

# НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИНЪЕКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ДОНОРОВ ПОД БЛЕСТЯЩУЮ ОБОЛОЧКУ ЖЕНСКОЙ ГАМЕТЫ

Зингеренко Б. В.<sup>1</sup>, Макарова Н. П.<sup>1</sup>, Сысоева А. П.<sup>1</sup>,  
Евтушенко Е. А.<sup>2</sup>, Кулакова Е. В.<sup>1</sup>, Калинина Е. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва,  
Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Московский государственный  
университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

## Контактная информация:

Макарова Наталья Петровна,  
ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии  
и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова»  
Минздрава России,  
ул. Академика Опарина, д. 4, Москва,  
Россия, 117997.  
E-mail: np\_makarova@oparina4.ru

Статья поступила в редакцию 09.10.2024  
и принята к печати 18.02.2025

## Резюме

**Актуальность.** В программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) не все ооциты, полученные при трансвагинальной пункции (ТВП), пригодны для оплодотворения, так как не все находятся на стадии МІ. Ооциты на стадиях герминативного везикула (GV) и МІ обычно утилизируются, поскольку после удаления кумулюсных клеток (КК) их созревание и оплодотворение невозможны. В данном исследовании предложен метод созревания таких ооцитов с помощью введения внеклеточных везикул (ВВ) фолликулярной жидкости (ФЖ) в перивителлиновое пространство. **Цель.** Оценить клиническую состоятельность технологии созревания незрелых ооцитов без клеток кумулюса (стадии GV и МІ) путем инъекции ВВ ФЖ донора под блестящую оболочку клетки. **Материалы и методы.** Собрано по 5 мл ФЖ от 4 доноров. Выделение ВВ ФЖ проводили методом последовательного центрифугирования. Часть везикул проанализировали с помощью метода анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA), другую часть изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Отобрали 53 незрелых ооцита в основную группу и 18 в группу контроля. Инъекцию ВВ ФЖ донора проводили через 4 часа после удаления КК, вводя под блестящую оболочку суспензию ВВ. Через 17 часов оценивали зрелость ооцитов в обеих группах. **Результаты.** Частота созревания ооцитов в группе основной была статистически значимо выше, чем в группе сравнения, что свидетельствует о потенциальной эффективности метода EV-IVM для созревания ооцитов на стадии GV. **Заключение.** Полученные данные дают надежду на разработку нового метода созревания ооцитов в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** бесплодие, внеклеточные везикулы, вспомогательные репродуктивные технологии, созревание ооцитов, фолликулярная жидкость, экзосомы, IVM

Для цитирования: Зингеренко Б.В., Макарова Н.П., Сысоева А.П. и др. Новая технология созревания ооцитов человека методом инъекции внеклеточных везикул фолликулярной жидкости доноров под блестящую оболочку женской гаметы. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 17-26. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-17-26. EDN: UXLPNN

////////////////////////////////////

## A NEW TECHNOLOGY FOR MATURATION OF HUMAN OOCYTES BY INJECTION OF EXTRACELLULAR VESICLES OF FOLLICULAR DONOR FLUID UNDER THE SHINY SHELL OF THE FEMALE GAMETE

Boris V. Zingerenko<sup>1</sup>, Natalya P. Makarova<sup>1</sup>, Anastasia P. Sysoeva<sup>1</sup>, Ekaterina A. Evtushenko<sup>2</sup>, Elena V. Kulakova<sup>1</sup>, Elena A. Kalinina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Corresponding author:**

Natalya P. Makarova,  
Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,  
Ac. Oparin str., 4, Moscow, Russia, 117997.  
E-mail: np\_makarova@oparina4.ru

Received 09 October 2024; accepted 18 February 2025



### Abstract

**Background.** In assisted reproductive technology (ART) programs, not all oocytes obtained during transvaginal puncture (TVP) are suitable for fertilization, as not all of them are at MII stage. Oocytes at germinal vesicle (GV) and MI stages are discarded because, after cumulus cells (CC) removal, their maturation and fertilization become impossible. Study proposes method for oocytes maturing by introducing extracellular vesicles (EVs) from follicular fluid (FF) into the perivitelline space. **Objective.** To evaluate the clinical feasibility of GV/MI oocytes maturing technology without cumulus cells by injecting donor FF EVs under the zona pellucida. **Materials and methods.** FF (5 ml) was collected from 4 donors. EVs were isolated using sequential centrifugation. Portion of EVs was analyzed using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), while another portion was examined using transmission electron microscopy (TEM). Total of 53 immature oocytes were selected for the main group and 18 for the control group. Donor FF EVs were injected 4 hours after CC removal by introducing EVs suspension under zona pellucida. After 17 hours, oocyte maturity was assessed in both groups. **Results.** Oocytes maturation rate in the main group was statistically significantly higher than in the control group, indicating the potential effectiveness of the EV-IVM method for maturing GV-stage oocytes. **Conclusion.** Obtained data provide hope for the development of a new method for *in vitro* oocyte maturation.

**Key words:** assisted reproductive technologies, exosomes, extracellular vesicles, follicular fluid, infertility, IVM, oocyte maturation

*For citation: Zingerenko BV, Makarova NP, Sysoeva AP, et al. A new technology for maturation of human oocytes by injection of extracellular vesicles of follicular donor fluid under the shiny shell of the female gamete. Translational Medicine. 2025; 12(1): 17-26. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-17-26. EDN: UXLPNN*

**Список сокращений:** а-ГнРГ — агонист гонадотропин-рилизинг гормона, ВВ — внеклеточные везикулы, ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии, ИКСИ — интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит, КК — клетки кумулюса, ТВП — трансвагинальная пункция, ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия, ФЖ — фолликулярная жидкость, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, EV-IVM — Extracellular Vesicles *in vitro* maturation, GV — герминативный везикул, NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) — анализ траектории частиц.

