокаина. Видимые фолликулы аспирировали иглой, соединенной силиконовым шлангом с центрифужной пробиркой объемом 50 мл. В качестве аспирационной использовали среду в модификации Дюльбекко с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) («Биолот», Россия) и гепарина (18 МЕ/мл). Аспираты от каждого донора (1 сессия ОРУ) фильтровали индивидуально, промывали ФБС, дополненным 1 % ФБС («Биолот», Россия), после чего под стереомикроскопом («Nikon», Япония) искали ооциты и переносили их в чашки Петри со средой ТС-199, содержащей 5 % ФБС и 50 мкг/мл гентамицина (ТС-199М).

Общий пул собранных от каждого донора ооцитов промывали трижды в ТС-199М, после чего разделяли по морфологическим критериям на три категории качества — хорошего, среднего и плохого. К хорошим по качеству относили ооциты с гомогенной цитоплазмой, окруженные более чем одним слоем компактного кумулюса, к средним — ооциты с гомогенной или умеренно гетерогенной цитоплазмой, с одним слоем кумулюсных клеток (КК) или частично окруженные КК, к плохим — ооциты, имеющие неоднородную цитоплазму с признаками грануляции или лизиса, голые клетки, а также созревшие ооцит-кумуляные комплексы (ОКК). Пригодными для дальнейшей работы считались только ооциты хорошего и среднего качества.

Отобранные ооциты хорошего и среднего качества объединяли и культивировали группами (4-8 ооцитов) в каплях среды объемом 200 мкл, нанесенных на дно лунки 4-луночного планшета («Биомедикал», Россия) и полностью покрытых минеральным маслом. В контроле в качестве среды ИVM использовали ТС-199 с ФБС (10 %), пируватом натрия (0,5 мМ), фолликулостимулирующим гормоном (10 мкг/мл), лютеонизирующим гормоном (10 мкг/мл), эпидермальным фактором роста (20 нг/мл) и гентамицином (50 мкг/мл). В опыте к этой среде добавляли EVs в физиологической концентрации, то есть к 1 мл среды ИVM добавляли везикулярный белок, выделенный из 1 мл фолликулярной жидкости. Культивирование проводили в инкубаторе (МСО-18AIC, «Sanyo», Япония) при 38,5 °С и 5 % CO₂ в атмосфере. Через 24 ч созревания ооциты подвергали процедуре экстракорпорального оплодотворения, как описано ранее (26).

Для экстракорпорального оплодотворения соломинки с замороженной спермой быка ярославской породы размораживали, активные сперматозоиды получали методом swim-up, применяя среду Sperm-TALP (27), как описано ранее (28). Выделенные сперматозоиды, добавляли к среде оплодотворения с предварительно перенесенными туда ОКК, так чтобы концентрация сперматозоидов составила $1,5 \times 10^6$ на 1 мл.

Половые клетки совместно культивировали в течение 10-11 ч, затем ооциты отделяли от КК и налипших сперматозоидов и оценивали морфологически. Выявляли наличие у ооцитов полярных телец (ПП) и таким образом определяли процент созревания (долю ооцитов с ПП к общему числу ооцитов). Очищенные оплодотворенные яйцеклетки переносили в среду ВО-IVC («IVF Bioscience», Великобритания) для развития эмбрионов. Культивирование происходило в инкубаторе (МСО-50M-PE, «Sanyo», Япония) при температуре 38,5 °С и газовой атмосфере, содержащей 5 % CO₂, 5 % O₂ и 90 % N₂, в каплях среды ВО-IVC объемом 100 мкл, нанесенных на дно лунки 4-луночного планшета («Nunc», Дания). Через 3 сут после опло-

дотворения ооцитов проводили смену среды и морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-е сут культивирования оценивали число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты.

