

Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека

А.П. Сысоева, Н.П. Макарова, Е.Е. Краевая

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

Долгое время роль семенной плазмы в процессе оплодотворения у человека оставалась недооцененной. Многочисленные исследования, связанные с разработкой методов культивирования эмбрионов человека *in vitro*, касались только качества мужских и женских гамет. Тем не менее в последние годы с развитием омиксных технологий стало понятно, что семенная плазма существенно влияет на морфофункциональные характеристики сперматозоидов. В первую очередь это касается регулирующей функции внеклеточных везикул, выделяемых клетками репродуктивного тракта мужчин. В связи с этим целью работы стала попытка проанализировать современные данные о влиянии внеклеточных везикул семенной плазмы на морфофункциональные характеристики сперматозоидов в решении проблем бесплодия, связанных с мужским фактором в репродуктивной медицине. В обзор включены исследования и результаты, описанные в научных статьях, найденных в базах Pubmed, Google Scholar, Cochrane Library по данной теме, опубликованные за последние 5 лет. Немногочисленные исследования, посвященные влиянию внеклеточных везикул семенной плазмы на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток, показывают, что внеклеточные везикулы действуют как функциональные регуляторы мужской фертильности, а их дисфункция может быть причиной бесплодия. Именно использование внеклеточных везикул семенной плазмы в клинических условиях может значительно повысить успех программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, и особенно это касается случаев, где причиной отсутствия беременности является нарушение сперматогенеза.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, экзосомы, биомаркеры, семенная плазма, сперматозоиды, вспомогательные репродуктивные технологии, клеточная биология, морфология

Для корреспонденции: Наталья Петровна Макарова. E-mail: np.makarova@gmail.com

Для цитирования: Сысоева А.П., Макарова Н.П., Краевая Е.Е. Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):5–13. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.5-13.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 15.06.2021. Получена после рецензирования 22.07.2021. Принята в печать 22.09.2021.

The role of seminal plasma extracellular vesicles in changes in the morphofunctional characteristics of human spermatozoa

A.P. Sysoeva, N.P. Makarova, E.E. Kraevaya

V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

For a long time, the role of seminal plasma during human fertilization remained underestimated. Numerous studies related to the development of different methods for human embryo *in vitro* cultivation were generally concerned with the quality of male and female gametes. However, in recent years, the development of Omix technologies provided a new insight into great seminal plasma influence on the morphofunctional characteristics of spermatozoa. This is especially true for the regulatory function of extracellular vesicles secreted by male reproductive tract cells. In this work, we attempted to analyze current data on the influence of extracellular seminal plasma vesicles on the morphofunctional characteristics of spermatozoa to solve male infertility topical issues. The review includes studies by foreign and Russian research groups that were

conducted within the past 5 years and found in PubMed, Google Scholar, and Cochrane Library databases. Very few studies demonstrate that seminal plasma vesicles act as functional regulators of male fertility and their dysfunction may lead to infertility. The use of seminal plasma extracellular vesicles in clinical practice may significantly increase the success of IVF programs, especially in impaired spermatogenesis.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, biomarkers, seminal plasma, spermatozoa, assisted reproductive technology, cell biology, morphology

Corresponding author: Natalia P. Makarova. E-mail: np.makarova@gmail.com

For citation: Sysoeva A.P., Makarova N.P., Kraevaya E.E. The role of seminal plasma extracellular vesicles in changes in the morphofunctional characteristics of human spermatozoa. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(4):5–13. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.5-13 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 15.06.2021. **Received in revised form** 22.07.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Использование различных методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) решило часть проблем, связанных с мужским и женским бесплодием. Например, метод ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) обеспечил прямую передачу отцовского генетического материала в яйцеклетку и получение эмбрионов у пар, бесплодие которых обусловлено мужским фактором. В связи с этим долгое время ролью семенной плазмы (СП) в регуляции процессов оплодотворения и развития эмбрионов в значительной степени пренебрегали. Тем не менее недавно обнаружены факторы, которые однозначно убеждают ученых в роли семенной плазмы в развитии эмбриона человека. В первую очередь это касается регулирующей функции внеклеточных везикул, выделяемых клетками репродуктивного тракта мужчины.

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой частицы, ограниченные клеточной мембраной с цитоплазматическим содержимым, которые секретируются почти всеми типами клеток, от прокариот до эукариот. Внеклеточные везикулы были обнаружены во многих биологических жидкостях организма человека (кровь, моча, слюна, грудное молоко, фолликулярная жидкость и сперма). Выделяют три типа внеклеточных везикул: 1) микровезикулы, или экзосомы, образующиеся во внеклеточном пространстве за счет расщепления плазматической мембраны, 2) экзосомы цитоплазматического происхождения, содержащие белки, РНК и липиды; их мембрана образуется в результате впячивания внутрь эндосомальной мембраны, 3) апоптотические тельца [1].