### Введение

В программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) проводят контролируемую овариальную стимуляцию для получения как можно более качественных зрелых женских половых клеток, находящихся на стадии МII (метафаза II деления мейоза). Однако в клинической практике не все получаемые ооциты являются зрелыми и пригодными для оплодотворения. У пациенток с резистентными яичниками, а также при наличии противопоказаний к стимуляции овуляции врачи прибегают к технологии дозревания ооцитов *in vitro* [1].

*In vitro* maturation (IVM) — это вспомогательная репродуктивная технология, подразумевающая аспирацию незрелых ооцитов и их последующее созревание *in vitro* [2, 3]. Созревание ооцитов *in vitro* было впервые описано еще в 1930-е гг., а сама технология IVM для ооцитов человека была впервые представлена Р. Эдвардсом в 1965 году. Однако на практике данная методика продемонстрировала положительные результаты только в 1990-е гг.: в 1991 году была зарегистрирована первая беременность после IVM, а в 1994-м — первый случай живорождения после применения IVM у пациенток с синдромом поликистозных яичников. Данная методика IVM подразумевает использование ооцит-кумулюсных комплексов, которые получают при трансвагинальной пункции из небольших фолликулов. Существует несколько разновидностей программ *in vitro* maturation: САРА-IVM, ОТО-IVM, классическое IVM. При этом все программы, в настоящее время применяемые на практике, используют культуральные среды (одно- или многоступенчатые), в которых происходит спонтанное дозревание женских половых клеток, окруженных клетками кумулюса.

Как известно, зрелый фолликул состоит из ооцита, окруженного клетками кумулюса, антральной полости, содержащей фолликулярную жидкость (ФЖ), гранулезных клеток, базальной мембраны и клеток теки. ФЖ продуцируется клетками

гранулезы и кровеносными сосудами, окружающими клетки теки. В состав ФЖ входят различные белки, липиды, полисахариды, факторы роста, нуклеиновые кислоты, стероидные гормоны, активные формы кислорода и антиоксидантные ферменты. Учитывая широкий спектр активных молекул и веществ, содержащихся в ФЖ, можно заключить, что ФЖ играет важную роль в регуляции фолликулогенеза, обеспечивая защиту, питание и созревание ооцита. Ранее исследователи пробовали использовать ФЖ для дозревания ооцитов человека, добавляя ее в среду культивирования, однако данный метод не показал высокую эффективность. При этом типе дозревания всегда используют ооцит-кумулюсные комплексы, так как ооцит напрямую не способен поглощать вещества без окружающих клеток кумулюса.

В программах ВРТ при подготовке к оплодотворению методом ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит) происходит полное удаление окружающих клеток кумулюса, что делает невозможным последующее дозревание ооцитов на стадиях GV и MI в условиях *in vitro*. Именно поэтому необходима разработка новых технологий доставки необходимых питательных веществ до ооцита без клеток кумулюса.

В последнее время все больше исследований посвящено регулированию различных функций клеток, органов и тканей с помощью внеклеточной сигнализации (внеклеточные везикулы, ВВ), которые обнаружены во всех биологических жидкостях, в том числе в ФЖ [4–6]. В 2022 году в составе экзосом ФЖ женщин были обнаружены экзосомальные микроРНК и с помощью биоинформатического анализа выявлена их способность регуляции развития фолликулов, возобновления в ооцитах мейоза и последующей овуляции [7]. Однако авторы использовали метод простого сокультивирования ВВ ФЖ с незрелыми ооцитами. Именно в силу значимой роли внеклеточных везикул ФЖ для созревания ооцитов предложено инъектировать их под блестящую оболочку, тем самым создавая предпосылки для возобновления мейоза и созревания ооцитов [8, 9].

**Цель настоящей работы** — оценка клинической состоятельности технологии дозревания незрелых ооцитов без клеток кумулюса (стадии GV и MI) путем инъекции ВВ ФЖ донора под блестящую оболочку клетки.

### Материалы и методы

#### **Получение фолликулярной жидкости и выделение внеклеточных везикул**

Фолликулярная жидкость была получена у доноров ооцитов, практически здоровых женщин

в программах ВРТ на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Перед проведением программы ВРТ доноры ооцитов (фолликулярной жидкости) были обследованы согласно приказу Министерства здравоохранения РФ от 31 июля 2020 г. № 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», Приложение № 5 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 августа 2012 г. № 107н, в том числе на наличие вирусных инфекций [10].