Полученные бластоцисты замораживали с использованием автоматизированного программного замораживателя CL-8800 («Cryologic», Австралия) в 1,5 М растворе этиленгликоля («IVM Technologies», Франция), после чего хранили в парах жидкого азота не менее 1 мес. Для оценки жизнеспособности эмбрионы размораживали и культивировали в среде ВО-IVC («IVF Bioscience», Великобритания), дополненной 5 % ФБС, в течение 3 сут до стадии вылупления.

Оценку дробления, развития до стадии бластоцисты и вылупившейся бластоцисты проводили под стереомикроскопом («Nikon», Япония). В некоторых случаях развивающиеся *in vitro* эмбрионы фотографировали, используя микроскоп Eclipse Ti-U («Nikon», Япония).

Статистическую обработку данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа в программе SigmaStat («Systat Software, Inc.», США). Данные выражали как средние значения (M) и стандартные ошибки средних ($\pm SEM$). Достоверность различий сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки (p не более 0,05).

Результаты. Препараты, обогащенные внеклеточными нановезикулами, были получены в результате последовательных центрифугирований ФЖ, выделенной из антральных фолликулов размером 3-6 мм. Выделение завершалось ультрацентрифугированием при 100000 g и отмывкой лишнего белка с помощью ФСБ. Такие препараты, разведенные в фосфатном буфере, содержали EVs, по размеру относящиеся к экзосомам (29, 30), а также кластеры липопротеинов (рис. 1, А). В препаратах, приготовленных таким образом, содержание общего белка составило $31,18 \pm 4,4$ мкг в расчете на 1 мл ФЖ. Концентрация EVs в расчете на 1 мл ФЖ составляла $2.4-4.5 \times 10^{12}$ со средним размером частиц 132,4-135,9 нм (см. рис. 1, Б).

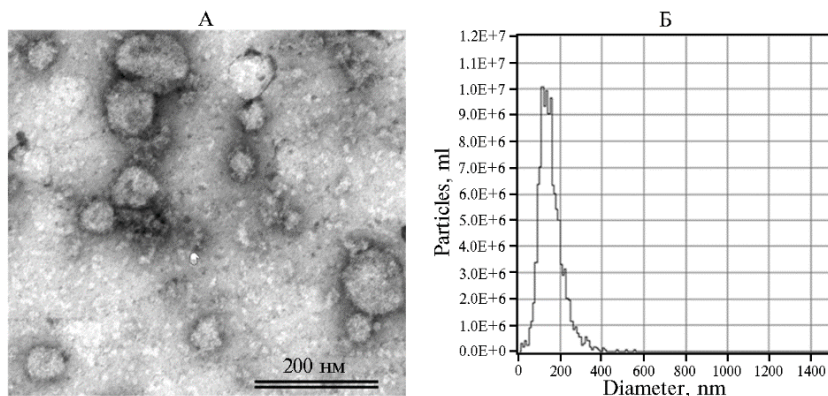


Рис. 1. Анализ пула внеклеточных везикул (EVs), выделенных из фолликулярной жидкости (ФЖ) антральных фолликулов коров: А — препарат EVs (трансмиссионная электронная микроскопия, JEOL 1011, «JEOL, Ltd.», Япония); Б — график распределения размеров (diameter) и концентрации частиц (particles) в разведенном препарате EVs из ФЖ яичников коров (Лаборатория клеточной биологии и электронной микроскопии Медицинского факультета Турского университета, 2022 год).

Всего за 34 сессии ОРУ аспирировали 321 УЗИ-видимый фолликул, из этих фолликулов выделили 156 ооцитов разного качества. После морфологической оценки ооциты хорошего и среднего качества культивировали с целью созревания либо в контрольной среде IVM, либо в среде, содержащей EVs. Из таблицы 1 видно, что группы имели сопоставимые показатели как

по эффективности процедуры ОРУ (число аспирированных фолликулов на одну сессию ОРУ и доля извлеченных ооцитов от числа аспирированных фолликулов), так и по качеству используемых для исследования ооцитов (доля ооцитов хорошего и среднего качества, то есть пригодных для культивирования, от общего числа выделенных ооцитов).