Семенная плазма человека состоит из смеси внеклеточных везикул, которые происходят из различных дополнительных мужских репродуктивных органов, таких как простата, придаток яичка и семенные пузырьки. Внеклеточные везикулы не только иммуномодулируют женские половые пути при прохождении сперматозоидов по репродуктивным путям в процессе оплодотворения, но также повышают подвижность сперматозоидов [2], разжижают сперму, защищают

от инфекций [3]. Показано, что ВВ регулируют функции сперматозоидов путем связывания и слияния с их мембраной, позволяя им интегрировать цитозольные и мембранные составляющие в клетку. Ведутся споры о необходимых условиях для связывания и слияния везикул, таких как pH, присутствие факторов капацитации или ответ на прогестерон [4]. Кроме того, перенос белка от везикул к сперматозоидам возможен только при наличии определенного значения pH, температуры и наличия цинка [5–8].

В обзоре современных данных литературы основное внимание уделяется участию именно внеклеточных везикул СП в регуляции функций сперматозоидов, влияющих на их способность к оплодотворению.

Протеомный и экзосомный профили семенной плазмы человека

Семенная плазма долгое время считалась пассивной средой, необходимой только для доставки сперматозоидов в женский репродуктивный тракт, однако последние достижения протеомных технологий позволили идентифицировать тысячи белков, и в настоящее время не остается сомнений в том, что СП значительно влияет на функции сперматозоидов и мужскую фертильность [9]. Белки СП участвуют в формировании семенного сгустка при эякуляции и процессе разжижения спермы благодаря содержанию белков семеногелина (SEMG), фибронектина (FN1) и KLK3. Семеногелин-1 (SEMG1) и семеногелин-2 (SEMG2) являются наиболее распространенными белками СП и служат основными компонентами эякуляционного сгустка, который препятствует преждевременной капацитации и активации сперматозоидов, и благодаря своим буферным свойствам (pH 7,35–7,50) обеспечивают защитную среду от кислой среды влагалища [10–13].

Белки СП также участвуют в регуляции подвижности сперматозоидов, гиперактивации и акросомной реакции; они обеспечивают защиту от окислительных процессов и обладают иммунодепрессивными свойствами, вызывая эффективное ингибирование лимфоцитов, макрофагов и системы комплементов [9, 14–16].

Семенная плазма преимущественно состоит из белков с диапазоном концентраций от 35 до 55 мг/мл [1, 7]. Большая часть белков, обнаруженных в семенной жидкости, происходит из семенных пузырьков, причем SEMG1, SEMG2, FN1 и лактотрансферрин (LTF) являются преобладающими белками, секретируемыми этими железами [17].

Синтаза оксида азота (NOS1), ингибиторы протеаз, такие как серпин, ингибитор протеина С (PCI), и различные цитокины, включая трансформирующий фактор роста (TGFB), также секретируются семенными пузырьками. При этом один из наиболее распространенных белков в СП, альбумин (ALB), который составляет около одной трети содержания белка в сперме, частично имеет простатическое происхождение [17, 18]. Простата также является основным источником глутаматкарбоксипептидазы-2 (фолатгидролаза, FOLH1 или простатоспецифический мембранный антиген, PSMA), арахидонат-15-липоксигеназы В (ALOX15B), глутамин-глутамилтрансферазы 4 (TGM4), простат-специфического белка 94 (PSP-94, ингибин-микро-семинопротеин), АСРР и калликрейна hK3e (KLK3), сериновой протеазы, известной как PSA. Другие белки, обнаруженные в СП, имеют эпидидимальное происхождение, включая простагландин-H2 D-изомеразу (простагландин-D2-синтаза или простагландин-D-синтаза липокалинового типа; PTGDS), кластерин (CLU), эпидидимальный секреторный белок E1 (NPC2), MIF, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), белок спермы P34H и ряд белков антиоксидантной системы, таких как эпидидимальная секреторная глутатионпероксидаза 5 (GPX5) и глутамилтранспептидаза (GGT1) [7, 17, 19]. Транскеталазеподобный белок 1 (TKTL1), фосфоглицераткиназа 2 (PGK2), С-цепь L-лактатдегидрогеназы (LDHC), экспрессируемый в яичках белок 101 (TEX101) и акросомный белок SP1 (ACRV1) происходят из секреции яичек [14, 20], в то время как муцин (MUC), которого очень много в семенной жидкости, является белком, характерным для куперовой железы. Многие белки, присутствующие в СП, происходят из различных половых желез. Например, ALB, который помимо простаты обнаруживается в яичках и придатке яичка, LTF, также образующийся в эпидидимисе, или протеин, ингибирующий пролактин (PIP), источником которого является не только семенной пузырек, но также семенники или придаток яичка [17, 21]. KLK3, в основном выделяемый простатой, также производится железой Литтре, а экспрессия белка SPAM1 (PH-20) была обнаружена в придатке яичка и самом яичке [17].

Таким образом, идентифицированные белки СП происходят из разных органов мужской репродуктивной системы. Тем не менее при исследовании СП следует учитывать, что 10 более распространенных белков в семенной жидкости, включая SEMG1, SEMG2 и ALB, составляют примерно 80% всей массы белка,

что затрудняет обнаружение других белков с низким содержанием [11, 14].

