

**На правах рукописи**

**СЫСОЕВА**

**Анастасия Павловна**

**ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ  
ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ НА  
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК**

**1.5.22 - Клеточная биология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Москва – 2023**

Диссертация выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

**Макарова Наталья Петровна** — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова Института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

**Официальные оппоненты:**

**Курило Любовь Федоровна** — доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова».

**Боголюбов Сергей Владимирович** — кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лечебно-диагностического отделения вспомогательных репродуктивных технологий ГНЦ РФ ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета (24.1.204.02) Федерального государственного бюджетного учреждения Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. академика Б.В. Петровского» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. академика Б.В. Петровского» и на сайте <https://www.med.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета 24.1.204.02,  
кандидат биологических наук

Наталия Борисовна Тихонова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

В последние годы интерес к межклеточной коммуникации заметно возрос, поскольку растет понимание сложности ее вклада в различные процессы в организме человека, включая регуляцию пролиферации клеток, их дифференцировку, гамето- и эмбриогенез, а также множество патологических процессов. В частности, обнаружение внеклеточных везикул (ВВ) как новых медиаторов межклеточных коммуникаций, усилило интерес исследователей как к этим структурам, так и к их функциям в различных системах органов человека. Участие ВВ в гаметогенезе, имплантации и в раннем развитии эмбриона успешно изучается последние несколько лет на животных моделях (Burns et al., 2014; Kharazi et al., 2020). Безусловно, появляются работы и на биологическом материале человека, в частности в области гамето- и раннего эмбриогенеза (Zhang et al., 2021). Однако в силу существенных физиологических и этических трудностей, такие события как дистантное взаимодействие гамет, механизмы привлечения яйцеклеткой сперматозоида, селекции наиболее перспективного сперматозоида, а также молекулярные и структурные процессы и изменения, происходящие в маточных трубах женщины *in vivo*, не удалось полноценно описать до сих пор.

Возрастные изменения организма влекут за собой снижение функциональной активности клеток, наиболее ярко выраженной в репродуктивной системе. Для этих процессов характерна специфическая серия событий, таких как геномная нестабильность, эпигенетические изменения, митохондриальная дисфункция, истощение стволовых клеток и клеточное старение, влияющие на клеточную физиологию (Zhou et al., 2021). Старший репродуктивный возраст (СРВ) ( $\geq 35$  лет) влияет на фертильный потенциал женщины и характеризуется изменениями белков, мРНК и некодирующих РНК внутри фолликула яичника. Состав ВВ фолликулярной жидкости (ФЖ) может предоставить информацию о качестве женских половых клеток, различных патологических состояниях половой системы и отражать репродуктивную способность пациенток, а также влиять на активацию сперматозоидов в маточных трубах (Ferraz et al., 2019).

Для решения вопроса улучшения исходов программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий чрезвычайно важно понимание процессов оплодотворения, дробления и бластуляции на ранних этапах развития эмбриона человека. Без внедрения новых технологий, связанных с безопасным культивированием эмбрионов человека и оценкой гамет, невозможно приблизиться к решению задачи. Только получение фундаментальных знаний о морфологических, генетических, функциональных особенностях гамет человека позволит оптимизировать и индивидуализировать программы экстракорпорального оплодотворения и культивирования эмбрионов человека *in vitro*, а также позволит выработать критерии оценки качества половых клеток, протоколов стимуляции суперовуляции и рождения здоровых детей.

В связи с вышеизложенным, крайне актуален научно обоснованный подход к морфологической и функциональной оценке мужских половых клеток, чтобы программа культивирования эмбрионов привела к рождению здорового ребенка и разработка методик, повышающих шансы на успешное оплодотворение *in vitro* для пар СРВ, страдающих бесплодием. Использование ВВ ФЖ молодых фертильных доноров может стать одним из решений этой проблемы. Анализ влияния ВВ ФЖ на подвижность сперматозоидов поможет повысить эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий с фактором мужского бесплодия за счет улучшения характеристик сперматозоидов у пациентов с астенозооспермией и увеличения оплодотворяющей способности сперматозоидов.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Изучение ФЖ и ее влияние на сперматозоиды началось еще в конце прошлого века. Однако данные о взаимодействии и эффектах на сперматозоиды оставались неполными и противоречивыми. В конце прошлого века было установлено, что овуляторные процессы у млекопитающих, в том числе и у человека, стимулируют движение сперматозоидов по маточным трубам благодаря хемоаттрактантам, выделяемым ооцитом и клетками кумулюса (Manor et al., 1994). Также было установлено, что хемоаттрактантный эффект ФЖ из отдельного фолликула связан с успешным оплодотворением яйцеклетки из того же фолликула (Jeon V.G. et al., 2001).

С открытием ВВ стали ясны многие механизмы регуляции в организме человека, в том числе и в репродуктивной системе. ВВ ФЖ и их роль в оогенезе были описаны у многих видов млекопитающих. Впервые исследование ВВ ФЖ было проведено на кобылах в 2012 году (da Silveira et al., 2012). Исследователи предположили, что ФЖ содержит биоактивные факторы, которые могут быть маркерами качества ооцитов, а также влиять на их рост и созревание. Особое внимание уделялось миРНК, учитывая её значимость в регуляции генной транскрипции. Были установлены различия в составе ВВ и миРНК ФЖ у старых и молодых особей (da Silveira et al., 2012). Первое исследование миРНК в ФЖ человека, выполненное в 2013 году, обнаружило более 30 вариантов миРНК и показало не только изменение экспрессии миРНК у пациенток разного возраста, но и включение разных миРНК на разных стадиях созревания ооцита и их критическую роль в фолликулогенезе и оплодотворении (Zhang et al., 2021). Результаты недавних исследований показали, что некоторые миРНК влияют на концентрацию прогестерона (Machtinger et al., 2017).

В репродуктивной системе ВВ играют огромную роль в созревании мужских и женских гамет, процессах оплодотворения, эмбриогенезе и имплантации (Machtinger et al., 2017). ВВ ФЖ играют ключевую роль не только в поддержании качества ооцитов и развитии эмбриона, но и в индукции капацитации, гиперактивации сперматозоидов, акросомальной реакции и стимулировании оплодотворения в репродуктивных путях млекопитающих, в том числе, человека. (Marín-Briggiler et al., 2021; Hasan et al., 2021; Syssoeva et al., 2021). За последние несколько лет был достигнут большой прогресс в

понимании процесса хемотаксиса сперматозоидов и обнаружено большое количество хемоаттрактантов, включающих белки с молекулярной массой 1–20 кДа, гормоны (прогестерон, окситоцин, адреналин и т.д.) Большинство исследований предполагают, что именно прогестерон ответственен за усиление функции сперматозоидов и индукцию акросомной реакции (Keyser et al., 2021). Однако долгое время поиск мембранных рецепторов сперматозоидов, ответственных за эффекты прогестина и других стероидов, не завершался успехом. Эксперименты на мышинных сперматозоидах, где было показано, что обработанные прогестероном сперматозоиды приобретали необходимые для оплодотворения характеристики (запускалась гиперактивация, капацитация и происходили изменения мембраны акросомы) и успешней достигали ооцит и проникали через блестящую оболочку по сравнению с интактными сперматозоидами доказали важность участия прогестерона в оплодотворении как *in vivo*, так и *in vitro*. Открытие в 2011 году двумя независимыми командами ученых (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011), что быстрое увеличение содержания  $Ca^{2+}$  в сперматозоидах человека, вызванное прогестероном, в организме человека опосредовано спермоспецифическим кальциевым каналом CatSper. Эти результаты открыли новые перспективы исследования в этой области.

Липиды являются важной энергетической поддержкой растущего ооцита: участвуют в построении мембраны, регулируют клеточный цикл и выживаемость, злокачественную трансформацию и апоптоз (Zhang, X. et al., 2020). На данный момент научная литература имеет крайне мало информации о влиянии липидов, которые могут переноситься ВВ ФЖ на функциональные характеристики сперматозоидов. Несмотря на быстрый темп развития новых методов изучения функционирования репродуктивной системы млекопитающих и особенностей взаимодействия гамет, а также высокую необходимость и актуальность данных исследований в современном мире, до сих пор остаются мало изучены фундаментальные и специфические особенности процессов оплодотворения и начальных этапов эмбрионального развития человека.

### **Цель исследования**

Установить влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на изменение подвижности и гиперактивации, а также морфофункциональные характеристики сперматозоидов человека в условиях *in vitro*.