1. Выделение и оценка качества ОРУ-ооцитов телок (*Bos taurus*) ярославской породы в контрольной и опытной (EVs) группах (ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год)

Показатель	Контроль	EVs
Число сессий ОРУ, <i>N</i>	18	16
Аспирировано фолликулов, <i>n</i>	164	157
Число аспирированных фолликулов на 1 сессию ОРУ, <i>n</i>	9,11	9,81
Общее число выделенных ооцитов, <i>n</i>	80	76
Доля извлечения ооцитов от числа аспирированных фолликулов, %	55,7±7,2	53,3±7,3
Доля ооцитов хорошего качества от общего числа выделенных ооцитов, %	33,3±7,3	32,5±8,7
Доля ооцитов среднего качества от общего число выделенных ооцитов, %	39,6±5,2	46,7±8,8
Доля пригодных для культивирования ооцитов от общего числа выделенных, %	72,9±4,3	79,3±5,5

Примечание. Контрольная и опытная группы — среда *in vitro* созревания соответственно без или с внеклеточными везикулами (EV) из фолликулярной жидкости коров.

Результаты созревания и эмбрионального развития ОРУ-ооцитов представлены в таблице 2.

2. Способность к эмбриональному развитию после оплодотворения *in vitro* ОРУ-ооцитов телок (*Bos taurus*) ярославской породы при воздействии внеклеточных везикул (EVs) из фолликулярной жидкости в среде созревания (ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год)

Показатель	Контроль	EVs
Число повторов, <i>N</i>	10	10
Число ооцитов, <i>n</i>	57	56
Доля созревших ооцитов, %	90,4±5,6	94,3±3,1
Доля раздробившихся ооцитов, %	78,6±7,3	86,7±4,9
Доля ооцитов, развившихся до стадии бластоцисты, %	26,6±5,8	41,2±3,2*

Примечание. Контроль — среда для *in vitro* созревания IVM.

* Различия с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.

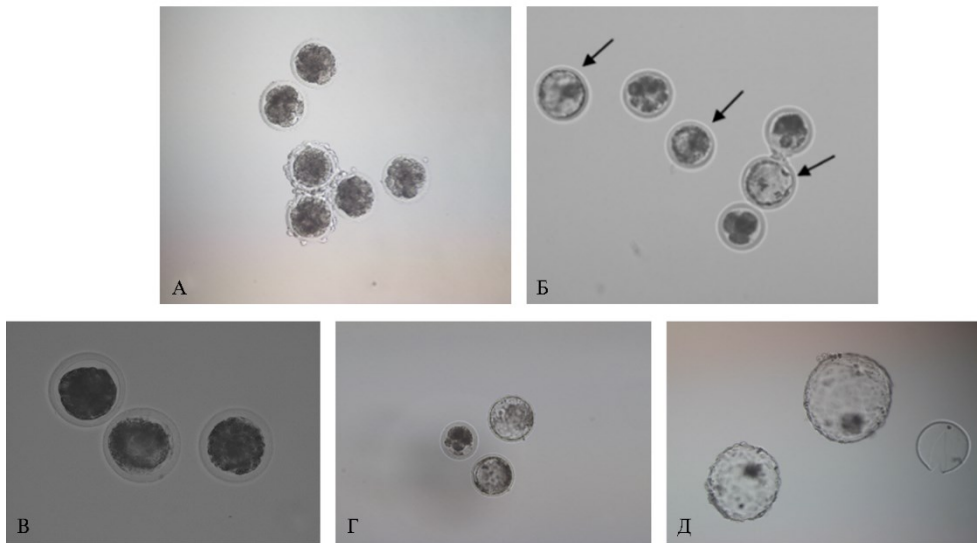


Рис. 2. Эмбрионы крупного рогатого скота (*Bos taurus*) ярославской породы, развившиеся после *in vitro* оплодотворения ОРУ-ооцитов: А — раздробившиеся ооциты; Б — эмбрионы, развившиеся до стадии бластоцисты (Бл, отмечены стрелками); В — замороженные Бл непосредственно после процедуры размораживания (увеличение $\times 200$); Г — размороженные Бл через 24 ч культивирования; Д — размороженные Бл, достигшие стадии вылупления через 3 сут культивирования. Микроскоп Eclipse Ti-U, «Nikon», Япония (увеличение $\times 100$ за исключением указанного для В) (ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год).

