

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПУТЕМ АСИММЕТРИЧНОЙ ГЛУБИННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Гаврилов М. Ю.¹, Макарова Н. П.¹, Якимова А. С.¹,
Вишнякова П. А.^{1,3}, Карягина В. Е.^{1,3}, Сысоева А. П.¹,
Евтушенко Е. А.², Калинина Е. А.¹

Контактная информация:
Макарова Наталья Петровна,
ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии
и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова»
Минздрава России,
ул. Академика Опарина, д. 4, Москва,
Россия, 117997.
E-mail: np_makarova@oparina4.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины медицинского института, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

*Статья поступила в редакцию 11.10.2024
и принята к печати 27.12.2024*

Резюме

Актуальность. Биологические жидкости организма содержат множество популяций внеклеточных везикул (ВВ), которые различаются по размеру, клеточному происхождению, молекулярному составу и биологической активности. В данном исследовании впервые был применен метод выделения ВВ из семенной плазмы (СП) с помощью асимметричной глубинной фильтрации без использования метода ультрацентрифугирования, который на данный момент является классическим в лабораторной практике. **Цель.** Подтвердить возможность использования нового метода выделения ВВ СП с помощью асимметричной глубинной фильтрации через полупроницаемую мембрану, который может послужить достойной альтернативой рутинному методу ультрацентрифугирования. **Материалы и методы.** Было отобрано 12 образцов семенной плазмы молодых мужчин и пациентов позднего репродуктивного возраста со слабо выраженной формой тератозооспермии. Из данных проб исследуемым методом были выделены ВВ СП. Вестерн-блот анализ на мембранные маркеры везикул CD9, CD63, CD81 показал присутствие ВВ СП в изучаемых образцах. Трансмиссионная электронная микроскопия также доказала присутствие ВВ СП. Были описаны морфологические особенности ВВ СП мужчин различного возраста. Количественные характеристики образцов ВВ СП оценивали с помощью Nanoparticle Tracking Analysis (NTA-анализ). **Результаты.** Полученные распределения частиц по размерам и концентрации демонстрируют возрастные изменения ВВ СП: в препаратах группы позднего репродуктивного возраста выявлен сдвиг пика распределения в сторону частиц большего размера по сравнению с пиком распределения в группе молодых мужчин. **Заключение.** Полученные результаты дают основание для продолжения изучения ВВ СП и рассмотрения возможностей клинического использования ВВ СП в программах экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: бесплодие, внеклеточные везикулы, возраст, вспомогательные репродуктивные технологии, простасомы, семенная плазма, экзосомы, эякулят

Для цитирования: Гаврилов М.Ю., Макарова Н.П., Якимова А.С. и др. Возрастные изменения внеклеточных везикул семенной плазмы, выделенных путем асимметричной глубинной фильтрации. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 27-36. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-27-36. EDN: VBTDL



AGE-RELATED CHANGES IN EXTRACELLULAR VESICLES OF SEMINAL PLASMA ISOLATED BY ASYMMETRIC DEPTH-FILTRATION

Maksim Yu. Gavrilov¹, Natalya P. Makarova¹,
Alexandra S. Yakimova¹, Polina A. Vishnyakova^{1,3},
Victoria E. Karyagina^{1,3}, Anastasia P. Sysoeva¹,
Ekaterina A. Evtushenko², Elena A. Kalinina¹

Corresponding author:

Natalya P. Makarova,
Academician V. I. Kulakov National Medical
Research Centre for Obstetrics, Gynecology
and Perinatology,
Ac. Oparin str., 4, Moscow, Russia, 117997.
E-mail: np_makarova@oparina4.ru

¹ Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for
Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples'
Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Received 11 October 2024; accepted
27 December 2024



Abstract

Background. Biological fluids contain diverse extracellular vesicle (EV) populations differing in size, origin, composition, and function. This study pioneers asymmetric depth filtration for isolating seminal plasma (SP) EVs, bypassing ultracentrifugation (current gold standard). **Objective.** Validate the novel asymmetric depth filtration method for SP EV isolation as an alternative to ultracentrifugation. **Design and methods.** Twelve samples of seminal plasma were collected from young men and patients of advanced reproductive age with mild teratozoospermia. EVs were isolated from the SP using the proposed method. Western blot analysis for vesicle membrane markers CD9, CD63, and CD81 confirmed the presence of SP EVs in the studied samples. Transmission electron microscopy further validated the presence of SP EVs. Morphological characteristics of SP EVs from men of different age groups were described. Quantitative characteristics of the SP EV samples were assessed using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). **Results.** The obtained particle size and concentration distributions revealed age-related changes in SP EVs: in the advanced reproductive age group, a shift in the distribution peak toward larger particles was observed compared to the peak distribution in the young men group. **Conclusion.** The results provide a basis for further investigation of SP EVs and exploration of their potential clinical applications in assisted reproductive technologies, such as *in vitro* fertilization programs.

