

УДК 576.371

ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2016 г. Е. Е. Брагина*, Е. А. Ариффулин, Е. П. Сенченков

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГОУ ВПО
“Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”; отдел электронной микроскопии
119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*E-mail: bragor@mail.ru

Поступила в редакцию 09.01.2016 г.
Окончательный вариант получен 29.01.2016 г.

Способность к движению – важнейшее свойство сперматозоидов млекопитающих, необходимое для оплодотворения. Морфологическим субстратом подвижности сперматозоидов является аксонема и периаксонемные структуры жгутика. Количественные методы исследования сперматозоидов человека позволили определить нормативные показатели подвижности сперматозоидов фертильных мужчин. Причиной значительного снижения подвижности сперматозоидов могут быть экзогенные факторы и, реже, генетические нарушения. Нарушения структуры аксонемы (отсутствие наружных и/или внутренних динеиновых ручек, отсутствие центральной пары микротрубочек) являются причиной первичной цилиарной дискинезии (ПЦД). ПЦД – тяжелое генетически обусловленное системное заболевание, при котором снижение подвижности сперматозоидов – только один из симптомов. Дисплазия фиброзной оболочки (ДФО) – также генетически обусловленное нарушение подвижности сперматозоидов. ПЦД и ДФО – мультигенные заболевания, наследуемые по аутосомно-рецессивному типу. Современные молекулярно-биологические методы исследования применяют для выявления кандидатных генов. Использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволяет получить потомство при ПЦД и ДФО. Однако генетическая природа патозооспермии должна учитываться при применении ВРТ. Симптомы ПЦД и ДФО проявляются у гомозиготных организмов. Дети, рожденные с помощью ВРТ имеют вероятность быть носителями мутаций, переданных через их родителей. Отсутствие полных данных по этиологическим факторам генетической спермопатологии не позволяют в полной мере оценить степень генетического риска. Однако следует учитывать возможность накопления мутаций, что является фактором риска для отдаленных потомков.

Ключевые слова: подвижность сперматозоидов, первичная цилиарная дискинезия, ультраструктура жгутиков сперматозоидов

DOI: 10.7868/S0475145016050025

ВВЕДЕНИЕ

Методы количественного исследования сперматозоидов человека в непосредственной привязке к проблемам фертильности получили развитие в 20-х годах прошлого столетия. Первоначально количественные методы заключались в определении концентрации сперматозоидов, в середине XX века фертилизационно значимым параметром стали считать их подвижность. Нормативные показатели подвижности сперматозоидов, т.е. показатели, определенные у большой когорты фертильных мужчин, составляли 70% (Быков, 2000). С 80-х годов XX века Всемирная организация здравоохранения начала регулярный выпуск руководства по проведению спермиологического исследования (Menkveld, 2010). В каждом издании приводятся нормативные показатели поступательной подвиж-

ности сперматозоидов. В 2010 г. вышло пятое издание Руководства (WHO, 2010), в котором приведены данные о нормативных показателях подвижности сперматозоидов в эякуляте фертильных мужчин начала XXI века. Заключение “астенозооспермия” в клинической практике соответствует снижению количества подвижных сперматозоидов, согласно пятому изданию Руководства ВОЗ – менее 32% сперматозоидов с поступательной подвижностью.

Продвижение сперматозоидов к яйцеклетке является важным этапом жизненного цикла человека. Движение сперматозоидов происходит благодаря повторяющимся регулярным биениям жгутика. Популяция сперматозоидов человека отличается высокой гетерогенностью морфологии и подвижностью. В эякуляте здорового фертильного мужчины можно найти практически все

типы морфологических нарушений структуры гамет, в том числе и структуры их жгутика. С точки зрения биологической целесообразности гетерогенность сперматозоидов, по-видимому, является продуктом уникальных условий, в которых находятся клетки репродуктивной системы. С одной стороны, в сперматогенном эпителии идет постоянная дифференцировка половых клеток, с другой — из-за наличия гемато-тестикулярного барьера отсутствует иммунологический контроль за этим процессом со стороны организма (Райцина, 1985). В этих условиях особую важность для сохранения генетической стабильности млекопитающих, в том числе вида *Homo sapiens* приобретают механизмы селекции функционально и генетически полноценных гамет. Снижение качественных параметров спермы, интенсивно обсуждаемое как в научной литературе, так и в СМИ, само по себе не является патологией. Оно отражает давление повреждающих факторов внешней среды (экологических, социально-экономических, инфекционных), действующих на организменном, клеточном и молекулярном уровнях и приводящих к элиминации поврежденных половых клеток из репродукции. Сперматозоиды со сниженной подвижностью исключаются из процесса спонтанного (естественного) оплодотворения, так же как и сперматозоиды с аномальной морфологией, которые не способны пройти цервикальную слизь шейки матки (Menkveld, 2010).

При ультраструктурном анализе сперматозоидов с помощью ряда морфологических критериев возможно отличить астенозооспермию, вызванную гибелью клеток (по таким признакам, как фрагментация плазматической мембраны, дегенеративные изменения акросомы, кариолизис и кариорексис) от генетически обусловленной астенозооспермии, являющейся результатом врожденных патологических изменений жгутиков сперматозоидов и от преходящей астенозооспермии, вызванной функциональными изменениями структуры жгутика (Chemes, Alvarez-Sedo, 2012; Moretti, Collodel, 2012).

Критериями генетически обусловленной астенозооспермии является тотальное нарушение структуры аксонемы жгутика и периаксонемных структур, семейный характер патозооспермии, постоянство морфологических показателей, отсутствие реакции гамет на различные (в том числе и медикаментозные) воздействия. В литературе описано два типа генетически обусловленной астенозооспермии. При первичной цилиарной дискинезии (ПЦД) происходит тотальное нарушение структур аксонемы, при дисплазии фиброзной оболочки (ДФО) — тотальное нарушение

структуры фиброзной оболочки жгутика (Baccetti et al., 2001; Chemes, Rawe, 2003).

СТРУКТУРА АКСОНЕМЫ И ПЕРИАКСОНЕМНЫХ СТРУКТУР ЖГУТИКОВ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Аксонема

В интактном жгутике сперматозоида человека, длина которого около 50 мкм, различают 4 отдела: соединительный отдел, прикрепленный к головке, средний отдел длиной 3–5 мкм, основной отдел (примерно 2/3 длины жгутика) и короткий концевой участок. В отличие от ресничек, покрытых плазматической мембраной, жгутики сперматозоидов помимо аксонемы, содержат дополнительные структуры, окружающие аксонему, так называемые периаксонемные структуры. В среднем отделе аксонема окружена митохондриальной спиралью и наружными плотными фибриллами, в основном — фиброзной оболочкой. Только в коротком концевом участке аксонема не содержит периаксонемных структур (Брагина, Абдумаликов, 2001; Fawcett, 1975).

Центральную часть ресничек и жгутиков занимает аксонема. Жгутики и реснички — две формы одной органеллы. Исторически сложилось так, что применяют название “реснички” если в клетке большое количество этих органелл, и “жгутики”, если структур одна или две. Эта структура консервативна и морфологически, но не биохимически, и идентична у жгутиков и ресничек всех эукариотических организмов (Konno et al., 2015). Аксонема состоит из 9 двойных микротрубочек (которые также называются дуплетами), расположенных по окружности вокруг двух одинарных микротрубочек, лежащих в центре — (9 + 2). Дуплеты микротрубочек нумеруют по часовой стрелке, счет начинается с того места, где над центральной парой МТ лежит два дуплета, счет начинается с правого (рис. 1).

Каждый периферический дуплет состоит из полной микротрубочки (субъединица А) и прилегающей к ней неполной микротрубочки (субъединица В), которые построены из 13 и 10 протофиламентов соответственно. Протофиламенты составлены из α и β гетеродимеров тубулина. Применение высокоразрешающей криоэлектронной микроскопии позволило показать, что один из протофиламентов не является тубулином (Sui, Downing, 2006) и идентифицирован как тектин (Linck et al., 2014).

От субъединицы А каждого дуплета в сторону субъединицы В следующего по часовой стрелке дуплета отходят выросты, состоящие из белка динеина, так называемые динеиновые ручки, наружная и

внутренняя. Каждая из динеиновых ручек представляет собой сложный мультипротеиновый комплекс (молекулярный мотор) (Schmidt et al., 2012). Дуплеты микротрубочек соединены тонкими нексиновыми (по названию белка) мостиками, в сторону центральной пары микротрубочек отходят радиальные “спицы”. Вся эта сложная структура обеспечивает скольжение микротрубочек, лежащее в основе ундуляции жгутика.

Наружные динеиновые ручки (НДР, outer arm dynein, ODA) состоят из 3 тяжелых полипептидных цепей (α , β и γ , около 500 кД), 2 промежуточных 78 и 69 кД и 10 легких (8–22 кД) (DiBella et al., 2005). Тяжелые цепи наружных динеиновых ручек обеспечивают скольжение микротрубочек, они накладываются на А-микротрубочку наружного дуплета аксонемы (Ishikawa et al., 2007) и меняют конфигурацию во время гидролиза АТФ (Movassagh et al., 2010). В НДР локализован регуляторный комплекс цАМФ-зависимой протеинкиназы А (Itoh et al., 2003; Konno et al., 2015), необходимой для гиперактивации сперматозоидов (Ho, Suarez, 2001).

Аксонема — сложная молекулярная машина, в которой внутренние и внешние динеиновые ручки генерируют силы для изгибательного движения, а центральный аппарат и радиальные спицы осуществляют регуляторную функцию (Inaba, 2003; 2011). Изучение молекулярной структуры аксонемы свидетельствует о высокой степени консервативности ее структуры, тем не менее данные молекулярной биологии, в том числе и протеомного анализа, позволили выявить ряд различий между ресничками и жгутиками одного и того же организма (Konno et al., 2015).