Пациентки подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено на заседании комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Подготовку к стимуляции овариальной функции осуществляли согласно клиническим рекомендациям «Женское бесплодие» (2024 г.) [11]. Собирали ФЖ доминантного фолликула без примеси крови. Выбирали только тех женщин, у которых стимуляция функции яичников проводилась по стандартной схеме с гонадотропинами и антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ). Триггером финального созревания служил препарат хорионического гонадотропина человека. Всего было собрано по 5 мл ФЖ от 4 доноров ФЖ. Далее проводили выделение ВВ ФЖ из каждого образца ВВ методом последовательного центрифугирования (400g в течение 10 мин., 10 000g при 4 °C в течение 30 мин., далее — 108 000g) согласно публикациям, рекомендованным Международным обществом по изучению внеклеточных везикул (the International Society for Extracellular Vesicles) [12]. Полученный осадок разбавляли в 100 мкл фосфатно-солевого буфера, разделяли на несколько пробирок и хранили при температуре -80 °C до момента использования [13]. Отдельно по такому же протоколу выделяли ВВ ФЖ у женщин-доноров с триггером агониста гонадотропин-рилизинг гормона.

#### ***Проведение трекового анализа частиц (Nanoparticle Tracking Analysis)***

Для оценки содержания ВВ ФЖ и их размеров при различных триггерах финального созревания фолликулов образцы помещали в прибор NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания) стерильным шприцем (1 мл). Настройки захвата и анализа устанавливали вручную согласно инструкции производителя. Визуализировали ВВ ФЖ с помощью рассеяния лазерного света, броуновское движение ВВ записывали на видео. Затем записанные видео анализировали с помощью

программного обеспечения NanoSight NTA 3.1 (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания). Количество анализируемых треков для каждого видео — более 200, суммарное число треков для каждого образца — более 5000.

#### ***Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости***

Выделенные образцы ВВ ФЖ отдавали на трансмиссионную электронную микроскопию, которую выполняли рутинным методом, описанным ранее [6, 14]. Кратко, для приготовления препаратов использовались медные сетки для электронной микроскопии 1G300 (PELCO), покрытые коллодиевой пленкой с углеродным напылением. На сетку наносилось 15 мкл образца ВВ ФЖ с концентрацией ВВ по белку — 1,7 мг/мл. После инкубации в течение 1 минуты лишняя жидкость отбиралась с помощью фильтровальной бумаги, затем проводилось негативное контрастирование 2 % водным раствором уранилацетата в течение 10 секунд, после чего жидкость отбиралась с помощью фильтровальной бумаги. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL), цифровой фотокамеры Quemesa и программного обеспечения iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

#### ***Процедура инъекции ВВ ФЖ донора в незрелые ооциты и критерии оценки***

Незрелые ооциты были получены у пациенток в программах лечения бесплодия методами ВРТ после подписания информированного добровольного согласия. В рутинной практике все незрелые ооциты утилизируют, поскольку они не могут быть оплодотворены после удаления клеток кумулюса для ИКСИ. Отбирали только тех женщин, у которых было получено при трансвагинальной пункции не менее 2 незрелых ооцитов на стадии GV (группа сравнения и группа основная). Группой сравнения служили незрелые ооциты GV самой пациентки, оставленные без вмешательств в культуральной среде для ооцитов (Sage ONE step, ORIGIO, Дания). Всего было отобрано 53 незрелых ооцита в группе основной (EV-IVM, Extracellular Vesicles in vitro maturation) и 18 ооцитов в группе сравнения. Инъекцию ВВ ФЖ донора выполняли через 4 часа после очищения ооцитов от клеток кумулюса, вводя под блестящую оболочку. Процедура инъекции ВВ ФЖ под блестящую оболочку ооцита на стадии GV проводилась на инвертированном микроскопе (Nikon Eclipse Ti, Япония) с установленными манипуляторами (Narishige Takanome, Япония). На первом этапе подготавливалась чашка

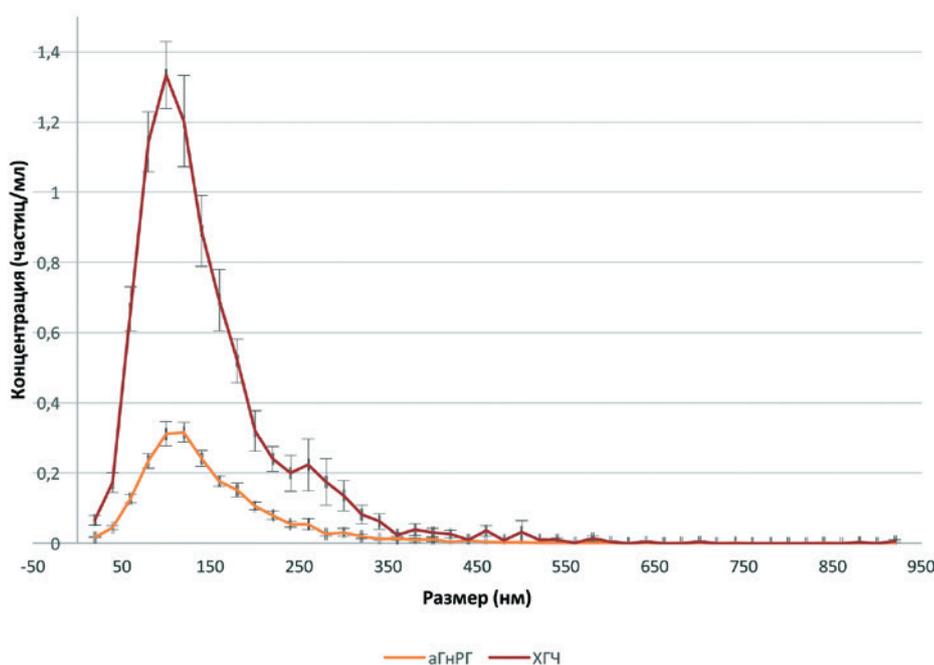
для ИКСИ (Corning, Германия) с двумя каплями: капля со средой для оплодотворения (SAGE-1 step, Origio, Дания), в которую помещали ооциты, и капля с ВВ ФЖ, обе капли покрывали культуральным маслом (OVOIL, Vitrolife, Швеция). Вторым этапом была инъекция ВВ ФЖ под блестящую оболочку ооцита с помощью микропипетки для ИКСИ (Origio, Дания). Объем вводимых ВВ ФЖ был равен  $1,88-2,45 \times 10^{-6}$  мкл (диаметр ооцита 130 мкм  $\times$  внутренний диаметр иглы 4,3-4,9 мкм, ORIGIO, Дания). Концентрация по белку вводимой суспензии ВВ ФЖ была 2–2,2 мг/мл. Через 17 часов оценивали зрелость женских половых клеток в обеих группах. В случае дозревания ооцита до стадии МП проводили оплодотворение донорской спермой и дальнейшее культивирование эмбрионов до стадии бластоцисты. Используемые культуральные среды были одинаковы в обеих группах (Sage ONE step, ORIGIO, Дания) без добавления дополнительных факторов. В качестве конечных точек исследования были выбраны следующие критерии: частота дозревания ооцитов до стадии МП (число клеток МП/число незрелых ооцитов GV) и частота оплодотворения (число зигот/число МП).

