

**ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ
ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ КОРОВ В РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ
ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ IN VITRO**

Г.Н. Сингина, Е.Н. Шедова

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Подольск, Россия

Развитие репродуктивных биотехнологий, в том числе производство эмбрионов, нацелены на увеличение воспроизводства и ускорения генетической селекции высокопродуктивных животных. Для оптимизации генетического отбора особенно важны технологии получения жизнеспособных эмбрионов in vitro (IVP) и технологии переноса их животным-реципиентам [1]. Тем не менее качество эмбрионов, полученных in vitro уступает таковым полученным in vivo. Как известно, эффективность IVP технологии определяется не только качеством исходной популяции гамет, выделенных из яичников животных, но и условиями среды, окружающей ооциты in vitro [2]. Наиболее важный этап культивирования – это созревание ооцитов. Посредством его моделирования можно существенно повысить как количественные (доля эмбрионов на стадии бластоцисты), так и качественные (полноценность бластоцист) показатели эффективности IVP метода [3]. Научное сообщество постоянно совершенствует научные исследования для улучшения систем созревания ооцитов путем добавления различных молекулярных факторов в культуральные среды для IVM. Известно, что эти факторы важны для компетенции к эмбриональному развитию ооцитов, которая приобретается вовремя фолликулогенеза яичника при плотной двунаправленной связи между ооцитом и окружающими фолликулярными клетками [4, 5].

Недавние фундаментальные исследования выявили внеклеточные секреторные гранулы – внеклеточные везикулы (extracellular vesicles, EVs), в качестве новых участников межклеточных коммуникаций, которые секретируются клетками и переносят разные регуляторные факторы (РНК, белки, липиды) в другие клетки, которые могут поглощать эти EVs [6,7]. В фолликулах коровьих яичников EVs присутствуют в фолликулярной жидкости (ФЖ) [8] и поэтому могут быть индикаторами их компетентности [9].

Руководствуясь вышесказанным в данной работе было оценено влияние Evs фолликулярного происхождения (ffEvs) в период IVM ооцитов коров на их способность к эмбриональному развитию in vitro и на качество IVP эмбрионов.

Выделенные post mortem ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) культивировали в среде TC-199, содержащая 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0.5 мМ пирувата натрия, 100 нг/мл EGF и 50 мкг/мл гентамицина в отсутствие (контроль) или в присутствии Evs-FF. Везикулярный белок добавляли к среде созревания в следующих концентрациях: 1) в количестве эквивалентном содержанию белка в 1 мл ФЖ (к 1 мл среды добавляли ffEvs выделенных из 1 мл ФЖ) (ffEvs 1:1); 2) в количестве эквивалентном содержанию белка в 0.5 мл ФЖ, то есть в двое разбавленной (к 1 мл среды добавляли ffEvs выделенных из 0.5 мл ФЖ) (ffEvs 1:2); 3) в двойной концентрации (к 1 мл среды добавляли ffEvs выделенных из 2 мл ФЖ) (ffEvs 2:1). Через 24 часа ОКК переносили в среду ВО-IVF. Активные сперматозоиды, полученные методом swim-up, как описано ранее [10], добавляли в лунки с созревшими ооцитами в конечной концентрации 1×10^6 сперматозоидов/мл.

Во всех экспериментах для оплодотворения ооцитов использовали заморожено-оттаянную сперму одного быка. Через 16–18 ч совместной инкубации со спермой ооциты осторожно пипетировали и отмывали в среде оплодотворения для освобождения от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов. Одновременно с промывом проводили морфологическую оценку изолированных ооцитов, подсчитывая число яйцеклеток с направлятельными тельцами (первым или первым и вторым) и определяя процент созревания. Предполагаемые зиготы переносили в среду ВО-IVC и культивировали в течение 5 суток, после чего развивающиеся эмбрионы помещали в ту же среду, содержащую 5 % фетальной бычьей сыворотки. На 2-й день после оплодотворения ооцитов проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-й день определяли число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты.