НДР расположены с периодичностью 24 нм на каждом дуплете микротрубочек. В прикреплении участвует структура, названная комплексом прикрепления НДР (outer dynein arm-docking complex (ODA-DC)) (Takada, Kamiya, 1994), состоящая из 3 полипептидов, один из которых является Ca^{2+} -связывающим белком (Casey et al., 2003). НДР обеспечивает около 4/5 сил скольжения, необходимых для биения жгутиков (Brokaw, 1994).

Внутренние динеиновые ручки (ВДР) более гетерогенны и состоят из 7 типов динеина (a–g) (Kagami et al., 1990). ВДРf содержат 2 тяжелые цепи (HC), три промежуточные (IC) и 5 легких цепей (LC) (Wirschell et al., 2009). Динеин f связан с протеином, который называется flagellar-associated protein (FAP) 120 (Ikeda et al., 2009). Другие динеины ВДР содержат тяжелые цепи, актин и центрин (Kamiya, 2002). В состав динеина d входят компоненты, связывающие его с наружными дуплетами микротрубочек (Yamamoto et al., 2008). Система, контролирующая деятельность белков ВДР, на молекулярном уровне отличается от

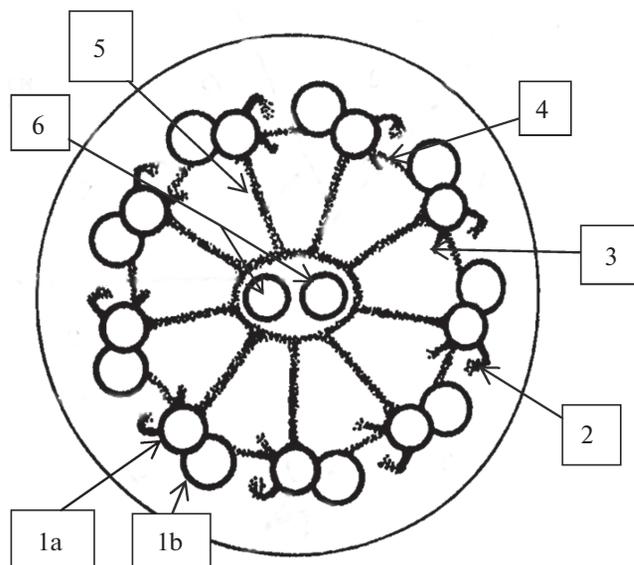


Рис. 1. Схема аксонемы. 1 — периферические дуплеты микротрубочек, состоящие из полной микротрубочки А (1a) и неполной микротрубочки В (1b), 2 — наружные динеиновые ручки, 3 — внутренние динеиновые ручки, 4 — нексиновые мостики, 5 — радиальные спицы, 6 — центральная пара микротрубочек.

НДР, в контроль деятельности ВДР вовлечены центральная пара МТ и радиальные спицы.

Радиальные спицы отходят от основания А-микротрубочек в сторону центральной пары МТ. В составе радиальных спиц описано 23 полипептида (от 8 до 230 кДа), включая компоненты кальциевой регуляторной системы, кальмодулин-связывающие белки, белок, связывающий А-киназу (A-kinase anchor protein, АКАР) и др. (Yang et al., 2006).

Взаимодействие радиальных спиц с центральными микротрубочками определяет направление и форму изгиба аксонемы. МТ С1 расположена со стороны активного скольжения микротрубочек. У 0-мутантов хламидомонад с отсутствием радиальных спиц центральный аппарат ориентирован случайным образом (Wargo, Smith, 2003).

Периаксонемные структуры жгутика сперматозоида. Средний отдел жгутика

Головку и жгутик сперматозоида связывает соединительный участок (шейка). У основания головки под базальной пластиной локализована центриоль, окруженная электронно-плотным капитулумом (capitulum) и девятью сегментированными колоннами — цилиндрическими структурами с периодической исчерченностью (Fawcett, 1975) (рис. 2). Мутация гена *Spata6*, кодирующего белок, входящий в состав капитулума и сегментированных колонн, приводит к нарушению при-

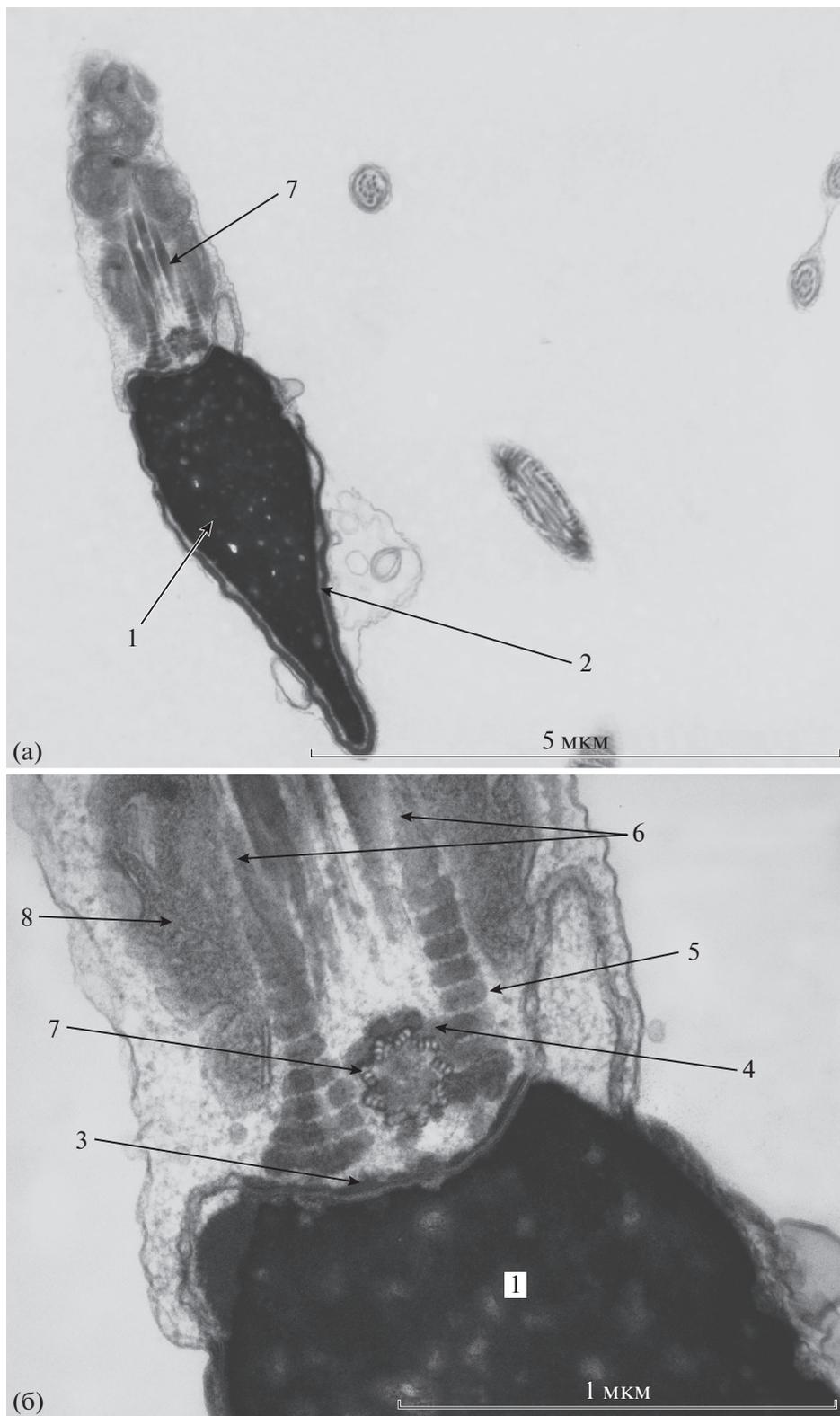


Рис. 2. Продольный срез через шейку сперматозоида. 1 – хроматин ядра сперматозоида, 2 – акросома, 3 – базальная пластина в зоне прикрепления головки и жгутика, 4 – капитулум, 5 – истощенные колонны, 6 – наружные плотные фибриллы. Видно, что наружные плотные фибриллы являются продолжением истощенных колонн, 7 – центриоль, 8 – митохондрии.

