

УДК 576.54

ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ КРЫСЫ *in vitro*

© 2024 г. А. М. Аймалетдинов¹, А. Г. Маланьева¹, М. А. Тамбовский¹, Е. Ю. Закирова¹ *¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, 420008 Россия

*e-mail: lenahamzina@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2024 г.

После доработки 21.04.2024 г.

Принята к публикации 23.04.2024 г.

После длительного хранения и криоконсервации у сперматозоидов животных снижается активность и оплодотворяющая способность. Известно, что естественные микровезикулы улучшают эти параметры. Согласно полученным нами данным, совместная инкубация сперматозоидов крысы с искусственными микровезикулами, полученными из мезенхимных стволовых клеток при помощи цитохалазина В, положительно влияет на состояние половых клеток. Инкубирование микровезикул со сперматозоидами приводит к более медленному снижению трансмембранного потенциала митохондрий и уменьшению накопления продуктов перекисного окисления липидов по сравнению с группой контроля. В результате такой инкубации ДНК половых клеток не повреждается, а слияния мембран микровезикул и сперматозоидов практически не происходит. Таким образом, присутствие искусственных микровезикул может улучшить качество спермы крыс во время хранения.

Ключевые слова: сперматозоид, жизнеспособность, искусственные микровезикулы, цитохалазин В

DOI: 10.56304/S0234275824030062

Мужские половые клетки, сперматозоиды, не способны к делению и росту и имеют ограниченные ресурсы для восстановления повреждений. В половых протоках мужского организма сперматозоиды сохраняют жизнеспособность в течение многих недель, но вне его могут выжить в течение короткого промежутка времени, не превышающего 24–48 ч при температуре тела. Любые манипуляции приводят к снижению качества этих половых клеток и влияют на их фертильную функцию [1]. Один из современных способов поддержания целостности и оплодотворяющей способности сперматозоидов при хранении/криоконсервации — это внесение микровезикул/экзосом в образцы. Везикулы регулируют функцию сперматозоидов посредством паракринных механизмов [2]. Микровезикулы секретируются всеми тканями человека/животных, а состав их зависит от типа материнской клетки и ее физиологического состояния [3, 4]. Практически для каждого подтипа микровезикул определен внутренний состав и специфические маркеры цитоплазматических мембран [5]. Влияние микровезикул различного происхождения на сперматозоиды отличается. Естественные микровезикулы, полученные из стволовых клеток,

оказывают протективное действие. Они обладают регенеративным и терапевтическим потенциалом, как и сами стволовые клетки [6]. Известно, что внесение в образцы спермы микровезикул, полученных из мезенхимных стволовых клеток (МСК), улучшает качество сперматозоидов мышей и крыс после криоконсервации [7, 8]. Также микровезикулы, полученные из МСК, предотвращают повреждение ДНК сперматозоидов, вызванное химиотерапией, путем подавления токсического стресса, возникающего в результате воздействия свободных радикалов [9]. Длительное хранение сперматозоидов хряка с добавлением экзосом семенной жидкости сохраняет подвижность этих половых клеток, при этом увеличивается эффективное время выживания, сохраняется целостность плазматической мембраны, повышается активность антиоксидантной системы, снижается содержание малонового диальдегида по сравнению с контрольными образцами [10]. Однако совместное культивирование естественных экзосом, полученных из клеток НЕК293, со спермой хряка практически не оказало влияния на подвижность сперматозоидов, их жизнеспособность, целостность мембран и потенциал митохондриальной мембраны. Авторы этой работы, Т. Vilanova-Perez и др. [11], предложили использовать экзосомы клеток НЕК293 в качестве эффективного и неинвазивного инструмента для

Список сокращений: МСК — мезенхимные стволовые клетки; ПОЛ — перекисное окисление липидов.

доставки защитных агентов и/или терапевтических средств, способных улучшить или восстановить функциональность поврежденных гамет млекопитающих. В исследовании M. Ferraz с соавт. [12], проведенном с использованием сперматозоидов редких и исчезающих видов животных, показано, что сперма красного волка и гепарда, размороженная в присутствии микровезикул яйцеводов соответственно собак и кошек, содержала больше интактных акросом, чем контрольная группа, размороженная без микровезикул. Более того, в сперме красного волка, оттаявшей в присутствии микровезикул яйцеводов собак, подвижность сперматозоидов сохранялась в течение длительного времени по сравнению с контролем.

Однако количество естественно выделяемых клетками микровезикул не обеспечивает возможность их широкого клинического применения, вследствие чего они могут быть использованы исключительно для исследовательских целей. Для получения большего количества везикул используют цитохалазин В (cytochalasin B), который нарушает структуру цитоскелета, а сформированные таким способом микровезикулы получили название искусственных [13, 14]. На данный момент времени не изучена безопасность и эффективность применения искусственных микровезикул, выделенных из МСК при помощи цитохалазина В, для сперматозоидов. Известно только, что свойства искусственных микровезикул сходны с естественными частицами [13, 14] и стимулируют регенерацию поврежденной ткани [15].

