

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

СЫСОЕВА
Анастасия Павловна

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

1.5.22 – Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

**доктор биологических наук
Макарова Наталья Петровна**

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	20
1.1. Общие сведения о структуре и функциональных характеристиках сперматозоидов человека	20
1.2. Роль морфофункциональных характеристик мужских половых клеток в процессе их движения в женском репродуктивном тракте при естественном оплодотворении	25
1.3. Современные представления о значении внеклеточных везикул в репродукции человека	27
1.4. Возрастные изменения клеток репродуктивной системы человека.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Характеристика исследуемого биологического материала	39
2.2. Получение биологического материала	40
2.3. Выделение внеклеточных везикул фолликулярной жидкости методом дифференциального центрифугирования	41
2.4. Инкубирование сперматозоидов с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости.....	42
2.5. Оценка подвижности и гиперактивации сперматозоидов методом CASA..	42
2.6. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) сперматозоидов.....	42
2.7. Флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов.....	43
2.8. Nanoparticle Tracking Analysis (НТА-анализ) внеклеточных везикул фолликулярной жидкости.....	44
2.9. Анализ липидов во внеклеточных везикулах фолликулярной жидкости методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС анализ)	44
2.10. Определение профилей миРНК во внеклеточных везикулах фолликулярной жидкости.....	46
2.11. Протеомный анализ внеклеточных везикул фолликулярной жидкости	47
2.12. Статистическая обработка данных.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
3.1. Выделение внеклеточных везикул из фолликулярной жидкости женщин ..	50

3.2. Морфологические особенности взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разного возраста с мужскими половыми клетками	51
3.3. Оценка показателей подвижности и гиперактивации сперматозоидов при взаимодействии с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости женщин разного возраста	75
3.4. Молекулярно-генетическая оценка состава внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разного репродуктивного возраста	85
3.4.1. Профиль экспрессии малых некодирующих РНК внеклеточных везикул фолликулярной жидкости.....	86
3.4.2. Оценка уровня прогестерона в образцах внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин	88
3.4.3. Липидомный анализ внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разного репродуктивного возраста.....	90
3.4.4. Протеом внеклеточных везикул фолликулярной жидкости в исследовании	93
3.5. Разработка новых подходов для совершенствования эмбриологических этапов вспомогательных репродуктивных технологий	99
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	132

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а-ГнРГ – аналоги (агонисты) гонадотропин-рилизинг гормона

А – аксонема

АСП - астенозооспермия

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БО – блестящая оболочка

ВВ – внеклеточные везикулы

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум

Р4 – прогестерон

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит

ЛГ – лютеинизирующий гормон

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

миРНК – малые некодирующие РНК

ОКК – ооцит-кумуляный комплекс

ПЗ – постакросомальная зона

ВАМ – внутренняя акросомальная мембрана

НАМ – наружная акросомальная мембрана

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СП – семенная плазма

ТВП – трансвагинальная пункция

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

ФЖ – фолликулярная жидкость

ФО – фиброзная оболочка

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

АсСа – ацилкарнитины

АНХА – аннексин

С1Р – церамид-1-фосфат

СЕ – холестерины

Сег – церамиды

СегG – гликозилцерамиды

СегP – церамидфосфаты

Сег-NS – N-лигноцериолсфингозины

DG – диглицерид

ESHRE – European Society of Human Reproduction and Embryology (Европейское общество по вопросам репродукции человека и эмбриологии)

Со – коэнзим

LPC – лизофосфатидилхолины

MG – моноглицериды

MGDG – моногалактозилдиацилглицерины

OxLPC, OxPC, OxPE, OxTG – окисленные формы лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и триглицеридов

PBS – Phosphate buffered saline (фосфатно-соляной буферный раствор)

PA – фосфатидные кислоты

PC – фосфатидилхолины

PEtOH – фосфатидилэтаноламы

PLs – фосфолипиды

S1P – сфингозин-1-фосфат

SM – сфингомиелины

TG – триглицериды

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Долгое время работы по изучению процессов оплодотворения млекопитающих, в том числе человека, проводились исключительно на животных. Исследователи до сих пор пытаются понять механизмы взаимодействия гамет, продвижение и конкуренцию сперматозоидов в репродуктивных путях за возможность только одному из миллионов оплодотворить ооцит и передать свой генетический материал потомству. Интересно, что у моногамных видов млекопитающих (прим. голые землекопы) или у тех, у которых в один цикл размножения имеется только один половой партнер (прим. мышь) качественные характеристики сперматозоидов (концентрация и подвижность) значительно ниже, чем у полигамных млекопитающих, как например, у шимпанзе, и более схожи с таковыми у человека. Однако даже самая приближенная животная модель не дает полного понимания процессов, происходящих во время подготовки и самого оплодотворения у человека. Разнообразие стратегий спаривания (за исключением внешнего оплодотворения), различия в строении репродуктивных путей, функций и т.д. делают сопоставление изучаемых процессов трудным и имеющим, до сих пор, достаточно ограниченное клиническое значение. В действительности, требуются более детальные исследования с использованием биологического материала человека *in vivo*. Однако в силу множества этических и технических препятствий, на данный момент — это трудноосуществимо.

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.

Традиционно, межклеточная коммуникация включает в себя три механизма: контактно-зависимая передача сигнала через мембраносвязанные сигнальные молекулы (рецепторы) или гѐп-переходы, паракринная передача сигнала на короткие расстояния через секретируемые растворимые молекулы, такие как цитокины и хемокины, и эндокринная передача сигнала на большие расстояния через секретируемые гормоны. Первые исследования начала прошлого десятилетия обнаружили существование ВВ, которые высвобождаются клетками во внеклеточную среду и могут служить транспортным средством для переноса белков, липидов, липидов и различными РНК между клетками как на местном (аутокринном и паракринном), так и на дистанционном уровне [54, 119]. Ключевые роли ВВ были показаны во многих аспектах биологии млекопитающих, как в норме, так и патологии (множество исследований роли ВВ начались именно в области онкологии [120]).

В репродуктивной системе млекопитающих, в том числе и человека, имеют место сложнейшие процессы, которые в значительной степени зависят от коммуникации между клетками и органами. Обнаружение ВВ в биологических жидкостях репродуктивной системы указывает на их важную функциональную роль в межклеточных коммуникациях, необходимых для зачатия и после него. Участие ВВ в гаметогенезе, имплантации и в раннем развитии эмбриона успешно изучается последние несколько лет на животных моделях [121, 122, 123]. Безусловно, появляются работы и на биологическом материале человека, в частности в области гамето- и раннего эмбриогенеза [123, 124]. 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.

В связи с растущей необходимостью медицинской помощи в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), связанной с различными

вариантами бесплодия, крайне актуально и необходимо изучение биологических, фундаментальных процессов клеточной биологии репродуктивной системы человека, поиск новых механизмов взаимодействия гамет при оплодотворении и внедрение полученных знаний в клиническую практику. Процесс селекции мужских половых клеток внутри женского репродуктивного тракта до сих пор остается загадкой, решение которой позволит не только дополнить фундаментальное понимание биологических процессов размножения, но и улучшить исходы программ ВРТ. Глобальная тенденция к прогрессирующему снижению числа и подвижности здоровых сперматозоидов в эякуляте связана с повышенным риском бесплодия. Таким образом, разработка подходов для поддержания или повышения подвижности сперматозоидов человека является важной областью исследований.

Мужской фактор бесплодия, связанный с нарушением подвижности сперматозоидов, составляет около 30% всех случаев патозооспермии. Участие ВВ семенной плазмы в поддержании сперматогенеза и функций сперматозоидов находится в процессе исследования. Однако изучение внеклеточных везикул фолликулярной жидкости (ВВ ФЖ) может привести к разработке способов улучшения подвижности сперматозоидов и лечения бесплодия с помощью ВРТ. ВВ ФЖ также могут быть использованы для оптимизации условий культивирования, модификации характеристик половых клеток и улучшения исходов программ ВРТ.

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 [15]. Таким образом, старший репродуктивный возраст (СРВ) (≥ 35 лет) влияет на репродуктивный потенциал женщины и характеризуется изменениями белков, мРНК и некодирующих РНК

внутри фолликула яичника. Состав ВВ ФЖ может предоставить информацию о качестве женских половых клеток, различных патологических состояниях половой системы и отражать репродуктивную способность женщины, а также влиять на активацию сперматозоидов в маточных трубах [19, 28].

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 женских гамет, 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 [30, 31]. Также было установлено, что хемоаттрактантный эффект ФЖ из отдельного фолликула связан с успешным оплодотворением яйцеклетки из того же фолликула [24, 30].

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 [18]. 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 [18]. 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 [16, 32]. Результаты недавних исследований показали, что некоторые миРНК влияют на концентрацию прогестерона [99].

В репродуктивной системе ВВ играют огромную роль в созревании мужских и женских гамет, процессах оплодотворения, эмбриогенезе и имплантации [11, 14]. 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. [17, 20, 22, 35]. 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 [25–37]. Однако долгое время поиск мембранных рецепторов сперматозоидов, ответственных за эффекты прогестинов 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 [36, 37], 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 [38]. 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.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ

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.

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ

Работа обсуждена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также на заседании апробационной

диссертационной комиссии НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

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).

По теме диссертации опубликовано 5 печатные работы в рецензируемых журналах ВАК (3 статьи как первый автор, 2 в соавторстве) и зарегистрированы два патента (Патент № 2801339 и Патент № 2801117).

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.

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

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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о структуре и функциональных характеристиках сперматозоидов человека

Сперматозоид — уникальная подвижная клетка, обладающая особой способностью перемещаться по половым путям женщины и оплодотворять яйцеклетку. Для того, чтобы достичь ооцита и проникнуть в него, сперматозоиды должны обладать прогрессивной подвижностью и быть способными адаптироваться к резко меняющимся условиям окружающей среды женского репродуктивного тракта. Именно поэтому подвижность, успешная гиперактивация и капацитация, а также своевременная акросомальная реакция являются важными параметрами как при естественном зачатии, так в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Сперматозоид человека представляет собой чрезвычайно специализированную клетку с сильно уплотненным ядром и скудной цитоплазмой [2]. Несмотря на то, что транскрипционно и трансляционно сперматозоид неактивен, в нем происходит множество метаболических изменений, которые являются основополагающими для оплодотворения и переноса отцовского генетического материала в ооцит [27]. Сперматозоиды, которые попадают во влагалище во время коитуса, должны достичь места оплодотворения — ампулярного участка маточной трубы (верхней трети яйцевода). Для этого им, в первую очередь, необходима поступательная подвижность, которая среди всех параметров эякулята считается самым важным прогностическим маркером потенциала мужской фертильности [39]. Интересно, что человеческие сперматозоиды проходят в среднем расстояние 17–20 см по репродуктивным путям женщины, претерпевая множество физиологических и биохимических изменений, прежде чем встретиться с ооцитом [40]. Этот неочевидный параметр может служить дополнительным критерием для разработки более физиологичных методов селекции сперматозоидов в программах ВРТ.

Исходя из характера движения и скорости, сперматозоиды можно разделить на прогрессивно подвижные, непрогрессивно подвижные (демонстрирующие только боковое смещение головки) и неподвижные. В соответствии с наиболее распространенными в клинической практике рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ, 2010) [41], референсные значения характеристик эякулята человека указаны в Таблице 1. Состояние, при котором у мужчин снижены параметры подвижности сперматозоидов (<40% всех подвижных и/или <32% прогрессивно подвижных) называется астенозооспермией и рассматривается как один из основных факторов, вызывающих мужское бесплодие [3, 42].

Таблица 1. Референсные значения характеристик эякулята человека, ВОЗ 2010

Показатель	Референсные значения по ВОЗ, 2010 [41]
Объем материала, (мл)	> 1,5
Общее количество сперматозоидов, (млн в эякуляте)	39
Концентрация сперматозоидов, (млн/мл)	> 15
Общая подвижность (Прогрессивно и непрогрессивно-подвижные + не сперматозоиды, %)	40
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, тип PR, (%)	> 32
Клетки с нормальной морфологией, (%)	> 4
Жизнеспособность (% живых сперматозоидов)	58
pH	≥7,2

Подвижность сперматозоидов контролируется сложными, структурными и молекулярными сигнальными механизмами. Сперматозоиды состоят из трех основных частей — головки (содержит ядерный материал), хвоста или жгутика и шейки, которая соединяет головку со жгутиком и содержит большое количество митохондрий для обеспечения клетки энергией [43]. Стержневой частью жгутика сперматозоида является аксонема (А), которая берет начало в области шейки и заканчивается на концевой части хвоста. Она состоит из 9

дублетов и центральной пары микротрубочек, которые управляются нексиновыми связями, соединенными с центральной парой радиальными спицами. Внутренние и внешние аксонемные динеиновые ручки являются ключевыми структурами для обеспечения поступательной подвижности сперматозоидов, приводя в движение дуплеты микротрубочек, потребляя аденозинтрифосфат (АТФ) [20]. В основной части жгутика располагаются сигнальные белки, регулирующие биение, и белки, участвующие в капацитации и гиперактивации [43].

После того, как сперматозоиды попадают в женский репродуктивный тракт, они сталкиваются с несколькими препятствиями. Во-первых, они должны пройти через вязкую слизь в шейке матки, а также между маткой и маточной трубой. В маточной трубе сперматозоиды временно связываются с ее эпителием в определенном участке — перешейке маточной трубы, который является функциональным резервуаром сперматозоидов до момента овуляции и оплодотворения [44]. После выхода из перешейка, но до достижения ампулярной части маточной трубы, сперматозоиды выполняют большую часть своей функции капацитации, физиологические и функциональные изменения которой, делают их компетентными для проникновения в ооцит. Направленное продвижение сперматозоидов по маточной трубе обусловлено сигнальным действием молекул во время овуляции, в частности, прогестероном.

Сперматозоиды, прошедшие капацитацию, демонстрируют энергичное (хлыстообразное) движение хвоста, т.е. гиперактивацию. Гиперактивация является видимым признаком того, что сперматозоиды претерпели все физиологические изменения, необходимые для взаимодействия сперматозоида с яйцеклеткой. В естественных условиях полностью капацитированные сперматозоиды успешно проходят через матрикс кумулюса и связываются с блестящей оболочкой (БО). Далее происходит акросомная реакция, необходимая для проникновения в ооцит и оплодотворения.

Капацитация и гиперактивация сперматозоидов человека

В настоящее время общепринятым определением капацитации является приобретение зрелыми сперматозоидами способности проникать через БО и оплодотворять ооцит в репродуктивных путях женщины. Более узкое объяснение термина капацитации включает в себя описание функций и реакций, необходимых сперматозоидам для того, чтобы пройти экзоцитотическую реакцию акросомы в ответ на индуцирующий сигнал от ооцита [45].

Во время нахождения в придатке яичка плазматическая мембрана сперматозоида проходит ряд модификация, включая увеличение отрицательного заряда поверхности из-за поглощения сиалогликопротеинов, сульфоглицеролипидов и стеролсульфатов, активное гликозилирование поверхностных компонентов и включение холестерина в плазматическую мембрану. Одной из функций капацитации является удаление этих остатков. Предполагается, что эти изменения происходят для стабилизации мембраны сперматозоида, предотвращая его преждевременную капацитацию в мужском репродуктивном тракте, поскольку завершение капацитации знаменует собой начало дестабилизации мембраны, гиперактивацию и подготовку к оплодотворению. В противном случае, дестабилизация мембраны приводит к гибели клетки.

На данный момент до конца невозможно визуализировать и провести анализ изменений в плазматической мембране сперматозоида, связанных с капацитацией, однако некоторые авторы сумели отследить изменения в структуре через связывания хлортетрациклина на головке сперматозоида и по изменениям в местах связывания лектинов [45].

Изменения, которые происходят во время капацитации, включают: 1) удаление молекул, адсорбированных или включенных в плазматическую мембрану сперматозоида во время прохождения через эпидидимис; 2) уменьшение отрицательного заряда поверхности сперматозоида [6], например, путем удаления остатков сиаловой кислоты; 3) увеличение поглощения

кислорода и увеличение гликолитической активности; 4) потеря холестерина, увеличивающая текучесть мембраны; 5) перераспределение внутримембранных частиц и ионов Ca^{2+} ; 6) изменения осмотических свойств и проницаемости плазматической мембраны; 7) накопление Ca^{2+} [6, 8]. Ранние для исследования индукции капацитации сперматозоидов *in vitro* использовали довольно простые солевые растворы, дополненные сывороткой крови или фолликулярной жидкостью [45]. Реакции капацитации и гиперактивации сперматозоидов *in vitro* является неотъемлемым шагом для успешного экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и других вспомогательных репродуктивных технологий.

Строение головки и мембраны сперматозоида человека

Головка сперматозоидов млекопитающих разделена на два основных региона (домена): акросомальный регион и постакросомальный регион (ПАР); эти регионы могут быть четко визуализировать с помощью специфических антител. Эти области далее делятся на субструктуры и субдомены. Область акросомы содержит два субдомена: наружная акросомальная мембрана (НАМ) и внутренняя акросомальная мембрана (ВАМ). НАМ участвует в акросомальной реакции, при которой происходит высвобождение акросомных ферментов и матричных белков. ВАМ участвует в слиянии мембран гамет [2, 43].

Цитоплазматические слои — это пространства, образованные между системами мембран в головке сперматозоида. Слои развиваются как плоские, узкие структуры и содержат плотное скопление цитоскелетных веществ и функциональных молекул. В зрелых сперматозоидах акросома, которая представляет собой мембраносвязанную органеллу, располагается между плазматической мембраной и лежащим под ней ядром в передней части головки. Таким образом, молекулы, накопленные в цитоплазматических слоях, играют важную роль в оплодотворении. Цитоплазма сперматозоида может быть дифференцирована по крайней мере на три слоя (пространства): периакросомальный, субакросомальный и постакросомальный слои [46].

Многие функциональные молекулы, необходимые для сперматогенеза и оплодотворения, организованы в системе мембран сперматозоида. Изучение мембранной системы клеток описывается в литературе с помощью метода замораживания-скалывания с использованием антибиотика филипина в качестве специфического маркера, поскольку филипин имеет сродство к мембранному стеролу.

Плазматическая мембрана сперматозоида эффективно модифицирована [79]. Структурно, плазматическая мембрана покрывает всю поверхность головки и хвоста сперматозоида до момента акросомальной реакции. Постакрсомальная плазматическая мембрана образует на своей поверхности гликокаликс-подобное вещество, и содержит различные молекулы, которые до сих пор не до конца изучены, вовлеченные в события, вызванные капациацией и реакцией акросомы, пока сперматозоид не сольется с ооцитом. Холестерин в большом количестве присутствует на экваториальной плазматической мембране и мембране в передней части акросомы.

Наружная и внутренняя акросомальные мембраны дифференцируются от проакросомальной гранулярной мембраны, происходящей из аппарата Гольджи, на стадии поздних удлиняющихся сперматид сперматогенеза.

1.2. Роль морфофункциональных характеристик мужских половых клеток в процессе их движения в женском репродуктивном тракте при естественном оплодотворении

Начало каждого организма, размножающегося половым путем, отмечено необычным процессом, который завершается распознаванием, взаимодействием и слиянием двух совершенно разных клеток — ооцита и сперматозоида.

Продвижение сперматозоидов в женском репродуктивном тракте млекопитающих долгое время рассматривался как «гонка» к ооциту, и единственным фактором, определяющим «победителя», было первенство в достижении яйцеклетки. Однако за последние 10 лет растет понимание того, что процесс движения сперматозоидов в репродуктивных путях опосредован гораздо

более сложной серией взаимодействий между сперматозоидами и женским репродуктивным трактом. Исследования *in vitro* и *in vivo* на животных моделях показали, что поведение сперматозоидов модулируется физическими и биохимическими взаимодействиями с клетками, выстилающими женский репродуктивный тракт, и жидкостями, составляющими окружающую среду. Высокая биологическая активность компонентов этих жидкостей имеет особое значение, поскольку они могут либо препятствовать, либо облегчать прохождение сперматозоидов, изменяя их подвижность и морфофункциональные характеристики.

Также важным для отбора сперматозоидов является архитектура женского репродуктивного тракта — многочисленные складки и резервуары, через которые сперматозоиды могут селективно проплывать или задерживаться до момента овуляции. Взаимодействие сперматозоидов и внутренней среды женского репродуктивного тракта влияет на хранение, подвижность, выживание, капацитацию и оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Хемотаксис сперматозоидов по отношению к ооцитам — широко распространенное явление, встречающееся у большинства форм жизни от низших растений до млекопитающих и играющее важную роль в обеспечении оплодотворения. На сперматозоиды аттрактанты действуют как «маяки», указывающие путь, ведущий к ооциту того же вида. У млекопитающих источником аттрактанта является не сам ооцит, а окружающие его кумулюсные клетки и ФЖ, попадающая при овуляции в маточную трубу, при этом хемотаксическое поведение проявляется только в небольших популяциях сперматозоидов [78].

Стероидный гормон прогестерон, выделяемый клетками кумулюса, окружающими яйцеклетку, является мощным стимулятором сперматозоидов человека. Он привлекает сперматозоиды к яйцеклетке и помогает им проникнуть через защитную оболочку яйцеклетки. Прогестерон вызывает приток Ca^{2+} в сперматозоиды и запускает многочисленные Ca^{2+} -зависимые физиологические

реакции, необходимые для успешного оплодотворения, такие как гиперактивация сперматозоидов, реакция акросомы и хемотаксис в направлении яйцеклетки. Как гормон яичников, прогестерон действует путем регуляции экспрессии генов через хорошо изученный ядерный рецептор прогестерона. Однако влияние прогестерона на транскрипционно молчащие сперматозоиды остается необъяснимым, и считается, что оно опосредуется специализированным, негеномным мембранным рецептором прогестерона. Идентичность этого негеномного рецептора прогестерона и механизм, с помощью которого он вызывает вход Ca^{2+} , остаются фундаментальными нерешенными вопросами в репродукции человека. Было обнаружено, что наномолярные концентрации прогестерона резко потенцируют CatSper, рН-зависимый Ca^{2+} канал жгутика сперматозоида. Канал CatSper человека синергически активируется повышением внутриклеточного рН и внеклеточным прогестероном. Интересно, что CatSper человека может быть дополнительно потенцирован простагландинами, но, очевидно, через сайт связывания, отличный от прогестерона. Учитывая, что CatSper-ассоциированный рецептор прогестерона специфичен для сперматозоидов и структурно отличается от геномного рецептора прогестерона, он представляет собой перспективную мишень для разработки новых методов улучшения подвижности в программах ВРТ.

Процесс селекции мужских половых клеток внутри женского репродуктивного тракта до сих пор остается загадкой, решение которой позволит не только дополнить фундаментальное понимание биологических процессов размножения, но и улучшить исходы программ ВРТ в клинической практике.

1.3. Современные представления о значении внеклеточных везикул в репродукции человека

Эукариотические клетки — это высокоспециализированные клетки с различными органеллами, включая эндоплазматический ретикулум, сеть транс-Гольджи, митохондрии, выполняющие различные функции. Внутри клеток

происходит перекрестное взаимодействие между органеллами посредством обмена биоинформационным материалом (нуклеиновая кислота, белки и т.д.). Этот процесс является критически важным для поддержания здоровой клеточной функции. Одним из механизмов взаимодействия органелл является везикулярный транспорт. Везикулы, образованные мембранами, способны переносить различные молекулы от одной органеллы к другой с помощью процессов секреции и поглощения [80].

Впервые везикулы вне клеток были замечены доктором Х. Кларком Андерсоном, преподавателем Университета Канзасского медицинского центра вскоре после изобретения электронной микроскопии в 1967 году [92]. В 1971 году доктор Н. Кроуфорд сообщил о наблюдении белков на/в везикулах, и исследования дальнейшие исследования сосредоточились на белках, связанных с везикулами, в различных системах. В 2007 году группой ученых было показано, что во внеклеточных везикулах (ВВ) присутствуют РНК-транскрипты, и это послужило началом глубокого изучения и понимания потенциальной биологической ВВ в организме человека [93]. Кроме того, было обнаружено, что большое количество ВВ выделяют раковые клетки [9]. Это привело к многочисленным гипотезам, рассматривающих ВВ в биологических жидкостях как биомаркеры различных патологий, и значительная часть этих работ сосредоточена на содержании малых некодирующих РНК (миРНК) и протеомном составе ВВ [9, 94].

Потенциал участия ВВ в нормальных и естественных физиологических процессах до сих пор изучен крайне мало. Антральный фолликул яичника, благодаря своей уникальной структуре и хорошо налаженными межклеточными взаимодействиями, предоставляет отличную возможность для изучения ВВ в нормальной физиологической среде.

ВВ представляют собой гетерогенную группу везикул, которые выделяется, практически, всеми типами клеток и обнаруживаются во всех жидкостях организма [14]. ВВ могут быть разного размера, происхождения и

содержания, классификация различных подтипов ВВ постоянно развивается [11, 53], выделяют три основных подтипа ВВ, которые были установлены на основе их биогенеза: экзосомы (обычно 40–100 нм), микровезикулы (обычно 100–500 нм) и апоптотические тельца (обычно 500 нм–2 мкм). Исследования показывают, что ВВ играют существенную роль в обеспечении межклеточной коммуникации во многих биологических системах, включая пролиферацию клеток, дифференцировку, гаметогенез, эмбриогенез и развитие [14, 52]. Также главной функцией ВВ является транспорт биологически активных молекул (белков, липидов, РНК, ионов) и, возможно, органелл [73] между клетками как локально, так и удаленно, и могут напрямую влиять на клеточные процессы, вызывая внутриклеточные изменения [50, 51]. Таким образом, ВВ с одной стороны, могут являться индикаторами физиологических и патофизиологических процессов, с другой стороны, выступать в качестве терапевтических агентов. Структура липидной мембраны ВВ действует как защитный барьер против деградации биологически активных молекул, например белков и миРНК протеиназами и РНКазами, делая их надежными микроконтейнерами по доставке биологически активных молекул клинического использования [13].

Биогенез внеклеточных везикул

ВВ могут высвобождаться во внеклеточное пространство с помощью различных клеточных механизмов и классифицируются по типу биогенеза и способу секреции. Два основных механизма, которые, как считается, преобладают в процессе формирования и секреции везикул — это прямое отслаивание плазматической мембраны во внеклеточное пространство (характерно для микровезикул) и слияние мультивезикулярных телец (МВТ), которые содержат небольшие внутрипросветные везикулы (обычно называемые экзосомами). Кроме того, апоптоз также может способствовать попаданию популяции везикул во внеклеточное пространство.

Экзосомы являются продуктом эндоцитарного пути, а именно, инвагинации клеточной мембраны. После эндоцитоза формируются ранние

эндосомы. Далее происходит формирование поздних эндосом путем отбора содержимого ранних эндосом. Поздние эндосомы образуют МВТ, которые могут связываться с цитоплазматической мембраной, при этом белки встраиваются в мембрану, а компоненты цитозоля поглощаются и запираются во внутриклеточных везикулах. Путем экзоцитоза происходит высвобождение содержимого МВТ, внутриклеточных везикул, во внеклеточное пространство, называемых экзосомами [5, 54, 55].

Экзосомы состоят из тех же молекул, что и клетки, из которых они происходят. Они содержат нуклеиновые кислоты, белки, ферменты, липиды или цитокины. В состав экзосом входят такие белки, как тетраспанины (CD9, CD63, CD81, CD82), которые играют роль в проникновении, инвазии и слиянии клеток. Белок CD81, который является наиболее многочисленным, используется в качестве маркера экзосом [56]. Другой тип белков экзосом являются белки теплового шока, такие как HSP70, HSP90, которые являются частью стрессового ответа и участвуют в презентации антигенов. Цитоскелетные протеины, белки, участвующие в биогенезе МВТ (например, тубулин, актин), белки, ответственные за мембранный транспорт (аннексин) также были обнаружены и идентифицированы в экзосомах [56]. Мембрана экзосом содержит фосфатидилхолин (PC), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилинозитол (PI), фосфатидную кислоту (PA), холестерин, церамиды, сфингомиелин, глицин. Было показано, что содержание экзосом и состав их мембран меняется в зависимости от различных факторов, включая диету, экспрессию патогенных генов или гормонов [56, 57].

Поскольку и экзосомы, и микровезикулы происходят из двухслойных липидных мембран, они имеют общие механизмы биогенеза [5]. Еще одно сходство экзосом и микровезикул — обогащенность их мембраны холестерином, сфингомиелином и церамидом. Сходство их биогенеза было показано в различных типах клеток. Более того, после высвобождения во внеклеточное пространство их трудно отличить друг от друга, поэтому специалисты начали

использовать термин «внеклеточная везикула, ВВ» для обозначения везикул, выделенных из биологических жидкостей [58].

Захват внеклеточных везикул

Для взаимодействия с ВВ и получения их содержимого клетки-реципиенты должны иметь механизмы для связывания и слияния с ВВ. Способность клеток поглощать ВВ была доказана различными методами, косвенными и прямыми. Перенос мРНК, миРНК или белка между клетками разных видов с помощью ВВ был продемонстрирован с использованием видоспецифичных праймеров или антител [59, 60]. Поглощение ВВ может быть, визуализировано с помощью флуоресцентных красителей. Наиболее распространенной методикой маркировки липидного слоя ВВ является окрашивание липофильными красителями, к которым относятся РКН26, РКН67, родамин В (R18) и т.д. Для определения поглощения ВВ клетками-реципиентами используются проточная цитометрия и конфокальная микроскопия. Конфокальная микроскопия может показать поглощение и локализацию ВВ в клетках после связывания. Метод проточной цитометрии может помочь количественно определить относительный уровень поглощения. Существует несколько способов, с помощью которых клетки-реципиенты могут захватывать ВВ во внеклеточном пространстве, включая различные виды эндоцитоза, слияние с мембраной и специфическое белок-зависимое связывание [61].

За последние несколько лет было установлено, что механизм связывания и поглощения ВВ зависит от типа клеток-мишеней. Существуют клатрин-зависимый и кавеолин-зависимый механизм эндоцитоза, требующий наличия белков клатрина и кавеолина, соответственно, в присутствии различных регуляторов и факторов роста [62, 63]. Макропиноцитоз — это тип эндоцитоза, который включает в себя образование инвагинированных мембранных раффлов и отпочковывание мембраны внутрь клетки. Этот механизм является $g\alpha 1$ -, актин- и холестерин-зависимым и требует Na^+/H^+ обмена. Фагоцитоз представляет собой еще один тип эндоцитоза. Фагоцитоз обычно происходит с

помощью рецепторов и известен тем, что с его помощью клетка может поглотить большие внеклеточные материалы. Фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа (PI3K) играет важную роль в фагоцитарных процессах, особенно в обеспечении вставки мембраны в формирующиеся фагосомы. Фосфатидилсерин (PS), фосфолипид мембраны, является еще одной молекулой, которая играет роль в фагоцитоз-опосредованное поглощение ВВ.

Другим способом доставки биологически активных молекул с помощью ВВ является слияние мембран, которое зависит от растворимых рецепторов белков прикрепления NSF (SNAREs, Soluble NSF Attachment Protein Receptors), Rab-белков и Sec1/Munc-18 белков (SM-белки) [90]. Слияние ВВ с клетками-реципиентами можно наблюдать с помощью флуоресцентного окрашивания липидов, с последующим обнаружением доставленных материалов с помощью специфических праймеров или антител [91]. Несмотря на наличие инструментов для измерения слияния мембран, в настоящее время очень мало известно и опубликовано работ об этом механизме взаимодействия ВВ и других клеток.

Помимо известных клеточных механизмов, известно также поглощение ВВ через взаимодействие с отдельными белками поверхности мембраны. Тетраспанины представляют собой семейство белков с четырьмя трансмембранными доменами, которые в большом количестве присутствуют в образцах ВВ. CD9, CD63 и CD81 из этого семейства широко используются в качестве маркеров ВВ. Обработка клеток антителами к CD9 или CD81 снижала связывание ВВ, что может говорить об активной роли этих двух тетраспанинов в поглощении ВВ клетками-мишенями [64]. Значение интегринов и иммуноглобулинов в связывании ВВ изучалось в основном на иммунных клетках. Блокирование CD11a, ICAM1, CD51 и CD61 приводило к снижению поглощения ВВ [65]. Авторы показали, что наивные Т-клетки захватывают ВВ через Т-клеточный рецептор (TCR), CD28, и функционально-ассоциированный антиген LFA1 [65]. CD4+ клеткам, также необходимо взаимодействия с TCR-рецептором главного комплекса гистосовместимости (МНС) для успешного

связывания и поглощения ВВ [66]. Эти работы подчеркивают роль белок-белкового взаимодействия в связывании ВВ. Еще одной важной группой белков, участвующих в связывании ВВ, являются лектины. Интересно, что в процессе изменения плазматической мембраны сперматозоида во время капацитации именно лектины играют важнейшую роль [45].

Приведенные выше данные показывают, что ВВ могут поглощаться клетками через различные механизмы, и что они зависят от различных клеточных белков и типа клеток-мишеней. Механизмы поглощения ВВ в отдельных типах клеток и органах требуют дальнейшего глубокого изучения, а модуляция выявленных механизмов может служить дополнительным подходом к изучению межклеточных коммуникации и созданию терапевтических моделей использования ВВ в клинической практике.

Внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости и их роль в процессах оплодотворения

Фолликулярная жидкость (ФЖ) представляет собой жидкость яичников, которая выделяется частично из фолликула и частично в виде экссудата из плазмы крови [7]. ФЖ играет существенную роль в физиологии яичников, стероидогенезе, созревании ооцита и его выхода в яйцевод во время овуляции [18]. Несколько предыдущих исследований показали, что некоторые биохимические характеристики ФЖ играют решающую роль в определении качества ооцита, его способности к оплодотворению и в последующем эмбриональном развитии млекопитающих [10, 18, 35]. ФЖ содержит хемоаттрактанты и факторы привлекающие и активирующие сперматозоиды в половых путях женщины [23, 26, 33]. Недавние исследования показали, что в дополнение к множеству метаболических и биохимических субстратов ФЖ содержит ВВ, которые являются универсальными переносчиками биологически активных веществ, как внутри фолликула, так и за его пределами — в маточных трубах во время оплодотворения [1]. Помимо белков и липидов — регуляторных и строительных молекул, ВВ ФЖ переносят миРНК, с изучения которых начался

пристальный интерес к участию ВВ ФЖ в репродуктивной функции млекопитающих.

В ряде исследований было показано, что профили экспрессии миРНК в ФЖ пациентов с такими заболеваниями как эндометриоз, синдромом поликистозных яичников или преждевременной недостаточностью яичников, отличаются от таковых у здоровых женщин [113, 114]. Также состав миРНК может отражать качество ооцита [113]. В статье Martinez с колл. продемонстрировали, что экспрессия миРНК в ВВ ФЖ коррелирует с оплодотворением и качеством эмбрионов. Они обнаружили, что сверхэкспрессия *miR-92a* и *miR-130b* связана с успешным оплодотворением, а дифференциальная экспрессия *miR-214*, *miR-454* и *miR-888* связана с эмбрионами хорошего качества на 3 сутки культивирования [28]. В 2013 году Sohel с колл. впервые продемонстрировала, что большинство миРНК из ФЖ находится во фракции экзосом, что подчеркивает важность изучения состава миРНК внутри ВВ [112]. Таким образом, можно предположить, что профиль экспрессии миРНК ВВ ФЖ способен отражать не только физиологические процессы старения организма, но и выступать в качестве маркеров заболеваний и предикторов успеха программ ВРТ.

1.4. Возрастные изменения клеток репродуктивной системы человека

Под процессом старения понимают зависящее от времени снижение функциональной активности клеток многоклеточного организма. Для него характерна специфическая серия событий: геномная нестабильность, эпигенетические изменения, митохондриальная дисфункция, истощение стволовых клеток и клеточное старение, влияющие на клеточную физиологию [48].

