



## Экспрессия экзосомальных микроРНК miR-34a и miR-210 при мужском бесплодии: связь с морфокинетическими параметрами и фрагментацией ДНК сперматозоидов

© Шамиль Н. Галимов<sup>1</sup>, Эльмира Ф. Галимова<sup>1</sup>, Ирина Р. Гилязова<sup>1,4</sup>, Иван Д. Громенко<sup>1</sup>, Юлия Ю. Громенко<sup>2</sup>, Дарья Д. Громенко<sup>1</sup>, Камиль Ш. Галимов<sup>3</sup>, Валентина Д. Котенко<sup>3</sup>, Теона З. Ткешелашвили<sup>3</sup>, Гульшат Р. Абдеева<sup>1</sup>, Петр Ф. Литвицкий<sup>3</sup>, Валентин Н. Павлов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет [Уфа, Россия]

<sup>2</sup> Медицинский центр «Семья» [Уфа, Россия]

<sup>3</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет) [Москва, Россия]

<sup>4</sup> Институт биохимии и генетики — Уфимский федеральный исследовательский центр РАН [Уфа, Россия]

### Аннотация

**Введение.** Бесплодием страдают десятки миллионов мужчин и женщин во всём мире. Примерно в половине случаев причиной недуга являются мужчины. В последние десятилетия наблюдается существенное снижение качества эякулята у мужчин, что проявляется уменьшением концентрации и подвижности сперматозоидов. Недостаточная диагностическая и прогностическая ценность результатов рутинного анализа спермы ставит задачу по разработке эффективных диагностических инструментов и поиску надёжных биомаркеров мужского бесплодия. Наиболее перспективным из них может стать оценка экспрессии микроРНК сперматозоидов.

**Цель исследования.** Изучить роль экзосомальных микроРНК miR-34a и miR-210 сперматозоидов в развитии мужского бесплодия.

**Материалы и методы.** В ретроспективное исследование включены 150 мужчин в возрасте 25 – 49 лет; из них 96 пациентов — с диагнозом идиопатического бесплодия. Группу сравнения составили 54 фертильных мужчины. Для оценки структуры и подвижности сперматозоидов использовали результаты стандартного исследования эякулята (ВОЗ, 2021) и компьютерного анализа данных с использованием программного обеспечения MMC Sperm (MMCSoft, Санкт-Петербург, РФ). Оценка степени фрагментации ДНК осуществлялась методом TUNEL. Для анализа экспрессии miR-34a и miR-210 проводили количественную ПЦР в реальном времени с использованием набора miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit («Qiagen» GmbH, Hilden, Germany) и системы обнаружения продуктов ПЦР Rotor-Gene Q («Qiagen» GmbH, Hilden, Germany).

**Результаты.** Изучение эякулята методом Computer Assisted Sperm Analysis System (CASA) выявило статистически достоверную связь уровня фрагментации ДНК сперматозоидов с показателями скорости их движения: прямолинейного (VSL) ( $r = -0,522726$ ;  $p < 0,01$ ), криволинейного (VCL) ( $r = -0,499096$ ;  $p < 0,01$ ), по среднему пути (VAP) ( $r = -0,429533$ ;  $p < 0,01$ ), а также с амплитудой бокового смещения головки (ALH) ( $r = -0,294779$ ,  $p < 0,01$ ), линейностью их криволинейного пути (LIN) ( $r = -0,385796$ ;  $p < 0,01$ ), степенью прямолинейно направленных движений (STR) ( $r = -0,268248$ ;  $p < 0,05$ ) и их прогрессивной подвижностью ( $r = -0,411547$ ;  $p < 0,01$ ). Исследование уровня экспрессии микроРНК в экзосомах сперматозоидов выявило статистически значимое снижение её микроРНК-34a пула ( $p = 0,0116$ ). Согласно шкале Chaddock, сила корреляционной связи между экспрессией miR-210 и эффективностью программ ВРТ была выражена умеренно (0,437993). Обратная зависимость экспрессии miR-34a с результатами ЭКО и ИКСИ была слабой (0,135314).

**Заключение.** Результаты биоинформационного анализа уровня экзосомальных микроРНК-34a и микроРНК-210, участвующих в регуляции процессов сперматогенеза, свидетельствуют о прямой связи их изменений с динамикой кинетических и морфологических показателей гамет, а также с состоянием процесса фрагментации их ДНК. Эти данные позволяют говорить о разных уровнях экспрессии генов у бесплодных пациентов и мужчин с доказанной фертильностью, а также у пациентов с успешными и повторными неудачными исходами процедуры ВРТ.

**Ключевые слова:** мужское бесплодие; микроРНК-34a; микроРНК-210; фрагментация ДНК

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке РНФ в рамках гранта № 23-25-00140. **Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Этическое заявление.** Исследование выполнено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации, пересмотренной в Форталезе (Бразилия) в октябре 2013 года.

**Вклад авторов:** Ш.Н. Галимов — концепция исследования, научное руководство, научное редактирование; Э.Ф. Галимова — разработка дизайна исследования, написание текста рукописи; Ю.Ю. Громенко — обзор литературы, сбор данных; И.Д. Громенко, Д.Д. Громенко — сбор данных, работа с биологическим материалом; К.Ш. Галимов, В.Д. Котенко, Т.З. Ткешелашвили — сбор данных; И.Р. Гилязова — анализ данных, научное редактирование; Г.Р. Абдеева — статистическая обработка данных; П.Ф. Литвицкий — концепция исследования; В.Н. Павлов — научное руководство.