Key words: age, assisted reproductive technologies, ejaculate, exosomes, extracellular vesicles, infertility, prostasomes, seminal plasma

For citation: Gavrilov MYu, Makarova NP, Yakimova AS, et al. Age-related changes in extracellular vesicles of seminal plasma isolated by asymmetric depth-filtration. *Translational Medicine*. 2025; 12(1): 27-36. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-27-36. EDN: VBTDL

Список сокращений: ВВ — внеклеточные везикулы, ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии, СП — семенная плазма, NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) — анализ траекторий наночастиц.

Введение

Семенная плазма представляет собой сложную биологическую жидкость, которая необходима для выполнения различных функций мужских половых клеток в процессе оплодотворения: от поддержания подвижности сперматозоидов до изменения иммунного ответа женского репродуктивного тракта во время оплодотворения. Семенная плазма очень богата внеклеточными везикулами, вырабатываемыми железами внутренней секреции мужского полового тракта (простата, эпидидимис, семенные пузырьки и бульбоуретральные железы) [1, 2]. В научной литературе были описаны три вида ВВ СП в зависимости от места их образования: микровезикулы и простасомы (размеры от 100 нм до 1000 нм, вырабатываются эпидидимисом и клетками предстательной железы соответственно), миелinosомы (размер от 200 нм до 700 нм, вырабатываются извитыми семенными канальцами) и экзосомы (размер от 30 нм до 100 нм, вырабатываются преимущественно простатой) [1, 3].

С возрастом происходит старение органов мужской репродуктивной системы, что отражается на фертильности мужских половых клеток, в частности все чаще исследователи указывают на эпигенетическое старение сперматозоидов [3, 4]. Происходит накопление точечных мутаций в геноме клетки, снижается возможность транскрипции определенных генов, уменьшается концентрация половых клеток в эякуляте [3]. Гистологические исследования на животных и человеке подтверждают морфологические изменения тканей органов репродуктивной системы с увеличением возраста [5]. Именно поэтому все чаще говорят об изменениях не только самих половых клеток, но и в биологических жидкостях репродуктивных органов и тканей [6, 7].

Целью данного исследования было определить возможность выделения внеклеточных везикул (ВВ) семенной плазмы (СП) методом глубинной фильтрации через полупроницаемую мембрану и сравнить характеристики ВВ СП у молодых мужчин и пациентов позднего репродуктивного возраста.

Материалы и методы

Получение семенной плазмы

Образцы эякулята были получены у 12 мужчин различного возраста, проходящих лечение

бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Всем мужчинам проводили оценку эякулята согласно Руководству ВОЗ по оценке и обработке эякулята (2010 г.). В исследование были отобраны мужчины, у которых были рожденные дети (подтвержденная фертильность), однако по результатам спермограммы выявлялось незначительное снижение количества морфологически нормальных форм сперматозоидов, слабо выраженная форма тератозооспермии — снижение числа морфологически нормальных форм сперматозоидов менее 4 % (строгий анализ спермограммы по Крюгеру). Концентрация мужских половых клеток и их подвижность находились в пределах нормальных значений. Все мужчины-доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Образцы спермы были получены путем мастурбации после 3–5 дней полового воздержания, далее происходил процесс разжижения на электрической мешалке на 150 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре с последующей оценкой характеристик эякулята. Семенная плазма отделялась от клеточных элементов эякулята путем центрифугирования при 400g в течение 10 минут при комнатной температуре, далее отбирался супернатант и переносился в новую пробирку для последующего выделения внеклеточных везикул. Все образцы полученной семенной плазмы были разделены на две группы в зависимости от возраста мужчины: группа 1 (молодые пациенты, 24–28 лет, n = 6) и группа 2 (мужчины позднего репродуктивного возраста, 43–48 лет, n = 6).