Фертильность женщин и качество ооцитов тесно связаны с возрастом: женщины старше 35 лет чаще сталкиваются с бесплодием, чем более молодые женщины [47]. Частота анеуплоидий среди женщин старшего репродуктивного возраста (СРВ) значительно выше по сравнению с молодыми женщинами. Кумулюсные клетки и ФЖ, которые окружают ооцит во время его роста внутри

антрального фолликула, представляют собой локальное микроокружение, влияющее на качество ооцита. Работы по изучению возрастных изменений клеток кумулюса и ФЖ демонстрирует уникальные генетические, эпигенетические, транскриптомные и протеомные изменения с соответствующими метаболическими изменениями, дисбалансом окислительно-восстановительного статуса и усилением апоптоза в клетках микроокружения ооцита [47, 51]. Старший репродуктивный возраст (≥ 35 лет) влияет на репродуктивный потенциал женщины и характеризуется изменениями белков, мРНК и малых некодирующих РНК внутри фолликула яичника. Состав ВВ ФЖ может предоставить информацию о качестве женских половых клеток, различных патологических состояниях половой системы и отражать репродуктивную способность женщины, а также влиять на активацию сперматозоидов в маточных трубах.

У мужчин сперматогенез и репродуктивные функции сохраняются до самой смерти. Однако литературные данные подчеркивают факт возрастного снижения мужской фертильности, который можно рассматривать с двух сторон: со стороны возрастных изменений показателей спермограммы и с физиологической [49]. Наиболее уязвимым параметром спермограммы является подвижность сперматозоидов. Российскими авторами была представлена следующая статистика, где в каждой группе патологии спермограммы было снижение подвижности у мужчин после 40 лет: астенозооспермия была выявлена в 56% случаев, астенотератозооспермия — в 21%, олигоастенотератозооспермия — в 17%, олигоастенозооспермия — в 6% случаев [4]. У пожилых мужчин подвижность сперматозоидов в среднем была значительно ниже, чем у молодых, концентрация выше (вероятно, связано со снижением частоты эякуляции с возрастом), объем ниже. Однако прогрессивное снижение параметров эякулята многие авторы связывают не с возрастом, а с приобретёнными заболеваниями половой системы [3, 4].

Данных об изменениях в структуре сперматозоидов, вызванных возрастными патологическими процессами у человека, в научной литературе представлено мало. В первую очередь, исследователи обращают внимание на увеличение ДНК-фрагментации, повреждения, вызванные окислительным стрессом, накопление хромосомных мутаций и другие молекулярные нарушения, появляющиеся с возрастом и влияющие на успех оплодотворения и развитие эмбриона. Данные о структурных изменениях сперматозоидов представлены только на животных. Однако с возрастом у человека происходят значительные изменения в липидном и белковом метаболизме, которые отражаются на правильном функционировании, оплодотворяющей способности и структурном составе мужских половых клеток [3, 10, 12].

Липидные компоненты мембран сперматозоидов имеют определенные физико-химические и метаболические свойства, которые позволяют мембранам обеспечивать их высокоспециализированные функции. Например, липидный состав является основным фактором, определяющим текучесть мембраны, необходимой для характерного движения жгутиков сперматозоидов, а также фузогенные свойства мембран, связанные с реакцией акросомы и оплодотворением [113]. Кроме того, было показано, что липидные медиаторы участвуют в различных механизмах сигнальной трансдукции, регулирующих функции сперматозоидов [114, 115]. Важность и функциональное значение высокополиненасыщенных ацильных компонентов фосфолипидов (PLs) сперматозоидов была проиллюстрирована на примере случаев снижения подвижности и ухудшения оплодотворяющей способности, связанных с недостатком в PLs сперматозоидов старых быков, в сравнении с молодыми особями [115]. Аналогичная картина наблюдалась в сравнении подвижности и способности к капацитации у птиц, в частности, у петухов разного возраста (25 и 60 недель) [116].

Интересная работа о взаимосвязи сперматозоидов реагировать на гипоосмотическую среду и с их оплодотворяющим потенциалом была проведена

на быках разного возраста [117]. Целью исследования была разработка относительно простого теста для оценки функциональной целостности мембран сперматозоидов.

У многих видов животных, в том числе и человека, сперматозоиды «набухают» в гипоосмотических условиях за счет притока воды и расширения мембран. Набухание мембраны особенно заметно в хвосте сперматозоида. Хотя мембраны хвоста и головки сперматозоида могут функционировать независимо друг от друга, наблюдалась хорошая корреляция между «набуханием» мембраны хвоста сперматозоидов и их способностью к капацитации и акросомной реакции, показатели которых были снижены в группе быков старого возраста. Капацитация и слияние с ооцитом сопряжены со многими изменениями в головке сперматозоида, без которых эти процессы не происходят, таким образом, «набухание» хвоста может свидетельствовать о нормальной функциональной активности мембран головки.

Крупный рогатый скот — это далеко не единственный вид, на сперматозоиды которого влияет возраст особи. В исследованиях на различных позвоночных и беспозвоночных животных было показано, что старение сперматозоидов приводит к постепенной потере со временем способности гамет к оплодотворению и поддержанию нормального эмбриологического развития. В исследованиях по старению *in vitro* сперматозоидов кролика, содержащих генетические маркеры, и одновременному осеменению самки как эякулятом от молодых, так и от старых особей, первые имели более высокую оплодотворяющую способность, а процент развития бластоцист был значительно выше [118].

Однако эксперименты, направленные на проверку влияния старения сперматозоидов *in vitro*, показали, оно в данной среде влияет только на фертильность, и если оплодотворение происходит, то развитие протекает нормально [116, 117, 118].

К сожалению, похожие исследования невозможно проводить на человеке, в силу этических и физиологических трудностей, однако имитация естественных условий маточных труб *in vitro*, может помочь решить эту задачу. Из-за тенденции увеличения возраста первородящих пар и большим количеством причин бесплодия необходимо искать новые методы для изучения процессов оплодотворения у человека в разных возрастах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика исследуемого биологического материала

Получение исследуемого биологического материала проводилось в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ в рамках проведения спермограммы и подготовки к проведению экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Все пациенты-доноры биологического материала (спермы) проходили микробиологическое и вирусологическое обследование на наличие антигенов и нуклеиновых кислот вирусов ВИЧ, гепатита В и С, хламидий, микоплазмы, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* в крови и семенной плазме. У всех пациентов результаты на перечисленные анализы были отрицательные. В экспериментах не использовался материал доноров спермы, позитивных по Грам⁺ и Грам⁻ патогенной кокковой микрофлоре в мазках из уретры. Условием невключения, также было наличие лейкоцитов в эякуляте (в количестве более 1 млн/мл) как косвенного признака воспаления, перенесенные заболевания за месяц до сдачи материала, сниженный объём эякулята (менее 2 мл), и присутствие агглютинации сперматозоидов.

Пациентки-доноры фолликулярной жидкости обследовались на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующая отделением – д.м.н., профессор Калинина Е.А.) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (директор – академик РАН Сухих Г.Т.) в период с сентября 2021 по декабрь 2022 года в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» от 2013 года. У всех доноров фолликулярной жидкости был нормальный женский тип телосложения. Среднее значение индекса массы тела

(ИМТ) пациенток в группе младшего репродуктивного возраста составило $22,7 \pm 2,0$ кг/м², а в группе СРВ - $23,2 \pm 1,4$ кг/м², что является нормальным показателем ИМТ.

2.2. Получение биологического материала

2.2.1. Сбор и анализ эякулята

Образцы эякулята, собранные путём мастурбации после 3-5 дней полового воздержания в стерильный контейнер, были получены от 40 пациентов в возрасте 26–68 лет, обратившихся в лабораторию клинической эмбриологии отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени проф. Б.В.Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» МЗ РФ. Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на использование образцов эякулята в научно-исследовательских целях. Разжижение эякулята длилось 15–30 мин. В исследование были включены образцы с концентрацией сперматозоидов более 15 млн/мл и с линейной подвижностью более 25%, а также с подвижностью менее 15% — для исследования сперматозоидов пациентов с астенозооспермией. Все измерения показателей спермы проводили с использованием системы CASA (MICROPTIC) в соответствии с Руководством ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека [41]. Все пациенты имели незначительное снижение характеристик сперматогенеза (подвижность, морфология, концентрация). Предварительно сперматозоиды отделяли от семенной плазмы методом центрифугирования в течение 10 минут при 400g.

Для пациентов с астенозооспермией (N=7) принимались во внимание некоторые важные моменты для предотвращения ложного диагноза. Эякулят не собирался после длительного воздержания (более 7 дней), так как при длительном воздержании количество неподвижных сперматозоидов возрастает. При получении образцов не использовали презервативы, отсутствовало попадание воды и средства для мытья рук в контейнер для сбора образца [41].

2.2.2. Получение фолликулярной жидкости

ФЖ получали от молодых пациенток (n=15) в возрасте 20–33 лет, безотягощённого анамнеза, вредных привычек, с нормальными показателями индекса массы тела, с первой попыткой ЭКО и от женщин СРВ в возрасте 41–47 лет (n=15) с неоднократными попытками ЭКО, не приводившими к беременности. Стимуляция функции яичников была одинаковой для всех женщин и проводилась с использованием стартовой дозы 150-200 МЕ рекомбинантного ФСГ (GONAL-F, Merck Serono) и 75 МЕ менопаузального гонадотропина человека (Menopur 75, Ferring Pharmaceuticals). Овуляцию индуцировали рекомбинантным хорионическим гонадотропином человека в дозе 10 000 МЕ. ФЖ была получена во время трансвагинальной пункции (ТВП) фолликулов после отбора ооцит-кумулюсных комплексов для программ ВРТ. В рамках исследования использовали только остаточную ФЖ, обычно подвергаемую утилизации, без примеси крови и визуализируемых крупных фрагментов клеток гранулёзы, прозрачно-жёлтого цвета. Все участницы исследования подписали добровольное информированное согласие на использование остатков образцов ФЖ в научно-исследовательских целях.

2.3. Выделение внеклеточных везикул фолликулярной жидкости методом дифференциального центрифугирования

Для выделения ВВ из ФЖ использовали метод дифференциального центрифугирования [74]. ФЖ отбирали без содержания примеси крови с помощью визуального анализа. Собранную ФЖ в объёме 5 мл последовательно подвергали нескольким этапам центрифугирования для удаления дебриса (400g в течение 10 мин, 10 000g при 4°C в течение 30 мин). Супернатант использовали для выделения ВВ ультрацентрифугированием при 108 000g. Полученный осадок ресуспензировали в 100 мкл в среде PBS. Образцы ВВ хранили в морозильнике при -80°C.

2.4. Инкубирование сперматозоидов с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости

После разжижения эякулята (15–30 мин) 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 CO₂-инкубаторе без покрытия маслом и добавления культуральных сред. Параллельно инкубировали контрольные образцы в физиологическом растворе без добавления ВВ. Инкубация проводилась в стерильных 4-х луночных планшетах (Thermo Scientific, США), после чего образцы сперматозоидов готовили для дальнейшего изучения в зависимости от эксперимента.

2.5. Оценка подвижности и гиперактивации сперматозоидов методом CASA

После инкубации сперматозоидов с ВВ ФЖ в течение 30 и 60 мин каждый образец анализировали с использованием системы CASA (computer-assisted sperm analysis) (MICROPTIC) для исключения человеческого фактора оценки. Для анализа подвижности 10-20 мкл образцов спермы капали в камеру Маклера и анализировали при увеличении $\times 100$ на положительном фазово-контрастном микроскопе (Leika Leitz DM1L) с подогревом. С помощью CASA исследовали не менее 10 полей зрения на образец, захватывая минимум 150-200 сперматозоидов, и регистрировали общую подвижность, прогрессивную подвижность (PR), а также гиперактивацию сперматозоидов. Для оценки гиперактивации было необходимо захватить от 200 прогрессивно-подвижных сперматозоидов с характерным движением, соответствующим гиперактивированному паттерну флагеллярного биения [75].

2.6. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) сперматозоидов

После инкубации 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. Образцы предфиксировали 0,5% раствором глутарового альдегида в изотоническом растворе NaCl, фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере pH 7,2 и OsO₄, после дегидратации заливали в эпоксидную смолу по стандартной методике. 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), оборудованного камерой Orius SC1000 W (Gatan, Inc.).

2.7. Флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов

Часть образцов сперматозоидов инкубировали совместно с предварительно окрашенными ВВ мембранным красителем и после икубации 60 минут производили фиксацию образцов 70% этанолом и производили окрашивание для иммунофлуоресцентного анализа.

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. Объем образца ВВ довели до 1 мл, используя Diluent C из набора PKH26. Затем, переносили образец в новую ультрацентрифужную пробирку и довели до 1 мл с помощью Diluent C. Добавляли 6 мкл красителя PKH26, после перемешивали в течение 30 секунд путем осторожного пипетирования и оставляли при комнатной температуре на 5 минут. Гашение проводили, добавляя 2 мл 10% BSA (A9418) в PBS (D8537).

После инкубирования сперматозоидов с окрашенными ВВ образцы фиксировали на стекле 70% этанолом и окрашивали ядерным красителем DAPI (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. D1306), с концентрацией 1мг/мл, рабочая концентрация 0,1 мкг/мл. На стекла с фиксированными образцами добавляли по

300 мкл раствора DAPI, инкубировали 7–10 минут в темноте при температуре 37°C, затем отмывали стекла 3 раза раствором PBS. Изображения визуализировали с помощью конфокального микроскопа ZEISS LSM 710.

2.8. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA-анализ) внеклеточных везикул фолликулярной жидкости

После выделения осадка ВВ ФЖ дифференциальным центрифугированием объем образцов доводили до 100 мкл раствором PBS. Каждый образец разбавляли непосредственно перед измерением PBS в соответствии с инструкциями производителя. Используемый исходный коэффициент разбавления составлял 10 в PBS. Образцы (500–700 мкл) вводили в прибор NanoSightLM10 (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания) стерильным шприцем на 1 мл. Настройки захвата и анализа устанавливали вручную в соответствии с протоколом. С помощью прибора NanoSight LM10 визуализировали ВВ ФЖ с помощью рассеяния лазерного света, броуновское движение ВВ записывали на видео. Количество треков всегда превышало 200, оценка размеров и концентрации проводили для каждого образца. Затем записанные видео анализировали с помощью программного обеспечения NanoSight NTA 3.1 (Malvern, Великобритания). Анализ ВВ проводили по 14 видео по 30 с каждое при 25°C.

2.9. 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. К порции везикул добавляли 480 мкл раствора хлороформ-метанол (2:1, об./об.), смесь инкубировали в течение 10 мин, тщательно перемешивая. В полученный раствор добавляли воды. Смесь центрифугировали при 13000 G в течение 10 минут при температуре окружающей среды. отбирали 150 мкл органического нижнего слоя, содержащего липиды, в оставшуюся смесь

добавляли 250 мкл раствора хлороформ-метанол (2:1, об./об.), повторно перемешивали, центрифугировали при 13000 G в течение 10 минут и отбирали ещё 300 мкл нижнего слоя. Органическую фазу высушивали в потоке азота, затем растворяли в 200 мкл смеси ацетонитрил-2-пропанол (1:1, об./об.) для последующего масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ экстрактов липидов

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 на колонке Zorbax C18 (150 x 2,1 мм, 5 мкм, Agilent, США) с градиентом от 15% до 45% элюента В в течение 2 минут, а затем от 45% до 99% в течение 15 минут. В качестве элюента А использовали раствор ацетонитрил/вода (60/40, об./об.) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония. Элюент В представлял собой раствор ацетонитрил/изопропанол/вода (90/8/2 об./об./об.) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты и 10 ммоль/л формиата аммония. Скорость потока элюирования была 35 мкл/мин, объем инжестируемого образца 0,5 мкл. Масс-спектры получали в режиме положительных и отрицательных ионов в диапазоне m/z 100-1700 со следующими установками: напряжение на капилляре 4,1 кВ для режима положительных ионов и 3.0 кВ для режима отрицательных ионов, давление распыляющего газа 0,7 бар, скорость потока осушающего газа 6 л/мин, температура осушающего газа 200 оС. Для идентификации липидов выполняли тандемную масс-спектрометрию в режиме зависящего сканирования с шириной окна 5 Да.

Идентификация липидов

Для предварительной обработки хроматомасс-спектрометрических данных использовали распространяемые программы msConvert из Proteowizard

3.0.9987 для преобразования файлов в MzXml, содержащий информацию о масс-спектре в любой момент времени и ms2, содержащую информацию о спектре фрагментации иона в заданный момент времени, и MzMine для выделения пиков, нормирования на полный ионный ток и создания таблицы, содержащей информацию о пике – массе иона, площади пика и времени выхода. Идентификация липидов производилась средствами скриптов LipidMatch, использующих данные, содержащие данные о спектрах фрагментации ионов пиков, выделенных при помощи MzMine и проверяющих наличие характерных фрагментов по входящей в состав пакета библиотеке спектров. Номенклатура липидов соответствует LIPID MAPS®.

2.10. Определение профилей миРНК во внеклеточных везикулах фолликулярной жидкости

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); по окончании реакции объем образца доводили деионизованной водой до 200 мкл. Синтезированную кДНК (2 мкл) использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с применением прямого праймера (0,2 мкМ, Евроген, Россия), специфичного для hsa-miR-21-5p, hsa-miR-888-5p, hsa-miR-424-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-190b-5p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-99b-3p), и 1х реакционную смесь (SYBR PCR Master Mix) с добавленным 1х универсальным обратным праймером (miScript Universal Primer) из набора miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany). Амплификацию проводили по протоколу: (1) денатурация ДНК в течение 15 мин при 95°C, (2) 40 циклов амплификации: денатурация ДНК при 94°C в течение 15 сек, отжиг прямого и обратного праймеров при оптимизированной температуре в течение 30 сек, удлинение праймеров при 70°C в течение 30 сек с детекцией флуоресцентного сигнала после каждого цикла реакции, (3) построение кривых плавления продукта ПЦР (нагревание реакционной смеси с 65°C до 95°C с шагом

0,1°C, сопровождающееся детекцией флуоресцентного сигнала на каждом шаге) в амплификаторе StepOnePlus™ thermocycler (Applied Biosystems, USA). Специфичность амплификации проверяли при анализе кривых плавления продукта ПЦР. Относительный уровень экспрессии анализируемых мкРНК ($\Delta C_t = C_t(\text{мкРНК}) - C_t(\text{hsa-miR-99b-3p})$) вычисляли по разнице пороговых циклов амплификации кДНК, соответствующих *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-888-5p*, *hsa-miR-424-3p*, *hsa-miR-214-3p*, *hsa-miR-190b-5p*, *hsa-miR-134-5p* и порогового цикла амплификации кДНК, соответствующей нормировочной эндогенной *hsa-miR-99b-3p* в одном и том же образце. РНК *hsa-miR-99b-3p* была выбрана в качестве нормировочной ввиду стабильного уровня экспрессии во всех исследуемых образцах.

2.11. Протеомный анализ внеклеточных везикул фолликулярной жидкости

Приготовления образца для протеомного анализа внеклеточных везикул

Осадок везикул лизировали в буфере RIPA, встряхивали 30 мин при 650 rpm, +4°C, выдерживают 30 с в ледяной воде и снова встряхивают 15 мин. Для восстановления –SH групп вносят до 10 мМ DTT, вортикуют, быстро сбрасывают капли и инкубируют 45 мин при +50 °C. Для алкилирования добавляют до 20 мМ IAA, вортикуют, быстро сбрасывают капли и инкубируют образцы (ThermoMixer) 30 мин в темноте при +25 °C. В образцы добавляют по 500 мкл ледяного ацетона, вортикуют и оставляют при -20°C на ночь. Перед трипсинолизом образцы центрифугируют (16000 g, 10 мин, +4°C), супернатант удаляют аккуратно, не задевая белкового осадка. Белковый осадок ресуспендируют в 50 мкл 40 мМ ABV pH 8,0. Добавляют трипсин 1:50 по белковой массе. Инкубируют 18 часов при +37°C и 350 rpm на ThermoMixer. Образцы закисляют муравьиной кислотой (МК), до 1,5% (v/v) и pH 2,0. Образцы центрифугируют 5 мин при 16000 × g. При формировании нерастворимого осадка, супернатант переносят в белковые пробирки LoBind.

Анализ 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). Настройки источника электроспрея (ESI) были следующими: напряжение на капилляре 4500 В, потенциал смещения торцевой пластины 500 В, расход сухого газа 3,0 л/мин при температуре 180°C. Измерения проводили в диапазоне масса/заряд (m/z) от 100 до 1700. Диапазон подвижности ионов включал значения от 0,60 до 1,60 В·с/см² ($1/k_0$, где k_0 – подвижность ионов). Общее время цикла было установлено равным 1,16 с, а количество сканирований PASEF MS/MS - 10. Для малых количеств образцов общее время цикла было установлено равным 1,88 с.

Для ВЭЖХ загруженный объем образца составлял 1 мкл на инъекцию. Разделение ВЭЖХ проводили с использованием упакованной эмиттерной колонки (C18, 25 см×75 мкм 1,6 мкм) (Ion Optics, Parkville, Australia) методом градиентного элюирования. Подвижная фаза А содержала 0,1% муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В содержала 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Разделение ЖХ было достигнуто при расходе 400 нл/мин с использованием 40-минутного градиента от 4 до 90% фазы В.

Анализ данных

Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 8.5, с использованием следующих параметров: погрешность измерения массы родительского иона – 20 ppm; погрешность массы фрагмента - 0,03 Да. Окисление метионина были установлены как возможные переменные модификации. Поиск проводился с использованием базы данных Swissprot белков человека. Пороговые значения FDR для всех этапов были установлены на уровне 0,01 (1%) или ниже.

2.12. Статистическая обработка данных

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 миРНК в исследуемых группах был выбран непараметрический критерий Манна-Уитни. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Выделение внеклеточных везикул из фолликулярной жидкости женщин

Для выделения ВВ из ФЖ был использован метод дифференциального центрифугирования, который позволил провести NTA-анализ. Поскольку важным параметром, влияющим на репродуктивную функцию женщин, является возраст фолликулярная жидкость была стратифицирована на две группы: молодые пациентки до 35 лет и поздний репродуктивный возраст (старше 36 лет). Была выполнена оценка концентрации и гидродинамического размера частиц ВВ ФЖ женщин разного репродуктивного возраста. Данные представлены на рисунке 1.

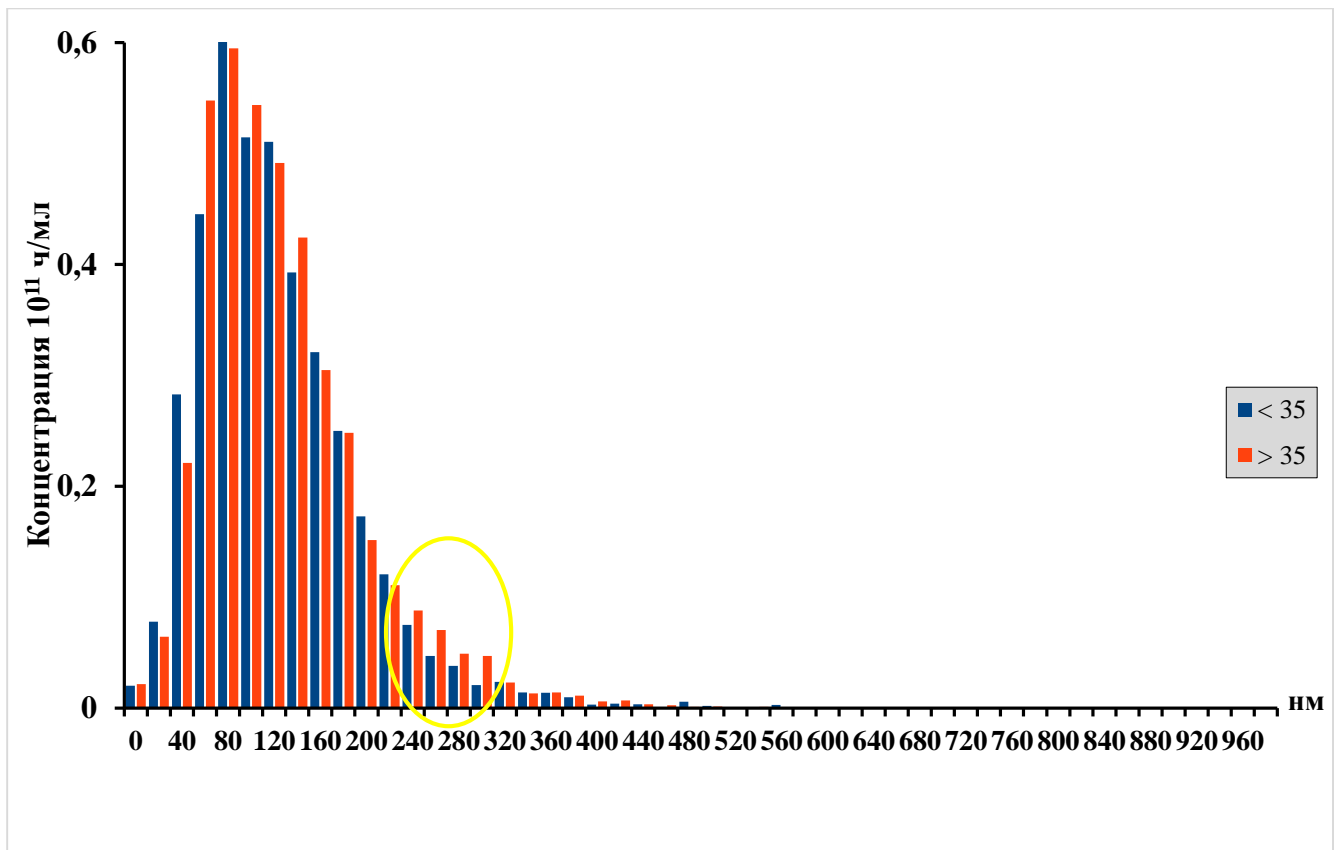


Рисунок 1. Гистограмма размеров и концентрации популяций ВВ ФЖ женщин молодого (синий цвет) и старшего (красный цвет) репродуктивного возраста с использованием метода NTA, полученных последовательным центрифугированием. Желтым кругом обозначена группа ВВ ФЖ, где обнаружены различия

NTA-анализ показал, что значимых различий в концентрации и размерах между возрастными группами нет: 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 $138,78$ нм $\pm 9,92$, SD=17,19 и $127,03$ 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, и соотносится с литературными данными [53, 55, 76]. Однако в группе женщин СРВ наблюдалась тенденция к увеличению количества ВВ ФЖ крупного размера, предположительно, апоптотических телец с размерами между 200 и 300 нм. Данные различия статистически значимые, парный *t* критерий Стьюдента $p=0,005$.

Для определения характеристик и морфологии ВВ ФЖ человека был проведён электронно-микроскопический анализ методом негативного контрастирования ВВ, которые по размерам и характеристикам соответствовали экзосомам и имели чашеобразную морфологию (рис. 2, 3). Отличий морфологии в образцах ВВ ФЖ женщин разного репродуктивного возраста обнаружено не было.

3.2. Морфологические особенности взаимодействия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разного возраста с мужскими половыми клетками

Влияние и взаимодействие ВВ маточных труб и сперматозоидов впервые было показано на представителях семейства кошачьих [20]. Исследователи наглядно продемонстрировали, что ВВ несут в себе белки, связанные с энергетическим обменом, модификацией мембран и репродуктивной функцией сперматозоидов; ВВ связываются с мембранами акросомы и средней части сперматозоидов, и инкубирование сперматозоидов с ВВ улучшает подвижность, оплодотворяющую способность сперматозоидов кошек и предотвращает экзоцитоз акросом *in vitro*.

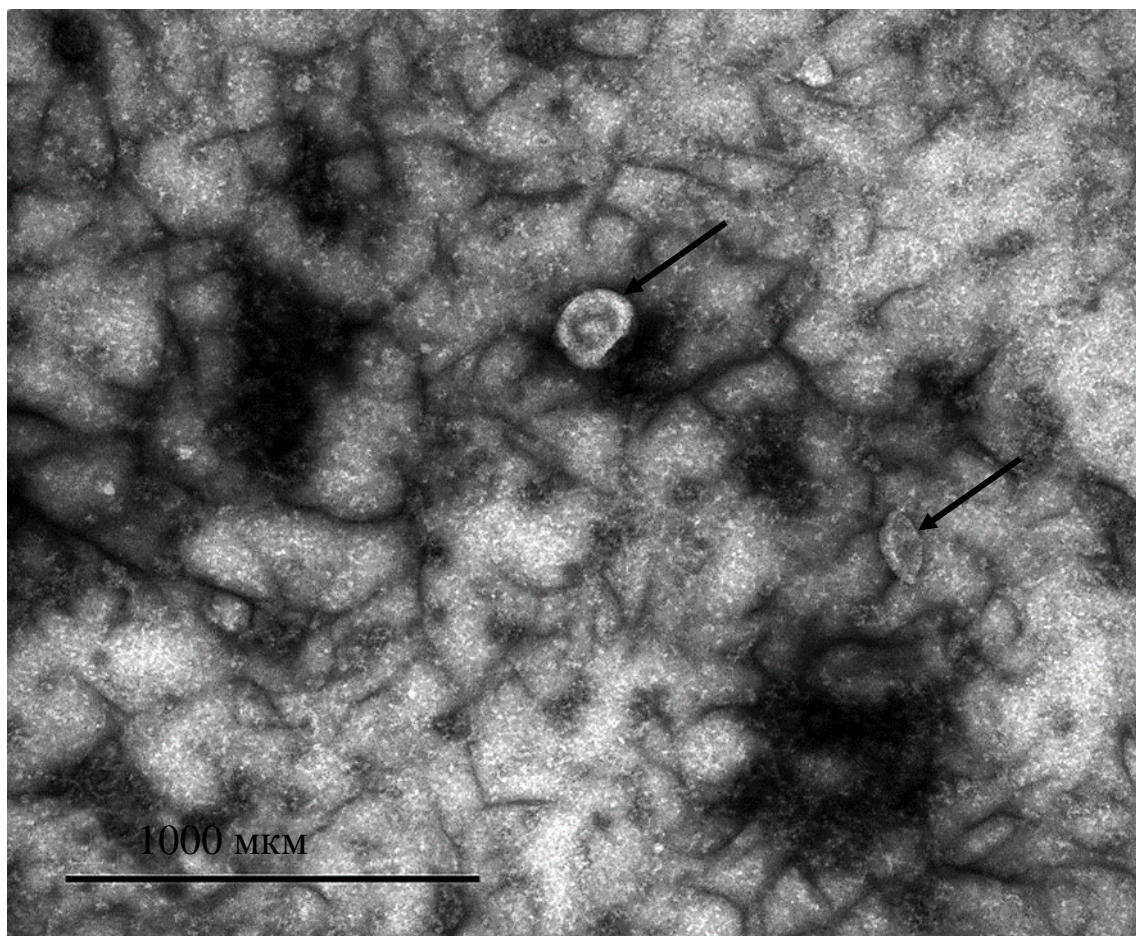


Рисунок 2. Внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости женщины младшего репродуктивного возраста (<35 лет). Трансмиссионная электронная микроскопия. Стрелками отмечены ВВ ФЖ (экзосомы) округлой, чашеобразной морфологии.

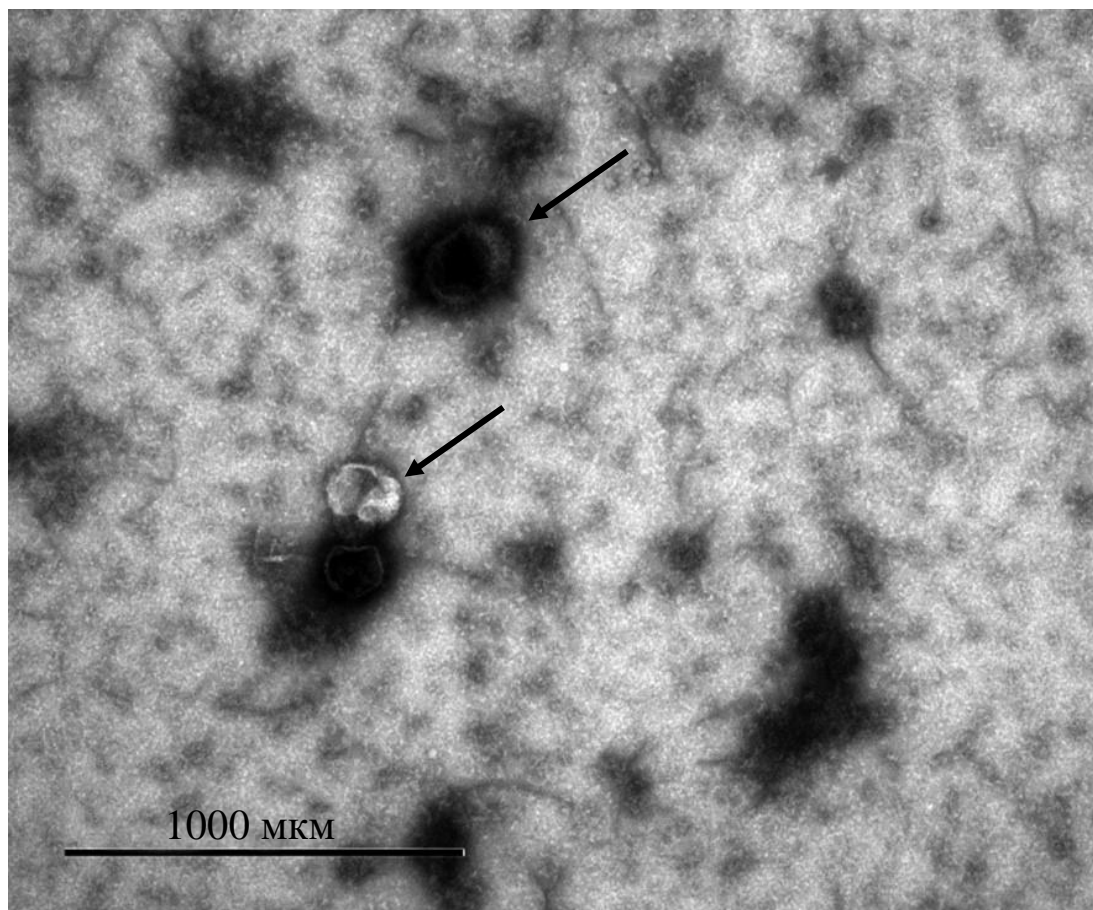


Рисунок 3. Внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости женщины СРВ (>35 лет). Трансмиссионная электронная микроскопия. Стрелками отмечены ВВ ФЖ (экзосомы) округлой, чашеобразной морфологии.

Основываясь на работах о влиянии ВВ семенной плазмы и жидкости яйцевода на подвижность и акросомную реакцию сперматозоидов [20, 67], данное исследование взаимодействия ВВ ФЖ человека со сперматозоидами и их влияние на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток, было выполнено с использованием метода трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Как показали исследования на животных моделях, небольшие ВВ (40–150 нм; экзосомы) способствуют переносу белков, миРНК и других факторов из люминальной жидкости к поверхности сперматозоидов [14, 20, 68].

Инкубация постэякуляторных сперматозоидов с фракцией выделенных ВВ ФЖ (1:2 об/об сперматозоидов к ВВ, $n=30$) в течение 1 ч приводила к высокому проценту связанных с ВВ сперматозоидов. Связывание ВВ обнаруживалось в большей степени в акросомной области головки и в средней части сперматозоида (рис. 4–10). ТЭМ подтвердила наличие ВВ размером от 60 до 180 нм. Связанные ВВ ФЖ не были обнаружены в контрольных образцах (без добавления ВВ ФЖ). На сперматозоидах человека такое взаимодействие ВВ ФЖ показано впервые. Благодаря электронной микроскопии удалось показать, что ВВ ФЖ не только связываются с мембраной головки сперматозоида, но и в дальнейшем запускают процессы капацитации и акросомную реакцию (рис. 8). Однако предполагаемый механизм активации необходимо продолжать изучать.