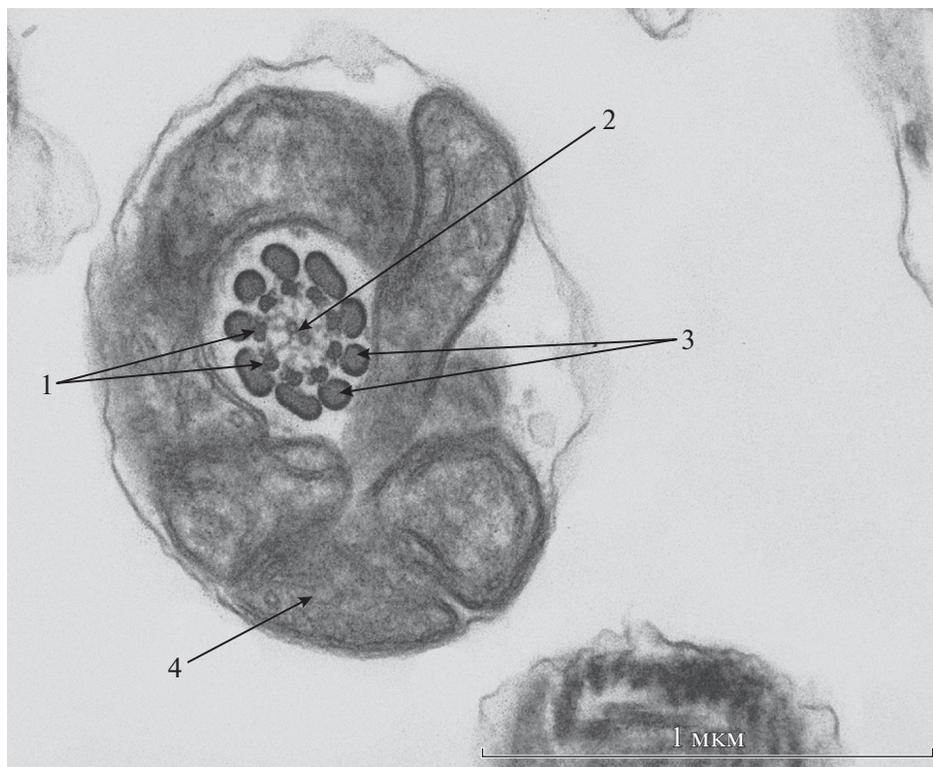


Рис. 3. Поперечный срез через средний отдел жгутика сперматозоида. 1 – периферические дуплеты микротрубочек аксонемы. От дуплетов микротрубочек по часовой стрелке отходят динеиновые ручки. 2 – центральная пара микротрубочек, 3 – наружные плотные фибриллы, 4 – митохондрии.

крепления жгутика и к формированию ацефалических сперматозоидов (Yuan et al., 2015). Продолжением сегментированных колонн являются окружающие аксонему наружные плотные фибриллы (НПФ). НПФ окружают аксонему в среднем отделе жгутика (рис. 3), одна фибрилла над каждым периферическим дуплетом микротрубочек. Основной белок НПФ – белок ODF1. Недавно показано, что, основываясь на его структуре, и, особенно, на структуре его α -кристаллинового домена, этот белок можно отнести к белкам теплового шока HSPB10 (Fontaine et al., 2003). У мышей, гетерозиготных по инактивирующей мутации *Odf1*, снижена подвижность сперматозоидов. Гомозиготные по этой мутации мыши стерильны из-за нарушенного прикрепления жгутика к головке (Yang et al., 2012).

В процессе спермиогенеза при элиминации большого количества цитоплазмы вместе с остаточными тельцами происходит редукция количества митохондрий (Kerr, 1991). В зрелом сперматозоиде с небольшим количеством цитоплазмы остается до 75 митохондрий, которые расположены по спирали вокруг наружных плотных фибрилл и аксонемы (рис. 3) (Ho, Wey, 2007). Количество витков спирали – 11–13, 2 митохондрии на

один виток (Zamboni, 1991). Длина митохондриальной спирали и примерное количество витков постоянно внутри вида (Olson, Winfrey, 1992).

Структура митохондриальной спирали устойчива благодаря так называемой “митохондриальной капсуле” – наружная митохондриальная мембрана покрыта кератиновыми молекулами, образующими дисульфидные мостики между цистеин- и пролин-обогащенными участками селенопротеинов (Ursini et al., 1999).

Многочисленные исследования выявляют влияние активных функциональных митохондрий на фертилизационную способность сперматозоидов. Дефекты ультраструктуры митохондрий ассоциированы со сниженной подвижностью сперматозоидов (Mundy et al., 1995; Pelliccione et al., 2011). Имеются противоречивые данные относительно роли мутаций мтДНК. С одной стороны, есть данные о связи делеций мтДНК с нарушением функций сперматозоидов и бесплодием (St-John et al., 2005). Однако для некоторых мтДНК это различие не подтверждалось при использовании *rtPCR* (Amaral et al., 2007).

При попадании в женские половые пути сперматозоиды не способны распознать путь к яйцеклетке. Перед оплодотворением они должны под-

вернуться процессу созревания — капацитации. Этот процесс позволяет представить на поверхности сперматозоидов комплекс рецепторов к прозрачной оболочке (*zona pellucida*) оболочки яйцеклетки (Reid et al., 2011). Кроме того, капацитация связана с высоко специализированной формой подвижности — гиперактивацией. Гиперактивация — специфическая форма движения жгутика, при котором планарное симметричное движение сменяется ассиметричным биением. Гиперактивация позволяет сперматозоиду не прикрепляться к эпителию женских половых путей и проникать через оболочку ооцита при оплодотворении (Suarez, 2008).

Процесс капацитации начинается с митохондрий и зависит от низкого уровня активных форм кислорода (АФК), производимого сперматозоидами (Koppers et al., 2008) и/или NADPH оксидазой плазматической мембраны типа Nox5 (Musset et al., 2012). Полученный супероксид соединяется с оксидом нитрита, в результате получаются реактивные виды азота — пероксинитриты (ONOO⁻). Эти соединения супрессируют тирозинфосфатазу и активируют аденилатциклазу (Lewis, Aitken, 2011). Далее стимулируется каскад фосфорилирования тирозина и запускается капацитация.

АФК, генерируемые при капацитации, окисляют холестерол до формы оксихолестерол и индуцируют обратный транспорт оксихолестерола с клеточной поверхности (Boerke et al., 2013). Уменьшение холестерола на клеточной поверхности плазматической мембраны увеличивает текучесть мембран, что способствует слиянию мембраны сперматозоида и яйцеклетки при оплодотворении.

Непрерывная продукция АФК и нитритных радикалов в конце концов истощает метаболические возможности сперматозоида и происходит оксидативный стресс, который включает внутренний апоптотический каскад (Aitken, 2011). Сперматозоиды подвержены оксидативному стрессу, т.к. в их мембране содержится большое количество полиненасыщенных жирных кислот, особенно 22:6 докозагексаеновой кислоты (*docosahexaenoic acid*). Она чувствительна к свободным радикалам — получают пероксил (ROO[•]) и алкостил (RO[•]) — радикалы, которые для стабилизации отнимают протон у углерода. Результатом являются дополнительные липидные радикалы, которые сохраняются с формированием в конце малых молекул липидных альдегидов — 4-гидроксинонал (4HNE), акролеин и малондиальдегид. Эти электрофильные альдегиды включают генерацию АФК митохондриями (Aitken et al., 2012a). Активация АФК не связана с немедленным изменением мембранного потенциала митохондрий (Koppers et al., 2001), который меняется по-

том, по мере нарастания явлений старения клетки и потери жизнеспособности (Espinoza et al., 2009). Генерация АФК сперматозоидами включается оксидативным стрессом в самоподдерживающемся цикле, что делает затруднительным реверсию цикла. Есть прямая зависимость между наличием гидроксиналенала 4HNE и спонтанной способности митохондрий генерировать АФК. Таким образом, апоптоз — продукт АФК-индуцированной генерации АФК, как и в других клеточных системах (Zorov et al., 2000).

Апоптоз в гаметях включается не так, как в соматических клетках, где он служит контрольно-пропускным пунктом в клеточном цикле, а является формой запрограммированного старения сперматозоида. Биологический смысл апоптотической гибели сперматозоидов можно связать с тем, что они являются чужеродными клетками как в мужских, так и в женских половых путях, и, практически, все клетки, кроме одной, становятся “лишними” для выполнения биологической функции.

Вопрос о метаболизме митохондрий сперматозоидов остается предметом дискуссии. С одной стороны, общепринята точка зрения, что АТФ, вырабатываемые митохондриями, являются основным источником для работы динеинового мотора аксонемы (Alberts et al., 2008). С другой стороны, сторонники гипотезы компартиментализации считают, что основным источником энергии для движения жгутика являются гликолиз (Miki et al., 2004; Danshina et al., 2010; Nakamura et al., 2013). Противоречивые результаты экспериментов, предпринятых разными группами исследователей, на сегодняшний день не позволяют сделать однозначный вывод. Нельзя исключить, что основной функцией митохондрий является не энергетический метаболизм, а участие в фундаментальных окислительно-восстановительных процессах, определяющих фертилизационную способность и время жизни сперматозоида.

Периаксонемные структуры жгутика сперматозоида. Основной отдел жгутика

Средний и основной отделы жгутика разделены кольцевой перетяжкой, или кольцом (*annulus*) (рис. 4), которая выполняет барьерную функцию и не допускает диффузии молекул между средним и основным отделами жгутика (Kwitny et al., 2010).