Выделение внеклеточных везикул семенной плазмы путем асимметричной глубинной фильтрации

Выделение внеклеточных везикул осуществляли при стандартизированном объеме семенной плазмы для всех пациентов, равном 2 мл, при помощи дифференциального центрифугирования, включая стадию отмывки от крупной фракции и последующее пропускание через полупроницаемую мембрану [8, 9]. Семенную плазму получали путем осаждения сперматозоидов из эякулята на центрифуге 10 минут 500g, дальнейшая очистка семенной плазмы происходила на микроцентрифуге при 15 000 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре [10]. Затем очищенную семенную плазму использовали для выделения везикул с помощью асимметричной глубинной фильтрации [11] в соответствии с протоколом производителя картриджей («Простагност», Москва, Россия) при скорости центрифугирования, уста-

новленной на 400g. После выделения ВВ хранили в пробирках protein LoBind (Эппендорф, Гамбург, Германия) при температуре -20 °С до анализа.

Оценка общего содержания белка во внеклеточных везикулах семенной плазмы

Анализ концентрации общего белка проводился с помощью спектрофотометра DS-11 FX+ (DeNovix, США) по технологии NanoDrop согласно инструкции производителя. Для исследования 1 мкл образца помещали в испытательную камеру и воздействовали излучением с длиной волны 280 нм для получения количественного определения образцов на основе значений абсорбции на детекторе 2048 element CCD.

Анализ траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis)

Перед проведением анализа траекторий наночастиц (NTA) образцы внеклеточных везикул размораживали и разводили в пропорции 1:10 000 в DPBS (Gibco, США). NTA выполнялся с помощью NanoSight LM10, оснащенного лазером мощностью 45 МВт с длиной волны 488 нм (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). В течение нескольких минут после разбавления образец вводили в испытательную ячейку, освещали лазером и записывали пять видеороликов продолжительностью 1 минута на высокочувствительную камеру sCMOS с уровнем восприимчивости сигнала, установленным на 15, для фиксации движения частиц. Затем видеозаписи были проанализированы с помощью программного обеспечения Nanosight версии 3.2 с порогом обнаружения, равным 5, раз-

мером размытия и максимальным расстоянием скачка, установленным на авто, для определения концентрации ВВ и распределения по размерам. Предполагалось, что вязкость DPBS соответствует вязкости воды при той температуре, которая была во время измерений [12].

Вестерн-блот внеклеточных везикул семенной плазмы

Маркеры внеклеточных везикул охарактеризовали с помощью метода вестерн-блоттинга. Образец ВВ смешивали с 2x Laemmli Sample буфером (Bio-rad, США). По 10 мкл образца наносили на 12 % полиакриламидный гель. Использовали белковый маркер молекулярной массы 10–250 кДа (Thermo Fisher Scientific, США). Белки разделяли при напряженности поля 80 В в течение 30 минут в концентрирующем геле и 180 В в разделяющем геле в течение 1 часа. Далее осуществляли полусухой перенос белков из геля на PVDF-мембрану с помощью системы Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-rad, США). После блокирования сайтов неспецифического связывания антител мембрану инкубировали с первичными антителами (табл. 1): анти-CD81 (Affinity Biosciences, DF8045, 1:1000), анти-CD63 (Affinity Biosciences, AF5117, 1:500), анти-CD9 (Affinity Biosciences, AF5117, 1:1000) при +4 °С в течение 18 часов. Далее мембраны трижды промывали TBST (TBS буфер с 0,1 % Твин-20) и инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки добавляли Clarity Western ECL (Bio-rad, США) субстрат для

Таблица 1. Моноклональные антитела, специфичные для внеклеточных везикул, использованные в исследовании

Table 1. Monoclonal antibodies specific to extracellular vesicles used in the study

Название	Номер в каталоге	Организм	Применение	Производитель	Концентрация
CD81 Antibody	DF8045	Человек	Вестерн-блот; иммуноферментный анализ	Affinity Biosciences, Китай	1:1000
CD63 Antibody	AF5117	Человек, Мышь, Крыса	Вестерн-блот; иммуногистохимия, иммуноферментный анализ	Affinity Biosciences, Китай	1:500
CD9 Antibody	AF5139	Человек, Мышь, Крыса	Вестерн-блот; иммуногистохимия, иммунофлюоресценция/ иммуноцитохимия, иммуноферментный анализ	Affinity Biosciences, Китай	1:1000

хемилюминесцентной детекции с помощью системы документации ChemiScore (Clinx, Китай). Программное обеспечение Clinx применялось для денситометрического анализа. В качестве контроля использовали буфер PBS без ВВ СП.

Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул семенной плазмы

Для приготовления препаратов из выделенных образцов ВВ СП применяли медные сетки для электронной микроскопии IGC300 (PELCO), покрытые коллодиевой пленкой с углеродным напылением. На сетку наносили 15 мкл образца ВВ СП. После инкубации в течение 1 минуты лишнюю жидкость отбирали с помощью фильтровальной бумаги, затем проводили негативное контрастирование 2 % водным раствором уранилацетата

в течение 10 секунд с последующим отбором лишней жидкости фильтровальной бумагой. Оценку ВВ СП выполняли с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL), цифровой фотокамеры Quemesa и программного обеспечения iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

Статистический анализ данных

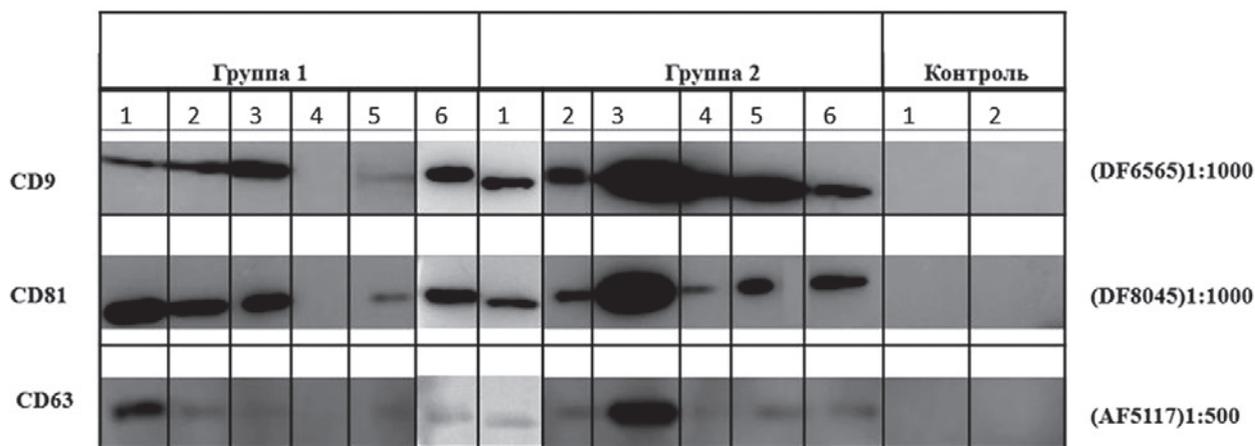
Статистическая обработка данных выполнялась с помощью таблиц Microsoft Excel и статистической программы SPSS Statistics 22 (США). Статистический анализ проводили с помощью χ^2 -теста для сравнения категориальных данных. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали в тесте Шапиро-Уилка. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение,

Таблица 2. Показатели эякулята в день выделения внеклеточных везикул семенной плазмы

Table 2. ejaculate parameters on the day of seminal plasma extracellular vesicle isolation

Параметр*	Группа 1 n = 6	Группа 2 n = 6	P
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл, млн/мл	81 (47; 110)	84 (68; 90)	> 0,05
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	66 (65; 67)	60 (55; 61)	> 0,05
Морфологически нормальные сперматозоиды, %	3 (2; 3)	2 (2; 3)	> 0,05

* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом (Q1; Q3).



Интенсивность сигнала соответствует 25 кДа.

Рис. 1. Оценка основных маркеров внеклеточных везикул, выделенных из семенной плазмы мужчин

Figure 1. evaluation of key markers of extracellular vesicles isolated from seminal plasma of men

использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате M (SD). При ранжировании признаков с распределением, отличающимся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3). Величину порогового уровня значимости (p) во всех исследованиях принимали равной 0,05.

Результаты

На первом этапе были охарактеризованы количественные показатели эякулята отобранных групп пациентов. Результаты показаны в таблице 2. Как видно, значимых различий по показателям спермограммы между возрастными группами мужчин не наблюдалось. Концентрация сперматозоидов в группе 1 молодых мужчин составила 81 (47; 110) млн/мл, в группе 2 — 84 (68; 90) млн/мл; прогрессивно-подвижных сперматозоидов в группе молодых — 66 (65; 67) %, группе возрастных мужчин — 60 (55; 61) %. Морфология мужских половых клеток (%) соответственно 3 (2; 3) и 2 (2; 3). Таким образом, группы по данным показателям были сопоставимы между собой. Далее методом глубинной фильтрации проводили выделение ВВ СП, которые были охарактеризованы качественно по главным маркерам внеклеточных везикул (CD81, CD63, CD9) [15]. Результаты вестерн-блота представлены на рисунке 1. Было показано, что выделенные фракции ВВ СП содержат специфичные маркеры везикул, это позволило провести дальнейшую характеристику выделенных ВВ СП в двух группах. Метод глубинной фильтрации показал свою эффективность для семенной плазмы. В более ранних работах использовался метод ультрацентрифугирования [2], метод глубинной фильтрации применен впервые.