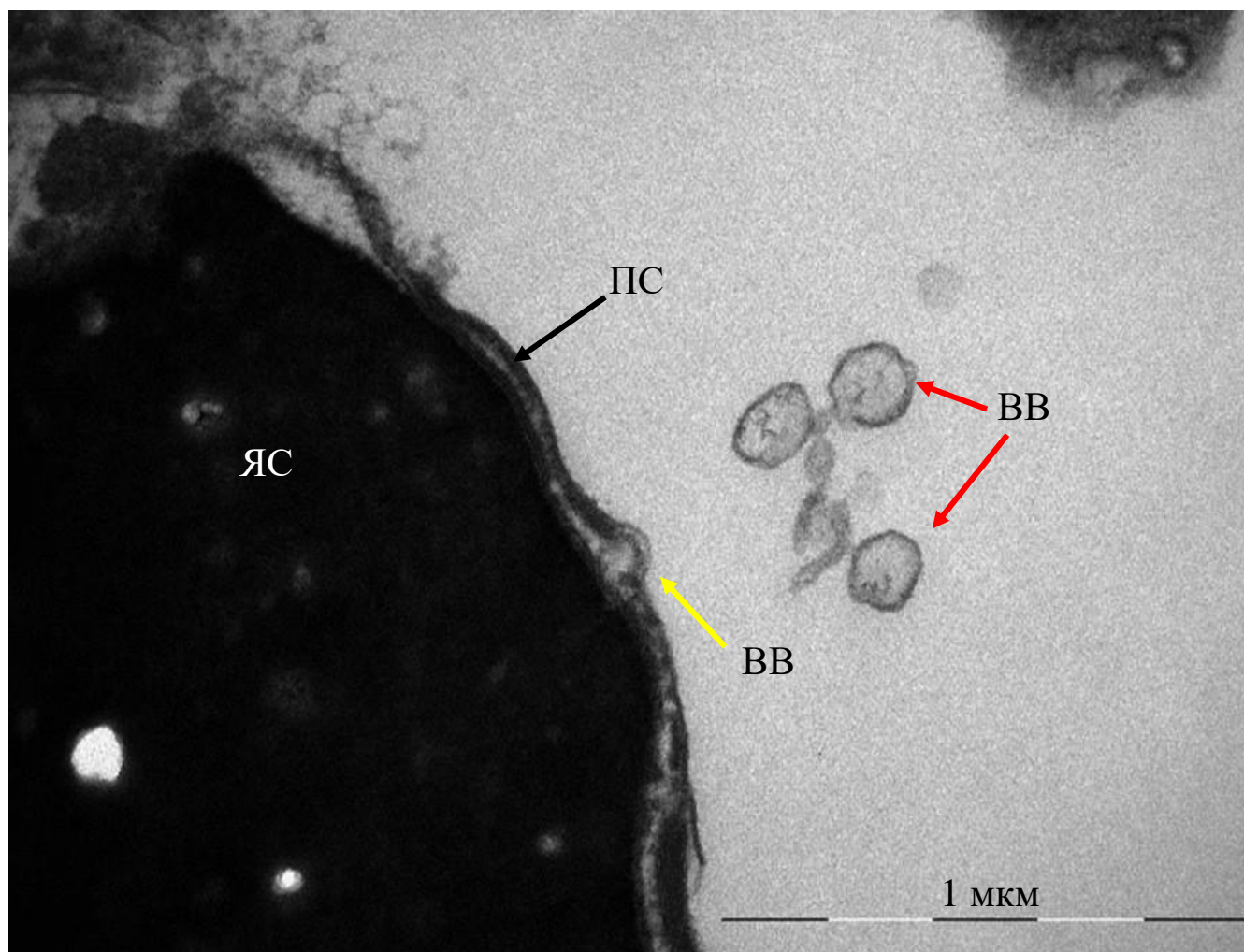


Рисунок 4. Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 30 мин после инкубации. ТЭМ. Желтой стрелкой показано слияние ВВ ФЖ с плазматической мембраной головки сперматозоида. Красными стрелками показаны свободные ВВ ФЖ. ПС — постакросомный сегмент, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ – внеклеточные везикулы.

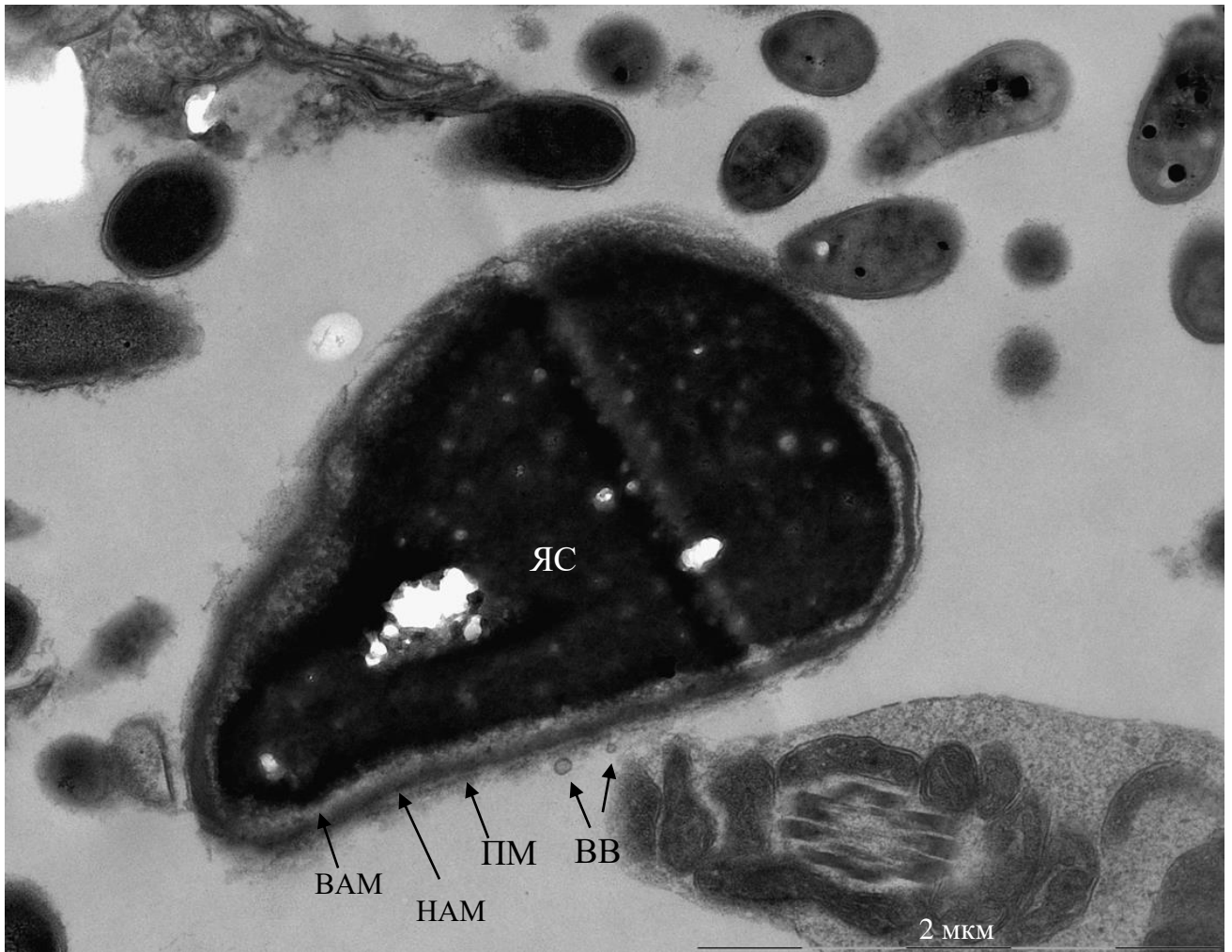


Рисунок 5а. Начало связывания ВВ ФЖ с мембраной сперматозоида через 30 мин после инкубации. ТЭМ, 10х – малое увеличение. ВВ ФЖ указаны стрелками. ПМ — плазматическая мембрана, ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана, НАМ — наружная акросомальная мембрана, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ – внеклеточные везикулы.

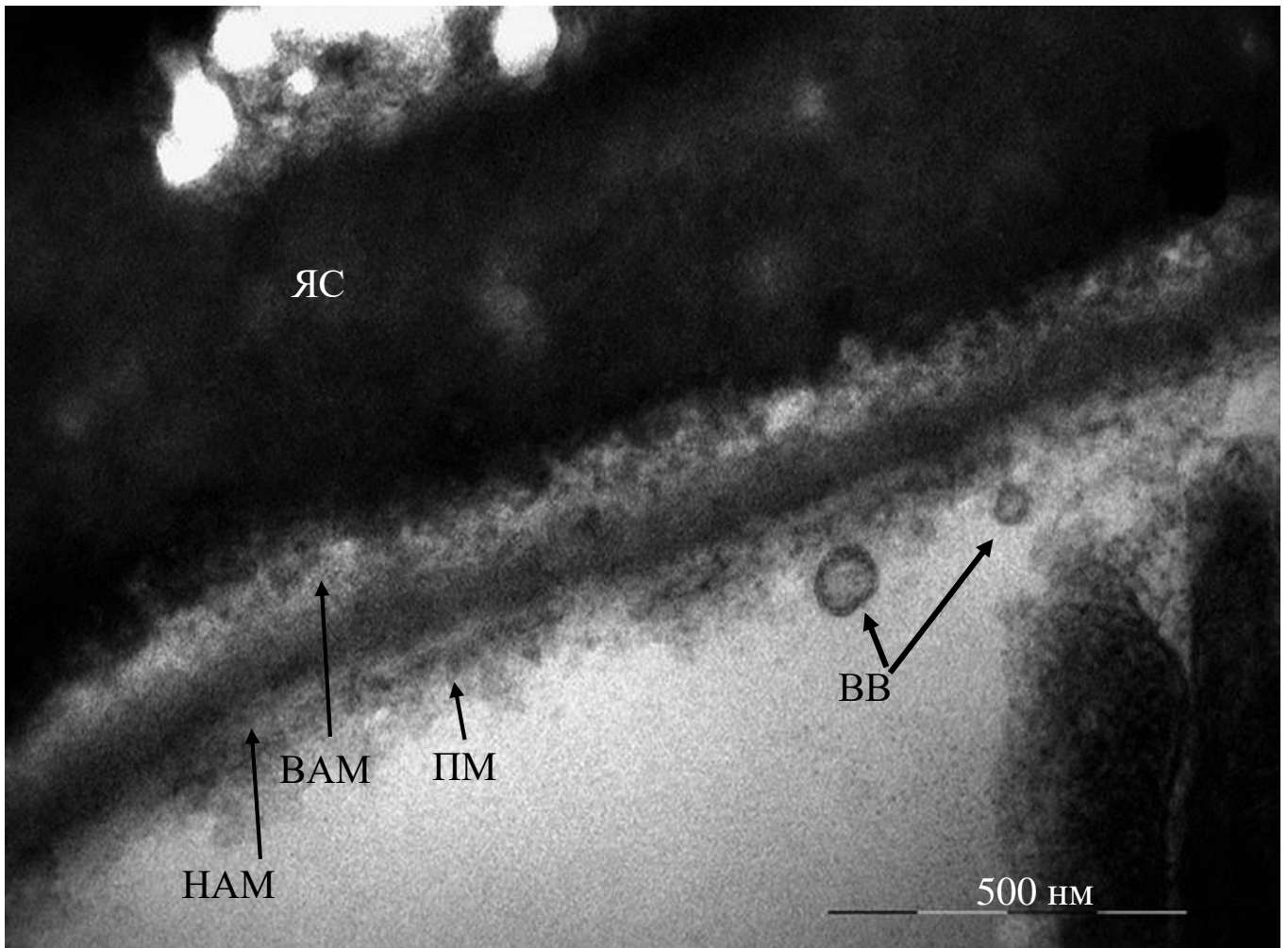


Рисунок 56. Начало связывания ВВ ФЖ с мембраной сперматозоида через 30 мин после инкубации. ТЭМ, 40х – большое увеличение. ВВ ФЖ прикрепляющиеся к ПМ указаны стрелками. ПМ — плазматическая мембрана, ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана, НАМ — наружная акросомальная мембрана, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ – внеклеточные везикулы

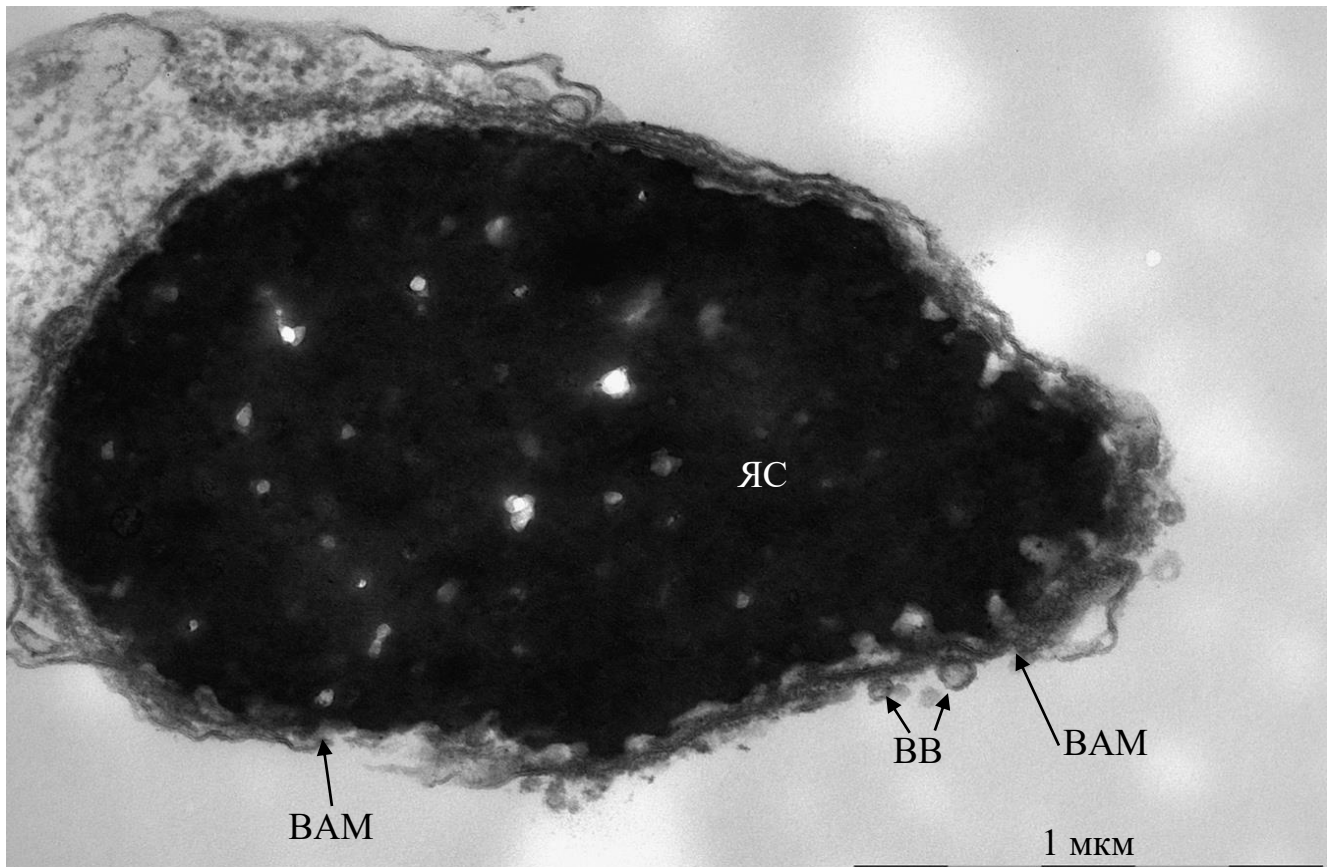


Рисунок 6а. Связывание ВВ ФЖ с мембраной головки сперматозоида через 45 мин после инкубации. ТЭМ, 10х – малое увеличение. Стрелками показано прикрепление ВВ ФЖ к мембране головки сперматозоида (слияние мембран), видна прореагировавшая акросома. ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ – внеклеточные везикулы.

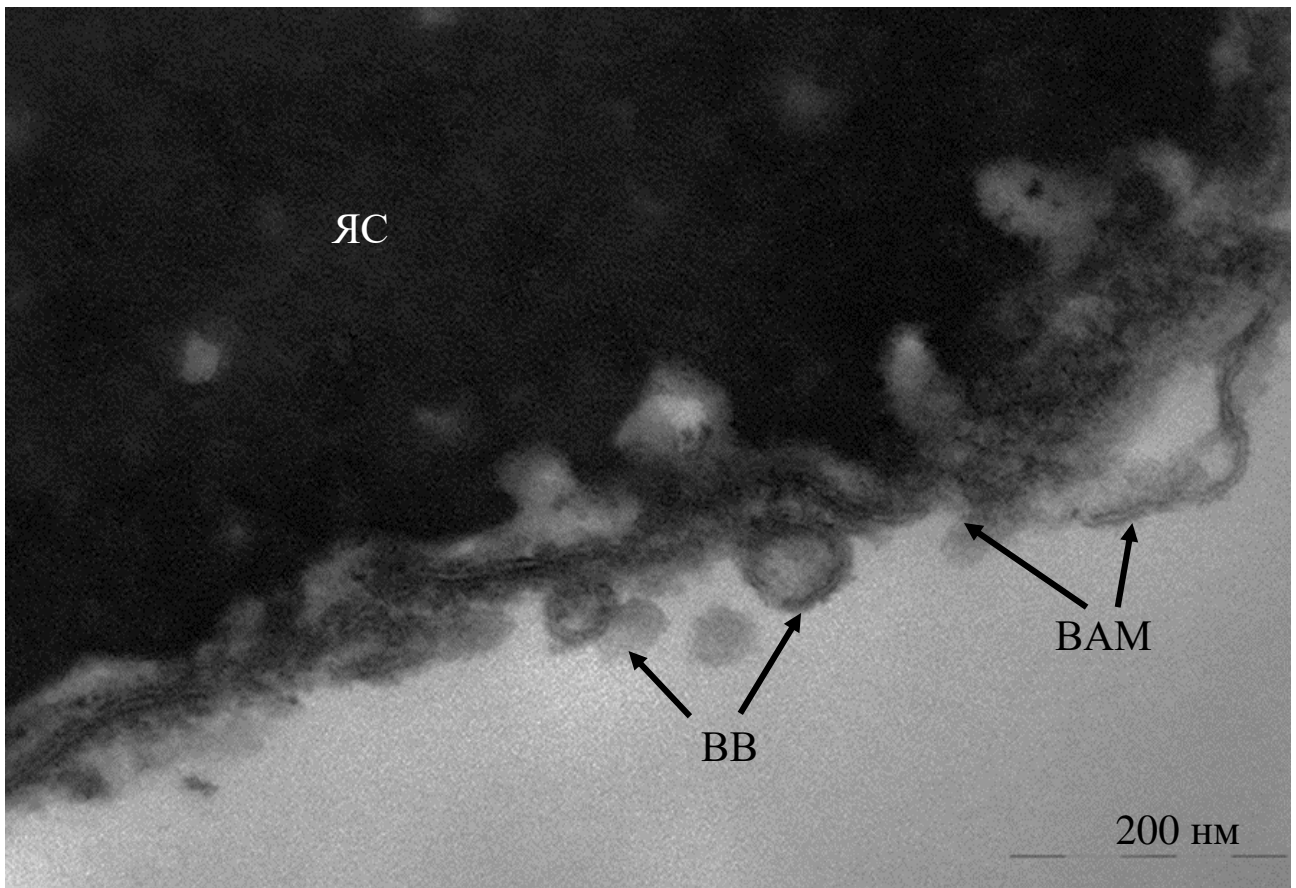


Рисунок 6б. Связывание ВВ ФЖ с мембраной головки сперматозоида через 45 мин после инкубации. ТЭМ, 40х – большое увеличение. Стрелками показано прикрепление ВВ ФЖ к мембране головки сперматозоида (слияние мембран). ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана после прохождения акросомной реакции, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ – внеклеточные везикулы.

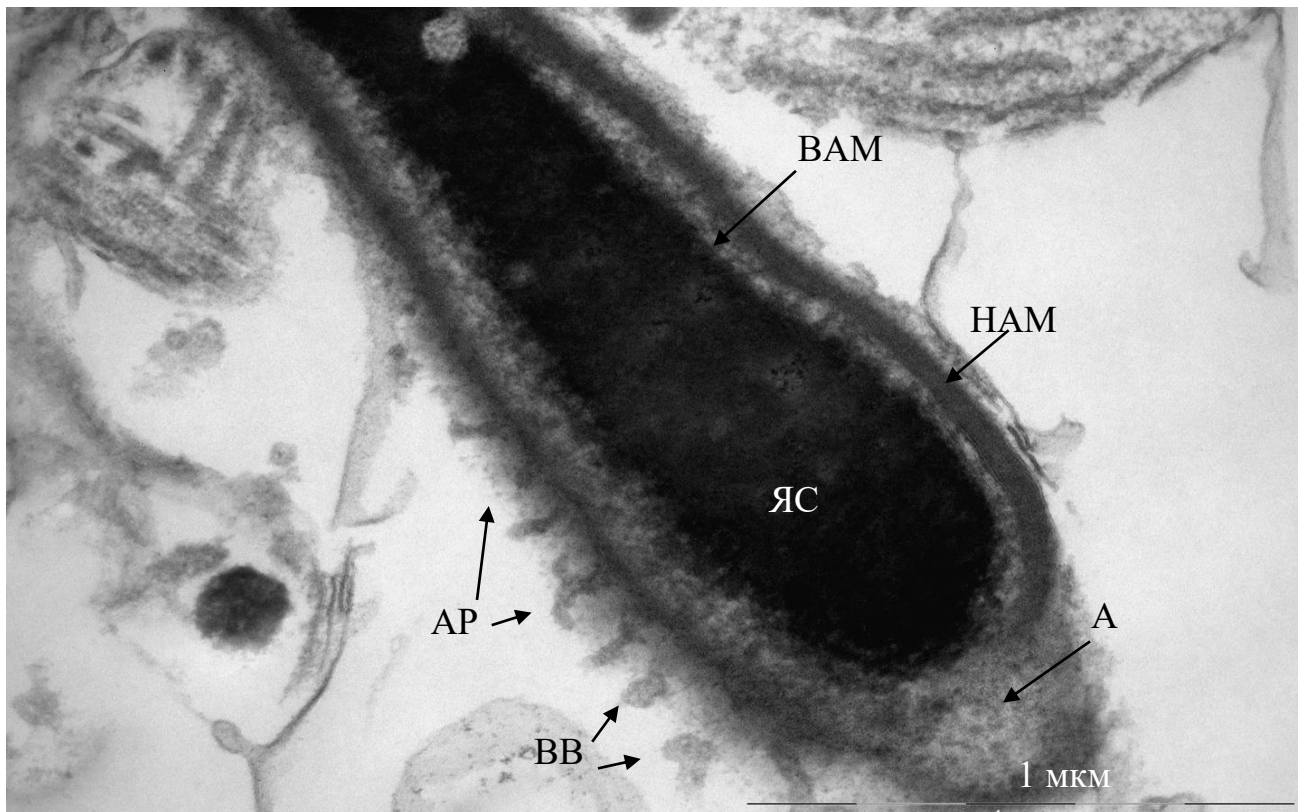


Рисунок 7а. Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 60 мин после инкубации. ТЭМ, 25х – малое увеличение. Связывание ВВ происходит преимущественно с акросомной областью головки. Стрелками показано начало акросомальной реакции. НАМ – наружная акросомальная мембрана, ВАМ – внутренняя акросомальная мембрана, ВВ – внеклеточные везикулы, А – акросома, АР – акросомная реакция (начало), ЯС — ядро сперматозоида.

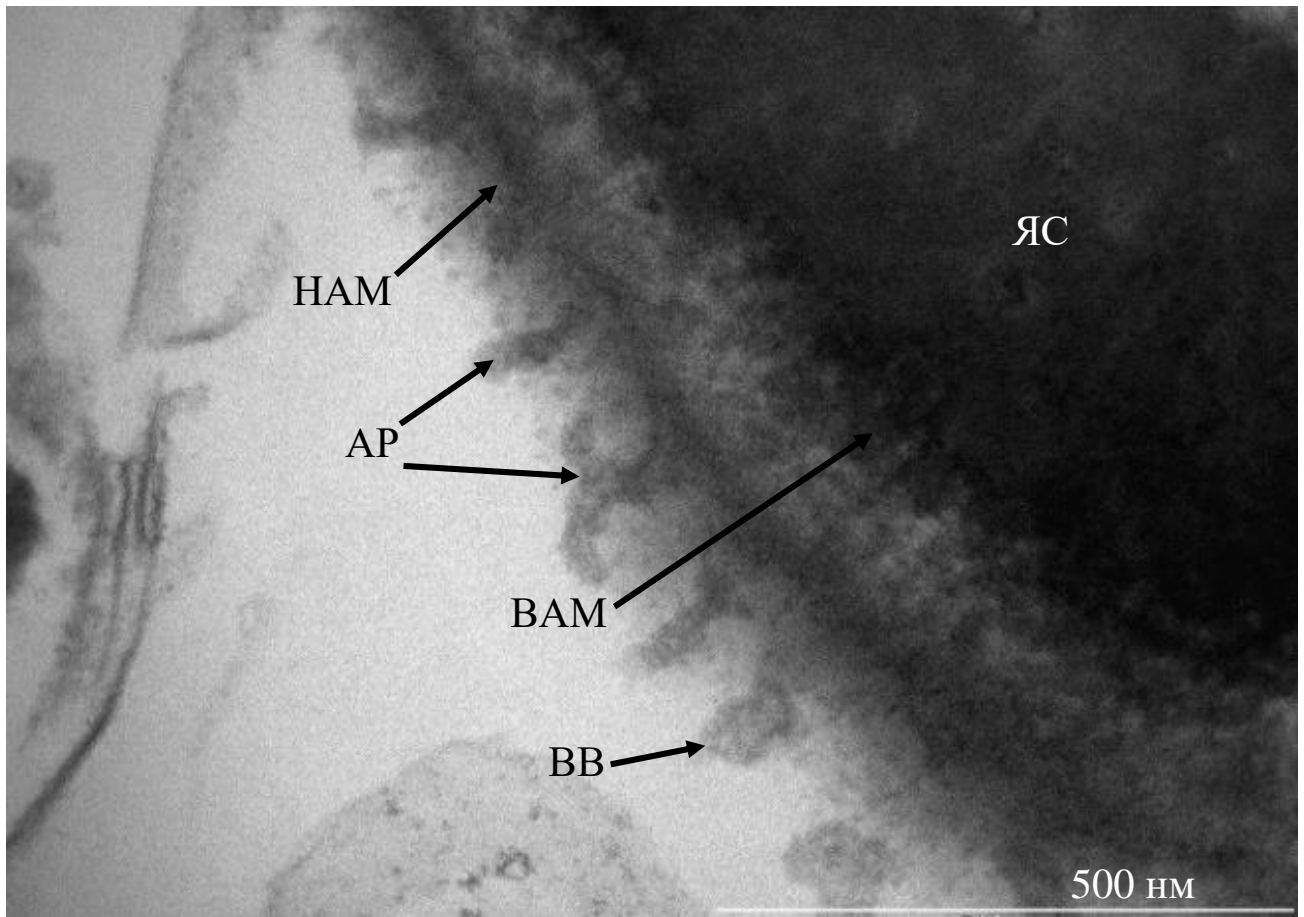


Рисунок 76. Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 60 мин после инкубации. ТЭМ, 50х – большое увеличение. Связывание ВВ происходит преимущественно с акросомной областью головки. Стрелками показано начало акросомальной реакции. НАМ – наружная акросомальная мембрана, ВАМ – внутренняя акросомальная мембрана, ВВ – внеклеточные везикулы, АР – акросомная реакция (начало), ЯС — ядро сперматозоида.

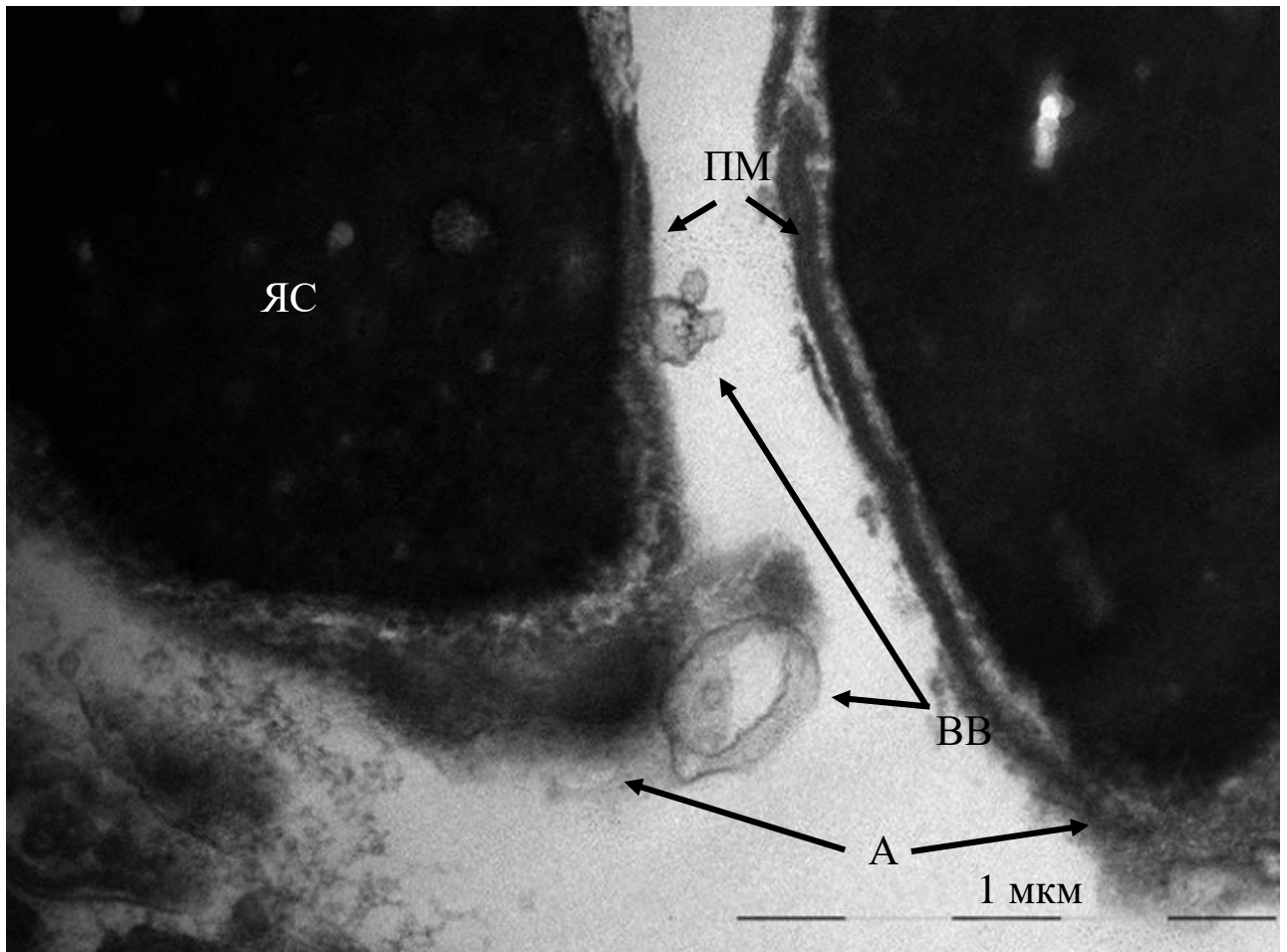


Рисунок 8. Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 60 мин после инкубации. ТЭМ. Стрелками показано связывание ВВ с акросомной областью головки. Места связывания указаны стрелками. АР — акросомная реакция, ПМ — плазматическая мембрана сперматозоида, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ — внеклеточные везикулы, А — акросома.

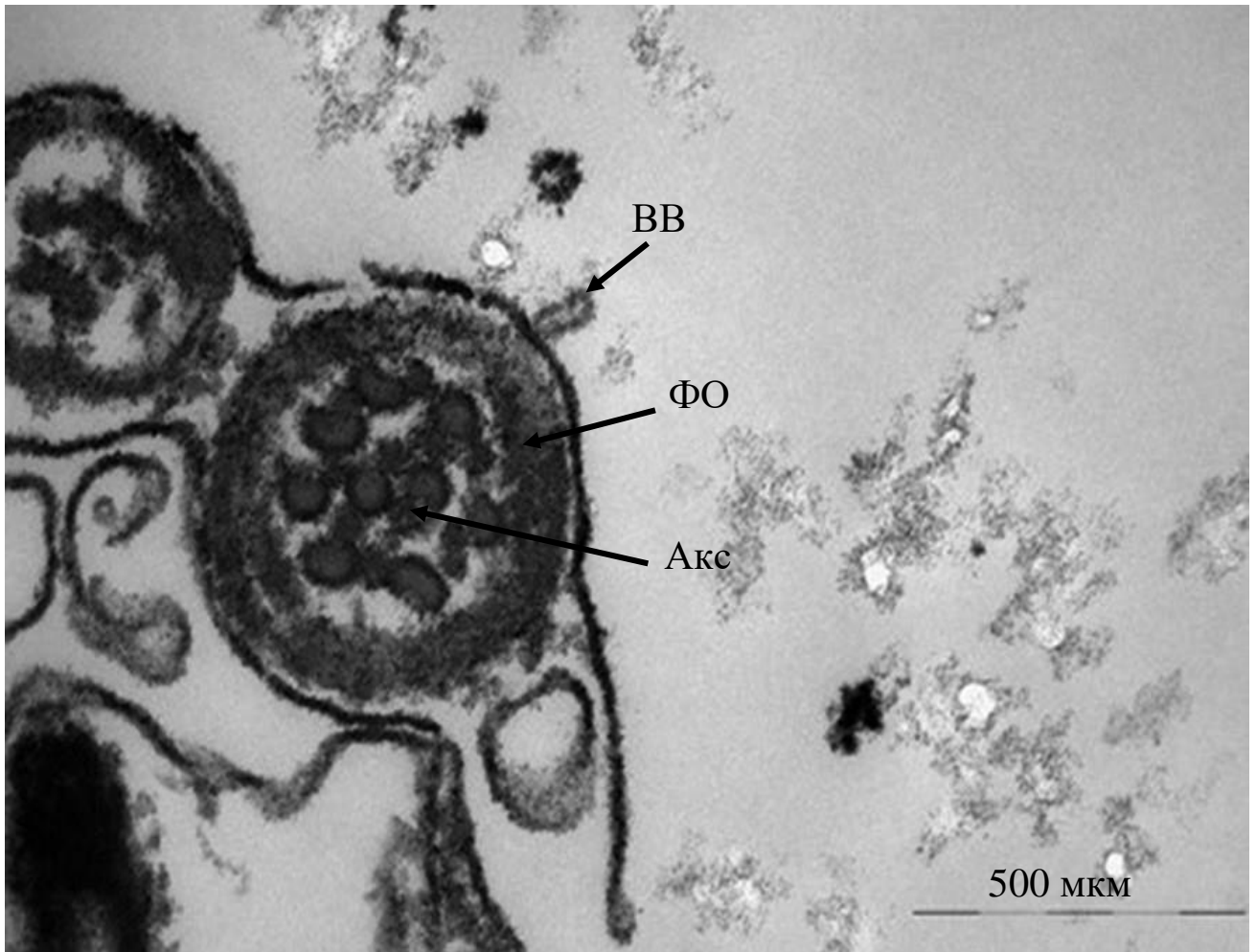


Рисунок 9. Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 60 мин после инкубации. ТЭМ. Показано связывание ВВ областью аксонемы сперматозоида, , окруженной фиброзной оболочкой. Акс — аксонема жгутика сперматозоида, ВВ — внеклеточные везикулы, ФО — фиброзная оболочка

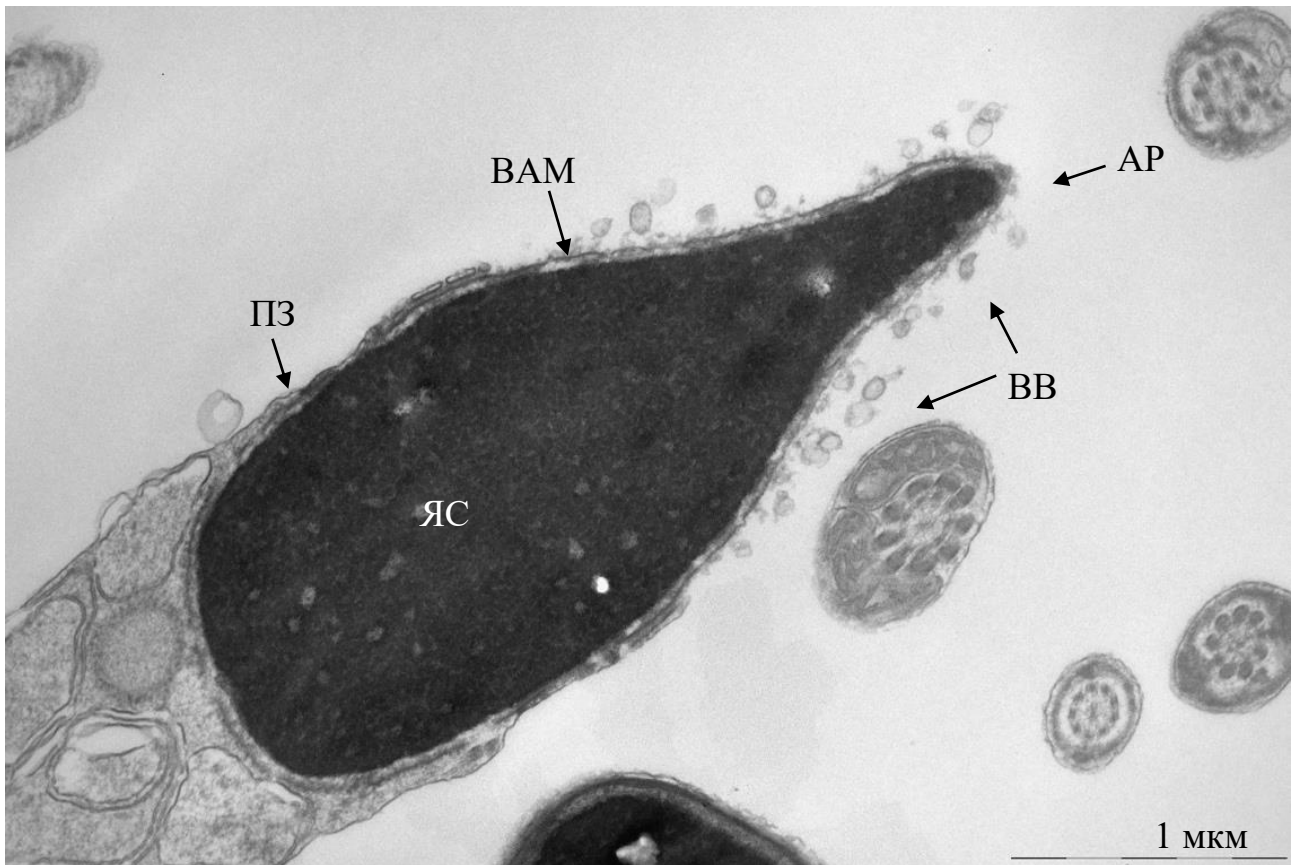


Рисунок 10а. Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 60 мин после инкубации. ТЭМ, 12х - малое увеличение. Показано прохождение акросомной реакции. Места связывания указаны стрелками. ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана, ПЗ — постакросомальная зона, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ — внеклеточные везикулы, АР — акросомная реакция.