### **Задачи исследования**

1. Описать и охарактеризовать внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости женщин.
2. Изучить особенности процесса взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости и мужских половых клеток с помощью электронно-микроскопического исследования и флуоресцентного анализа.
3. Проанализировать и охарактеризовать влияние внеклеточных везикул на показатели подвижности и гиперактивацию сперматозоидов *in vitro*.
4. Выявить оптимальные условия культивирования внеклеточных везикул фолликулярной жидкости со сперматозоидами человека и подобрать

условия культивирования внеклеточных везикул фолликулярной жидкости для пациентов с патозооспермией.

5. Исследовать различия влияния внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин молодого и старшего репродуктивного возраста на характеристики сперматозоидов и оценить взаимосвязь между возрастом женщины и изменением профилей миРНК фолликулярной жидкости.
6. Проанализировать уровни прогестерона как хемоаттрактанта в образцах внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин молодого и старшего репродуктивного возраста.
7. Идентифицировать липиды и описать протеомный состав в образцах внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разного репродуктивного возраста с помощью масс-спектрометрического анализа.
8. На основании изученных процессов разработать новый метод улучшения функциональных характеристик сперматозоидов для использования в клинической практике в программах ВРТ.

### **Научная новизна**

На основании проведенного исследования представлены и научно обоснованы новые данные об особенностях взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с мужскими половыми клетками. В литературных источниках на данный момент имеются схожие данные только на животных моделях, на сперматозоидах человека представленные результаты описаны впервые.

Подобраны оптимальные условия инкубирования сперматозоидов с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости, необходимые для приобретения оплодотворяющей способности, но не допускающие преждевременной акросомальной реакции. Выявлен и проанализирован характер и механизм взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с мембраной сперматозоида, а также установлено достоверное изменение характера их подвижности и гиперактивация.

Впервые проведена комплексная оценка значимых характеристик (концентрации и размеров), липидного и протеомного состава внеклеточных везикул и их изменения, связанные с возрастом женщины, которые в свою очередь, могут влиять на взаимодействие со сперматозоидами и приобретение ими оплодотворяющей способности в маточных трубах. Обнаружены липиды, которые необходимы для перестройки мембраны сперматозоида при подготовке к оплодотворению, поступающие исключительно из везикул фолликулярной жидкости при попадании ооцита с фолликулярной жидкостью во время овуляции. Проанализированы несколько миРНК (*mir-21-5p*, *mir-888-5p*, *mir-424-3p*, *mir-214-3p*, *mir-190b5p*, *mir-134-5p*), играющих значимую роль в функционировании и возрастных изменениях репродуктивной системы женщин. Найдена связь уровня экспрессии миРНК внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разных возрастных групп и изменения их взаимодействия со сперматозоидами.

Впервые установлено, что прогестерон, главный хемоаттрактант сперматозоидов млекопитающих, может находиться в фолликулярной

жидкости не только в свободном состоянии, но и связанным с везикулами. Уровень везикулярного прогестерона значительно ниже (в 6,6 раз) в группе женщин старшего репродуктивного возраста. Получены уникальные данные о понимании фундаментальных процессов взаимодействия гамет, «выбора» ооцитом единственного сперматозоида для оплодотворения и разработаны эффективные методы с использованием очищенных фракций внеклеточных везикул фолликулярной жидкости для улучшения исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий с мужским фактором бесплодия, приближенных к естественным условиям оплодотворения.

### **Научно-практическая значимость**

Выявленные особенности взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости со сперматозоидами позволяют не только расширить понимание фундаментальных процессов оплодотворения человека и более глубоко понять механизмы и участие фолликулярной жидкости в привлечении и запуске гиперактивации и капацитации, но и дополнить необходимые критерии оценки максимального оплодотворяющего потенциала сперматозоидов в программе вспомогательных репродуктивных технологий. Классические методы подготовки спермы (swim up и центрифугирование в градиенте плотности) недостаточно эффективны для получения популяций сперматозоидов с наиболее высоким оплодотворяющим потенциалом, так как выделение только живых и подвижных сперматозоидов не является физиологическими и не моделируются строгими процессами отбора сперматозоидов в женских репродуктивных путях.

Благодаря полученным научным данным, разработаны новые подходы для оптимизации эмбриологического этапа программ вспомогательных репродуктивных технологий, такие как, использование модифицированной чашки Петри для имитации дифференциального хемотаксиса с помощью внеклеточных везикул фолликулярной жидкости для селекции сперматозоидов и повышение подвижности, запуск гиперактивации и улучшение оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Таким образом, в данной работе показана значимость изучения молекулярно-биологических взаимодействий сперматозоидов с везикулами фолликулярной жидкости с помощью современных электронно-микроскопических и омиксных методов для дальнейшего внедрения полученных знаний в клиническую практику. В работе апробирована технология сокультивирования сперматозоидов с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости.

### **Методология и методы исследования**

Пациенты-доноры биологического материала, сперматозоидов и фолликулярной жидкости, проходили полное обследование на базе ФГБУ «НМИЦ АГП имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. Проведение исследования было одобрено на заседании этического комитета. Все доноры подписали добровольное информированное согласие на использование биологического материала в научных целях.

Методология исследования основана широким и последовательном микроскопическом, метаболомном и молекулярно-генетическом анализе: выделение ВВ ФЖ методом последовательного дифференциального центрифугирования, инкубирование сперматозоидов с ВВ ФЖ женщин разного репродуктивного возраста, оценка подвижности и гиперактивации сперматозоидов с помощью компьютерного анализатора CASA (MICROOPTIC®), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) и флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов после сокультивирования с ВВ ФЖ, анализ траектории наночастиц (NTA-анализ) для определения концентрации и размеров ВВ ФЖ женщин разных возрастных групп, оценка липидного и протеомного профиля выделенных фракций ВВ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии миРНК в составе ВВ ФЖ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии и флуоресцентного окрашивания обнаружено связывание внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с мембраной сперматозоидов человека преимущественно с областью шейки. Выявлены возрастные отличия морфологических картин связывания: внеклеточные везикулы молодых женщин связываются активнее по сравнению с пациентками позднего репродуктивного возраста.
2. Сокультивирование сперматозоидов с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости статистически значимо увеличивает общий процент подвижных сперматозоидов (с  $21,30\% \pm 10,3$  до  $47,60\% \pm 8,2$  для 60 мин, с  $22,78\% \pm 11,3$  до  $32,67\% \pm 8,1$  для 30 мин,  $p < 0,05$ ). Процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов при сокультивировании с внеклеточными везикулами молодых женщин значимо выше по сравнению с возрастными (с  $27,52\% \pm 10,4$  до  $44,79\% \pm 10,0$  для молодых, с  $27,5\% \pm 10,4$  до  $32,24\% \pm 9,3$  для женщин СРВ,  $p < 0,05$ ).
3. Дифференцированная по возрасту женщины активация сперматозоидов при сокультивировании с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости обусловлена их молекулярно-генетическим составом: у женщин молодого возраста в 6,6 раз больше концентрация везикулярного прогестерона, снижена экспрессия регуляторных миРНК, повышены суммарные уровни основных групп липидов, показано присутствие в протеомном составе внеклеточных везикул фолликулярной жидкости не только маркерных молекул, но и специфических белков, участвующих в активации сперматозоидов в репродуктивных путях женщины.

#### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность результатов обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования и их решением, использованием комплекса современных молекулярных, электронно-микроскопических и омиксных методов, достаточным объемом данных для каждой модели исследования, адекватным применением методов статистического анализа,



критической оценкой полученных результатов при сравнении их с данными современной литературы.

Основные положения диссертационной работы доложены на XXXI Международной конференции РАРЧ (Сочи, 2021), XXXII Международной конференции РАРЧ (Казань, 2022), а также на XIV Международном конгрессе КАРМ–2022 (Астана, 2022). Также материалы, представленные к защите, были доложены в рамках XXIII Всероссийского научно-образовательного форума «Мать и дитя–2022» на конгрессе «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (ЛАБРИН–2022) «Цифровая трансформация: современный тренд в лабораторной диагностике» (Москва, 2022), Всероссийском конгрессе «Право на жизнь – 2023» (Москва, 2023).

В 2022 году результаты полученных исследований были представлены в качестве постерного доклада на ежегодной европейской конференции по репродуктивной медицине ESHRE – 2022 (Милан, 2022) и в 2023 году в виде устного доклада на ESHRE – 2023 (Копенгаген, 2023).

#### **Личное участие автора**

Автор лично принимал участие в выборе научного исследования, разработке цели и задач исследования, сборе материала, планировании и проведении исследования, статистической обработке полученных результатов, анализе и обобщении, формировании выводов диссертационной работы, подготовке публикаций.

#### **Публикации по теме работы**

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ в рецензируемых журналах ВАК (3 статьи как первый автор, 2 в соавторстве), получены два патента на изобретение (Патент №2801339 и Патент №2801117) и опубликовано 5 материалов в сборниках научных трудов конференции.

#### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе эмбриологов отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (руководитель профессор, д.м.н. Калинина Е.А.) и в учебном процессе на курсах повышения квалификации врачей-гинекологов «ВРТ для акушеров-гинекологов с практическим курсом» и клинических эмбриологов «Вспомогательные репродуктивные технологии для эмбриологов с практическим курсом» в Научно-образовательном центре ВРТ им. Фредерика Паулсена (директор института репродуктивной медицины – д.м.н., профессор Назаренко Т.А.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» МЗ РФ (директор — академик РАН Сухих Г.Т.), в лабораторную практику и научный процесс ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии» (руководитель отделения репродуктологии – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор Краснопольская К.В.) и в лабораторную практику, учебный и научный процесс ГБУЗ «ГБУ №31 им. академика Г.М. Савельевой» Департамента здравоохранения города Москвы (руководитель Центра вспомогательных

репродуктивных технологий ГKB №31 им. академика Г.М. Савельевой – д.м.н., профессор Яворовская К.А.)

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена в традиционной форме. Состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, обзора литературы, описания собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа представлена на 141 странице машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками, 3 таблицами. Библиографический указатель включает 124 научные работы.

Научные положения данной кандидатской диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 1.5.22. — Клеточная биология. Результаты исследования соответствуют области исследования специальности, пунктам 1, 2, 7, 8, 19 паспорта специальности.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Получение исследуемого биологического материала (ФЖ, сперматозоиды) проводилось в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. ФЖ получали от пациенток-доноров младшего репродуктивного возраста (20–33 лет),  $n=15$  и от пациенток-доноров СРВ (41–47 лет),  $n=15$  с неоднократными попытками ЭКО, не приводившими к беременности. Все пациентки были без отягощённого анамнеза, вредных привычек, с нормальными показателями индекса массы тела. Овариальная стимуляция была одинаковой для всех женщин. ФЖ была получена во время трансвагинальной пункции фолликулов после отбора ооцит-кумулюсных комплексов для программ ВРТ. Для выделения ВВ из ФЖ использовали метод дифференциального центрифугирования (Краевая и др., 2020). Образцы сперматозоидов были получены от 40 пациентов в возрасте 26–68 лет. В исследование были включены образцы с концентрацией сперматозоидов более 15 млн/мл и с линейной подвижностью более 25%. Все измерения показателей спермы проводили с использованием системы CASA (MICROPTIC).

*Инкубирование сперматозоидов с ВВ ФЖ.* После разжижения эякулята от каждого образца отбирали 1 мл и разводили физиологическим раствором до достижения концентрации  $10^6$  сперматозоидов/мл и инкубировали с ВВ ФЖ (1 объём спермы:2 объёма ВВ ФЖ; 100 мкл спермы:200 мкл ВВ ФЖ) в течение 30, 60 и 120 мин (в зависимости от дальнейшего эксперимента) при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе без покрытия маслом и без добавления культуральных сред. Параллельно инкубировали контрольные образцы в физиологическом растворе без добавления ВВ.

*Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).* После инкубации с ВВ ФЖ часть образцов сперматозоидов осаждали центрифугированием при 700 g в течение 5 мин и фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде на 0,1 М буфере для анализа с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Reichert-Jung Ultracut E,

монтировали на медные сетки, покрытые формваровой плёнкой, контрастировали 1% водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца. Образцы исследовали при мощности 80 кВ с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL).

*Флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов.* На этапе выделения ВВ окрашивали с использованием витального мембранного красителя PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling (Sigma-Aldrich)) в соответствии с протоколом производителя. После инкубирования сперматозоидов с окрашенными ВВ образцы фиксировали на стекле 70% этанолом и окрашивали ядерным красителем DAPI (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. D1306). Изображения визуализировали с помощью конфокального микроскопа ZEISS LSM 710.

*Анализ траектории наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA-анализ) ВВ ФЖ.* Каждый образец выделенных ВВ ФЖ разбавляли непосредственно перед измерением в соответствии с инструкциями производителя. С помощью прибора NanoSight LM10 визуализировали ВВ ФЖ. Количество треков всегда превышало 200; оценку размеров и концентрации проводили для каждого образца. Затем записанные видео анализировали с помощью программного обеспечения NanoSight NTA 3.1 (Malvern, Великобритания).

*Анализ липидов во внеклеточных везикулах фолликулярной жидкости методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС анализ).* Экстракты липидов получали в соответствии с модифицированным методом Фолча. Определение молекулярного состава образцов проводили с помощью хроматомасс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Германия), соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с ЭРИ источником ионов (Bruker Daltonics, Германия). Разделение образцов осуществлялось методом обращенно-фазовой хроматографии.

*Определение мiРНК в ВВ ФЖ.* Из собранных образцов ВВ ФЖ была выделена РНК колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen) с последующим синтезом на ней кДНК в реакционной смеси (20мкл) в соответствии с протоколом miScript® II RT Kit (Qiagen, Germany). Относительный уровень экспрессии анализируемых мкРНК ( $\Delta Ct = Ct(\text{мкРНК}) - Ct(\text{hsa-miR-99b-3p})$ ) вычисляли по разнице пороговых циклов амплификации кДНК искомой и референсной. РНК *hsa-miR-99b-3p* была выбрана в качестве нормировочной ввиду стабильного уровня экспрессии во всех исследуемых образцах.

*Протеомный анализ ВВ ФЖ.* Для приготовления образца для протеомного анализа ВВ ФЖ проходил по стандартному протоколу подготовки к ВЭЖХ-МС. Анализ пептидной фракции проводился на ВЭЖХ-системе Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), соединенной с масс-спектрометром TIMS TOF Pro (Bruker Daltonics, США), с использованием метода сбора данных с помощью параллельного накопления и последовательной фрагментации (PASEF) в режиме DDA (сбор данных в

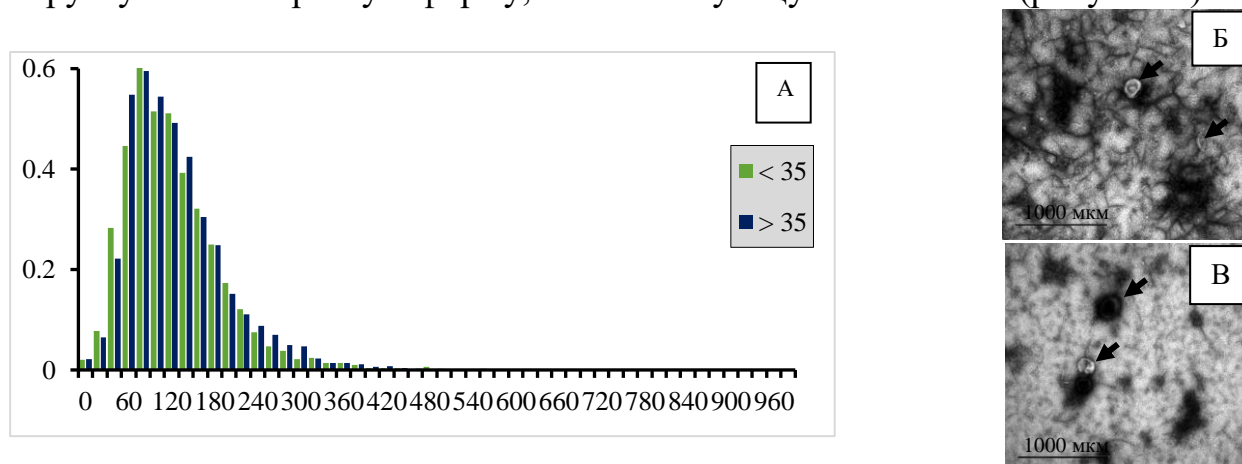
зависимости от данных). Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 8.5.

### Статистическая обработка данных

Статистический анализ выполняли в программах MS Excel и Statistica 10.0. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали в тесте Шапиро-Уилка. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD). Для сравнения данных по изменению подвижности сперматозоидов после инкубации с ВВ ФЖ использовали парный t критерий Стьюдента для зависимых совокупностей с 95% доверительным интервалом. С целью определения статистической значимости различий в профиле экспрессии мРНК в исследуемых группах был выбран непараметрический критерий Манна-Уитни. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы было выполнено выделение и оценка ВВ ФЖ женщин разного возраста. С помощью NTA-анализа показано отсутствие значительных различий в размерах и концентрации ВВ ФЖ в зависимости от возраста женщины: в группе женщин <35 лет концентрация  $3,75 \times 10^{11}$  част./мл  $\pm 0,47$ , SD=0,8, n=14, в группе женщин >35 лет концентрация  $3,7 \times 10^{11}$  част./мл  $\pm 0,6$ , SD=1,036, n=14, средний размер частиц  $138,78 \text{ нм} \pm 9,92$ , SD=17,19 и  $127,03 \text{ нм} \pm 17,17$ , SD=29,7, соответственно. В обеих возрастных группах присутствует большое количество ВВ ФЖ малого и среднего размера от 40 до 200 нм, что соответствует микровезикулам и экзосомам. Вероятно, это связано с тем, что ФЖ для выделения ВВ была отобрана только из доминантного овулирующего фолликула у всех женщин молодого и старшего репродуктивного возраста. Морфологические характеристики ВВ ФЖ между возрастными группами также не различались – ВВ преимущественно имели округлую чашеобразную форму, соответствующую экзосомам (рисунок 1).



