

УДК:

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (MSC) ПРИ ЗАБОРЕ ООЦИТ КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ OPU

В.Ю. Ткачев, ветеринарный врач, репродуктолог СГЦ АО Ваганово, аспирант, Т.В. Зубова, д-р биол. наук, профессор кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО «Кузбасская государственная сельскохозяйственная академия», Россия, г. Кемерово
e-mail: suta54@mail.ru

EXPERIENCE IN THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) WHEN COLLECTING OOCYTES OF CUMULUS COMPLEXES BY THE OPU METHOD

V.Y. Tkachev, veterinarian, embryologist of the Vaganovo Agricultural Center, postgraduate student,
T.V. Zubova, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Animal Science
Kuzbass State Agricultural Academy, Kemerovo, Russia
e-mail: suta54@mail.ru

***Аннотация.** Целью настоящего исследования была оценка эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток, содержащихся в препарате BOVI STEM у коров доноров, проходящих повторный цикл OPU, как средства уменьшения пагубного воздействия воспаления и последующего фиброза на функцию яичников.*

Показана эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток, содержащихся в препарате BOVI STEM на уменьшение пагубного воздействия воспаления и последующего фиброза на функцию яичников в циклах OPU in Vitro у коров доноров голштинской породы.

***Ключевые слова:** bovi stem, in vitro, msc, опу, аспирация, донор, фолликул, коровы, лечение, ооцит*

***Annotation.** The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the use of mesenchymal stem cells contained in the BOVI STEM preparation in donor cows undergoing a repeated OPU cycle as a means of reducing the harmful effects of inflammation and subsequent fibrosis on ovarian function.*

The effectiveness of the use of mesenchymal stem cells contained in the BOVI STEM preparation to reduce the harmful effects of inflammation and subsequent fibrosis on ovarian function in OPU cycles in Vitro in Holstein donor cows has been shown.

Ключевые слова: *bovi stem, in vitro, msc, opu, аспирация, донор, фолликул, коровы, лечение, ооцит.*

Введение. За последние десятилетия во всем мире расширилось использование технологии эмбриотрансфера *in vitro*, и, по данным Ассоциации эмбриологических технологий в Европе (АЕТЕ), уже в 2017 году методом *in vitro* было произведено больше эмбрионов крупного рогатого скота, чем методом *in vivo*.

Основной проблемой репродукции крупного рогатого скота *boss Taurus* по технологии *in vitro* остается производство ооцитов с оптимальной способностью к развитию. Такая способность определяет способность яйцеклетки созреть, успешно оплодотвориться, достигать стадии бластоцисты и давать жизнеспособное, здоровое потомство.

В поиски понимания приобретения компетенции развития ооцитов было доказано, что факторы питания наиболее важны, потому что они напрямую влияют на репродуктивную функцию и способность изменять действие других факторов [1].

Косвенное же влияние оказывает иммунобиологический статус коров доноров и травмирующий фактор забора ооцитов методом ОРУ (*Ovum Pick-Up*) которому не прерывно подвергаются доноры приводит к поражению яичников и как следствие снижению качества и количества получаемых ооцитов [2,3].

Показано, что лечение мезенхимальными стволовыми клетками (MSC) является ценной терапией при ряде состояний, связанных с острыми и хроническими воспалительными процессами, на фоне снижения иммунной резистентности доноров[4].

Стволовые клетки продуцируют ряд цитокинов и других растворимых медиаторов, которые обладают способностью модулировать процессы воспаления и активации иммунитета и потенциально минимизировать повреждение тканей, связанное с воспалением [5].

У доноров, проходящих повторный цикл ОРУ, терапия MSC может быть эффективной стратегией для уменьшения пагубного воздействия воспаления и последующего фиброза на функцию яичников. Показано, что терапия стволовыми клетками улучшает функцию яичников на моделях лабораторных животных, у которых искусственно индуцировалось бесплодие [6].

Тем не менее, клиническое применение у крупных сельскохозяйственных животных все еще обсуждается [7].

Материал и методы исследований.

Научно-хозяйственный опыт проводили в осенний период 2021 года на базе АО «Ваганово» (Кемеровская обл., Промышленновский р-н)

Поголовье крупного рогатого скота в хозяйстве составляет 2105 голов голштинской породы, из которых коров 1168 голов. Средний годовой надой на корову 10603 кг.