✉ **Корреспондирующий автор:** Шамиль Нариманович Галимов; sngalim@mail.ru

**Поступила в редакцию:** 03.04.2024. **Принята к публикации:** 09.07.2024. **Опубликована:** 26.08.2024.

**Для цитирования:** Галимов Ш.Н., Галимова Э.Ф., Гилязова И.Р., Громенко И.Д., Громенко Ю.Ю., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Котенко В.Д., Ткешелашвили Т.З., Абдеева Г.Р., Литвицкий П.Ф., Павлов В.Н. Экспрессия экзосомальных микроРНК miR-34a и miR-210 при мужском бесплодии: связь с морфокинетическими параметрами и фрагментацией ДНК сперматозоидов. *Вестник урологии*. 2024;12(4):34-42. DOI: 10.21886/2308-6424-2024-12-4-34-42.

## Expression of exosomal microRNAs miR-34a and miR-210 in male infertility: relationship with morphokinetic parameters and sperm DNA fragmentation

© Shamil N. Galimov<sup>1</sup>, Elmira F. Galimova<sup>1</sup>, Irina R. Gilyazova<sup>1,4</sup>,  
Ivan D. Gromenko<sup>1</sup>, Yulia Yu. Gromenko<sup>2</sup>, Darya D. Gromenko<sup>1</sup>,  
Kamil Sh. Galimov<sup>3</sup>, Valentina D. Kotenko<sup>3</sup>, Teona Z. Tkeshelashvili<sup>3</sup>,  
Gulshat R. Abdeeva<sup>1</sup>, Petr F. Litvitsky<sup>3</sup>, Valentin N. Pavlov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University [Ufa, Russian Federation]

<sup>2</sup> Medical Center «Family», LLC [Ufa, Russian Federation]

<sup>3</sup> Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) [Ufa, Russian Federation]

<sup>4</sup> Institute of Biochemistry and Genetics – Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences [Ufa, Russian Federation]

### Abstract

**Introduction.** Infertility affects tens of millions of men and women across the globe. In approximately half of cases, male factors are the cause of infertility. In recent decades, there has been a significant decline in the quality of male ejaculate, which is characterized by reduced sperm concentration and motility. The insufficient diagnostic and prognostic value of routine semen analysis results highlights the challenge of developing effective diagnostic tools and searching for reliable biomarkers of male infertility. One of the most promising approaches may be assessing sperm microRNA expression.

**Objective.** To study the role of sperm exosomal microRNAs miR-34a and miR-210 in the development of male infertility.

**Materials & methods.** The retrospective study included 150 men aged 25 – 49 years; of these, 96 patients were diagnosed with idiopathic infertility. The comparison group consisted of 54 fertile men. To assess the structure and motility of sperm, the results of a standard ejaculate study (WHO, 2021) and computer data analysis using MMC Sperm (MMCSOFT, St. Petersburg, Russia) software were used. The degree of DNA fragmentation was assessed using the TUNEL method. To analyze the expression of miR-34a and miR-210, quantitative real-time PCR was performed using the miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit («Qiagen» GmbH, Hilden, Germany) and the Rotor-Gene Q PCR product detection system («Qiagen» GmbH, Hilden, Germany).

**Results.** The study of ejaculate using the Computer Assisted Sperm Analysis System (CASA) method revealed a statistically significant relationship between the level of DNA fragmentation of sperm and indicators of the speed of their movement: rectilinear (VSL) ( $r = -0.522726$ ;  $p < 0.01$ ), curvilinear (VCL) ( $r = -0.499096$ ;  $p < 0.01$ ), along the middle path (VAP) ( $r = -0.429533$ ;  $p < 0.01$ ), as well as with the amplitude of lateral head displacement (ALH) ( $r = -0.294779$ ,  $p < 0.01$ ), the linearity of their curvilinear path (LIN) ( $r = -0.385796$ ;  $p < 0.01$ ), the degree of straight-line movements (STR) ( $r = -0.268248$ ;  $p < 0.05$ ) and their progressive mobility ( $r = -0.411547$ ;  $p < 0.01$ ). A study of the level of microRNA expression in sperm exosomes revealed a statistically significant decrease in its miRNA-34a pool ( $p = 0.0116$ ). According to the Chaddock scale, the strength of the correlation between miR-210 expression and the effectiveness of ART programs was moderate (0.437993). The inverse relationship between miR-34a expression and IVF and ICSI results was weak (0.135314).

**Conclusion.** The analysis of exosomal microRNA-34a and microRNA-210, which are involved in the regulation of spermatogenesis, reveals a direct correlation between their variations and changes in the kinetic and morphological parameters of gametes. It also indicates a relationship with the state of DNA fragmentation. These findings suggest varying levels of gene expression among infertile patients, men with proven fertility, and those undergoing assisted reproductive technology (ART) treatments, both with successful and repeated unsuccessful outcomes.

**Keywords:** male infertility; microRNA-34a; microRNA-210; DNA fragmentation

**Financing.** The study was supported by the Russian Science Foundation under grant No. 23-25-00140. **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest. **Ethical approval.** The study was carried out in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (revised in Fortaleza, Brazil, October 2013).

**Authors' contribution:** Sh.N. Galimov — research concept, scientific supervision, scientific editing; E.F. Galimova — study design, drafting the manuscript; Yu.Yu. Gromenko — literature review, data acquisition; I.D. Gromenko, D.D. Gromenko — data acquisition, biological material handling; K.Sh. Galimov, V.D. Kotenko, T.Z. Tkeshelashvili — data acquisition; I.R. Gilyazova — data analysis, scientific editing; G.R. Abdeeva — statistical data processing; P.F. Litvitsky — research concept; V.N. Pavlov — scientific guide.