Целью исследования было изучение влияния искусственных микровезикул на сперматозоиды крыс при их совместном инкубировании.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Лабораторные животные

В работе использованы лабораторные белые беспородные крысы (*Rattus albus*). Животных содержали в виварии в клетках со свободным доступом к воде и корму. Для эксперимента отбирали самцов с массой не более 300 г и не старше 12 мес.

Получение и характеристика мезенхимных стволовых клеток

МСК выделяли из жировой ткани крыс по описанной ранее методике [16]. Для определения биологической активности выделенных клеток проводили дифференцировку в трех направлениях и анализ на наличие мембранных маркеров, характерных для МСК. Клетки окрашивали антителами к CD90 (Biolegend, США), CD44 (Biolegend), CD29 (Biolegend), CD73 (Biolegend), CD34 (Santa Cruz, США) и анализировали на проточ-

ном цитофлуориметре FACS Aria III (BD Biosciences, США).

Получение искусственных микровезикул

Для получения микровезикул из МСК крысы 1×10^6 клеток снимали с флакона методом трипсинизации, дважды промывали в фосфатно-солевом буфере Дульбеко (DPBS) и инкубировали в среде DMEM (оба препарата производства “ПанЭко”, Россия), содержащей 10 мкг/мл цитохалазина В (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин (37°C , 5% CO_2). По окончании инкубации полученную суспензию интенсивно перемешивали в течение 30 с на мультивортексе V-32 (Biosan, Латвия). Далее проводили серию последовательных этапов центрифугирования на центрифуге Eppendorf 5702R (ротор A-4-38; Eppendorf, Германия): 10 мин при 500 об/мин, супернатант отбирали и центрифугировали 20 мин при 500 об/мин, супернатант отбирали и центрифугировали 25 мин при 3000 об/мин. Осадок, содержащий микровезикулы, промывали большим объемом PBS (“ПанЭко”), центрифугировали при 3000 об/мин 25 мин. Полученный осадок, состоящий из искусственных микровезикул, использовали далее в работе.

Определение общего белка

Для определения общего белка были выделены микровезикулы из $(0,5, 1,0, 2,0) \times 10^6$ МСК. К осадку микровезикул добавляли лизирующий буфер (50 мМ HEPES, pH 7,9, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5% NP-40, 10% глицерин), содержащий 1 мМ PMSF (Sigma-Aldrich), тщательно перемешивали и инкубировали на льду в течение 20 мин. Полученный раствор центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин при 4°C на центрифуге Mikro 220R (ротор 2427-A; Hettich, США). Супернатант, содержащий выделенный белок, переносили в пробирку и использовали для определения общего белка. Реакцию проводили методом биуретовой реакции с использованием коммерческого набора ОБЩИЙ БЕЛОК-АГАТ (ООО “Агат-Мед”, Россия) согласно инструкции производителя.

Выделение сперматозоидов крысы и анализ их жизнеспособности

Сперму крыс получали по методике, описанной ранее [17]. Подсчет числа сперматозоидов, определение их подвижности в семенной жидкости проводили под световым микроскопом в камере Горяева при 37°C . Для подсчета содержания патологических форм и жизнеспособности сперматозоидов образцы дополнительно окрашивали 5%-ным раствором эозина (“Ленреактив”, Россия). Рассчитывали процентное содержание жи-

вых (белый цвет) и мертвых (оранжево-красный цвет) сперматозоидов в общем пуле.

Определение целостности акросомы сперматозоидов

Определение целостности акросомы проводили путем окрашивания образцов спермы на предметных стеклах, которые инкубировали 2 мин в свежеприготовленном растворе красителя, содержащем 0.22% Coomassie Blue G-250 (“ПанЭко”), 50% метанола (“Химпром”, Россия), 10% ледяной уксусной кислоты (“Химбаза”, Россия), 40% воды. Стекляшки тщательно промывали дистиллированной водой для удаления несвязавшегося красителя и анализировали образцы под световым микроскопом AxioObserver.Z1 (CarlZeiss, Германия).

Инкубация сперматозоидов крысы с микровезикулами

Условия инкубации сперматозоидов крысы с микровезикулами подбирали, основываясь на показателе жизнеспособности клеток. Для этого образец спермы разбавляли теплым DPBS до концентрации 5×10^6 клеток/мл. В опытные образцы добавляли микровезикулы из расчета (по общему белку) 50 мкг/мл (согласно данным А. Qatag с соавт. [18], это оптимальная концентрация общего белка, оказывающая протективный эффект при криоконсервации образцов спермы). Полученную суспензию инкубировали в течение 5 ч при 24°C или 37°C. Долю живых сперматозоидов определяли через 1, 3, 5 ч инкубации по окрашиванию 5%-ным эозином.

Метод ДНК-комет

С целью определения генотоксического действия микровезикул опытные образцы спермы инкубировали с микровезикулами в течение 1 ч, в контрольные образцы препарат не вносили. Генотоксическое действие микровезикул на сперматозоиды крысы оценивали с использованием метода ДНК-комет по описанной ранее методике [19].

