

**ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМУ ОПЛОДОТВОРЕНИЮ
У КОРОВ: ВЛИЯНИЕ РАЗНОГО УРОВНЯ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА
В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ И РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ**

Шедова Е.Н., Сингина Г. Н., Лопухов А.В.

*ФИЦ животноводства — ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Подольск-Дубровицы
Московской обл., Российская Федерация*

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) является одним из ключевых регуляторов созревания ооцитов млекопитающих. Цель исследования - изучение зависящего от концентрации влияния ЭФР в культуре коровьих ооцитов на их созревание *in vitro* и эмбриональное развитие после экстракорпорального оплодотворения, а также качество полученных IVP эмбрионов. Ооцит-кумуляные комплексы (ОКК) культивировали в контрольной среде или при добавлении различных концентраций (10, 20, 40 нг/мл) ЭФР, после чего их сначала оплодотворяли *in vitro*, а затем культивировали для эмбрионального развития. Сразу после оплодотворения по наличию полярных телец оценивали созревание, на 3-и и 7-е сутки определяли соответственно дробление и число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты. На цитологических препаратах полученных бластоцист определяли общее количество ядер и долю ядер с признаками апоптоза. Не выявлено влияния условий культивирования на завершение ядерного созревания. Также отсутствовали различия между вариантами в уровне дробления ооцитов после экстракорпорального оплодотворения. Условия созревания ооцитов повлияли на их развитие до стадии бластоцисты. В контроле выход бластоцист составил 25% а введение в среду созревания ЭФР в концентрациях 20 и 40 нг/мл повышало этот показатель до 40% ($P < 0,05$). ЭФР во всех тестируемых концентрациях (10, 20 и 40 нг/мл) снижал частоту апоптотической дегенерации в бластоцистах ($P < 0,05$), повышая таким образом их жизнеспособность. Заключение, что рекомендуемой концентрацией ЭФР в среде созревания коровьих ооцитов является 20-40 нг/мл.

Ключевые слова: лактирующие коровы, оплодотворение *in vitro*, эпидермальный фактор роста, развитие эмбриона

Проблемы биологии продуктивных животных, 2025. 4: 74-83.

Используемые обозначения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ЭФР – эпидермальный фактор роста; ЛГ – лютеинизирующий гормон; КРС – крупный рогатый скот; МII – стадия метафазы второго деления мейоза; ОКК – ооцит-кумуляные комплексы; ФБС – фетальная бычья сыворотка; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride); IVM (*in vitro* maturation) - созревание ооцитов *in vitro*; IVP (*in vitro* production, IVP)

Создание и внедрение в селекционный процесс репродуктивной биотехнологии, связанной с получением эмбрионов *in vitro* (IVP) является актуальной проблемой, решение которой позволяет проводить работу по воспроизводству, а также созданию новых и улучшению существующих пород крупного рогатого скота более интенсивно и на высоком генетическом уровне (Dobson et al., 2007). Согласно недавним данным, количество эмбрионов, произведенных *in vitro*, продолжает расти со среднегодовым темпом в 12%. Это связано с тем, что данная технология становится альтернативой традиционным программам получения эмбрионов *in vivo*

и все чаще применяется в коммерческих целях, а также в программах по сохранению генетических ресурсов в различных странах (Ferré et al., 2020).

Хотя в последние годы были достигнуты определенные успехи в области получения IVP эмбрионов у КРС, их качество ниже качества эмбрионов, полученных *in vivo* (Ferré et al., 2020a; Ferré et al., 2020b). Показано, что эффективность получения эмбрионов вне организма, во многом зависит от качества ооцитов, которое они приобретают в процессе созревания *in vitro* (in vitro maturation, IVM) (Conti, Franciosi, 2018; Lonergan, Fair, 2016). Аналогично созреванию, происходящему *in vivo*, в выделенных из фолликулов и инкубируемых вне организма ооцитах возобновляется мейоз и происходят изменения хромосом от стадии диплотены 1го деления мейоза до метафазы 2го деления мейоза (МII). Тем не менее, созревание цитоплазмы ооцитов, когда в ней наблюдаются необходимые для их последующего оплодотворения ультраструктурные и молекулярные перестройки, оказывается недостаточным, и полноценность яйцеклеток снижается (Blanco et al., 2011; Conti, Franciosi, 2018). Причина - неадекватность условий экстракорпорального созревания женских половых клеток и необходимость их дальнейшего совершенствования (Chandra, Sharma, 2020). При этом воспроизведение микроокружения, характерного для овариальных фолликулов, где происходит созревание ооцитов *in vivo*, представляется наиболее логичным и перспективным подходом (Chandra, Sharma, 2020; Dalbies-Tran et al., 2020).