✉ **Corresponding author:** Shamil N. Galimov; sngalim@mail.ru

**Received:** 04/03/2024. **Accepted:** 07/09/2024. **Published:** 08/26/2024.

**For citation:** Galimov Sh.N., Galimova E.F., Gilyazova I.R., Gromenko I.D., Gromenko Yu.Yu., Pavlov V.N. Expression of exosomal microRNAs miR-34a and miR-210 in male infertility: relationship with morphokinetic parameters and sperm DNA fragmentation. *Urology Herald*. 2024;12(4):34-42. (In Russ.). DOI: 10.21886/2308-6424-2024-12-4-34-42.

## Введение

В современных условиях проблема снижения рождаемости и невозможность иметь ребёнка в каждой семье являются важными как для общества в целом, так и для благополучия отдельного человека. Существенная роль в этих процессах наряду с социально-экономическими факторами принадлежит бесплодию, которым страдают до 15% семейных пар [1 – 3]. При этом не менее половины всех зарегистрированных случаев связано с нарушением репродуктивной функции мужчин. Несмотря на совершенствование методов дифференциальной диагностики различных форм мужского бесплодия, включая молекулярно-генетические технологии, от 30 до 70% всех случаев обозначаются как идиопатические, то есть без установленной конкретной причины нарушения фертильности [4, 5].

Сперматогенез — это контролируемый многоступенчатый процесс, в ходе которого образуются зрелые сперматозоиды. Нарушение сперматогенеза у мужчин может иметь различную этиологию и молекулярные механизмы, которые ещё предстоит выявить. Известно, что почти 2000 генов координируют сперматогенез [6]. Выявление причин их дисфункции, а также роли различных регуляторных молекул, включая микроРНК, является важнейшим предметом исследования современной андрологии.

МикроРНК (miRNAs) представляют собой тип некодирующих РНК длиной около 22 нуклеотидов, играющих существенную роль в реализации посттранскрипционных процессов. Изменения экспрессии микроРНК ассоциируют с качеством ооцитов, а также олиго-, астено- и тератозооспермией [7, 8]. Изучение микроРНК является важной составляющей научных исследований,

поскольку они циркулируют в различных биологических средах и достаточно легко обнаруживаются даже в низких концентрациях. МикроРНК выявляются намного раньше белковых маркеров, что позволяет диагностировать заболевание на ранней стадии. МикроРНК более стабильны, чем мРНК, поскольку защищены от действия эндогенных РНКаз и существуют в виде комплексов с различными белками или другими веществами [9]. В настоящее время микроРНК рассматриваются как эффективные модуляторы всех этапов репродуктивного процесса, включая гаметогенез, оплодотворение, имплантацию эмбриона, эмбриональное развитие и сохранение беременности [10, 11].

**Цель исследования:** изучить роль экзосомальных микроРНК miR-34a и miR-210 сперматозоидов в развитии мужского бесплодия.

## Материалы и методы

В ретроспективном исследовании приняли участие 150 мужчин в возрасте 25 – 49 лет, которые наблюдались в медицинском центре «Семья» г. Уфы, из них 96 пациентов были с диагнозом «Идиопатическое мужское бесплодие». Средний возраст обследованных составил  $32,3 \pm 3,6$  года. В группу сравнения вошли 54 фертильных мужчины. Все участники подписали форму информационного согласия. Процедуры исследования одобрены локальным этическим комитетом.

Обследуемые сдавали эякулят после двухдневного полового воздержания. Исследуемые образцы хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$  не более 3 месяцев. Соблюдены все принципы предварительной подготовки к сдаче спермы. Все обследуемые предварительно прошли анкетирование.

Критериями отбора пациентов стали: возраст от 20 до 50 лет, отсутствие тяжёлых соматических заболеваний, детей и вредных привычек. Критерии исключения — тяжёлая соматическая патология, заболевания яичек и их придатков, наличие варикоцеле. Кроме того, в работе были использованы дополнительные результаты обследования для включения в исследование, в которых учитывались сведения о гормональном статусе пациента (ФСГ, ЛГ, тестостерон, пролактин), данные инструментальных методов (трансректального ультразвукового исследования простаты, УЗИ мошонки) и классическая спермограмма.

Для оценки структуры и подвижности сперматозоидов использовали результаты стандартного исследования эякулята, проводимого специалистом в ручном режиме, а также компьютерного анализа методом Computer Assisted Sperm Analysis System (CASA). В анализе CASA применялось программное обеспечение MMC Sperm (MMCSoft, Санкт-Петербург, РФ). Изучались такие параметры, как скорость криволинейного (VCL) и прямолинейного движений (VSL), скорость движения по среднему пути (VAP); амплитуда бокового смещения головки сперматозоида (ALH); линейность криволинейного пути (LIN); степень отклонения фактической траектории относительно усреднённой (WOB); частота, с которой криволинейная траектория пересекала средний путь движения сперматозоидов (BCF); показатель прямолинейно направленных движений (STR). Оценка степени фрагментации ДНК осуществлялась методом TUNEL (The terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling assay). Для подсчёта доли клеток с повреждённой ДНК использовали проточную цитометрию на аппарате Beckman Coulter Navios Flow Cytometer.

Основной этап работы заключался в исследовании процессов экспрессии miR-210 и miR-34a, ассоциированных со сперматогенезом, в том числе у пациентов с повторными неудачными исходами ВРТ. Этот этап исследования выполнен в Институте урологии и клинической онкологии Башкирского государственного медицинского университета.