На следующем этапе исследования выполнена сравнительная характеристика выделенных ВВ СП у мужчин разного возраста. Оценка общей концентрации белка показала отсутствие

достоверной разницы между группами (табл. 3). Результаты анализа траекторий наночастиц представлены на рисунке 2. В группе 1 молодых мужчин максимальная концентрация в препарате ВВ СП была у частиц размером 80 нм, а в группе 2 (возрастных) — 100 нм. Данные размеры везикул соответствуют экзосомам и простасомам. Более того, в группе молодых мужчин на графике прослеживается еще один пик частиц размером 170 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия также подтвердила присутствие ВВ СП в выделенных образцах. Микрофотографии показаны на рисунках 3 и 4. ВВ СП представляют собой структуры с чашеобразной морфологией.

Таким образом, впервые примененный метод глубинной фильтрации для выделения ВВ СП подтвердил свою эффективность, а также при последующем анализе была выявлена разница в количественных характеристиках ВВ СП у мужчин разного возраста, но с одинаковыми показателями спермограммы.

Обсуждение

В нашем исследовании было показано, что метод глубинной фильтрации эффективно позволяет выделить ВВ СП. С помощью CD-маркеров и электронной микроскопии были качественно описаны ВВ. Ранее было установлено, что данный метод выделения ВВ может быть использован для других биологических жидкостей, для семенной плазмы метод предложен впервые [11].

Обнаруженные возрастные изменения ВВ СП указывают на сдвиг пика распределения частиц по размерам в сторону ВВ больших размеров у возрастных мужчин, при этом у молодых пациентов регистрировали большую концентрацию мелких ВВ. Такие изменения СП могут также объяснять эффекты внутриматочной перфузии СП на наступление беременности [13]. Как показали авторы на модели мышей, частота имплантации

Таблица 3. Оценка концентрации белка в выделенных из семенной плазмы внеклеточных везикулах у мужчин разного возраста

Table 3. Protein concentration assessment in extracellular vesicles isolated from seminal plasma of men of different age groups

Исследуемый параметр	Группа 1 n = 6	Группа 2 n = 6	p
Концентрация белка, мг/мл	6,84 (2,7; 7,1)	3,43 (0,8; 8,3)	> 0,05

* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом (Q1; Q3).

эмбриона была примерно на 40 % ниже у мышей после внутриматочной перфузии семенной плазмы от старых самцов, чем семенной плазмы от молодых самцов. Также авторами была изучена возможность «донации» семенной плазмы. Снижение частоты имплантации было частично устранено путем добавления в «старую» мужскую семенную плазму ВВ «молодой» СП перед предимплантационной внутриматочной перфузией, с увеличением на 20 %. Эти различия объясняются разницей в содержании ВВ СП у старых и молодых самцов, вызывающей иммуномодуляцию клеток эндометрия посредством экспрессии цитокинов и хемокинов, а также различия уровней экспрессии генов в матках мышей с СП старых и молодых самцов [13].

Также показано, что с возрастом у мужчин в организме увеличивается системное воспаление, которое затрагивает семенную плазму [14]. Установлено, что угасание репродуктивной функции связано с оксидативным стрессом, воспалительными процессами в органах и тканях, и большее число обнаруженных простасом в семенной плазме в представленном эксперименте, полученных

с помощью метода выделения ВВ СП путем асимметричной глубинной фильтрации, может быть следствием общих процессов старения.

В нашей работе показана тенденция возрастных изменений ВВ СП, которую мы планируем подтвердить увеличением выборки пациентов в дальнейшем. Однако уже полученные результаты могут быть основанием для использования ВВ в программах экстракорпорального оплодотворения у человека. Возможность клинического использования ВВ СП может повысить эффективность программ экстракорпорального оплодотворения путем донации ВВ СП молодых мужчин, причем как донорской СП, так и собственной — после предварительной криоконсервации. Однако данные предположения требуют тщательного анализа и проведения предварительных экспериментальных работ на половых клетках человека. Результаты исследования подтвердили возможность выделения внеклеточных везикул семенной плазмы методом глубинной фильтрации через полупроницаемую мембрану, что являлось основной целью работы.

