

УДК 636.2: 576.54: 57.085.23

ВЫДЕЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ КОРОВ И ИХ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Е.Н. Шедова¹, Р. Узбеков², Г.Н. Сингина¹, С.В. Узбекова³

¹ ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста”, Московская обл., Подольск, Россия

² Медицинский факультет, Университет Тура, Тур, Франция

³ CCNRS, IFCE, INRAE, Университет Тура, Нузийи, Франция

Роль внеклеточных везикул (extracellular vesicles, EVs) в регуляции различных клеточных функций достаточно известна, также, как и их роль в коммуникационных путях клеточной сигнализации, в том числе внутри фолликулов [1, 2]. EVs фолликулярной жидкости (ФЖ) фолликулов также переносят различные виды РНК, а также белки и липиды [2]. EVs ФЖ (ffEVs) изучаются очень интенсивно, так как они задействованы в регуляции мейоза в яйцеклетке [3], раннего развития эмбриона [4], а также могут быть использованы в целях диагностики в репродуктивных технологиях [5].

Целью представленной работы было моделирование условий выделения EVs из фолликулярной жидкости крупного рогатого скота, их морфологическая и биохимическая характеристика, а также анализ поглощаемости фолликулярных EVs ооцит-кумулюсными комплексами (ОКК) коров в процессе их созревания *in vitro*.

Для получения ФЖ доставленные с мясокомбината яичники коров и половозрелых телок отмывали в физиологическом растворе и содержимое антральных фолликулов аспирировали в стерильные пробирки. Клеточный осадок из ФЖ (фолликулярные клетки и клетки крови) удалялся центрифугированием при 300 g (комнатная температура) в течение 15 мин для получения осветленной ФЖ. Были проведены несколько этапов выделения EVs, включающие дифференциальное центрифугирование при 12000 g (2 раза по 15 мин) для отделения апоптотических телец (размером 1–5 мкм) и крупных микровезикул (размером 200–1000 нм). На этом этапе часть или вся ФЖ были заморожены и хранились при – 800 С. Для осаждения EVs размером 30–150 нм (экзосом) проводили ультрацентрифугирование на центрифуге CS 150 NX (Hitachi, Япония) в течение 90 минут при 100000 g. Последним этапом выделения EVs была их отмывка стерильным однократным фосфатным буфером pH 7.4 с последующим центрифугированием в течение 90 минут при 100 000g для осаждения EVs, и их последующей гомогенизации в PBS. Аликвоты выделенных EVs (по 5 мкл) были использованы для определения их количества (по концентрации белка) и размеров (с помощью электронной микроскопии).

Концентрацию белка определяли на приборе Qubit 4 Fluorometer с помощью набора Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США) и белкового стандарта с концентрацией от 0.125 до 5 мг/мл.

Для морфологической характеристики после центрифугирования 5 мкл суспензии EVs были смешаны с 5 мкл 1 % раствора глутарового альдегида и фиксировали в течение 1 час при комнатной температуре. 2 мкл суспензии фиксированных EVs наносили на поверхность никелевой ЭМ сеточки покрытой формваровой плёнкой и инкубировали 60 минут во влажной камере, после чего сеточку три раза по 10 секунд промывали дистиллированной водой, нанося на её поверхность каплю объемом 20 мкл и удаляя каплю прикосновением краем сеточки к фильтровальной бумаге. Далее производили негативное окрашивание 2 % водным раствором уранилацетата. На сеточку с препаратом EVs наносили каплю (10 мкл) уранилацетата – 3 раза по 10 секунд. После удаления последней капли препараты сушили на воздухе. Морфологию EVs изучали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа. Результаты электронной микроскопии подтвердили присутствие EVs и, что их подавляющая часть относится к экзосомам.

Всего было проанализировано 3 пула ФЖ объемом 10, 15 и 20 мл, выделенных из яичников в разные дни. Препараты EVs из 5 мл ФЖ были приготовлены в 25 мкл фосфатного буфера и заморожены. Концентрация белка составила в среднем 7,5 мкг/мкл. В данных выделениях, на один миллилитр ФЖ приходилось от 37.7 мкг до 70.2 мкг везикулярного белка.

Результаты электронной микроскопии подтвердили присутствие EVs и, что их подавляющая часть относится к экзосомам. Наблюдались как единичные везикулы, так и агрегированные в сгустки, что является возможным последствием неполной гомогенизации осадка везикул в процессе последнего этапа их выделения. После измерения размера (среднего диаметра) отдельно лежащих везикул (n=314), было определено, что 87,9 % из них по размеру являются экзосомами (30–150 нм), которые, в свою очередь, распределялись следующим образом: размером менее 30 нм -11.8 %, от 30 до 50 нм -35 %, от 50 до 100 нм – 50 %, от 100–150 нм – 2.9 % и 150–250 нм – 0,3 %.

В целях изучения возможных механизмов действия ffEVs проведен анализ инкорпорации ffEVs в созревшие ооциты и окружающие их клетки кумулюса, посредством культивирования ооцит кумулюсных комплексов (ОКК) в присутствии флуоресцентно-меченых ffEVs. Маркировку полученных препаратов ffEVs проводили с помощью коммерческого набора PKN67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit согласно модифицированному протоколу.

Выделенные *post mortem* ОКК после промывки и селекции переносили в 500 мкл бессывороточной среды (TC-199 содержащую 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 100 нг/мл EGF), в которую предварительно было добавлено 25 мкл либо смеси экзосом+PKN67, либо контрольного PBS (PBS+PKN67), и культивировали *in vitro* при 5 % CO₂ и 38.5 °C. Через 22 часа частично изолированные от окружающего кумулюса ооциты промывали в PBS с 0.1 % BSA и фиксировали в 4 % растворе параформальдегида в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем ооциты окрашивали (15 мин) раствором Hoechst 33342 (2 мкг/мл) и переносили на предметное стекло. Оценку препаратов выполняли с использованием конфокального микроскопа Zeiss 700 с соответствующими лазерами (488 нм для флуоресценции PKN67, 405 нм для Hoechst).

Анализ цитологических препаратов с использованием конфокальной микроскопии показал наличие специфичной флуоресценции в клетках кумулюса, в оболочке ооцитов (*zona pellucida*) и в их цитоплазме. Полученные данные свидетельствует о способности ffEVs поглощаться как яйцеклетками, так и окружающими их соматическими клетками.

Таким образом, полученные данные показывают, что большинство выделенных из фолликулярной жидкости EVs представляют собой экзосомы (везикулы от 30 до 100 нм), и что они способны проникать в клетки кумулюса и ооциты в процессе совместной инкубации ОКК в культуре IVM, а, следовательно, могут быть использованы в репродуктивных биотехнологиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 19–16–00115)

Литература

1. Machtinger R., Laurent L.C., Baccarelli A.A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation // *Human Reproduction Update*. 2016. Vol. 22(2). P. 182–93.
2. 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. Vol. 150. P. 70–74.
3. de Almeida Monteiro Melo Ferraz, Fujihara M., Nagashima J.B., Noonan M.J., Inoue-Murayama M., Songsasen N. Follicular extracellular vesicles enhance meiotic resumption of domestic cat vitrified oocytes // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10(1). P. 8619.
4. da Silveira J.C., Andrade G.M., Del Collado M., Sampaio R.V., Sangalli J.R., Silva L.A., Pinaffi 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. Vol. 12(6). P. e0179451.
5. Giacomini E., Makieva S., Murdica V., Vago R., Viganó P. Extracellular vesicles as a potential diagnostic tool in assisted reproduction // *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2020. Vol. 32(3). P. 179–184.