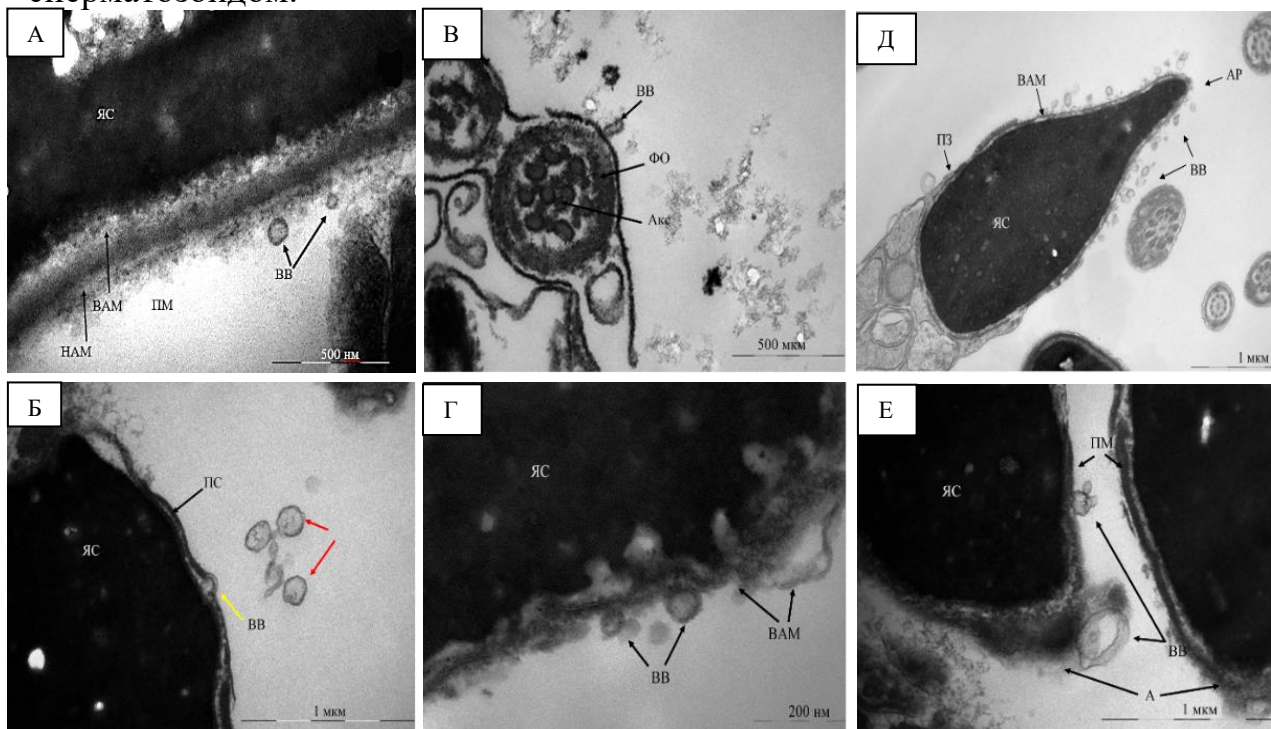
**Рисунок 1.** Гистограмма размеров и концентрации популяций ВВ ФЖ женщин молодого (зеленый цвет) и старшего (синий цвет) репродуктивного возраста с использованием метода NTA (А); ВВ ФЖ

женщины младшего репродуктивного возраста (<35 лет) (Б); и старшего (>35 лет) (В), ТЭМ.

В недавних публикациях появились данные, что количество ВВ ФЖ млекопитающих зависит от размера фолликула, наибольшая концентрация наблюдалась в малых фолликулах. Этот факт можно объяснить тем, что в растущих фолликулах необходимо наибольшее количество активных молекул для поддержания роста ооцита (Neyroud A. S. et al., 2022).

Инкубация постэякуляторных сперматозоидов с фракцией выделенных ВВ ФЖ молодых доноров (1:2 об/об сперматозоидов к ВВ, n=30) в течение 60 минут приводила к высокому проценту связанных с ВВ сперматозоидов. Связывание ВВ обнаруживалось в большей степени в акросомной области головки и в средней части сперматозоида. Связанные ВВ ФЖ не были обнаружены в контрольных образцах. На сперматозоидах человека такое взаимодействие ВВ ФЖ показано впервые (рисунок 2).

Метод ТЭМ показал, что ВВ ФЖ женщин СРВ связываются со сперматозоидами хуже, по сравнению с ВВ ФЖ женщин младше или <35 лет после 60 минут инкубации. В образцах группы СРВ большее количество сперматозоидов осталось с интактной мембраной после инкубации, связывание ВВ наблюдалось у 2-х сперматозоидов из 10-и, тогда как в группе ВВ ФЖ молодых женщин связывание везикул наблюдалось почти с каждым сперматозоидом.

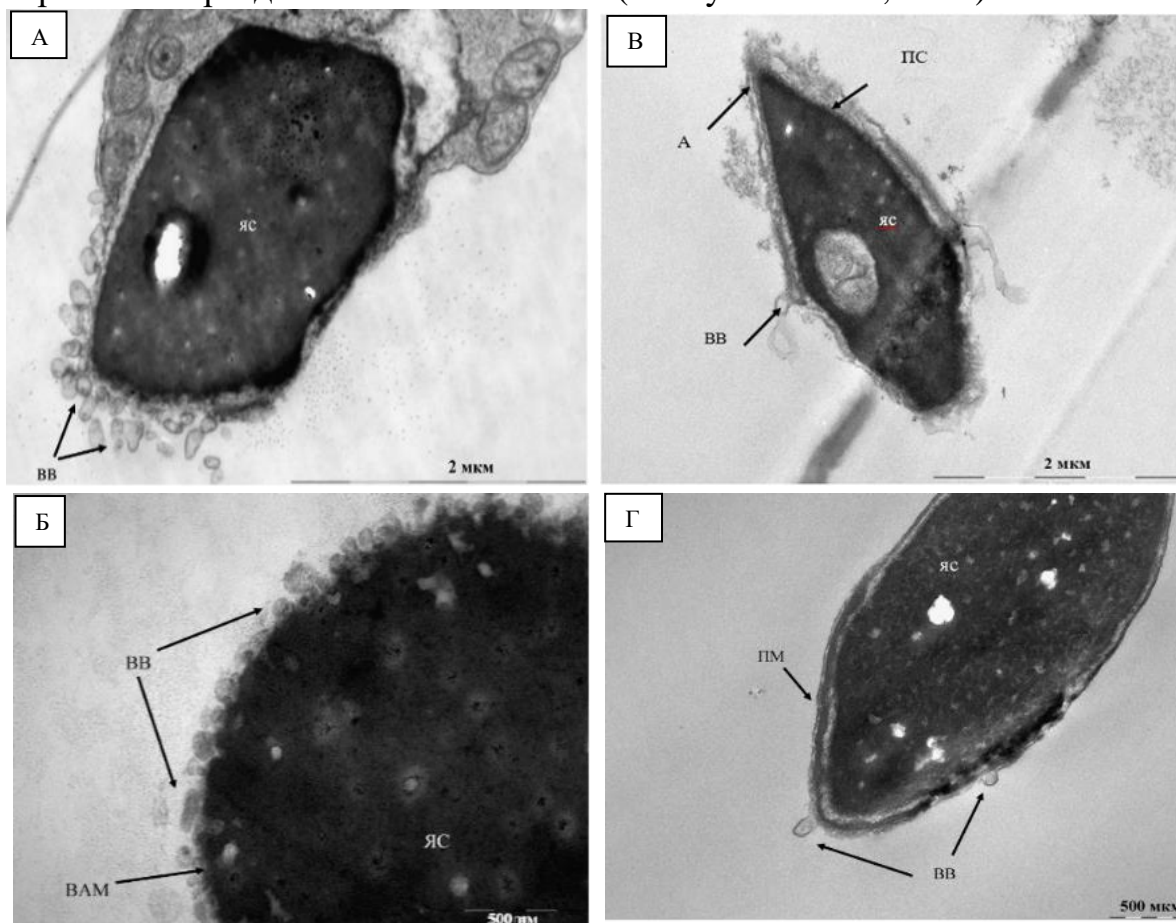


**Рисунок 2. Микрофотографии связывания ВВ ФЖ со сперматозоидами через разные промежутки времени инкубирования, ТЭМ. А, Б — связывание ВВ ФЖ с мембраной сперматозоида через 30 мин после инкубации. Красными стрелками показаны свободные ВВ, желтой — слияние мембран. В, Г — Показано связывание ВВ областью аксонемы сперматозоида, окруженной фиброзной оболочкой и прикрепление ВВ ФЖ к мембране головки сперматозоида (слияние мембран) через 60**