Для анализа экспрессии miR-34a, miR-210 проводили количественную ПЦР в реальном времени с использованием

набора miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit («Qiagen» GmbH, Hilden, Germany) и системы обнаружения продуктов ПЦР в реальном времени Rotor-Gene Q («Qiagen» GmbH, Hilden, Germany). В качестве эндогенного контроля использовали микроРНК-16 и микроРНК-1228, а также синтетические молекулы UniSp2, UniSp4, UniSp5, UniSp6. Синтетическую cel-микроРНК-39 использовали для экзогенного контроля выделения, обратной транскрипции и амплификации («Qiagen» GmbH, Hilden, Germany). Для интерпретации полученных результатов применён биоинформатический анализ  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . В основе этого метода лежит положение о том, что разница в величине «порогового цикла» ( $\Delta Ct$ ) — цикла, в котором наблюдалась детектируемая флуоресценция между интересующим и контрольным геном, пропорциональна уровню относительной экспрессии интересующего гена.

**Статистический анализ.** Для статистической обработки данных применялось программное обеспечение Pandas Python Data Analysis Library, для визуализации результатов — Plotly Python Open Source. При расчётах показателей использовано программное обеспечение Python 10.3 (Python Software Foundation, Delaware, DE, USA) пакет SciPy v1.11.4. Количественные показатели представлены в виде средних ( $M$ )  $\pm$  стандартным отклонением ( $SD$ ) или в виде частот / долей (%). После проведения проверки на нормальность распределения показателей с помощью теста Shapiro-Wilk была использована ранговая корреляция Spearman для выявления взаимосвязанных величин. Сила корреляционных связей оценивалась по шкале Chaddock. Уровень достоверности различий —  $p < 0,05$ .

### Результаты

Формы патологии у мужчин с бесплодием представлены в таблице 1. Из неё видно, что основной контингент составили пациенты с диагнозом «идиопатическое бесплодие». В таблице 2 представлены показатели спермограмм пациентов с идиопатическим бесплодием и фертильных мужчин контрольной группы.

Бесплодные пациенты и фертильные мужчины статистически достоверно отличались по показателям концентрации и содержания аномальных сперматозоидов в эякуляте и не имели статистически

**Таблица 1.** Клиническая характеристика пациентов

| Причины бесплодия  | Число наблюдений | %    |
|--|------------------|------|
| Идиопатическая олигозооспермия, астенозооспермия, тератозооспермия | 96               | 64   |
| Варикоцеле   | 16               | 10,6 |
| Азооспермия  | 3                | 2    |
| Воспалительные заболевания придаточных желез                       | 11               | 7,3  |
| Эндокринный фактор   | 2                | 2    |
| Врождённые аномалии репродуктивной системы                         | 8                | 5,3  |
| Иммунологический фактор  | 1                | 0,6  |
| Другие причины   | 13               | 8,6  |
| Всего  | 150              | 100  |

**Таблица 2.** Показатели спермограмм обследованных мужчин

| Параметры (M ± m)                       | Фертильные доноры (n = 42) | Бесплодные (n = 96) |
|---|----------------------------|---------------------|
| Объём эякулята, мл                      | 3,6 ± 0,2                  | 3,5 ± 0,2           |
| Концентрация сперматозоидов, млн/мл     | 71,2 ± 5,4                 | 23,5 ± 2,2 *        |
| Морфологически нормальные формы, %      | 60,3 ± 5,9                 | 20,9 ± 0,8 *        |
| Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, % | 44,7 ± 2,4                 | 41,9 ± 1,8          |

**Примечание.** \*  $p < 0,05$  — по сравнению с контрольной группой

значимых различий по его объёму и содержанию прогрессивно-подвижных клеток. В настоящее время имеются многочисленные сведения о том, что данные спермограммы не несут надёжной информации о возможности зачатия ребёнка. В связи с этим в нашей работе был использован метод компьютерного анализа кинетических свойств сперматозоидов (CASA), который характеризуется высокой объективностью и репрезентативностью [12, 13].

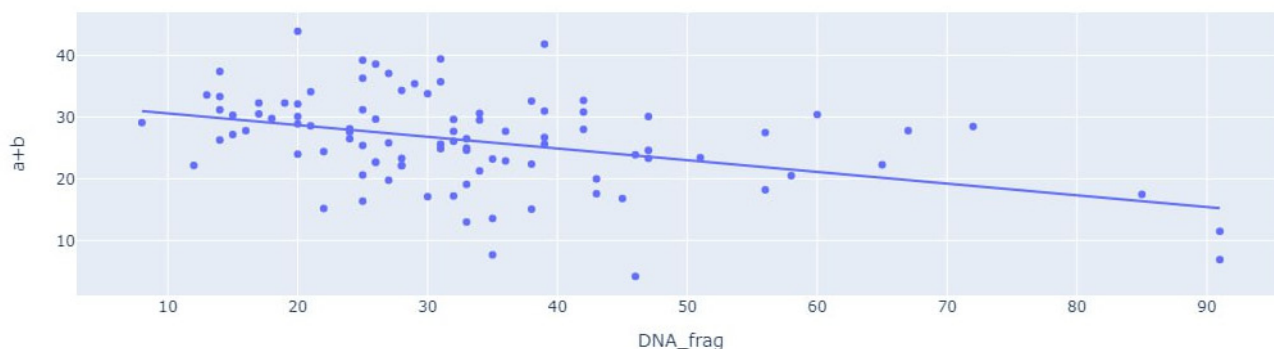
На рисунке 1 показана взаимосвязь степени фрагментации ДНК и уровня прогрессивной подвижности сперматозоидов. Полученные данные были проанализированы с использованием метода ранговой корреляции Spearman.