Основной отдел расположен за средним отделом, это наиболее длинный отдел жгутика. В основном отделе жгутика митохондриальный слой не выявляется, и аксонему жгутика окружает другой цитоскелетный компонент жгутика — фиброзная оболочка (ФО). Две продольные колонны фиброз-

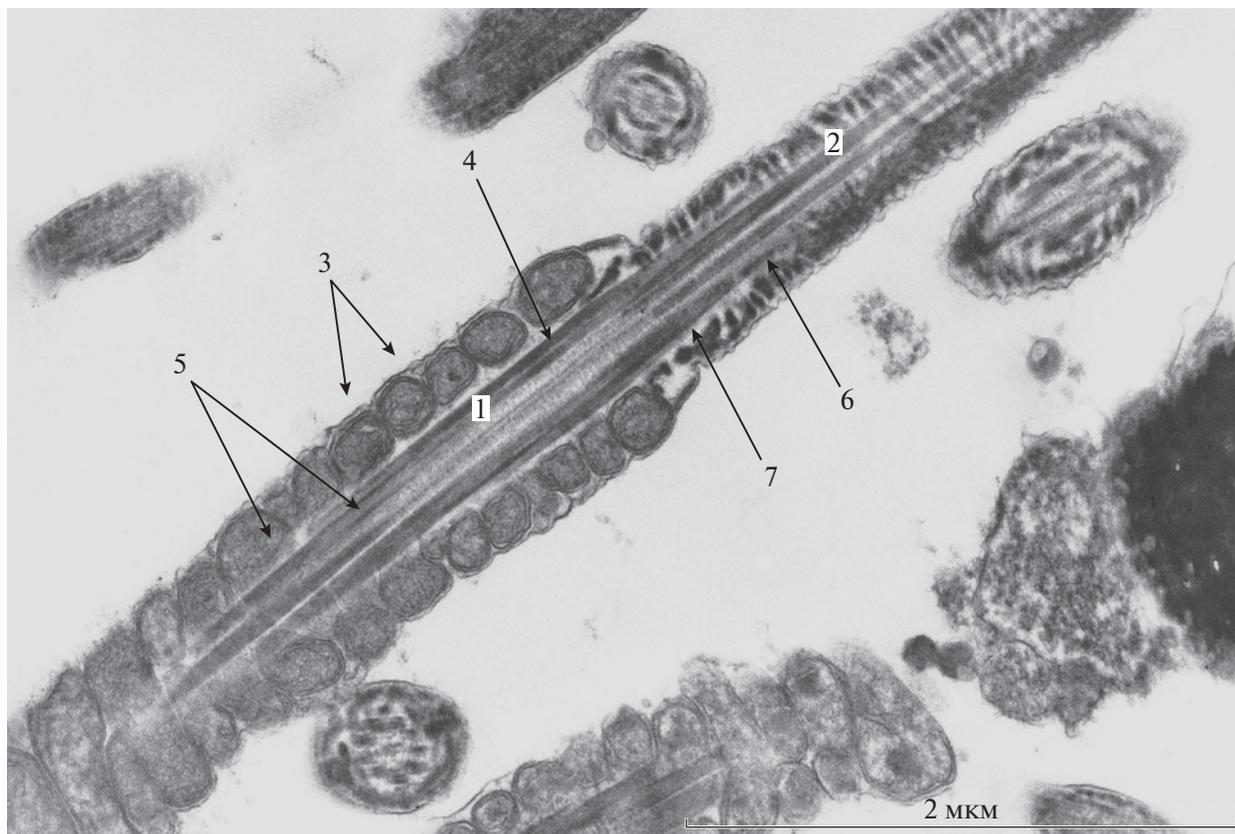


Рис. 4. Продольный срез через средний (1) и основной (2) отделы жгутика. 3 – митохондрии, 4 – аксонема, 5 – наружные плотные фибриллы, 6 – фиброзная оболочка, 7 – кольцевая перетяжка между средним и основным отделами жгутика (annulus).

ного слоя заменяют наружные плотные фибриллы № 3 и № 8 и соединяются между собой многочисленными поперечными кольцами (рис. 4, 5) (Брагина, Абдумаликов, 2002).

В ФО выявлено 18 полипептидов (Око, 2001), которые служат каркасом для гликолитических ферментов и являются сигнальными молекулами при индукции подвижности (см. обзор Eddy et al., 2003). Белки АКАР4 (A kinase anchoring protein) и АКАР3 являются основными компонентами ФС, вероятно, формируя интегральную часть их цитоскелетной структуры (Eddy et al., 2003). АКАР3 и АКАР4 связаны друг с другом и прикрепляются к цАМФ-зависимой протеин киназе А через регуляторную единицу киназы. Гены, кодирующие АКАР3 и АКАР4, секвенированы, идентифицированы участки связывания (Mandal et al., 1999). Мышиный гомолог АКАР4 (мАКАР4) и, по-видимому, АКАР4 человека, локализован в поперечных кольцах и продольных колоннах ФО (Johnson et al., 1997). Наоборот, АКАР3 локализован в поперечных кольцах (но не в продольных колоннах) ФС (Mandal et al., 1999). Идентифици-

рованы также ТАКАР 80, Rho-связывающий белок, рофиллин и роппорин (Eddy et al., 2003).

В основном отделе жгутика локализованы ферменты гликолиза – спермоспецифическая гексокиназа 1 (Travis et al., 1998), лактатдегидрогеназа (Beyler et al., 1985) и спермоспецифическая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФДс). Нарушение экспрессии ГАФДс приводит к серьезным нарушениям подвижности сперматозоидов, блокируя их поступательное движение (Welch et al., 2000). У трансгенных мышей, лишенных гена ГАФДс, уровень АТФ составляет всего 10% от уровня АТФ в сперматозоидах мышей дикого типа, несмотря на то, что уровень потребления кислорода митохондриями остается неизменным (Miki et al., 2004). Данные результаты позволяют предположить, что в процессе гликолиза генерируется большая часть энергии, необходимой для энергообеспечения подвижности сперматозоидов млекопитающих (Mikai, Okuno, 2004).

В соматических клетках глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) локализована в цитоплазме: в сперматозоидах ГАФДс, напротив, прочно связана с белками ФС, как и ряд других

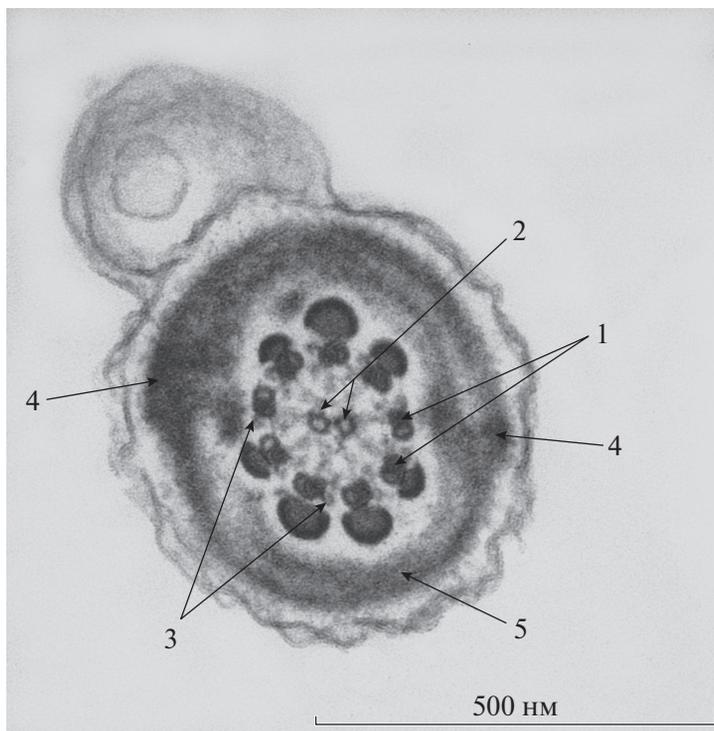


Рис. 5. Поперечный срез через основной отдел жгутика. 1 – периферические дуплеты микротрубочек, 2 – центральная пара микротрубочек, 3 – динеиновые ручки, 4 – вертикальные колонны фиброзной оболочки, 5 – поперечные ребра фиброзной оболочки.

гликолитических ферментов (Krisfalusi et al., 2006). Иммуноцитохимическим методом было показано, что ГАФДс локализована в поперечных кольцах ФС (Tani et al., 2007). Структура ГАФДс существенно отличается от структуры цитоплазматического фермента ГАФД. Основное отличие связано с присутствием на N-конце ГАФДс дополнительной последовательности из 72 (у человека) аминокислотных остатков (Welch et al., 2000). Данная последовательность содержит много гидрофобных остатков (23 остатка пролина и 9 остатков валина), которые обеспечивают гидрофобные взаимодействия с белками ФС, а также один цистеиновый остаток (в положении 21), который, возможно, образует ковалентную связь с белками ФС (Щуцкая и соавт., 2008).

НАРУШЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ И АНОМАЛИИ СТРУКТУРЫ ЖГУТИКА

Функциональные нарушения

Сложная согласованная система компонентов жгутика обеспечивает движение сперматозоида, необходимое для достижения им яйцеклетки и оплодотворения. Любые нарушения структуры

приводят к соответствующему нарушению подвижности.

Наиболее распространенной является “функциональная” форма астенозооспермии. При этом наблюдают многообразные гетерогенные изменения ультраструктуры аксонемы и периаксонемных структур – изменение количества и расположения дуплетов микротрубочек (Collodel et al., 2009), изменение формы наружных плотных фибрилл или архитектуры фиброзной оболочки (Escalier, 2003). Количественные изменения и нарушения локализации митохондрий также описаны в связи с астенозооспермией (Rawe et al., 2007). В эякуляте фертильных мужчин содержание сперматозоидов с аномалиями структуры аксонемы не превышает 30%, с атипией фиброзной оболочки и наружных плотных фибрилл – 10% (Брагина, Бочарова, 2014; Bartoov et al., 1994). Описано нарушение ультраструктуры аксонемы жгутиков у наркоманов (El-Shoura et al., 1995). В то же время показано, что курение и алкоголь не влияют на ультраструктурные параметры зрелых сперматозоидов. Сниженное количество сперматозоидов у потребителей алкоголя и курящих мужчин позволяет предполагать наличие тестикулярной селекции (Collodel et al., 2010; Joo et al., 2012). Функциональная астенозооспермия может быть вторичным