Опыт проходил в один этап. Было сформировано по принципу аналогов две группы коров (опытная и аналоговая) по 5 голов 2-4 лактации. Подопытные животные представлены голштинской породой скота 120-270 дней после отела

со средним годовым надоем 12000-13374 кг молока. Животные находились в одинаковых привязных условиях содержания. Исследования проводили на коровах донорах *in vitro*, подобранных по принципу аналогов с учетом физиологического состояния, возраста, живой массы, уровня продуктивности. Данных животных подвергли 8 кратной серии ОРУ с интервалом 7 дней с последующей морфологической оценкой качества полученных ооцитов, визуальной оценки регенерации тканей яичников под контролем ультразвукового исследования. Четырехкратному биохимическому исследованию крови, иммуноферментному анализу на концентрацию гормона щитовидной железы Тироксина(Т4).

Оценку гематологических и гормональных показателей проводили 4-кратно перед началом, после 5 дневной серии инъекций BOVI STEM, через один и два- месяца после начала опыта. Морфологическую оценку качества ооцитов проводили четырехкратно, перед началом опыта и далее каждую неделю в течении двух месяцев.

В ходе исследования было установлено, что применение препарата BOVI STEM коровам донорам голштинской породы в восьмикратной серии ОРУ *in Vitro* позволяет повысить число качественных ооцитов на 24,8% не прибегая к гормональному протоколу обработки доноров *in vitro* уже ко второй серии аспираций, за счет улучшения метаболических процессов в организме, которые отражены в картине морфологических и биохимических показателей крови. Уже ко второй серии повысился уровень каротина с 23,9 мкМ/л до 43.7 мкМ/л на 45,4% при норме 32,5 мкМ/л, уровень йода с 11,7 мкМ/л до 31,4 мкМ/л на 62,7% при норме 32,5 мкМ/л. Применение препарата BOVI STEM также положительно отразилось на состоянии щитовидной железы повышением концентрации уровня Тироксина в сыворотки крови до физиологической нормы с 31,9 нМ/л при норме 40-50 нМ/л до 43,8 нМ/л на 27,1%.

Опытным животным препарат BOVI STEM вводился 5 дневной серией по 5 мл согласно схеме опыта (табл. 1).

Таблица 1 - Схема опыта

Гру ппа	Ко л - во	Особенности
Опыт на коровах донорах <i>in vitro</i>		
1	2	3
Контроль	5	День 1
Опыт	5	1. Биохимическое исследование крови № 1 2. Визуальная оценка тканей яичников под контролем 3. ультразвукового исследования перед началом ОРУ № 1 4. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОРУ № 1 5. Иммуноферментный анализ на концентрацию Т4 №1
		День 2

	Внутримышечная инъекция Bovi Stem 5 мл № 1
	День 3
	Внутримышечная инъекция Bovi Stem 5 мл № 2
	День 4
	Внутримышечная инъекция Bovi Stem 5 мл № 3
	День 5
	Внутримышечная инъекция Bovi Stem 5 мл № 4
	День 6
	Внутримышечная инъекция Bovi Stem 5 мл № 5
	День 7
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Биохимическое исследование крови № 2 2. Иммуноферментный анализ на концентрацию Т4 №1
	День 8
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования перед началом ОРУ № 2 2. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОРУ № 2
	День 15
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования перед началом ОРУ № 3 2. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОРУ № 3
	День 22
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования перед началом ОРУ № 4 2. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОРУ № 4
	День 29
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Биохимическое исследование крови № 3 2. Иммуноферментный анализ на концентрацию Т4 №3 3. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования перед началом ОРУ № 5 4. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОРУ № 5
	День 36
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования перед началом ОРУ № 6 2. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОРУ № 6
	День 43
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования перед началом ОРУ № 7 2. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОРУ № 7
	День 50

		<ol style="list-style-type: none"> 1. Биохимическое исследование крови № 4 2. Иммуноферментный анализ на концентрацию Т4 № 4 3. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования перед началом ОПУ № 3 4. Морфологическая оценка качества ооцитов после ОПУ № 3
		День 57
		<ol style="list-style-type: none"> 1. Визуальная оценка тканей яичников под контролем ультразвукового исследования на 7 дней после ОПУ № 8

Результаты и обсуждение

В эксперименте лечение MSC благоприятно повлияло на качество фолликулогенеза на, что указывают данные, приведенные в (таблице 2).