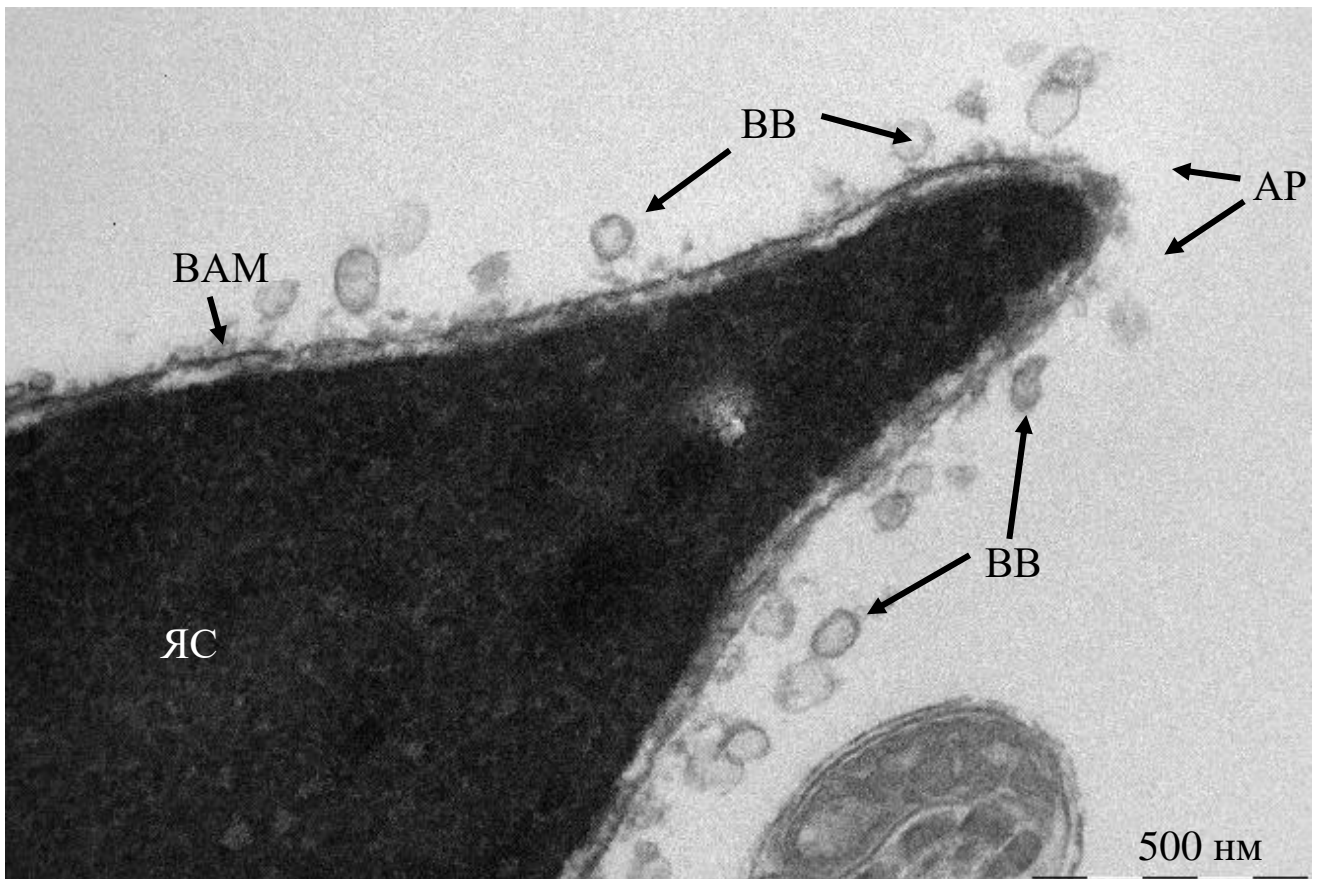


Рисунок 10б. Связывание ВВ ФЖ со сперматозоидами через 60 мин после инкубации. ТЭМ, 25х - большое увеличение. Показано прохождение акросомной реакции. Места связывания указаны стрелками. ВАМ — внутренняя акросомальная мембрана, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ — внеклеточные везикулы, АР — акросомная реакция.

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. Интересно также 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. Данный вывод, также подтверждается незначительными улучшениями показателей прогрессивной подвижности сперматозоидов после инкубации. Показательным 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. 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 (рис. 11, 12; рис. 13, 14). Интересно также, 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. На рис.11 и 12 отмечается сохранение акросомы, т.е. акросомная реакция не прошла, но единичные ВВ ФЖ прикрепляются к плазматической мембране 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 значительно выражено в группе младше 35 лет, чем в группе женщин СРВ (рис. 15, 16, 17).

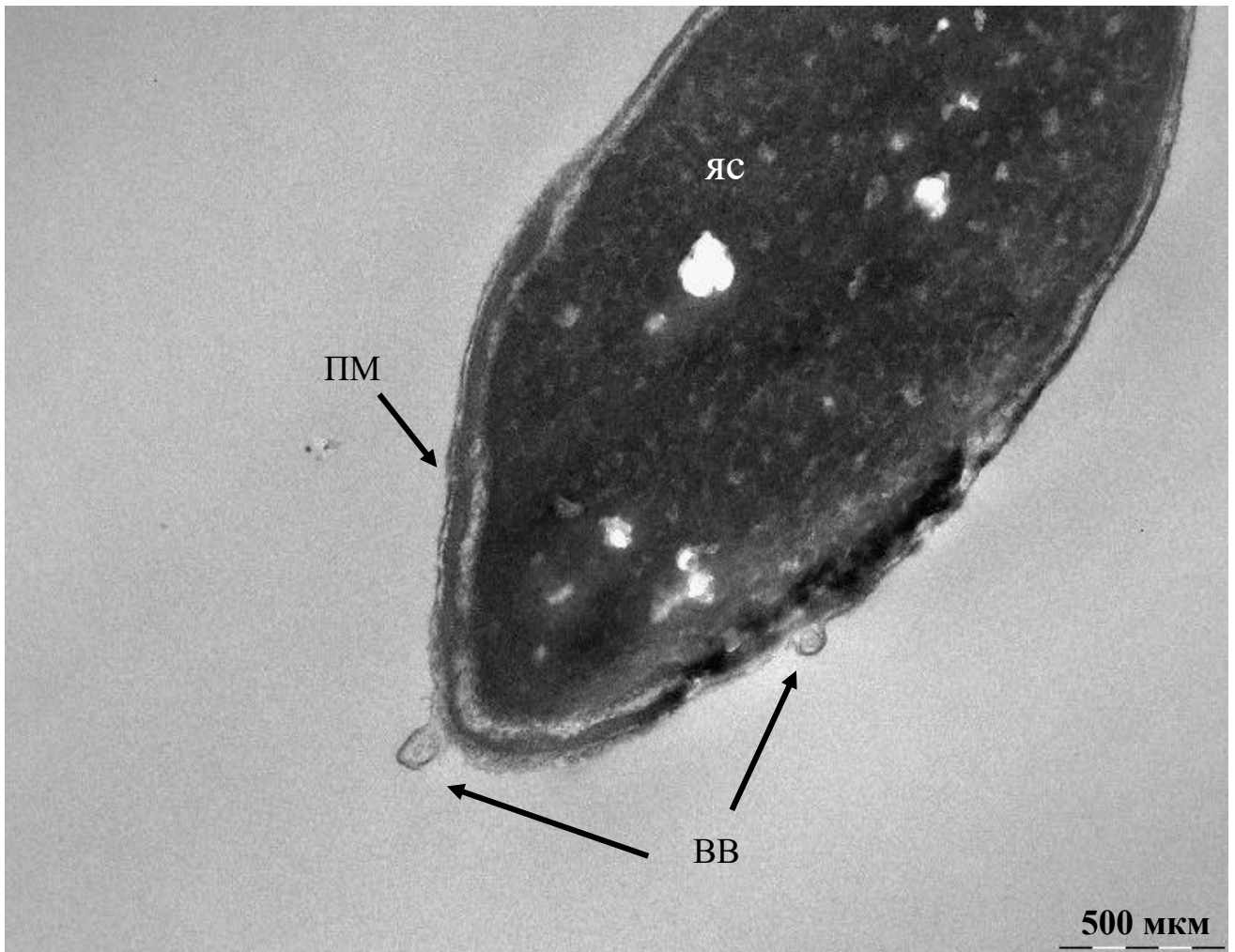


Рисунок 11. Связывание единичных ВВ ФЖ женщин СРВ (>35 лет) с мембраной сперматозоида через 120 мин после инкубации. ТЭМ. ПМ – плазматическая мембрана, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ – внеклеточные везикулы.

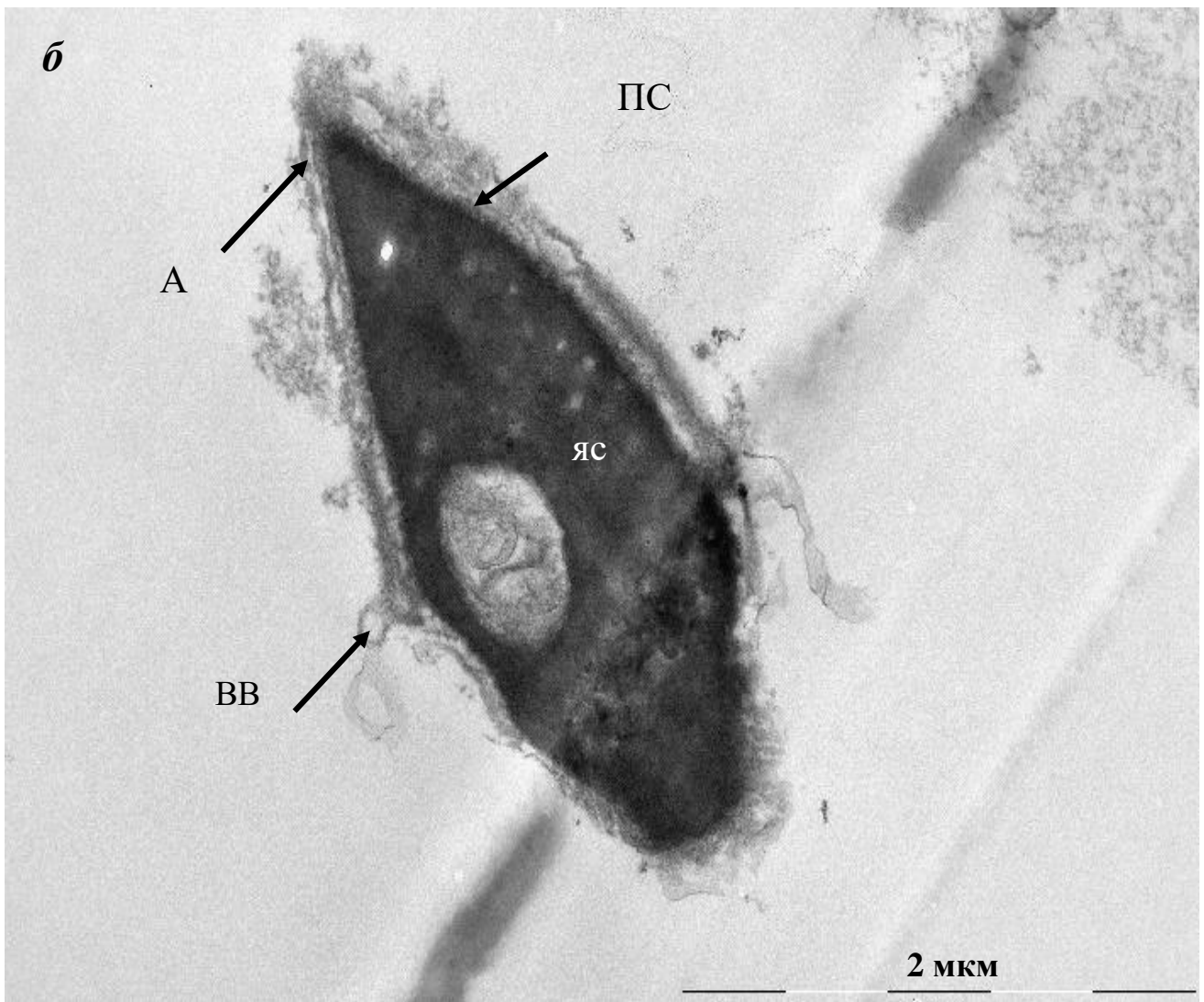


Рисунок 12. Связывание связью единичных ВВ женщин СРВ (> 35 лет) с постакросомальной мембраной сперматозоида через 120 мин после инкубации. ТЭМ. А — акросома, ЯС — ядро сперматозоида, ВВ — внеклеточные везикулы, ПС — постакросомальная мембрана.

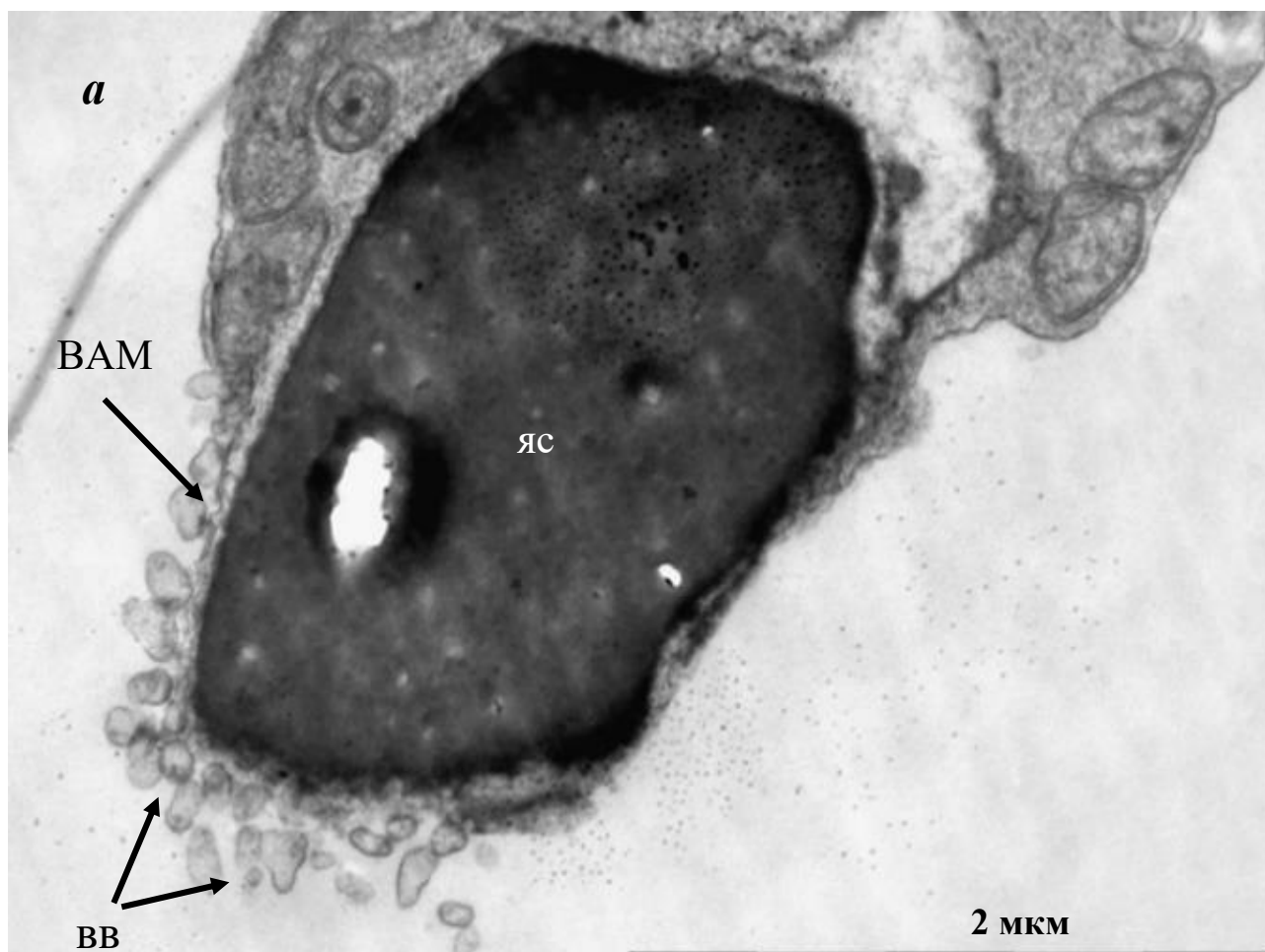


Рисунок 13. Связывание ВВ ФЖ женщин младшего репродуктивного возраста (<35 лет) с внутренней акросомальной мембраной сперматозоида после прохождения акросомной реакции через 120 мин после инкубации. ТЭМ; многочисленные ВВ присоединяются к внутренней акросомальной мембране. ВМ — внутренняя акросомальная мембрана, ВВ — внеклеточные везикулы, ЯС — ядро сперматозоида.

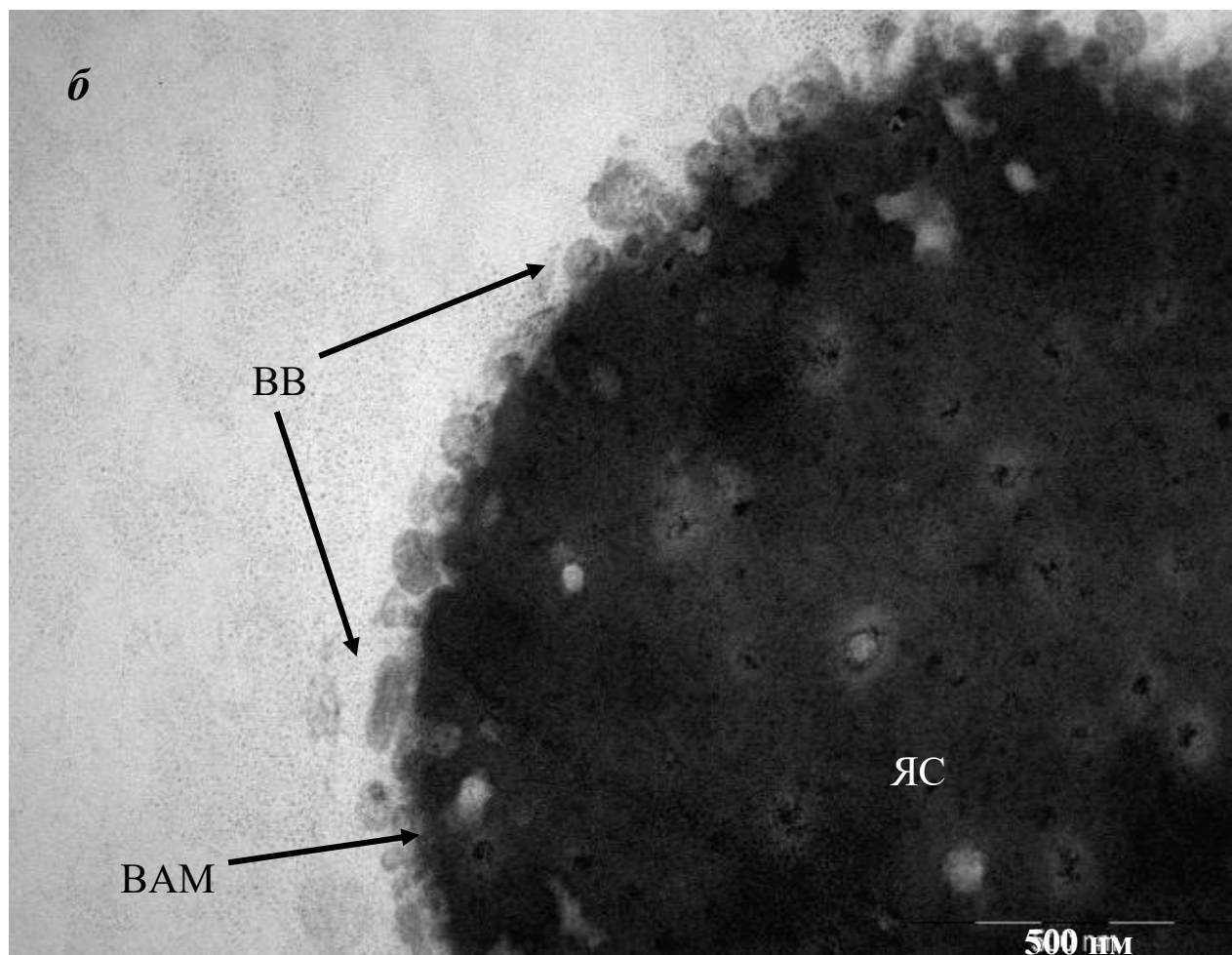


Рисунок 14. Связывание ВВ ФЖ женщин младшего репродуктивного возраста (<35 лет) с внутренней акросомальной мембраной сперматозоида после прохождения акросомной реакции через 120 минут инкубации. ТЭМ.; многочисленные ВВ присоединяются к внутренней акросомальной мембране. ВММ — внутренняя акросомальная мембрана, ВВ — внеклеточные везикулы, ЯС — ядро сперматозоида.

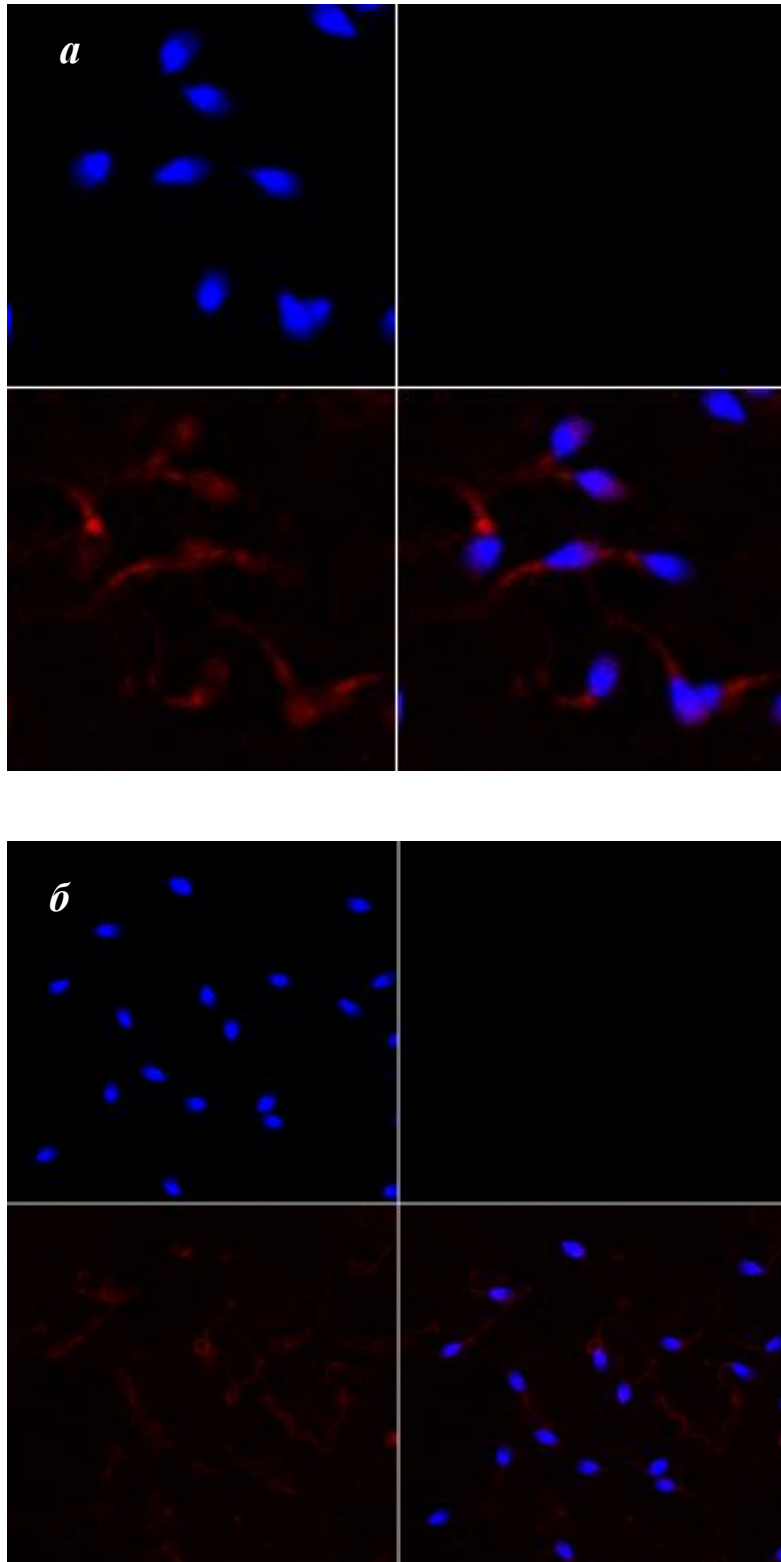


Рисунок 15. Флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов после инкубации 60 минут с ВВ ФЖ женщин младшего (а) и старшего (б) репродуктивного возраста. Окрашивание ядра DAPI (синий), окрашивание мембраны ВВ РКН26 (красный) в местах связывания

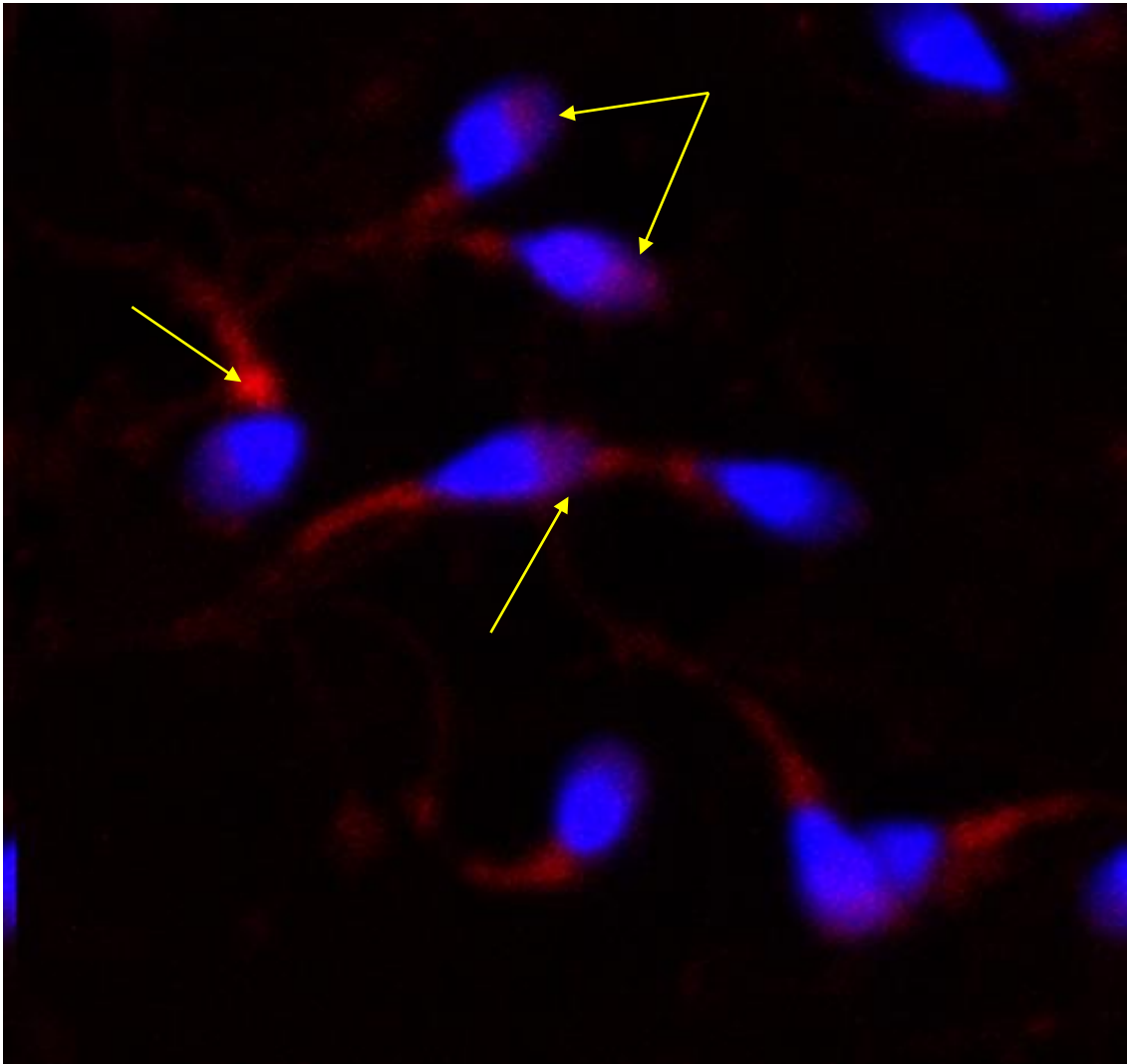


Рисунок 16. Флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов после инкубации 60 минут с ВВ ФЖ женщин младшего репродуктивного возраста (<35 лет). Окрашивание ядра DAPI (синий), окрашивание мембраны ВВ РКН26 (красный) в местах связывания. Желтыми стрелками показаны места связывания ВВ ФЖ с областью акросомы и шейки.