Нами выявлена группа параметров, имеющих значимую корреляционную связь с процессом ДНК-фрагментации.

Так, прогрессивная подвижность сперматозоидов была обратно пропорциональна степени повреждения генетического материала ( $r = -0,411547$ ;  $p < 0,01$ ) (рис. 1). Это коррелирует с данными других авторов [14, 15]. Сила обратной связи по шкале Chaddock оценивалась как умеренная.

Из определяемых с помощью компьютерного анализа показателей эякулята достоверно значимую ассоциацию с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов имели VCL, VSL, VAP, ALH, LIN и STR. Результаты представлены в таблице 3.

Наиболее сильная корреляционная связь уровня фрагментации ДНК сперматозоидов выявлена с показателем их прямолинейной скорости движения — VCL ( $r = -0,522726$ ;  $p < 0,01$ ). Согласно шкале Chaddock сила ассоциации оценивалась как умеренная. К параметрам с умеренной кор-



**Рисунок 1.** Взаимосвязь фрагментации ДНК и прогрессивной подвижности сперматозоидов

**Таблица 3.** Взаимосвязь уровня фрагментации ДНК и кинетических характеристик сперматозоидов, полученных с помощью компьютерного анализа показателей эякулята CASA

| Параметр                  | Коэффициент корреляции Spearman, r | P      |
|---------------------------|------------------------------------|--------|
| Прогрессивная подвижность | -0,411547                          | < 0,01 |
| VCL                       | -0,499096                          | < 0,01 |
| VSL                       | -0,522726                          | < 0,01 |
| VAP                       | -0,429533                          | < 0,01 |
| ALH                       | -0,294779                          | < 0,01 |
| BCF                       | -0,025033                          | > 0,05 |
| LIN                       | -0,385796                          | < 0,01 |
| STR                       | -0,268248                          | < 0,05 |
| WOB                       | -0,128926                          | > 0,05 |

**Примечание.** VCL — скорость криволинейного движения; VSL — скорость прямолинейного движения; VAP — скорость движения по среднему пути; ALH — амплитуда бокового смещения головки сперматозоида; BCF — частота, с которой криволинейная траектория пересекала средний путь движения сперматозоида; LIN — линейность криволинейного пути; STR — показатель прямолинейно направленных движений; WOB — степень отклонения фактической траектории относительно усреднённой

реляционной связью относились также скорость криволинейного пути ( $r = -0,499096$ ;  $p < 0,01$ ) и скорость движения по среднему пути ( $r = -0,429533$ ;  $p < 0,01$ ), а среди производных параметров — линейность криволинейного пути ( $r = -0,385796$ ;  $p < 0,01$ ). В то же время такие параметры, как ALH и STR, хоть и обладали значимой корреляционной связью ( $r = -0,294779$ ;  $p < 0,01$  и  $r = -0,268248$ ;  $p < 0,05$  соответственно), характеризовались слабой силой ассоциации.

В целом приведённые выше данные дают основания для рекомендации использования морфокинетических параметров CASA в качестве прогностического критерия степени фрагментации ДНК спермато-

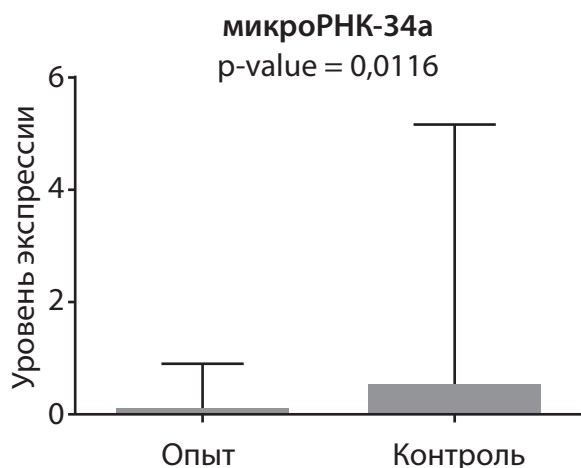
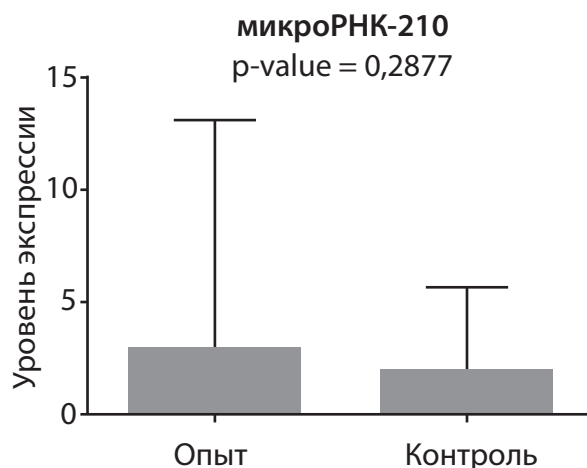
зоидов для оценки их оплодотворяющей способности.

На следующем этапе исследования были изучены различные аспекты регуляции фрагментации ДНК (SDF), ассоциированные с молекулярными механизмами репарации ДНК и контроля экспрессии её генов, которые, в свою очередь, зависят от профиля микроРНК. Оплодотворение яйцеклетки сперматозоидом низкого качества приводит к необратимым молекулярным изменениям у потомства, поскольку имеется прямая корреляционная связь между качеством спермы, эффективностью оплодотворения и развитием эмбриона [16].

Основными достоинствами метода выявления микроРНК сперматозоидов являются высокая чувствительность, стабильность, строгая специфичность, сравнительная лёгкость исполнения и возможность раннего обнаружения как диагностического маркера. Исходя из этого детекция уровня микроРНК может представлять собой идеальный инструмент для быстрой и неинвазивной диагностики многочисленных форм патологии, включая мужское бесплодие [17].

На рисунках 2 и 3 представлено графическое изображение полученных нами результатов уровней экспрессии микроРНК-34а и микроРНК-210 в группах обследованных мужчин.

У пациентов с идиопатическим бесплодием обнаружено значимое снижение экспрессии микроРНК-34а ( $p = 0,0116$ ) и повышение экспрессии микроРНК-210-3р при низкой степени достоверности ( $p = 0,2877$ )

**Рисунок 2.** Уровни экспрессии микроРНК-34а у обследованных мужчин**Рисунок 3.** Уровни экспрессии микроРНК-210-3р у обследованных мужчин

этих изменений. Согласно шкале Chaddock, сила корреляционной связи между экспрессией miR-210-3p и эффективностью программ BPT в этой когорте оценивалась как умеренная ( $p = 0,437993$ ), в то время как обратная зависимость экспрессии miR-34a с результатами ЭКО/ИКСИ характеризовалась как слабая ( $p = 0,135314$ ). Близкие по характеру ассоциации были установлены между степенью SDF и экспрессией изученных нами микроРНК в когорте бесплодных мужчин.

### Обсуждение

Метод CASA позволяет оценить различные показатели прямолинейного и криволинейного движения гамет, включая его амплитуду, скорость и траекторию. Кроме того, этот метод имеет преимущество в сравнении с оценкой рутинной спермограммы при изучении таких показателей, как относительное содержание непрогрессивно подвижных и неподвижных сперматозоидов в качестве критериев степени повреждения их ДНК. По нашим данным, доля таких сперматозоидов прямо пропорциональна степени ДНК-фрагментации ( $r = 0,50$ ,  $p < 0,001$ ). Прогностическая ценность параметра достигает 77 – 78%. В ходе исследования установлена также отрицательная корреляция между фрагментацией ДНК и такими параметрами, как VCL, VSL, VAP, ALH, LIN и STR.

Похожие результаты были получены группой H. Lin et al. (2022) [14]. В работе была показана значимая обратная связь показателя фрагментации ДНК сперматозоидов с базовыми параметрами CASA (VCL, VSL, VAP и ALH), но не выявлено корреляции с производными величинами LIN и STR. Авторами также было показано, что совместное использование морфокинетических показателей CASA, рутинного анализа морфологии клеток и оценки SDF значительно повышает прогностическую способность исследования и в большинстве случаев является оптимальным индикатором мужской фертильности. Низкий (физиологический) уровень ДНК-фрагментации, по данным большинства исследований, сочетается, как правило, с высокими значениями кинетических показателей компьютерного мониторинга (VAP, VCL, VSL и STR), что согласуется с полученными нами данными.

Важно отметить, что различные стороны регуляции целостности ДНК сопряжены с aberrантной экспрессией множества различных микроРНК, каждая из которых имеет несколько мишеней со множеством сайтов связывания для одних и тех же или разных микроРНК [17]. Следовательно, разные пулы микроРНК могут проявлять синергические эффекты при одних и тех же физиологических процессах, и определённые микроРНК играют существенную роль на различных стадиях сперматогенеза. Инициация мейотической фазы сперматогенеза требует, чтобы мужские половые клетки вышли из митоза и быстро экспрессировали гены, регулирующие мейоз. Выполненная в настоящем исследовании валидация экспрессии микроРНК-34a продемонстрировала статистически значимое изменение в группе бесплодных мужчин по сравнению с индивидами контрольной группы. МикроРНК-34a является необходимой для правильного формирования, а также надлежащего функционирования сперматозоидов, и, кроме того, обладает значительными антиоксидантными и антиапоптотическими свойствами, способствуя, таким образом, регуляции гомеостаза яичек [7, 11].

Согласно нашим и литературным данным, у пациентов с нарушением фертильности значительно увеличена экспрессия miR-210-3p по сравнению с мужчинами без патологии спермограммы. Считается, что увеличение экспрессии miR-210 сопровождается активацией каспазы-3, что приводит к апоптозу [18], а также нарушениям регуляции сперматогенеза, дефектам строения аксонемы сперматозоидов с высокой вероятностью снижения их активности. МикроРНК наряду с другими факторами [19] играют также ключевую роль в возрастных изменениях мужской фертильности, то есть являются медиаторами репродуктивного старения, о чём свидетельствует анализ профилей экспрессии микроРНК сперматозоидов мужчин разного возраста с нормальной фертильностью [20].

### Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют сделать вывод о том, что имеется статистически значимая связь между процессом фрагментации ДНК сперматозоидов и такими кинетическими параметрами, как прогрессивная подвижность, пря-

молинейная скорость движения, скорость движения по среднему пути и скорость криволинейного движения. Результаты биоинформационного анализа микроРНК-34а и микроРНК-210, регулирующих физиологические процессы в сперматозоидах, имеют тесную связь с изменением их кинетических и морфологических параметров, а также с процессом фрагментации ДНК сперматозоидов.

#### Ключевые моменты

• Показатели экспрессии микроРНК-34а и микроРНК-210 существенно различаются у бесплодных пациентов и мужчин с дока-

занной фертильностью, а также у пациентов с повторными неудачными и успешными исходами процедуры ВРТ.

• Нарушение экспрессии семейств miR-34а/210 отрицательно влияет на репродуктивный потенциал мужчин.

• Результаты мониторинга количественных и структурных изменений экзосомальных микроРНК сперматозоидов могут служить чувствительными биомаркерами при проведении индивидуальной диагностики мужского бесплодия, а также при оценке его тяжести.

#### Список литературы | References

1. Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *JAMA*. 2021;326(1):65-76. DOI: 10.1001/jama.2021.4788
2. Божедомов В.А., Корнеев И.А., Липатова Н.А., Божедомова Г.Е., Камарина Р.А., Николаева М.А., Галимова Э.Ф., Галимов Ш.Н., Епанчинцева Е.А., Павлов В.Н., Камалов А.А. Референтные показатели базового анализа эякулята фертильных мужчин: российские региональные особенности (многоцентровое поперечное ретроспективное исследование). *Урология*. 2023;(5):55-62. Bozhedomov V.A., Korneev I.A., Lipatova N.A., Bozhedomova G.E., Kamarina R.A., Nikolaeva M.A., Galimova E.F., Galimov Sh.N., Yepanchintseva E.A., Pavlov V.N., Kamalov A.A. Reference values for basic ejaculate analysis from fertile men: Russian regional characteristics (multicenter cross-sectional retrospective study). *Urologiya*. 2023;5:55-62. (In Russian). DOI: 10.18565/urology.2023.5.48-56
3. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, Arafa M, Paner Selvam MK, Shah R. Male infertility. *Lancet*. 2021;397(10271):319-333. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2
4. Podgrajsek R, Hodzic A, Stimpfel M, Kunej T, Peterlin B. Insight into the complexity of male infertility: a multi-omics review. *Syst Biol Reprod Med*. 2024;70(1):73-90. DOI: 10.1080/19396368.2024.2317804
5. Галимов Ш.Н., Ахметов Р.М., Галимова Э.Ф., Байрамгулов Ф.М., Биккулова Л.Р. Молекулярные аспекты влияния комплекса Сперотон на мужскую фертильность при идиопатическом бесплодии. *Урология*. 2017;2:88-92. Galimov Sh.N., Ahmetov R.M., Galimova E.F., Bayramgulov F.M., Bikkulova L.R. Molekular aspekts of the impact of the speroton complex on the male fertility in idiopathic infertility. *Urologiya*. 2017;2:88-92. (In Russian). DOI: 10.18565/urol.2017.2.88-92
6. Wagner AO, Turk A, Kunej T. Towards a Multi-Omics of Male Infertility. *World J Mens Health*. 2023;41(2):272-288. DOI: 10.5534/wjmh.220186
7. Громенко Ю.Ю., Громенко И.Д., Галимова С.Ш., Галимова Э.Ф., Громенко Д.Д., Булыгин К.В., Шелестова О.С., Рягин С.Н., Галимов Ш.Н., Ящук А.Г. Роль и место микроРНК в патогенезе бесплодия. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2023; 22(6): 65-72. Gromenko Yu.Yu., Gromenko I.D., Galimova S.Sh., Galimova E.F., Gromenko D.D., Bulygin K.V., Shelestova O.S., Ryagin S.N., Galimov Sh.N., Yashchuk A.G. Role and place of microRNAs in the pathogenesis of infertility. *Vopr. Ginek. Akus. perinatol.* (Gynecology, Obstetrics and Perinatology). 2023; 22(6): 65-72. (In Russian). DOI: 10.20953/1726-1678-2023-6-65-72
8. Burgos CF, Cikutovic R, Alarcón M. MicroRNA expression in male infertility. *Reprod Fertil Dev*. 2022;34(12):805-818. DOI: 10.1071/RD21131
9. Sendler E, Johnson GD, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, Krawetz SA. Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(7):4104-4117. DOI: 10.1093/nar/gkt132
10. Дмитриева М.Л., Тихоновская О.А., Петров И.А., Логвинов С.В. Экспрессия miR181a и miR-146a при преждевременной овариальной недостаточности аутоиммунной этиологии. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2022;21(2):85-89. Dmitrieva M.L., Tikhonovskaya O.A., Petrov I.A., Logvinov S.V. Expression of miR-181a and miR-146a in primary ovarian insufficiency of autoimmune. *Vopr ginek. Akus. perinatol.* (Gynecology, Obstetrics and Perinatology). 2022;21(2):85-89. (In Russian). DOI: 10.20953/1726-1678-2022-2-85-89
11. Pantos K, Grigoriadis S, Tomara P, Louka I, Maziotis E, Pantou A, Nitsos N, Vaxevanoglou T, Kokkali G, Agarwal A, Sfakianoudis K, Simopoulou M. Investigating the Role of the microRNA-34/449 Family in Male Infertility: A Critical Analysis and Review of the Literature. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:709943. DOI: 10.3389/fendo.2021.709943
12. Галимов Ш.Н., Громенко И.Д., Галимов К.Ш., Громенко Р.И., Громенко Д.Д., Муратов Э.М., Литвицкий П.Ф. Компьютерный анализ эякулята CASA: преимущества и перспективы. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2023;18(1):92-95. Galimov Sh.N., Gromenko I.D., Galimov K.Sh., Gromenko R.I., Gromenko D.D., Muratov E.M., Litvitsky P.F. Computer analysis of ejaculate CASA: advantages and prospects. *Medical Bulletin of Bashkortostan*. 2023;18(1):92-95. (In Russian). eLIBRARY ID: 50364654; EDN: NBLPED
13. Finelli R, Leisegang K, Tumallapalli S, Henkel R, Agarwal A. The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Transl Androl Urol*. 2021;10(7):3069-3079. DOI: 10.21037/tau-21-276
14. Lin HT, Wu MH, Wu WL, Tsai LC, Chen YY, Hung KH, Wu PH, Chen TS, Ou HT, Cheng YS. Incorporating sperm DNA fragmentation index with computer-assisted semen morphokinematic parameters as a better window to male fertility. *Chin J Physiol*. 2022;65(3):143-150. DOI: 10.4103/CJP.CJP\_12\_22
15. Aghazarian A, Huf W, Pflüger H, Klätte T. Standard Semen Parameters vs. Sperm Kinematics to Predict Sperm DNA Damage. *World J Mens Health*.



- 2021;39(1):116-122.  
DOI: 10.5534/wjmh.190095
16. Xie Y, Wu C, Chen W, Wu Z, Cai G, Hong L. Extracellular vesicles-encapsulated microRNA in mammalian reproduction: A review. *Theriogenology*. 2023;196:174-185.  
DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.022
17. Bahmyari S, Khatami SH, Taghvimi S, Rezaei Arablouydareh S, Taheri-Anganeh M, Ghasemnejad-Berenji H, Farazmand T, Soltani Fard E, Solati A, Movahedpour A, Ghasemi H. MicroRNAs in Male Fertility. *DNA Cell Biol*. 2024;43(3):108-124.  
DOI: 10.1089/dna.2023.0314
18. Xu YW, Ou NJ, Song YX, Wang XH, Kang JQ, Yang YJ, Chen YG, Liu XQ. Seminal plasma miR-210-3p induces spermatogenic cell apoptosis by activating caspase-3 in patients with varicocele. *Asian J Androl*. 2020;22(5):513-518.  
DOI: 10.4103/aja.aja\_114\_19
19. Galimov SN, Gromenko JY, Bulygin KV, Galimov KS, Galimova EF, Sinenikov MY. The level of secondary messengers and the redox state of NAD<sup>+</sup>/NADH are associated with sperm quality in infertility. *J Reprod Immunol*. 2021;148:103383.  
DOI: 10.1016/j.jri.2021.103383
20. Zhao MJ, Zhang YN, Zhao YP, Chen XB, Han BS, Ding N, Gu YQ, Wang SS, Ma J, Liu ML. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in normal fertile men of different ages. *Asian J Androl*. 2023;25(6):737-744.  
DOI: 10.4103/aja20238

#### Сведения об авторах | Information about the authors

**Шамиль Нариманович Галимов** — д-р мед. наук, профессор | **Shamil N. Galimov** — Dr.Sc.(Med), Full Prof.  
<https://orcid.org/0000-0002-5871-5151>; [sngalim@mail.ru](mailto:sngalim@mail.ru)

**Эльмира Фанисовна Галимова** — д-р мед. наук, доцент | **Elmira F. Galimova** — Dr.Sc.(Med), Assoc.Prof. (Docent)  
<https://orcid.org/0000-0002-3351-7669>; [efgalimova@mail.ru](mailto:efgalimova@mail.ru)

**Ирина Ришатовна Гилязова** — канд. биол. наук, доцент | **Irina R. Gilyazova** — Cand.Sc.(Biol), Assoc.Prof. (Docent)  
<https://orcid.org/0000-0001-9499-5632>; [gilyazova\\_irina@mail.ru](mailto:gilyazova_irina@mail.ru)

**Иван Дмитриевич Громенко** | **Ivan D. Gromenko**  
<https://orcid.org/0000-0001-8582-660X>; [gromenko@mail.ru](mailto:gromenko@mail.ru)

**Юлия Юрьевна Громенко** — канд. мед. наук | **Yulia Yu. Gromenko** — Cand.Sc.(Med)  
<https://orcid.org/0000-0002-3373-0873>; [info@medufa.ru](mailto:info@medufa.ru)

**Дарья Дмитриевна Громенко** | **Daria D. Gromenko**  
<https://orcid.org/0000-0001-5638-1779>; [dasha.gromenko@mail.ru](mailto:dasha.gromenko@mail.ru)

**Камиль Шамилович Галимов** | **Kamil Sh. Galimov**  
<https://orcid.org/0000-0002-0148-4380>; [kamil9819@mail.ru](mailto:kamil9819@mail.ru)

**Валентина Дмитриевна Котенко** | **Valentina D. Kotenko**  
<https://orcid.org/0009-0008-7381-9814>; [kotenko.tina1@inbox.ru](mailto:kotenko.tina1@inbox.ru)

**Теона Зурабовна Ткешелашвили** | **Teona Z. Tkeshelashvili**  
<https://orcid.org/0009-0008-7729-1287>; [teona.teottz@gmail.com](mailto:teona.teottz@gmail.com)

**Гульшат Руслановна Абдеева** | **Gulshat R. Abdeeva**  
<https://orcid.org/0000-0001-7189-5532>; [gulshatik2001@mail.ru](mailto:gulshatik2001@mail.ru)

**Пётр Францевич Литвицкий** — д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН | **Peter F. Litvitskiy** — Dr.Sc.(Med), Full Prof., Corr. Mbr. of the RAS  
<https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>; [litvitskiy\\_p\\_f@staff.sechenov.ru](mailto:litvitskiy_p_f@staff.sechenov.ru)

**Валентин Николаевич Павлов** — д-р мед. наук, профессор, акад. РАН | **Valentin N. Pavlov** — Dr.Sc.(Med), Full Prof., Acad. of the RAS  
<https://orcid.org/0000-0003-2125-4897>; [vpavlov3@yandex.ru](mailto:vpavlov3@yandex.ru)