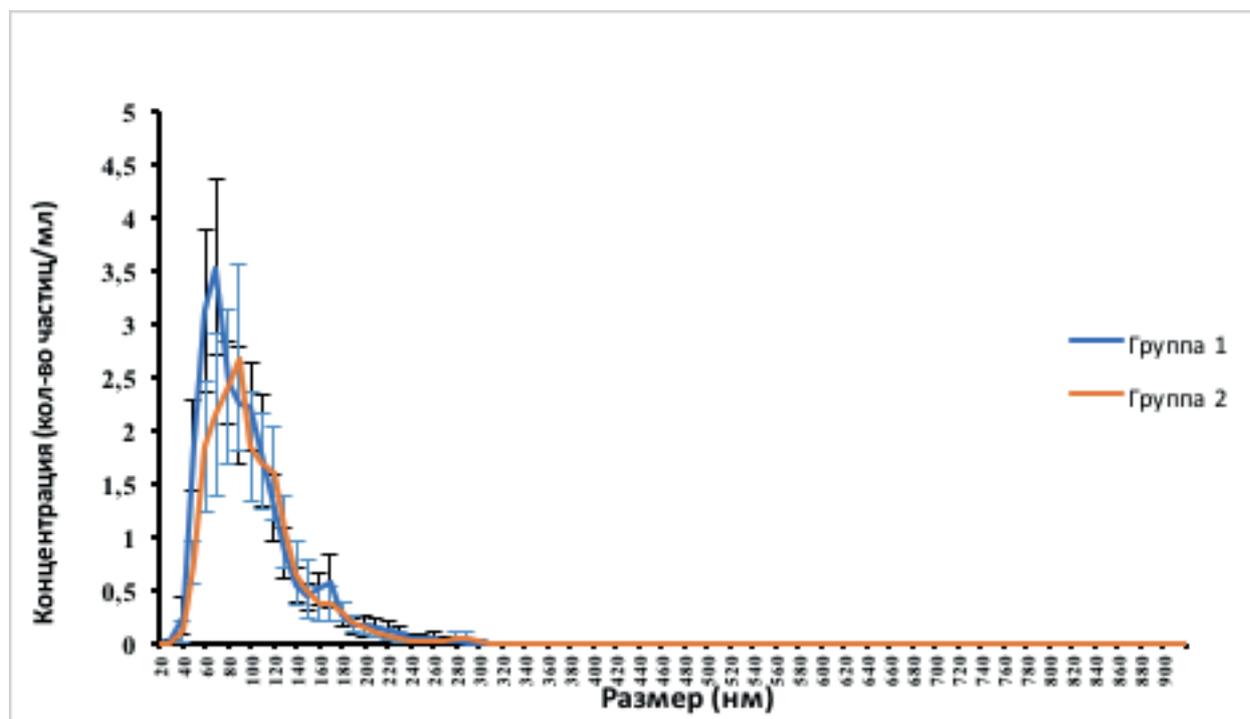


Рис. 2. Проведение анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis) внеклеточных везикул семенной плазмы мужчин выделенных возрастных групп. Группа 1 — молодые мужчины, группа 2 — мужчины позднего репродуктивного возраста. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение

Figure 2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) of Extracellular Vesicles from Seminal Plasma of Men in Different Age Groups. Group 1 — young men, Group 2 — men of advanced reproductive age. Data are presented as mean \pm standard deviation