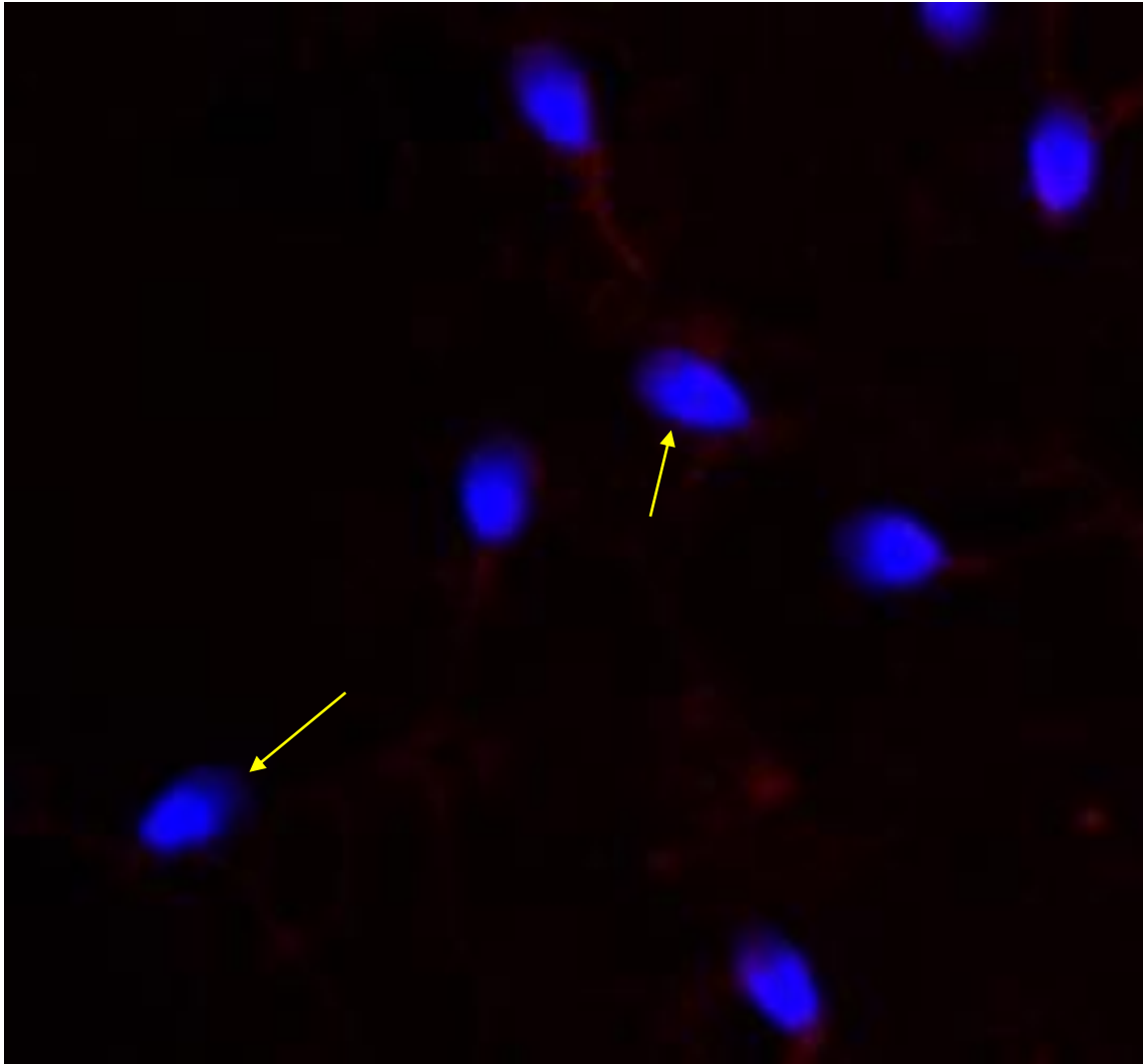


Рисунок 17. Флуоресцентное витальное окрашивание сперматозоидов после инкубации 60 минут с ВВ ФЖ женщин СРВ (>35 лет). Окрашивание ядра DAPI (синий), окрашивание мембраны ВВ РКН26 (красный) в местах связывания. В группе СРВ сигнал от мембран ВВ (красный) выражен очень слабо по сравнению с молодой возрастной группой. Желтыми стрелками показаны потенциальные места связывания ВВ ФЖ с областью акросомы и шейки

3.3. Оценка показателей подвижности и гиперактивации сперматозоидов при взаимодействии с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости женщин разного возраста

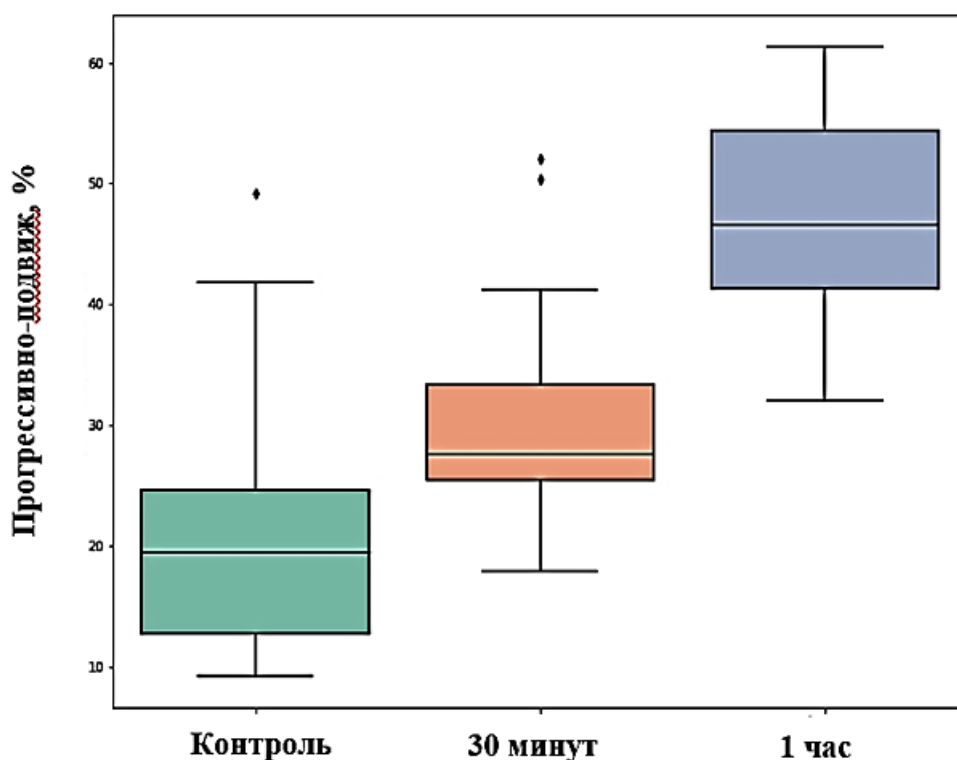
Функциональные характеристики сперматозоидов обычно зависят от их прогрессивной подвижности, целостности акросомы и способности претерпевать капацитацию и акросомный экзоцитоз [67]. Известно, что ФЖ человека содержит различные биологически активные молекулы, которые регулируют не только рост фолликула и созревание ооцита, но и морфофункциональные характеристики сперматозоидов в процессе оплодотворения яйцеклетки в яйцевом [69, 70, 71], поддерживая взаимодействие гамет и раннее развитие эмбриона.

Опубликованные ранее работы показали, что инкубирование отделённых от семенной плазмы сперматозоидов с ФЖ увеличивает их подвижность через 6-9 ч, в отличие от контроля (инкубирование в буфере с БСА) [26]. Через 1, 3, 5 ч инкубирования с ВВ достоверных различий в подвижности выявлено не было [26]. Учитывая данные литературы, в данной работе были подобраны короткие периоды инкубации (30 и 60 мин), чтобы показать улучшение параметров подвижности сперматозоидов и использовать полученные результаты в клинической практике лаборатории эмбриологии ВРТ для пациентов с мужским фактором бесплодия, выраженным в нарушении подвижности сперматозоидов [26, 71, 73]. Для исследования, могут ли ВВ ФЖ улучшить и поддерживать подвижность сперматозоидов человека *in vitro*. сперму инкубировали в течение 30 или 60 мин с ВВ, предварительно выделенными из ФЖ, полученной от женщин-доноров в процессе ТВП.

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 30 мин, $22,782 \pm 11,308$ и

32,676±8,144 для 30 мин инкубации по сравнению с контролем) (рис. 18а). 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 (рис. 18б, 18в). Важно отметить, что в данном эксперименте у мужчин пациентов не было выраженной патозооспермии, показатели спермограммы были приближены к норме.

Значительное увеличение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов относительно контроля и изменение общей подвижности (рис. 18в) было, также предположительно связано с усилением гиперактивации сперматозоидов [20].



a

Рисунок 18а. Достоверное увеличение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов через 30 мин и 60 мин инкубации с ВВ ФЖ в сравнении с контролем (параллельная инкубация без ВВ).

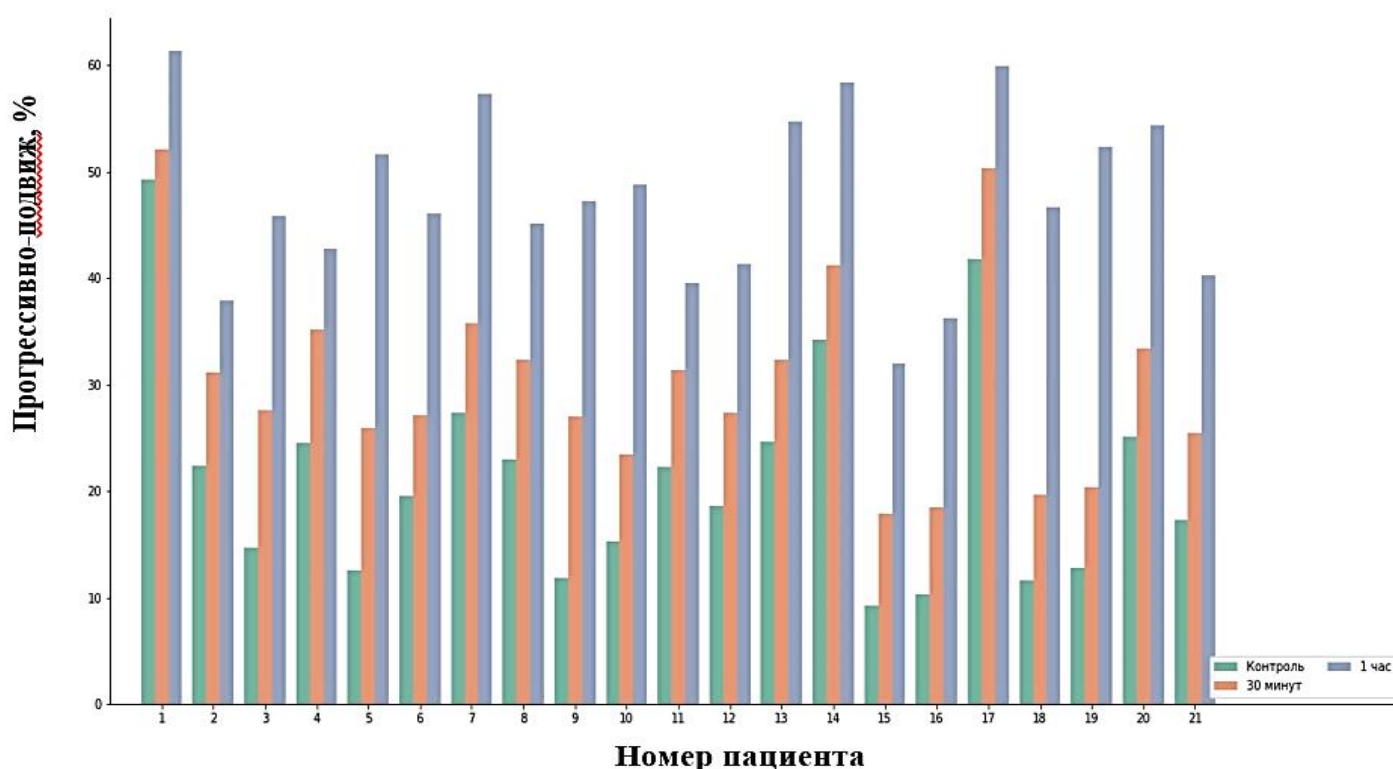


Рисунок 186. Достоверное увеличение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов через 30 мин и 60 мин инкубации с ВВ ФЖ в сравнении с контролем (параллельная инкубация без ВВ) по каждому пациенту; парный t критерий Стьюдента, $p < 0,001$ и $p = 0,005$ для 30 и 60 мин соответственно; ($n=21$).

Предположение об увеличении гиперактивации сперматозоидов после инкубирования с ВВ ФЖ также подтверждается изменением траектории движения сперматозоидов относительно контроля, полученных с помощью системы CASA (рис. 19). Траектория движения имела спиралевидную форму, стала заметнее хаотичность движения через 1 час инкубации.

Возрастные изменения, отражающиеся на энергетических, метаболических и других важных биологических процессах, косвенно дают нам основание полагать, что и функциональная роль ВВ ФЖ и состав ВВ с

возрастом изменяется [14, 29]. 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 СРВ.

6

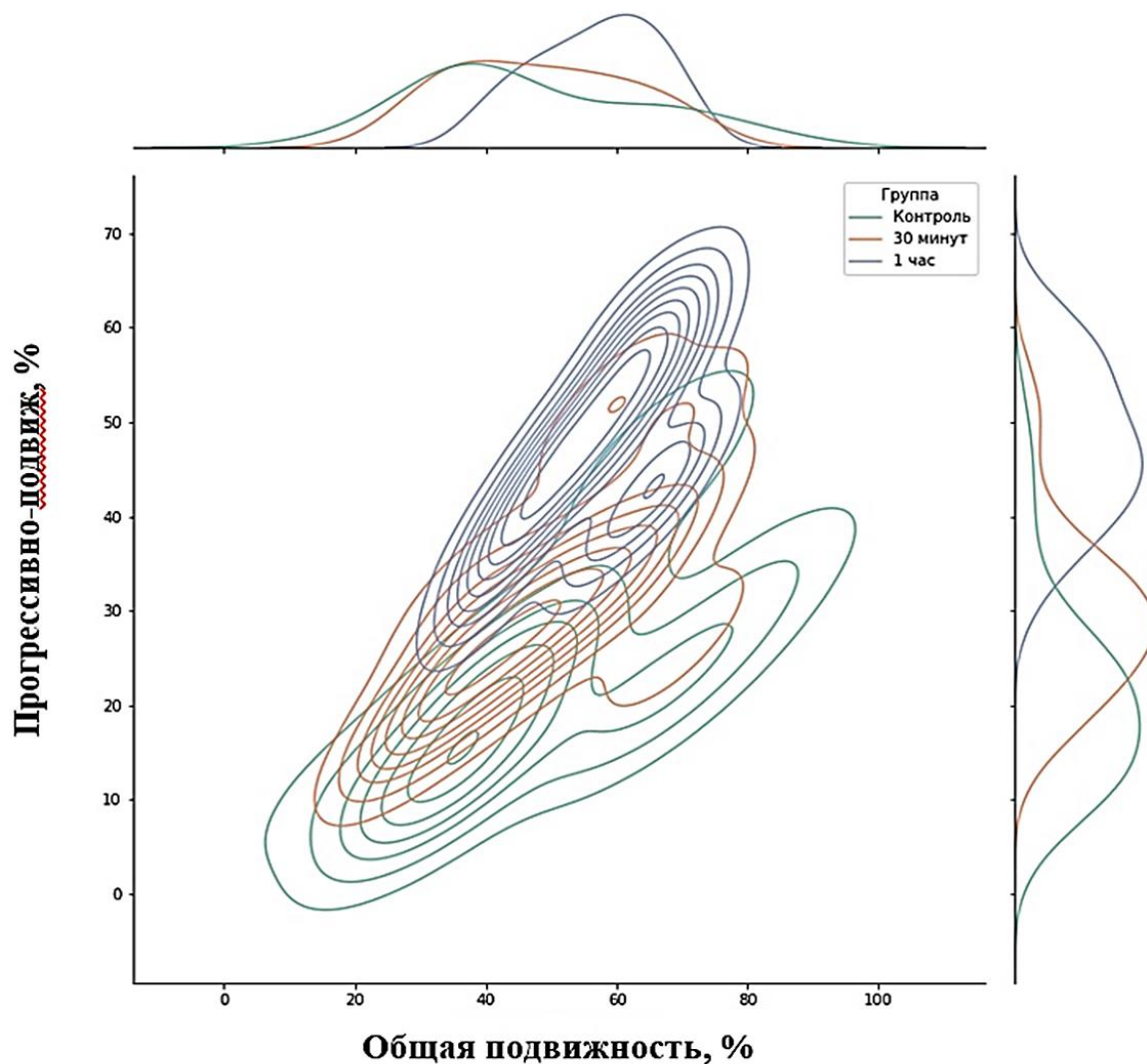


Рисунок 18в. Изменение общей подвижности (%) и количества прогрессивно-подвижных (%) сперматозоидов по всем образцам в зависимости от времени инкубации (30 и 60 мин) с ВВ ФЖ и по сравнению с контролем (инкубация без ВВ ФЖ).

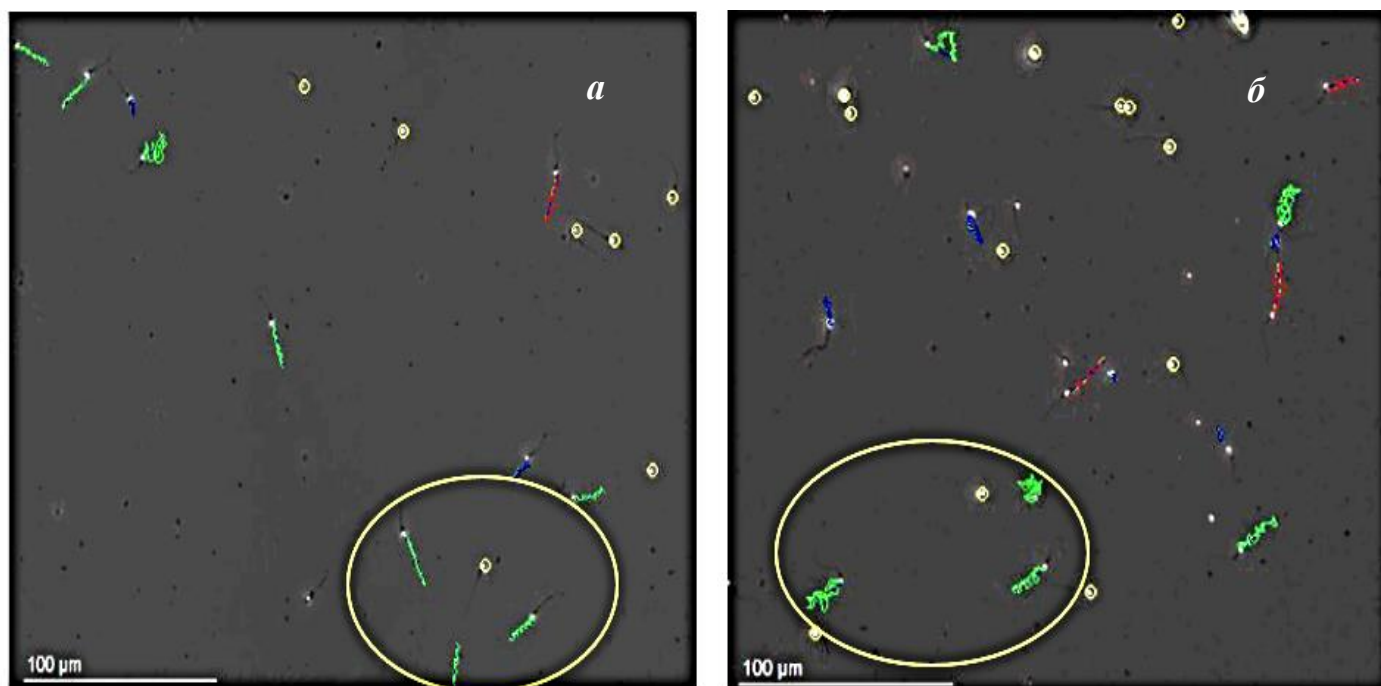


Рисунок 19. Изменение траектории движения сперматозоидов после 60-минутной инкубации с ВВ ФЖ по сравнению с контролем. а — контроль (параллельная инкубация без добавления ВВ), б — 60-минутная инкубация сперматозоидов с добавлением ВВ. Изменённые траектории сперматозоидов выделены кругом.

На следующем этапе работы было проведено сравнение показателей прогрессивной и общей подвижности сперматозоидов после 1 часа инкубации с ВВ ФЖ молодых женщин и СРВ. В качестве контроля инкубировали сперматозоиды без добавления ВВ ФЖ. Инкубация сперматозоидов с ВВ ФЖ молодых женщин приводила к значимому увеличению количество прогрессивно-подвижных сперматозоидов (парный t критерий Стьюдента, $p < 0,001$; среднее значение признака до и после эксперимента – $27,524 \pm 10,401$ и $44,797 \pm 10,028$ для инкубации с ВВ ФЖ молодых женщин, $27,524 \pm 10,401$ и $32,248 \pm 9,313$ для инкубации с ВВ ФЖ женщин СРВ, соответственно, по сравнению с контролем), показателей общей подвижности ($p = 0,05$; среднее значение признака до и после эксперимента - $49,304 \pm 13,925$ и $63,953 \pm 10,901$

для ВВ ФЖ молодых женщин, $49,304 \pm 13,925$ и $52,293 \pm 12,697$ для инкубации с ВВ ФЖ женщин СРВ) и гиперактивации сперматозоидов после 60 мин культивирования, а инкубация сперматозоидов с ВВ ФЖ женщин СРВ незначительно меняла данные показатели в сравнении с контролем ($p=0,171$) (рис. 20а, 20б, рис. 21).

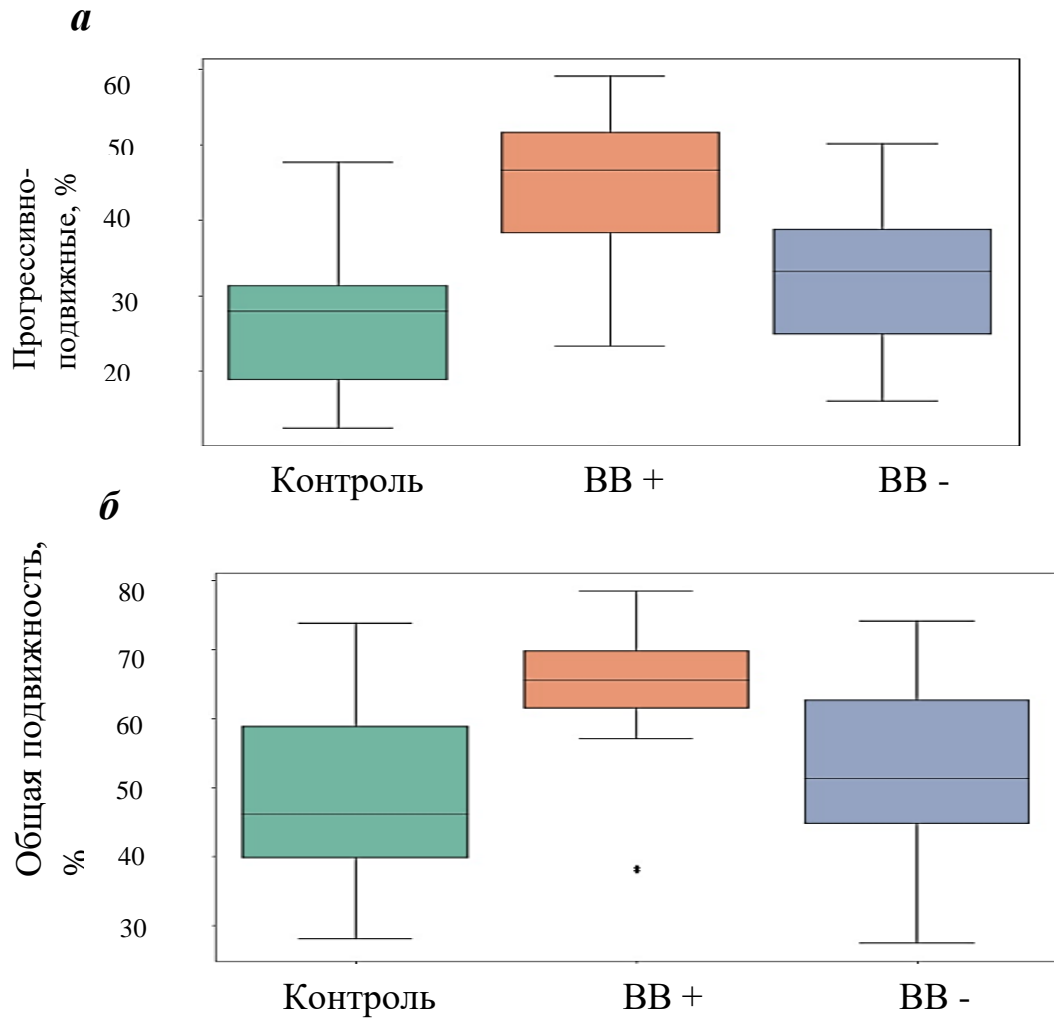


Рисунок 20. Достоверное увеличение количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов (%) (а) и общей подвижности (%) (б) через 60 мин инкубации с ВВ ФЖ женщин молодого репродуктивного возраста в сравнении с контролем (параллельная инкубация без ВВ) и с ВВ ФЖ женщин СРВ; парный t критерий Стьюдента ($p < 0,001$) и показатели общей подвижности ($p = 0,05$), $n = 18$.

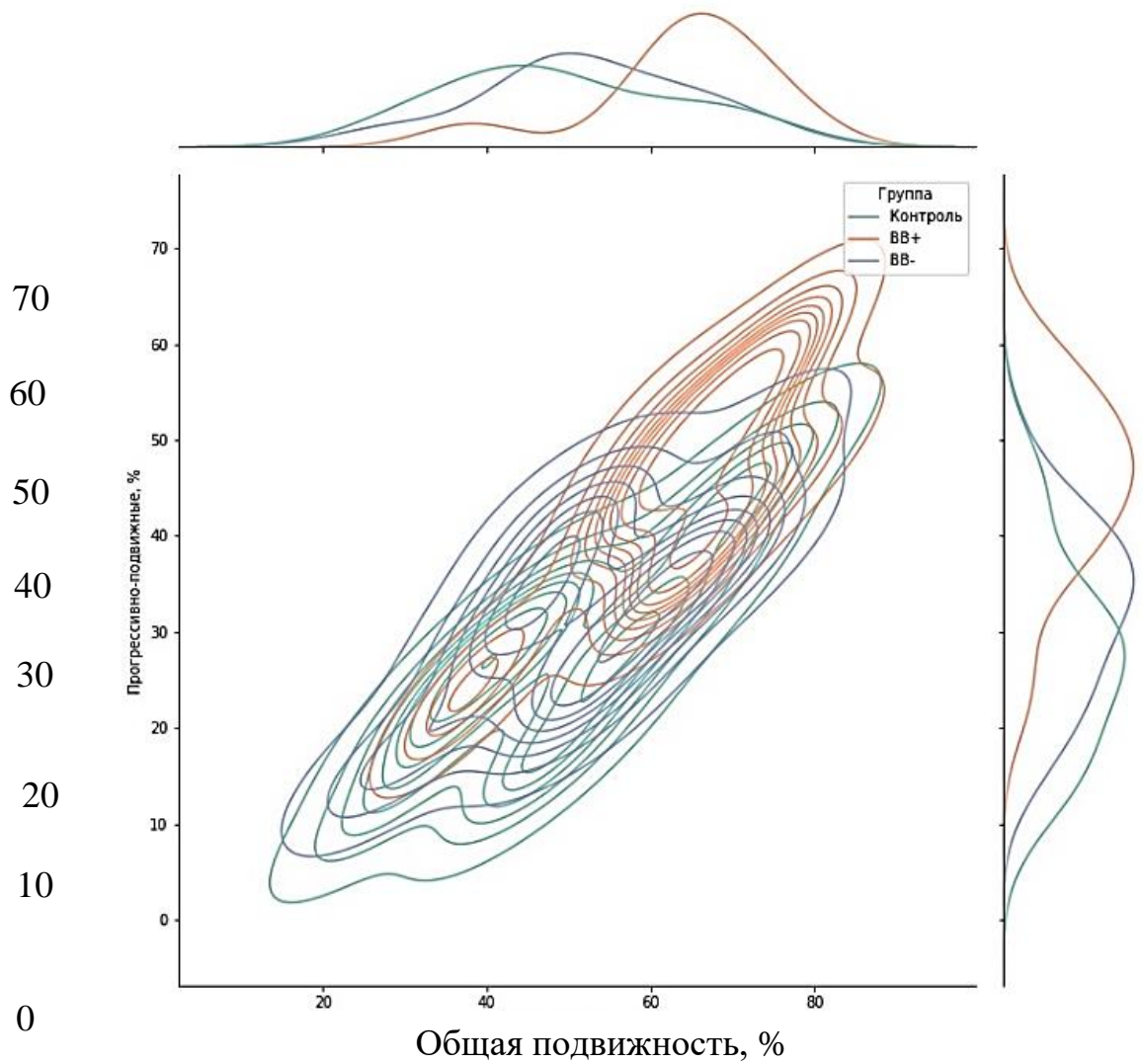


Рисунок 21. Изменение общей подвижности (%) и количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов (%) по всем образцам с BB+ (от ФЖ женщин молодого возраста) и BB- (от ФЖ женщин СРВ) по сравнению с контролем, n=18.

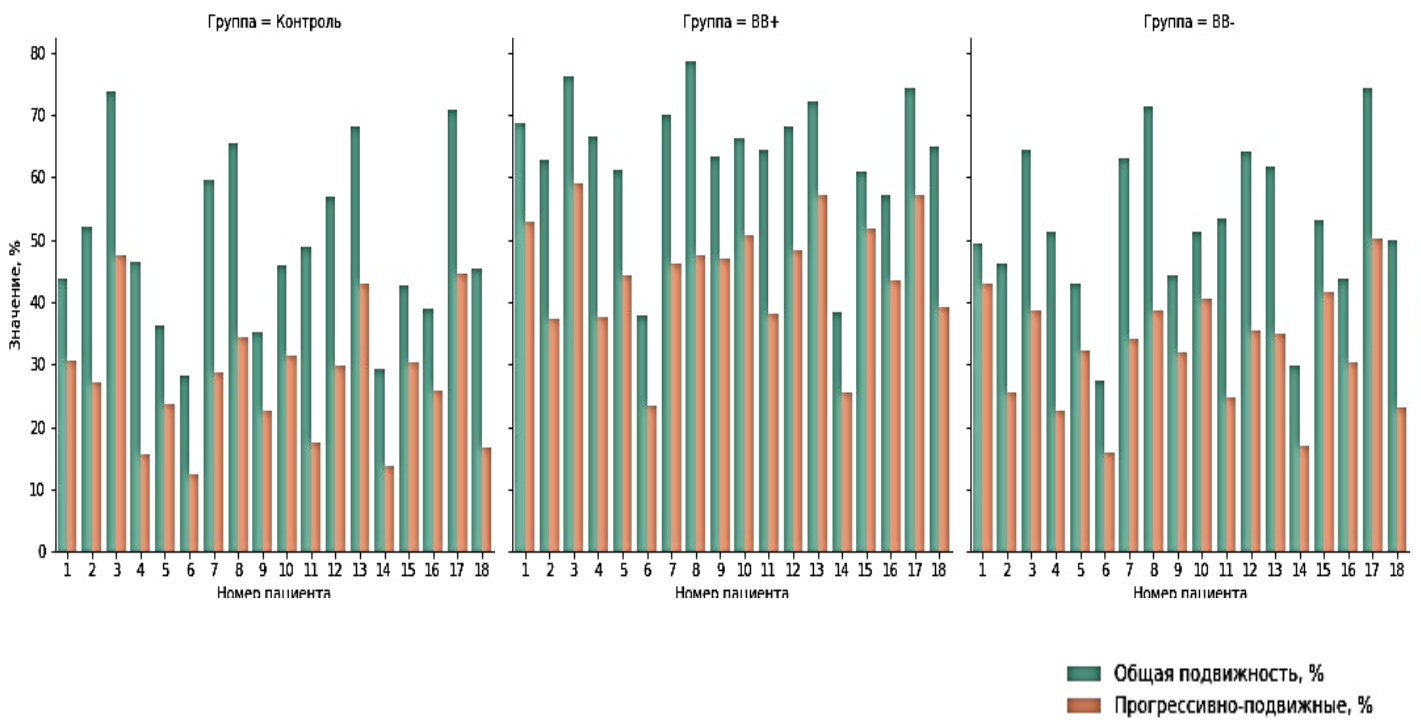


Рисунок 22. Достоверное увеличение общей подвижности (%) и количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов (%) через 60 мин инкубации с ВВ ФЖ женщин молодого репродуктивного возраста в сравнении с контролем (параллельная инкубация без ВВ) и с ВВ ФЖ женщин СРВ по каждому пациенту: парный t критерий Стьюдента ($p < 0,001$) и показатели общей подвижности ($p = 0,05$), $n = 18$.

Получив обнадеживающие результаты об улучшении показателей подвижности сперматозоидов после инкубации с ВВ ФЖ молодых женщин, было принято решение проверить этот эффект на сперматозоидах пациентов с диагнозом астенозооспермия старшего возраста. Выборка составила всего 7 пациентов с истинной астенозооспермией (АСП) (сперматозоиды были получены из эякулята с соблюдением стандартного протокола сбора биологического материала), средний возраст пациентов составил 54,67 года. Пациенты, сперматозоиды которых были получены путем биопсии яичка, включены не были, в связи со сложностью оценки параметров подвижности до и после инкубации с ВВ ФЖ и особой ценностью биологического материала.

Инкубация сперматозоидов с ВВ ФЖ молодых женщин проводилась 1 час и приводила к увеличению количества прогрессивно-подвижных сперматозоидов (парный t критерий Стьюдента, $p=0,005$). Данные подвижности до и после инкубации с ВВ ФЖ приведены в Таблице 2. Параметры подвижности до и после инкубации сперматозоидов были оценены с помощью системы CASA.

Таблица 2. Показатели подвижности сперматозоидов (%) до и после инкубации с ВВ ФЖ, n=7

№ образца	Подвижность сперматозоидов, %	Подвижность сперматозоидов после инкубации с ВВ ФЖ, %
1	13,04	34,02
2	9,53	15,66
3	11,67	22
4	14,2	18,88
5	2,34	5,99
6	10,78	18,5
7	9	14,7

Оказалось, что несмотря на увеличение показателей подвижности сперматозоидов (%), количество подвижных сперматозоидов (шт/200 п.зр.) у

данных пациентов значительно не возросло (рис. 23, рис. 24). Вероятно, такая тяжелая астенозооспермия может быть связана с возрастными и/или генетическими нарушениями [72], 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.



Рисунок 23. Прогрессивная подвижность сперматозоидов пациентов с астенозооспермией до и после инкубации с ВВ ФЖ, %. * $p=0,005$.



Рисунок 24. Количество подвижных сперматозоидов на 200 п/зрения у пациентов с астенозооспермией старшего возраста до и после инкубации с ВВ ФЖ, шт.

3.4. Молекулярно-генетическая оценка состава внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разного репродуктивного возраста

Главной функцией ВВ является перенос биологически активных молекул (миРНК, липидов, белков, ионов, органелл и т.д.). В данной работе была изучена экспрессия отдельных миРНК, уровень прогестерона, 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.

3.4.1. Профиль экспрессии малых некодирующих РНК внеклеточных везикул фолликулярной жидкости

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 [21, 23, 28, 29], связывают с возрастными изменениями репродуктивной системы женщины. Так как миРНК участвуют в важнейших сигнальных путях, регулирующих метаболические процессы в ооците, клетках кумулюса и ФЖ, а с увеличением возраста активность этих путей значительно снижается, влияние и участие в процессах взаимодействия ВВ ФЖ со сперматозоидами и активации их оплодотворяющей способности становится менее выраженной. 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 с неоднократными попытками ЭКО, по сравнению с ВВ ФЖ молодых (<35 лет) с первой попыткой (рис. 25, рис. 26).

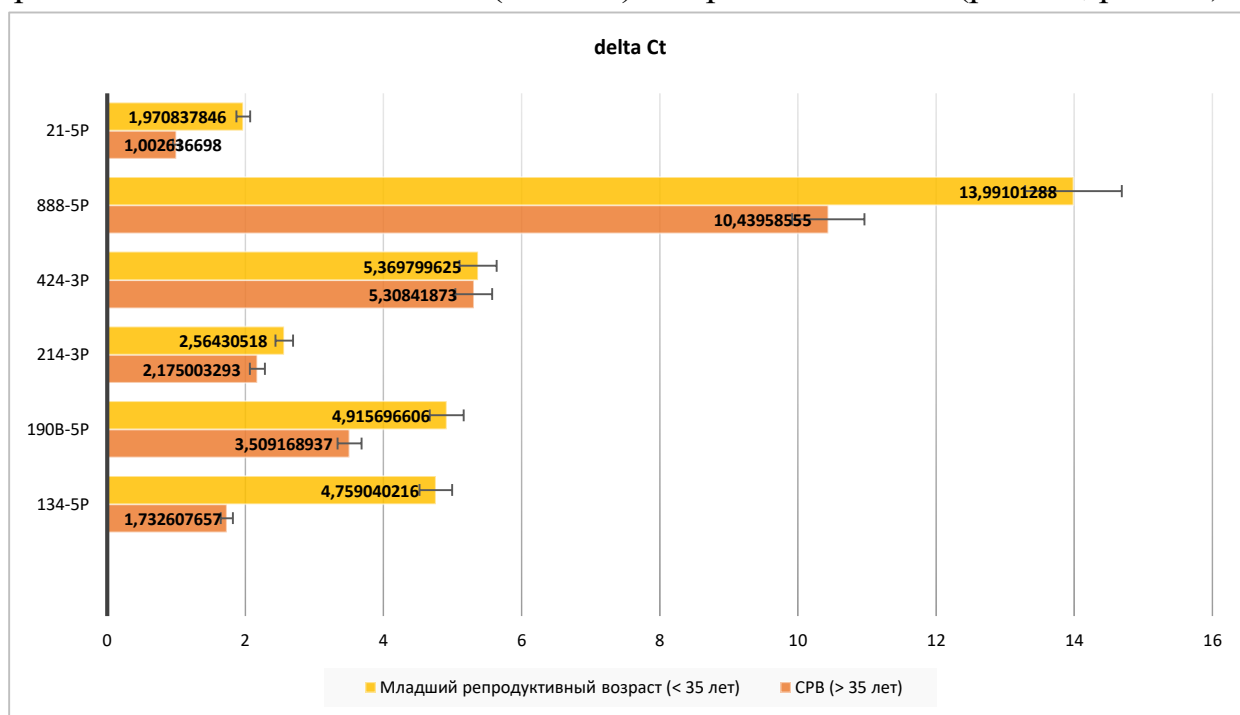


Рисунок 25. Сравнение относительных уровней экспрессии миРНК (*mir-21-5p*, *mir-888-5p*, *mir-424-3p*, *mir-214-3p*, *mir-190b5p*, *mir-134-5p*). ΔCt – это относительный уровень экспрессии выбранных миРНК. Чем выше значение ΔCt , тем ниже уровень экспрессии РНК.