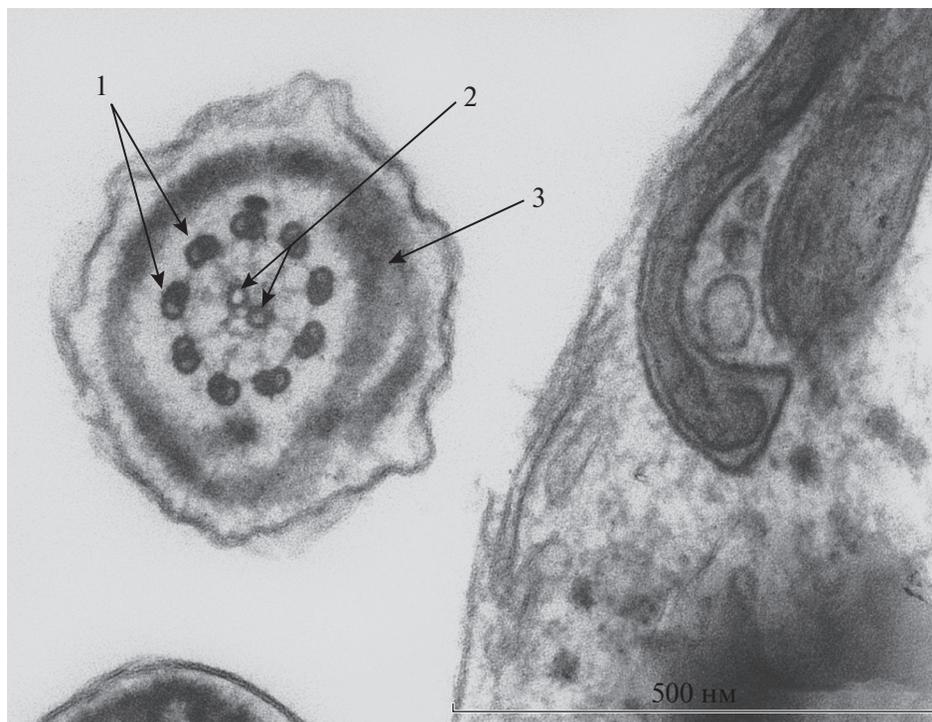


Рис. 6. Поперечный срез через основной отдел жгутика сперматозоида при первичной цилиарной дискинезии. 1 – периферические дуплеты микротрубочек аксонемы. Динеиновые ручки отсутствуют. 2 – центральная пара микротрубочек, 3 –фиброзная оболочка.

нарушением при варикоцеле, инфекционных заболеваниях органов репродуктивной системы, экзогенных воздействиях (Chemes, Rawe, 2003).

Генетически обусловленные нарушения подвижности. Первичная цилиарная дискинезия

Нарушение структуры аксонемы ресничек и жгутиков описано при цилиопатии, которая носит название “первичная цилиарная дискинезия” (ПЦД). Это аутосомно-рецессивное заболевание, отличающееся широкой генетической гетерогенностью. Основная форма патологии, описанная при ПЦД – бронхо-легочные заболевания респираторного тракта, связанные с инфицированием и бронхоэктазами из-за нарушения или полного отсутствия подвижности ресничек. У мужчин наблюдается снижение фертильности благодаря абсолютному отсутствию подвижности сперматозоидов или аномалиям эфферентных семявыносящих протоков с ресничным эпителием. У пациентов – частые головные боли из-за отсутствия ресничек в клетках желудочков мозга, что ведет к уменьшению циркуляции спинно-мозговой жидкости. Кроме того, у половины пациентов с ПЦД наблюдают изменение симметрии внутренних органов, правостороннее сердце (*situs inversus*). Возможной причиной является от-

сутствие подвижности ресничек в зародышевом узелке Гензена, который ответственен за однопавленное движение жидкости эмбриона (назад), что определяет право- и левостороннюю симметрию (Basu, Brueckner, 2008). Распространенность ПЦД 1/10000–1/20000 новорожденных (Katsuhara et al., 1972).

Исторически ПЦД впервые описана в 1904 г. как сочетание бронхоэктаз и *situs inversus*. В 1933 г. было описано заболевание, сочетающее *situs inversus*, бронхоэктазы и синуситы. Оно получило название синдром Картагенера по имени автора (Kartagener, 1933). Развитие методов электронной микроскопии позволило идентифицировать аномалии ультраструктуры аксонемы – отсутствие динеиновых ручек (рис. 6) либо центральной пары микротрубочек (Afzelius, 1988). В связи с новыми данными заболевание получило название “синдром неподвижных ресничек”. Афзелиус продемонстрировал связь мужского бесплодия в частой ассоциации с хроническими респираторными заболеваниями с генетически обусловленным дефицитом динеина аксонемы и, соответственно, с нарушением ее ультраструктуры. В 1988 г. Россман и Ньюхаус (Rossman, Newhouse, 1988), исходя из того, что часть ресничек и жгутиков может сохранять некоторую подвижность, предложили более общее название, отражающее цилиарную

природу заболевания – синдром первичной цилиарной дискинезии. Синдром Картагенера считается частным случаем ПЦД.

Традиционным тестом для выявления ПЦД долгое время служила электронная микроскопия. На светооптическом уровне сперматозоиды при ПЦД выглядят морфологически нормальными. В этом случае ТЭМ позволяет выявить отсутствие НДР и/или ВДР, отсутствие центральной пары МТ или радиальных спиц, изменение расположения МТ.

Излюбленным объектом для изучения молекулярной композиции аксонемы служит одноклеточная двужгутиковая водоросль рода *Chlamydomonas*. Удобство изучения этой модели обусловлено тем, что мейоз у *Chlamydomonas* происходит в зиготе непосредственно после оплодотворения и большую часть жизненного цикла она существует в гаплоидном состоянии, что облегчает исследование генов, кодирующих белки аксонемы. Исследование мутантных форм хламидомонады позволило получить материал о молекулярной архитектуре аксонемы, хотя некоторые белки и механизмы регуляции отличаются от таковых в сперматозоидах млекопитающих (Inaba, 2007). У *Chlamydomonas reinhardtii* определены более 200 белков аксонемы. С помощью 0-мутаций идентифицировано 25 локусов, участвующих в сборке аксонемы, и 52 локуса, нарушающих ее подвижность (Nakano et al., 2003).

Гены, кодирующие белки аксонемы, выявленные при изучении хламидомонады, являются кандидатными для ПЦД. С 1999 по 2011 гг. с помощью генетических подходов (исследование групп сцепления методом гомозиготного картирования), протеомного анализа и секвенирования (в основном секвенирования по Сэнгеру) было выявлено 16 мутаций [см. обзор Kurkowiak et al., 2015) кандидатных генов ПЦД. С 2011 г. благодаря использованию методов полноэкзомного и полногеномного секвенирования были описаны мутации еще в 18 генах. Большинство мутаций (85%) – это мутации, приводящие к потере функций белка (нонсенс-мутации, сдвиг рамки считывания, дефектный сплайсинг). Примерно 15% мутаций – это консервативные миссенс-мутации. Как упоминалось выше, ПЦД является генетически гетерогенным заболеванием. Мутации двух генов, *DNAI1* и *DNAH*, являются наиболее распространенными, однако большинство выявленных мутаций было обнаружено либо у одного конкретного пациента, либо в пределах одной семьи.

Гены *DNAI1* и *DNAH5* кодируют белки НДР. Первый идентифицирован в 1999 г. (Pennarun et al., 1999). Этот ген кодирует промежуточную динеиновую цепь I. Большинство мутаций *DNAI1* ло-

кализовано в 13, 16 и 17 экзонах и в 1 интроне, обнаружены у 14% пациентов с ПЦД (Zariwala et al., 2006). Другой идентифицированный ген *DNAH5* описан при использовании гомозиготного картирования и анализа групп сцепления в семье с близкородственными браками (Omran et al., 2000). *DNAH5* кодирует тяжелую динеиновую цепочку 5, основной моторный белок НДР. Наиболее частые мутации – в экзонах 34, 50, 63, 76, 77. Мутации этого гена выявлены более чем у 25% пациентов с ПЦД (Hornef et al., 2006).

Более редко обнаружены мутации генов *DNAI2*, *DNAL1* и *TXNDC3* (Horváth et al., 2005; Loges et al., 2008). Выявлены мутации генов, кодирующих факторы сборки динеиновых ручек – *CCDC114* (прикрепление НДР к МТ А) (Knowles et al., 2013), *CCDC151* (комплекс прикрепления НДР) (Onoufriadis et al., 2013). Гены, кодирующие белки радиальных спиц *RSPH9* и *RSPH4A* были определены методом гомозиготного картирования в бедуинской семье при множественных близкородственных браках (Castleman et al., 2009). Фенотипически при ультраструктурном исследовании клеток дыхательного эпителия в ресничках были выявлены аномалии центральных МТ аксонемы. Мутация гена *RSPH4A* описана в Восточной европейской популяции (Ziętkiewicz et al., 2012). Мутация *RSPH1* встречается у пациентов с ПЦД при дефекте радиальных спиц и центральной пары МТ (Kott et al., 2013). Несколько мутаций обнаружено в белках, кодирующих нексинные мостики и *CCDC39* и *CCDC40* (Blanchon et al., 2011). Выявлены мутации в генах, контролирующих группу цитоплазматических белков (*DNAAF1/LRRC50*, *DNAAF2/KTU*, *DNAAF3*, *CCDC103*, *HEATR2*, *LRRC6* и *DYX1C1*), которые могут играть роль в предварительной сборке динеиновых ручек (Onoufriadis et al., 2013).