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) высоко экспрессируется в женских репродуктивных органах и связан со многими репродуктивными процессами, такими как фолликулогенез, овуляция, имплантация эмбриона и функциональное поддержание желтого тела (Shimada, 2016; Luo et al., 2020). Одним из основных путей, ответственных за распространение сигнала ЛГ через кумулюсные клетки и ооцит *in vivo*, является система, состоящая из ЭФР и его лигандов (таких как амфиригулин, эпирегулин и бетацеллюлин) (Richani, Gilchrist, 2018; Prochazka, 2017). В условиях *in vitro* ЭФР улучшает созревание ооцитов, их оплодотворение, а также развитие эмбрионов до стадии бластоцисты у мышей (Richani et al., 2014) и свиньи (Valleh et al., 2016). У КРС данный ростовой фактор способствует созреванию ооцитов крупного рогатого скота и разрастанию кумулюсных клеток (Bezerra et al., 2020), снижению апоптоза (Sirisathien, Brackett, 2003), повышению компетенции ооцитов к эмбриональному развитию, поэтому его включают в среду IVM, но вопрос о том в каких концентрациях он должен присутствовать в среде созревания остается дискуссионным (Guler et al., 2020; Yong et al., 2017).

Цель исследования – изучение зависящего от концентрации влияния ЭФР в культуре коровьих ооцитов на их созревание *in vitro* и эмбриональное развитие после экстракорпорального оплодотворения, а также качество полученных IVP эмбрионов.

Материал и методы

Яичники половозрелых самок крупного рогатого скота, собранные после убоя животных, были доставлены в лабораторию в физиологическом растворе (ФЗ) в течение 4-6 часов при температуре не ниже 28 °С. После доставки их освобождали от лишних тканей и многократно промывали в стерильном (подогретом до 37°C) ФЗ с антибиотиками, чтобы удалить компоненты крови и микробную контаминацию. Ооциты в составе ооцит-кумуляных комплексов (ОКК) выделяли из фолликулов яичников механическим способом - рассекали стенки видимых фолликулов лезвием, после чего проводили поиск и промыв извлечённых ОКК. При этом в качестве рабочего раствора применялась среда TC199M с буфером HEPES (25 мМ), 2 % ФБС, 10 мкг/мл гепарина и 50 мкг/мл гентамицина. В завершении промыва выполняли морфологическую оценку выделенных ОКК, отбирая ооциты с гомогенной цитоплазмой и окруженные многослойным компактным кумулюсом.

Группы из отобранных 30-35 ОКК созревали *in vitro* в контрольной среде (TC199C, содержащая HEPES (25 мМ), Na-пируват (0.5 мМ), ФСГ и ЛГ (каждый по 10 мкг/мл), а также

ФБС (10%) в течение 24 ч. В опытных группах в среде IVM аналогичного состава дополнительно присутствовал ЭФР в концентрации 10, 20 и 40 нг/мл соответственно.

По завершению периодов созревания (24 ч IVM) ооциты подвергали процедуре ЭКО с целью получения эмбрионов *in vitro*. Созревшие ОКК промывали однократно в среде Fert-TALP (Сингина, Шедова, 2018), модифицированной внесением 10 мкг/мл гепарина, 20 мкМ пенициламина, 10 мкМ гипотаурина и 1 мкМ эпинефрина, и переносили в 4-луночные планшеты, которые содержали 400 мкл той же среды, покрытой равным объемом минерального масла. Активные сперматозоиды, полученные методом swim-up (Singina et al., 2021), добавляли в среду экстракорпорального оплодотворения с созревшими ооцитами в конечной концентрации $1,5 \times 10^6$ сперматозоидов/мл. Во всех экспериментах для оплодотворения ооцитов использовали заморожено-оттаянную сперму одного быка. Оплодотворение ооцитов, также, как и описанное выше их культивирование с целью созревания, проводили при температуре 38,5 °С в атмосфере с 5% CO₂ и 90% влажностью. Через 18-20 ч совместной инкубации со спермой ооциты осторожно пипетировали и отмывали в среде Fert-TALP для освобождения от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов. По завершению данных процедур проводили морфологическую оценку наличия или отсутствия в клетках полярных тельц. Ооциты, имеющие хотя бы одно полярное тельце, считались завершившими ядерное созревание, то есть созревшими. Затем предполагаемые зиготы переносили в среду эмбрионального развития и культивировали как описано ранее (Шедова и др., 2022). На 3-и сутки после оплодотворения ооцитов проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-е сутки определяли число эмбрионов, развившихся до стадий бластоцисты.