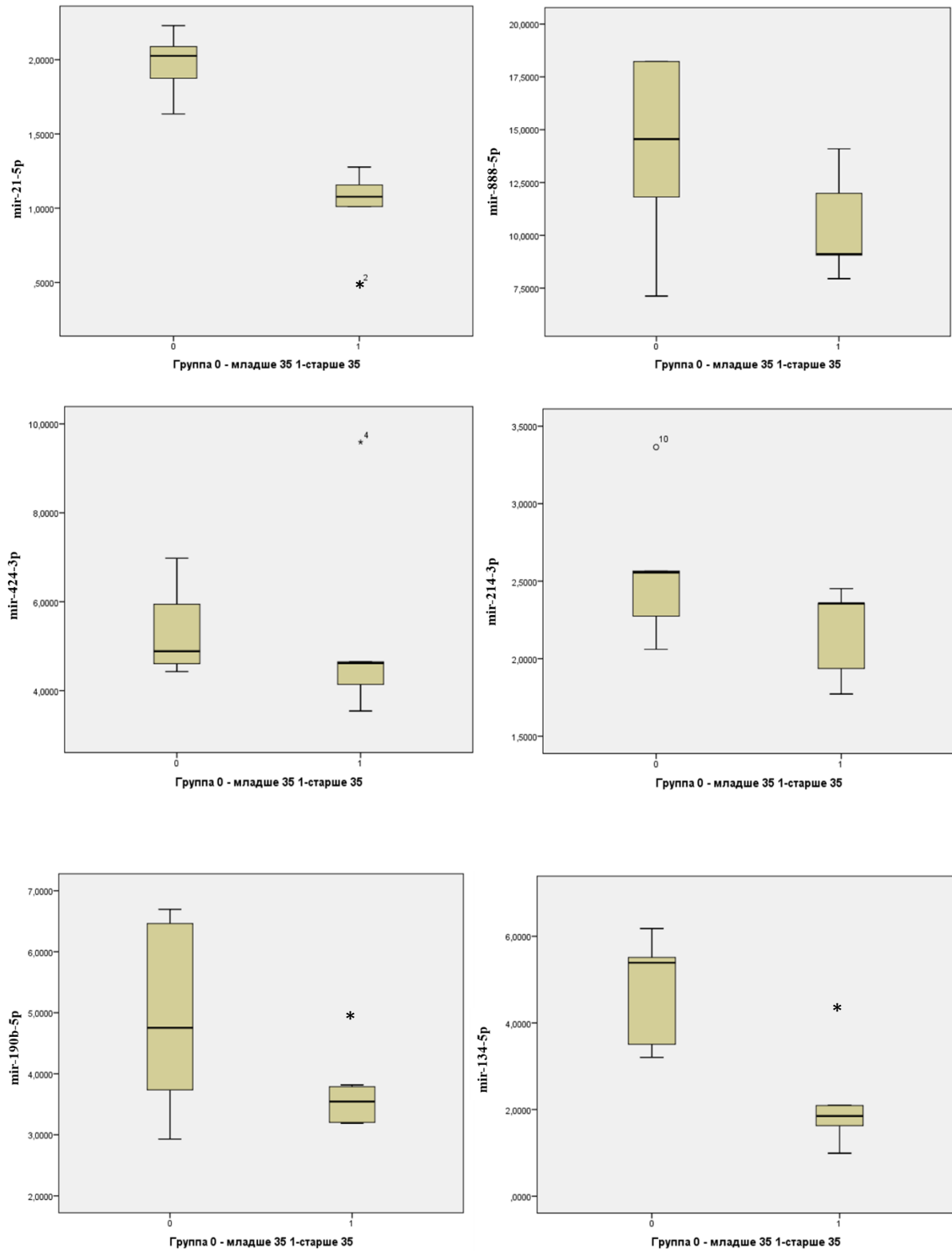


Рисунок 26. Сравнение профилей миРНК женщин молодого репродуктивного возраста и женщин СРВ. * $p < 0,05$

3.4.2. Оценка уровня прогестерона в образцах внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин

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.) ($p < 0,05$) (рис. 27, рис. 28а, б, в).

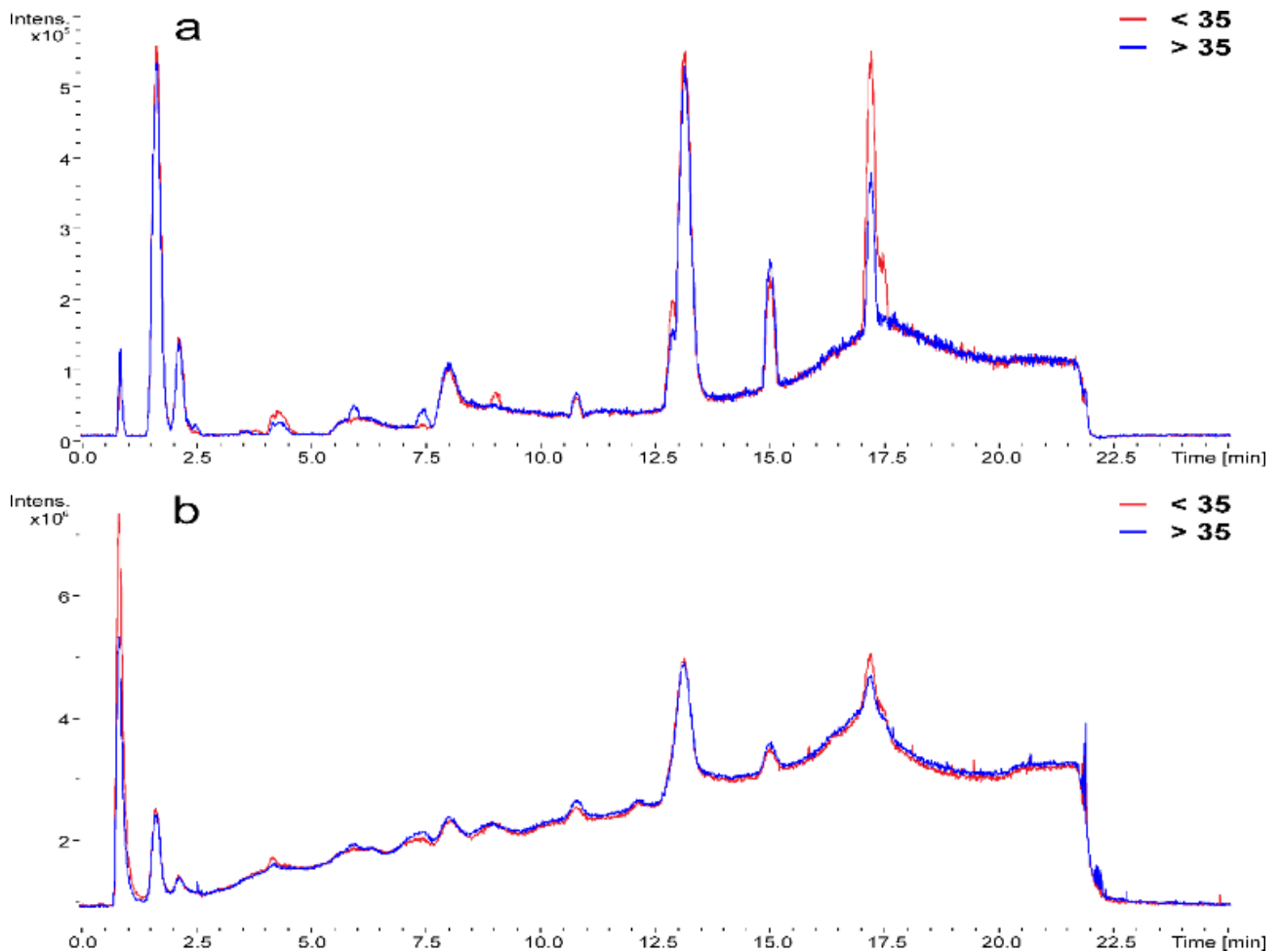


Рисунок 27. Хроматограммы ионного тока, зарегистрированные в режиме положительных ионов. а - ионный ток базового пика; б - полный ионный ток.

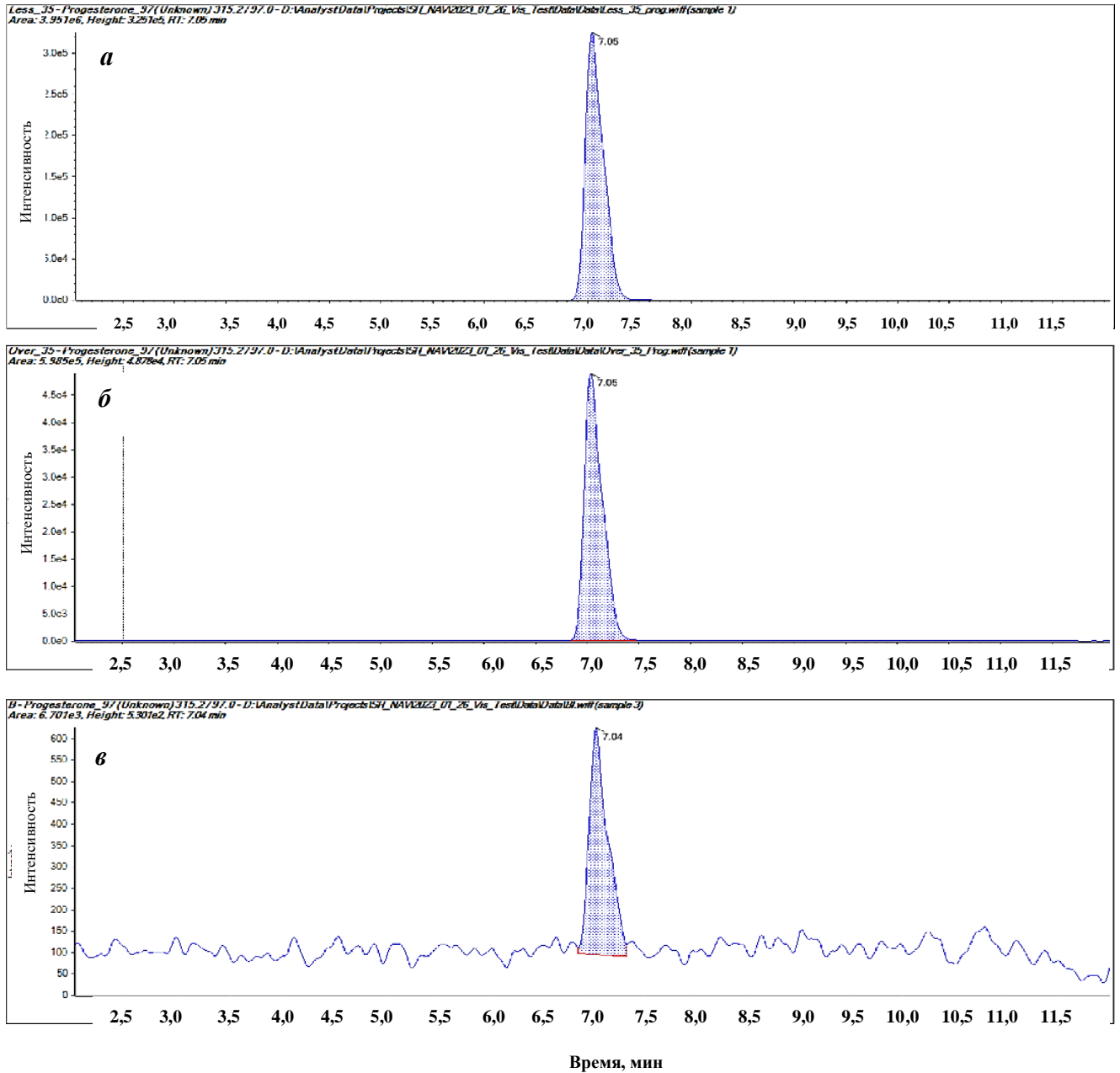


Рисунок 28 а, б, в. Хроматограмма ионного тока перехода m/z 315.2/97.0, соответствующего прогестерону. а – образец везикул от пациентов младше 35 лет; б - образец везикул от пациентов старше 35 лет; в – контрольный образец.

На рисунке 29 представлена количественная визуализация разницы уровня прогестерона (усл. ед.) в образцах женщин младшего репродуктивного возраста и СРВ.

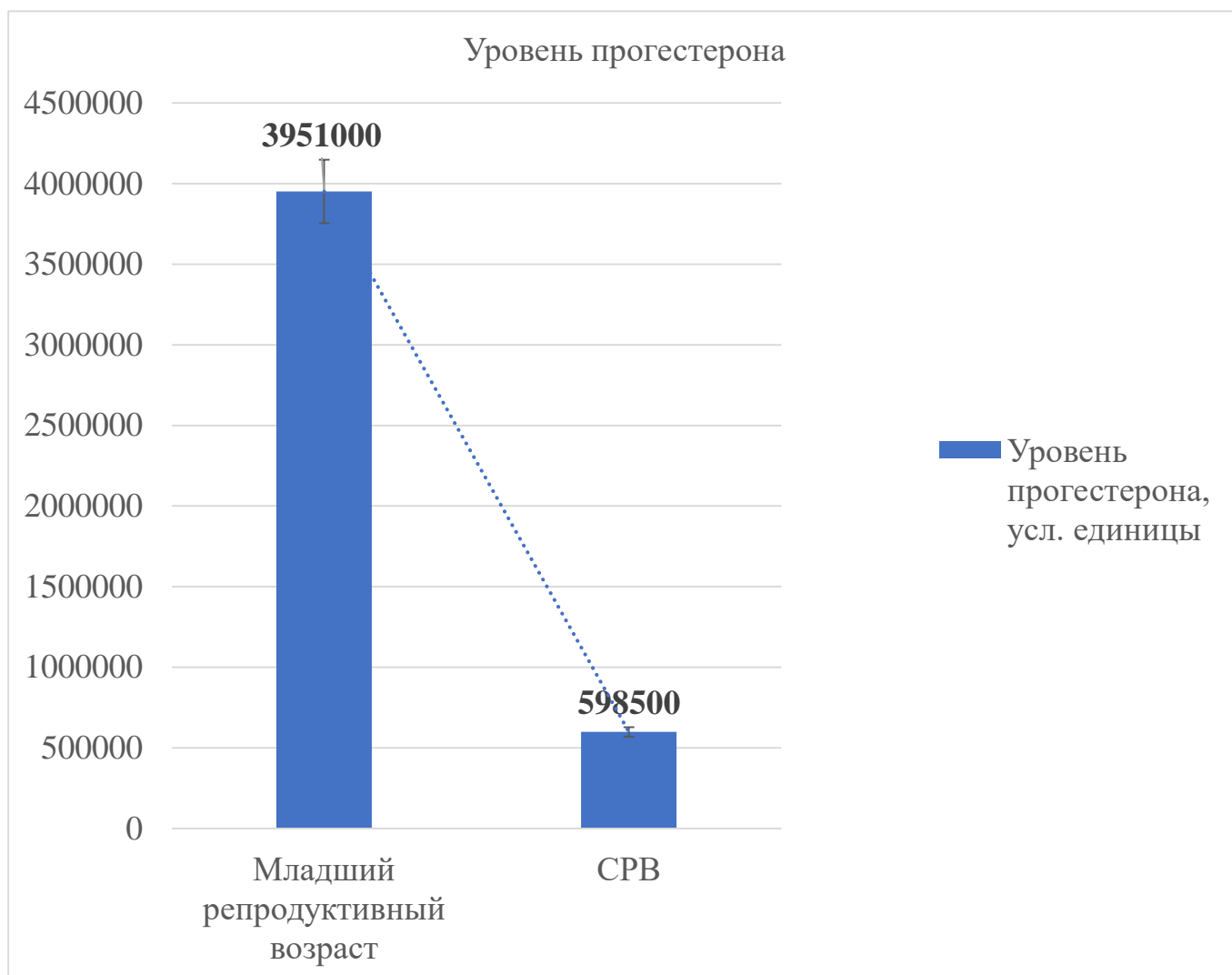


Рисунок 29. Количественная визуализация разницы уровня прогестерона (усл. ед.) в образцах женщин младшего репродуктивного возраста и СРВ.

3.4.3. Липидомный анализ внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин разного репродуктивного возраста

В результате липидомного анализа было идентифицировано 389 липидов (Приложение 1), из них 74 липида идентифицированы по точной массе и характерным фрагментам в тандемных масс-спектрах, а также 315 липидов по точной массе. Было выявлено 23 класса: холестериновые эфиры (CE), холестерины, N-лигноцероилсфингозины (Cer-NS),

лизофосфатидилхолины (LPC), фосфатидилхолины (PC) фосфатидилэтаноламы (PEtOH), простые эфиры триглицеридов и фосфатидилхолинов (plasma_{nyl}-TG, Plasma_{nyl}-PC), сфингомиелины (SM), триглицериды (TG), фосфатидные кислоты (PA) ацилкарнитины (AcCa), церамиды (Cer), гликозилцерамиды (CerG), церамидфосфаты (CerP), коэнзим (Co), диглицериды (DG), моноглицериды (MG), моногалактозилдиацилглицерины (MGDG), окисленные формы лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и триглицеридов (OxLPC, OxPC, OxPE, OxTG).

Результат сравнения относительных уровней липидов между исследуемыми группами представлен на рисунке 28, на котором приведены липиды, уровни которых отличаются более, чем в 1,5 раза. Наибольшие отличия между группами обнаружены для отдельных эфиров холестерина, лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов, церамидов, триглицеридов, ди- и триглицеридов, моногалактозилдиацилглицеринов (рис. 30).

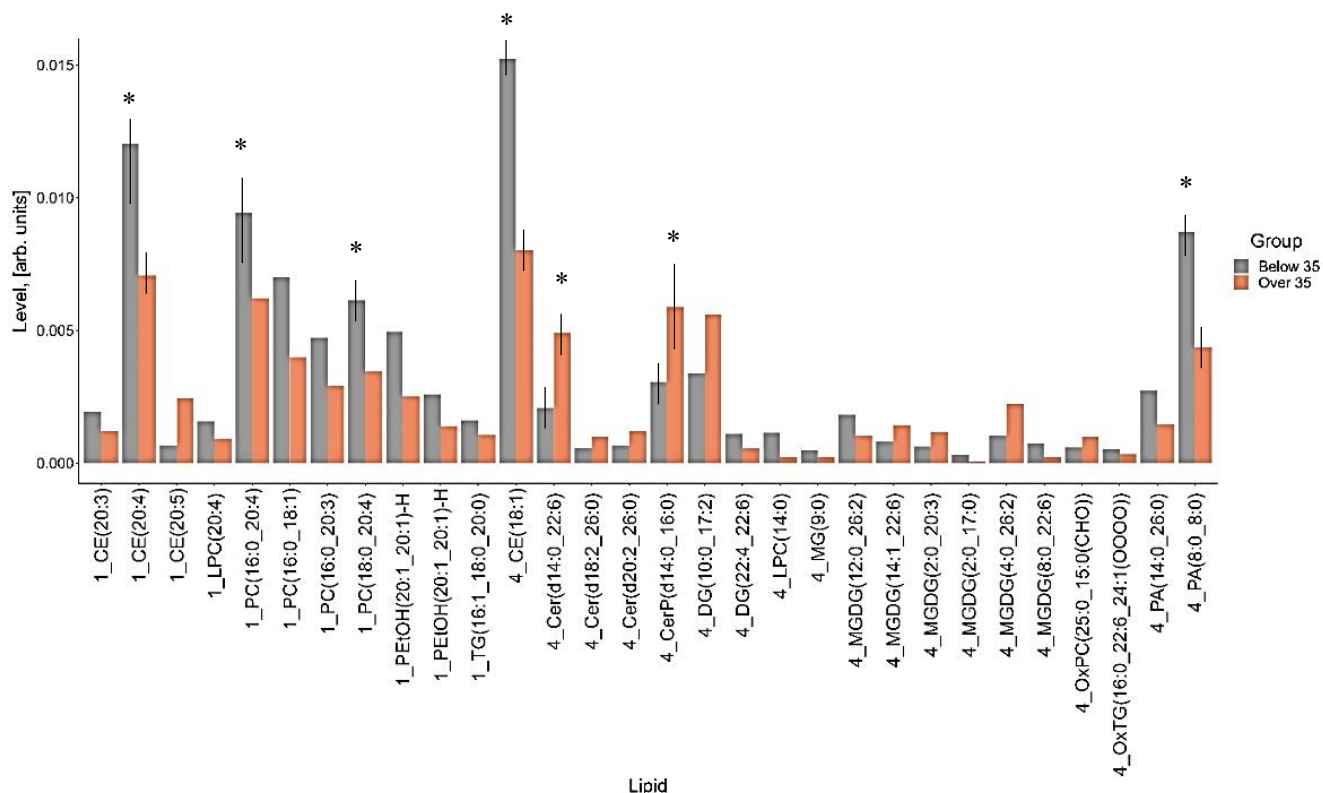


Рисунок 30. Сравнение липидов, уровни которых отличаются между группами более, чем в 1,5 раза.

Суммарные уровни холестеринаных эфиров, холестерина, лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов были выше в везикулах, полученных от женщин младше 35 лет, а ди- и триглицеридов, моногалактозилдиацилглицеринов, окисленных форм фосфатидилхолинов, церамидов были выше в везикулах, полученных от женщин старше 35 лет (рис. 31).

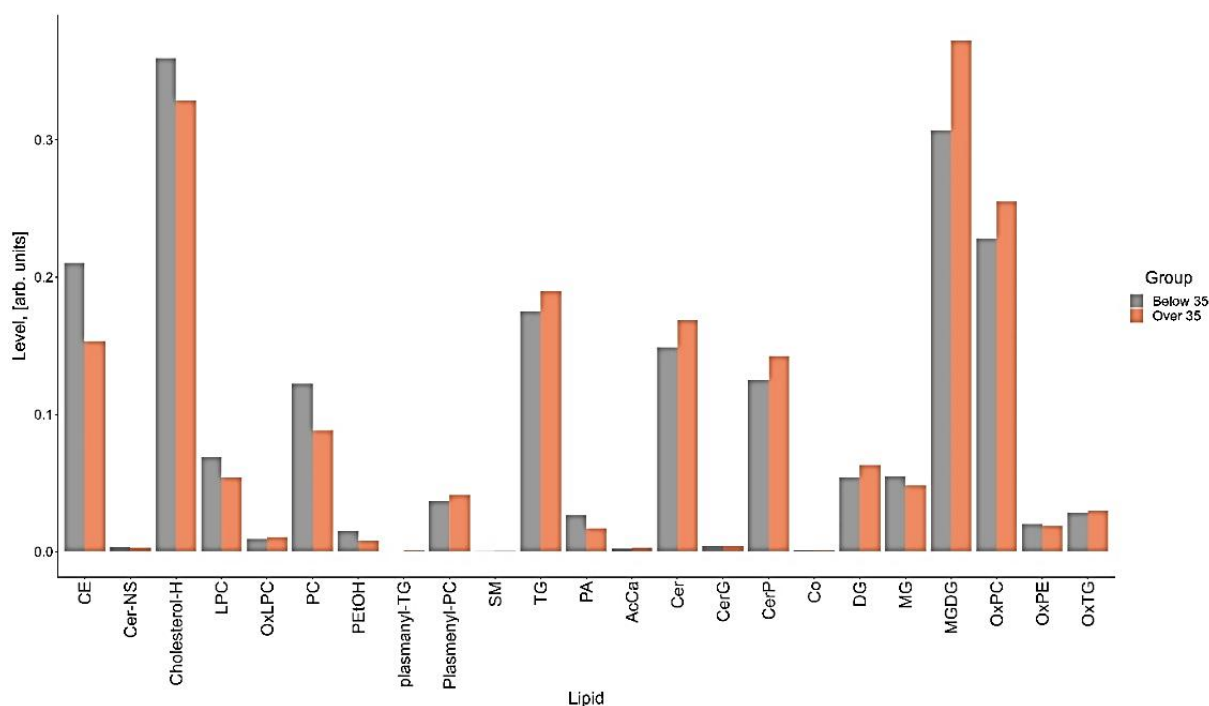


Рисунок 31. Сравнение суммарных уровней липидов по каждому из выявленных классов. CE - холестеринные эфиры, Cer-NS - холестеринны, N-лигноцероилсфингозины, LPC – лизофосфатидилхолины, PC - фосфатидилхолины, PEtOH - фосфатидилэтаноламы, plasmanyl-TG, Plasmenyl-PC - простые эфиры триглицеридов и фосфатидилхолинов, SM - сфингомиелины, TG - триглицериды, PA - фосфатидные кислоты, AcCa - ацилкарнитины, Cer - церамиды, CerG - гликозилцерамиды, CerP - церамидфосфаты, Co - коэнзим, DG - диглицериды, MG - моноглицериды, MGDG - моногалактозилдиацилглицерины, OxLPC, OxPC, OxPE, OxTG - окисленные формы лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и триглицеридов.

3.4.4. Протеом внеклеточных везикул фолликулярной жидкости в исследовании

ФЖ человека — одна из наиболее сложных биологических жидкостей, не только составляющая микросреду развивающихся фолликулов в яичнике и поддерживающая развитие ооцита, но и регулирующая процессы оплодотворения в маточной трубе (привлечение сперматозоидов к ооциту, их активацию и подготовку к проникновению в яйцеклетку) с помощью сигнальных белков репродуктивной системы. Белки, как и другие активные молекулы, переносятся с помощью ВВ, и информация о белковых составляющих ВВ ФЖ может обеспечить лучшее понимание физиологии яичников, развития и компетенции ооцитов, а также открыть новые пути для изучения нарушения молекулярных процессов при оплодотворении. Эти данные могут помочь разобраться в причинах бесплодия неясного генеза в программах ВРТ. Однако состав протеома ВВ ФЖ остается недостаточно изученным, и одной из главных сложностей остается определение белков, специфичных именно для ВВ ФЖ, взаимодействующих со сперматозоидами и влияющими на их функциональные характеристики.

В данном исследовании было проведено разделение белков на основе ВХЖХ с последующим ЖХ-МС анализом для характеристики протеома ВВ ФЖ человека. Было идентифицировано около 1000 белков, в числе которых присутствуют как маркерные белки ФЖ, так и специфичные именно для процессов оплодотворения. Участие последних в активации сперматозоидов человека в маточной трубе представлено в данной работе впервые. Здесь представлен процент покрытия идентифицированных белков, который указывает насколько полно детектированные пептиды представляют всю аминокислотную последовательность данного белка.

Идентифицированные белки относятся к различным функциональным категориям, включая факторы роста и гормоны, рецепторную сигнализацию, катализ ферментов и т.д. [29]. Данная работа может послужить ресурсом для

будущих исследований, направленных на разработку биомаркеров не только для определения качества ооцитов, но и их репродуктивного потенциала, а также на изучение процессов взаимодействия ооцита и сперматозоидов и их изменения морфофункциональных характеристик.

В Таблице 3 представлены основные белки, характерные для ВВ. CD9, CD81, CD63 являются тетраспанинами, которые играют роль в проникновении, инвазии и слиянии клеток. Они, также используются в качестве маркеров экзосом [76]. Другой тип белков экзосом являются белки теплового шока, такие как HSP70, HSP90, которые являются частью стрессового ответа и участвуют в презентации антигенов [76]. Цитоскелетные белки (например, тубулин, актин) и белки, ответственные за мембранный транспорт, аннексин (A6, A5, A2, A11, A4) также были обнаружены и идентифицированы в экзосомах ФЖ. В свою очередь, такие белки как флотиллин и TSG101 участвуют в биогенезе экзосом [76, 77]. Также показано, что ВВ ФЖ содержат метаболические ферменты, такие как АТФаза, альдегид-редуктаза и аспаргат аминотрансфераза, которые могут принимать участие в активации сперматозоидов в репродуктивных путях, повышая их подвижность и запуская гиперактивацию.

Таблица 3. Маркерные и характерные белки для внеклеточных везикул в организме человека.

Протеиновая группа	Протеин ID	Принадлежность, название	Покрытие, %	Описание
134	59342	P08133 ANXA6_HUMAN	42	Annexin A6
417	59770	P21926 CD9_HUMAN	21	CD9 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD9 PE=1 SV=4
507	59751	P60033 CD81_HUMAN	25	CD81 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD81 PE=1 SV=1

Протеиновая группа	Протеин ID	Принадлежность, название	Покрытие, %	Описание
516	59602	O43657 TSN6_HUMAN	16	Tetraspanin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSPAN6 PE=1 SV=1
435	59523	P08758 ANXA5_HUMAN	27	Annexin A5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA5 PE=1 SV=2
626	59587	P07355 ANXA2_HUMAN	14	Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2
733	59498	P50995 ANXA11_HUMAN	15	Annexin A11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA11 PE=1 SV=1
1309	59829	P09525 ANXA4_HUMAN	7	Annexin A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA4 PE=1 SV=4
977	59644	O75955 FLOT1_HUMAN	11	Flotillin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLOT1 PE=1 SV=3
984	66552	P08962 CD63_HUMAN	5	CD63 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD63 PE=1 SV=2
1340	66529	O75954 TSN9_HUMAN	6	Tetraspanin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSPAN9 PE=1 SV=1
1804	61200	P20073 ANXA7_HUMAN	3	Annexin A7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA7 PE=1 SV=3
923	60136	P16070 CD44_HUMAN	3	CD44 antigen OS=Homo sapiens

Протеиновая группа	Протеин ID	Принадлежность, название	Покрытие, %	Описание
				OX=9606 GN=CD44 PE=1 SV=3
1174	59685	P04083 ANXA1_HUMAN	13	Annexin A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA1 PE=1 SV=2
1918	66522	P41732 TSN7_HUMAN	6	Tetraspanin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSPAN7 PE=1 SV=2
1874	64079	Q99816 TS101_HUMAN	4	Tumor susceptibility gene 101 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSG101 PE=1 SV=2
59742	P0DMV8	P0DMV8 HS71A_HUMAN	4	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1
59743	P0DMV9	P0DMV9 HS71B_HUMAN	4	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1

Эксперимент по определению белков ВВ ФЖ показал наличие в ФЖ 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 4). 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. Также был обнаружен мембранный рецептор к прогестерону, который, как показали результаты работы, в большом количестве присутствуют на ВВ ФЖ молодых женщин, и тем самым, имеют больше влияния на активацию сперматозоидов.

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.

Таблица 4. Специфические белки ВВ ФЖ, предположительно участвующие в активации капацитации, гиперактивации и подготовке сперматозоидов к оплодотворению в репродуктивных путях женщины.

Протеиновая группа	Протейн ID	Принадлежность, название	Покрытие, %	Описание
367	59355	P23634 AT2B4_HUMAN	17	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B4 PE=1 SV=2
103	59305	Q16610 ECM1_HUMAN	47	Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECM1 PE=1 SV=2
49	59300	Q08380 LG3BP_HUMAN	51	Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS3BP PE=1 SV=1
667	59605	P00558 PGK1_HUMAN	13	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3
1228	59541	P78527 PRKDC_HUMAN	11	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKDC PE=1 SV=3

Протеиновая группа	Протейн ID	Принадлежность, название	Покрываемость, %	Описание
883	59534	P54289 CA2D1_HUMAN	6	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACNA2D1 PE=1 SV=3
559	59522	Q8WUA8 TSK_HUMAN	29	Tsukushi OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSKU PE=1 SV=3
1031	59650	Q9Y653 AGRG1_HUMAN	6	Adhesion G-protein coupled receptor G1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADGRG1 PE=1 SV=2
1119	66513	P31323 KAP3_HUMAN	5	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKAR2B PE=1 SV=3
241	59348	P80108 PHLD_HUMAN	27	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPLD1 PE=1 SV=3
1106	60553	O15173 PGRC2_HUMAN	9	Membrane-associated progesterone receptor component 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGRMC2 PE=1 SV=1
532	59357	P17301 ITA2_HUMAN	17	Integrin alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA2 PE=1 SV=1

Протеиновая группа	Протейн ID	Принадлежность, название	Покровительство, %	Описание
346	59451	P05556 ITGB1_HUMAN	12	Integrin beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGB1 PE=1 SV=2

3.5. Разработка новых подходов для совершенствования эмбриологических этапов вспомогательных репродуктивных технологий

Как показали полученные изображения электронной микроскопии, связываясь с мембраной сперматозоида, ВВ ФЖ могут передавать им необходимые биологически активные молекулы, регулируя тем самым их функциональные характеристики. Эксперименты данной работы, также указывают, что степень взаимодействия ВВ ФЖ и сперматозоидов зависит от возраста донора ФЖ. 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) в чашке Петри (рис. 32).

Во время подготовки чашек для проведения оплодотворения ооцитов методом ИКСИ в лаборатории ВРТ подготовка модифицированной чашки с имитацией дифференциального хемотаксиса включает в себя добавление дополнительной капли с ВВ ФЖ. Перед проведением ИКСИ сперматозоиды добавляются в общую каплю и после 1 часа инкубации отбираются из капли с ВВ ФЖ, которая соединена с общей каплей мостиком среды.

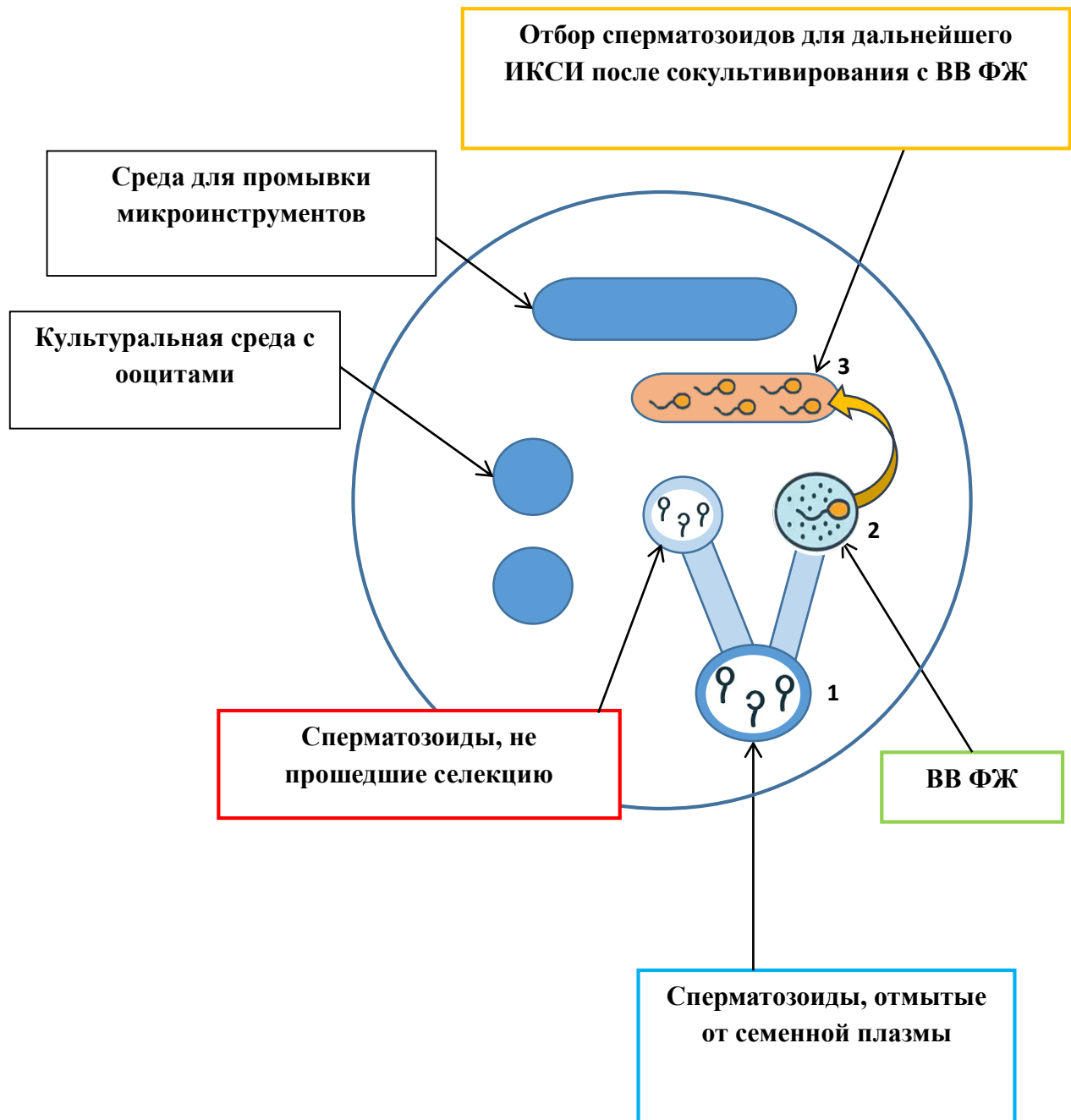


Рисунок 32. Схематичное изображение модифицированной чашки для ИКСИ с отбором сперматозоидов методом дифференциального хемотаксиса и сокультивированием с ВВ ФЖ. 1- начальный этап; добавление сперматозоидов, отмытых от семенной плазмы, в общую каплю, 2 – капля с ВВ ФЖ, где происходит сокультивирование со сперматозоидами, прошедшими селекцию, 60 минут; 3 – перенос сперматозоидов микроинструментом в чистую каплю после сокультивирования с ВВ ФЖ; отбор для дальнейшего ИКСИ.