Дополнительно, полученные на 7-й день эмбрионы фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида. Для оценки ядерного материала в эмбрионах последние были окрашены раствором DAPI (1 мкг/мл) в течение 20 мин. Наличие признаков апоптоза в бластомерах эмбрионов оценивали методом TUNEL с использованием набора In Situ Cell Death Detection Kit, fluorescein («Roche Diagnostics», Швейцария) согласно инструкции компании-производителя. Микрофотографирование, подсчет числа ядер и оценку уровня апоптоза в бластоцистах осуществляли при увеличении 200х с помощью инвертированного микроскопа Axio Imager M2, оснащенного флуоресцентной приставкой, при использовании программы Zen pro (Carl Zeiss, Германия). Уровень апоптоза в эмбрионах оценивали по доле TUNEL-позитивных ядер от общего числа ядер.

Статистическую обработку полученных данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа при помощи программы SigmaStat. Данные выражали как средние значения $\pm$ стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Морфологический анализ не обнаружил влияния пролактина на завершение ядерного созревания. Доля созревших ооцитов как отношение числа ооцитов с полярными тельцами к исходному числу, определяемое после процедуры экстракорпорального оплодотворения в процессе освобождения яйцеклеток от кумулюсных клеток и сперматозоидов, была высокой (85–91 %) и существенно не различалась между контрольной и опытными группами.

Доля раздробившихся ооцитов, также не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 77 до 84 %. Тем не менее, обнаружено влияние ffEVs в период IVM ооцитов коров на их дальнейшее эмбриональное развитие *in vitro*. В случае созревания ОКК в контрольной среде выход бластоцист составлял 22.4 ± 2.3 %. Введение ffEVs в среду культивирования в физиологической концентрации (группа ffEVs 1:1) и в концентрации превышающей ее в двое (группа ffEVs 2:1) повышало данный показатель до 33.1 ± 3.2 % и 36.0 ± 2.1 % соответственно ($p < 0.05$). Кроме того введение ffEVs в количестве эквивалентном содержанию белка в 2 мл ФЖ (группа ffEVs 2:1) приводило к увеличению числа ядер в эмбрионах как по сравнению с внутренним контролем, так и по сравнению с более низкими концентрациями ffEVs ($P < 0.05$), а в количестве эквивалентном содержанию белка в 1 (ffEVs 1:1) и 2 мл (ffEVs 2:1) снижало уровень апостола ($P < 0.05$).

Таким образом ffEVs в среде созревания оказывает стимулирующее действие на компетентность ооцитов коров к последующему эмбриональному развитию. Позитивное влияние отмечается как на количественные, так и на качественные характеристики эмбрионального развития, что свидетельствует о положительном действии внеклеточных везикул на качество ооцитов, а также о возможности их использования на этапе экстракорпорального созревания для повышения эффективности технологии IVP.

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

Литература

1. Blanco M.R., Demyda S., Moreno Millán M., Genero E. Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: a review // *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2011. Vol. 6(7). P. 155–165.
2. Buratini J., Price C.A. Follicular somatic cell factors and follicle development // *Reproduction, Fertility and Development*. 2011. Vol. 23(1). P. 32–9.
3. Hsueh A.J.W., Kawamura K., Cheng Y., Fauser B.C. Intraovarian control of early folliculogenesis // *Endocrine Reviews*. 2015. Vol. 36(1). P. 1–24.
4. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends // *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 200(4). P. 373–83.
5. 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.
6. Di Pietro C., Exosome-mediated communication in the ovarian follicle // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016. Vol. 33(3). P. 303–311.
7. Tesfaye D., et al. MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development // *Reproduction*. 2018. Vol. 155(3). P. R121–R135.
8. Сингина Г.Н., и др.. Способность ооцитов коров к эмбриональному развитию при созревании в разных системах двухфазного культивирования // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Том. 52. № 4. С. 772–784.