### Статистический анализ

Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали в тесте Шапиро-Уилка. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали медиану (Me) и стандартное отклонение (SD). Для остальных данных использовали парный критерий Хи-квадрат. Величину порогового уровня значимости  $p$  принимали равной 0,05.

### Результаты

На первом этапе было оценено содержание ВВ ФЖ у доноров при различных типах триггера финального созревания фолликулов. NTA-анализ показал различное содержание ВВ в ФЖ женщин (рис. 1). Установлено, что средний размер ВВ ФЖ при триггере овуляции а-ГнРГ составил  $131 \pm 3,94$  нм, при ХГЧ —  $134 \pm 6,12$  нм. В образцах обеих групп женщин присутствовали ВВ от 20 до 960 нм. Данные размеры ВВ ФЖ соответствовали микровезикулам и экзосомам. При этом концентрация ВВ существенно различалась у отобранных молодых пациенток в зависимости от типа препарата. При использовании ХГЧ средняя концентра-



**Рис. 1.** Распределение частиц по размерам и концентрации, полученное методом NTA, для образцов ВВ ФЖ женщин при различных типах триггера финального созревания фолликулов  
Примечание: ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; а-ГнРГ — агонист гонадотропин-рилизинг гормона.

**Figure 1.** Distribution of particles by size and concentration, obtained using the NTA method, for samples of follicular fluid (FF) from women with different types of triggers for final follicular maturation

Note: hCG — human chorionic gonadotropin; a-GnRH — gonadotropin-releasing hormone agonist.

ция ВВ составила  $(9,36 \pm 1,3) \times 10^{10}$  част./мл, при аГнРГ —  $(1,02 \pm 0,2) \times 10^{10}$  част./мл. Данные по концентрации и размерам представлены на рисунке 1.

Результаты трансмиссионной электронной микроскопии подтвердили результаты, полученные при НТА-анализе. Микрофотографии показаны на рисунках 2 и 3. Морфометрический анализ данных препаратов мы проводили, опираясь на результаты A. S. Neugoud и соавторов (2022), которые ввели классификацию ВВ ФЖ женщин [7]. Были обнаружены ВВ следующих морфологических классов (рис. 2, 3): экзосомы и экзосомы с двойной оболочкой.