Анализ слияния клеточных мембран

Сперматозоиды в количестве 5×10^6 клеток/мл культивировали в присутствии микровезикул в концентрации (по общему белку) 50 мкг/мл в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 1 ч. После этого сперматозоиды осаждали центрифугированием 400 об/мин в течение 3 мин на центрифуге Eppendorf 5702R (ротор A-4-38; Eppendorf). Предварительно микровезикулы окрашивали витальным мембранным красителем DiD (#V22889; Life Technologies, США), мембраны сперматозоидов окрашивали DiO (#V22886; Life Technologies). Надоса-

дочную жидкость удаляли. Осадок сперматозоидов ресуспендировали в нагретом до 37°C PBS. Состояние мембран сперматозоидов оценивали с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss). Также проводили анализ полученных образцов на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACSAria™ III (Becton Dickinson, США).

Определение мембранного потенциала митохондрий

Мембранный потенциал митохондрий сперматозоидов, обработанных микровезикулами в течение 1 ч при 37°C и необработанных (контроль), оценивали с использованием красителя JC-10 (Abcam, США). Из среды культивирования сперматозоиды осаждали центрифугированием при 400 об/мин в течение 5 мин на центрифуге Eppendorf 5702R (ротор A-4-38; Eppendorf). Осадок сперматозоидов ресуспендировали в теплом PBS и доводили их концентрацию до 1×10^6 клеток/мл. Краситель JC-1 вносили в полученные образцы в конечной концентрации 5 мкг/л и инкубировали при 37°C в течение 10 мин при постоянном перемешивании, после чего клетки промывали PBS для удаления красителя с последующим анализом на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACSAria™ III (Becton Dickinson).

Анализ продуктов перекисного окисления липидов

Анализ продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сперматозоидах, обработанных и не обработанных микровезикулами, проводили с использованием набора Thiobarbituric Acid Reactants (TBARS) Fluorometric Assay Kit (#E-BC-K298-F; Elabscience Biotechnology Inc., США) согласно инструкции производителя. Опытные образцы спермы инкубировали с микровезикулами и освобождали от них, как описано в предыдущем пункте.

Статистическая обработка результатов

Для обработки результатов использовали методы первичного статистического анализа, результаты которого представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Вторичную статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика мезенхимных стволовых клеток

Выделенные из жировой ткани крыс клетки, адгезированные на культуральном пластике, имели фибробластоподобную морфологию. Согласно результатам проточной цитометрии, $95 \pm 3\%$ из вы-

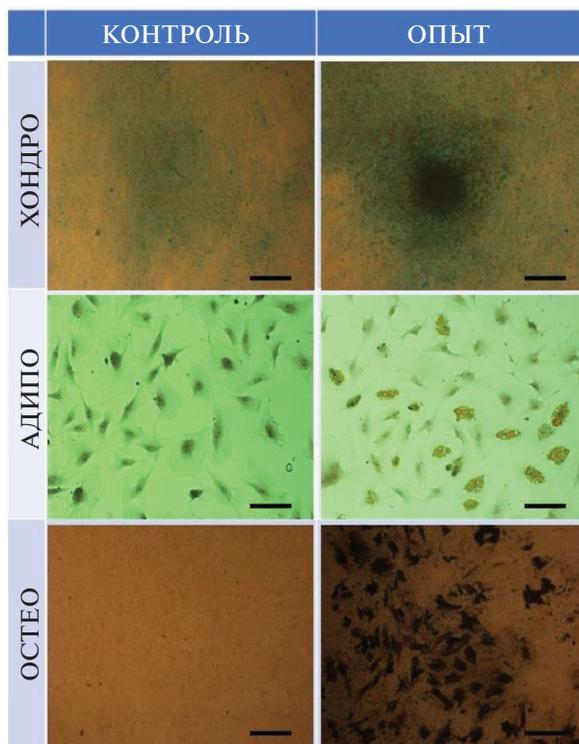


Рис. 1. Морфология мезенхимных стволовых клеток крысы адипогенного происхождения после индукции дифференцировки в трех направлениях: адипогенному (Адипо), остеогенному (Остео) и хондрогенному (Хондро). Шкала – 100 мкм.
Fig. 1. Morphology of rat mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue during differentiation. The scale bar is 100 μ m.

деленных нами клеток несли на поверхности маркер Thy-1, $98 \pm 1\%$ – CD44, $99 \pm 1\%$ – CD29, $95 \pm 5\%$ – CD73, 1% – CD34. МСК крысы эффективно дифференцировались по трем основным

направлениям: адипогенному, хондрогенному и остеогенному (рис. 1).

Оценка качества сперматозоидов крыс

В результате анализа жизнеспособности сперматозоидов в семенной жидкости крыс выявлено, что эякулят животных был мутным или имел молочно-белый цвет и густую консистенцию. Концентрация сперматозоидов в эякуляте была высокой и большинство из них сохраняло жизнеспособность и целостность акросомы (табл. 1).

Содержание патологических форм сперматозоидов не превышало общепринятых критериев нормы. В образцах спермы крыс подвижность сперматозоидов составляла 79%, в то время как прогрессивно подвижными были 72%. Таким образом, сперма крыс, использованная в экспериментах, соответствовала стандартизированным показателям для этого вида животных [20].