Для оценки качества полученных бластоцист готовили и анализировали их цитологические препараты, используя протокол, описанный ниже. Полученные бластоцисты промывали в ФБС, содержащем 0,1 % БСА (ФБС-БСА), и фиксировали 4 % раствором параформальдегида в ФБС в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывания в ФБС-БСА образцы подвергали процедуре пермеабелизации в 0,5% растворе Triton X-100 в течение 30 мин. Наличие признаков апоптоза ядерного материала в эмбрионах оценивали методом TUNEL с использованием набора In Situ Cell Death Detection Kit, fluorescein («Roche Diagnostics», Швейцария) согласно инструкции компании-производителя. Затем ооциты обрабатывали в течение 20 мин раствором DAPI (1 мкг/мл) с целью окрашивания хромосом и переносили на предметное стекло, с последующим заключением в среду Vectashield. Микрофотографирование и анализ препаратов выполняли под микроскопом Axio Imager M2, оснащенным флуоресцентной приставкой, при использовании программы Zen pro (Carl Zeiss, Германия). Для оценки качества эмбрионов подсчитывали общее число ядер в бластоцистах, а также определяли в них уровень апоптоза - долю TUNEL-позитивных ядер от общего числа ядер.

Статистический анализ данных проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA в программном пакете SigmaStat 2.03.0 (Systat Software Inc., США).

Результаты и обсуждение.

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) является одним из ключевых паракринных регуляторов, участвующих в координации созревания ооцитов и функционировании фолликулярных клеток. Добавление ЭФР в среду IVM рассматривается как способ усиления сигналов, аналогичных тем, что действуют в фолликуле *in vivo*, и благодаря чему можно улучшить качество созревающих ооцитов. В данной работе, определяли оптимальную концентрацию ЭФР при созревании ооцитов *in vitro*. Для этого, ооциты коров культивировали либо в контрольной среде, либо в аналогичной среде, но дополненной различными концентрациями ЭФР: 10, 20 и 40 нг/мл.

Результаты оценки уровня созревания ооцитов после их культивирования в контроле и при воздействии различных концентраций ЭФР представлены в табл. 1. Через 24 ч IVM доля МП

ооцитов, оцениваемая по наличию по крайней мере одного полярного тельца, на момент окончания процедуры оплодотворения и освобождения ооцитов от спермы и клеток кумулюса, была высокой и не различалась между экспериментальными группами, свидетельствуя об отсутствии влияния исследуемого фактора на данный процесс.

Таблица 1. Уровень ядерного созревания ооцитов в группах (M±m)

Группы	Количество ОКК, n	Доля созревших ооцитов, %
Контроль	127	90,6±1,6
10 нг/мл ЭФР	120	92,5±0,7
20 нг/мл ЭФР	122	89,3±1,2
40 нг/мл ЭФР	147	89,6±1,8

Примечания: ЭФР – эпидермальный фактор роста; ОКК – ооцит-кумулюсные комплексы.

Для оценки долгосрочного влияния ЭФР в среде IVM ооциты подвергали экстракорпоральному оплодотворению. Результаты эмбрионального развития представлены на рис. 1. Доля дробления созревших ооцитов (рис. 1А) в контроле составила 78,7±2,5 %. Введение ЭФР в среду *in vitro* созревания существенно не меняло ее значения: для концентраций 10, 20 и 40 нг/мл этот показатель составил соответственно 74,2±1,6, 82,5±4,0 и 78,0±3,2%. В тоже время, обнаружено зависящее от концентрации влияние ЭФР на развитие созревших и оплодотворенных ооцитов до стадии бластоцисты (рис. 1А и 2А). В контроле выход бластоцист составил 24,9±2,4%. Когда к среде созревания добавлялся FGF2 в концентрациях 20 и 40 нг/мл этот показатель повышался соответственно до 39,8±3,7 и 40,5±4,3% (P<0,05). При концентрации 10 нг/мл был также несколько выше, чем в контроле, но значимых различий не наблюдалось.

Охарактеризовано качество эмбрионов, полученных из ооцитов, созревших при различных концентрациях ЭФР по общему числу ядер (рис. 2Б) и числу ядер с признаками апоптоза (рис. 1В) в эмбрионах на стадии бластоцисты.