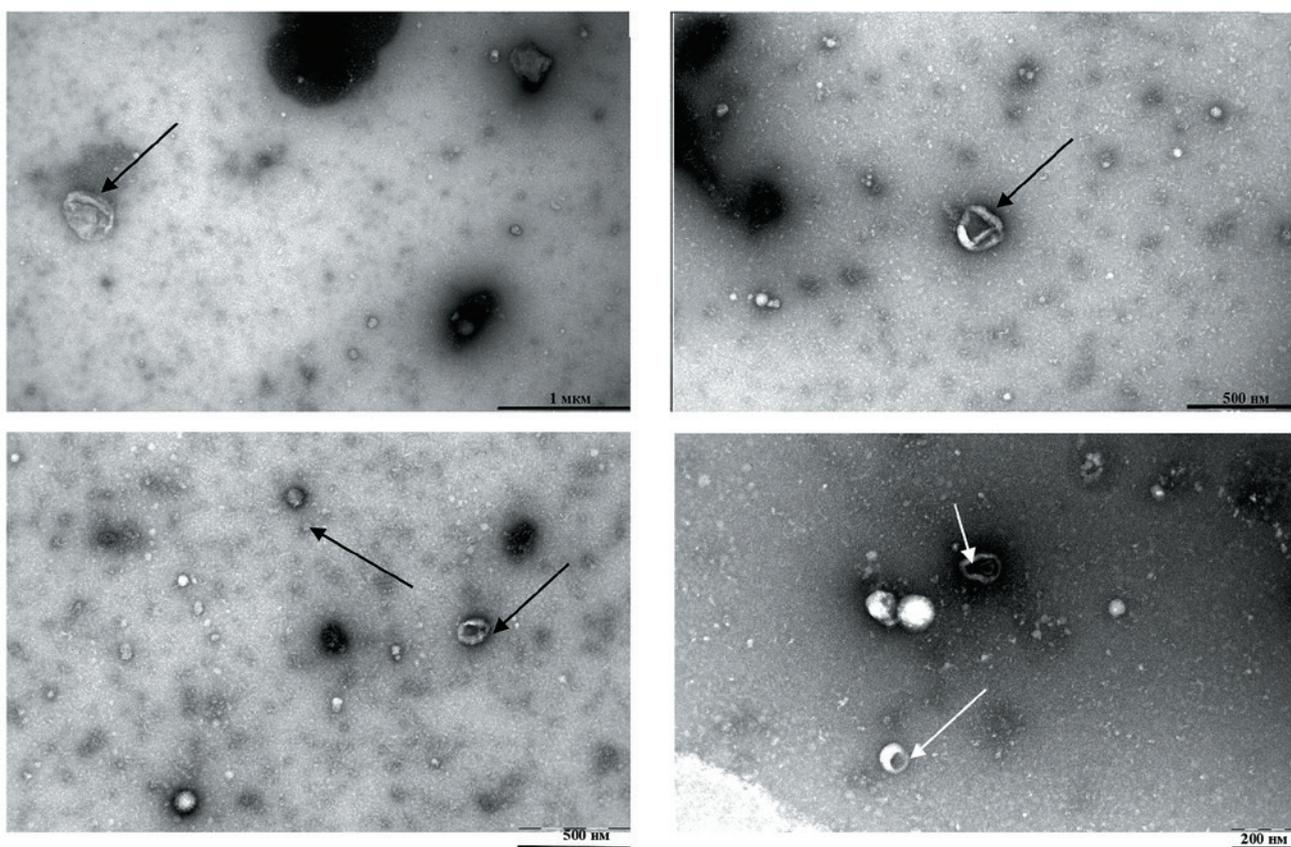
Таким образом, на первом этапе исследования было установлено, что при использовании триггера ХГЧ концентрация ВВ ФЖ практически в 9,1 раза превышает таковую при а-ГнРГ. Данный факт может быть объяснен различным биологическим действием препаратов на клетки кумулюса (КК) при стимуляции функции яичников. Действие ХГЧ приводит

к большей экспансии КК и разрастанию гиалуронового матрикса, окружающего ооцит-кумуляный комплекс, что позволяет клеткам с большей интенсивностью выделять ВВ в полость фолликула.

На втором этапе оценивали эффективность метода EV-IVM. Результаты показаны в таблице 1. Как видно из таблицы, результаты технологии дозревания ооцитов путем инъекции ВВ ФЖ под блестящую оболочку показали свою высокую клиническую значимость. Частота дозревания статистически значимо была выше в группе основной по сравнению с группой ооцитов, которые не подвергали воздействию ВВ: 73,5 % против 33,3 %,  $p = 0,003$ . По частоте оплодотворения группы между собой не отличались.

### Обсуждение

В процессе созревания ооцита человека очень важна коммуникация между КК и ооцитом жен-



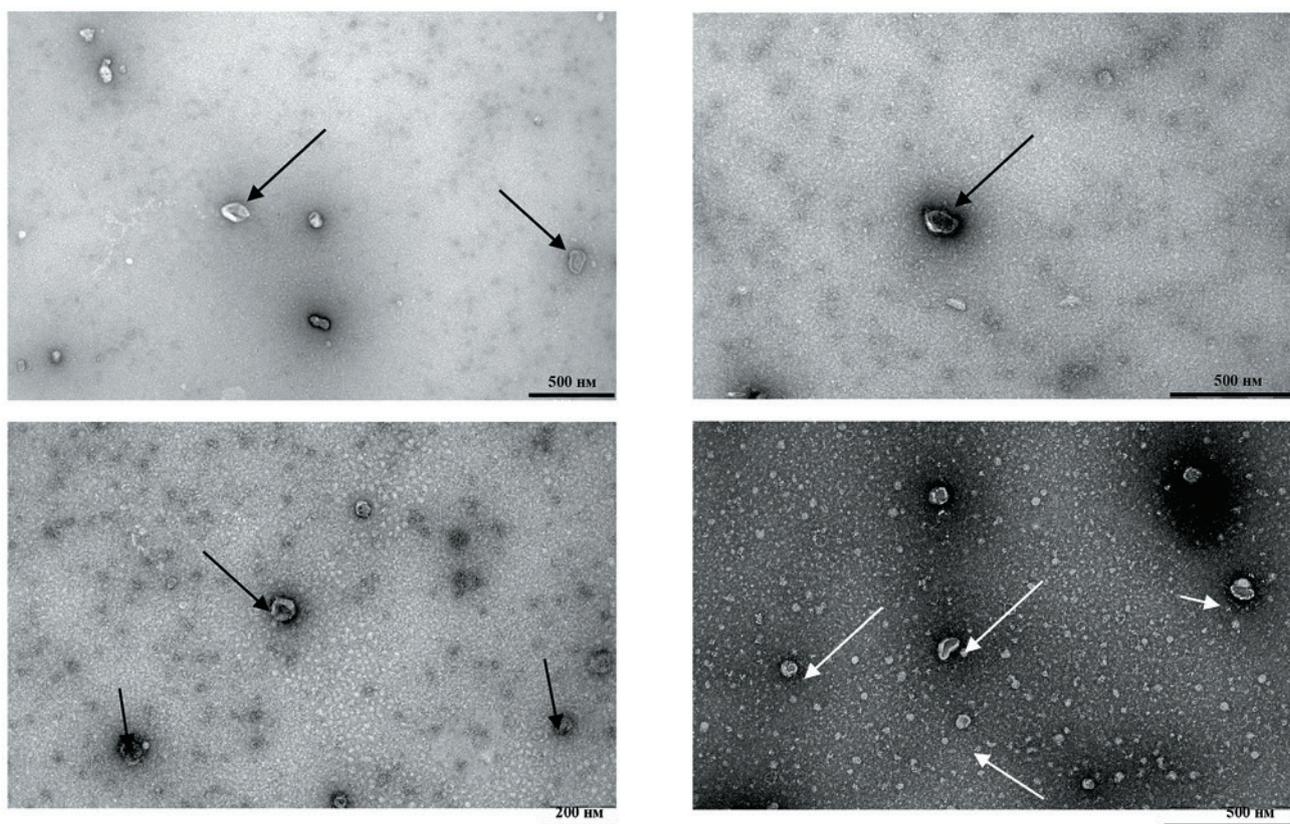
**Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин в программах стимуляции функции яичников с триггером хорионический гонадотропин человека (масштабный отрезок указан на микрофотографиях; стрелками указаны ВВ)**