Подбор условий культивирования сперматозоидов с микровезикулами

Результаты определения общего белка в образцах искусственных микровезикул, выделенных из МСК различных концентраций, приведены в табл. 2.

Результаты анализа жизнеспособности сперматозоидов крысы после инкубации с микровезикулами при 24 и 37°C показаны на рис. 2.

Из приведенных данных видно, что в присутствии микровезикул повышается выживаемость сперматозоидов крысы – при инкубировании как при 24°C, так и при 37°C. Однако жизнеспособность сперматозоидов, обработанных и не обработанных микровезикулами, при 37°C выше, чем

Таблица 1. Количественные и качественные показатели эякулята самцов белых крыс
Table 1. Quantitative and qualitative indicators of the ejaculate of male white rats

№	Параметр	Значение, $M \pm SD$
1	Концентрация сперматозоидов в эякуляте, $\times 10^7$ /мл	5.3 ± 0.2
2	Содержание живых сперматозоидов в эякуляте, %	98 ± 0.5
3	Содержание патологических форм в эякуляте, %	14 ± 0.1
4	Акросомные повреждения, %	2 ± 0.1

Таблица 2. Концентрация общего белка в образцах микровезикул, полученных из МСК крыс
Table 2. Total protein concentration in samples of microvesicles isolated from MSCs of rats

№ образца	Число МСК в образце, $\times 10^6$ клеток	Общий белок, г/л
1	0.5	21.0 ± 1.3
2	1.0	47.0 ± 3.3
3	2.0	101.0 ± 4.6

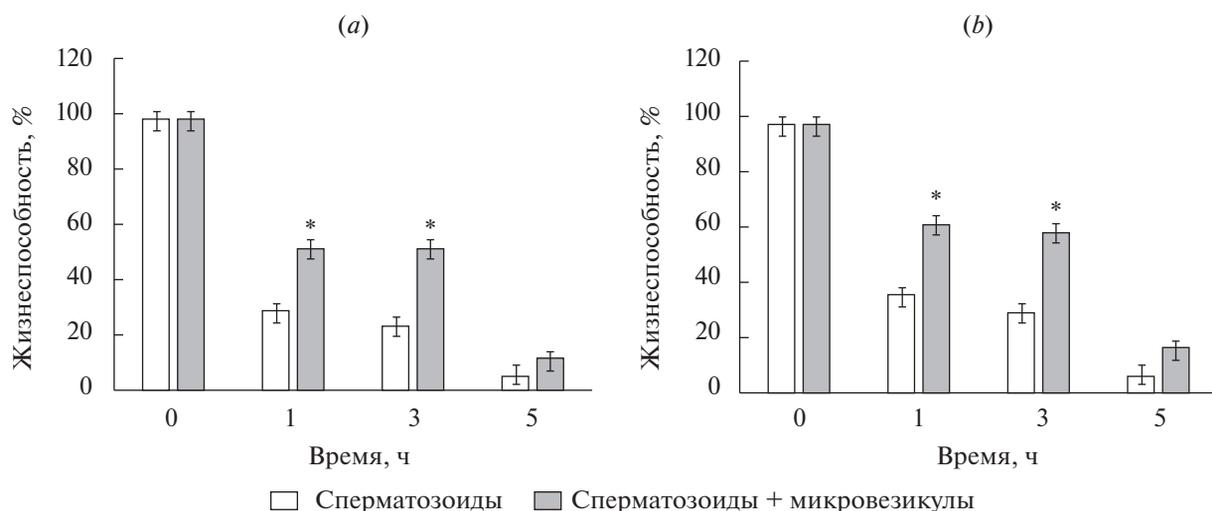


Рис. 2. Анализ жизнеспособности сперматозоидов крысы, инкубированных с микровезикулами при 24°C (a) и 37°C (b). * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой.

Fig. 2. Analysis of viability of rat spermatozoa incubated with microvesicles at 24°C (a) and 37°C (b). * $p < 0.05$ compared to the control group.

при 24°C. Во всех последующих экспериментах образцы сперматозоидов инкубировали при 37°C.

Влияние микровезикул на свойства сперматозоидов крысы

По результатам теста на генотоксичность, приведенным на рис. 3, микровезикулы не оказы-

вали повреждающего действия на ДНК половых клеток. Это согласуется с результатами, полученными недавно С. Ли с соавт. [21].

В результате анализа возможного слияния мембраны микровезикул с мембраной сперматозоидов показана вероятность такого события (рис. 4a), хотя и редкого — большинство везикул регистрировали отдельно от сперматозоидов (рис. 4b). По ре-