Таблица 2 - Количественная и морфологическая оценка качества ооцит кумулюсных комплексов после серии Ovum Pick-up

Группа		Контрольная	Опытная	Расхождения , %	
Число аспираций		8	8	-	
Аспирировано фолликулов		412	527	>21%	
Получено ОКК	G1	27	56	>48%	
	G2	179	147	>22%	
	G3	274	280	>2,2%	
	Плохие	183	73	< 2,5 раза	
	Пригодные	ОКК	206	410	>32%
		%	53%	85%	
Всего ОКК		483	389	>19%	
Выход ОКК на донора		9,7	12,1	>19%	

Оценку влияния 5 кратной серии инъекции мезенхимальных стволовых клеток MSC на общий исход IVF. Проводилось сразу после 8 сеанса ОПУ. ОКК были извлечены ОПУ, как описано в статье [13]. Все фолликулы размером более 3 мм были аспирированы с помощью портативного ультразвукового устройства (Aloka Prosound 2, Aloka Co., Токио, Япония.), оснащенного направляющей для биопсии и одноразовыми иглами 18G (WTA, Cravinhos, Бразилия). Использовалось вакуумное давление от 80 до 100 мм рт.ст. Фолликулярную жидкость извлекали в пробирки по 50 мл, содержащие 15 мл DPBS с добавлением 1% BSA (Sigma) и 5 МЕ/мл гепарина натрия (РУП «Бел медпрепараты»). Выделенные ОКК были классифицированы по качеству на 4 группы: 1–G1(отличные), 2–G2 (хорошие), 3–G3 (удовлетворительные), 4 — плохого качества, в соответствии с количеством слоев кучевых клеток и морфологией цитоплазмы. Только КОК, классифицированный как жизнеспособный, переносили в эпиндорфы 5 мл (Spy life sciences, USA), содержащие среду созревания IVM (IVF, England), и выдерживали в CO2 инкубаторе Binder при 6% концентрации CO2 и инкубировали при 38,8 °C в

течении 21-23 часов. Полученные клетки регистрировали общим числом из правого и левого яичника полученных от одного донора.

Общее состояние яичников оценивали визуально под контролем ультразвукового исследования на основании отличий в скорости и качестве регенерации тканей в опытной и контрольной группе ни по одному из анализируемых параметров не было.

В опытной группе у животных, получавших MSC, общее число фолликулов увеличилось на 21%, а число жизнеспособных ооцитов на 32% по сравнению с контрольной группой, что привело к увеличению количества эмбрионов, полученных *in vitro*, а также к более высокому производству ранних и расширенных бластоцист.

Для оценки эффективности влияния мезенхимальных стволовых клеток на метаболические процессы, согласно схеме опыта, были проведены четырех кратные исследования крови (данные находятся в стадии обработки).

Применение препарата мезенхимальных стволовых клеток (MSC) BOVI STEM также положительно отразилось на состоянии щитовидной железы повышением концентрации уровня Тироксина в сыворотки крови до физиологической нормы с 31,9 нМ/л при норме 40-50 нМ/л до 43,8 нМ/л на 27,1% (табл.3).

Гормональная активность щитовидной железы играет важную роль у жвачных животных в модуляции метаболических переменных. В этой серии исследования было оценено изменение гормона щитовидной железы Тироксина Т4 для оценки эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток.

Сыворотку, как и в предыдущей серии опыта получали после центрифугирования, хранили при температуре -18–19 °С и после окончания опыта транспортировали в лабораторию для анализа (Униплан АИФР-01).

Результаты вариации иммунофлуоресцентного анализа тиреотропного гормона Т4 у коров доноров контрольной и опытной группы представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Динамика изменения гормона тироксина после 5 кратной серии инъекций Bovi-Stem

Уровень Тироксина в сыворотке крови		Норма нМ/л	Серия опыта			
			№1	№2	№3	№4
Гр уп пы	Опыт	40-50 нМ/л	31,9	43,8	42,1	40,8
	Контроль	40-50 нМ/л	32,3	33,7	34,5	32,8
	Расхождения , %		1,2%	23,0%	22,0	24,3%

Сравнение значений уровня Тироксина с референтным значением представлено на рисунке 1.