**Figure 2. Transmission electron microscopy of extracellular vesicles from the follicular fluid of women in ovarian stimulation programs with human chorionic gonadotropin as the trigger (the scale bar is indicated on the micrographs; arrows indicate EVs (extracellular vesicles))**

**Таблица 1. Оценка эффективности дозревания и оплодотворения при использовании технологии инъекции ВВ ФЖ под блестящую оболочку**

**Table 1. Evaluation of the efficiency of maturation and fertilization using the technology of FF EV injection under the zona pellucida**

	Группа основная EV-IVM n = 53	Группа сравнения n = 18	
Частота дозревания МП, %	73,5 % (39/53)	33,3 % (6/18)	p = 0,003 (хи-квадрат) ОШ = 5,57 ДИ:1,75–17,6
Частота оплодотворения, %	74,3 % (29/39)	66,6 % (4/6)	p > 0,05



**Рис. 3. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин в программах стимуляции функции яичников с агонистом гонадотропин-рилизинг гормона (масштабный отрезок указан на микрофотографиях; стрелками указаны ВВ)**

**Figure 3. Transmission electron microscopy of extracellular vesicles from the follicular fluid of women in ovarian stimulation programs with a gonadotropin-releasing hormone agonist as the trigger (the scale bar is indicated on the micrographs; arrows indicate EVs (extracellular vesicles))**

ской гаметы. Особенно важны межклеточные коммуникации в преовуляторном фолликуле. В течение нескольких часов после повышения уровня лютеинизирующего гормона контакты между клетками кумулюса ослабевают, ооцит-кумуляный комплекс быстро увеличивается в размере

[15]. Это стимулирует экспрессию EGF-подобных факторов (амфирегулин, эпирегулин), которые секретируются в антральную область для связывания рецепторов EGF, расположенных на КК. Эти EGF-подобные сигналы, наряду с факторами роста, секретируемые ооцитом (например, GDF9,

BMP15 и др.), обеспечивают мощный коктейль стимуляторов, который способствует активизации генов, необходимых для быстрой пролиферации и дифференцировки КК (например, HAS2, PTGS2, PTX3 и TNFAIP6). Эти гены, в свою очередь, секретируют так называемый гелеобразный матрикс из гиалуроновой кислоты и стабилизирующих факторов, вызывающих экспансию КК [16, 17].

Стоит отметить, что именно ВВ ФЖ несут важные факторы, влияющие на ооцит [18]. Экспериментальные модели на животных показали, что добавление ВВ из ФЖ небольших фолликулов в среду культивирования приводило к увеличению количества бластоцист, изменениям в транскрипции генов эмбрионов, а также изменению уровней метилирования ДНК [8, 19]. На ооцитах крупного рогатого скота было показано, что в ВВ ФЖ присутствуют отдельные регуляторные миРНК (miR-151-3p и miR-425-5p), которые улучшают не только созревание ооцитов, но и дальнейшее эмбриональное развитие [20]. Интересное исследование провели М. Luis-Calero и коллеги (2024), охарактеризовав секрет ВВ преовуляторной ФЖ и его влияние на ооциты лошадей во время созревания *in vitro*. Авторы показали, что степень экспрессии GDF9 и BMP15 влияет на компетентность созревания ооцитов лошадей [21]. С каждым годом аналогичных исследований становится все больше, и необходимо экстраполировать данные, полученные на животных моделях, на биологический материал человека для более глубокого понимания механизмов созревания женских гамет и применения полученных знаний в клинической практике.

Исследования подобного типа на ооцитах человека описаны в литературе не были. Также на животных моделях было установлено, что экзосомы ФЖ обладают цитопротекторным действием. Обработка ооцитов экзосомами, полученными из ФЖ, снижала апоптоз КК и повреждение ооцитов, вызванное тепловым шоком [22].

В программах лечения бесплодия триггер финального созревания ооцита является крайне важным в силу биологических процессов, необходимых для формирования компетентного ооцита. В то время как использование хорионического гонадотропина человека является стандартным подходом для индукции овуляции в циклах ВРТ, агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона также применяются для индукции всплеска лютеинизирующего гормона. Важным клиническим преимуществом триггера а-ГнРГ является его способность вызывать лютеализ и ингибировать секрецию вазоактивных продуктов, особенно фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), внутри формирующегося желтого тела.