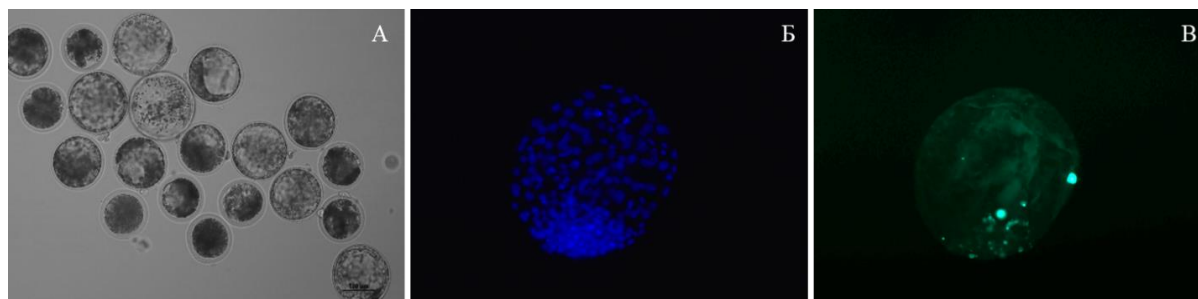


Рисунок 1. Микрофотографии эмбрионов крупного рогатого скота, полученных в следствие экстракорпорального созревания и оплодотворения коровьих ооцитов. А - эмбрионы, развившиеся до стадии бластоцисты (микроскоп Eclipse Ti-U, Nikon, Япония); Б — окрашивание ядер в бластоцисте с помощью DAPI (синий цвет); В — окрашивание апоптотических ядер в бластоцисте методом TUNEL (TUNEL-позитивные ядра окрашены в зеленый цвет). Увеличение 200х, флуоресцентный микроскоп Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия).

Наибольшее среднее число ядер в бластоцистах (79) наблюдалось в группе ЭФР 40 нг/мл, но статистически значимых различий его с таковым в контроле и в других опытных группах выявлено не было (рис. 2). В то же время было обнаружено положительное влияние ЭФР во всех тестируемых концентрациях (10, 20 и 40 нг/мл) на частоту апоптотической дегенерации в бластоцистах (рис. 3), выражающееся в понижении данного показателя по сравнению с контролем с $5,9 \pm 0,4$ до $3,5 \pm 0,2$, $2,8 \pm 0,2$ % и $3,0 \pm 0,2$ ($P < 0,001$) соответственно. Статистически значимые различия были между группами 10 и 20 нг/мл ($P < 0,05$) в пользу последней.