минут инкубирования. Д, Е — Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 60 мин после инкубации, показано прохождение акросомной реакции. А — акросома, АР — акросомная реакция, Акс — аксонема жгутика сперматозоида, ВВ — внеклеточные везикулы, ПМ — плазматическая мембрана, ПЗ — постакросомальная зона, ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана, НАМ — наружная акросомальная мембрана, ФО — фиброзная оболочка, ЯС — ядро сперматозоида

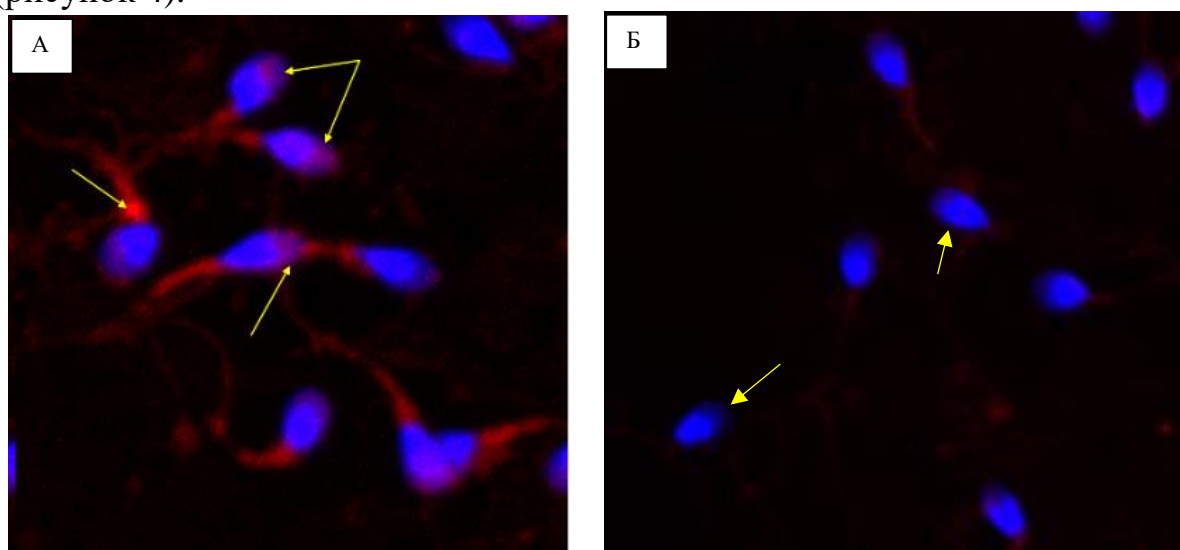
Интересно, что ВВ ФЖ женщин СРВ связываются преимущественно с постакросомальной мембраной сперматозоида, а не с областью акросомы, как в случае с ВВ ФЖ молодых женщин, что может указывать на изменение функционального состава ВВ ФЖ женщин СРВ и целевых областей взаимодействия со сперматозоидами. Показательной является и инкубация 120 минут, при которой в образцах культивирования с ВВ ФЖ молодого возраста у сперматозоидов произошла капацитация и отсутствовала акросома, однако в образцах с ВВ ФЖ женщин СРВ аналогичного эффекта замечено не было (рисунок 3). Эти результаты говорят не только о том, что ВВ ФЖ действительно запускают процессы в сперматозоидах необходимые для оплодотворения, но и о том, что у ВВ ФЖ женщин СРВ такие функции выражены гораздо в меньшей степени (Babayev E. et al., 2022).



**Рисунок 3. Микрофотографии связывания ВВ ФЖ женщин разных возрастных групп со сперматозоидами через 120 минут инкубирования, ТЭМ. А, Б — связывание ВВ ФЖ женщин младшего репродуктивного**

возраста (<35 лет) с внутренней акросомальной мембраной сперматозоида после прохождения акросомной реакции; многочисленные ВВ присоединяются к внутренней акросомальной мембране. В, Г — связывание единичных ВВ ФЖ женщин СРВ (>35 лет) с мембраной сперматозоида, ПМ интактна. А — акросома, ВВ — внеклеточные везикулы, ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана, ПМ — плазматическая мембрана. ЯС — ядро сперматозоида

Также было проведено сокультивирование сперматозоидов с ВВ ФЖ, окрашенных флуоресцентным витальным красителем РКН26. Было показано, что ВВ ФЖ связываются с мембраной сперматозоидов в функционально значимых областях (акросоме и области шейки) и связывание наиболее значимо выражено в группе младше 35 лет, чем в группе женщин СРВ (рисунок 4).

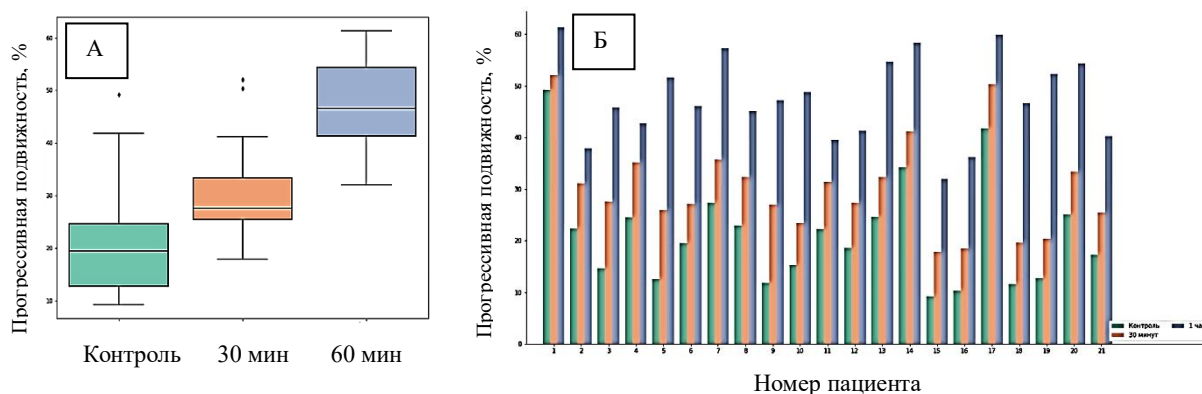


**Рисунок 4. Флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов после инкубации 60 минут с ВВ ФЖ женщин младшего (А) и старшего (Б) репродуктивного возраста. Окрашивание ядра DAPI (синий), окрашивание мембраны ВВ РКН26 (красный) в местах связывания. В группе СРВ сигнал от мембран ВВ (красный) выражен очень слабо по сравнению с молодой возрастной группой.**

Функциональные характеристики сперматозоидов обычно зависят от их прогрессивной подвижности, целостности акросомы и способности претерпевать капацитацию и акросомный экзоцитоз (Брагина Е. Е. и др., 2014; Жуков, О. Б. и др., 2021; Murdica V. et al., 2019). Известно, что ФЖ человека содержит различные биологически активные молекулы, регулирующие не только рост фолликула и созревание ооцита, но и морфофункциональные характеристики сперматозоидов в процессе оплодотворения яйцеклетки в маточной трубе (Getpook C. et al., 2007; Беспалова О.Н. и др., 2023) поддерживая взаимодействие гамет и раннее развитие эмбриона. Инкубация сперматозоидов с ВВ показала больший процент подвижных сперматозоидов (парный *t* критерий Стьюдента,  $p < 0,001$  и  $p = 0,005$  для 30 и 60 мин инкубации соответственно;  $n = 21$ ; среднее значение признака до и после эксперимента —  $21,340 \pm 10,368$  и  $47,602 \pm 8,216$  для 60 мин,  $22,782 \pm 11,308$  и  $32,676 \pm 8,144$  для 30