Недавно была показана существенная разница в профиле экспрессии малых некодирующих РНК (miRNAs) во ВВ ФЖ женщин при различных типах триггера финального созревания ооцитов в программах ВРТ [22]. Авторы идентифицировали 41 EV-miRNA, уровни экспрессии которых значительно различались между двумя группами триггеров. Биоинформатический анализ генов, регулируемых этими EV-miRNAs, показал различные пути между двумя триггерами, включая сигнализацию TGF-beta, клеточный цикл и сигнальные пути WNT. Большинство этих путей регулируют каскады, связанные с апоптозом, развитием эмбриона, имплантацией, децидуализацией и развитием плаценты.

В настоящем исследовании для дозревания применяли ВВ ФЖ при триггере ХГЧ, воздействуя на ооциты, полученные при использовании триггера а-ГнРГ. Именно данная комбинация позволила получить высокую частоту дозревания ооцитов. В первоначальном пилотном проекте мы не разделяли незрелые ооциты на стадии GV пациенток по типу триггера, и, возможно, поэтому не было получено достоверной разницы (результаты не представлены).

### Заключение

Частота получения зрелых ооцитов в программах лечения бесплодия методами ВРТ не превышает 80 %, а иногда все полученные клетки не пригодны для оплодотворения в силу своей незрелости и программу приходится останавливать. Ооциты на стадии зародышевого пузырька, получаемые при трансвагинальной пункции, крайне редко спонтанно созревают, именно поэтому необходима разработка подходов их дозревания. ФЖ представляет собой жидкость яичников, которая играет важную роль в созревании яйцеклеток и является источником ВВ. В настоящей работе предложено использовать инъекцию ВВ ФЖ донора под блестящую оболочку ооцита, что позволило увеличить частоту дозревания с 33,3 % до 73,5 %. В отличие от традиционных программ дозревания ооцитов ОТО-IVM и САРА-IVM, которые невозможно проводить без окружающих клеток кумулюса, выделение внеклеточных везикул является недорогой процедурой, позволяющей получать хорошие результаты. Более того, предлагаемый метод использует женские половые клетки на стадии GV без окружающих клеток кумулюса, которые были удалены при стандартной подготовке к процедуре ИКСИ. Такие ооциты GV в рутинной практике не пригодны для дальнейшего применения в программах лечения бесплодия методами ВРТ. Считаем, что метод EV-IVM можно использовать для дозревания ооцитов

на стадии GV, чтобы увеличить число пригодных для оплодотворения клеток и тем самым повысить шансы наступления беременности в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

### Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

- Silber SJ, Goldsmith S, Castleman L, Hayashi K. *In Vitro* Maturation, *In Vitro* Oogenesis, and Ovarian Longevity. *Reprod Sci.* 2024 May;31(5):1234–1245. DOI: 10.1007/s43032-023-01427-1. Epub 2023 Dec 30. PMID: 38160209; PMCID: PMC11090930.
- Das M, Son WY. *In vitro* maturation (IVM) of human immature oocytes: is it still relevant? *Reprod Biol Endocrinol.* 2023 Nov 22;21(1):110. DOI: 10.1186/s12958-023-01162-x. PMID: 37993914; PMCID: PMC10664544.
- Ho VN, Ho TM, Vuong LN, Garcia-Velasco J. An update on the current indications for *in vitro* maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2024 Jun 1;36(3):173–180. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000942. Epub 2024 Jan 31. PMID: 38295060.
- Nejabati HR, Roshangar L, Nouri M. Follicular fluid extracellular vesicle miRNAs and ovarian aging. *Clin Chim Acta.* 2023 Jan 1;538:29–35. DOI: 10.1016/j.cca.2022.11.003. Epub 2022 Nov 8. PMID: 36368351.
- Zhou Z, Zhang Y, Zhang X, et al. Follicular Fluid-Derived Small Extracellular Vesicles Alleviate DHEA-Induced Granulosa Cell Apoptosis by Delivering LINC00092. *Reprod Sci.* 2023 Oct;30(10):3092–3102. DOI: 10.1007/s43032-023-01251-7. Epub 2023 May 15. PMID: 37188981.
- Sysoeva AP, Makarova NP, Silachev DN, et al. Influence of Extracellular Vesicles of the Follicular Fluid on Morphofunctional Characteristics of Human Sperm. *Bull Exp Biol Med.* 2021 Dec;172(2):254–262. DOI: 10.1007/s10517-021-05372-4. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34855079.
- Neyroud AS, Chiechio RM, Moulin G, et al. Diversity of Extracellular Vesicles in Human Follicular Fluid: Morphological Analysis and Quantification. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 2;23(19):11676. DOI: 10.3390/ijms231911676. PMID: 36232981; PMCID: PMC9570429.
- Gabryś J, Kij-Mitka B, Sawicki S, et al. Extracellular vesicles from follicular fluid may improve the nuclear maturation rate of *in vitro* matured mare oocytes. *Theriogenology.* 2022 Aug;188:116–124. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.05.022. Epub 2022 May 27. PMID: 35689941.
- Makarova NP, Sysoeva AP, Sylachev DN, et al. Technology for human oocyte maturation at Gv-stage using extracellular follicular fluid vesicles in fertilization programs *in vitro*: v-ivm (extracellular vesicles *in vitro* maturation) No 2023101793: date of filling: 27.01.2023: published: 15.11.2023. Proprietor(s): Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie “Natsionalnyj meditsinskij issledovatel’skij centr akusherstva, ginekologii i perinatologii imeni akademika V. I. Kulakova” Ministerstva zdavookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU) - EDN WEZOFP. In Russian [Патент № 2807492 С1 Российская Федерация, МПК С12N 5/075, А61К 35/54. Технология дозревания ооцитов человека на стадии GV с помощью внеклеточных везикул фолликулярной жидкости в программах экстракорпорального оплодотворения: EV-IVM (extracellular vesicles *in vitro* maturation): № 2023101793: заявл. 27.01.2023: опубли. 15.11.2023 / Н. П. Макарова, А. П. Сысоева, Д. Н. Силачев [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. EDN WEZOFP].
- Order of the Ministry of Health of the Russian Federation (RU) 31.07.2020 No 803n “About the procedure for the use of assisted reproductive technologies, contraindications and restrictions to their use” (Registration 19.10.2020 No 60457). Text: web-site // Official Internet portal of legal information: – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202010190041?>. In Russian [Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31.07.2020 № 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» (зарегистрирован 19.10.2020 № 60457). Текст: электронный // Официальный интернет-портал правовой информации: – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202010190041?>].
- Clinical recommendations. Female infertility. 2024. Text: electronic // Ministry of Health of the Russian Federation: official website. – URL: <https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/magic/default/download/14971.html> (data obrashcheniya: 01.12.2024). In Russian [Клинические рекомендации. Женское бесплодие. 2024. Текст: электронный // Министерство здравоохранения Российской Федерации: официальный сайт. – URL: <https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/magic/default/download/14971.html> (дата обращения: 01.12.2024)].
- Welsh JA, Goberdhan DCI, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024 Feb;13(2):e12404. DOI: 10.1002/jev2.12404. Erratum in: *J Extracell Vesicles.* 2024 May;13(5):e12451. DOI: 10.1002/jev2.12451. PMID: 38326288; PMCID: PMC10850029.
- Kenigsberg S, Wyse BA, Librach CL, da Silveira JC. Protocol for exosome isolation from small volume of ovarian follicular fluid: evaluation of ultracentrifugation and