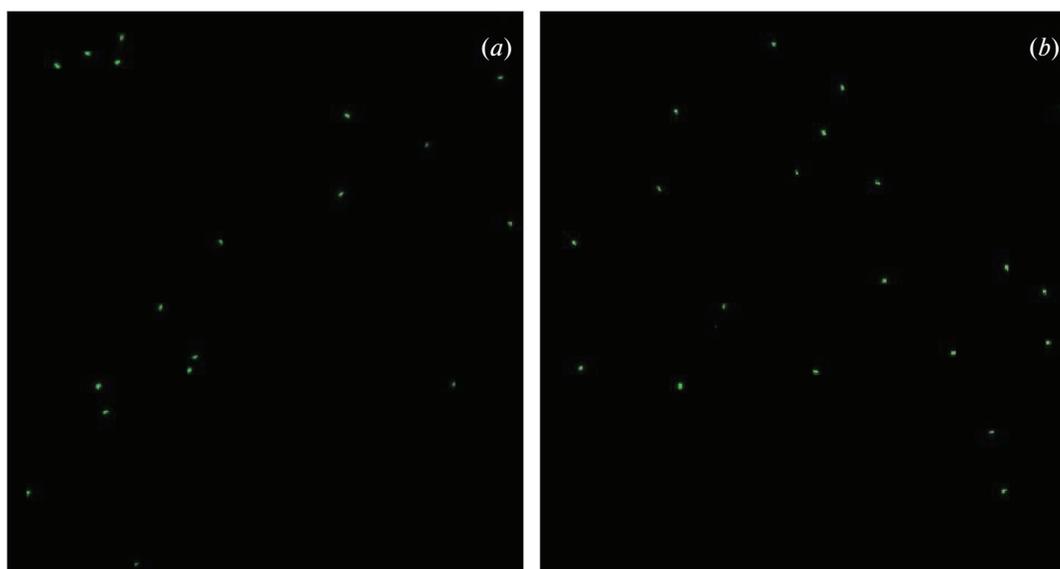


Рис. 3. Тест ДНК-кометы. (a) — Образец интактной спермы; (b) — образец спермы, инкубированной с микровезикулами в течение 1 ч при 37°C. Образцы спермы окрашивали SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific, США). Приведены микрофотографии, полученные на лазерном конфокальном микроскопе LSM 78. Увеличение $\times 400$.

Fig. 3. DNA-comet test. (a) — Intact sperm; (b) — the sample incubated with microvesicles for 1 h at 37°C. Samples were stained with SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific, USA). Microphotographs obtained with a LSM 78 laser confocal microscope are shown. Magnification $\times 400$.

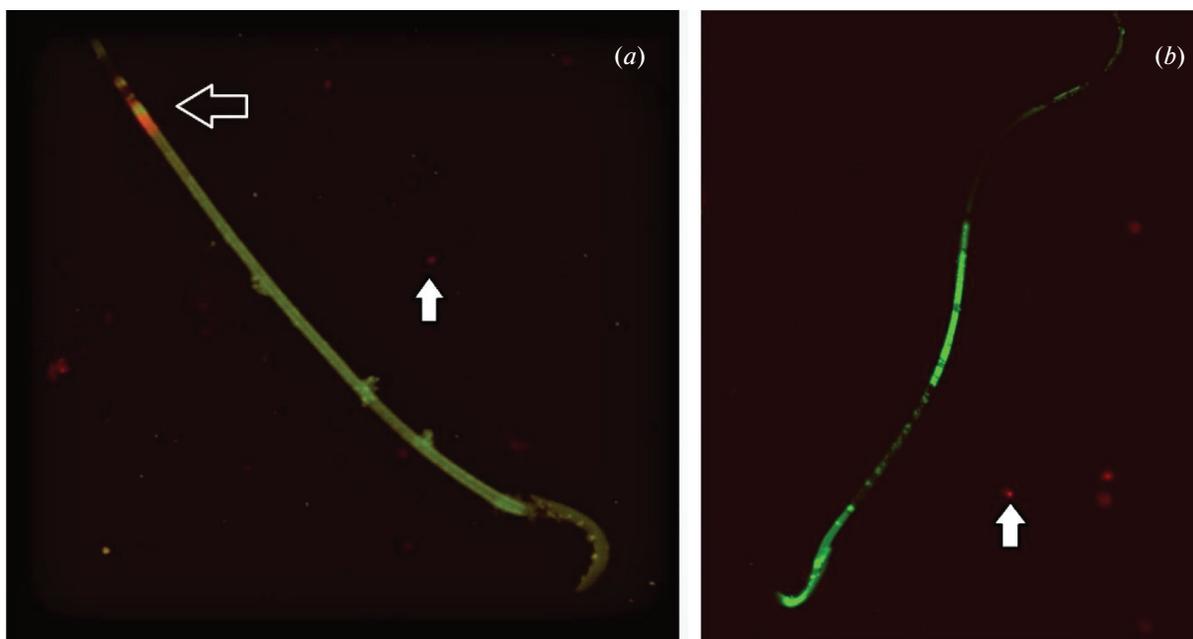


Рис. 4. Сперматозоид крысы после инкубации с микровезикулами. (а) – Слияние мембраны микровезикулы с мембраной сперматозоида (черная стрелка); (b) – intactный сперматозоид (зеленый) и микровезикула (белая стрелка). Приведены микрофотографии, полученные на лазерном конфокальном микроскопе LSM 78. Увеличение $\times 400$.
Fig. 4. Rat spermatozoon after incubation with microvesicles. (a) – Fusion of the microvesicle membrane with the sperm membrane (black arrow); (b) – intact sperm (green) and microvesicle (white arrow). Microphotographs obtained with a LSM 78 laser confocal microscope are shown. Magnification $\times 400$.