В построении аксонемы участвует около 200 белков. По-видимому, есть белки, общие для ресничек эпителиальных клеток и для жгутиков сперматозоидов. У пациентов, гомозиготных по мутациям этих генов, наблюдается полный набор симптомов первичной цилиарной дискинезии – бронхо-легочные заболевания, изменения симметрии внутренних органов, неподвижность сперматозоидов. Другие белки аксонемы являются тканеспецифичными, и мутации в кодирующих генах вызывает мозаичность симптомов цилиопатии. Мутации гена *DNAH1*, кодирующего тяжелую цепь I белка ВДР (сплайсинг-мутация в 73 интроне; мутация, разрушающая стоп-кодон экзона 78 и миссенс-мутация экзона 23), выявили Бен Келифа и соавт. (Ben Khelifa et al., 2014) у 20 пациентов с бесплодием и тотальной астенозооспермией при отсутствии симптомов бронхо-легочных заболева-

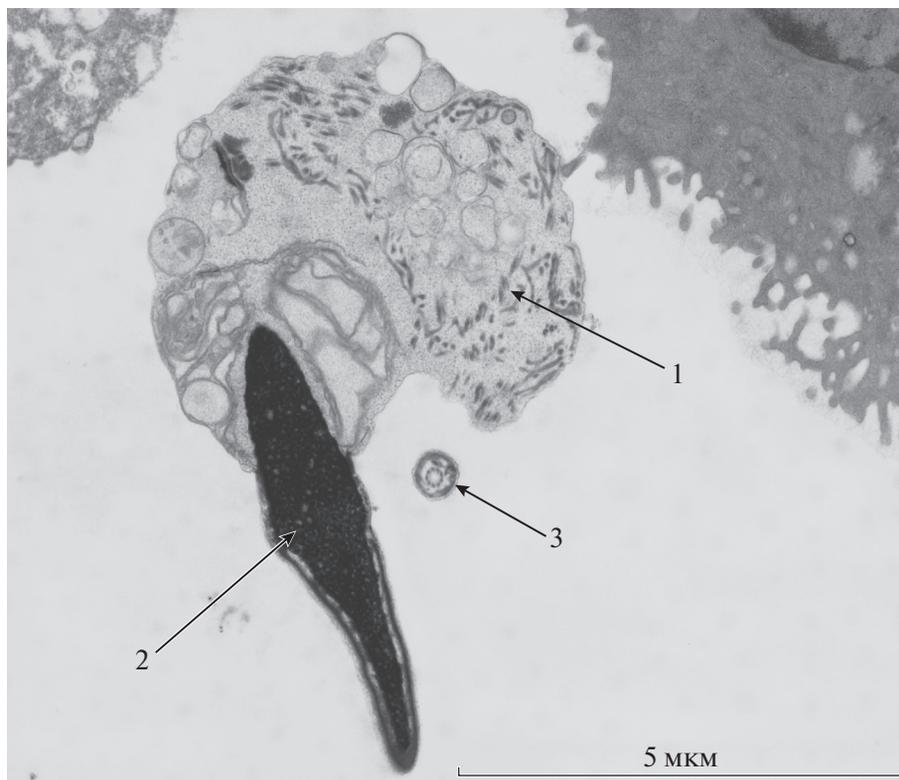


Рис. 7. Продольный срез через сперматозоид при дисплазии фиброзной оболочки. 1 — дезорганизованная фиброзная оболочка, 2 — головка сперматозоида, 3 — поперечный срез через жгутик. Заметно отсутствие центральной пары микротрубочек.

ний. Похожие данные получены на модельной системе — у мышей, нокаутных по гену *Mdhc7*, кодирующему две тяжелые цепи 7 динеина ВДР, выявлено снижение подвижности сперматозоидов и ультраструктурные аномалии, аналогичные установленным у человека (Neesen et al., 2001).

Дисплазия фиброзной оболочки

Название дисплазия ФО, предложенное Чемез и соавт. (Chemes et al., 1998), (другие названия — “обрубленный жгутик”, синдром укороченных жгутиков) отражает отсутствие или значительное снижение подвижности сперматозоидов, связанное с изменениями ФО (рис. 7) и диспластическим развитием жгутика во время спермиогенеза. Нарушение структуры ФО часто сочетается с другими аномалиями структуры жгутика — отсутствием центральной пары микротрубочек (рис. 8), нарушением структуры кольцевой перетяжки жгутика либо митохондрий (Sousa et al., 2015). Частые семейные случаи ДФО позволяют предполагать генетический характер заболевания с аутосомно-рецессивным характером наследования (Vaccetti et al., 2001; Moretti, Collodel, 2006).

ДФО была смоделирована на мышах прицельным разрушением гена *Akap4* — сперматозоиды животных имели укороченные и утолщенные жгутики, морфологически идентичные жгутикам пациентов с ДФО (Miki et al., 2002). Однако только в одном исследовании на человеке были получены подтверждающие результаты. Бачетти и соавт. (Vaccetti et al., 2005) с помощью ПЦР обнаружили внутригенную делецию генов *AKAP4* и *AKAP3*, основных структурных компонентов фиброзной оболочки у одного пациента с ДФО, но не смогли обнаружить аномалий в исследованных образцах других пациентов. Количественных и качественных отличий между содержанием *AKAP4* и *AKAP3* в фиброзной оболочке нормальных сперматозоидов и сперматозоидов с дисплазией фиброзной оболочки при тотальной астенозооспермии, так же, как изменений в соответствующих генах не нашли Тернер и соавт. (Turner et al., 2001).

Элькина и соавт. (Elkina et al., 2016) обнаружили снижение активности гликолитического фермента ГАФД и атипичную локализацию фермента в сперматозоидах 7 пациентов с ДФО. Авторы выявили мутацию гена *GAPDS* — замену аденина на гуанин в интроне между шестым и седьмым экзонами гена.

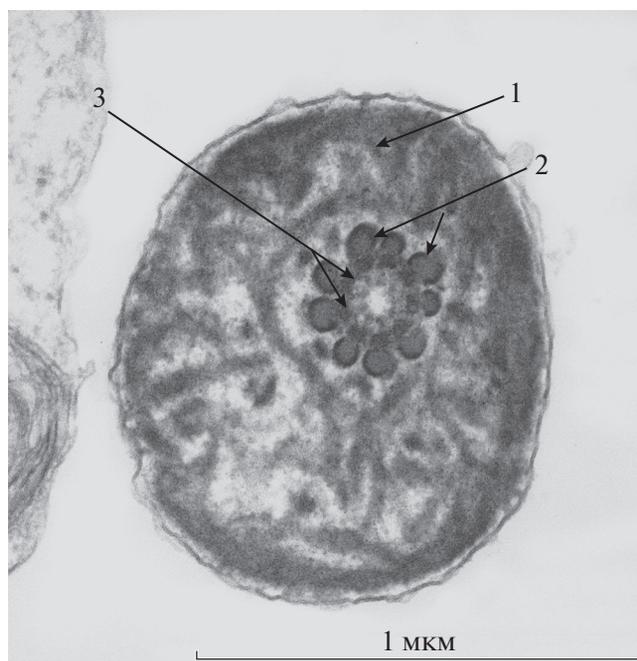


Рис. 8. Поперечный срез через жгутик сперматозоида при дисплазии фиброзной оболочки. 1 – дезорганизованная фиброзная оболочка жгутика, 2 – наружные плотные фибриллы, 3 – периферические микротрубочки аксономы. Отсутствует центральная пара микротрубочек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сложный комплекс, обеспечивающий подвижность сперматозоида и локализованный в жгутике, содержит примерно 400 белков, из которых в настоящее время идентифицированы далеко не все. Дефекты этой комплексной молекулярной системы приводят к выраженному нарушению подвижности сперматозоидов, и, следовательно, к снижению их фертилизационного потенциала. Разработка новой платформы для диагностики генетически обусловленных форм патозооспермии может быть связана с использованием транскриптома сперматозоидов (Bansal et al., 2015) и протеомного анализа (Shen et al., 2013). Рассматриваются перспективы использования микрочипов для анализа транскриптомов в качестве биомаркеров для исследования синдромных форм патозооспермии (Lima-Souza et al., 2012).

Аксонема и периаксонемные структуры жгутиков – инвариантные органеллы, т.е. любое нарушение морфологии приводит к нарушению функции, что практически ликвидирует фертилизационный потенциал сперматозоидов *in vivo*. Мужчины с выраженной астенозооспермией до развития вспомогательных репродуктивных технологий практически не имели шанса получить потомство. Метод интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ) позволяет оплодотворять яйцеклетку неподвижными сперматозоидами. Первые результаты были опубли-

кованы в 1992 г. группой Брюссельских эмбриологов (Palermo et al., 1992). В настоящий момент в поиске по PubMed с ключевым словом ICSI обнаруживается более 5000 публикаций, в том числе многочисленные работы о генетическом риске этой процедуры. Развитие методов преимплантационной диагностики, в том числе неинвазивных, позволяет минимизировать риск наследования хромосомных аномалий. Уже известно, что дети, рожденные после ИКСИ, отличаются по ряду параметров от естественно рожденных, но чаще всего это связывается со здоровьем родителей (Fauser et al., 2014).

Последствия применения ИКСИ при генетически обусловленных формах спермопатологии, таких, как ПЦД и ДФО, практически не известны в силу редкости как самой патологии, так и успешного рождения детей при использовании в ИКСИ сперматозоидов этих пациентов (около 20 опубликованных случаев, по версии PubMed). Ранее, до эры ИКСИ, эти пациенты не получали потомство в силу естественных причин. Заболевание наследуется как аутосомно-рецессивные, для проявления симптомов необходимо наличие двух мутантных аллелей гена, что делает опасность прямого наследования ПЦД не очень демонстративной. Это снижает риск заболевания у детей, полученных после ВРТ/ИКСИ, но увеличивает вероятность накопления мутаций в популяции, что, соответственно, увеличивает вероят-

ность гомозиготности по мутированным генам для отдаленных потомков (Ferlin et al., 2006; Serebrovska et al., 2006).

Следует отметить, что генетическая консультация не всегда применяется перед ИКСИ. Предполагаемые родители, не понимая генетического риска для своего еще не рожденного ребенка, не могут принять ответственное решение. Среди решений может быть такое, как отказ от применения репродуктивных технологий, применение других способов стать родителями. Ответственность за высокий риск рождения ребенка с генетическими аномалиями касается не только родителей, но и всего общества.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А. Руководство по сперматологии. М.: Сорек-полиграфия, 2002. 108 с.
- Брагина Е.Е., Бочарова Е.Н. Количественное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия // Андрология и генитальная хирургия. 2014. № 1. С. 54–63.
- Быков В.А. Сперматогенез у мужчин в конце XX века // Пробл. репрод. 2000. Т. 1. № 6. С. 12–20.
- Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 208 с.
- Щуцкая Ю.Ю., Элькина Ю.Л., Куравский М.Л. и др. Исследование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 228–236.
- Afzelius B. A human syndrome caused by immotile cilia // Science. 1988. V. 193. P. 317–319.
- Aitken R.J. The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function // Biol. Reprod. 2011. V. 85. P. 9–12.
- Aitken R.J., Gibb Z., Mitchell L.A. et al. 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. 2012a. V. 87. P. 110–121.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell, 5th edn. New York: Garland Publishing, 2008.
- Amaral A., Ramalho-Santos J., St-John J.C. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm // Hum. Reprod. 2007. V. 22. P. 1585–1596.
- Baccetti B., Capitani S., Collodel G. et al. Genetic sperm defects and consanguinity // Hum. Reprod. 2001. V. 16. P. 1365–1371.
- Baccetti B., Collodel G., Estenoz M. et al. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia // Hum. Reprod. 2005. V. 20. P. 2790–2794.
- Bansal S.K., Gupta N., Sankhwar S.N. et al. Differential genes expression between fertile and infertile spermatozoa revealed by transcriptome analysis // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0127007.
- Barthoov B., Eltes F., Pansky M. et al. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses // Hum. Reprod. 1994. V. 9. P. 2069–2075.
- Basu B., Brueckner M. Cilia multifunctional organelles at the center of vertebrate left–right asymmetry // Curr. Top. Dev. Biol. 2008. V. 85. P. 115–117.
- Ben-Khelifa M., Coutton C., Zouari R. et al. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella // Am. J. Hum. Genet. 2014. V. 94. P. 95–104.
- Beyler S.A., Wheat T.E., Goldberg E. Binding of antibodies against antigenic domains of murine lactate dehydrogenase-C4 to human and mouse spermatozoa // Biol. Reprod. 1985. V. 2. P. 1201–1210.
- Blanchon S., Legendre M., Copin B. et al. Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary ciliary dyskinesia // J. Med. Genet. 2011. V. 49. P. 410–416.
- Boerke A., Brouwers J.F., Olkkonen V.M. et al. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during *in vitro* fertilization // Biol. Reprod. 2013. V. 88. P. 21–39.
- Brokaw C.J. Control of flagellar bending: a new agenda based on dynein diversity // Cell Motil. Cytoskeleton. 1994. V. 28. P. 199–204.
- Casey D.M., Inaba K., Pazour G.J. et al. DC3, the 21-kDa subunit of the outer dynein arm-docking complex (ODA-DC), is a novel EF-hand protein important for assembly of both the outer arm and the ODA-DC // Mol. Biol. Cell. 2003. V. 14. P. 3650–3663.
- Castleman V.H., Romio L., Chodhari R. et al. Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause PCD with central-microtubular-pair abnormalities // AJHG. 2009. V. 84. P. 197–209.
- Chemes H.E., Alvarez-Sedo C. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail // Asian J. Androl. 2012. V. 14. P. 14–23.
- Chemes H.E., Olmedo S.B., Carrere C. et al. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men // Hum. Reprod. 1998. V. 13. P. 2521–2526.
- Chemes H.E., Rawe V.Y. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men // Hum. Reprod. Update. 2003. V. 9. P. 405–428.
- Collodel G., Capitani S., Pammolli A. et al. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study // J. Androl. 2010. V. 31. P. 108–113.
- Collodel G., Pascarelli N.A., Moretti E. The role of transmission electron microscopy analysis in different cases of reduced motility in human spermatozoa // In Abreu T., Silva G. Eds. Cell Movement: New Research Trends. Nova Science Publishers, 2009. P. 265–294.
- Danshina P.V., Geyer C.B., Dai Q.S. et al. Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and

- male fertility in mice // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82. P. 136–145.
- DiBella L.M., Gorbatyuk O., Sakato M. et al.* Differential light chain assembly influences outer arm dynein motor function // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. P. 5661–5674.
- Eddy E.M., Toshimori K., O'Brien D.A.* Fibrous sheath of mammalian spermatozoa // *Microsc. Res. Tech.* 2003. V. 61. P. 103–115.
- El-Shoura S.M., Abdel-Aziz M., Ali M.E. et al.* Deleterious effects of khat addiction on semen parameters and sperm ultrastructure // *Hum. Reprod.* 1995. V. 10. P. 2295–2300.
- Elkina Yu.L., Kuravsky M.L., Bragina E.E. et al.* Mutation in the intron of GAPDS gene in patients with fibrous sheath dysplasia of the sperm flagellum // *Andrology.* 2016. in press.
- Escalier D.* New insights into the assembly of the periaxonemal structures in mammalian spermatozoa // *Biol. Reprod.* 2003. V. 69. P. 373–378.
- Espinoza J.A., Paasch U., Villegas J.V.* Mitochondrial membrane potential disruption pattern in human sperm // *Hum. Reprod.* 2009. V. 24. P. 2079–2085.
- Fausser J.M., Devroey P., Diedrich K. et al.* Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature // *Reprod. Biomed. Online.* 2014. V. 28. P. 162–182.
- Fawcett D.W.* The mammalian spermatozoon // *Dev. Biol.* 1975. V. 44. P. 394–436.
- Ferlin A., Arredi B., Foresta C.* Genetic causes of male infertility // *Reprod. Toxicol.* 2006. V. 22. P. 133–141.
- Fontaine J.M., Rest J.S., Welsh M.J. et al.* The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins // *Cell Stress Chaperones.* 2003. V. 8. P. 62–69.
- Ho H.C., Suarez S.S.* Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation // *Reproduction.* 2001. V. 122. P. 519–526.
- Ho H.C., Wey S.* Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis // *Microsc. Res. Tech.* 2007. V. 70. P. 719–723.
- Hornef N., Olbrich H., Horvath J. et al.* DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2006. V. 174. P. 120–126.
- Horváth J., Fliegauf M., Olbrich H. et al.* Identification and analysis of axonemal dynein light chain 1 in primary ciliary dyskinesia patients // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2005. V. 33. P. 41–47.
- Ikeda K., Yamamoto R., Wirschell M. et al.* A novel ankyrin-repeat protein interacts with the regulatory proteins of inner arm dynein f (I1) of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2009. V. 66. P. 448–456.
- Inaba K.* Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling // *Zool. Sci.* 2003. V. 20. P. 1043–1056.
- Inaba K.* Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. V. 1101. P. 506–526.
- Inaba K.* Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components // *Mol. Hum. Reprod.* 2011. V. 17. P. 524–538.
- Ishikawa T., Sakakibara H., Oiwa K.* The architecture of outer dynein arms *in situ* // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 368. P. 1249–1258.
- Itoh A., Inaba K., Ohtake H. et al.* Characterization of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003. V. 305. P. 855–861.
- Johnson L., Foster J.A., Haig-Ladewig L. et al.* Assembly of AKAP82, a protein kinase A anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm // *Dev. Biol.* 1997. V. 192. P. 340–350.
- Joo K.J., Kwon Y.W., Myung S.C. et al.* The effects of smoking and alcohol intake on sperm quality: light and transmission electron microscopy findings // *J. Int. Med. Res.* 2012. V. 40. P. 2327–2335.
- Kagami O., Takada S., Kamiya R.* Microtubule translocation caused by three subspecies of inner-arm dynein from *Chlamydomonas* flagella // *FEBS Lett.* 1990. V. 264. P. 179–182.
- Kamiya R.* Functional diversity of axonemal dyneins as studied in *Chlamydomonas* mutants // *Int. Rev. Cytol.* 2002. V. 219. P. 115–155.
- Kartagener M.* Zur Pathogenese der Bronchiektasien: Bronchiektasien bei Situs viscerum inversus // *Beitr. Klin. Tuberk.* 1933. Bd. 83. P. 489–501.
- Katsuhara K., Kawamoto S., Wakabayashi T. et al.* Situs inversus totalis and Kartagener's syndrome in a Japanese population // *Chest.* 1972. V. 61. P. 56–61.
- Kerr J.B.* Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis // *J. Electron Microsc. Tech.* 1991. V. 19. P. 215–240.
- Knowles M.R., Leigh M.W., Ostrowski L.E. et al.* Genetic disorders of mucociliary clearance consortium. Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. V. 92. P. 99–106.
- Konno A., Shiba K., Cai C. et al.* Branchial cilia and sperm flagella recruit distinct axonemal components // *PLoS One.* 2015. P. 10.
- Koppers A.J., DeIulius D.N., Finnie J.M. et al.* Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. P. 3199–3207.
- Koppers A.J., Mitchell L.A., Wang P. et al.* Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa // *Biochem. J.* 2001. V. 436. P. 687–698.
- Kott E., Legendre M., Copin B. et al.* Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. V. 93. P. 561–570.
- Krisfalusi M., Miki K., Magyar P.L. et al.* Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa // *Biol. Reprod.* 2006. V. 75. P. 270–278.
- Kurkowiak M., Ziętkiewicz E., Witt M.* Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics // *J. Med. Genet.* 2015. V. 52. P. 1–9.
- Kwitny S., Klaus A.V., Hunnicutt G.R.* The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82. P. 669–678.

- Lewis B., Aitken R.J. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa // *J. Androl.* 2011. V. 22. P. 611–622.
- Lima-Souza A., Anton E., Mao S. et al. A platform for evaluating sperm RNA biomarkers: dysplasia of the fibrous sheath-testing the concept // *Fertil. Steril.* 2012. V. 97. P. 1061–1066.
- Linck R., Fu X., Lin J. et al. (2014) Insights into the structure and function of ciliary and flagellar doublet microtubules: tektins, Ca²⁺-binding proteins, and stable protofilaments // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 17427–17444.
- Loges N.T., Olbrich H., Fenske L. et al. DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. V. 83. P. 547–558.
- Manda A.S., Naaby-Hansen M.J., Wolkowicz K. et al. FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa // *Biol. Reprod.* 1999. V. 61. P. 1184–1197.
- Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen // *Asian J. Androl.* 2010. V. 12. P. 47–58.
- Mikai C., Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. P. 540–547.
- Miki K., Qu W., Goulding E.H. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004. V. 101. P. 16501–16506.
- Miki K., Willis W.D., Brown P.R. et al. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility // *Dev. Biol.* 2002. V. 248. P. 331–342.
- Moretti E., Collodel G. Electron microscopy in the study of human sperm pathologies // *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*. Méndez-Vilas A. Ed. Formatex, 2012. P. 343–351.
- Moretti E., Collodel G. Three cases of genetic defects affecting sperm tail: a FISH study // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 2006. V. 38. P. 137–141.
- Movassagh T., Bui K.H., Sakakibara H. et al. Nucleotide-induced global conformational changes of flagellar dynein arms revealed by in situ analysis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 761–767.
- Mundy A.J., Ryder T.A., Edmonds D.K. Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece // *Hum. Reprod.* 1995. V. 10. P. 116–119.
- Musset B., Clark R.A., DeCoursey T.E. et al. NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 9376–9388.
- Nakamura N., Dai Q., Williams J. et al. Disruption of a spermatogenic cell-specific mouse enolase 4 (eno4) gene causes sperm structural defects and male infertility // *Biol. Reprod.* 2013. V. 88. P. 90–102.
- Nakano I., Kobayashi T., Yoshimura M. et al. Central-pair-linked regulation of microtubule sliding by calcium in flagellar axonemes // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 1627–1636.
- Neesen J., Kirschner R., Ochs M. et al. Disruption of an inner arm dynein heavy chain gene results in asthenozoospermia and reduced ciliary beat frequency // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. P. 1117–1128.
- Oko R. Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa // *Biol. Reprod.* 2001. V. 39. P. 169–182.
- Olson G.E., Winfrey V.P. Structural organization of surface domains of sperm mitochondria // *Mol. Reprod. Dev.* 1992. V. 1. P. 89–98.
- Omran H., Häffner K., Völkel A. et al. Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia on chromosome 5p and identification of the heavy dynein chain DNAH5 as a candidate gene // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000. V. 23. P. 696–702.
- Onoufriadis A., Paff T., Antony D. et al. UK10K, Pals G, Mitchison HM Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene CCDC114 cause primary ciliary dyskinesia // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. V. 92. P. 88–98.
- Palermo G., Joris H., Devroey P. et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte // *Lancet.* 1992. V. 340. P. 17–18.
- Pelliccione F., Micillo A., Cordeschi G. et al. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia // *Fertil. Steril.* 2011. V. 95. P. 641–646.
- Pennarun G., Escudier E., Chapelin C. et al. Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 65. P. 1508–1519.
- Rawe V.Y., Hermes R., Nodar F.N. et al. Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia // *Fertil. Steril.* 2007. V. 88. P. 649–653.
- Reid A.T., Redgrove K., Aitken R.J. et al. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction // *Asian J. Androl.* 2011. V. 13. P. 88–96.
- Rossmann C.M., Newhouse M.T. Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management // *Pediatr. Pulmonol.* 1988. V. 5. P. 36–50.
- Schmidt H., Gleave E., Carter A. Insights into dynein motor domain function from a 3.3-Å crystal structure // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. P. 492–497.
- Serebrovska Z.A., Serebrovska T.V., Pyle R.L. et al. Transmission of male infertility and intracytoplasmic sperm injection (mini-review) // *Fiziol. Zh.* 2006. V. 52. P. 110–118.
- Shen S., Wang J., Liang J. et al. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia // *World J. Urol.* 2013. V. 31. P. 1395–1401.
- Sousa M., Oliveira E., Alves Â. et al. Ultrastructural analysis of five patients with total sperm immotility // *Zygote.* 2015. V. 23. P. 900–907.
- St-John J.C., Jokhi R.P., Barratt C.L. The impact of mitochondrial genetics on male infertility // *Int. J. Androl.* 2005. V. 28. P. 65–73.
- Suarez S.S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. V. 52. P. 455–462.
- Sui H., Downing K.H. Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography // *Nature.* 2006. V. 442. P. 475–478.

- Takada S., Kamiya R.* Functional reconstitution of Chlamydomonas outer dynein arms from alpha-beta and gamma subunits: requirement of a third factor // *J. Cell Biol.* 1994. V. 126. P. 737–745.
- Tanii I., Yagura T., Inagaki N. et al.* Preferential localization of rat GAPDS on the ribs of fibrous sheath of sperm flagellum and its expression during flagellar formation // *Acta Histochem. Cytochem.* 2007. V. 40. P. 19–26.
- Travis A.J., Foster J.A., Rosenbaum N.A. et al.* Targeting of a germ cell-specific hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa // *Mol. Biol. Cell.* 1998. V. 9. P. 263–276.
- Turner R.M., Musse M.P., Mandal A. et al.* Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath // *J. Androl.* 2001. V. 22. P. 302–315.
- Ursini F., Heim S., Kiess M. et al.* Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation // *Science.* 1999. V. 285. P. 1393–1396.
- Wargo M.J., Smith E.F.* Asymmetry of the central apparatus defines the location of active microtubule sliding in Chlamydomonas flagella // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. V. 100. P. 137–142.
- Welch J.E., Brown P.L., O'Brien D.A. et al.* Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells // *J. Androl.* 2000. V. 21. P. 328–338.
- Wirschell M., Yang C., Yang P. et al.* IC97 is a novel intermediate chain of II dynein that interacts with tubulin and regulates interdoublesliding // *Mol. Biol. Cell.* 2009. V. 20. P. 3044–3054.
- World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research.* WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. Geneva, 2010. 271 p.
- Yamamoto R., Yanagisawa H.A., Yagi T. et al.* Novel 44-kilodalton subunit of axonemal dynein conserved from Chlamydomonas to mammals // *Eukaryot. Cell.* 2008. V. 7. P. 154–161.
- Yang K., Meinhardt A., Zhang B. et al.* The small heat shock protein ODF1/HSPB10 is essential for tight linkage of sperm head to tail and male fertility in mice // *Mol. Cell Biol.* 2012. V. 32. P. 216–225.
- Yang P., Diener D.R., Yang C. et al.* Radial spoke proteins of Chlamydomonas flagella // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. P. 1165–1174.
- Yuan S., Stratton C.J., Bao J. et al.* Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head-tail junction // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. P. 430–439.
- Zamboni L.* Physiology and pathology of the human spermatozoon: the role of electron microscopy // *J. Electron Microsc. Tech.* 1991. V. 7. P. 412–436.
- Zariwala M.A., Leigh M.W., Ceppa F. et al.* Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2006. V. 174. P. 858–866.
- Ziętkiewicz E., Bukowy-Bierytło Z., Voelkel K. et al.* Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e33667.
- Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O. et al.* Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // *J. Exp. Med.* 2000. V. 192. P. 1001–1014.

Genetically Determined and Functional Human Sperm Motility Decrease

E. E. Bragina, E. A. Arifulin, and E. P. Senchenkov

*Department of Electron Microscopy, Belozersky Institute of Physicochemical Biology,
Moscow State University, Leninskye gory 1, Moscow, 119992 Russia*

e-mail: bragor@mail.ru

Received January 9, 2016; in final form, January 29, 2016

Motility – the most important property of mammalian sperm required for fertilization. Axoneme and axoneme surrounding tail components are the morphological substrate of sperm motility. Quantitative research methods of human spermatozoa motility allowed to define the normative parameters for fertile men. Exogenous factors, and, rarely, genetic defects may cause by a significant reduction in sperm motility. Axonemal anomalies (absence of external and/or internal dynein arms, central pair of microtubules absence) may be the cause of primary ciliary dyskinesia (PCD). PCD – severe systemic disease in which the reduction of sperm motility – just one symptom. Dysplasia of the fibrous sheath (DFO) is also genetically determined sperm motility decrease. DAI and the DFO – multigene diseases are inherited in an autosomal recessive manner. Modern molecular biological research methods are used to identify candidate genes. Assisted reproduction technologies allow men suffering PCD and DFO to get offspring. PCD and DFO symptoms appear in homozygote. Children born after ART have the probability of being mutation carriers. We do not have the completed information about etiological factor of genetically determined spermpathology. So we can't assess the genetic risk degree. However, it should consider the possibility of mutations accumulation, that can be a risk factor for distant offspring.

Keywords: sperm motility, primary ciliary dyskinesia, sperm tail ultrastructure