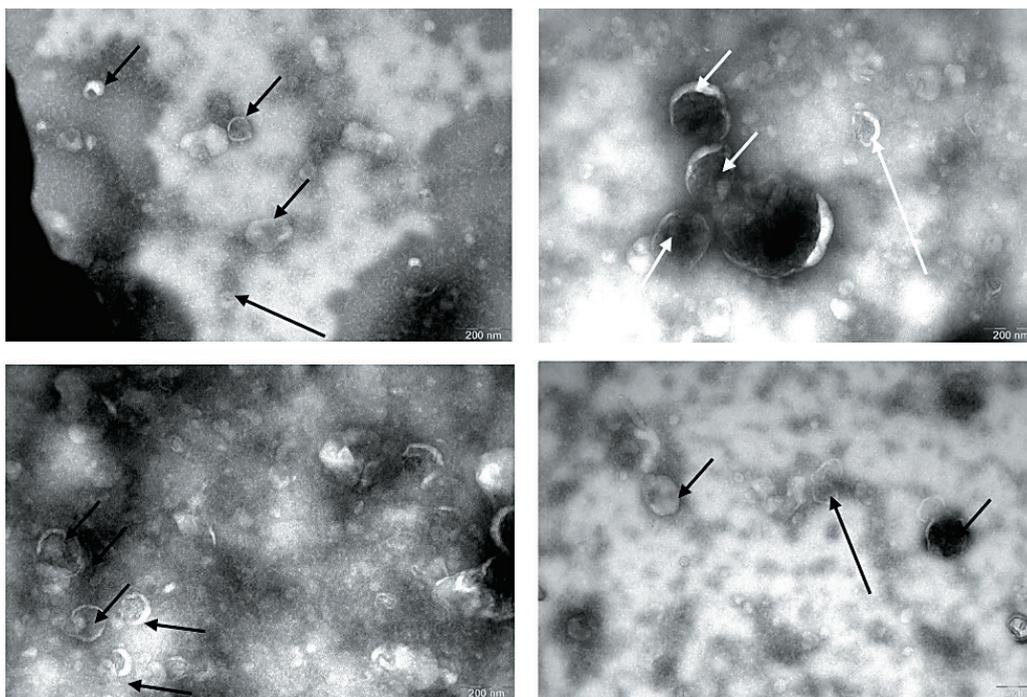


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул семенной плазмы мужчин молодого возраста. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях. Стрелками указаны ВВ СП

Figure 3. Transmission Electron Microscopy of Extracellular Vesicles from Seminal Plasma of Young Men. The scale bar is indicated on the micrographs. Arrows indicate SP EVs

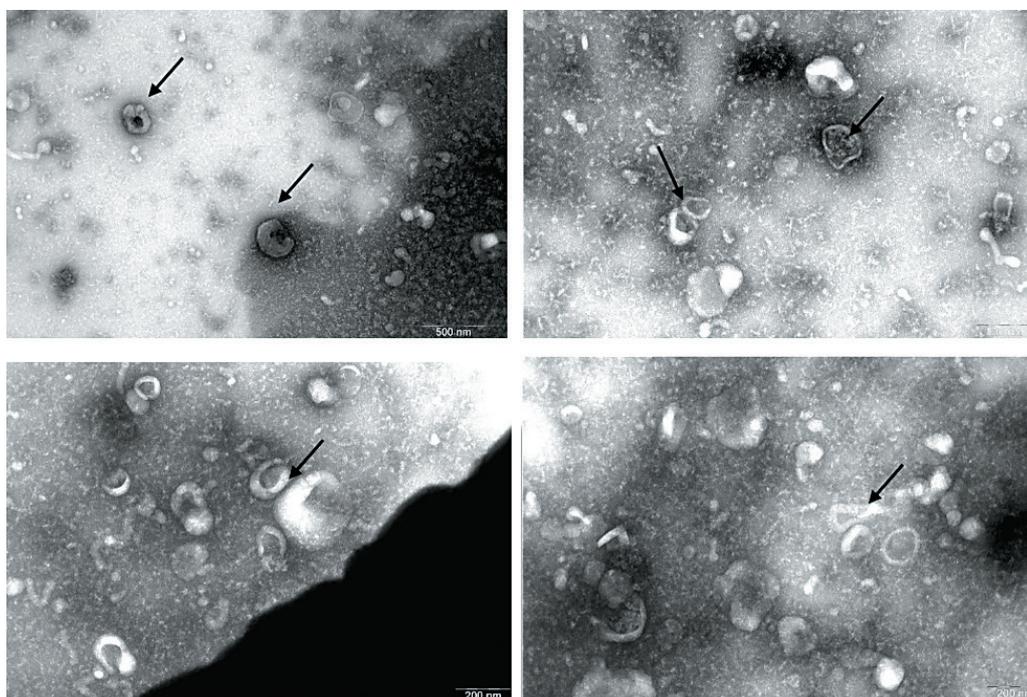


Рис. 4. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул семенной плазмы мужчин позднего репродуктивного возраста. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях. Стрелками указаны ВВ СП

Figure 4. Transmission Electron Microscopy of Extracellular Vesicles from Seminal Plasma of Men of Advanced Reproductive Age. The scale bar is indicated on the micrographs. Arrows indicate SP EVs

Заключение

Изучение ВВ СП важно, поскольку сперматозоиды находятся в состоянии транскрипционного и трансляционного «покоя» из-за упаковки ДНК с помощью протаминов, то есть события посттестискулярного созревания в придатке яичка и женских половых путях модифицируемы внешними сигналами, в том числе через везикулярный транспорт. В работе показана возможность простого выделения ВВ СП путем глубокой фильтрации, без использования большой ультрацентрифуги — дорогостоящего устройства повышенной опасности, которая требует дополнительной квалификации от сотрудника, что увеличивает время и трудозатраты на выделение внеклеточных везикул. В работе показаны изменения в концентрации (количество частиц/мл) (рис. 2) и размерах ВВ СП в зависимости от возраста мужчины. В группе молодых пациентов ВВ СП представлены большим количеством ВВ малых размеров (около 80 нм), а в группе возрастных пациентов был обнаружен сдвиг пика распределения по размерам в сторону ВВ большего размера. Данные изменения чаще всего связаны с накопленным грузом соматических заболеваний, увеличивающимся с возрастом мужчины [16]. Полученные результаты обнадеживают в возможностях оптимизации эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ у человека.