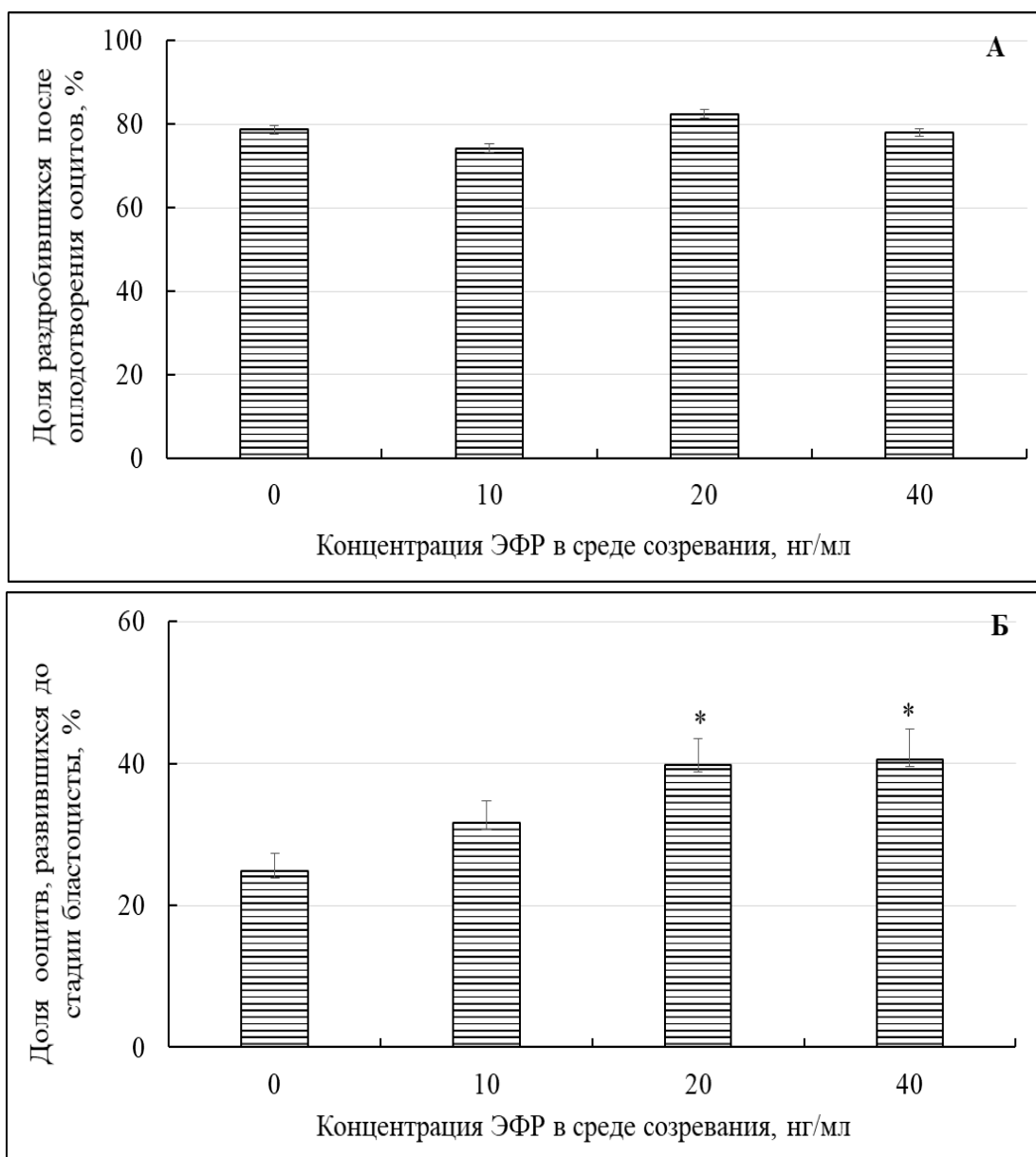


Рисунок 2. Эмбриональное развитие ооцитов коров, созревающих *in vitro* при воздействии эпидермального фактора роста (ЭФР) в разной концентрации. А – дробление созревших и оплодотворенных ооцитов; Б – развитие оплодотворенных ооцитов до стадии бластоцисты (M±m). * $P < 0,05$ по тесту Тьюки при сравнении с контролем (0).

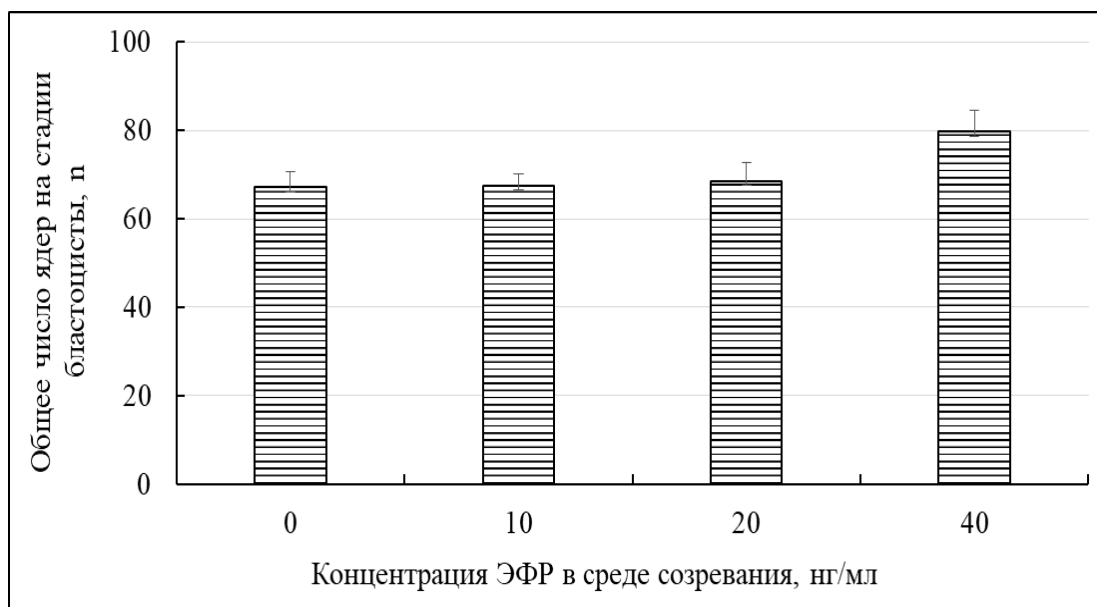


Рисунок 3. Результаты цитологического анализа числа ядер в IVP-бластоцистах, развившихся после экстракорпорального оплодотворения коровьих ооцитов, созревших *in vitro* при воздействии различных концентраций эпидермального фактора роста (ЭФР). (M±m).