Как уже было сказано, помимо растворимых молекул и внеклеточных компонентов значительное количество белков, обнаруженных в СП, является цитоплазматическими, что связано с присутствием семенных экзосом в этой жидкости. Семенные экзосомы составляют 3% от общего белка семенной плазмы и в основном включают эпидидимосомы и простасомы [1]. Эти везикулы могут быть выделены из эякулята с помощью центрифугирования после удаления сперматозоидов с последующими различными этапами ультрацентрифугирования надосадочной жидкости [22–24]. Данный метод позволяет анализировать протеом СП, связанный исключительно с этими внеклеточными пузырьками. Еще в 2008 году A.G. Utleg et al. [25] проанализировали экзосомы от пяти здоровых мужчин и сообщили о наличии 139 белков. Самыми многочисленными группами белков были следующие.

1. Ферменты (с особым обилием протеаз, таких как АСРР, GGT1), а также ферменты аминопептидаза N (APN), аминопептидаза P (APP), неприлизин (MME), дипептидилпептидаза IV (DPP4), FOLH1 и KLK3. Высказано предположение, что APN и MME регулируют подвижность сперматозоидов человека посредством модуляции уровней энкефалина и тахикинина [17].

2. Транспортные/структурные белки с преобладанием пяти членов семейства аннексинов (ANXA1, 3, 5, 6 и 11), участвующих в регуляции Ca^{2+} , мембранном переносе, реорганизации липидов в мембране и эндцитозе, такие как актин А (ACTA), актин В (ACTB), профилин I (PRO1) и профилин II (PRO2), LTF, FN1 и тубулины (TBA1) и (TBB2).

3. Белки GTP, включая белки семейства RAS (RAB и RAP), участвующие в регуляции транспорта везикул.

4. Белки шаперонов, включая белки, связанные с тепловым шоком, HSP27 (HS27), HSP70 (HS71, HS72 и HS76) и HSP90 (HS9A и d HS9B).

5. Белки сигнальной трансдукции, включая кальмодулин (CALM), CLU, UBQ, цинк-альфа-2-гликопротеин (AZGP1, также известный как ZA2G) и MIF.

Более поздние и более масштабные работы команды C. Yang et al. в 2017 году [11] показали наличие в образцах везикул СП 1474 различных белков, ассоциированных с основными биологическими процессами, такими как метаболизм, рост и транспорт клеток, поддержание энергетического метаболизма, что согласуется с предыдущими исследованиями [8, 11, 24, 26]. Кроме того, были обнаружены белки-маркеры экзосом: HSP70, CD81, связанный с апоптозом ген 2-взаимодействующий белок X (ALIX), АСТВ, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), фосфоглицератдегидрогеназа (PHGDH) и галектин-3-связывающий белок (LGALS3BP) [11, 27]. Исследование, проведенное L. Vojtech et al., показало, что семенные экзосомы человека содержат особый набор малых некодирующих

РНК, которые модулируют репродуктивный тракт самок, поддерживая развитие эмбриона [5].

Внеклеточные везикулы семенной плазмы как биомаркеры мужского бесплодия

Внутреннее содержание внеклеточных экзосом потенциально может служить биомаркером мужского бесплодия [9, 11]. Последние разработки протеомных инструментов и усовершенствование процесса выделения экзосом сделали возможным идентифицировать значительное количество экзосомальных белков. Многие из фактически предложенных семенных биомаркеров оказались особенно полезными, например, для определения причин варикоцеле [28] или азооспермии (отсутствие сперматозоидов в эякуляте). При последнем диагнозе отсутствие сперматозоидов в сперме может возникать при аномалиях сперматогенеза и при гормональных нарушениях организма, в частности при необструктивной азооспермии (НОА) или обструктивной азооспермии (ОА), ассоциированной с обструкцией семенных путей [14]. Обнаружение биомаркеров к НОА и ОА очень важно для уточнения показаний к экстракции сперматозоидов из яичек (TESE) и предотвращения повторных множественных биопсий, поскольку >50% истинной НОА позволяет восстановить сперматогенез [14].

К. Yamakawa et al. [29] проанализировали протеом СП 10 фертильных и 10 бесплодных мужчин с азооспермией (семеро с НОА и трое с ОА) и идентифицировали четыре возможных биомаркера НОА: стабиллин-2 (STAB2), гуанин-нуклеотидвысвобождающий белок (GNRP) и PIP, которые отсутствовали в образцах пациентов с НОА, и один маркер обструктивной азооспермии, эпидидимальный белок NPC2 (белок С2 болезни Ниманна-Пика), отсутствующий у пациентов с ОА. Последний маркер был предложен в качестве клинического для дифференциации НОА от ОА.

В 2013 году A.D. Rolland et al. [20] провели интересное исследование и обнаружили, что белки TKTL1, PGK2 и LDHC специфически экспрессируются в половых клетках яичек на разных стадиях развития сперматозоидов. Эти белки были достоверно обнаружены в СП от фертильных доноров, но практически не идентифицировались в СП у мужчин после вазэктомии и у пациентов с азооспермией, что позволило исследователям предположить их потенциальную роль как биомаркеров состояния семенного эпителия и как сигнальных молекул задержки созревания половых клеток у пациентов с бесплодием.