Сперматозоиды, не прошедшие селекцию, обнаруживаются в капле без ВВ ФЖ и не используются для оплодотворения. Инкубация проходит в CO₂-инкубаторе при 37 °С, после приготовления чашка покрывается минеральным маслом. Схематичное изображение модифицированной чашки для ИКСИ представлено на рисунке 30.

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 миРНК 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Каждый год публикуются новые данные о видах и функциях ВВ. Результаты исследований на быках и свиньях показывают, что минимальная концентрация ВВ ФЖ 5×10^5 частиц/500 мкл достаточна, чтобы изменить функциональные параметры сперматозоидов (подвижность, жизнеспособность, запуск капацитации и акросомальной реакции). Также существуют данные, что количество ВВ ФЖ зависит от размера фолликула, из которого была получена ФЖ – наибольшая концентрация наблюдалась в малых фолликулах. Этот факт можно объяснить тем, что в растущих фолликулах, не достигших стадии доминантного, необходимо наибольшее количество активных молекул для поддержания и роста ооцита.

Данная работа не выявила значительных различий в размерах и концентрации ВВ в зависимости от возраста женщины. Вероятно, это связано, что ФЖ для выделения ВВ была отобрана только из доминантного овулирующего фолликула у всех женщин молодого и старшего репродуктивного возраста. Увеличение количество апоптотических телец (полученные результаты размеров сопоставимы с этой группой ВВ ФЖ) в группе СРВ может быть связано с возрастными и воспалительными процессами в репродуктивных путях. Вероятно, разгадка эффекта ВВ ФЖ на сперматозоиды кроется в их составе.

Поступательная подвижность является необходимым условием для достижения сперматозоидов ооцита. В яйцеводе в ответ на овуляцию одновременно с процессом капацитации сперматозоиды приобретают особый тип подвижности (гиперактивацию), характеризующуюся энергичными движениями жгутика и головы, необходимыми для проникновения через оболочку ооцита [81]. Участие CatSper в процессе гиперактивации было однозначно продемонстрировано у мышей [37] и у людей. Учитывая, что прогестерон является одним из основных активаторов CatSper в сперматозоидах человека, его достаточная концентрация в маточных трубах

является необходимым условием для оплодотворения. Помимо кальциевых каналов CatSper, прогестерон может модулировать другие каналы на мембране жгутика. Высокие концентрации прогестерона, подобные тем, которые обнаруживаются вблизи ОКК, ингибируют ионы K^+ [82] и приводят к деполяризации мембраны сперматозоидов, что еще больше усиливает активацию CatSper [83]. Также прогестерон участвует в качестве главного сигнала для выхода сперматозоидов из перешейка маточной трубы (место хранения спермы до оплодотворения), известное как функциональный резервуар спермы, и является основным хемоаттрактантом человека [84].

Интересно также что малые концентрации прогестерона не оказывают значительного влияния на сперматозоиды у свиней и быков [85], что коррелирует и с данной работой на сперматозоидах человека. Одной из гипотез отсутствия достоверного эффекта влияния ВВ ФЖ женщин СРВ на подвижность сперматозоидов может быть снижение уровня везикулярного прогестерона с возрастом (по нашим результатам его уровень у женщин младшего возраста в ВВ ФЖ выше в 6,6 раз), который не только является одним из главных хемоаттрактантов для сперматозоидов при оплодотворении [82, 85], но и является триггерной молекулой для запуска CatSper Ca^{2+} каналов, которые обеспечивают подвижность и гиперактивацию сперматозоидов, таким образом, чем ниже концентрация прогестерона в среде, тем хуже проявляется гиперактивация и увеличение прогрессивной подвижности сперматозоидов. Так как с возрастом женщины изменяется гормональный и молекулярный состав ФЖ, количество прогестерона, переносимого ВВ ФЖ может, также значительно снижаться при приближении к менопаузе, что может в значительной степени влиять на процессы активации сперматозоидов в репродуктивных путях и их оплодотворяющую способность.

В данной работе было показано, что суммарные уровни холестеринных эфиров, холестерина, лизофосфатидилхолинов, фосфатидилхолинов были в

1,5 раза выше ВВ ФЖ женщин младшего репродуктивного возраста, а ди- и триглицеридов, моногалактозилдиацилглицеринов, окисленных форм фосфатидилхолинов, церамидов были выше в ВВ ФЖ женщин СРВ. Эти липиды переносятся в ВВ ФЖ по репродуктивным путям во время оплодотворения и могут передавать сигналы для активации и изменения характеристик сперматозоидов, необходимых к оплодотворению. Так, например, фосфолипиды в большом количестве присутствуют в ФЖ. Фосфолипиды являются наиболее распространенными липидами в клеточных мембранах и включают лизофосфатидную кислоту (LPA), лизофосфатидилхолин (LPC), сфингозин-1 фосфаты и сфингофорилхолин [34, 108]. Некоторые исследования показали, что LPC метаболизируется в LPA фосфолипазой. LPC очень активны внутри интактных клеток, таких как ВВ, и поэтому являются кандидатами на роль цитоплазматических мессенджеров, передающих сигналы для активации метаболических процессов и генных экспрессий в ядре [108]. LPC, также может активировать и вторичные мессенджеры, киназы (регулируемые внеклеточными сигналами) и протеинкиназу С, которая, не только участвует в регуляции развития фолликулов и созревании ооцитов, но и в активации капацитации и акросомной реакции сперматозоидов [109], задействуя CatSper Ca²⁺ каналы, регулируемые прогестероном. Протеинкиназа С, также вовлечена в запуск гиперактивации сперматозоидов, следовательно, с возрастными изменениями метаболических процессов в репродуктивных путях, меняется и характер взаимодействия мужских и женских гамет. Анализ протеомного состава ВВ ФЖ показал наличие специфических протеинкиназ, которые могут быть вовлечены в этот процесс, тем самым объясняя результат влияния инкубирования с ВВ ФЖ на прогрессивную подвижность сперматозоидов.

Интересные данные были получены по церамидам, уровень которых оказался высоким в обеих возрастных группах. Сфинголипиды составляют ~10–20% всех мембранных липидов [86]. Церамид является центральным

звеном метаболизма сфинголипидов и участвует в синтезе других взаимосвязанных биоактивных липидов, таким образом управляя клеточными реакциям. Метаболиты сфинголипидов - церамид, сфингозин-1-фосфат (S1P) и церамид-1-фосфат (C1P) являются важными сигнальными молекулами, участвующими в регуляции множества физиологических функций, включая экзоцитоз, в частности, акросомную реакцию сперматозоидов человека. Церамиды представляют собой многозадачные сфинголипиды, эффекты которых можно анализировать с разных точек зрения. Они влияют на биофизические свойства мембраны является важным участником передачи различных триггерных сигналов. Для церамидов были обнаружены многочисленные внутриклеточные мишени, в частности киназы и фосфатазы [86], присутствующие, в том числе, и у сперматозоидов. Важно отметить влияние церамидов на концентрацию кальция в цитоплазме, во многих исследованиях сообщается о взаимосвязи между церамидом и кальциевыми каналами, добавление церамида повышает цитоплазматический Ca^{2+} за счет его высвобождения из внутриклеточных резервуаров [86, 87, 88]. Была, также обнаружена связь между церамидами и CatSper Ca^{2+} каналами сперматозоидов человека.

Сперматозоиды представляют собой терминальные клетки, лишенные почти всех органелл, транскрипционной и трансляционной активности. Они предназначены для единственного события — слияния мембран, экзоцитоза акросомы. Это свойство сперматозоида локально показывает участие церамидов в его подготовке к оплодотворению. Обработка спермы сфингомиелиназой и последующее образование церамидов или добавление экзогенных церамидов увеличивает процент чувствительных к прогестерону и гиперактивированных сперматозоидов [89].

В научной литературе есть упоминания, что церамиды могут образовываться *de novo* в результате гидролиза сфингомиелина, но такого процесса у сперматозоидов обнаружено не было [86]. Предположительно,

церамид поступает к сперматозоидам и активирует их оплодотворяющую функцию, в числе прочих участников процесса, из ВВ ФЖ, которые связываются с мембраной сперматозоида и запускают необходимые процессы. Однако повышенный уровень окисленных церамидов в группе СРВ, говорит о наличии менее функциональных молекул в данных образцах ВВ ФЖ, так как окисление липидов связано со патологическими состояниями организма, окислительным стрессом, дисфункциональными метаболическими изменениями.

Повышенный уровень холестерина и холестеринových эфиров подтверждает гипотезу о влиянии возрастных метаболических изменений как на качество ооцита, так и на его способность к привлечению и активации сперматозоидов. Холестерин является участником многих регуляторных и энергетических процессов, в том числе и субстратом для подготовки и процесса оплодотворения. С возрастом выраженность и успех этих событий снижается, как и репродуктивный потенциал человека [107].

На основании полученных результатов, также можно предположить: 1) ВВ ФЖ действуют как регуляторы функциональных свойств сперматозоидов, активация которых необходима для оплодотворения ооцита, что является консервативным эволюционным механизмом; 2) сила эффекта регуляции зависит от возраста донора ФЖ, что также может отражать и статус фертильности женщины. Можно полагать, что профиль миРНК ВВ ФЖ зависит от возраста женщины и может отражать статус фертильности пациенток. Это важное наблюдение, дополняющее наши знания и наше понимание механизмов гиперактивации сперматозоидов в зависимости от возраста женщины, который ранее не был широко известен.

Участие миРНК в процессах старения, были продемонстрированы на различных клеточных моделях [104]. *In vivo* было обнаружено несколько миРНК, которые по-разному экспрессируются в сыворотке или плазме крови при старении и связанных со старением заболеваниях [104, 105]. При

репродуктивном старении только в нескольких работах исследовали экспрессию миРНК во ВВ ФЖ у женщин СРВ и молодых женщин [28]. В 2014 г. Diez-Fraile с колл. сравнили профили экспрессии четырех миРНК в ФЖ молодых женщин (<31 года) и женщин СРВ (>38 лет) и показали, что в значительно более высоких уровнях в ФЖ молодых женщин присутствовала miR-21-5p, а в ФЖ женщин СРВ - miR-99b, miR-134 и miR-190b. Авторы полагают, что miR-190b играет важную роль в регуляции экспрессии гепарансульфатных протеогликанов в перивуляторных фолликулах, а также может способствовать аномальному метаболизму глюкозы в фолликулах женщин СРВ. Путь p53 играет решающую роль в процессе старения, а miR-21-5p рассматривается как антиапоптотический фактор. Мишенями для miR-134 являются гены-ингибиторы апоптоза - BCL2 и IKK β . Авторы приводят гипотезу о том, что повышенные уровни апоптоза клеток гранулезы у женщин СРВ могут быть связаны с подавлением miR-21-5p в сочетании с более высокими уровнями miR-134 [51]. В работе Battaglia с колл. количественно определили ВВ в ФЖ женщин СРВ и молодых женщин и проанализировали экспрессию миРНК, заключенных внутри везикул. Авторы показали, что в ФЖ женщин СРВ содержалось вдвое больше мелких ВВ по сравнению с молодыми (117,3 \pm 14,6 нм vs 123,4 \pm 15,6 нм). В результате биоинформатического анализа из 46 дифференциально экспрессированных миРНК было отобрано 6, связанных со старением и участвующих в сигнальных путях TP53 (Tumor Protein p53). Авторы предлагают группу миРНК, строго связанных с репродуктивным старением женщин: экспрессия miR-16-5p, miR-214-3p и miR-449a подавлялась, а miR-125b, miR-155-5p и miR-372 повышалась [48].

Различное распределение миРНК, связанное с конкретными физиологическими или патологическими состояниями в биологических жидкостях, может быть использовано для диагностики или прогноза в персонализированной медицине, однако во многих случаях биологическое значение дифференциальных значений уровней миРНК остается неизвестным.

Детектированные изменения в экспрессии миРНК отражают как физиологическое, так и патофизиологическое состояние окружающих клеток, связанное с возрастом женщины и с ее фертильным статусом, исходя из наших критериев отбора пациентов [28]. Транскриптомные и протеомные изменения, происходящие в процессе старения будут также отражаться на метаболических особенностях в микроокружении ооцитов, а именно в клетках кумулюса и ФЖ. По сравнению с более молодыми женщинами (<35 лет) с нормальным овариальным резервом у женщин СРВ и пациенток со сниженным овариальным резервом наблюдается пониженный уровень глюкозы и повышенный уровень лактата в ФЖ. В отношении аминокислотного и липидного состава ФЖ отмечены также значимые изменения с увеличением возраста [47]. Известно, что с возрастом происходит накопление активных форм кислорода (АФК) в ФЖ. На физиологических уровнях АФК регулируют многочисленные клеточные процессы, включая увеличение циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), Ca^{2+} и активацию событий фосфорилирования, необходимых для капацитации. Напротив, при высоких концентрациях, не нарушающих жизнеспособность сперматозоидов, АФК могут вызывать потерю подвижности и ингибирование капацитации. Более высокие концентрации АФК способствуют окислению липидов, белков и ДНК, что приводит к гибели клеток, и эти повреждения связаны с мужским бесплодием [104, 106].

Ц-АМФ является одной из множества молекул, ответственной за процессы капацитации и гиперактивации, который переносится ВВ ФЖ в полость маточной трубы при овуляции. В 2017 году Alonso et al. показали, что различные концентрации ц-АМФ индуцируют капацитацию сперматозоидов, повышая уровень Ca^{2+} в сперме ($P < 0,01$) за счет активации различных сигнальных путей. Кроме того, ц-АМФ-индуцированная гиперактивация сперматозоидов через взаимодействие с ВВ способствовала увеличению доли сперматозоидов с высокой митохондриальной активностью ($P < 0,01$). Наконец,

ц-АМФ увеличивал скорость оплодотворения *in vitro* по сравнению с контрольными условиями ($P < 0,001$). [106]

Белок аннексин, являясь одним из маркеров ВВ, также может выполнять большое количество функций в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека. На животных моделях было показано, что аннексин А2 (ANXA2) регулирует загрузку миРНК в ВВ независимым от последовательности образом, связывает миРНК в ВВ в присутствии Ca^{2+} и что недостаточное количество ANXA2 снижает количество миРНК в ВВ, что может быть характерно с увеличением возраста [96]. Было, также показано на различных видах млекопитающих (мышьях, хомяках, быках и свиньях), что аннексин 1, 2, 4, 5 участвует в удержании сперматозоидов в резервуаре маточной трубы до момента овуляции и участвует в изменении мембраны сперматозоида в начале капацитации [95, 96].

Различные типы фосфолипаз участвуют в процессах экзоцитоза в организме млекопитающих, в том числе и в акросомной реакции сперматозоидов. На крысах, кроликах, быках и человеке *in vitro* была показана значимость присутствия фосфолипазы D в переходе гиперактивированных сперматозоидов к капацитации и дальнейшей подготовки мембраны к оплодотворению [97, 98]. Интегрины ($\alpha 5\beta 1$ и $\alpha 5\beta 3$), участвующие в слиянии мембран ВВ ФЖ и сперматозоидов мышей и в доставке биологически активных молекул были, также обнаружены в данном исследовании [68].

Как было упомянуто выше, достаточное присутствие концентрация ионов Ca^{2+} необходимо для многих процессов активации сперматозоидов. Поэтому обнаружение в ВВ ФЖ человека таких белков, как Voltage-dependent calcium channel subunit (CACNA2D2) и Plasma membrane calcium-transporting ATPase (ATP2B4) указывает на их непосредственное участие при естественном оплодотворении в маточных трубах [100, 101]. Источником

описанных белков служит ФЖ, которая, как было показано, посредством ВВ, переносит их к сперматозоидам.

Рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), участвуют в нескольких физиологических процессах и представляют собой самое большое семейство лекарственных мишеней на сегодняшний день. Однако наличие и функции этих рецепторов в сперматозоидах человека описаны плохо.

В сперматозоидах человека был идентифицирован 71 GPCR, 7 из которых селективно экспрессировались в мужских тканях (эпидидимис, семенные пузырьки и семенники), а 9 были связаны с дефектами мужского бесплодия у мышей. Кроме того, ADRA2A, AGTR1, AGTR2, FZD3 и GLP1R были связаны со специфическими для сперматозоидов функциями, такими как капацитация сперматозоидов, реакция акросомы и подвижность, представляя собой потенциальные мишени для модуляции и улучшения функции сперматозоидов [102]. Благодаря протеомному анализу ВВ ФЖ в данной работе, был обнаружен уникальный белок Tsukushi (TSK), регулирующий активность рецепторов, связанных с G-белками, и наиболее сильно экспрессирующийся в репродуктивной системе. Открытый недавно, TSK регулирует сигнальные пути, которые в конечном итоге контролируют пролиферацию и клеточную коммуникацию. В последние годы исследования TSK становятся все более сложными, иллюстрируя его участие в физиологии и патофизиологии нейронных, генетических и метаболических заболеваний [103]. Публикаций по изучению TSK в процессах оплодотворения на сегодняшний момент нет. Данная работа может вызвать интерес к дальнейшим исследованиям в этом направлении, так как косвенное участие TSK в процессах активации сперматозоидов определяется его локализацией и молекулярными функциями.

Приведенные в Таблице 4 специфические белки по данным литературы на животных могут не только участвовать в улучшении морфофункциональных характеристик сперматозоидов, но и служить в

составе ВВ ФЖ в качестве терапевтических молекул, так как их биологические функции включают в себя регуляцию активности G-белок-связанных рецепторов, индукцию оплодотворяющей способности сперматозоидов путем повышения уровня ионов через активацию различных сигнальных путей, удержание и стимуляцию к освобождению сперматозоидов и резервуара маточной трубы (мыши, крупный рогатый скот, свиньи) до овуляции и участие в модификации мембраны сперматозоидов, и в подготовке к контакту и связыванию гамет.

На основе полученных научных данных разработанный метод модифицированной чашки Петри для имитации дифференциального хемотаксиса с помощью ВВ ФЖ для селекции сперматозоидов (*Патент № 2801117*) может быть использован в программах ВРТ для отбора сперматозоидов у пациентов с пониженной подвижностью сперматозоидов, с заключением астенозооспермия и в случаях, когда сперматозоиды были получены хирургическим путем для улучшения морфофункциональных характеристик и оплодотворяющей способности мужских половых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы показывают, как много факторов участвуют в процессе оплодотворения, и еще многие не известны до сих пор. Однако эффект и участие ВВ ФЖ в активации сперматозоидов человека в репродуктивных путях доказано. ВВ ФЖ улучшают подвижность, капацитацию и гиперактивацию сперматозоидов, подготавливая их к акросомальной реакции и оплодотворению. Был сделан вывод, что 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 процессах оогенеза, в том числе, показаны основные миРНК и другие активные молекулы в составе ВВ ФЖ 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, исключая проросты и контаминацию в культуральной среде, 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 с мужским фактором бесплодия.

Несмотря на то, что в данной работе впервые показано не только взаимодействие ВВ ФЖ со сперматозоидами человека и описаны предполагаемые белки и липиды, участвующие в приобретении сперматозоидами оплодотворяющей способности в маточной трубе, многие

механизмы остаются загадкой и, безусловно, требуют дальнейшего изучения. Необходимо продолжать рассматривать клеточный процесс взаимодействия гамет с разных сторон, как на молекулярном и физическом уровне, так и клиническом. В настоящее время, изобретение новых методов лечения и улучшения клинических исходов, требует серьезной вовлеченности именно фундаментальной биологии. На стыке глубоких базовых знаний и клинической практики рождаются новые решения и возможности.

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.
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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беспалова О.Н., Шенгелия М.О., Загайнова В.А., Чепанов С.В., Комарова Е.М., Коган И.Ю. Биологический профиль фолликулярной жидкости: пилотное исследование // Журнал акушерства и женских болезней. - 2023. - Т. 72. - №3. - С. 15-26.
2. Брагина Е. Е., Бочарова Е. Н. Количественное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – №. 1. – С. 41-50.
3. Жуков, О. Б., Брагина, Е. Е., Корнеев, И. А., Кадыров, З. А., Епанчинцева, Е. А., Коршунов, М. Н., Петрищев, В. С. Мужское бесплодие - 2021.
4. Ибишев, Х.С. Идиопатическое мужское бесплодие и папилломавирусная инфекция / Х.С.Ибишев, Н.Н.Рябенченко, Г.А.Магомедов // Вестник урологии. – 2019. – Т.7, № 2. – С.51-58.
5. Кондратов К. А., Головкин А. С., Федоров А. В. Методы изучения субпопуляций внеклеточных везикул // Цитология. – 2018. – Т. 60. – №. 7. – С. 487-497.
6. Коробкина Ю. Д., Пантелеев М. А., Свешникова А. Н. Механизмы кальциевого ответа в сперматозоидах человека и мыши // Локальный оргкомитет: к. б. н. Надеев АД, к. б. н. Мальцева ВН, к. б. н. Теплов ИЮ, к. б. н. Гайдин СГ, к. б. н. Косенков АМ, Ларюшкин ДП, Крицкая КА. – 2023. – С. 139.
7. Краевая Е.Е., Силачев Д.Н., Безнощенко О.С., Горюнов К.В., Шевцова Ю.А., Хуторненко А.А., Макарова Н.П., Кречетова Л.В., Иванец Т.Ю., Полетаев А.В., Калинина Е.А., Долгушина Н.В., Сухих Г.Т. Влияние внеклеточных везикул фолликулярной жидкости на коагуляционный гемостаз яичника // Проблемы репродукции. 2020. Т. 26, № 2. С. 18-26. doi: 10.17116/ repro20202602118

8. Нуруллин Л. Ф., Алмазов Н. Д., Волков Е. М. Кальциевые каналы и кальций-сенсорные белки в регуляции экзо-эндоцитоза везикул. – 2023.
9. Пантелеев М. А. и др. Физиология и патология внеклеточных везикул //Онкогематология. – 2017. – №. 1. – С. 62-70.
10. Сергеев О. В. и др. Современные подходы к изучению роста, развития и репродуктивного потенциала у мужчин: проспективное когортное исследование Russian Children's Study //Репродуктивное здоровье женщин и мужчин. – 2017. – С. 37-38.
11. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию. Москва, 2005 г.
12. Ashapkin V. et al. Age-associated epigenetic changes in mammalian sperm: implications for offspring health and development //Human Reproduction Update. – 2023. – Т. 29. – №. 1. – С. 24-44.
13. Andronico F, Battaglia R, Ragusa M, Barbagallo D, Purrello M, Di Pietro C. Extracellular Vesicles in Human Oogenesis and Implantation // Int J Mol Sci. 2019 May 1;20(9):2162. doi: 10.3390/ijms20092162.
14. Machtinger R., Laurent L.C., Baccarelli A.A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation // Hum. Reprod. Update. 2016. Vol. 22, N 2. P. 182-193. doi: 10.1093/humupd/dmv055
15. Zhou G, Gu Y, Zhou F, Zhang M, Zhang G, Wu L, et al.. The Emerging Roles and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles in Infertility. Front Endocrinol (Lausanne) (2021) 12:758206. doi: 10.3389/fendo.2021.758206
16. Almiñana C., Corbin E., Tsikis G., Alcântara-Neto A.S., Labas V., Reynaud K., Galio L., Uzbekov R., Garanina A.S., Druart X., Mermillod P. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo crosstalk // Reproduction. 2017. Vol. 154, N 3. P. 153-168. doi: 10.1530/REP-17-0054

17. Di Pietro C. Exosome-mediated communication in the ovarian follicle // *J Assist Reprod Genet.* 2016 Mar;33(3):303-311. doi: 10.1007/s10815-016-0657-9
18. da Silveira J.C., Veeramachaneni D.N., Winger Q.A., Carnevale E.M., Bouma G.J. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle // *Biol. Reprod.* 2012. Vol. 86, N 3. ID 71. doi: 10.1095/biolreprod.111.093252
19. Ferraz M.A.M.M., Carothers A., Dahal R., Noonan M.J., Songsasen N. Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, N 1. ID 9484. doi: 10.1038/s41598-019-45857-x
20. Marín-Briggiler C.I., Luque G.M., Gervasi M.G., Oscoz-Susino N., Sierra J.M., Mondillo C., Salicioni A.M., Krapf D., Visconti P.E., Buffone M.G. Human Sperm Remain Motile After a Temporary Energy Restriction but do Not Undergo Capacitation-Related Events // *Front Cell Dev Biol.* 2021 Nov 12;9:777086. doi: 10.3389/fcell.2021.777086.
21. Hackl M, Brunner S, Fortschegger K, Schreiner C, Micutkova L, Mück C, Laschober GT, Lepperdinger G, Sampson N, Berger P, Herndler-Brandstetter D, Wieser M, Kühnel H, Strasser A, Rinnerthaler M, Breitenbach M, Mildner M, Eckhart L, Tschachler E, Trost A, Bauer JW, Papak C, Trajanoski Z, Scheideler M, Grillari-Voglauer R, Grubeck-Loebenstern B, Jansen-Dürr P, Grillari J. miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging // *Aging Cell.* 2010 Apr;9(2):291-6. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00549.x.
22. Hasan M.M., Reshi Q.U.A., Lättekivi F., Viil J., Godakumara K., Dissanayake K., Andronowska A., Jaakma Ü., Fazeli A. Bovine Follicular Fluid Derived Extracellular Vesicles Modulate the Viability, Capacitation

- and Acrosome Reaction of Bull Spermatozoa // *Biology* (Basel). 2021 Nov 9;10(11):1154. doi: 10.3390/biology10111154.
23. Williams M., Hill C.J., Scudamore I., Dunphy B., Cooke I.D., Barratt C.L. Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation // *Hum. Reprod.* 1993. Vol. 8, N 12. P. 2019-2026. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137975
24. Jeon B.G., Moon J.S., Kim K.C., Lee H.J., Choe S.Y., Rho G.J. Follicular fluid enhances sperm attraction and its motility in human // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2001. Vol. 18, N 8. P. 407-412. doi: 10.1023/a:1016674302652
25. Keyser S., Horst G., Maree L. Progesterone, Myo-Inositol, Dopamine and Prolactin Present in Follicular Fluid Have Differential Effects on Sperm Motility Subpopulations // *Life* 2021, 11, 1250. <https://doi.org/10.3390/life11111250>.
26. Yao Y., Ho P., Yeung W.S. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa // *Fertil. Steril.* 2000. Vol. 73, N 4. P. 680-686. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00637-8
27. Aitken RJ, Henkel RR. Sperm cell biology: current perspectives and future prospects. *Asian J Androl.* 2011 Jan;13(1):3-5. doi: 10.1038/aja.2010.155.
28. Martinez R.M., Liang L., Racowsky C., Dioni L., Mansur A., Adir M., Bollati V., Baccarelli A.A., Hauser R., Machtinger R. Extracellular microRNAs profile in human follicular fluid and IVF outcomes // *Sci Rep.* 2018 Nov 19;8(1):17036. doi: 10.1038/s41598-018-35379-3.
29. Shen X., Liu X., Zhu P., Zhang Y., Wang J., Wang Y., Wang W., Liu J., Li N., Liu F. Proteomic analysis of human follicular fluid associated with successful in vitro fertilization // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2017. Vol. 15, N 1. ID 58. doi: 10.1186/s12958-017-0277-y
30. Ralt D., Goldenberg M., Fetterolf P., Thompson D., Dor J., Mashiach S., Garbers D.L., Eisenbach M. Sperm attraction to a follicular factor(s)

- correlates with human egg fertilizability // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1991. Vol. 88, N 7. P. 2840-2844. doi: 10.1073/pnas.88.7.2840
31. Ralt D., Manor M., Cohen-Dayag A., Tur-Kaspa I., BenShlomo I., Makler A., Yuli I., Dor J., Blumberg S., Mashiach S. et al. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors // *Biol. Reprod.* 1994. Vol. 50, N 4. P. 774-785. doi: 10.1095/biolreprod50.4.774
32. Sang Q., Yao Z., Wang H., Feng R., Wang H., Zhao X., Xing Q., Jin L., He L., Wu L., Wang L. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013. Vol. 98, N 7. P. 3068-3079. doi: 10.1210/jc.2013-1715.
33. Saint-Dizier M, Mahé C, Reynaud K, Tsikis G, Mermillod P, Druart X. Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Mol Cell Endocrinol.* 2020 Oct 1;516:110956. doi: 10.1016/j.mce.2020.110956.
34. Menezo Y, Testart J, Khatchadourian C, Frydman R. Human preovulatory follicular fluid: the lipids. Are they the trigger for capacitation? *Int J Fertil.* 1984;29(2):61-4. PMID: 6148318.
35. Sysoeva A.P., Makarova N.P., Silachev D.N., Lobanova N.N., Shevtsova Y.A., Bragina E.E., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. Influence of extracellular vesicles of the follicular fluid on morphofunctional characteristics of human sperm // *Bull Exp Biol Med.* 2021 Dec; 172(2):254-262. doi: 10.1007/s10517-021-05372-4.
36. Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature.* 2011 Mar 17;471(7338):387-91. doi: 10.1038/nature09767. PMID: 21412339.
37. Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺

- influx in human sperm. *Nature*. 2011 Mar 17;471(7338):382-6. doi: 10.1038/nature09769. PMID: 21412338.
38. Zhang, X., Wang, T., Song, J. et al. Study on follicular fluid metabolomics components at different ages based on lipid metabolism. *Reprod Biol Endocrinol* 18, 42 (2020). doi.org/10.1186/s12958-020-00599-8
39. Toxicology BMiR. Biologic markers of human male reproductive health and physiologic damage. 1989.
40. Brown RL. Rate of transport of spermia in human uterus and tubes. *Am J Obstet Gynecol*. 1944;47(3):407–11. doi:10.1016/S0002-9378(15)30756-0.
41. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 2010.
42. Shlomi Barak HWGB. Clinical management of male infertility. *Adult and Pediatric: Endocrinology*; 2016.
43. Dcunha R, Hussein RS, Ananda H, Kumari S, Adiga SK, Kannan N, Zhao Y, Kalthur G. Current Insights and Latest Updates in Sperm Motility and Associated Applications in Assisted Reproduction. *Reprod Sci*. 2022 Jan;29(1):7-25. doi: 10.1007/s43032-020-00408-y.
44. Oh-Oka T, Saxena DK, Tanii I, Yoshinaga K, Toshimori K. Changes in the activity of sperm nitric oxide synthase in the oviductal reservoir during ovulation. *Reprod Med Biol*. 2003 Apr 30;2(2):75-81. doi: 10.1046/j.1445-5781.2003.00024.x.
45. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*. 1997 Sep-Oct;3(5):403-39. doi: 10.1093/humupd/3.5.403. PMID: 9528908
46. Toshimori K. Dynamics of the mammalian sperm head // *Adv Anat Embryol Cell Biol*. – 2009. – T. 204. – C. 5-94.
47. Babayev E., Duncan F.E. Age-associated changes in cumulus cells and follicular fluid: The local oocyte microenvironment as a determinant of

- gamete quality // Biol Reprod. 2022 Jan 4:ioab241. doi: 10.1093/biolre/ioab241.
48. Battaglia R., Musumeci P., Ragusa M., Barbagallo D., Scalia M., Zimbone M., Lo Faro J.M., Borzi P., Scollo P., Purrello M., Vento E.M., Di Pietro C. Ovarian aging increases small extracellular vesicle CD81+ release in human follicular fluid and influences miRNA profiles // Aging (Albany NY). 2020 Jun 17;12(12):12324-12341. doi: 10.18632/aging.103441.
49. Schwartz, D. Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men / D.Schwartz, M.J.Mayaux, A.Spira, M.L.Moscato, P.Jouannet, F.Czyglik, G.David // Fertil. Steril. – 1983. – V.39, № 4. – P.530-535.
50. Chen B., Xu P., Wang J., Zhang C. The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS) // Gene. 2019 Jul. 20;706:91-96. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.082.
51. Diez-Fraile A., Lammens T., Tilleman K., Witkowski W., Verhasselt B., De Sutter P., Benoit Y., Espeel M., D'Herde K. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization // Hum Fertil (Camb). 2014 Jun;17(2):90-8. doi: 10.3109/14647273.2014.897006.
52. Simon C., Greening D.W., Bolumar D., Balaguer N., Salamonsen L.A., Vilella F. Extracellular vesicles in human reproduction in health and disease // Endocr. Rev. 2018. Vol. 39, N 3. P. 292-332. doi: 10.1210/er.2017-00229
53. Neyroud A. S. et al. Diversity of Extracellular Vesicles in Human Follicular Fluid: Morphological Analysis and Quantification // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – T. 23. – №. 19. – C. 11676.
54. B. Zhang, Y. Yin, R.C. Lai, S.K. Lim, Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles, Front Immunol. 5 (2014) 518. doi:10.3389/fimmu.2014.00518/abstract.

- 55.A.S. Jadli, N. Ballasy, P. Edalat, V.B. Patel, Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake, *Mol. Cell. Biochem.* 467 (1–2) (2020) 77–94.
- 56.S. Salarpour, M. Barani, A. Pardakhty, M. Khatami, N. Pal Singh Chauhan, The application of exosomes and Exosome-nanoparticle in treating brain disorders, *J. Mol. Liq.* 350 (2022), 118549.
57. U. Kharazi, R. Badalzadeh, A review on the stem cell therapy and an introduction to exosomes as a new tool in reproductive medicine, *Reprod. Biol.* 20 (4) (2020) 447–459.
- 58.Cocucci, E. and J. Meldolesi (2015). "Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles." *Trends Cell Biol* 25(6): 364-372.
- 59.Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* 9(6): 654-659.
- 60.Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, H. Yin, C. Betts, S. Lakhali and M. J. Wood (2011). "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes." *Nat Biotechnol* 29(4): 341-345.
- 61.Montecalvo, A., A. T. Larregina, W. J. Shufesky, D. B. Stolz, M. L. Sullivan, J. M. Karlsson, C. J. Baty, G. A. Gibson, G. Erdos, Z. Wang, J. Milosevic, O. A. Tkacheva, S. J. Divito, R. Jordan, J. Lyons-Weiler, S. C. Watkins and A. E. Morelli (2012). "Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes." *Blood* 119(3): 756-766.
- 62.Escrevente, C., S. Keller, P. Altevogt and J. Costa (2011). "Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells." *BMC Cancer* 11: 108.
- 63.Nanbo, A., E. Kawanishi, R. Yoshida and H. Yoshiyama (2013). "Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized

via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells." *J Virol* 87(18): 10334-10347.