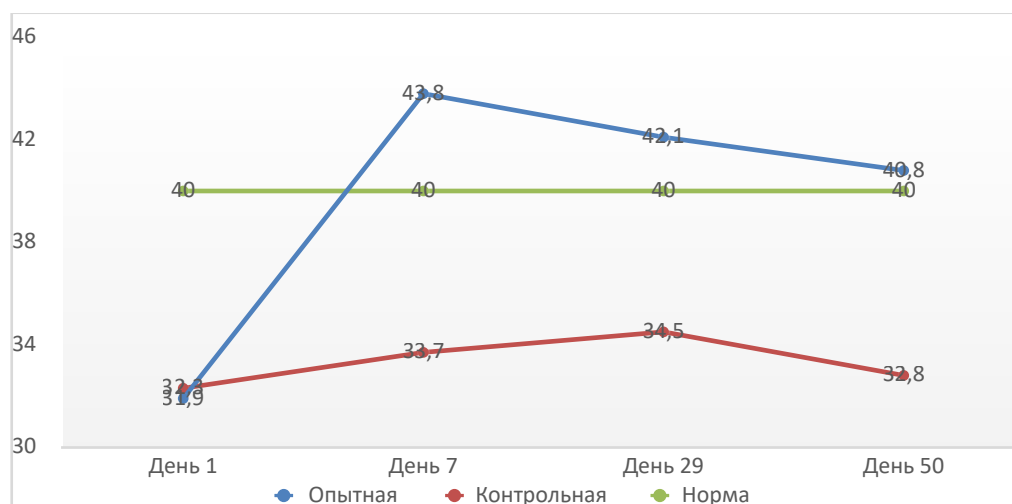


Рисунок 1 - Динамика изменения гормона тироксина после 5 кратной серии инъекций Bovi-Stem

Этот положительный эффект может быть обусловлен либо увеличением числа набора в пул преантральных фолликулов, либо уменьшением атрезии фолликулов. В текущем исследовании различия наблюдались вскоре после лечения, уже на второй сессии OPU, что позволяет предположить, что MSC оказали положительное влияние на популяцию растущих антральных фолликулов, которые были аспирированы в течение нескольких недель после лечения и, таким образом, были набраны из пула первичных фолликулов до лечения MSC. Это наблюдение согласуется с антиапоптотическим эффектом и последующим увеличением популяции антральных фолликулов, наблюдаемым после этого типа клеточной терапии у других видов [9].

Воспаление, связанное с повторными процедурами OPU, может вызвать наличие высоких концентраций воспалительных сигналов в яичнике. Инфекции в других органах, таких как матка или молочная железа, также связаны с увеличением фиброзной ткани в яичнике, нарушением фолликулогенеза, аномальной внутрифолликулярной средой, снижением уровня потенциала развития яйцеклеток [10]. Присутствие бактериальных липосахорида индуцирует накопление медиаторов воспаления, которые также, вероятно, будут увеличены из-за механических повреждений, вызванных OPU [11].

Мы можем сделать вывод, что присутствие MSC, возможно, отрицательно модулирует выработку цитокинов, связанных с воспалением как это наблюдалось у мышей [12], и таким образом, минимизировало их пагубное воздействие на растущие фолликулы, уменьшая атрезию и улучшая качество яйцеклеток. Соответственно увеличения наблюдаемое в результатах IVF, было обусловлено восстановлением большего числа жизнеспособных ОКК, и, таким образом, минимизировало их пагубное воздействие на растущие фолликулы, уменьшая атрезию и улучшая качество яйцеклеток. Соответственно, увеличение, наблюдаемое в результатах IVF, было обусловлено восстановлением большего числа жизнеспособных ОКК.

Лечение MSC не было эффективным для снижения пагубного воздействия воспаления и последующего фиброза.

В этом случае мы можем предположить, что хронический воспалительный процесс в яичниках из-за повторяющихся ОРУ, возможно, поставил под угрозу популяцию фолликулов или физиологию яичников таким образом, что лечения MSC полноценно не способно восстанавливать функцию яичников. Например, многочисленные проколы в серии ОРУ вызывают накопление рубцовой ткани в строме яичника [13], что приводит к затвердению яичника, что наблюдается клинически [14]. Изменения, наблюдаемые в жесткости яичников, могут повлиять на развитие преантральных фолликулов.