Присутствие EVs в среде IVM не влияло на ядерное созревание OPU-ооцитов. Процент созревания (доля ооцитов с ПП) оказался равно высоким в обеих группах (более 90 %). Также мы не выявили влияния везикул на способность созревших в их присутствии ооцитов вступить в первое деление дробления (рис. 2, А). Доля раздробившихся яйцеклеток после экстракорпорального оплодотворения была выше 70 %. Тем не менее обнаружено положительное влияние EVs из ФЖ на развитие созревших и оплодотворенных *in vitro* ооцитов до стадии бластоцисты (см. рис. 2, Б). При культивировании OPU-ооцитов в контрольной среде IVM выход бластоцист составил $26,6 \pm 5,8$ %. Введение EVs в среду IVM повышало этот показатель в 1,5 раза ($p < 0,05$). Как следствие, в расчете на одну сессию OPU в опыте получили 1,37 бластоцисты против 0,77 в контроле.

Мы также определили долгосрочные эффекты присутствия EVs ФЖ в среде созревания ооцитов, используя тест на устойчивость развившихся из них бластоцист к замораживанию. При исследовании выживаемости бластоцист после процедуры замораживания-размораживания было обнаружено позитивное влияние препаратов везикул на созревающие ооциты (табл. 3). Воздействием EVs во время созревания OPU-ооцитов было обусловлено увеличение (хотя и недостоверное) доли вылупившихся бластоцист (см. рис. 2, Д), что, вероятно, стало следствием повышения их жизнеспособности и/или потенциала к развитию, наблюдаемого до замораживания.

3. Влияние внеклеточных везикул (EVs) из фолликулярной жидкости в среде созревания OPU-ооцитов телок (*Bos taurus*) ярославской породы на жизнеспособность заморожено-оттаянных бластоцист после кратковременного культивирования *in vitro* (ФГБНУ ФИЦ животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 2023 год)

Группа	Число		Доля вылупившихся бластоцист, %
	повторов, <i>N</i>	бластоцист, <i>n</i>	
Контроль (среда для <i>in vitro</i> созревания IVM)	10	14	$29,1 \pm 8,8$
EVs (IVM + EVs)	10	22	$53,3 \pm 9,2^*$

* Различия с контролем: $p = 0,081$.

Внеклеточные везикулы представляют собой покрытые мембраной секреторные гранулы, присутствие которых обнаружено во всех типах биологических жидкостей (18), в том числе в жидкости из фолликулов яичников самок, которая является естественным окружением ооцитов при их развитии *in vivo*. Показано, что EVs активно участвуют в межклеточных коммуникациях внутри фолликула, так как они секретируются клетками и способны переносить свое содержимое в другие клетки за счет способности последних их поглощать (18, 19). В связи с этим EVs активно изучаются как потенциальные регуляторы качества ооцитов (в том числе, у коров) и их компетенции к эмбриональному развитию в условиях *in vitro* (24, 25, 31-33).

К настоящему времени показано, что внесение EVs в среду IVM *post mortem* ооцитов коров увеличивает выход бластоцист с 26 % (контроль) до 37 % (32), а также повышает качество эмбрионов (24). Кроме того, установлено, что EVs могут улучшать функциональное состояние зрелых ооцитов, повышая их устойчивость к возрастным трансформациям (34), а также защищая их от стресса (25).

В представляемой работе объектом исследования служили ооциты коров, выделенные из фолликулов яичников индивидуальных доноров методом OPU. Насколько нам известно, это первое исследование, в котором OPU-ооциты культивировали с целью созревания в отсутствие (контроль) или в присутствии EVs, после чего оплодотворяли *in vitro* и культивировали до стадии бластоцисты. При этом мы изучали не только влияние EVs на

созревание ОРУ-ооцитов и их развитие до стадии бластоцисты, но также устойчивость полученных бластоцист к замораживанию-оттаиванию. Выделенные из ФЖ антральных фолликулов (диаметр 3-6 мм) EVs, согласно общепринятой классификации (29, 30), представляли собой по размеру экзосомы (см. рис. 1, А, Б). Их присутствие в среде созревания не влияло на ядерное созревание ОРУ-ооцитов и их способность после оплодотворения вступать в первое деление дробления (см. табл. 2). Тем не менее мы показали, что EVs, выделенные из ФЖ яичников коров, во время созревания ооцитов могут улучшать развитие эмбрионов *in vitro*. При воздействии EVs доля ооцитов, достигших стадии Бл, увеличивалась по сравнению с контролем с 26 до 42 %, что было даже несколько выше, чем в исследованиях других авторов на *post mortem* ооцитах коров (32). Кроме того, присутствие EVs в среде ИVM, возможно, имеет долгосрочный эффект, так как обнаружилась тенденция к повышению жизнеспособности полученных Бл после процедуры замораживания-размораживания. На наш взгляд, статистическая недостоверность при определении характера влияния EVs в среде ИVM на криоустойчивость Бл может быть связана с присутствием в среде фетальной сыворотки крупного рогатого скота. О негативном влиянии некоторых компонентов ФБС ранее сообщалось в аналогичных исследованиях по использованию EVs, выделенных из сред, кондиционированных эпителиальными клетками яйцевода (35).

Таким образом, использование внеклеточных везикул EVs из фолликулярной жидкости (ФЖ) яичников коров в процедуре *in vitro* созревания (ИVM) улучшает качество ооцитов и, как следствие, их компетенцию к эмбриональному развитию после экстракорпорального оплодотворения. Следовательно, препараты, обогащенные внеклеточными везикулами из ФЖ коров, могут быть применены на этапе экстракорпорального созревания яйцеклеток для более эффективного получения высококачественных эмбрионов крупного рогатого скота с помощью ОРУ/ИВЕР технологии.

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, 142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60, e-mail: g_singina@mail.ru ✉, shedvek@yandex.ru, roman_chinarov@mail.ru, kristybatle@gmail.com;

Поступила в редакцию
3 ноября 2023 года

²Laboratory of Cell Biology and Electron Microscopy, Faculty of Medicine, University of Tours, 37032 Tours, France, 10 bd Tonnelles, e-mail: rustem.uzbekov@univ-tours.fr;

³Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234 Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы 1, стр. 73;

⁴Physiology of Reproduction and Behavior unit, INRAE, CNRS, IFCE, Tours University, 37380 Nouzilly, France, e-mail: svetlana.uzbekova@inrae.fr

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 6, pp. 1100-1111

PRESENCE OF FOLLICULAR FLUID EXTRACELLULAR VESICLES DURING *in vitro* MATURATION OF DONOR COW (*Bos taurus*) OOCYTES INCREASES THEIR ABILITY TO *in vitro* EMBRYO DEVELOPMENT

G.N. Singina¹ ✉, E.N. Shedova¹, R. Uzbekov^{2, 3}, R.Yu. Chinarov¹, V.A. Lukanina¹, S. Uzbekova⁴

¹Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail g_singina@mail.ru (✉ corresponding author), shedvek@yandex.ru, roman_chinarov@mail.ru,

kristybatle@gmail.com;

²Laboratory of Cell Biology and Electron Microscopy, Faculty of Medicine, University of Tours, 37032 Tours, France, 10 bd Tonnelle, e-mail rustem.uzbekov@univ-tours.fr;

³Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, GSP-1, 1-73, Leninskiye Gory, Moscow, 119234 Russia;

⁴Physiology of Reproduction and Behavior unit, INRAE, CNRS, IFCE, Tours University, 37380 Nouzilly, France, e-mail svetlana.uzbekova@inrae.fr

ORCID:

Singina G.N. orcid.org/0000-0003-0198-9757

Chinarov R.Yu. orcid.org/0000-0001-6511-5341

Shedova E.N. orcid.org/0000-0002-9642-2384

Lukanina V.A. orcid.org/0000-0003-4744-7873

Uzbekov R. orcid.org/0000-0002-9336-5484

Uzbekova S. orcid.org/0000-0002-6989-6904

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Science Foundation, project No. 19-16-00115-II

Final revision received November 03, 2023

doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1100eng

Accepted November 30, 2023

Abstract

In vitro embryo production (IVEP) technology from the oocytes isolated by transvaginal follicle puncture (ovum-pickup, OPU) is widely used to generate a number of descendants from the most valuable donor cows and becomes a routine in cattle breeding programs to replicate and conserve precious genotypes. To increase the efficiency of OPU/IVEP-technology, in this work for the first time, bovine OPU-oocytes were matured in the presence of extracellular vesicles (EVs) from follicular fluid (FF), and the ability of treated oocytes to IVEP after in vitro fertilization was investigated. The aim was to study the effects of FF EVs on oocyte maturation and capacity to develop up to blastocyst of OPU-oocytes, as well as to resistance of such blastocysts to freezing. EVs were obtained from FF by differential centrifugations followed by ultracentrifugation at 100,000 g. The preparations were analyzed by transmission electron microscopy that confirmed the presence of exosome-size EVs. Oocyte donors were sexually mature Yaroslavl breed heifers ($n = 6$) following natural cycle. OPU was performed twice a week. The isolated oocytes were in vitro matured in TC-199 medium, supplemented by fetal bull serum (10 %), follicle stimulating and luteinizing (10 $\mu\text{g/ml}$) hormones, epidermal growth factor (10 ng/ml) in absence (control) or presence of EVs (experiment). Vesicular preparations were added to the in vitro maturation (IVM) medium in the physiological concentration (EVs isolated from 1 ml of FF per 1 ml of medium). After 24 hours of IVM, the oocytes were subjected to in-vitro fertilization and in vitro embryo culture. At day 3 after fertilization, oocyte morphology was checked, and at day 7 of culture, a number of embryos developed to blastocyst (BI) was determined. The resulting BI were frozen and stored for some time at -196°C . Then the blastocysts were thawed and in vitro cultured until hatching to determine their viability. A total of 10 independent experiments were performed, 57 and 56 oocytes were analyzed in control and treatment, respectively. No impact of experimental conditions on nuclear maturation rate was evidenced. The mature oocytes were similar in control and EVs-treated groups and accounted for $90.4 \pm 5.6\%$ and $94.3 \pm 3.1\%$, respectively. In addition, the presence of EVs during IVM did not change oocyte cleavage rate after vitro fertilization, $78.6 \pm 7.3\%$ and $86.7 \pm 4.9\%$ in control and EV-treated groups, respectively. However, beneficial effect of EVs on blastocyst rate was found. In control, $26.6 \pm 5.8\%$ of OPU oocytes developed to BI. EVs added during IVM increased blastocyst rate to $41.2 \pm 3.2\%$ ($p < 0.05$). EVs also tended to increase cryoresistance of resulting blastocysts. In control, blastocyst hatching rate after thawing and short-term culture was $29.1 \pm 8.8\%$ and increased to $53.3 \pm 9.2\%$ in the EVs group. Thus, addition of EVs from cow follicular fluid during IVM culture increases oocyte quality and, consequently, their competence to embryo development after in vitro fertilization. Therefore, using of follicular fluid EVs during in vitro maturation of OPU oocytes can improve the efficiency of OPU/IVEP technologies in cattle.

Keywords: extracellular vesicles, bovine follicular fluid, bovine oocytes, in vitro maturation, oocyte aging, embryo development.

REFERENCES

1. Mapletoft R.J. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, 2013, 10(3): 168-173.
2. Sirard M.A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 2018, 156(1): 1-7 (doi: 10.1530/REP-18-0008).
3. Qi M., Yao Y., Ma H., Wang J., Zhao X., Liu L., Tang X., Zhang L., Zhang S., Sun F. Transvaginal ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) in cattle. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2013, 18: Article 118 (doi:10.4172/1662-100X.1000118).
4. Boni R. Ovum pick-up in cattle: A 25 yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 2012, 9(3): 362-369.
5. Viana J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2020, 38(4): 7-26.

6. Viana J. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2022, 38(4): 22-40.
7. Ferré L.B., Kjelland M.E., Strøbech L.B., Hyttel P., Mermillod P., Ross P.J. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 2020, 14(5): 991-1004 (doi: 10.1017/S1751731119002775).
8. Sanches B.V., Zangirolamo A.F., Seneda M.M. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. *Animal Reproduction*, 2019, 16(3): 394-401 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0058).
9. Ashry M., Smith G.W. Application of embryo transfer using in vitro produced embryos: intrinsic factors affecting efficiency. *Cattle Practice: Journal of the British Cattle Veterinary Association*, 2015, 23(Pt. 1): 1-8.
10. Ferré L.B., Kjelland M.E., Taiyeb A.M., Campos-Chillon F., Ross P.J. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, 2020, 55(6): 659-676 (doi: 10.1111/rda.13667).
11. Marsico T.V., de Camargo J., Valente R.S., Sudano M.J. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Animal Reproduction*, 2019, 16(3): 423-439 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0072).
12. Thompson J.G., Lane M., Gilchrist R.B. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 2007, 64: 179-190 (doi: 10.5661/rdr-vi-179).
13. Wrenzycki C., Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 2013, 48(1): 38-43 (doi: 10.1111/rda.12204).
14. Mingoti G.Z., Castro V.S., Méo S.C., Sá Barreto L.S., Garcia J.M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 2011, 47: 361-367 (doi: 10.1007/s11626-011-9400-0).
15. Lonergan P., Fair T. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4: 255-268 (doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110822).
16. Luciano A.M., Franciosi F., Barros, R.G., Dieci C., Lodde V. The variable success of in vitro maturation: can we do better? *Animal Reproduction*, 2018, 15: 727-736 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0021).
17. Peixoto de Souza V., Jensen J., Whitler W., Estill C.T., Bishop C.V. Increasing vitamin D levels to improve fertilization rates in cattle. *Journal of Animal Science*, 2022, 100(7): Article skac168 (doi: 10.1093/jas/skac168).
18. Raposo G., Stoerovogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 2013, 200(4): 373-383 (doi: 10.1083/jcb.201211138).
19. Record M., Carayon K., Poirot M., Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1841(1): 108-120 (doi: 10.1016/j.bbali.2013.10.004).
20. Uzbekova S., Almicana C., Labas V., Teixeira-Gomes A.P., Combes-Soia L., Tsikis G., Carvalho A.V., Uzbekov R., Singina G. Protein cargo of extracellular vesicles from bovine follicular fluid and analysis of their origin from different ovarian cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: Article 584948 (doi: 10.3389/fvets.2020.584948).
21. Maugrion E., Shedova E.N., Uzbekov R., Teixeira-Gomes A.P., Labas V., Tomas D., Banliat C., Singina G.N., Uzbekova S. Extracellular vesicles contribute to the difference in lipid composition between ovarian follicles of different size revealed by mass spectrometry imaging. *Metabolites*, 2023, 13: Article 1001 (doi: 10.3390/metabo13091001).
22. Tesfaye D., Hailay T., Salilew-Wondim D., Hoelker M., Bitseha S., Gebremedhn S. Extracellular vesicle mediated molecular signaling in ovarian follicle: Implication for oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 2020, 150: 70-74 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.075).
23. Hailay T., Hoelker M., Poirier M., Gebremedhn S., Rings F., Saeed-Zidane M., Salilew-Wondim D., Dauben C., Tholen E., Neuhooff C., Schellander K., Tesfaye D. Extracellular vesicle-coupled miRNA profiles in follicular fluid of cows with divergent post-calving metabolic status. *Scientific Reproduction*, 2019, 9(1): Article 12851 (doi: 10.1038/s41598-019-49029-9).
24. Asaadi A., Dolatabad N.A., Atashi H., Raes A., Van Damme P., Hoelker M., Hendrix A., Pascottini O.B., Van Soom A., Kafī M., Pavani K.C. Extracellular vesicles from follicular and ampullary fluid isolated by density gradient ultracentrifugation improve bovine embryo development and quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(2): Article 578 (doi: 10.3390/ijms22020578).
25. Rodrigues T.A., Tuna K.M., Alli A.A., Tribulo P., Hansen P.J., Koh J., Paula-Lopes F.F. Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2019, 31(5): 888-897 (doi: 10.1071/RD18450).
26. Singina G.N., Chinarov R.Yu., Lukanina V.A., Voroshbit T.A. The effect of prolactin on the quality of heifer oocytes retrieved by transvaginal puncture of follicles. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*