64. Zoller, M. (2009). "Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis." *Nat Rev Cancer* 9(1): 40-55
65. Nolte-'t Hoen, E. N., S. I. Buschow, S. M. Anderton, W. Stoorvogel and M. H. Wauben (2009). "Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1." *Blood* 113(9): 1977-1981.
66. Hao, S., O. Bai, F. Li, J. Yuan, S. Laferte and J. Xiang (2007). "Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity." *Immunology* 120(1): 90-102.
67. Murdica V., Giacomini E., Alteri A., Bartolacci A., Cermisoni G.C., Zarovni N., Papaleo E., Montorsi F., Salonia A., Viganò P., Vago R. Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation // *Fertil. Steril.* 2019. Vol. 111, N 5. P. 897-908.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.01.030
68. Al-Dossary A.A., Strehler E.E., Martin-Deleon P.A. Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, N 11. ID e80181. doi: 10.1371/journal.pone.0080181
69. Getpook C., Wirotkarun S. Sperm motility stimulation and preservation with various concentrations of follicular fluid // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007. Vol. 24, N 9. P. 425-448. doi: 10.1007/s10815-007-9145-6
70. Ralt D., Goldenberg M., Fetterolf P., Thompson D., Dor J., Mashiach S., Garbers D.L., Eisenbach M. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88, N 7.
71. Williams M., Hill C.J., Scudamore I., Dunphy B., Cooke I.D., Barratt C.L. Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around

- ovulation // *Hum. Reprod.* 1993. Vol. 8, N 12. P. 2019-2026. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137975
72. Shahrokhi S. Z. et al. Asthenozoospermia: Cellular and molecular contributing factors and treatment strategies // *Andrologia*. – 2020. – T. 52. – №. 2. – C. e13463.
73. Zorova, L.D.; Kovalchuk, S.I.; Popkov, V.A.; Chernikov, V.P.; Zharikova, A.A.; Khutornenko, A.A.; Zorov, S.D.; Plokhikh, K.S.; Zinovkin, R.A.; Evtushenko, E.A.; et al. Do Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Contain Functional Mitochondria? *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7408. [https://doi.org/ 10.3390/ijms23137408](https://doi.org/10.3390/ijms23137408)
74. Kenigsberg S., Wyse B.A., Librach C.L., da Silveira J.C. Protocol for exosome isolation from small volume of ovarian follicular fluid: evaluation of ultracentrifugation and commercial kits // *Methods Mol. Biol.* 2017;1660:321-341. doi: 10.1007/978-1-4939-7253-1_26/
75. Mortimer D., Mortimer S. T. Computer-aided sperm analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation // *Spermatogenesis: Methods and Protocols*. – 2013. – C. 77-87.
76. Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, W.H. Tang, Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential, *Cell Biosci.* 9 (1) (2019) 19.
77. U. Kharazi, R. Badalzadeh, A review on the stem cell therapy and an introduction to exosomes as a new tool in reproductive medicine, *Reprod. Biol.* 20 (4) (2020) 447–459.
78. Bhagwat S. et al. N-formyl-l-aspartate: A novel sperm chemoattractant identified in ovulatory phase oviductal fluid using a microfluidic chip // *Andrology*. – 2021. – T. 9. – №. 4. – C. 1214-1226.
79. Flesch F. M., Gadella B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. – 2000. – T. 1469. – №. 3. – C. 197-235.

80. Vassilieva, E. V. and A. Nusrat (2008). "Vesicular trafficking: molecular tools and targets." *Methods Mol Biol* 440: 3-14.
81. Freitas M. J., Vijayaraghavan S., Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility // *Biology of Reproduction*. – 2017. – T. 96. – №. 1. – C. 2-12.
82. Smith J. F. et al. Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca^{2+} channel in a *CatSper2*-deficient infertile patient // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – T. 110. – №. 17. – C. 6823-6828.
83. Brown S. G. et al. Human sperm ion channel (dys) function: implications for fertilization // *Human reproduction update*. – 2019. – T. 25. – №. 6. – C. 758-776.
84. Mirihagalle S., Hughes J. R., Miller D. J. Progesterone-Induced Sperm Release from the Oviduct Sperm Reservoir // *Cells*. – 2022. – T. 11. – №. 10. – C. 1622.
85. Machado S. A. et al. Release of porcine sperm from oviduct cells is stimulated by progesterone and requires *CatSper* // *Scientific reports*. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 19546.
86. Vaquer CC, Suhaiman L, Pavarotti MA, De Blas GA, Belmonte SA. Ceramide induces a multicomponent intracellular calcium increase triggering the acrosome secretion in human sperm. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020 Jul;1867(7):118704. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118704.
87. T. Numakawa, H. Nakayama, S. Suzuki, T. Kubo, F. Nara, Y. Numakawa, D. Yokomaku, T. Araki, T. Ishimoto, A. Ogura, T. Taguchi. Nerve growth factor-induced glutamate release is via p75 receptor, ceramide, and Ca^{2+} from ryanodine receptor in developing cerebellar neurons. *J. Biol. Chem.*, 278 (2003), pp. 41259-41269
88. C. Colina, A. Flores, H. Rojas, A. Acosta, C. Castillo, R. Garrido Mdel, A. Israel, R. DiPolo, G. Benaim. Ceramide increase cytoplasmic Ca^{2+}

- concentration in Jurkat T cells by liberation of calcium from intracellular stores and activation of a store-operated calcium channel. *Arch. Biochem. Biophys.*, 436 (2005), pp. 333-345
- 89.N.L. Cross. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. *Biol. Reprod.*, 63 (2000), pp. 1129-1134
- 90.Jahn, R. and T. C. Sudhof (1999). "Membrane fusion and exocytosis." *Annu Rev Biochem* 68: 863-911.
- 91.Parolini, I., C. Federici, C. Raggi, L. Lugini, S. Palleschi, A. De Milito, C. Coscia, E. Iessi, M. Logozzi, A. Molinari, M. Colone, M. Tatti, M. Sargiacomo and S. Fais (2009). "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells." *J Biol Chem* 284(49): 34211-34222.
- 92.Anderson, H. C. (1967). "Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification." *J Cell Biol* 35(1): 81-101.
- 93.Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* 9(6): 654-659
- 94.Ciardiello, C., L. Cavallini, C. Spinelli, J. Yang, M. Reis-Sobreiro, P. de Candia, V. R. Minciocchi and D. Di Vizio (2016). "Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer." *Int J Mol Sci* 17(2).
- 95.Hagiwara K. et al. Commitment of Annexin A2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles //FEBS letters. – 2015. – T. 589. – №. 24. – C. 4071-4078.
- 96.George G. Ignatz and others, Annexins Are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir, *Biology of Reproduction*,

Volume 77, Issue 6, 1 December 2007, Pages 906–913, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062505>

97. Itach S. B. S. et al. Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization // *Developmental biology*. – 2012. – T. 362. – №. 2. – C. 154-161.
98. Maccarrone M. et al. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction // *Journal of Cell Science*. – 2005. – T. 118. – №. 19. – C. 4393-4404.
99. Machtinger, R.; Rodosthenous, R.S.; Adir, M.; Mansour, A.; Racowsky, C.; Baccarelli, A.A.; Hauser, R. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: An exploratory study. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2017, 34, 525–533.
100. Martinez C. A. et al. miRNA-Profilng in Ejaculated and Epididymal Pig Spermatozoa and Their Relation to Fertility after Artificial Insemination // *Biology*. – 2022. – T. 11. – №. 2. – C. 236.
101. Benoff S. et al. Voltage-dependent calcium channels in mammalian spermatozoa revisited // *Frontiers in Bioscience-Landmark*. – 2007. – T. 12. – №. 4. – C. 1420-1449.
102. Corda PO, Santiago J, Fardilha M. G-Protein Coupled Receptors in Human Sperm: An In Silico Approach to Identify Potential Modulatory Targets. *Molecules*. 2022 Oct 1;27(19):6503. doi: 10.3390/molecules27196503.
103. Istiaq A, Ohta K. A review on Tsukushi: mammalian development, disorders, and therapy. *J Cell Commun Signal*. 2022 Dec;16(4):505-513. doi: 10.1007/s12079-022-00669-z.
104. Jung H.J., Suh Y. Circulating miRNAs in ageing and ageing-related diseases // *J. Genet Genomics*. 2014 Sep 20;41(9):465-72. doi: 10.1016/j.jgg.2014.07.003.

105. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging // *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
106. Alonso C.A. Claudia E. Osycka-Salut, Castellano L., Cesari A., Di Siervi N., Mutto A., Johannisson A., Morrell J.M., Davio C., Perez-Martinez S. Extracellular cAMP activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation in bovines // *Mol Hum Reprod* 2017 Aug 1;23(8):521-534. doi: 10.1093/molehr/gax030.
107. Huang Q, Liu Y, Yang Z, Xie Y, Mo Z. The Effects of Cholesterol Metabolism on Follicular Development and Ovarian Function. *Curr Mol Med*. 2019;19(10):719-730. doi: 10.2174/1566524019666190916155004.
108. Cordeiro FB, Montani DA, Pilau EJ, Gozzo FC, Fraietta R, Turco EGL. Ovarian environment aging: follicular fluid lipidomic and related metabolic pathways. *J Assist Reprod Genet*. 2018 Aug;35(8):1385-1393. doi: 10.1007/s10815-018-1259-5.
109. Ravnik SE, Zarutskie PW, Muller CH. Lipid transfer activity in human follicular fluid: relation to human sperm capacitation. *J Androl*. 1990 May-Jun;11(3):216-26. PMID: 2384343.
110. Sohel M.M.H., Hoelker M., Noferesti S.S., SalilewWondim D., Tholen E., Looft C., Rings F., Uddin M.J., Spencer T.E., Schellander K., Tesfaye D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence // *PLoS ONE*. 2013 8:e78505. doi: 10.1371/journal.pone.0078505.
111. Zhang D., Lv J., Tang R., Feng Y., Zhao Y., Fei X., Chian R., Xie Q. Association of exosomal microRNAs in human ovarian follicular fluid with oocyte quality // *Biochem Biophys Res Commun*. 2021. Jan; 1;534:468-473. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.11.058.

112. Chen B., Xu P., Wang J., Zhang C. The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS) // *Gene*. 2019 Jul. 20;706:91-96. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.082.
113. Bearer EL, Friend DS. Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J Cell Biol* 1982; 92: 604-615. doi.org/10.1095/biolreprod57.5.976
114. Oliver EH, Sprecher H. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by an (n-6) lipoxygenase associated with human ejaculates. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1002:283-291.
115. Roldan ERS, Harrison RAP Diacylglycerol in the exocytosis of the mammalian sperm acrosome. *Biochem Soc Trans* 1993; 21:284-289.
116. S. Cerolini and others, Relationship between Spermatozoan Lipid Composition and Fertility during Aging of Chickens, *Biology of Reproduction*, Volume 57, Issue 5, 1 November 1997, Pages 976–980, <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.976>
117. Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228. Retrieved Sep 5, 2023, from <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
118. Martin P. A., Shaver E. L. Sperm aging in utero and chromosomal anomalies in rabbit blastocysts // *Developmental Biology*. – 1972. – T. 28. – №. 3. – C. 480-486.
119. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200:373–383.5
120. Lucchetti D., Fattorossi A., Sgambato A. Extracellular vesicles in oncology: progress and pitfalls in the methods of isolation and analysis // *Biotechnology journal*. – 2019. – T. 14. – №. 1. – C. 1700716.

121. Frenette G, Lessard C, Madore E, Fortier MA, Sullivan R. Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biol Reprod* 2003;69: 1586– 1592
122. Burns G, Brooks K, Wildung M, Navakanitworakul R, Christenson LK, Spencer TE. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS One* 2014;9: e90913.
123. Saadeldin IM, Kim SJ, Choi YB, Lee BC. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cell Reprogram* 2014;16:223 –234
124. Pons-Rejraji H, Artonne C, Sion B, Brugnon F, Canis M, Janny L, Grizard G. Protasomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *Int J Androl* 2011;34:568 –580.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Результат идентификации липидов в образцах внеклеточных везикул фолликулярной жидкости.

#	m/z	Время удерживания, мин.	Идентификация
1	642.6284	17.48658	CE(16:0)
2	640.6123	17.18147	CE(16:1)
3	670.6507	17.48797	CE(18:0)
4	664.6134	16.94664	CE(18:3)
5	692.6412	17.15892	CE(20:3)
6	690.6301	17.05214	CE(20:4)
7	688.6149	16.77653	CE(20:5)
8	664.6518	15.51808	Cer-NS(d20:1/23:0)
9	646.6073	14.81254	Cer-NS(d18:1/24:2)
10	369.3591	17.20681	Cholesterol-H2O
11	496.3485	4.345731	LPC(16:0)
12	518.3305	4.351358	LPC(16:0)
13	494.334	3.511864	LPC(16:1)
14	524.3802	5.691633	LPC(18:0)
15	522.3633	4.611678	LPC(18:1)
16	520.349	3.845131	LPC(18:2)
17	546.3655	4.210678	LPC(20:3)
18	544.3492	3.757897	LPC(20:4)
19	438.2053	2.183133	OxLPC(11:1(CHO))
20	542.331	3.845111	OxLPC(16:1(OOO))
21	522.2586	3.525928	OxLPC(16:2(COOH))
22	758.5826	12.69823	PC(16:0_18:2)
23	782.5825	12.41701	PC(16:0_20:4)
24	760.5984	13.6613	PC(16:0_18:1)
25	806.5821	12.07968	PC(16:0_22:6)
26	784.597	12.92461	PC(16:0_20:3)
27	808.5976	12.59422	PC(16:0_22:5)
28	780.5651	12.68982	PC(16:1_20:4)
29	780.5673	11.70061	PC(16:1_20:4)
30	786.6141	13.90002	PC(18:0_18:2)
31	810.6158	13.51796	PC(18:0_20:4)
32	812.6283	14.08986	PC(18:0_20:3)
33	808.5962	12.85994	PC(18:0_20:5)
34	783.5877	12.39596	PEtOH(20:1_20:1)-H
35	783.5881	8.199778	PEtOH(20:1_20:1)-H

36	614.5827	14.40476	plasmany-TG(O-18:0_8:0_8:0)
37	766.5936	13.15665	Plasmenyl-PC(P-16:0/20:4)
38	877.7377	16.65416	SM(d22:5/25:0)
39	684.6167	16.38843	TG(10:0_14:0_14:0)
40	792.7208	16.27311	TG(13:0_16:1_17:1)
41	824.7835	17.03381	TG(14:0_16:0_18:0)
42	796.7516	16.76528	TG(14:0_16:0_16:0)
43	820.7521	16.58956	TG(14:0_16:1_18:1)
44	794.7365	16.51362	TG(14:0_16:0_16:1)
45	782.7352	16.59234	TG(14:0_15:0_16:0)
46	768.719	16.44886	TG(14:0_14:0_16:0)
47	766.7056	16.17326	TG(14:0_14:1_16:0)
48	818.7357	16.33645	TG(14:0_16:1_18:2)
49	920.8793	17.65811	TG(14:1_16:0_25:0)
50	810.7683	16.88767	TG(15:0_16:0_16:0)
51	808.752	16.65277	TG(15:0_16:0_16:1)
52	936.9097	18.05478	TG(15:0_16:0_25:0)
53	922.8948	17.91119	TG(15:0_16:0_24:0)
54	948.9103	17.95061	TG(15:0_16:1_26:0)
55	806.7367	16.43062	TG(15:1_16:0_16:1)
56	874.7999	16.88353	TG(16:0_18:1_18:2)
57	822.7686	16.80886	TG(16:0_16:0_16:1)
58	848.7841	16.85958	TG(16:0_16:1_18:1)
59	850.8	17.07039	TG(16:0_16:1_18:0)
60	852.8151	17.28975	TG(16:0_16:0_18:0)
61	878.8301	17.31928	TG(16:0_18:0_18:1)
62	846.7685	16.64293	TG(16:0_16:1_18:2)
63	880.8472	17.53728	TG(16:0_18:0_18:0)
64	908.8785	17.78047	TG(16:0_18:0_20:0)
65	876.8152	17.09292	TG(16:1_18:0_18:1)
66	872.785	16.65844	TG(16:1_18:1_18:2)
67	906.8665	17.54992	TG(16:1_18:0_20:0)
68	934.8956	17.84231	TG(16:1_20:0_20:0)
69	870.7689	16.41937	TG(16:1_18:1_18:3)
70	904.8461	17.33761	TG(18:0_18:1_18:1)
71	898.7999	16.68653	TG(18:1_18:2_18:2)
72	900.8155	16.91581	TG(18:1_18:1_18:2)
73	896.7853	16.43625	TG(18:1_18:2_18:3)
74	669.4529	15.02333	PA(34:4)
75	345.2158	10.77756	AcCa(10DC)
76	342.2522	18.01958	AcCa(12:1)
77	342.2539	19.2555	AcCa(12:1)
78	372.3251	20.61667	AcCa(14:0)

79	626.5834	18.34014	CE(15:1)
80	626.5824	17.78336	CE(15:1)
81	652.599	14.582	CE(17:2)
82	668.645	17.48942	CE(18:1)
83	666.6308	17.21806	CE(18:2)
84	714.6305	16.913	CE(22:6)
85	714.6134	16.3238	CE(22:6)
86	452.4028	5.812528	Cer(d10:0_18:2)
87	512.5127	11.66699	Cer(d10:0_22:0)
88	438.3871	4.708753	Cer(d10:0_17:2)
89	540.5438	12.82899	Cer(d10:0_24:0)
90	480.4374	13.60784	Cer(d10:0_20:2)
91	480.4349	7.357494	Cer(d10:0_20:2)
92	400.3859	6.945428	Cer(d10:0_14:0)
93	470.4553	13.81296	Cer(d10:0_19:0)
94	508.4657	8.843917	Cer(d10:0_22:2)
95	526.5175	15.07948	Cer(d10:0_23:0)
96	554.5499	15.55321	Cer(d10:0_25:0)
97	484.4706	14.15729	Cer(d10:0_20:0)
98	510.4873	14.68188	Cer(d10:0_22:1)
99	386.3849	17.22647	Cer(d10:0_13:0)
100	480.4369	17.30517	Cer(d10:0_20:2)
101	532.4487	12.90356	Cer(d12:0_22:4)
102	548.5137	14.00832	Cer(d13:0_22:3)
103	550.5167	15.32984	Cer(d13:0_22:2)
104	516.4354	10.83513	Cer(d13:0_20:5)
105	580.5646	15.92013	Cer(d13:0_24:1)
106	492.4497	12.18651	Cer(d13:0_18:3)
107	522.4879	14.7226	Cer(d13:0_20:2)
108	544.4666	11.82974	Cer(d13:0_22:5)
109	546.4863	14.7029	Cer(d13:0_22:4)
110	556.4518	4.44705	Cer(d14:0_22:6)
111	608.5945	16.28861	Cer(d14:1_25:0)
112	624.6204	14.84356	Cer(d14:0_26:0)
113	622.6047	14.59038	Cer(d14:1_26:0)
114	594.5802	16.12403	Cer(d14:0_24:1)
115	622.611	16.37299	Cer(d14:1_26:0)
116	594.5723	13.82978	Cer(d14:0_24:1)
117	560.5	15.22292	Cer(d14:0_22:4)
118	592.5574	13.79345	Cer(d14:1_24:1)
119	570.4667	4.603219	Cer(d15:0_22:6)
120	606.5809	16.23378	Cer(d15:1_24:1)
121	578.5491	15.86531	Cer(d15:0_22:2)

122	636.6205	14.97272	Cer(d15:1_26:0)
123	638.6216	14.5665	Cer(d15:0_26:0)
124	574.518	15.51816	Cer(d15:0_22:4)
125	568.4887	7.102856	Cer(d15:1_22:6)
126	606.5738	14.12919	Cer(d15:1_24:1)
127	584.4845	5.527233	Cer(d16:0_22:6)
128	620.5965	16.39966	Cer(d16:1_24:1)
129	650.6367	15.24682	Cer(d16:1_26:0)
130	590.5488	16.00723	Cer(d16:0_22:3)
131	650.6361	17.16603	Cer(d16:1_26:0)
132	604.5647	16.02703	Cer(d17:0_22:3)
133	596.5203	8.547208	Cer(d17:1_22:6)
134	662.6371	15.31143	Cer(d17:2_26:0)
135	594.4678	5.903831	Cer(d17:2_22:6)
136	666.6574	15.44649	Cer(d17:0_26:0)
137	632.5897	14.34998	Cer(d17:2_24:1)
138	632.5963	16.29854	Cer(d17:2_24:1)
139	632.5965	16.6191	Cer(d17:2_24:1)
140	634.6056	14.77328	Cer(d17:1_24:1)
141	424.3703	4.608875	Cer(d18:2_8:0)
142	676.6546	15.59541	Cer(d18:2_26:0)
143	678.6682	15.77534	Cer(d18:1_26:0)
144	680.6842	15.82451	Cer(d18:0_26:0)
145	612.5157	6.955261	Cer(d18:0_22:6)
146	674.6427	16.77236	Cer(d18:3_26:0)
147	616.5649	16.05367	Cer(d18:0_22:4)
148	660.6288	16.68937	Cer(d18:3_25:0)
149	644.5977	16.35894	Cer(d18:3_24:1)
150	616.5452	15.04582	Cer(d18:0_22:4)
151	618.5745	13.99005	Cer(d18:0_22:3)
152	660.6218	14.99658	Cer(d18:3_25:0)
153	672.6303	16.63731	Cer(d18:4_26:0)
154	618.581	16.44753	Cer(d18:0_22:3)
155	646.6116	16.51074	Cer(d18:2_24:1)
156	660.6264	16.94669	Cer(d18:3_25:0)
157	628.5663	16.086	Cer(d19:0_22:5)
158	700.6392	16.37157	Cer(d20:4_26:0)
159	706.7003	16.05932	Cer(d20:1_26:0)
160	704.6836	16.01297	Cer(d20:2_26:0)
161	688.6545	15.53636	Cer(d20:3_25:0)
162	690.6688	15.77254	Cer(d20:2_25:0)
163	686.6433	16.79483	Cer(d20:4_25:0)
164	640.547	8.360158	Cer(d20:0_22:6)

165	708.7164	16.10989	Cer(d20:0_26:0)
166	692.6852	15.68818	Cer(d20:1_25:0)
167	690.6696	0.862833	Cer(d20:2_25:0)
168	686.637	15.36208	Cer(d20:4_25:0)
169	656.5918	14.83089	Cer(d20:5_23:0)
170	722.7316	16.35611	Cer(d21:0_26:0)
171	658.5213	4.451217	Cer(d22:5_22:6)
172	720.7162	16.27723	Cer(d22:1_25:0)
173	716.6841	16.14509	Cer(d22:3_25:0)
174	732.7157	16.38978	Cer(d22:2_26:0)
175	730.6996	16.15066	Cer(d22:3_26:0)
176	718.7003	16.13941	Cer(d22:2_25:0)
177	736.7483	16.50093	Cer(d22:0_26:0)
178	728.6833	15.97502	Cer(d22:4_26:0)
179	694.6224	16.45165	Cer(d22:6_24:1)
180	734.7326	16.45311	Cer(d22:1_26:0)
181	714.6693	15.70508	Cer(d22:4_25:0)
182	748.7463	16.60926	Cer(d24:1_25:0)
183	764.7812	16.63174	Cer(d24:0_26:0)
184	778.7957	17.02258	Cer(d25:0_26:0)
185	728.6016	8.119589	CerG1(d18:1_18:0)
186	1004.807	0.868428	CerG2(d18:1_26:0)
187	948.7346	7.611892	CerG2(d18:1_22:0)
188	564.4386	10.80842	CerP(d14:0_16:0)
189	672.537	5.4442	CerP(d14:1_24:1)
190	672.5357	15.83996	CerP(d14:1_24:1)
191	680.4925	13.14818	CerP(d15:1_24:4)
192	682.5225	5.871592	CerP(d15:0_24:4)
193	690.5573	0.858619	CerP(d15:0_24:0)
194	644.5053	4.299281	CerP(d18:1_18:1)
195	736.5551	13.15666	CerP(d19:1_24:4)
196	744.5968	6.681233	Co(Q8)
197	512.4249	4.496361	DG(10:0_17:2)
198	540.4562	5.607242	DG(12:0_17:2)
199	542.4896	17.34603	DG(12:0_17:1)
200	570.5216	17.67786	DG(13:0_18:1)
201	620.5418	14.42017	DG(13:0_22:4)
202	632.5391	10.79858	DG(14:0_22:5)
203	634.5486	5.985419	DG(14:0_22:4)
204	628.5127	5.399175	DG(14:1_22:6)
205	650.5814	14.1742	DG(15:0_22:3)
206	656.5413	6.910397	DG(16:1_22:6)
207	740.6886	16.09581	DG(17:0_26:0)

208	684.5744	8.239122	DG(18:1_22:6)
209	700.6104	15.31853	DG(19:0_22:6)
210	780.7209	16.34489	DG(20:1_26:0)
211	778.7047	16.07189	DG(20:2_26:0)
212	804.721	16.16478	DG(22:3_26:0)
213	734.5807	13.70902	DG(22:4_22:6)
214	732.558	3.970314	DG(22:5_22:6)
215	800.7298	15.29889	DG(22:5_26:0)
216	838.7997	17.14769	DG(24:0_26:0)
217	836.7837	16.93683	DG(24:1_26:0)
218	866.8304	17.38125	DG(26:0_26:0)
219	486.4282	16.76675	DG(8:0_17:1)
220	526.4413	4.584944	DG(8:0_20:2)
221	584.5364	17.75092	DG(8:0_24:1)
222	554.4912	17.40925	DG(8:0_22:2)
223	468.316	3.22385	LPC(14:0)
224	546.363	5.709964	LPC(20:3)
225	568.3494	3.618742	LPC(22:6)
226	348.3268	6.253869	MG(16:0)
227	348.3248	19.43822	MG(16:0)
228	348.3241	20.28342	MG(16:0)
229	362.3339	2.569811	MG(17:0)
230	360.33	9.056128	MG(17:1)
231	360.3302	11.2355	MG(17:1)
232	360.3305	10.3213	MG(17:1)
233	360.3249	7.46435	MG(17:1)
234	394.3083	8.246158	MG(20:5)
235	394.3078	6.928664	MG(20:5)
236	394.3071	14.26979	MG(20:5)
237	394.3074	20.92467	MG(20:5)
238	194.119	11.94966	MG(5:0)
239	194.1187	10.58374	MG(5:0)
240	250.1823	6.589881	MG(9:0)
241	250.1823	6.935572	MG(9:0)
242	772.628	8.028175	MGDG(10:0_26:2)
243	741.4773	0.879661	MGDG(10:0_22:6)
244	740.5599	9.924989	MGDG(10:0_24:4)
245	816.6539	7.912867	MGDG(11:0_26:1)
246	754.5733	9.951728	MGDG(11:0_24:4)
247	811.6197	13.58117	MGDG(12:0_26:2)
248	768.6011	13.20443	MGDG(12:0_24:4)
249	750.5712	13.15941	MGDG(13:0_22:6)
250	782.6029	11.03877	MGDG(13:0_24:4)

251	814.6901	13.33797	MGDG(13:0_26:2)
252	844.6841	0.879722	MGDG(13:0_26:1)
253	762.5717	13.19879	MGDG(14:1_22:6)
254	805.5671	12.38331	MGDG(14:1_24:4)
255	858.7175	13.11158	MGDG(14:0_26:1)
256	778.602	13.14956	MGDG(15:0_22:6)
257	804.564	12.47472	MGDG(15:1_22:6)
258	857.6952	0.878317	MGDG(15:0_26:0)
259	776.5865	20.49142	MGDG(15:1_22:6)
260	776.5848	20.87692	MGDG(15:1_22:6)
261	776.5872	4.044814	MGDG(15:1_22:6)
262	803.5575	8.026775	MGDG(16:0_22:6)
263	803.5563	14.24869	MGDG(16:0_22:6)
264	792.6167	13.17064	MGDG(16:0_22:6)
265	803.5532	14.49337	MGDG(16:0_22:6)
266	790.6011	4.241669	MGDG(16:1_22:6)
267	803.5553	13.48136	MGDG(16:0_22:6)
268	882.7063	0.861431	MGDG(16:1_26:2)
269	803.5566	21.6545	MGDG(16:0_22:6)
270	835.6122	13.24665	MGDG(16:0_24:4)
271	790.6027	4.615889	MGDG(16:1_22:6)
272	834.6094	13.21429	MGDG(17:0_22:6)
273	832.5945	9.307739	MGDG(17:1_22:6)
274	902.7432	12.97664	MGDG(17:0_26:0)
275	902.7439	16.4053	MGDG(17:0_26:0)
276	806.6332	14.99387	MGDG(17:0_22:6)
277	862.6625	13.15239	MGDG(17:2_24:4)
278	845.6047	9.747806	MGDG(17:2_24:4)
279	859.6208	10.23011	MGDG(18:2_24:4)
280	831.5908	9.327311	MGDG(18:0_22:6)
281	904.7071	7.714567	MGDG(18:4_26:2)
282	876.6769	6.412761	MGDG(18:2_24:4)
283	647.4713	15.02052	MGDG(2:0_24:0)
284	585.3687	10.83932	MGDG(2:0_20:3)
285	656.4261	0.874106	MGDG(2:0_24:4)
286	519.3355	4.352764	MGDG(2:0_15:1)
287	535.3678	11.98271	MGDG(2:0_16:0)
288	566.3907	5.396381	MGDG(2:0_17:0)
289	927.6871	12.86977	MGDG(20:4_25:0)
290	915.6836	10.22014	MGDG(20:4_26:2)
291	907.721	0.862861	MGDG(20:3_25:0)
292	920.7325	0.868511	MGDG(20:5_25:0)
293	915.6784	13.23819	MGDG(20:4_26:2)

294	905.7132	7.765233	MGDG(20:4_25:0)
295	945.7449	13.18611	MGDG(22:4_26:1)
296	901.5752	0.874067	MGDG(22:4_22:6)
297	945.7452	13.4715	MGDG(22:4_26:1)
298	945.7471	15.49857	MGDG(22:4_26:1)
299	945.7435	20.74464	MGDG(22:4_26:1)
300	642.4477	9.260014	MGDG(3:0_24:4)
301	612.3993	0.872672	MGDG(3:0_22:5)
302	659.4933	6.952486	MGDG(3:0_24:1)
303	689.5368	21.66861	MGDG(3:0_26:0)
304	688.5322	4.157239	MGDG(4:0_26:2)
305	652.4221	21.79511	MGDG(4:0_22:6)
306	624.4227	7.005992	MGDG(4:0_22:6)
307	703.5518	4.425886	MGDG(4:0_26:0)
308	626.4244	9.272681	MGDG(4:0_22:5)
309	670.4795	9.941853	MGDG(5:0_24:4)
310	670.4794	10.42377	MGDG(5:0_24:4)
311	702.5479	4.369683	MGDG(5:0_26:2)
312	651.4235	0.860072	MGDG(5:0_22:5)
313	746.5744	4.386525	MGDG(6:0_26:1)
314	716.564	5.257122	MGDG(6:0_26:2)
315	698.511	11.04017	MGDG(7:0_24:4)
316	679.4301	5.535619	MGDG(7:0_22:5)
317	687.4318	15.02609	MGDG(8:0_20:5)
318	680.4628	8.330561	MGDG(8:0_22:6)
319	774.6242	0.874061	MGDG(8:0_26:1)
320	788.6238	6.557561	MGDG(9:0_26:1)
321	771.587	7.526244	MGDG(9:0_26:1)
322	506.2345	3.523181	OxLPC(15:3(COOH))
323	608.3963	6.953864	OxLPC(22:2(OO))
324	664.4695	13.15944	OxPC(12:0_14:0(CHO))
325	702.4255	13.19182	OxPC(12:0_16:3(COOH))
326	790.3936	1.682378	OxPC(14:1(OOOO)_16:4(COOH))
327	856.5775	13.16224	OxPC(16:1_22:4(OOO))
328	882.564	0.872678	OxPC(17:2_22:5(OOOO))
329	934.6571	9.299317	OxPC(18:1_24:1(OOOO))
330	786.5134	6.135764	OxPC(18:2_16:1(COOH))
331	918.5927	20.55475	OxPC(18:2(OOH)_22:2(OOO))
332	918.5906	19.14431	OxPC(18:2(OOH)_22:2(OOO))
333	830.5403	6.093678	OxPC(20:4_19:4(CHO))
334	920.5878	0.855822	OxPC(20:5_22:4(OOOO))
335	732.427	7.648536	OxPC(20:5_12:3(CHO))
336	832.5352	0.864275	OxPC(20:4_18:4(COOH))

337	852.4168	2.204186	OxPC(20:5(OOOO)_15:4(COOH))
338	698.3709	19.81228	OxPC(20:4(Ke)_7:1(COOH))
339	944.742	13.15103	OxPC(21:0_24:1(Ke,OH))
340	944.7429	15.44927	OxPC(21:0_24:1(Ke,OH))
341	850.5895	13.14958	OxPC(21:0_19:5(CHO))
342	828.5645	12.0981	OxPC(21:0_16:3(COOH))
343	654.344	5.678989	OxPC(22:6_3:0(COOH))
344	874.5666	6.037319	OxPC(22:4_19:4(COOH))
345	982.6252	0.854392	OxPC(22:2(OO)_22:6(OOOO))
346	876.5618	0.867122	OxPC(22:3_19:4(COOH))
347	1048.664	0.865656	OxPC(22:4(OOOO)_24:1(OOOO))
348	992.7624	7.538836	OxPC(22:0_24:1(OOOO))
349	838.3938	0.862881	OxPC(22:6(OOOO)_12:3(COOH))
350	758.3354	19.18089	OxPC(22:6(OOOO)_6:1(COOH))
351	832.6502	6.505567	OxPC(23:0_15:0(CHO))
352	966.7232	13.23672	OxPC(25:0_22:5(OO))
353	860.6819	7.81025	OxPC(25:0_15:0(CHO))
354	1022.785	13.22685	OxPC(25:0_24:1(Ke,OH))
355	1070.776	13.16642	OxPC(26:0_24:1(OOOO))
356	716.4122	7.953628	OxPC(8:0_20:5(OOO))
357	826.3866	0.883931	OxPE(14:1(OO)_20:5(OOOO))
358	846.3892	21.56175	OxPE(15:1(OOOO)_18:4(OOOO))
359	698.267	14.03081	OxPE(18:4(OOO)_8:1(COOH))
360	700.2657	14.03225	OxPE(18:4(OOOO)_7:1(COOH))
361	624.2468	13.45748	OxPE(18:4(OOOO)_3:0(COOH))
362	612.1933	12.63628	OxPE(18:4(Ke,OH)_3:0(COOH))
363	870.416	0.867078	OxPE(18:4(OOO)_20:5(OOOO))
364	626.2455	13.47718	OxPE(18:3(OOOO)_3:0(COOH))
365	796.3518	1.683778	OxPE(22:6(OOOO)_12:3(COOH))
366	876.4173	0.867094	OxPE(22:6(OOOO)_18:5(COOH))
367	802.3625	20.38183	OxPE(22:6(OOO)_12:3(COOH))
368	802.3631	18.73514	OxPE(22:6(OOO)_12:3(COOH))
369	610.1937	12.63205	OxPE(3:0(COOH)_18:5(COOH))
370	536.1758	11.75543	OxPE(3:0(COOH)_14:3(COOH))
371	600.4792	4.397803	OxTG(14:0_14:0_3:0(CHO))
372	614.4957	4.463903	OxTG(14:0_14:0_4:0(CHO))
373	750.6151	9.063131	OxTG(14:0_14:0_14:2(CHO))
374	694.5508	11.71032	OxTG(14:0_14:0_10:2(CHO))
375	694.5495	8.0085	OxTG(14:0_14:0_10:2(CHO))
376	750.613	10.20613	OxTG(14:0_14:0_14:2(CHO))
377	638.4941	5.847711	OxTG(14:0_14:1_6:1(CHO))
378	694.5501	14.68191	OxTG(14:0_14:0_10:2(CHO))
379	750.6139	9.292258	OxTG(14:0_14:0_14:2(CHO))

380	694.5505	14.19524	OxTG(14:0_14:0_10:2(CHO))
381	1070.847	0.868472	OxTG(16:0_22:6_24:1(OOOO))
382	980.8112	16.92703	OxTG(18:0_20:4_20:4(OOH))
383	982.7919	0.875469	OxTG(18:0_22:5_18:2(OOH))
384	1094.788	12.61798	OxTG(22:5_22:5_22:5(OOO))
385	761.602	13.65285	PA(14:0_26:0)
386	817.6567	7.888981	PA(18:0_26:0)
387	565.3722	21.76556	PA(8:0_18:0)
388	425.2224	4.200858	PA(8:0_8:0)
389	1056.913	17.20958	PC(19:0_36:0)