Более того, вполне вероятно, что также существовала взаимосвязь между хроническим воспалением яичников, эндокринным дисбалансом и старением, что, возможно, способствовало интенсивному развитию фиброза у большинства исследуемых коров.

Заключение

Стволовые клетки обладают положительным тропизмом к любой области, подвергающейся воспалительному процессу. Таким образом, чтобы гарантировать, что клетки будут действовать именно в яичнике, мы использовали 5 кратную серию инъекцию BOVI-STEM. В ряде исследований сообщалось о интрафолликулярных [16], внутриутробных [15] или внутриовариальных [17] введении лекарств, но большинство, если не все, применялось только в экспериментальных целях. Поскольку целью настоящего исследования было проверить альтернативу лечению доноров ооцитов, используемых для коммерческого внутривенного введения, было проведено предыдущее исследование для проверки безопасности этой процедуры и подтверждения количества введенных MSC. Эксперимент проводился путем введения MSC в здоровые яичники коровы, и никаких побочных эффектов зарегистрировано не было, что подтверждает безопасность процедуры. В эксперименте 1 мы выполнили дополнительные перфорации в яичниках перед инъекцией физиологического раствора или MSC, чтобы уменьшить потенциальные различия в воспалении между яичниками, из которых было извлечено большее или меньшее количество яйцеклеток.

Таким образом, в настоящем исследовании представлены доказательства того, что серия инъекций MSC оказывает благотворное влияние на IVF у коров голштинской породы, подвергающихся серии ОРУ. Однако такие эффекты могут быть ограничены в зависимости от того, как долго коровы использовались в качестве доноров ооцитов, что отражает степень повреждения ткани яичников.

Литература

1. Abd-Allah, S. H. et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy* 15, 64-75 (2013).

2. Aller, J. F., Mucci, N. C., Kaiser, G. G., Callejas, S. S. & Alberio, R. H. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 133, 10-15 (2012).
3. Boni, R., Roelofsen, M. W., Pieterse, M., Kogut, J. & Kruip, T. A. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48, 277-289 (1997).
4. Caplan, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol.* 217, 318-324 (2009).
5. Carvalho, J. L. et al. Priming mesenchymal stem cells boosts stem cell therapy to treat myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 617-625 (2013).
6. Chang, L.-B. et al. Therapeutic potential of amniotic fluid stem cells to treat bilateral ovarian dystrophy in dairy cows in a subtropical region. *Reproduction in Domestic Animals* 53, 433-441 (2018).
7. de Oliveira Bravo, M., Carvalho, J. L. & Saldanha-Araujo, F. Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. *Purinergic Signal.* 12, 595-609 (2016).
8. Elfayomy, A. K., Almasry, S. M., El-Tarhouny, S. A. & Eldomiaty, M. A. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue and Cell* 48, 370-382 (2016).
9. Grady, S. T. et al. Effect of intra-ovarian injection of mesenchymal stem cells in aged mares. *J. Assist. Reprod. Genet.* 36, 543–556 (2019).
10. Haddad, R. & Saldanha-Araujo, F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res. Int.* 2014, 216806 (2014).
11. Lai, D., Wang, F., Dong, Z. & Zhang, Q. Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells Help Restore Function to Ovaries in a Premature Ovarian Failure Mouse Model. *PLoS ONE* 9, e98749 (2014).
12. Lindroos, B., Suuronen, R. & Miettinen, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep* 7, 269-291 (2011).
13. Mohamed, S. A. et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod. Sci.* 25, 51-63 (2018).
14. Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, T. A. M. & Taverne, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30, 751-762 (1988).

15. Rosado, I. R. et al. Immunomodulatory and neuroprotective effect of cryopreserved allogeneic mesenchymal stem cells on spinal cord injury in rats. *Genet. Mol. Res* 16, (2017).
 16. Spejo, A. B., Carvalho, J. L., Goes, A. M. & Oliveira, A. L. R. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells on spinal motoneurons following ventral root axotomy: synapse stability and axonal regeneration. *Neuroscience* 250, 715-732 (2013).
 17. Takehara, Y. et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab. Invest.* 93, 181-193 (2013).
-