зультатам проточной цитометрии, около 2% сперматозоидов несли на мембране вкрапления мембран микровезикул.

Известно, что естественные микровезикулы: экзосомы МСК, семенной плазмы, а также перевиваемых культур клеток – могут поглощаться половыми клетками, а их мембрана внедряется в состав цитоплазматической мембраны сперматозоидов, не оказывая при этом негативного действия на их функции. В исследованиях ряда авторов показано, что через 1 ч совместного культивирования сперматозоидов и микровезикул цитоплазма незначительной части половых клеток несет включения микровезикул, а через 5 ч доля таких клеток достигает 90%. По результатам флуоресцентной микроскопии, экзосомы и микровезикулы семенной плазмы абсорбируются преимущественно в головке спермия и реже в шейке и хвосте [11, 22]. Показано, что микровезикулы яйцеводов кошки связываются с акросомальной областью головки и средней частью сперматозоида. Согласно опубликованным данным, через 1 ч инкубации 96% сперматозоидов имели на цитоплазматической мембране вкрапления мембран микровезикул. Важно, что при этом инкубация сперматозоидов с микровезикулами повышает и поддерживает подвижность и целостность акросом, а также улучшает оплодотворяющую способность сперматозоидов придатка яичка у домашних котов [23]. Ранее нами

обнаружена [24] возможность слияния микровезикул, полученных из МСК при помощи цитохалазина В, с тенобластами крысы *in vitro*.

Теперь нами показано, что через 1 ч инкубации с микровезикулами в образце спермы крысы митохондрии $47 \pm 3\%$ сперматозоидов имели высокий трансмембранный потенциал, а $46 \pm 2\%$ – низкий. В контрольной группе эти показатели соответствовали $37 \pm 3\%$ и $42 \pm 4\%$. Таким образом, культивирование образцов спермы с микровезикулами в течение 1 ч замедляло падение трансмембранного потенциала митохондрий ($p \leq 0.05$) по сравнению с контрольными образцами. Однако в опытной группе доля сперматозоидов с низким трансмембранным потенциалом была несколько выше, чем в контроле, хотя различия были незначимы ($p \geq 0.05$). Обнаружено, что трансмембранный потенциал митохондрий сперматозоидов крысы в присутствии микровезикул падал медленнее, чем в контроле. Недавно F. Mahdavinezhad и др. [22] показали, что в образцах сперматозоидов, которые замораживали в присутствии естественных экзосом или микровезикул семенной плазмы, доля половых клеток с высоким трансмембранным потенциалом митохондрий была выше, чем в необработанных везикулами образцах.

Выявленное нами положительное влияние искусственных микровезикул на митохондрии сперматозоидов крысы важно с той точки зрения, что

митохондрии – это ключевые органеллы, играющие основную роль в механизмах выживания сперматозоидов. Они напрямую вовлечены в модуляцию многочисленных изменений на многих этапах репродуктивного процесса – от сперматогенеза до оплодотворения: стероидогенеза, дифференцировки сперматогонимальных стволовых клеток и развития соматических клеток яичек, конденсации/деконденсации ДНК сперматозоидов в эпидимисе, гомеостаза активных форм кислорода (АФК) как мессенджеров капацитации, акросомной реакции и взаимодействия с ооцитами и других [25]. Известно, что сперматозоиды с высоким значением трансмембранного потенциала митохондрий соответствуют половым клеткам с высокой подвижностью. Высокие значения трансмембранного потенциала отражают целостность структуры митохондрий и оптимальный уровень их активности, а также напрямую коррелируют с оплодотворяющей способностью и вероятностью получения эмбрионов хорошего качества при оплодотворении и наступления беременности [26].

Активность процесса ПОЛ в образцах спермы мы оценивали по содержанию соединений, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой, и обнаружили, что в присутствии микровезикул их концентрация была достоверно ниже, чем в контрольных пробах (рис. 5).

Известно, что процесс ПОЛ сопровождается накоплением токсичных для клетки свободнорадикальных и перекисных соединений. Окислительный стресс в биологических системах – это состояние, вызванное неспособностью антиоксидантной системы устранять избыточные молекулы АФК [22]. Плазматическая мембрана сперматозоидов млекопитающих особенно чувствительна к окислительному повреждению из-за высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот. Окислительный стресс ухудшает качество спермы, включая снижение концентрации сперматозоидов, их подвижность и морфологию, а также целостность геномной ДНК. Следствием этих повреждений может быть неспособность сперматозоида к оплодотворению яйцеклетки [27]. При окислительном стрессе в мужской гамете накапливаются цитотоксические аддукты, такие как малондальдегид, акролеин и 4-гидроксиноненаль, влияющие на текучесть мембран и их способность к слиянию – обязательных условий акросомной реакции и взаимодействия сперматозоида с яйцеклеткой [28]. Нами показано, что, по сравнению с контролем, в образцах сперматозоидов с микровезикулами накопление продуктов ПОЛ замедлено. Исходя из этих данных, можно сделать вывод, что микровезикулы оказывают протективное действие на сперматозоиды крысы, снижая в них интенсивность процессов ПОЛ.

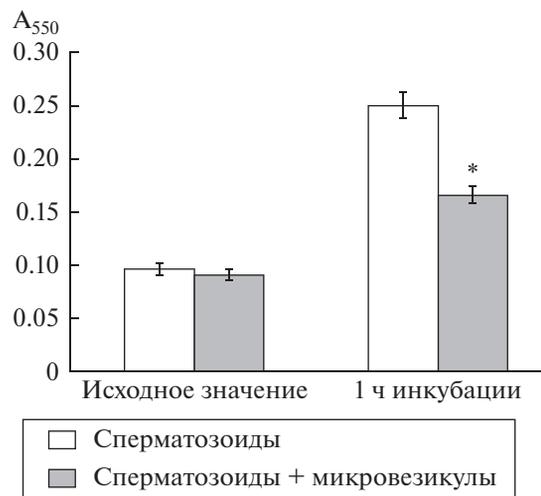


Рис. 5. Накопление продуктов перекисного окисления липидов в образцах сперматозоидов, обработанных и не обработанных микровезикулами. Относительную концентрацию реагирующих с тиобарбитуровой кислотой соединений оценивали по оптической плотности при длине волны 550 нм на микропланшетном ридере Infinite M200Pro (TECAN, Австрия). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Fig. 5. Accumulation of lipid peroxidation products in sperm samples treated and untreated with microvesicles. The relative concentrations of thiobarbiturate-reactive compounds were assessed by optical density at a wavelength of 550 nm on a microplate reader Infinite M200Pro (TECAN, Austria). * $p < 0.05$ compared to the control.

В результате проведенного нами исследования показано, что использование искусственных микровезикул, полученных из мезенхимных стволовых клеток под действием цитохалазина В, можно рассматривать как перспективный инструмент для повышения стабильности и качества препаратов сперматозоидов при их хранении/криоконсервации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда (грант № 23-26-00172) в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

На проведение работ с животными было получено разрешение локального этического комитета Казанского федерального университета (Протокол № 1 от 23.02.2015 на проведение научного исследования по теме “Генная и клеточная терапия в регенеративной ветеринарной медицине”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сатаева Т.П., Ковальчук А.В., Кутя С.А. Жизненный цикл сперматозоида. Норма и нарушения. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*, 2018, 8(1), 113–122.
2. Tambovsky M.A., Aimaletdinov A.M., Zakirova E.Y. Current trends in the application of stem cells and their derivatives in animal sperm cryopreservation. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2023, 17, 243–248. <https://doi.org/10.1134/S1990747823050112>
3. Famil'tseva A., Jeremic N., Tyagi S.C. Exosomes: cell-created drug delivery systems. *Mol. Cell. Biochem.*, 2019, 459(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03545-4>
4. Doyle L.M., Wang M.Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 2019, 8, 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
5. Barranco I., Alvarez-Barrientos A., Parra A., Martínez-Díaz P., Lucas X., Roca J. Immunophenotype profile by flow cytometry reveals different subtypes of extracellular vesicles in porcine seminal plasma. *Cell Commun. Signal.*, 2024, 22(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01485-1>
6. Klymiuk M.C., Balz N., Elashry M.I., Heimann M., Wenisch S., Arnhold S. Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells. *BMC Vet. Res.*, 2019, 15(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1789-9>
7. Tanrikulu M.D., Çevik M. The role of stem cell-based extracellular vesicles in male fertility. *J. Exp. Clin. Med.*, 2023, 40(2), 410–416. <https://doi.org/10.52142/omujecm.40.2.37>
8. Mokarizadeh A., Rezyanfar M.-A., Dorostkar K., Abdollahi M. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters. *Reprod. Toxicol.*, 2013, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.07.024>
9. Rezyanfar M., Mokarizadeh A., Ghasemzadeh Hasankolaee M., Baeeri M., Hodjat M., Abdollahi M. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles can prevent chemotherapy induced sperm DNA damage through suppression of free radicals toxic stress. *Toxicol. Lett.*, 2016, 258, S158. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.1601>
10. Du J., Shen J., Wang Y., Pan C., Pang W., Diao H., Dong W. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*, 2016, 7(37), 58832–58847. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11315>
11. Vilanova-Perez T., Jones C., Balint S., Dragovic R., Dustin M., Yeste M., Coward K. Exosomes derived from HEK293T cells interact in an efficient and noninvasive manner with mammalian sperm *in vitro*. *Nanomedicine (Lond.)*, 2020, 15(20), 1965–1980. <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0056>
12. Ferraz M., Nagashima J.B., Noonan M., Crosier A., Songsasen N. Oviductal extracellular vesicles improve post-thaw sperm function in red wolves and cheetahs. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(10), 3733. <https://doi.org/10.3390/ijms21103733>
13. Li Y., Wu J., Liu J., Xu W., Qiu X., Huang S., Hu X., Xiang D. Artificial exosomes for translational nanomedicine. *J. Nanobiotechnology*, 2021, 19, 242. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00986-2>
14. Gomzikova M.O., Zhuravleva M.N., Vorobev V.V., Salafutdinov I.I., Laikov A.V., Kletukhina S.K., Martynova E.V., Tazetdinova L.G., Ntekim A.I., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A. Angiogenic activity of cytochalasin B-induced membrane vesicles of human mesenchymal stem cells. *Cells*, 2019, 9(1), 95. <https://doi.org/10.3390/cells9010095>
15. Zakirova E., Sofronova S., Tambovsky M., Rutland C., Rizvanov A., Gomzikova M. Application of mesenchymal stem cells derived artificial microvesicles for the treatment of canine skin wound. *BioNanoSci.*, 2021, 12, 83–88. <https://doi.org/10.1007/s12668-021-00928-0>
16. Закирова Е.Ю., Аймалетдинов А.М., Тамбовский М.А., Ризванов А.А. Сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток различных видов животных. *Цитология*, 2021, 63(2), 139–146. <https://doi.org/10.31857/S0041377121020097>
17. Takeo T., Nakao S., Mikoda N., Yamaga K., Maeda R., Tsuchiyama S., Nakatsukasa E., Nakagata N. Optimized protocols for sperm cryopreservation and *in vitro* fertilization in the rat. *Lab. Anim. (NY)*, 2022, 51, 256–274. <https://doi.org/10.1038/s41684-022-01053-5>
18. Qamar A.Y., Fang X., Kim M.J., Cho J. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Animals (Basel)*, 2019, 9(11), 865. <https://doi.org/10.3390/ani9110865>
19. Гайдай Е.А., Дорофеева А.А., Крышень К.Л., Гайдай Д.С. Методические аспекты проведения ДНК-комет-теста в условиях *in vivo* в доклинических исследованиях. *Лабораторные животные для научных исследований*, 2020, 3, 16–24. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-03-03>
20. Мельникова Н.А., Шубина О.С., Дуденкова Н.А., Лапина М.В., Лиференко О.В., Тимошкина О.И. Исследование жизнеспособности клеток при воздействии ацетата свинца на организм крысы. *Современные проблемы науки и образования*, 2014, 1, 88–89.
21. Li C., Liu S., Dai X., Lan D., Song T., Wang X., Kong Q., Tan J., Zhang J. The emerging role of exosomes in the development of testicular *Asian J. Androl.*, 2023, 25(5), 547–555. <https://doi.org/10.4103/aja2022126>
22. Mahdavinezhad F., Gilani M.A.S., Gharaei R., Ashrafnezhad Z., Valipour J., Nashtaei M.S., Amidi F. Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online*, 2022, 45(2), 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.03.033>
23. 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, 9, 9484. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45857-x>
24. Zakirova E., Aimaletdinov A., Mansurova M., Titova A., Kurilov I., Rutland C.S., Malanyeva A., Rizvanov A. Artificial microvesicles: new perspective on healing ten-

- don wounds. *Cells Tissues Organs*, 2024, 213(1), 24–39. <https://doi.org/10.1159/000526845>
25. Литвицкий П.Ф., Галимов К.Ш., Громенко Ю.Ю., Галимова С.Ш., Гилязова И.Р., Галимова Э.Ф., Павлов В.Н. Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 2022, 66(2), 72–79. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.72-79>
26. Alamo A., De Luca C., Mongioi L.M., Barbagallo F., Cannarella R., La Vignera S., Calogero A.E., Condorelli R.A. Mitochondrial membrane potential predicts 4-hour sperm motility. *Biomedicines*, 2020, 8(7), 196. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070196>
27. Walke G., Gaurkar S.S., Prasad R., Lohakare T., Wanjari M. The impact of oxidative stress on male reproductive function: exploring the role of antioxidant supplementation. *Cureus*, 2023, 15(7), e42583. <https://doi.org/10.7759/cureus.42583>
28. Aitken R., Gibb Z., Mitchell L., Lambourne S., Connaughton H., De Iulius G. Sperm motility is lost *in vitro* as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol. Reprod.*, 2012, 87(5), 110. <https://doi.org/10.1095/biol-reprod.112.102020>

Protective Effect of Microvesicles on Rat Spermatozoa *in vitro*

A. M. Aimaletdinov^a, A. G. Malanyeva^a, M. A. Tambovsky^a, and E. Y. Zakirova^{a, #}

^a*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

[#]*e-mail: lenahamzina@yandex.ru*

Abstract—After long-term storage and cryopreservation, animal spermatozoa exhibit reduced activity and fertilizing ability. Native microvesicles are known to improve these parameters. Here, we demonstrated that incubation of rat spermatozoa with artificial microvesicles derived from mesenchymal stem cells using cytochalasin B had a positive effect on the germ cells. This incubation caused a slower reduce of the transmembrane potential of spermatozoa mitochondria and a decrease in the accumulation of lipid peroxidation products in comparison with the control cells. At the same time, the spermatozoa DNA was not damaged, and the percentage of germ cells fused with microvesicles was only 2%. Therefore, artificial microvesicles can be used to improve the survival of mammalian spermatozoa during their storage/cryopreservation.

Keywords: sperm, viability, artificial microvesicles, cytochalasin B