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках инициативного научного проекта «Изучение влияния внеклеточных везикул биологических жидкостей репродуктивных органов и тканей на гаметы, процесс оплодотворения и раннего эмбриогенеза человека и имплантации» (2025-2027, руководитель Макарова Н.П.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» МЗ РФ (директор академик РАН, профессор, д.м.н. Сухих Г.Т.) / The work was carried out within the framework of the initiative scientific project "Influence of extracellular vesicles of biological fluids of reproductive organs and tissues on human gametes, fertilization, embryogenesis and implantation" (2025-2027, head Makarova N.P.) of the Federal State Budgetary Institution "Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Director Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Medical Sciences Sukhikh G.T.).

Список литературы

1. Roca J, et al. Extracellular vesicles in seminal fluid and effects on male reproduction. An overview in farm animals and pets. *Animal Reproduction Science*. 2022; 246:106853.
2. Neyroud AS, Chiechio R, Yefimova M, et al. Extra-cellular vesicles of the male genital tract: new actors in male fertility? *Basic Clin. Androl*. 2021;31(1):25. <https://doi.org/10.1186/s12610-021-00141-9>
3. Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res Rev Bras PesquiMedicas E Biol*. 2013; 46:824–30.
4. Klutstein M, Gonen N. Epigenetic aging of mammalian gametes. *Mol Reprod Dev*. 2023 Dec;90(12):785–803. DOI: 10.1002/mrd.23717. Epub 2023 Nov 24. PMID: 37997675.
5. Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Human Reproduction Update*. Vol. 10, Issue 4. July 2004, P. 327–339. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh030>
6. Vashisht A, Gahlay GK. Understanding seminal plasma in male infertility: emerging markers and their implications. *Andrology*. 2024 Jul;12(5):1058–1077. DOI: 10.1111/andr.13563. Epub 2023 Nov 28. PMID: 38018348.
7. Parra A, et al. Seminal extracellular vesicles and their involvement in male (in) fertility: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4818.
8. Li H, et al. Cell-free seminal mRNA and micro-RNA exist in different forms // *PloS one*. 2012;7(4): 34566.
9. Crescitelli R, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes // *Journal of extracellular vesicles*. 2013;2(1):20677.
10. Aalberts M, et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans // *Biology of reproduction*. 2012;86(3):82, 1–8.
11. Chernyshev VS, et al. Asymmetric depth-filtration: A versatile and scalable method for high-yield isolation of extracellular vesicles with low contamination // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2022;11(8):e12256.
12. Gardiner C, et al. Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles // *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(1):25361.
13. Wang D, et al. Seminal plasma and seminal plasma exosomes of aged male mice affect early embryo implantation via immunomodulation. *Front. Immunol*. 2021; 12:723409.
14. Frungieri MB, Calandra RS, Bartke A, Matzkin ME. Ageing and inflammation in the male reproductive tract. *Andrologia*. 2018 Dec;50(11):e13034. DOI: 10.1111/and.13034. Epub 2018 May 8. PMID: 29740839.

15. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019;19(1):9.

16. Frungieri MB, Calandra RS, Bartke A, Matzkin ME. Ageing and inflammation in the male reproductive tract. *Andrologia.* 2018;50(11):e13034. DOI:10.1111/and.13034.

Информация об авторах:

Гаврилов Максим Юрьевич, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Макарова Наталья Петровна, д.б.н., ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Якимова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Вишнякова Полина Александровна, к.б.н., руководитель лаборатории регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России, НИИ молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы;

Карягина Виктория Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России, НИИ молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы;

Сысоева Анастасия Павловна, к.б.н., эмбриолог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова, ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии, перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Евтушенко Екатерина Алексеевна, к.б.н., старший преподаватель биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»;

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России.

Maksim Y. Gavrilov, Junior Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Natalya P. Makarova, PhD, Leading Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Alexandra S. Yakimova, Junior Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Polina A. Vishnyakova, chief of Laboratory of Regenerative Medicine, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University);

Victoria E. Karyagina, Junior Research Fellow, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University);

Anastasia P. Sysoeva, PhD, Embryologist, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Ekaterina A. Evtushenko, PhD, Senior Lecturer, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University;

Elena A. Kalinina, MD, PhD, professor, Chief of Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

Authors information: