

# Eksozomların erkek infertilitesindeki rolü

## Role of exosomes in male infertility

Aslı Metin Mahmutoğlu<sup>1</sup>

### ÖZ

İnfertilite üreme çağındaki çiftlerin %14–15’inde görülen önemli bir sağlık problemidir ve erkek faktörün bu soruna katkısının yaklaşık olarak %50 olduğu tahmin edilmektedir. Eksozomlar birçok hücre tipi tarafından hücre dışı ortama salınan nano büyüklükteki keseciklerdir. Eksozomlar anne sütü, blastosöl sıvısı, idrar ve semenin de dahil olduğu birçok vücut sıvısında bulunmaktadır. Eksozomların hücreler arası iletişim, farklı kargoların (RNA, protein ve lipid gibi) taşınımı, anti-retroviral aktivite, mikrobiyal patogenezin düzenlenmesi, programlı hücre ölümü, anjiyogenez, immun cevabın düzenlenmesi ve koagülasyon da rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle son 10 yılda yapılan çalışmalar seminal eksozomlar ve erkek infertilitesi arasında bir ilişki olduğunu ve eksozomların erkek infertilitesinin tanısında ve tedavisinde kullanılabilirliğini bildirmektedir. Ancak erkek infertilitesi ve eksozomlar arasındaki bu olası ilişkinin tam olarak aydınlatılabilmesi için kapsamlı ve iyi organize edilmiş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** erkek infertilitesi, eksozom, seminal eksozom, miRNA, protein

### ABSTRACT

Infertility is an important problem affecting 14–15% couples in reproductive age and the contribution of male factor to this problem is indicated to be approximately 50%. Exosomes are nano-sized vesicles released from many cell types to intracellular milieu. Exosomes are found in several body fluids including breast milk, blastocoel fluid, urine and semen. Exosomes are known to play various roles in the transportation of different cargos (such as RNA, protein and lipid), anti-retroviral activity, regulation of immune response and microbial pathogenicity, apoptosis, angiogenesis and coagulation. In particular, in the last decade, studies have indicated that there is an association between seminal exosomes and male infertility and that exosomes may be used in the diagnosis and treatment of male infertility. However, comprehensive and more organized studies are needed to clarify the possible association between male infertility and exosomes.

**Keywords:** male infertility, exosome, seminal exosome, miRNA, protein

## GİRİŞ

Eksozomlar insanların da dâhil olduğu farklı organizmalara ait bir çok hücre tipi tarafından ortama salınan nano büyüklükteki (40–150 nm) keseciklerdir.<sup>[1-7]</sup> Kendilerine özgü lipid organizasyonuna sahip olan bu keseciklerin endozomlardan köken aldığı bilinmektedir.<sup>[8,9]</sup> Endozomun olgunlaşması sırasında endozom zarının içeri doğru tomurcuklanmasıyla küçük kesecikler meydana gelmektedir. Bu kesecikleri içinde bulunduran yapıya çok-kesecikli yapılar (MVB: multivesiclar bodies) adı verilir. Çok-kesecikli yapıların hücre zarı ile birleşmesi sonucu içlerindeki kargo hücre dışı sıvıya salınarak eksozomların çeşitli vücut sıvılarına geçmesi sağlanmaktadır.<sup>[10,11]</sup> Anne sütü, kan, semen,

epididimal sıvı, vajinal salgılar, tükürük ve idrar eksozomlarının izolasyon ve karakterizasyonunun yapıldığı vücut sıvıları arasında yer almaktadır.<sup>[10,12-14]</sup>

Eksozom içeriğinin köken alınan hücre tipine ve hücrenin durumuna göre farklılık gösterdiği bilinmekle birlikte; eksozomların protein ve lipid gibi bileşenler bakımından kısmen özgün olduğu belirtilmektedir. Endozomal kökene sahip olmalarından dolayı eksozomların tetraspaninler (CD9, CD63, CD81 ve CD82), ısı-şok proteinleri (HSP60, HSP70 ve HSP90), TSG101 (tumor susceptibility gene 101), Alix, flotillin, Rab5b, Annexin proteinleri (Annexin I, II, IV, VII ve IX), lipid-ilişkili proteinler ve çeşitli fosfolipidler (fosfotidilkolin ve fosfotidilserin gibi) bakımından zengin olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu proteinlerden bazıları eksozomların karakterize edilmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.<sup>[11,15,16]</sup> Ancak yakın zamanda yayınlanan ve eksozomların kompozisyonunu yeniden değerlendiren bir çalışmada, Annexin I’in (Annexin A1) bir çok çalışmada belirtildiği gibi eksozomlar için spesifik bir biyobelirteç olmadığı ancak eksozomlar gibi hücre dışı kesecikler olan mikroveziküllere özgü bir biyobelirteç olduğu belirtilmiştir. Ayrıca eksozomların

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

### Yazışma Adresi/ Correspondence:

Asistan Aslı Metin Mahmutoğlu  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kurupelit  
Kampüsü, Samsun, Türkiye  
Tel. +90 362 312 19 19  
E-mail: aslimetin83@gmail.com

**Geliş/ Received:** 31.10.2019

**Kabul/ Accepted:** 13.12.2019

CD9'u mikroveziküllerden çok daha az miktarda içerdiği de bildirilmiştir.<sup>[2]</sup> Benzer şekilde seminal plazma eksozomlarında CD63 ve CD9 ekspresyonunun mikroveziküllerden daha düşük, CD81 ekspresyonunun ise daha yüksek olduğu flow sitometri analizleri ile gösterilmiştir.<sup>[17]</sup>

Eksozomlar protein, lipid, mRNA ve kodlama yapmayan RNA'ları (miRNA, siRNA ve lncRNA gibi) taşımakla görevli olan yapılardır.<sup>[18-21]</sup> Fakat bilinenlerin aksine kromatin yapısının oluşmasında rol oynayan histon proteinlerinin,<sup>[22]</sup> DNA'nın, miRNA'nın işlenmesinde rol alan Argonaute 1-4 proteinlerinin ve hücre iskeleti proteinlerinin eksozomlar tarafından taşınmadığı son zamanlarda yapılan bir çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Eksozomların yüklenmesinin rasgele olmadığı aksine çok iyi düzenlendiği bildirilmektedir.<sup>[2]</sup> Eksozomlar hücreler arası iletişim, anti-viral aktivite, mikrobiyal patogenezin düzenlenmesi, programlı hücre ölümü, anjiyogenez, immun cevabın düzenlenmesi ve koagulyasyonda rol almaktadır.<sup>[11,23]</sup> Semende bol miktarda bulunan eksozomların (seminal eksozomların) erkek fertilitesinde de önemli rol oynadığı bildirilmektedir.<sup>[24,25]</sup>

## Seminal Eksozomlar

Semen; sperm hücrelerinin yanı sıra somatik hücreler, çeşitli peptid ve proteinler, prostatik sıvılar, immunosupresif ajanlar ve membranla çevrili mikro- ve nano-kesciklerin bulunduğu biyolojik bir sıvıdır.<sup>[26-28]</sup> Eksozomlar ve mikroveziküller seminal plazmada yer alan hücre dışı kesciklerdir ve sahip oldukları birçok fonksiyonla üremede yer almaktadırlar.<sup>[17]</sup> Eksozomların hücreler arası iletişime küçük RNA moleküllerini taşıyarak aracılık ettiği düşünülmektedir. Sperm hücreleri gibi seminal eksozomlar da heterojen RNA içeriğine sahiptir.<sup>[28,29]</sup> sncRNA, mRNA, miRNA, piRNA, Y-RNA, rRNA ve tRNA seminal eksozomlarda bulunan RNA çeşitlerinden bazılarıdır. miRNA'ların yanı sıra translasyonu baskılama özelliği olan tRNA fragmentlerinin de seminal eksozomlarda bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir. Seminal eksozomlar ile küçük RNA moleküllerinin seçici olarak taşındığı ve eksozomların alıcı genital mukoza hücrelerinde immun cevabın düzenlenmesinde rol aldığı belirtilmektedir.<sup>[28]</sup>

Atar damar virüsü atların semenlerinde bulunan ve üreme sisteminde uzun süre kalıcı enfeksiyona neden olan bir virüstür. Bu virüsün uzun süre kalıcı enfeksiyona neden olmasının *CXCL16* geninin spesifik bir alleliyle (*CXCL16S*) ilişkili olduğu bilinmekteydi fakat mekanizması açık değildi. Seminal eksozomlar içerisinde yer alan eca-mir-128 miRNA çeşidinin *CXCL16* geninde ekspresyon artışına dolayısıyla da enfeksiyona neden olduğu bilinmektedir.<sup>[30]</sup>

Yaban domuzunda seminal plazma eksozomları; sperm motilitesi, sperm membran bütünlüğü, antioksidant kapasitesi ve premature kapasitasyon inhibisyonunun sürdürülmesi ile ilişkilendirilmektedir.<sup>[31]</sup> Tavuklarda sperm hücreleri sperm depolama tübülünde (SST, sperm storage tubule) uzun süre canlılığını koruyarak depolanabilir. Sperm hücrelerinin, SST hücreleri tarafından SST lümenine salınan eksozomlar sayesinde canlılıklarını sürdürebildikleri belirtilmektedir.<sup>[32]</sup>

İnsan semeninde farklı hücre tiplerinden köken alan eksozomların bulunduğu ve bu eksozomların prokoagulant ve anti-retroviral aktivite gibi farklı fonksiyonlara sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.<sup>[13,23]</sup> İnsanlarda seminal plazmadan köken alan eksozomların detaylı proteomik analizinin yapıldığı çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmada 12 sağlıklı donörün seminal eksozomlarından PHGDH, LGALS3BP, SEMG1, ACTB, GAPDH ve ALIX'in de dâhil olduğu toplamda 1474 proteinin karakterize edilmiştir. Karakterize edilen seminal eksozom ilişkili bu proteinlerin hangi hücre yolaklarında görev aldığı belirlenmesi için biyoinformatik analizler yapılmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu seminal eksozom ilişkili proteinlerin çoğunlukla hücre büyümesi ve devamlılığı, enerji yolakları, protein metabolizması ve taşıma gibi biyolojik süreçlerde rol aldığı ortaya çıkarılmıştır.<sup>[33]</sup> Seminal eksozomlar inseminasyonun (döllenme) ardından dişi üreme sisteminde depolanmaktadır. İnsanlarda seminal eksozomlar ile uterus hücreleri arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Seminal eksozomların endometrial stroma hücreleri tarafından alındığı ve bu hücrelerde IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin üretimini indüklediği bildirilmiştir. IL-6 ve IL-8 sitokinleri embriyo implantasyonunun immünolojisinde yer alan sitokinlerdir. Uterusta seminal eksozomlar seminal plazmanın immun fonksiyonuna katkı yapmakta ve embriyo implantasyon sürecine katılabilmektedir. Dolayısıyla seminal eksozomların biyogenezinde, salgılanmasında ve/veya hücreler arası iletişim fonksiyonunda meydana gelebilecek sorunlar endometrium ile iletişimin bozulmasına ve implantasyon başarısızlığına neden olabilir.<sup>[34]</sup>

## Eksozomlar ve Erkek İnfertilitesi

İnfertilite üreme çağındaki çiftlerin %14-15'ini etkileyen önemli bir sorundur.<sup>[35]</sup> Erkek faktörün bu üreme probleminin yaklaşık olarak yarısından sorumlu olduğu belirtilmektedir. Genetik sebepler, testiküler hasar, konjenital anomaliler ve hipogonadizm erkek infertilitesine neden olan faktörler arasında yer almaktadır. Erkek infertilitesi hakkında yapılan yoğun araştırmalara rağmen hala erkek infertilite vakalarının %30-40'ını oluşturan idiyopatik infertilite vakalarından sorumlu olan moleküler mekanizmalar

ve/veya faktörler bulunamamıştır.<sup>[29,36]</sup> Eksozomların erkek infertilitesindeki rolünün belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar son 10 yılda artış göstermektedir.

Erkek infertilitesi ile eksozomların da dâhil olduğu ekstrasellüler veziküller arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalar mevcut literatürde sınırlıdır. Oligoastenozoospermili (OA) subfertil erkeklerin seminal plazmalarından elde edilen ekstrasellüler veziküllerin miRNA ekspresyon profili normozoospermik erkeklerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Eksozomların da aralarında bulunduğu ekstrasellüler veziküllerde mikroarray ile 1205 miRNA'nın analiz edildiği ve bu miRNA'lardan 32 tanesinin OA'lı bireylerde normozoospermiklere göre ekspresyon farklılığı gösterdiği bildirilmiştir. OA'lı bireylerde ekspresyon farklılığı gösteren 32 miRNA'nın yedi tanesinin ekspresyonunun yüksek olduğu, 29 miRNA'nın ekspresyonunun ise düşük olduğu belirtilmiştir. Normozoospermik erkeklerle kıyaslandığında OA'lı subfertil erkeklerin seminal eksozom ve mikroveziküllerinde miR765 ve miR1275'nin daha fazla eksprese edildiği, miR15a'nın ise daha az eksprese edildiği gösterilmiştir. Seminal plazmadan elde edilen ekstrasellüler veziküller, semen ve spermatozoanın miRNA ekspresyon profili arasında büyük bir örtüşme olduğu bildirilmiştir.<sup>[37]</sup> Azoosperminin orijini tahmin etmek için semen eksozomlarında bulunan miR-31-5p'nin %90'dan yüksek hassaslık ve duyarlılığa sahip bir biyobelirteç olabileceği bildirilmektedir. miR-539-5p ve miR-941'deki ekspresyon değişikliklerinin şiddetli spermatogenik rahatsızlığı olan bireylerde spermatogenez varlığının tahmini için yüksek tanı doğruluğuna sahip olduğu önerilmektedir. Semendeki sperm bozukluklarının orijini sınıflandırmak ve azoospermili erkeklerin spermatogenik rezervini tahmin etmek için invaziv olmayan bir tanı metodu yoktur. Azoospermili bireylerin tanısı genellikle testis biyopsisi ile konulmaktadır. Testis ve erkek üreme bezlerinin durumu hakkında bilgi verebilen insan semeninde azoosperminin biyobelirteci olabilecek eksozomal miRNA'lar araştırılmıştır. Semen eksozomları diğer biyolojik sıvılardan oldukça farklı ve spesifik bir miRNA profili sergilemektedir.<sup>[24]</sup> miRNA'ların fertil ve infertil erkeklerde farklı ekspresyon özelliği gösterdiği de bilinmektedir.<sup>[38]</sup> Şiddetli spermatogenik bozukluğu olan bireyler, vasktomize erkekler, normozoospermik ve oligozoospermik bireylerin yer aldığı çalışmada miRNA profillemesi analizi ile toplamada 623 miRNA belirlenmiştir. Bu miRNA'ların %63,7'sinin (397 miRNA) tüm çalışma gruplarında oldukça tutarlı ekspresyon özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Spermatogenik bozukluktan kaynaklanan azoospermi ile normal spermatogeneze sahip olup genital sistem obstrüksiyonundan dolayı meydana gelen azoospermi arasında gözlenen miRNA

ekspresyon farklılıkları çeşitli moleküler yöntemlerle doğrulanmıştır. Azoosperminin orijini belirleyebilmek ve testislerdeki sperm varlığı hakkında bilgi sahibi olabilmek için seminal eksozomlarda miR-31-5p ve miR-941 analizi yapılmasının faydalı olabileceği ve bu analizin azoospermili erkeklere önerilebileceği bildirilmektedir.<sup>[24]</sup>

Erkek üreme sisteminde farklı kökene sahip hücreler tarafından üretilen eksozomlar semen kalitesini etkilemektedir. Spermin hareketlilik ve kapasitasyon yeteneği kazanmasında CRISP1 (Cysteine-rich secretory protein 1) gibi proteinlerin eksozomlar aracılığıyla transferinin etkili olabileceği bildirilmektedir. Eksozomların normozoospermik bireylerde spermin hareketliliğini iyileştirdiği ve kapasitasyonu tetiklediği bildirilirken; şiddetli astenozoospermik bireylerde benzer bir etkinin görülmediği belirtilmektedir. Normozoospermi, astenozoospermi ve azoospermiye sahip olan bireylerin seminal eksozomları şekil, büyüklük, kanonik eksozom markırlarının ekspresyonu, spermin olgunlaşmasında rol alan proteinler ve fertilizasyon kapasitesi açısından benzer özellikler göstermektedir. Sperm hücreleri ejakulasyondan sonra bile zamana ve pH'ye bağlı biçimde eksozomlar aracılığıyla taşınan kargoları alma yeteneğindedir.<sup>[39]</sup> Son zamanlarda yapılan bir çalışmada normozoospermik ve şiddetli astenozoospermik bireylerin sperm özelliklerine katkı yapan seminal eksozomlarının protein profilleri karşılaştırılmıştır. Yapılan kapsamlı proteomik analizler sonucu her iki grup için 1403'ü ilk kez olmak üzere toplamda 2138 proteini karakterize edilmiştir. Bu proteinlerden 89'unun iki grup arasında ekspresyon farklılığı gösterdiği belirtilmiştir. Şiddetli astenozoospermik bireyler normozoospermikler ile karşılaştırıldığında 52 proteinin ekspresyonunda artış 37 proteinin ekspresyonunda ise azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Normozoospermik bireylerin seminal eksozomlarında sperm fonksiyonlarını pozitif etkilediği bilinen CRISP1, sperm-ilişkili antijen 11B (SPAG11B) ve defensin B126 (DEFB126) proteinlerinin ekspresyon düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Astenozoospermik erkeklerin eksozomlarında ise inhibitör bir protein olan glikodelin (PAEP) ve transglutaminaz 4 (TGM4) ekspresyonu daha yüksek bulunmuştur. Normozoospermik erkeklerin seminal eksozomlarında ekspresyonu yüksek olan proteinlerden 1/3'ünün üreme ile ilgili süreçlerde yer aldığı protein yolağı analizi ile belirlenirken, şiddetli astenozoospermik bireylerde ekspresyonu yüksek olan proteinlerin herhangi bir biyolojik sürece özgü olmadığı bulunmuştur.<sup>[40]</sup>

Eksozomlar immün cevabın düzenlenmesinde etkili faktörler olarak da görev yapabilir. Sağlıklı bireylerin semen ve vajinal sıvılarından izole edilen eksozomların HIV-1 enfeksiyonunu durdurabildiği ve/veya *in vitro* da potansiyel

olarak viral transferi bloke edebildiği bildirilmektedir.<sup>[10]</sup> HIV-1'in aktarımı cinsel ilişki ile meydana gelir ve bu aktarımda semen öncü rol oynar. İnsan semeninin retrovirüs- lere özgü anti-HIV-1 aktivitesine sahip eksozomlar içerdiği önerilmektedir. Seminal eksozomların farklı tipte hedef hücreler tarafından alındığında HIV-1'in replikasyonu durdurduğu bildirilmiştir. Seminal eksozomların HIV-1'in replikasyonunu durdurması HIV-1 ters-transkriptaz prote- ininin kompozisyonunu değiştirmesiyle sağlanır.<sup>[23]</sup>

Eksozom-ilişkili proteinlerin tek taraflı varikoseli bulunan infertil bireyler ve fertilitesi kanıtlanmış erkekler arasında ekspresyon farklılığı gösterdiği oldukça yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada bildirilmektedir. Bu çalışmada eksozomlarla ilişkili olan ve ekspresyon farklılığı gösteren ANXA2, TF, CD63, KIF5B ve SEMG1 proteinleri biyo- informatik analizlerle seçilmiş ve bu proteinlerdeki eks- presyon farklılığını Western blot analiziyle doğrulanmıştır. Tek taraflı varikoseli olan hastalarda ANXA2'nin ekspres- yonunda artış gözlenirken, KIF5B'nin ekspresyonunda ise azalma olduğu rapor edilmiştir. KIF5B ve ANXA2'nin tek taraflı varikoseli olan bireyler için protansiyel infertilite bi- yobelirteci olabileceği önerilmiştir.<sup>[41]</sup>

## Eksozomlar ve erkek infertilitesinin tedavisi

Non-obstrüktif azospermi (NOA) erkek infertilitesinde tedavisi olmayan önemli bir sorundur. Busulfan ile indük- lenmiş NOA fare modelinde idrardan köken alan kök hü- crelerin (USCs, Urine-derived stem cells) ve USC-eksozom transplantasyonun farede endojen spermatogenez onarı- mını 36 günde gerçekleştirebildiği bildirilmiştir. USC'ler multipotent farklılaşma kapasitesi ve parakrin etkilere sa- hip olan hücrelerdir. Bu hücreler doku onarımı ve yenilen- mesini gerçekleştirebilme yeteneğine sahiptir. Otuz altıncı gün sonunda USC ve USC-eksozomların transplantasyo- nu, spermatogenez genler *Pou5f1*, *Prm1*, *SYCP3* ve *DAZL* ve spermatogenez protein UCHL1'in ekspresyonunda kontrol grubuyla (PBS uygulanmış grup) karşılaştırıldığın- da istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirmiştir.<sup>[42]</sup>

## SONUÇ

Erkek infertilitesi alanında yapılan yoğun araştırmalara rağmen idiyopatik erkek infertilitesinin altında yatan moleküler mekanizmalar hala aydınlatılamamıştır. Eksozomların sperm kalitesi, maturasyonu ve kapasitasyonu üzerine olan etkileri ve RNA'dan proteine kadar farklı çeşitte kargoları hedef hücrelere taşıyabilme özellikleri dikkate alındığında; bu nano-keseciklerin erkek infertilitesinin henüz bilin-meyen nedenlerinden sorumlu olabileceği düşünülebilir.

Eksozomlarla erkek infertilitesinin non-invazif tanısı ve hatta tedavisi mümkün görünmektedir. Ancak bu konuyla ilgili kapsamlı ve iyi organize edilmiş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız

### Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmişlerdir.

### Finansal Destek

Herhangi bir mali destek alınmamıştır.

### Peer-review

Externally peer-reviewed.

### Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

### Financial Disclosure

No financial support has been received.

## KAYNAKLAR

1. Harp D, Driss A, Mehrabi S, Chowdhury I, Xu W, Liu D, et al. Exosomes derived from endometriotic stromal cells have enhanced angiogenic effects in vitro. *Cell Tissue Res* 2016;365:187–96. [\[CrossRef\]](#)
2. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 2019;177:428–45.e18. [\[CrossRef\]](#)
3. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. The role of placental exosomes in reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:520–33. [\[CrossRef\]](#)
4. Mitchell MD, Scholz-Romero K, Reed S, Peiris HN, Koh YQ, Meier S, et al. Plasma exosome profiles from dairy cows with divergent fertility phenotypes. *J Dairy Sci* 2016;99:7590–601. [\[CrossRef\]](#)
5. Qu P, Qing S, Liu R, Qin H, Wang W, Qiao F, et al. Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. *PLoS One* 2017;12:e0174535. [\[CrossRef\]](#)
6. Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol* 2006;56:345–55. [\[CrossRef\]](#)
7. Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, Giebel B. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;87:146–50. [\[CrossRef\]](#)
8. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta* 2014;1841:108–20. [\[CrossRef\]](#)
9. Zomer A, Vendrig T, Hopmans ES, van Eijndhoven M, Middeldorp JM, Pegtel DM. Exosomes: Fit to deliver small RNA. *Commun Integr Biol* 2010;3:447–50. [\[CrossRef\]](#)
10. Ouattara LA, Anderson SM, Doncel GF. Seminal exosomes and HIV-1 transmission. *Andrologia* 2018;50:e13220. [\[CrossRef\]](#)
11. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:940–8. [\[CrossRef\]](#)
12. de la Torre Gomez C, Goreham RV, Bech Serra JJ, Nann T, Kussmann M. "Exosomics" --A Review of Biophysics, Biology and Biochemistry of Exosomes With a Focus on Human Breast Milk. *Front Genet* 2018;9:92. [\[CrossRef\]](#)

13. Franz C, Boing AN, Hau CM, Montag M, Strowitzki T, Nieuwland R, Toth B. Procoagulant tissue factor-exposing vesicles in human seminal fluid. *J Reprod Immunol* 2013;98:45–51. [\[CrossRef\]](#)
14. Gatti JL, Metayer S, Belghazi M, Dacheux F, Dacheux JL. Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod* 2005;72:1452–65. [\[CrossRef\]](#)
15. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73:1907–20. [\[CrossRef\]](#)
16. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:575–81. [\[CrossRef\]](#)
17. Barranco I, Padilla L, Parrilla I, Alvarez-Barrientos A, Perez-Patino C, Pena FJ, et al. Extracellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression profiles. *Sci Rep* 2019;9:11584. [\[CrossRef\]](#)
18. El Andaloussi S, Lakhali S, Mager I, Wood MJ. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:391–7. [\[CrossRef\]](#)
19. Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* 2012;1. [\[CrossRef\]](#)
20. Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res* 2017;66:30–41. [\[CrossRef\]](#)
21. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654–9. [\[CrossRef\]](#)
22. Gunes SO, Metin Mahmutoglu A, Agarwal A. Genetic and epigenetic effects in sex determination. *Birth Defects Research Part C. Embryo Today: Reviews* 2016;108:321–36. [\[CrossRef\]](#)
23. Madison MN, Roller RJ, Okeoma CM. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology* 2014;11:102. [\[CrossRef\]](#)
24. Barcelo M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Hum Reprod* 2018;33:1087–98. [\[CrossRef\]](#)
25. Gabrielsen JS, Lipshultz LI. Rapid progression in our understanding of extracellular vesicles and male infertility. *Fertil Steril* 2019;111:881–2. [\[CrossRef\]](#)
26. Aalberts M, Sostaric E, Wubbolts R, Wauben MW, Nolte-Hoen ENM, Gadella BM, et al. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochim Biophys Acta* 2013;1834:2326–35. [\[CrossRef\]](#)
27. Hopkins BR, Sepil I, Wigby S. Seminal fluid. *Curr Biol* 2017;27:R404–R5. [\[CrossRef\]](#)
28. Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP, et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 2014;42:7290–304. [\[CrossRef\]](#)
29. Gunes S, Mahmutoglu AM. Transcriptomics and Oxidative Stress in Male Infertility. In: Henkel R, Samanta L, Agarwal A, editors. *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*; Elsevier; 2019. p.249–60. [\[CrossRef\]](#)
30. Carossino M, Dini P, Kalbfleisch TS, Loynachan AT, Canisso IF, Shuck KM, et al. Downregulation of microRNA eca-mir-128 in seminal exosomes and enhanced expression of CXCL16 in the stallion reproductive tract are associated with long-term persistence of equine arteritis virus. *J Virol* 2018;92:e00015–18. [\[CrossRef\]](#)
31. 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;7:58832–47. [\[CrossRef\]](#)
32. Huang A, Isobe N, Yoshimura Y. Changes in localization and density of CD63-positive exosome-like substances in the hen oviduct with artificial insemination and their effect on sperm viability. *Theriogenology* 2017;101:135–43. [\[CrossRef\]](#)
33. Yang C, Guo WB, Zhang WS, Bian J, Yang JK, Zhou QZ, et al. Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma. *Andrology* 2017;5:1007–15. [\[CrossRef\]](#)
34. Paktinat S, Hashemi SM, Ghaffari Novin M, Mohammadi-Yeganeh S, Salehpour S, Karamian A, Nazarian H. Seminal exosomes induce interleukin-6 and interleukin-8 secretion by human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2019;235:71–6. [\[CrossRef\]](#)
35. Cheung S, Parrella A, Rosenwaks Z, Palermo GD. Genetic and epigenetic profiling of the infertile male. *PloS One* 2019;14:e0214275. [\[CrossRef\]](#)
36. Gunes S, Agarwal A, Henkel R, Mahmutoglu A, Sharma R, Esteves S, et al. Association between promoter methylation of MLH 1 and MSH 2 and reactive oxygen species in oligozoospermic men—A pilot study. *Andrologia* 2018;50:e12903. [\[CrossRef\]](#)
37. Abu-Halima M, Ludwig N, Hart M, Leidinger P, Backes C, Keller A, et al. Altered micro-ribonucleic acid expression profiles of extracellular microvesicles in the seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia. *Fertil Steril* 2016;106:1061–9.e3. [\[CrossRef\]](#)
38. Gunes S, Metin Mahmutoglu A, Arslan MA, Henkel R. Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men. *Andrologia* 2018;50:e13124. [\[CrossRef\]](#)
39. Murdica V, Giacomini E, Alteri A, Bartolacci A, Cermisoni GC, Zarovni N, et al. Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. *Fertil Steril* 2019;111:897–908.e2. [\[CrossRef\]](#)
40. Murdica V, Cermisoni GC, Zarovni N, Salonia A, Vigano P, Vago R. Proteomic analysis reveals the negative modulator of sperm function glycodelin as over-represented in semen exosomes isolated from asthenozoospermic patients. *Hum Reprod* 2019;34:1416–27. [\[CrossRef\]](#)
41. Panner Selvam MK, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Gupta S, Dias TR, Dias Martins A. Protein Fingerprinting of Seminal Plasma Reveals Dysregulation of Exosome-Associated Proteins in Infertile Men with Unilateral Varicocele. *World J Mens Health* 2019. [\[CrossRef\]](#)
42. Deng C, Xie Y, Zhang C, Ouyang B, Chen H, Lv L, et al. Urine-Derived Stem Cells Facilitate Endogenous Spermatogenesis Restoration of Busulfan-Induced Nonobstructive Azoospermic Mice by Paracrine Exosomes. *Stem Cells Dev* 2019;28:1322–33. [\[CrossRef\]](#)