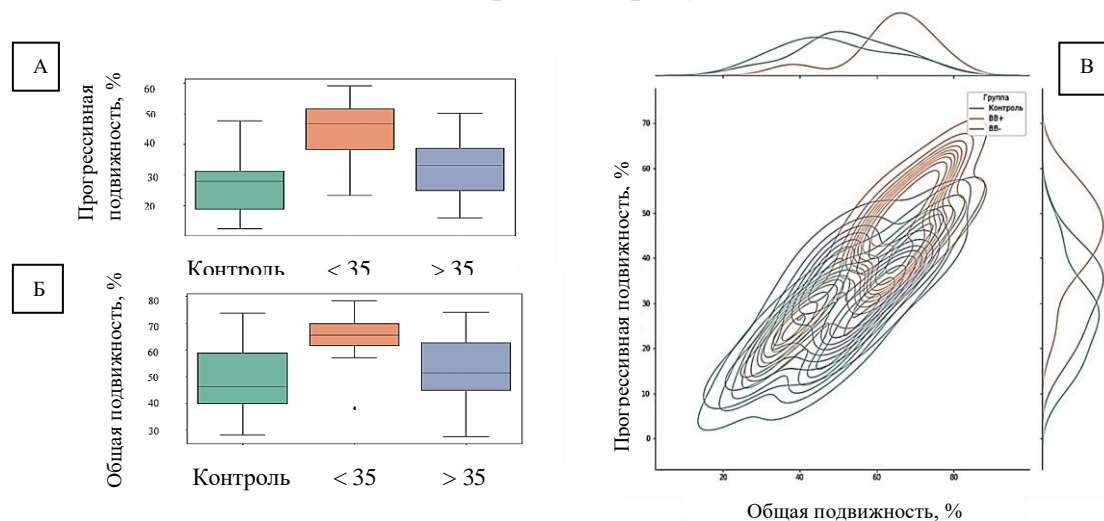
мин инкубации по сравнению с контролем) (рисунок 5А). Изменения были выявлены не только в увеличении общей подвижности, но и в количестве прогрессивно-подвижных сперматозоидов у каждого пациента, особенно выражено через 60 мин инкубации по сравнению с контролем (рисунок 5Б).

Значительное увеличение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов относительно контроля и изменение общей подвижности было, также предположительно связано с усилением гиперактивации сперматозоидов, что подтверждается изменением траектории движения сперматозоидов относительно контроля, полученных с помощью системы CASA (Marín-Briggiler C. et al., 2021).



**Рисунок 5. Статистически значимое увеличение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов через 30 мин и 60 мин инкубации с ВВ ФЖ в сравнении с контролем (А) и по каждому пациенту,  $n=21$  (Б).**

Анализ подвижности сперматозоидов после культивирования с ВВ ФЖ женщин разного возраста показал лучшие результаты увеличения подвижности в случае культивирования с ВВ ФЖ молодых женщин, чем с ВВ ФЖ женщин СВВ (с  $27,52\% \pm 10,4$  до  $44,79\% \pm 10,0$  для молодых, с  $27,5\% \pm 10,4$  до  $32,24\% \pm 9,3$  для женщин СВВ,  $p < 0,05$ ) (рисунок 6).



**Рисунок 6. Достоверное увеличение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов (%) (А) и общей подвижности (%) (Б) через 60 мин**

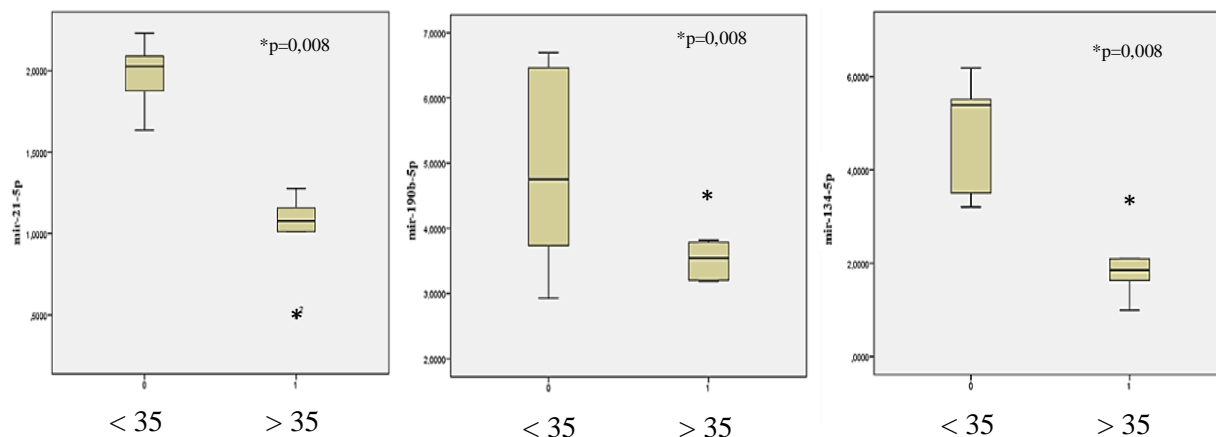


инкубации с ВВ ФЖ женщин молодого репродуктивного возраста в сравнении с контролем и с ВВ ФЖ женщин СРВ ( $p < 0,001$ ) и показатели общей подвижности ( $p = 0,05$ ),  $n = 18$ . Изменение общей подвижности и количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов по всем образцам с ВВ+ (от ФЖ женщин молодого возраста) и ВВ- (от ФЖ женщин СРВ) по сравнению с контролем (В).

Было, также, проанализировано влияние ВВ ФЖ на сперматозоидах пациентов с диагнозом астенозооспермия старшего возраста на небольшой выборке ( $N = 7$ ). Несмотря на увеличение показателей подвижности сперматозоидов (%), количество подвижных сперматозоидов (шт/200 п.зр.) у данных пациентов значительно не возросло. Вероятно, такая тяжелая астенозооспермия может быть связана с возрастными и/или генетическими нарушениями (Ибишев, Х.С. и др., 2019; Zorova, L.D. et al., 2022), и сокультивирование таких образцов с ВВ ФЖ оказывает влияние только на те сперматозоиды, которые сохранили минимальную способность к движению, без серьезных нарушений генома и сигнальных путей сперматозоидов.

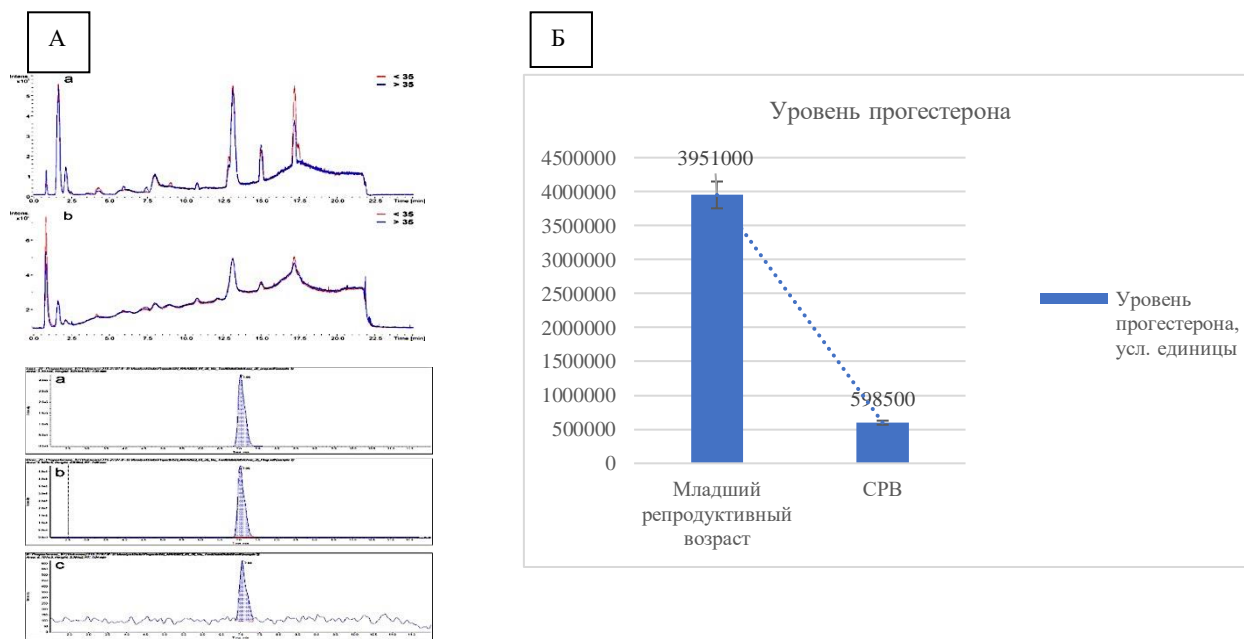
Главной функцией ВВ является перенос биологически активных молекул. В данной работе была изучена экспрессия отдельных миРНК, уровень прогестерона (Р4), липидный и протеомный состав ВВ ФЖ молодых женщин и СРВ, так как содержимое ВВ ФЖ может указывать не только на патологические процессы в женской репродуктивной системе, но и объяснять различия во взаимодействии и влиянии ВВ ФЖ женщин разного репродуктивного возраста на сперматозоиды при естественном оплодотворении.