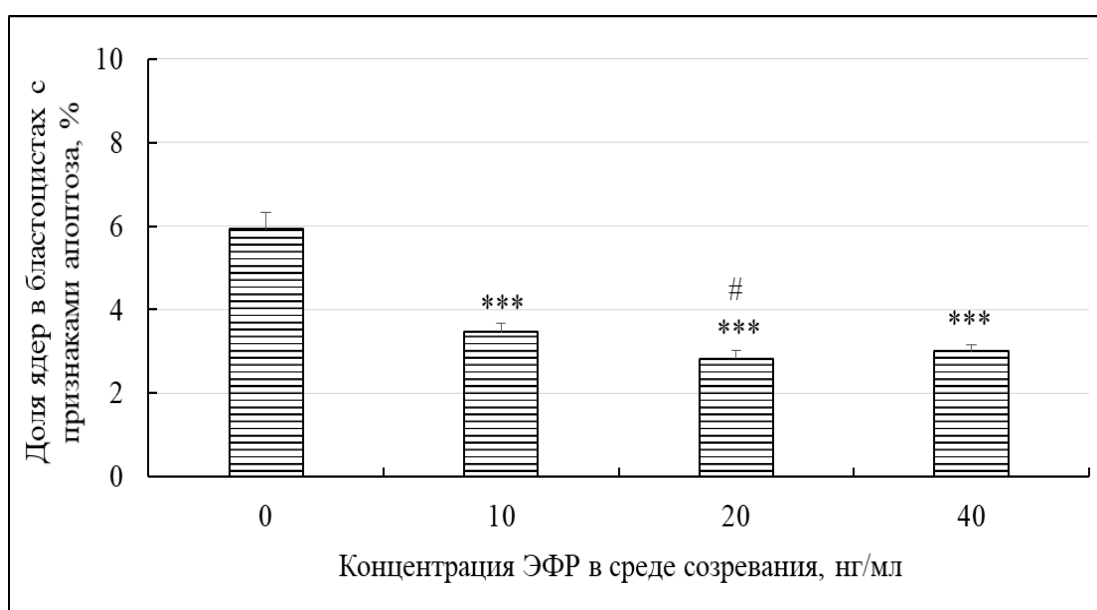


Рисунок 4. Уровень апоптотической дегенерации ядер в IVP-бластоцистах, развившихся из ооцитов коров, созревших *in vitro* в присутствии различных концентраций эпидермального фактора роста (ЭФР). (M±m). ***P<0,001 по тесту Тьюки при сравнении с контролем (0); #P<0,05 при сравнении с 10 нг/мл

Положительное влияние ЭФР на созревание ооцитов *in vitro* выявлено у различных видов млекопитающих, включая сельскохозяйственных животных. Согласно многочисленным исследованиям, ЭФР стимулирует экспансию кумулюсных клеток, активирует MAPK/ERK-каскад и способствует улучшению процессов цитоплазматического созревания. Концентрации,

при которых этот эффект наблюдается варьируют от 1 до 100 нг/мл (Richani, Gilchris, 2018). У крупного рогатого скота с одной стороны продемонстрировано (Lonergan et al., 1996; Bastan A. et al., 2010), что добавление ЭФР в концентрациях 1, 10 и 100 нг/мл в равной степени усиливает экспансию кумулюса, повышает долю МП-ооцитов, а также увеличивает процент бластоцист после оплодотворения, с другой, что данный эффект является дозозависимым: позитивное влияние на ядерное созревание и развитие эмбрионов достигается при 30 нг/мл, тогда как при 40–50 нг/мл он отсутствует (Vinayak et al., 2018). Отмечается также, что в концентрации 50 нг/мл ЭФР могут взаимодействовать с другими ростовыми факторами, в частности с IGF1 (Yang et al., 2022), усиливая митохондриальную активность, экспансию кумулюса и повышая частоту формирования бластоцист, но при индивидуальном использовании такого влияния он не оказывал.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что положительное влияние ЭФР в среде созревания ооцитов коров носит долговременный характер и преимущественно связано с цитоплазматическими, а не ядерными изменениями в яйцеклетках. Изучаемый фактор роста не оказал влияния на долю ооцитов, достигших стадии МП, однако способствовал повышению выхода бластоцист после их экстракорпорального оплодотворения. Данный позитивный эффект достигался при концентрации 20 и 40 нг/мл (рис. 1). Примечательно, что выявленный эффект ЭФР, затрагивал не только количественный, как это было показано другими авторами (Lonergan et al., 1996; Bastan et al., 2010; Vinayak et al., 2018), но и качественный показатель эмбрионального развития: под действием ЭФР наблюдалось снижение доли ядер с признаками апоптоза в сформировавшихся бластоцистах во всех исследованных концентрациях, в том числе при концентрации 10 нг/мл (рис. 3).

Сравнение данных, продемонстрированных в настоящем исследовании, с результатами, полученными другими авторами указывает на возможную опосредованную роль специфических условий культивирования ооцитов, в реализации эффекта тестируемого фактора. В данной работе во всех экспериментальных группах ооциты созревали в среде ТС199, дополненной гонадотропными гормонами ФСГ и ЛГ: такой вариант чаще других используется для этих целей. В упомянутых выше исследованиях культивирование ооцитов происходило либо в среде в отсутствие гонадотропных гормонов (Lonergan et al., 1996), либо в среде иного состава (Bastan et al., 2010). Более близкими к нашим результатам оказались данные полученные при использовании ТС199, содержащей ЛГ и эстрадиол (Vinayak et al., 2018).

Заключение

Проведенное исследование показало, что действие ЭФР на ооциты коров, созревающие *in vitro*, носит дозозависимый характер. В условиях протокола, предусматривающего одновременное добавление в среду ТС199 гонадотропных гормонов ФСГ и ЛГ, рекомендуемой концентрацией этого ростового фактора является 20–40 нг/мл. Хотя включение ЭФР в среду IVM не изменяет показатели ядерного созревания, оно способствует повышению эмбриональной компетентности ооцитов после экстракорпорального оплодотворения, что указывает на улучшение их цитоплазматического созревания и общего качества.

Работа выполнена по государственному заданию (тема FGGN-2024-0014).

Список литературы

1. Сингина Г.Н., Шедова Е.Н. Дозревание ооцитов коров в среде FERT-TALP повышает их качество и компетентность к развитию *in vitro*. // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 6. С. 1206–1213. doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1206rus.
2. Шедова Е.Н., Сингина Г.Н., Узбекова С., Узбеков Р., Луканина В.А., Цындрин Е.В. Влияние внеклеточных везикул фолликулярного происхождения в среде созревания на способность ооцитов коров к эмбриональному развитию *in vitro* после старения и экстракорпорального оплодотворения. //

- Сельскохозяйственная биология. 2022. Т. 57. № 6. С. 1178-1187. doi: 10.15389/agrobiol.2022.6.1178rus
3. Bastan A., Polat B., Acar D. B., Korkmaz Ö., Çolak A. Determination of optimal dose of EGF for bovine oocyte maturation and subsequent in vitro fertilization and culture in two media // *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*: 2010. Vol. 34: nr 1. Article 5. <https://doi.org/10.3906/vet-0711-23>
 4. Bezerra F.T.G., Paulino L.R.F.M., Silva B.R., Silva A.W.B., Souza Batista A.L.P., Silva J.R.V. Effects of epidermal growth factor and progesterone on oocyte meiotic resumption and the expression of maturation-related transcripts during prematuration of oocytes from small and medium-sized bovine antral follicles. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2020. Vol. 32 nr 14. P. 1190-1199. doi: 10.1071/RD20099
 5. Blanco M.R., Demyda S., Moreno M.M., Genero E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. // *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2011. Vol. 6. P. 155-165.
 6. Chandra V., Sharma G.T. In vitro strategies to enhance oocyte developmental competence. // *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. 2020. Vol. 12 nr 1. P. 116-136. doi: 10.2741/S543
 7. Conti M., Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. // *Human Reproduction Update*. 2018. Vol. 24 nr 3. P. 245-266. doi: 10.1093/humupd/dmx040
 8. Dalbies-Tran R., Cadoret V., Desmarchais A., Elis S., Maillard V., Monget P., Monniaux D., Reynaud K., Saint-Dizier M., Uzbekova S. A comparative analysis of oocyte development in mammals. // *Cells*. 2020. Vol. 9 nr 4. P. 1002. doi: 10.3390/cells9041002
 9. Dobson H., Smith R., Royal M., Knight Ch., Sheldon I. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. // *Reprod. Domest. Anim.* 2007. Vol. 42 Suppl 2. P. 17-23. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00906.x
 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. // *Reprod. Domest. Anim.* 2020a. Vol. 55 nr 6. P. 659-676. doi: 10.1111/rda.13667
 11. Guler A., Poulin N., Mermillod P., Terqui M., Cognié Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes // *Theriogenology*. 2000. Vol. 54 nr 2. P. 209-18. doi: 10.1016/s0093-691x(00)00342-3
 12. Lonergan P., Carolan C., Van Langendonck A., Donnay I., Khatir H., Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. // *Biol. Reprod.* 1996. Vol. 54. nr 6. P. 1420-9. doi: 10.1095/biolreprod54.6.1420
 13. Lonergan P., Fair T. Maturation of oocytes in vitro. // *Annual Review of Animal Biosciences*. 2016. Vol. 4. P. 255-68. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110822
 14. Luo Y., Zhang R., Gao J., Wang Y., Zhang W., Qing S. The localization and expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in bovine ovary during oestrous cycle. // *Reprod. Domest. Anim.* 2020. Vol. 55 nr 7. P. 822-832. doi: 10.1111/rda.13690.
 15. Richani D., Wang X., Zeng H.T., Smitz J., Thompson J.G., Gilchrist R.B. Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence. // *Mol. Reprod. Dev.* 2014. Vol. 81 nr 5. P. 422-35. doi: 10.1002/mrd.22307
 16. Richani D., Gilchrist R.B. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. // *Hum. Reprod. Update*. 2018. Vol. 24 nr 1. P. 1-14. doi: 10.1093/humupd/dmx029
 17. Prochazka R., Blaha M., Nemcová L. Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. // *Biol. Reprod.* 2017. Vol. 97 nr 4. P. 537-549. doi: 10.1093/biolre/i0x112
 18. Singina G.N., Shedova E.N., Lopukhov A.V., Mityashova O.S., Lebedeva I.Y. Delaying effects of prolactin and growth hormone on aging processes in bovine oocytes matured in vitro. // *Pharmaceuticals*. 2021. Vol. 14 nr 7. Article 684. doi: 10.3390/ph14070684
 19. Sirisathien S., Brackett B.G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. // *Mol Reprod Dev.* 2003. Vol. 65 nr 1. P. 51-6. doi: 10.1002/mrd.10263.

20. Shimada M., Umehara T., Hoshino Y. Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation process. // *Reprod. Med. Biol.* 2016. Vol. 15 nr 4. P. 201-216. doi: 10.1007/s12522-016-0236-x
21. Valleh M.V., Rasmussen M.A., Hyttel P. Combination effects of epidermal growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor on the in vitro developmental potential of porcine oocytes // *Zygote*. 2016. Vol. 24 nr 3. P. 465-76. doi: 10.1017/S0967199415000416
22. Vinayak S.G., Meenambigai T.V., Mangalagowri A., Reena D. Vijayarani K. Influence of epidermal growth factor in the in vitro development of bovine preimplantation embryos. // *Int. J. Pure App. Biosci.* 2018. Vol. 6 nr 6. P. 584-589. doi: 10.18782/2320-7051.6638
23. Yang S., Yang Y., Hao H., Du W., Pang Y., Zhao S., Zou H., Zhu H., Zhang P., Zhao X. Supplementation of EGF, IGF-1, and Connexin 37 in IVM Medium significantly improved the maturation of bovine oocytes and vitrification of their IVF blastocysts. // *Genes*. 2022. Vol. 13. Article 805. doi: 10.3390/genes13050805
24. Yong H., Oh H.I., Lee S.H., Cheong H.T., Yang B.K., Park C.K. Treatment of epidermal growth factor (EGF) enhances nuclear maturation of porcine oocytes and stimulates expression of ER/Golgi transport proteins. // *Dev. Reprod.* 2017. V. 21 nr 2. P. 131-138. doi: 10.12717/DR.2017.21.2.131

References (for publications in Russian)

1. Singina G.N., Shedova E.N. [Final maturation of bovine oocytes in a FERT-TALP medium increased their quality and competence to in vitro embryo development]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* (Agricultural Biology). 2019. 54(6): 1206-1213. doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1206rus
2. 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. 7(6): 1178-1187. doi: 10.15389/agrobiology.2022.6.1178rus

UDC 636.2.082.12

***In vitro* fertilization studies in cows: the effect of different levels of epidermal growth factor in culture medium on oocyte maturation and embryo development**

Shedova E. N., Singina G. N., Lopukhov A. V.

Federal Research Center of Animal Husbandry, Ernst Institute of Animal Husbandry, Podolsk-Dubrovitsy, Moscow oblast, Russian Federation

ABSTRACT. Epidermal growth factor (EGF) is one of the key regulators of mammalian oocyte maturation. The aim of this study was to investigate the concentration-dependent effects of EGF in bovine oocyte cultures on their *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization (IVF), as well as on the quality of the resulting IVP embryos. Oocyte–cumulus complexes (OCCs) were cultured either in a control maturation medium or in medium supplemented with different concentrations of EGF (10, 20, and 40 ng/mL). Following maturation, the oocytes were fertilized *in vitro* and then cultured for embryonic development. Oocyte maturation was assessed immediately after fertilization based on the presence of polar bodies, while cleavage and the number of embryos that reached the blastocyst stage were evaluated on days 3 and 7, respectively. Cytological preparations of the resulting blastocysts were examined to determine the total number of nuclei and the proportion of nuclei with signs of apoptosis. No effect of culture conditions on the completion of nuclear maturation was observed. Similarly, no differences were detected among the experimental groups in the cleavage rate after IVF. The maturation conditions significantly influenced the ability of oocytes to develop to the blastocyst stage. In the control group, blastocyst yield was 25%, whereas supplementation of the maturation medium with EGF at concentrations of 20 and 40 ng/mL increased this parameter to 40% ($P<0.05$). EGF at all tested concentrations (10, 20, and 40 ng/mL) reduced the incidence of apoptotic degeneration in blastocysts ($P<0.05$), thereby enhancing their viability. Concluded, that the recommended concentration of EGF in the maturation medium for bovine oocytes is 20–40 ng/mL.

Keywords: dairy cows, in vitro fertilization, oocyte maturation, epidermal growth factor, embryo development

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology). 2025. 4: 74-83.

Поступило в редакцию: 20.11.2025

Получено после доработки: 18.12.2025

Сведения об авторах:

Шедова Екатерина Николаевна, н.с.; shedvek@yandex.ru

Сингина Галина Николаевна, к.б.н., рук. лаб.; g_singina@mail.ru

Лопухов Александр Викторович, н.с.; vubi_myaso@mail.ru