- [*Agricultural Biology*], 2021, 56(6): 1148-1155 (doi: 10.15389/agrobiol.2021.6.1148eng).
27. Parrish J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 2014, 81(1): 67-73 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005).
 28. Singina G.N. Change of culture medium positively influences the development and quality of in vitro cattle embryos. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, 57(6): 1197-1207 (doi: 10.15389/agrobiol.2022.6.1197eng).
 29. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(8): E968-E977 (doi: 10.1073/pnas.1521230113).
 30. Pavani K.C., Hendrix A., Van Den Broeck W., Couck L., Szymanska K., Lin X., De Koster J., Van Soom A., Leemans B. Isolation and characterization of functionally active extracellular vesicles from culture medium conditioned by bovine embryos in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 20(1): 38 (doi: 10.3390/ijms20010038).
 31. Hung W.-T., Navakanitworakul R., Khan T., Zhang P., Davis J.S., McGinnis L.K., Christenson L.K. Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. *Biology of Reproduction*, 2017, 97(4): 644-655 (doi: 10.1093/biolre/iox106).
 32. da Silveira J.C., Andrade G.M., Del Collado M., Sampaio R.V., Sangalli J.R., Silva L.A., Pinnaffi F.V.L., Jardim I.B., Cesar M.C., Nogueira M.F.G., Cesar A.S.M., Coutinho L.L., Pereira R.W., Perecin F., Meirelles F.V. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e0179451 (doi: 10.1371/journal.pone.0179451).
 33. Giacomini E., Makieva S., Murdica V., Vago R., Vigany P. Extracellular vesicles as a potential diagnostic tool in assisted reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 2020, 32(3): 179-184 (doi: 10.1097/GCO.0000000000000621).
 34. Shedova E.N., Singina G.N., Uzbekova S., Uzbekov R., Lukanina V.A., Tsyndrina E.V. Effect of extracellular vesicles of follicular origin during in vitro maturation and ageing of bovine oocytes on embryo development after in vitro fertilization. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, 57(6): 1178-1187 (doi: 10.15389/agrobiol.2022.6.1178eng).
 35. Lopera-Vásquez R., Hamdi M., Fernandez-Fuertes B., Mailló V., Beltrán-Breca P., Calle A., Redruello A., López-Martín S., Gutierrez-Adán A., Yacez-Mó M., Ramirez M.Á., Rizos D. Extracellular vesicles from BOEC in in vitro embryo development and quality. *PLoS ONE*, 2016, 11(2): e0148083 (doi: 10.1371/journal.pone.0148083).