Для данного исследования было выбрано 6 миРНК (*mir-21-5p*, *mir-888-5p*, *mir-424-3p*, *mir-214-3p*, *mir-190b5p*, *mir-134-5p*), которые, по данным разных авторов, связывают с возрастными изменениями репродуктивной системы женщины, воспалительными и апоптотическими процессами (Shen X. et al., 2017; Martinez R.M. et al., 2019). Результаты показали, что уровень экспрессии *miR-134-5p* ( $p = 0,008$ ), *mir-190b5p* ( $p = 0,008$ ) и *miR-21-5p* ( $p = 0,008$ ) статистически значимо был выше во ВВ ФЖ женщин СРВ, по сравнению с ВВ ФЖ молодых женщин (рисунок 7).



## Рисунок 7. Сравнение профилей миРНК женщин молодого репродуктивного возраста и женщин СРВ.

В результате ЖХ-МС анализа образцов ВВ ФЖ было выявлено, что уровень прогестерона в везикулах от пациентов младше 35 лет (площадь хроматографического пика 3951000 усл. ед.) в 6,6 раза выше уровня прогестерона в везикулах от пациентов старше 35 лет (площадь хроматографического пика 598500 усл. ед.) ( $p < 0,05$ ) (рисунок 8).



**Рисунок 8. А — ВЭЖХ-МС анализ образцов ВВ ФЖ на уровень Р4 двух возрастных групп пациентов (молодых и СРВ) (площадь хроматографического пика – условные единицы), Б — количественная визуализация разницы уровня Р4 (усл. ед.) в образцах женщин младшего репродуктивного возраста и СРВ.**

Поступательная подвижность и гиперактивация являются необходимыми условиями для достижения сперматозоидов ооцита. (Freitas M. J. et al., 2017). Участие спермоспецифического кальцеазависимого канала CatSper в процессе гиперактивации было однозначно продемонстрировано у мышей и у людей (Коробкина Ю. Д. и др., 2023; Machado S. A. et al., 2019). Р4 является одним из основных активаторов CatSper в сперматозоидах человека, его достаточная концентрация в маточных трубах является необходимым условием для оплодотворения. Также Р4 участвует в качестве главного сигнала для выхода сперматозоидов из перешейка маточной трубы (место хранения спермы до оплодотворения), и является основным хемоаттрактантом человека (Mirihagalle S. et al., 2022).

В результате липидомного анализа было идентифицировано 389 липидов и выявлено 23 класса. Наибольшие отличия между группами обнаружены для отдельных эфиров холестерина (СЕ), лизофосфатидилхолинов (LPC), фосфатидилхолинов (РС), церамидов (Сer), ди- и триглицеридов (DG) (TG), фосфатидных кислот (РА) для группы <math>< 35</math> лет и окисленных форм этих липидов (OxLPC, OxPC, OxPE, OxTG) для группы

>35 лет. Суммарные уровни холестерина эфиров, холестерина, лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов, были выше в ВВ ФЖ женщин младшего репродуктивного возраста, а ди- и триглицеридов, моногалактозилдиацилглицеринов, окисленных форм фосфатидилхолинов и церамидов были выше в ВВ ФЖ СРВ. Молекулы липидов в ВВ ФЖ во время оплодотворения могут передавать сигналы для активации и изменения характеристик мужских половых клеток, а также изменять структуру их мембраны во время подготовки к оплодотворению. Некоторые липиды являются кандидатами на роль цитоплазматических мессенджеров, передающих сигналы для активации метаболических процессов и генных экспрессий в ядре сперматозоида (Cordeiro F. et al., 2018). Ряд липидов, в том числе, церамиды, не способны образовываться в сперматозоидах *de novo*, поэтому одним из источников таких молекул могут быть именно ВВ ФЖ (Vaquer C. et al., 2020).

Анализ протеомного состава ВВ ФЖ показал наличие не только маркеров ВВ, но и специфических белков, которые могут быть претендентами на факторы, запускающие процессы капацитации и гиперактивации сперматозоидов в маточных трубах, тем самым подготавливая сперматозоиды к оплодотворению и усиливающие отбор самого компетентного сперматозоида (Таблица 1). Это белки, участвующие в связывании и переносе ионов  $Ca^{2+}$ , необходимого сперматозоидам для улучшения подвижности, фосфолипазы, запускающие акросомную реакцию, G-белки и связанные с ними факторы, необходимые для запуска работы  $Ca^{2+}$ -каналов, активации капацитации и связывания с БО ооцита (Corda P. et al., 2022).

**Таблица 1. Специфические белки ВВ ФЖ, предположительно участвующие в активации капацитации, гиперактивации и подготовке сперматозоидов к оплодотворению в репродуктивных путях женщины.**

Протеиновая группа	Протеин ID	Принадлежность, название	Покрытие, %	Описание
1119	66513	P31323 KAP3_HUMAN	5	cAMP-dependent protein kinase type II-beta
883	59534	P54289 CA2D1_HUMAN	6	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1
1031	59650	Q9Y653 AGR1_HUMAN	6	Adhesion G-protein coupled receptor G1
1228	59541	P78527 PRKDC_HUMAN	11	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
367	59355	P23634 AT2B4_HUMAN	17	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4
1106	60553	O15173 PGRC2_HUMAN	19	Membrane-associated progesterone receptor component 2
559	59522	Q8WUA8 TSK_HUMAN	29	Tsukushi
134	59342	P08133 ANXA6_HUMAN	47	Annexin 1, 2, 4, 5, 6
49	59300	Q08380 LG3BP_HUMAN	51	Galectin-3-binding protein

Был обнаружен мембранный рецептор к прогестерону, который, как показали результаты работы, в большем количестве присутствуют на ВВ ФЖ молодых женщин, и тем самым, имеют больше влияния на активацию сперматозоидов (Jeyendran, R. et al., 2023). Интересным оказалось достаточно большой процент покрытия в образцах белка Tsukushi, который в большом количестве экспрессируется в женских половых путях и напрямую участвует в регуляции активности G-белков (Istiaq A. Et al., 2022).

Полученные результаты работы указывают на то, что степень взаимодействия ВВ ФЖ и сперматозоидов зависит от возраста донора ФЖ и позволяют модифицировать функциональные характеристики мужских гамет. Полученные знания послужили началом разработки новых подходов для совершенствования эмбриологических этапов ВРТ. Одним из таких подходов является использование метода дифференциального хемотаксиса с помощью ВВ ФЖ для селекции сперматозоидов *in vitro* (Патент №2801117, Патент №2801339) в чашке Петри и увеличение подвижности мужских гамет в программах ЭКО с помощью ВВ ФЖ донора.

Таким образом, в процессе данной исследовательской работы было установлено специфическое взаимодействие ВВ ФЖ и мембраны сперматозоидов, а также показано, что сокультивирование с ВВ ФЖ достоверно улучшает показатели подвижности и гипеактивацию сперматозоидов человека *in vitro*. Для более углубленного понимания участия ВВ ФЖ в процессах активации сперматозоидов и дистантном взаимодействии гамет, были изучены профили липидов и мРНК ВВ ФЖ женщин разного репродуктивного возраста, их сравнение, а также протеомный анализ и оценка уровня прогестерона в ВВ ФЖ. Полученные данные позволяют не только более точно понять клеточные и молекулярные основы процесса размножения у человека, но и усовершенствовать условия оплодотворения *in vitro* в программах ВРТ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы показывают, как много факторов участвуют в процессе оплодотворения, и еще многие не известны до сих пор. Показано, что ВВ ФЖ улучшают подвижность, капацитацию и гиперактивацию сперматозоидов, подготавливая их к акросомальной реакции и оплодотворению. Роль ФЖ заключается не только в питании ооцита, но и в повышении функциональных параметров сперматозоидов, опосредованных ВВ. Этот факт дает новые данные о понимании фундаментальных процессов взаимодействия гамет, «выбора» ооцитом единственного сперматозоида для оплодотворения и расширяет наши знания о физиологии размножения. С момента первого исследования ВВ ФЖ в 2012 году было проведено достаточно много исследований об участии ВВ ФЖ в репродуктивных процессах на различных животных моделях. Однако данные о положительном влиянии ВВ ФЖ на функциональную активность и морфологические изменения сперматозоидов во время оплодотворения человека в этой работе получены впервые. Это значительный вклад в биологию области репродукции. Постоянная достаточная концентрация и высокая степень очистки образцов

ВВ ФЖ в совокупности со множеством положительных доказанных эффектов на сперматозоиды человека может сделать использование как аутологичных, так и донорских ВВ ФЖ новым методом для улучшения исходом программ ВРТ.