commercial kits // *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1660. P. 321–341. DOI: 10.1007/978-1-4939-7253-1\_26.

14. Zorova LD, Kovalchuk SI, Popkov VA, et al. Do Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Contain Functional Mitochondria? *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 3;23(13):7408. DOI: 10.3390/ijms23137408. PMID: 35806411; PMCID: PMC9266972.

15. Martinez CA, Rizos D, Rodriguez-Martinez H, Funahashi H. Oocyte-cumulus cells crosstalk: New comparative insights. *Theriogenology.* 2023 Jul 15;205:87–93. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.04.009. Epub 2023 Apr 18. PMID: 37105091.

16. Nagyova E. The Biological Role of Hyaluronan-Rich Oocyte-Cumulus Extracellular Matrix in Female Reproduction. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 18;19(1):283. DOI: 10.3390/ijms19010283. PMID: 29346283; PMCID: PMC5796229.

17. Del Bianco D, Gentile R, Sallicandro L, et al. Electro-Metabolic Coupling of Cumulus-Oocyte Complex. *Int J Mol Sci.* 2024 May 14;25(10):5349. DOI: 10.3390/ijms25105349. PMID: 38791387; PMCID: PMC11120766.

18. Machtinger R, Racowsky C, Baccarelli AA, et al. Recombinant human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone agonist differently affect the profile of extracellular vesicle microRNAs in human follicular fluid. *J Assist Reprod Genet.* 2023;40:527–536. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02703-w>

19. Piibor J, Dissanayake K, Midekessa G, et al. Characterization of bovine uterine fluid extracellular vesicles proteomic profiles at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Vet Res Commun.* 2023;47:885–900. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10052-3>

20. Aoki S, Inoue Y, Hara S, et al. microRNAs associated with the quality of follicular fluids affect oocyte and early embryonic development. *Reprod Med Biol.* 2024 Jan 18;23(1):e12559. DOI: 10.1002/rmb2.12559. PMID: 38239486; PMCID: PMC10795439.

21. Luis-Calero M, Marinaro F, et al. Characterization of preovulatory follicular fluid secretome and its effects on equine oocytes during *in vitro* maturation. *Res Vet Sci.* 2024 May;171:105222. DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105222. Epub 2024 Mar 11. PMID: 38513461.

22. Nicolao MC, Rodriguez Rodrigues C, Cumino AC. Extracellular vesicles from *Echinococcus granulosus* larval stage: Isolation, characterization and uptake by dendritic cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(1):e0007032. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007032>

#### Информация об авторах:

Зингеренко Борис Владимирович, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Макарова Наталья Петровна, д.б.н., ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Сысоева Анастасия Павловна, к.б.н., эмбриолог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Евтушенко Екатерина Алексеевна, к.б.н., старший преподаватель биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»;

Кулакова Елена Владимировна, д.м.н., старший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России.

#### Authors information:

Boris V. Zingerenko, Junior Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Natalya P. Makarova, DSc, leading researcher, department of IVF named after Professor B. V. Leonov, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Anastasia P. Sysoeva, PhD, Embryologist, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Ekaterina A. Evtushenko, PhD, Senior Lecturer, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University;

Elena V. Kulakova, MD, senior researcher, department of IVF named after Professor B. V. Leonov, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Elena A. Kalinina, MD, PhD, professor, Chief of Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.