Общие характеристики нормальной и субфертильной спермы установлены Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, 2010) для систематического анализа качества спермы [30]. Приблизительно у 40–60% мужчин имеются нарушения показателей спермограммы. Протеомный анализ СП пациентов с астенозооспермией представляет собой богатый источник биомаркеров мужского бесплодия, что дает возможность предположить, что функциональные анома-

лии придатка яичка и простаты могут способствовать астенозооспермии. СП здоровых доноров и пациентов с астенозооспермией проанализировали и идентифицировали 741 белок [7, 17]. Из них 45 белков было активировано, а 56 белков подавлено у пациентов с астенозооспермией, по сравнению с группой мужчин с нормозооспермией, где такого эффекта замечено не было. Протеомные изменения в семенной жидкости у пациентов с астенозооспермией в основном были связаны с метаболизмом, производством АТФ и нарушениями генерации метаболитов-предшественников АТФ, поскольку цикл Кребса оказался наиболее пострадавшим метаболическим путем. Среди идентифицированных белков был дегликаза DJ-1, белок, снижающий окислительный стресс, который был сильно подавлен у пациентов с астенозооспермией и предложен в качестве биомаркера для этого состояния. Снижение экспрессии DJ-1 сопровождалось увеличением уровней АФК, фактора, связанного с мужским бесплодием [7, 22].

В работе Y. Wu et al. 2019 года [12] также был проанализирован протеом СП мужчин с нормо- и астенозооспермией (524 белка). Авторы показали, что у пациентов с астенозооспермией 22 белка было подавлено, включая LDCH, SORD, ANXA2 и калликреин-2 (KLK2), а семь белков активировано, включая связанный с тепловым шоком белок HSP72. Измененная экспрессия белков, участвующих в процессах сворачивания и деградации, наблюдалась и в предыдущих протеомных анализах у мужчин с астенозооспермией. Большинство этих молекул является белками теплового шока (HSP), молекулярными шаперонами, которые опосредуют укладку других белков и предотвращают их агрегацию. Достоверная связь между измененной экспрессией HSP и нарушением подвижности сперматозоидов до конца не изучена, однако некоторые исследования связывают HSP с мужским бесплодием [31]. Важно также отметить, что в исследовании Y. Wu et al. наиболее дифференциально экспрессируемые белки при астенозооспермии были локализованы во внеклеточном пространстве и заключены во внеклеточные везикулы [12].

Существует достаточно много работ, описывающих нарушенную регуляцию белков у пациентов с тератозооспермией, олигозооспермией и олиготератозооспермией по сравнению с мужчинами с нормозооспермией [8, 32]. Среди них муцин-6 (MUC6), предшественник орозомукоида 1 (ORM1), предшественник эпидидимального гликопротеина изоформы 1 и гомолог CRISP1 у пациентов с тератозооспермией, CLU и LGALS3BP – у пациентов с олигозооспермией, однако тканевый ингибитор металлопротеиназы (TIMP) и AZGP1 (белок, участвующий в регуляции подвижности сперматозоидов) были значительно активированы у данной группы пациентов. Интересно также, что белки KLK3 и SEMG1 были активированы у пациентов с олиготератозооспермией, а белок LTF – у пациентов с тератозооспермией, вне зависимости от показателей concentra-

ции сперматозоидов в эякуляте. Белок DJ-1 отсутствует у пациентов с олиготератозооспермией и дифференциально экспрессируется у других групп пациентов. Эти результаты показывают, что экспрессия белков семенной плазмы напрямую зависит от концентрации и морфологии сперматозоидов, что дает возможность использовать некоторые из белков в качестве биомаркеров бесплодия [17, 24].

В случае олигоастенозооспермии E. Giacomini et al. [33] в своем исследовании сообщили о недостаточной экспрессии белков NPC2 и LGALS3BP и сверхэкспрессии липокалина-1 (LCN-1) и формы PIP в СП у таких пациентов по сравнению с пациентами с нормозооспермией.

Нарушение экспрессии белков при олигоастенозооспермии в основном отражает проблемы с развитием и метаболизмом сперматозоидов, транспортом веществ, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами семенной плазмы. Результаты разных исследований указывают на возможность использовать белки, например NPC2, PIP, PTGDS, LTF, AZGP1, ECM1 и KL3, в качестве биомаркеров статуса мужской фертильности [11, 24, 32, 33].

Интересную работу, осветившую тему внеклеточных везикул в эякуляте и их влияние на характеристики сперматозоидов, провели V. Murdica et al. в 2019 году [24]. Для их исследования были отобраны 42 пациента в возрасте от 18 до 50 лет – им выполнили расширенный анализ спермы, по результатам которого выделили три группы: 33 мужчины с нормальными показателями спермы (НС), 10 мужчин с тяжелой азооспермией (АС) и четверо с поствазэктомической азооспермией (ВАЗ). Пациенты с варикоцеле, воспалением мочеполовой системы, инфекциями семенных путей и курящие не были включены в исследование [24]. У групп пациентов с НС и АС была отобрана семенная плазма для выделения и анализа экзосом, содержащихся в эякуляте. Группы были схожи по следующим параметрам: период воздержания, рН, объем спермы, концентрация и жизнеспособность сперматозоидов. Критерии эякулята оценивали по данным ВОЗ [30]. Группы различались только по количеству прогрессивно подвижных сперматозоидов, которое было значительно ниже у мужчин с АС по определению. Для того чтобы исключить вклад популяции экзосом из яичек или придатков яичка в эксперимент, была включена сперма от пациентов с ВА3 [23].

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) выявила не только наличие везикул округлой формы, но также канальцев и других мембранных частиц. Везикулы, полученные из семенной плазмы пациентов с НС и АС, имели схожую форму, размер и электронную плотность. В частности, размер везикул обеих групп варьировал от 50 до 150 нм, большинство из которых было меньше 100 нм. Везикулы из семенной плазмы пациентов с азооспермией также имели схожие параметры размеров и формы с везикулами пациентов с

нормо- и астенозооспермией. Аналогично параметры везикул пациентов с НС и ВА3 оказались близки. Таким образом, V. Murdica et al. предположили, что секреция экзосом не зависит от наличия или статуса сперматозоидов в семенной жидкости [24].

Методы выделения чистой фракции внеклеточных везикул из семенной плазмы

В классическом методе выделения ВВ используется разделение частиц в соответствии с их плавучей плотностью путем центрифугирования. На первом этапе осаждаются частицы с высокой плавучей плотностью, такие как крупные клетки, клеточный дебрис, апоптотические тельца и агрегаты биополимеров. Для того чтобы не допустить потерю везикул, вызванную совместным оседанием компонентов плазмы, и уменьшить загрязнение препаратов продуктами лизиса клеток, этот этап также включает в себя несколько подэтапов, а именно центрифугирование при 300–400 g в течение 10 минут для осаждения основной части клеток, при 2000 g для удаления клеточного мусора, а при 10 000–14 000 g для удаления агрегатов биополимеров, апоптотических тельца и других структур с плавучей плотностью выше, чем у ВВ. Разная скорость вращения (от 100 000 до 200 000 g) также используется для окончательного осаждения ВВ [34]. Белки, не относящиеся к ВВ, в осадке удаляются путем суспендирования с последующим вторичным ультрацентрифугированием [35]. Полученный препарат ВВ дополнительно очищается, выделенные микрочастицы отбираются в соответствии с их размером путем микрофльтрации суспензии с использованием фильтров с диаметром пор 0,1 мкм, 0,22 мкм или 0,45 мкм [34, 35]. Важно отметить, что дополнительные этапы очистки ВВ (промывание и микрофльтрация) не только повышают чистоту, но и снижают их целевое количество. В частности, J. Webber et al. [36] показали, что промывание снижает выход ВВ (потери, вызванные неполным осаждением и агрегацией в осадке); выделенная таким образом фракция незначительно отличается по чистоте (соотношение ВВ к общему белку) по сравнению с той, что не подвергается дополнительному промыванию. Тем не менее отмывание везикул может быть необходимым для выделения чистой фракции ВВ, которые предназначены для определенного типа исследований [36, 37].

Применение внеклеточных везикул семенной плазмы для изменения морфофункциональных характеристик сперматозоидов

V. Murdica et al. в 2019 году исследовали влияние внеклеточных везикул СП на подвижность и процесс капацитации сперматозоидов [24]. Были изучены ВВ эякулята двух групп мужчин: нормальная подвижность и сниженная подвижность. Выделенные из СП ВВ инкубировали со сперматозоидами и отбирали пробы в разные моменты времени (через 15 минут, 1 час и 4 часа). Оказалось, что внеклеточные везикулы,

выделенные из семенной плазмы пациентов с нормозооспермией и азооспермией, вызванной вазэктомией, значительно увеличивали количество прогрессивно подвижных сперматозоидов, а вот экзосомы пациентов с астенозооспермией не только не оказали какого-либо положительного эффекта, но и вызвали еще большее снижение подвижности сперматозоидов. Далее авторы добавили ВВ, полученные из СП мужчин с нормозооспермией, к собственным сперматозоидам и вернули им былую подвижность. Аналогичным образом было показано увеличение количества сперматозоидов, которые подверглись акросомной реакции, после добавления ВВ. Этот эффект был наиболее очевиден у экзосом от пациентов с нормозооспермией, в то время как добавление экзосом от мужчин с астенозооспермией не привело к улучшению показателей. Увеличение фракции подвижных сперматозоидов, активация капациации и стимуляция акросомальной реакции, вероятно, происходят за счет переноса различных факторов из ВВ в сперматозоиды [17, 38, 39].

В своей работе V. Murdica et al. доказали гипотезу, которая заключается в том, что сперматозоиды, отделенные от СП человека, могут связывать и поглощать экзосомы. С помощью флуоресцентной микроскопии и меченных липофильным красителем экзосом авторы обнаружили, что уже через 15 минут сперматозоиды связывают ВВ, а через 1 час и 4 часа этот процесс активно выражен. Эксперимент также показал, что экзосомы из образцов эякулята пациентов с нормозооспермией обладали лучшей связывающей способностью, чем экзосомы от пациентов с астенозооспермией [24, 40, 41].

Еще одна интересная работа, описывающая влияние внеклеточных везикул эякулята на характеристики сперматозоидов, опубликована X. Zhang et al. в 2020 году [42]. Авторы показали, что ВВ семенной плазмы и их содержимое обладают антибактериальными, антиоксидантными и иммуносупрессивными свойствами и могут участвовать в биологических процессах, косвенно влияя на функции сперматозоидов. ВВ снижают избыточную продукцию АФК, ослабляют окислительный стресс в семенной жидкости и переносят ионы Ca^{2+} для регулирования индуцированной подвижности сперматозоидов [2, 43]. Взаимодействуя напрямую со сперматозоидами, ВВ могут играть решающую роль в их созревании в придатке яичка, а также оказывать влияние на функционирование и оплодотворяющую способность мужских половых клеток [9, 44]. Интересно, что ВВ, выделенные из эякулята пациентов с олигоастенозооспермией, демонстрируют другие профили микроРНК и белков по сравнению с эякулятом пациентов с нормозооспермией [45, 46]. Эти исследования показывают, что ВВ действуют как функциональные регуляторы мужской фертильности, а их дисфункция может быть причиной мужского бесплодия.

Наряду с этим X. Zhang et al. показали, что внутриклеточный гомеостаз кальция является ключевым компонентом в контроле подвижности сперматозоидов, а

приток кальция важен для поддержания прогрессивной подвижности и функционирования сперматозоидов [42], особенно для акросомальной реакции и гиперактивации [47–49]. Все эти процессы крайне важны для нормального оплодотворения ооцита. Авторы также проводили изучение катионного канала сперматозоидов – CatSper, состоящего из белков катионных каналов, экспрессируемых исключительно в зрелых мужских половых клетках. В экспериментах с самцами мышей было показано, что канал CatSper важен для мужской фертильности: животные с дефицитом CatSper и мужчины с мутациями в гене *CatSper* бесплодны из-за отсутствия гиперактивации сперматозоидов [50, 51]. Авторы изучили механизм, с помощью которого ВВ регулируют передачу сигналов кальция в эякуляте человека с акцентом на участие канала CatSper. Для оценки влияния экзосом на подвижность сперматозоидов выделяли семенную плазму с ВВ и семенную плазму без экзосом. Паттерны движения сперматозоидов оценивали с помощью системы компьютерного анализа CASA (WLJY-9000, WeiLi. Co., Ltd., Китай). Регистрировали общую подвижность, прогрессивную подвижность (PR), криволинейную скорость (VCL), прямолинейную скорость (VSL), среднюю скорость движения (VAP), линейность (LIN) и другие параметры сперматозоидов [42]. Анализатор Flow NanoAnalyzer и вестерн-блоттинг показали присутствие универсальных маркеров экзосом CD9 и CD63 во взвеси выделенных ВВ из СП. Трансмиссионная электронная микроскопия также подтвердила, что экзосомы содержали липидный бислой и выглядели как круглые частицы в ожидаемом диапазоне размеров экзосом. В своей работе X. Zhang et al. показали, что добавление экзосом в культуральную среду со сперматозоидами значительно усиливает их гиперактивацию посредством кальциевого канала CatSper. Кроме того, способность сперматозоидов проникать в искусственную вязкую среду (модель среды женского репродуктивного тракта – 1% метилцеллюлоза) – еще один параметр, связанный с гиперактивацией сперматозоидов, – усиливалась после добавления ВВ и снижалась ингибитором CatSper Mi [42].

С учетом того, что ВВ улучшают подвижность сперматозоидов и их функциональную активность посредством передачи сигналов ионов кальция, X. Zhang et al. дополнительно исследовали потенциальное клиническое применение ВВ из СП. Авторы обнаружили, что повышение концентрации ионов (Ca^{2+})_i было значительно ниже в пробах экзосом, полученных из семенной жидкости пациентов с астенозооспермией, чем в СП пациентов с нормозооспермией. Общая подвижность сперматозоидов, прогрессивная подвижность, параметры VCL, VSL и VAP были заметно выше в интактной семенной плазме с нормальными показателями эякулята, чем в семенной плазме без экзосом, выделенных и удаленных при подготовке эксперимента. В соответствии с этими результатами ВВ у мужчин с нормозооспермией улучшали прогрессивную

подвижность и способствовали проникновению и движению в вязкой среде сперматозоидов от пациентов с астенозооспермией. Авторы показали, что ВВ из СП частично восстанавливают подвижность и функции сперматозоидов у пациентов с нарушениями секреции и специфического функционирования везикул семенной плазмы [33, 52].

Заключение

Физиологическое значение внеклеточных везикул, выделенных из семенной плазмы, для регуляции функции сперматозоидов остается интересной и сложной темой. Экзосомы вместе с другими компонентами семенной плазмы и жидкостями женских половых путей могут изменять показатели сперматозоидов, необходимые для оплодотворения. Развитие омиксных технологий в медицине позволит идентифицировать биомаркеры, связанные с дисфункцией внеклеточных везикул эякулята, влияющих на мужскую фертильность.

Немногочисленные протеомные исследования показали изменения экспрессии экзосомальных белков у пациентов с патозооспермией. Эти работы служат основой для изучения роли экзосомальных белков и внеклеточных везикул в определенных состояниях, связанных с мужским бесплодием. Доступные в настоящее время молекулярные маркеры способны идентифицировать причину мужского бесплодия, но идентификация экзосомальных маркеров еще больше повысит понимание дефектов сперматозоидов в результате дисфункции дополнительных половых органов и желез. Использование внеклеточных везикул семенной плазмы в клинических условиях может значительно повысить успех программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, и особенно это касается случаев, где причиной отсутствия беременности является нарушение сперматогенеза.

Литература/References

1. *Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;14(4):27066. DOI: 10.3402/jev.v4.27066.
2. *Park KH, Kim BJ, Kang J, Nam TS, Lim JM, Kim HT et al.* Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Sci Signal.* 2011;4(173):ra31. DOI: 10.1126/scisignal.2001595.
3. *Schjenken JE, Robertson SA.* The female response to seminal fluid. *Physiol Rev.* 2020;100(3):1077–117. DOI: 10.1152/physrev.00013.2018.
4. *Verze P, Cai T, Lorenzetti S.* The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol.* 2016;13(7):379–86. DOI: 10.1038/nrurol.2016.89.
5. *Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP et al.* Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):7290–304. DOI: 10.1093/nar/gku347.
6. *Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krahlting M et al.* The CatSper channel: A polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.* 2012;31(7):1654–65. DOI: 10.1038/emboj.2012.30.
7. *Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A.* The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):41. DOI: 10.1186/s12958-018-0358-6.
8. *Agarwal A, Ayaz A, Samanta L, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM et al.* Comparative proteomic network signatures in seminal plasma of infertile men as a function of reactive oxygen species. *Clin Proteomics.* 2015;12(1):23. DOI: 10.1186/s12014-015-9094-5.
9. *Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA.* Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update.* 2016;22(2):182–93. DOI: 10.1093/humupd/dmv055.
10. *Andersen JM, Herning H, Witczak O, Haugen TB.* Anti-Müllerian hormone in seminal plasma and serum: Association with sperm count and sperm motility. *Hum Reprod.* 2016;31(8):1662–7. DOI: 10.1093/humrep/dew121.
11. *Yang C, Guo WB, Zhang WS, Bian J, Yang JK, Zhou QZ et al.* Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma. *Andrology.* 2017;5(5):1007–15. DOI: 10.1111/andr.12412.
12. *Wu Y, Yuan Y, Chen L, Wang M, Yang Y, Wang Y et al.* Quantitative proteomic analysis of human seminal plasma from normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2735038. DOI: 10.1155/2019/2735038.
13. *García-Rodríguez A, de la Casa M, Peinado H, Gosálvez J, Roy R.* Human prostasomes from normozoospermic and non-normozoospermic men show a differential protein expression pattern. *Andrology.* 2018;6(4):585–96. DOI: 10.1111/andr.12496.
14. *Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP.* Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol.* 2014;11(5):278–88. DOI: 10.1038/nrurol.2014.74.
15. *Szczykutowicz J, Kaluza A, Kaźmierowska-Niemczuk M, Ferens-Sieczkowska M.* The potential role of seminal plasma in the fertilization outcomes. *Biomed Res Int.* 2019;2019:5397804. DOI: 10.1155/2019/5397804.
16. *Dias TR, Samanta L, Agarwal A, Pushparaj PN, Panner Selvam MK, Sharma R.* Proteomic signatures reveal differences in stress response, antioxidant defense and proteasomal activity in fertile men with high seminal ROS levels. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):203. DOI: 10.3390/ijms20010203.
17. *Candenas L, Chianese R.* Exosome composition and seminal plasma proteome: A promising source of biomarkers of male infertility. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7022. DOI: 10.3390/ijms21197022.
18. *Drake RR, White KY, Fuller TW, Igwe E, Clements MA, Nyalwidhe JO et al.* Clinical collection and protein properties of expressed prostatic secretions as a source for biomarkers of prostatic disease. *J Proteomics.* 2009;72(6):907–17. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.01.007.

19. Dacheux JL, Dacheux F, Druart X. Epididymal protein markers and fertility. *Anim Reprod Sci.* 2016;169:76–87. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.034.
20. Rolland AD, Lavigne R, Daully C, Calvel P, Kervarrec C, Freour T et al. Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod.* 2013;28(1):199–209. DOI: 10.1093/humrep/des360.
21. Camargo M, Intasqui P, Bertolla RP. Understanding the seminal plasma proteome and its role in male fertility. *Basic Clin Androl.* 2018; 28:6. DOI: 10.1186/s12610-018-0071-5.
22. Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics.* 2017;162:125–34. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.08.018.
23. Murdica V, Cermisoni GC, Zarovni N, Salonia A, Viganò P, Vago R. Proteomic analysis reveals the negative modulator of sperm function glycodelin as over-represented in semen exosomes isolated from asthenozoospermic patients. *Hum Reprod.* 2019;34(8):1416–27. DOI: 10.1093/humrep/dez114.
24. Murdica V, Giacomini E, Alteri A, Bartolacci A, Cermisoni GC, Zarovni N et al. Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. *Fertil Steril.* 2019;111(5):897–908. e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.01.030.
25. Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR et al. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate.* 2003;56(2):150–61. DOI: 10.1002/pros.10255.
26. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 2006;7(5):R40. DOI: 10.1186/gb-2006-7-5-r40.
27. Aalberts M, van Dissel-Emiliani FM, van Adrichem NP, van Wijnen M, Wauben MH, Stout TA et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biol Reprod.* 2012;86(3):82. DOI: 10.1095/biolreprod.111.095760.
28. Panner Selvam MK, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Gupta S, Dias TR et al. Protein fingerprinting of seminal plasma reveals dysregulation of exosome-associated proteins in infertile men with unilateral varicocele. *World J Mens Health.* 2021;39(2):324–37. DOI: 10.5534/wjmh.180108.
29. Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato T, Iwamoto T. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *J Androl.* 2007;28(6):858–65. DOI: 10.2164/jandrol.107.002824.
30. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010. 271 p.
31. Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online.* 2018;36(3):327–39. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.12.005.
32. Liu X, Wang W, Zhu P, Wang J, Wang Y, Wang X et al. In-depth quantitative proteome analysis of seminal plasma from men with oligoasthenozoospermia and normozoospermia. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(4):467–79. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.06.025.
33. Giacomini E, Ura B, Giolo E, Luppi S, Martinelli M, Garcia RC et al. Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men. *Reprod Biomed Online.* 2015;30(5):522–31. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.01.010.
34. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *Biomed Res Int.* 2018;2018:8545347. DOI: 10.1155/2018/8545347.
35. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;3:3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
36. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles.* 2013;10:2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19861.
37. Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1152–62. DOI: 10.1172/JCI81129.
38. Caballero J, Frenette G, d'Amours O, Belleannee C, Lacroix-Pepin N, Robert C et al. Bovine sperm raft membrane associated glioma pathogenesis-related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. *J Cell Physiol.* 2012;227(12):3876–86. DOI: 10.1002/jcp.24099.
39. Ebert B, Kisiela M, Maser E. Human DCXR—another “moonlighting protein” involved in sugar metabolism, carbonyl detoxification, cell adhesion and male fertility? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015;90(1):254–78. DOI: 10.1111/brv.12108.
40. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):193–208. DOI: 10.1007/s00018-017-2595-9.
41. Baskaran S, Panner Selvam MK, Agarwal A. Exosomes of male reproduction. *Adv Clin Chem.* 2020;95:149–63. DOI: 10.1016/bs.acc.2019.08.004.
42. Zhang X, Song D, Kang H, Zhou W, Chen H, Zeng X. Seminal plasma exosomes evoke calcium signals via the CatSper channel to regulate human sperm function. *BioRxiv.* 2020.2020.05.21.094433. DOI: 10.1101/2020.05.21.094433.
43. Noda T, Ikawa M. Physiological function of seminal vesicle secretions on male fecundity. *Reprod Med Biol.* 2019;18(3):241–6. DOI: 10.1002/rmb2.12282.
44. Du J, Shen J, Wang Y, Pan C, Pang W, Diao H et al. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget.* 2016;7(37):58832–47. DOI: 10.18632/oncotarget.11315.
45. Lin Y, Liang A, He Y, Li Z, Li Z, Wang G et al. Proteomic analysis of seminal extracellular vesicle proteins involved in asthenozoospermia by iTRAQ. *Mol Reprod Dev.* 2019;86(9):1094–105. DOI: 10.1002/mrd.23224.
46. Abu-Halima M, Ludwig N, Hart M, Leidinger P, Backes C, Keller A et al. Altered micro-ribonucleic acid expression profiles of extracellular microvesicles in the seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2016;106(5):1061–9.e3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.06.030.

47. *Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M.* Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl.* 2017;19(1):5–14. DOI: 10.4103/1008-682X.167716.
48. *Batruch I, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP et al.* Analysis of seminal plasma from patients with non-obstructive azoospermia and identification of candidate biomarkers of male infertility. *J Proteome Res.* 2012;11(3):1503–11. DOI: 10.1021/pr200812p.
49. *Chung JJ, Miki K, Kim D, Shim SH, Shi HF, Hwang JY et al.* CatSperzeta regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *Elife.* 2017;6:e23082. DOI: 10.7554/eLife.23082.
50. *Lishko PV, Mannowetz N.* CatSper: A unique calcium channel of the sperm flagellum. *Curr Opin Physiol.* 2018;2:109–13. DOI: 10.1016/j.cophys.2018.02.004.
51. *Mannowetz N, Miller MR, Lishko PV.* Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(22):5743–8. DOI: 10.1073/pnas.1700367114.
52. *Tamessar CT, Trigg NA, Nixon B, Skerrett-Byrne DA, Sharkey DJ, Robertson SA et al.* Roles of male reproductive tract extracellular vesicles in reproduction. *Am J Reprod Immunol.* 2021;85(2):e13338. DOI: 10.1111/aji.13338.

Информация об авторах

Анастасия Павловна Сысоева – эмбриолог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Наталья Петровна Макарова – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Елизавета Евгеньевна Краева – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Author information

Anastasia P. Sysoeva – Clinical Embryologist, Professor B.V. Leonov Department of Assistive Technologies in the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia. <https://orcid.org/0000-0002-6502-4498>

Natalia P. Makarova – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Professor B.V. Leonov Department of Assistive Technologies in the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia. <https://orcid.org/0000-0003-1396-7272>

Elizabeth E. Kraevaya – Cand. Sci. (Med.), Junior Researcher, Professor B.V. Leonov Department of Assistive Technologies in the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia. <https://orcid.org/0000-0002-8140-0035>