### ВЫВОДЫ

1. Выделенные ВВ ФЖ имеют разнообразную форму и размер, их концентрация и распределение по размерам не отличалась достоверно между группами: в группе женщин <35 лет концентрация  $3,75 \times 10^{11}$  част./мл $\pm 0,47$ , в группе женщин >35 лет концентрация  $3,7 \times 10^{11}$  част./мл $\pm 0,6$ , средний размер частиц  $138,78 \text{ нм} \pm 9,92$  и  $127,03 \text{ нм} \pm 17,17$ , соответственно. В обеих возрастных группах присутствует большое количество ВВ ФЖ малого и среднего размера от 40 до 200 нм, что соответствует микровезикулам и экзосомам.
2. ВВ ФЖ взаимодействуют с функционально важными частями сперматозоидов человека (область акросомы и шейки). Достоверно лучше происходит связывание ВВ ФЖ молодых женщин с мембраной сперматозоидов, чем ВВ ФЖ женщин СРВ.
3. Показано достоверное улучшение характеристик подвижности сперматозоидов, их гиперактивации и подготовки к акросомной реакции после инкубации с ВВ ФЖ женщин младшего репродуктивного возраста (прогрессивная подвижность изменялась с  $27,52\% \pm 10,4$  до  $44,79\% \pm 10,0$  для молодых, с  $27,5\% \pm 10,4$  до  $32,24\% \pm 9,3$  для женщин СРВ,  $p < 0,05$ ).
4. Подобрано оптимальное и достаточное время инкубирования сперматозоидов и ВВ ФЖ, запускающее гиперактивацию сперматозоидов, не приводящее к преждевременной акросомной реакции — 60 минут.
5. В группе ВВ ФЖ СРВ достоверно повышена экспрессия miR-21-5p, miR-190b5p, miR-134-5p, ( $p = 0,008$ ), участвующих в различных воспалительных и апоптотических возрастных процессах.
6. Уровень прогестерона, связанного с ВВ ФЖ в группе младшего репродуктивного возраста, оказался в 6,6 раз выше, чем в группе СРВ: 3951000 усл. ед. и 598500 усл. ед., соответственно ( $p < 0,05$ ).
7. Суммарные уровни основных групп липидов составе ВВ ФЖ женщин разного репродуктивного возраста статистически значимо различаются ( $p < 0,05$ ). В позднем репродуктивном возрасте показано увеличение в 1,5 раза окисленных форм холестерина, церамидов и фосфатидилхолина. Из 1000 обнаруженных белков протеомного анализа ВВ ФЖ впервые определены белки, которые могут специфически и направлено влиять на функции и оплодотворяющую способность сперматозоидов человека (TSK, LG3BP, PGRC2, AT2B4 и другие).
8. Разработанный метод отбора сперматозоидов для оплодотворения на основе дифференциального хемотаксиса позволяет улучшить исходы

эмбриологического этапа программ ВРТ у пациентов с фактором мужского бесплодия.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

*Статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК рецензируемых научных изданий*

1. Влияние экстраклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики сперматозоидов человека / А.П. Сысоева, Н.П. Макарова, Д.Н. Силачев, Н.Н. Лобанова, Ю.А. Шевцова, Е.Е. Брагина, Е.А. Калинина, Г.Т. Сухих // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2021. - №3. – С. 176-185.
2. Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости с различным профилем миРНК на функциональные свойства сперматозоидов человека / А. П. Сысоева, О.С. Непша, Н. П. Макарова, Д. Н. Силачев, Н. Н. Лобанова, А. В. Тимофеева, Ю. А. Шевцова, Е. Е. Брагина, Е. А. Калинина // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2022. – №2 - С.117-126.
3. Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека / А.П. Сысоева, Н.П. Макарова, Е.Е. Краевая // Клиническая и экспериментальная морфология – 2021. – Т. 10. - №4. С. 5-13.
4. Терапевтические возможности внеклеточных везикул в репродуктивной медицине / Е.Е. Краевая, Н.П. Макарова, А.П. Сысоева, Е.А. Калинина, Д.Н. Силачев // Акушерство и гинекология – 2021. №7. – С. 5-9.
5. Внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости: клинические аспекты и молекулярная биология / Довгань А.А., Ахмедова З.Ф., Сысоева А.П., Зингеренко Б.В., Романов Е.А., Силачев Д.Н., Макарова Н.П., Калинина Е.А. Акушерство и гинекология. 2023. № 6. С. 38-43.

*Статьи в сборниках и материалы конференций*

1. А.П. Сысоева, О.С. Непша, Н.П. Макарова, Д.Н. Силачев, Н.Н. Лобанова, А.В. Тимофеева, Ю.А. Шевцова, Е.Е. Брагина, Е.А. Калинина. Внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости женщин: Профиль экспрессии миРНК и особенности влияния на функциональные характеристики сперматозоидов // Сборник Научных трудов XXXII Ежегодной Международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра», 2022, с. 62-64.
2. Сысоева А.П. Макарова Н.П., Силачев Д.Н., Непша О.С., Го-рюнов К.В., Шевцова Ю.А., Калинина Е.А., Сухих Г.Т. Роль внеклеточных везикул фолликулярной жидкости в процессах регуляции функций сперматозоидов человека // Сборник научных трудов XIV Международного конгресса КАРМ «Современные подходы к лечению бесплодия. ВРТ: Настоящее и будущее», 2022, Казахстан.

3. А.П. Сысоева, Н.П. Макарова, Д.Н. Силачев, Е.Е. Краевая, Е.А. Калинина. Влияние экстраклеточных везикул фолликулярной жидкости на морфофункциональные характеристики сперматозоидов // Сборник Научных трудов XXXI Ежегодной Международной конференции РАРЧ «Репродуктивные технологии сегодня и завтра», 2021, с. 63-64.
4. A. Sysoeva, O. Nepsha, N. Makarova, D. Silachev, N. Lobanova, Y. Shevtsova, E. Bragina, A. Timofeeva. The effect of follicular fluid extracellular vesicles on motility and hyperactivation of human spermatozoa and differential miRNA levels depend on the woman's age // 38th Hybrid Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Volume 37, Issue Supp\_1, 2022, Poster Abstract citation ID: deac107.181 P-188.
5. A. Sysoeva, N. Makarova, O. Nepsha, B. Zingerenko, D. Silachev, Y. Shevtsova, K. Goryunov, V. Chagovets. Follicular fluid extracellular vesicles as a potential tool for human spermatozoa selection in vitro // 39th Hybrid Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology Volume 38, Supp\_1, 2023, Oral Abstract citation ID: dead 093.283.

#### *Патенты*

1. Патент на изобретение 2801339 С1, 07.08.2023. Способ использования внеклеточных везикул фолликулярной жидкости для увеличения подвижности сперматозоидов человека в программах экстракорпорального оплодотворения // Сысоева А.П., Макарова Н.П., Силачев Д.Н., Непша О.С., Горюнов К.В., Шевцова Ю.А., Калинина Е.А., Назаренко Т.А., Сухих Г.Т.
2. Патент на изобретение 2801117 С1, 02.08.2023. Способ селекции мужских гамет с помощью внеклеточных везикул фолликулярной жидкости при оплодотворении методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов в ооцит // Сысоева А.П., Макарова Н.П., Силачев Д.Н., Непша О.С., Горюнов К.В., Шевцова Ю.А., Калинина Е.А., Сухих Г.Т.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

а-ГнРГ – аналоги (агонисты)	ИКСИ – интрацитоплазматическая
гонадотропин-рилизинг гормона	инъекция сперматозоида в ооцит
А – аксонема	мРНК – матричная
БО – блестящая оболочка	рибонуклеиновая кислота
ВАМ – внутренняя акросомальная	миРНК – малые некодирующие
мембрана	РНК
ВВ – внеклеточные везикулы	НАМ – наружная акросомальная
ВОЗ – Всемирная организация	мембрана
здравоохранения	ПЗ – постакросомальная зона
ВРТ – вспомогательные	ПЦР – полимеразная цепная
репродуктивные технологии	реакция
	РНК – рибонуклеиновая кислота

ТВП – трансвагинальная пункция	(Европейское общество по вопросам репродукции человека и эмбриологии)
ФЖ – фолликулярная жидкость	
ФО – фиброзная оболочка	
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон	ОxLPC, ОxPC, ОxPE, ОxTG – окисленные формы
ХГЧ – хорионический гонадотропин человека	лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и триглицеридов
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение	Р4 – прогестерон
АНХА – аннексин	PBS – Phosphate buffered saline (фосфатно-соляной буферный раствор)
СЕ – холестерин	РА – фосфатидные кислоты
Cer – церамиды	РС – фосфатидилхолины
DG – диглицерид	PLs – фосфолипиды
MG – моноглицериды	TG – триглицериды
LPC – лизофосфатидилхолины	
ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology	