

УДК 575.224.22

DOI: 10.18522/2308-9709-2025-53-4

Анализ ассоциации полиморфизма гена *ATP8A1* с патозооспермией

Яровая Е.В.¹, Шерчкова Т.А.², Машкина Е.В.¹

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

²ООО «Наука», Ростов-на-Дону, Россия

344090, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, Академия биологии и медицины им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, lenmash@mail.ru

Аннотация

В качестве возможных генетических причин формирования патозооспермии можно рассматривать полиморфизм генов, белковые продукты которых вовлечены в процессы сперматогенеза, формирования функционально зрелой структуры сперматозоидов. Важной особенностью функционально активных клеток является асимметричность липидного бислоя клеточных мембран. Флиппаза *ATP8A1* ответственна за перемещение фосфатидилсерина во внутренний липидный слой. Появление фосфатидилсерина во внешнем слое является одним из маркеров апоптоза. Целью работы было изучить ассоциацию rs2290870 гена *ATP8A1* с развитием патозооспермии у мужчин. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из эякулята 143 неродственных мужчин репродуктивного возраста. По результатам спермиологического анализа образцы эякулята были разделены на 3 группы: нормозооспермия, тератозооспермия, олигоастенотератозооспермия. Показано, что в группе с нормозооспермией у мужчин, гетерозиготных по rs2290870 гена *ATP8A1*, статистически значимо снижена доля сперматозоидов с быстрым поступательным движением. Подобная закономерность выявлена и для группы с олигоастенотератозооспермией. Мужчины с олигоастенотератозооспермией, гетерозиготные по rs2290870 гена *ATP8A1*, характеризуются и наименьшим числом

сперматозоидов с нормальной морфологией. Для них же характерна и наименьшая частота жизнеспособных сперматозоидов.

Ключевые слова: патозооспермия, ATP8A1, полиморфизм гена

Analysis of the association of *ATP8A1* gene polymorphism with pathozoospermia

Yarovaya E.V., Sherchkova T.A., Mashkina E.V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Polymorphisms in genes whose protein products are involved in spermatogenesis, the structure of functionally mature spermatozoa formation, can be considered as possible genetic causes of pathozoospermia. An important feature of functionally active cells is the asymmetry of the lipid bilayer of cell membranes. Flippase ATP8A1 is responsible for the translocation of phosphatidylserine to the inner lipid bilayer. The appearance of phosphatidylserine in the outer layer is one of the markers of apoptosis. The aim of this study was to investigate the association of rs2290870 of the *ATP8A1* gene with the development of pathozoospermia in men. DNA was isolated from the ejaculate of 143 unrelated men of reproductive age. Based on the results of spermiological analysis, the samples were divided into three groups: normozoospermia, teratozoospermia, and oligoasthenoteratozoospermia. It was shown that in the normozoospermia group, men heterozygous for rs2290870 of the *ATP8A1* had a statistically significantly reduced proportion of sperm cells with fast progressive motility. A similar pattern was found for the group with oligoasthenoteratozoospermia. Men with oligoasthenoteratozoospermia, heterozygous for rs2290870 of the *ATP8A1*, are characterized by the lowest number of spermatozoa's with normal morphology. They also have the lowest frequency of viable sperm cells.

Keywords: pathozoospermia, ATP8A1, gene polymorphism

Введение

Патозооспермия как комплекс патологических изменений в показателях спермограммы является проявлением на уровне эякулята нарушений репродуктивной функции мужчины. Причины развития патозооспермии многообразны и включают влияние как экзогенных, так и эндогенных факторов. Уменьшение количества сперматозоидов, ухудшение их качества может быть обусловлено нарушением генетического контроля сперматогенеза и/или апоптоза. Изменение спектра фосфолипидов в наружном слое липидов плазматической мембраны является одним из сигнальных механизмов реализации апоптоза поврежденных или патологических клеток.

Эукариотические клетки характеризуются асимметричным распределением липидов в бислое плазматической мембраны, а также мембранах органелл (эндоплазматический ретикулум, транс-сеть аппарата Гольджи, эндосомы). Фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин локализируются во внутреннем липидном слое плазматической мембраны, тогда как фосфатидилхолин, сфингомиелин – во внешнем слое (Balasubramanian, Schroit, 2003). Асимметричное распределение липидов важно для целого ряда клеточных процессов, в том числе образования везикул, клеточной сигнализации, межклеточных взаимодействий (Clarke, Hossain, Cao, 2020). Появление фосфатидилсерина во внешнем слое липидов важно для активации тромбоцитов (Zwaal, Comfurius, Bevers, 2004), трофобластического межклеточного слияния (Das et al., 2004), капацитации сперматозоидов (Gadella, Harrison, 2002; De Vries, 2003), а также выявляется при оплодотворении яйцеклетки мышей (Curia et al., 2013). Однако показано, что потеря асимметрии распределения фосфатидилсерина и его появление во внешнем липидном слое также ассоциировано с процессами апоптоза (Fadok et al., 1992).

Асимметричность липидного бислоя является результатом функционирования флиппаз. АТФ-зависимые фосфолипидные транслоказы (флиппазы) обеспечивают мобилизацию специфических фосфолипидов во внутреннем или внешнем липидном слое (Mark, Elferink, Paulusma, 2013; Takada et al., 2018). Инактивация флиппаз нарушает липидную асимметрию.

Флиппазу АТР8А1 рассматривают как наиболее изученный кандидат на роль фосфолипидной флиппазы, которая стимулирует перемещение фосфатидилсерина во

Яровая Е. В., Шерчкова Т. А., Машкина Е. В., Анализ ассоциации полиморфизма гена АТР8А1 с патозооспермией // «Живые и биокосные системы». – 2025. – № 53; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-53/article-4>; DOI: 10.18522/2308-9709-2025-53-4

внутренний липидный слой (Coleman, Quazi, Molday, 2013; Andersen et al., 2016). Функционирование данного белка важно для поддержания асимметрии мембран, формирования внутриклеточных везикул и везикулярного транспорта, что играет ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза.

Целью исследования было изучить ассоциацию rs2290870 гена *ATP8A1* с развитием патозооспермии у мужчин.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенные из эякулята 143 неродственных мужчин репродуктивного возраста. По результатам спермиологического анализа образцы эякулята были разделены на 3 группы:

- нормозооспермия – 51 образец;
- тератозооспермия – 54 образца;
- олигоастенотератозооспермия – 38 образцов.

Анализ спермограмм был проведен на базе клинико-диагностической лаборатории «Наука» (Ростов-на-Дону). Сбор образцов эякулята был осуществлен в 2022 - 2024 гг. От каждого мужчины было получено информированное согласие об участии в научных исследованиях. Исследование выполнено с соблюдением этических принципов проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов.

ДНК из клеток эякулята выделяли сорбентным методом с использованием реагентов «ДНК-сорб-АМ» (АмплиСенс, Россия).

Анализ однонуклеотидной замены rs2290870 гена *ATP8A1* проводили методом аллель-специфичной амплификации с использованием реагентов SNP-экспресс (Литех, Россия). Продукты амплификации разделяли с помощью горизонтального электрофореза в 2,5% агарозном геле.

Оценка соответствия частот генотипов равновесию по закону Харди-Вайнберга была осуществлена путем сравнения наблюдаемых частот генотипов с ожидаемыми частотами генотипов. Сравнение частот аллелей и генотипов по исследуемому SNP в контрольной группе и группах мужчин с патозооспермией проводили с помощью критерия χ^2 .

Статистический анализ количественных показателей спермограммы проводили, используя t-критерий Стьюдента. Приведенные в таблицах данные представляют собой средние значения \pm ошибка стандартного отклонения. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Основные спермиологические показатели исследуемых групп образцов эякулята представлены в таблице 1. Средний возраст мужчин трех исследуемых групп одинаков – 35 – 36 лет. Индивидуальный возраст пациентов в группах находился в диапазоне 25 - 48 лет. Не выявлено отличий между группами и по таким показателям спермограммы как значение рН эякулята и общий объем эякулята (табл. 1).

Результаты анализа общего количества сперматозоидов в эякуляте и их концентрации в 1 мл показывают, что данные показатели статистически значимо снижены у мужчин с тератозооспермией и комплексной патозооспермией (табл. 1). В образцах эякулята из группы контроля (нормозооспермия) количество сперматозоидов в 3 раза больше, чем в группе с совокупностью патологий и в 1,4 раза больше, чем в группе пациентов с тератозооспермией.

Таблица 1 – Спермиологические показатели эякулята мужчин трех исследуемых групп

Группы Параметры	Нормозооспермия	Тератозооспермия		Олигоастенотератозооспермия		
			p1	p1	p1	p2
Возраст, лет	36,4 \pm 1,08	36,0 \pm 1,01	0,8	35,3 \pm 0,96	0,46	
Объем эякулята, мл	3,9 \pm 0,25	4,1 \pm 0,26	0,57	3,6 \pm 0,24	0,38	
рН	7,7 \pm 0,20	7,7 \pm 0,02	0,28	7,7 \pm 0,02	0,93	
Концентрация сперматозоидов в 1 мл, млн/мл	90,9 \pm 6,90	59,2 \pm 4,40	0,0003	32,9 \pm 4,0	<0,0001	<0,0001
Общее количество сперматозоидов в эякуляте, млн.	321,6 \pm 25,10	230,6 \pm 23,60	0,01	105,3 \pm 12,30	<0,0001	<0,0001
Доля сперматозоидов с быстрым поступательным движением, %	38,3 \pm 1,20	31,5 \pm 1,10	0,0002	8,4 \pm 1,20	<0,0001	<0,0001

Доля сперматозоидов с нормальной морфологией, %	46,3 ± 0,60	42 ± 0,60	<0,0001	23,1 ± 1,50	<0,0001	<0,0001
Жизнеспособных сперматозоидов, %	76,9 ± 0,80	71,7 ± 0,80	<0,0001	52,7 ± 1,60	<0,0001	<0,0001

Примечание: p1 – сравнение с группой «нормозооспермия»; p2 – сравнение между группами «тератозооспермия» и «олигоастенотератозооспермия».

При этом снижается не только количество мужских половых клеток, но и их качество. Если в группе нормозооспермии доля жизнеспособных сперматозоидов практически достигает 77%, то в случае тератозооспермии и олигоастенотератозооспермии жизнеспособными являются 71,7% и 52,7% гаплоидных клеток соответственно (табл. 1).

Доля сперматозоидов с быстрым поступательным движением в группе с совокупностью патологий мужских половых клеток в 4,5 раза ниже, чем в группе с нормозооспермией. Процент сперматозоидов, имеющих нормальную морфологию, в группах с нормозооспермией и тератозооспермией составил 46,3 ± 0,60 и 42,0 ± 0,60 соответственно, что в 2 раза больше, чем в группе с олигоастенотератозооспермией (табл. 1).

Частоты генотипов и аллелей по полиморфизму rs2290870 гена *ATP8A1* представлены в таблице 2. Во всех исследуемых группах преобладают гомозиготы по аллели *A*. Распределение частот генотипов и аллелей в группах с патозооспермией не отличается от такового в группе с нормозооспермией (табл. 2).

Таблица 2 – Частоты генотипов (абс., (%)) и аллелей по rs2290870 гена *ATP8A1* в исследуемых группах мужчин

Группы Параметры	Нормозооспермия	Тератозооспермия		Олигоастенотератозооспермия		
		p1 (χ^2 (p))		p1 (χ^2 (p)) p2 (χ^2 (p))		
<i>AA</i>	28 (54,9)	28 (51,9)	0,1 (0,95)	21 (55,3)	0,04 (0,98)	0,17 (0,92)
<i>AG</i>	17 (33,3)	19 (35,2)		13 (34,2)		
<i>GG</i>	6 (11,8)	7 (13,0)		4 (10,5)		
PXB, (χ^2 (p))	0,9 (0,34)	0,79 (0,37)		0,31 (0,58)		
Аллель <i>A</i>	0,72	0,69		0,72		

Аллель <i>G</i>	0,28	0,31	0,11 (0,74)	0,28	0,01 (0,91)	0,18 (0,67)
-----------------	------	------	----------------	------	----------------	----------------

Примечание: p1 – сравнение с группой «нормозооспермия»; p2 – сравнение между группами «тератозооспермия» и «олигоастенотератозооспермия»; РХВ – равновесие по Харди-Вайнбергу.

Установлено, что в группе с нормозооспермией у мужчин, гетерозиготных по rs2290870 гена *ATP8A1*, статистически значимо снижена доля сперматозоидов с быстрым поступательным движением по сравнению с обоими вариантами гомозиготного генотипа (табл. 3). Подобная закономерность выявлена и для группы с олигоастенотератозооспермией.

Таблица 3 – Доля сперматозоидов (%) с быстрым поступательным движением в зависимости от генотипа по rs2290870 гена *ATP8A1* в исследуемых группах мужчин

Генотип	Нормозооспермия	Тератозооспермия	Олигоастенотератозооспермия
<i>AA</i>	39,9 ± 1,61	30,7 ± 1,31	6,9 ± 2,44
<i>AG</i>	33,7 ± 2,05*	30,3 ± 1,99	1,5 ± 1,07*
<i>GG</i>	41,2 ± 2,68	29,0 ± 2,64	2,2 ± 2,25

Примечание: * - статистически значимое отличие по сравнению с показателем для генотипа *AA*

Мужчины с олигоастенотератозооспермией, гетерозиготные по rs2290870 гена *ATP8A1*, характеризуются и наименьшим числом сперматозоидов с нормальной морфологией (табл. 4). Для них же характерна и наименьшая частота жизнеспособных сперматозоидов (табл. 5).

Таблица 4 – Доля сперматозоидов (%) с нормальной морфологией в зависимости от генотипа по rs2290870 гена *ATP8A1* в исследуемых группах мужчин

Генотип	Нормозооспермия	Тератозооспермия	Олигоастенотератозооспермия
<i>AA</i>	46,7 ± 0,75	42,0 ± 0,65	20,8 ± 2,73
<i>AG</i>	45,7 ± 0,86	40,9 ± 1,04	9,3 ± 3,18*

GG	45,0 ± 2,29	42,0 ± 1,13	17,2 ± 5,22
----	-------------	-------------	-------------

Примечание: * - статистически значимое отличие по сравнению с показателем для генотипа AA

В группе с тератозооспермией не выявлено зависимости количественных показателей эякулята от генотипа по полиморфизму rs2290870 гена *ATP8A1* (табл. 3 – 5).

Таблица 5 – Доля жизнеспособных сперматозоидов (%) в зависимости от генотипа по rs2290870 гена *ATP8A1* в исследуемых группах мужчин

Генотип	Нормозооспермия	Тератозооспермия	Олигоастенотератозооспермия
AA	77,1 ± 1,19	71,7 ± 0,92	52,1 ± 3,05
AG	75,9 ± 1,23	72,5 ± 1,39	38,1 ± 4,09*
GG	78,6 ± 2,93	71,1 ± 1,96	39,8 ± 15,48

Примечание: * - статистически значимое отличие по сравнению с показателем для генотипа AA

Ген *ATP8A1* содержит 37 экзонов и охватывает 244 т.п.н., локализуется в коротком плече 4-й хромосомы. Эффект интронной замены -216A>G (rs2290870) в гене *ATP8A1* на молекулярном уровне не изучен. Есть данные литературы об ассоциации данной замены с риском развития азооспермии (Aston et al., 2009).

Флиппаза ATP8A1, создавая асимметричное распределение липидов в бислой мембран, играет существенную роль в образовании внутриклеточных везикул и, таким образом, в везикул-опосредованном транспорте белковых молекул (Uchida et al., 2011; Matsudaira et al., 2017; Rocognoni et al., 2024; Lan et al., 2025). Потеря или изменение функциональной активности флиппаз могут оказывать влияние на организацию мембран транс-цистерн аппарата Гольджи и, следовательно, процесс формирования акросомы в клетках – предшественниках сперматозоидов.

Флиппаза ATP8A1 является белком, который наиболее прочно взаимодействует с IFT27 (Yap et al., 2021). Белок IFT27 (внутрижгутиковый транспортер 27) является одним из регуляторов спермиогенеза и фертильности самцов у мышей. Нокаут гена данного белка у мышей приводит к значительному снижению количества сперматозоидов; нарушению их подвижности. При этом было показано, что большинство сперматозоидов утратили структуру аксонемы (9 + 2) (Zhang et al., 2017).

То есть IFT27 играет важную роль в образовании жгутиков и обеспечении подвижности сперматозоидов. Таким образом, можно предположить, что эффект мутаций в гене *ATP8A1* опосредуется через изменения в функционировании других белковых молекул, например, IFT27.

На основании полученных данных мы предполагаем, что молекулярным механизмом выявленного эффекта полиморфизма rs2290870 может быть нарушение сплайсинга или экспрессии гена *ATP8A1*. Это приводит к дисфункции флиппазы, что может негативно сказываться на критических для сперматогенеза процессах, включая акросомогенез и сборку аксонемы жгутика, потенциально через нарушение кооперации с такими партнерами, как IFT27. Для верификации предложенного механизма необходимы дальнейшие экспериментальные исследования.

Заключение

Установлено, что гетерозиготность по rs2290870 гена *ATP8A1* ассоциирована со снижением доли жизнеспособных сперматозоидов с нормальной морфологией, способных к быстрому поступательному движению при олигоастенотератозооспермии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018

Литература

Andersen J.P., Vestergaard A.L., Mikkelsen S.A., Mogensen L.S., Chalal M., Molday R.S. P4-ATPases as phospholipid flippases-structure, function, and enigmas // *Front Physiol.* – 2016. – V. 7. – P. 275.

Aston K.I., Carrell D.T. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia // *Journal of andrology.* – 2009. – V. 30. – №. 6. – P. 711-725.

Balasubramanian K., Schroit A.J. Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death // *Annu Rev Physiol.* -2003. V. 65(1). P. 701-734.

Clarke R.J., Hossain K.R., Cao K. Physiological roles of transverse lipid asymmetry of animal membranes // *Biochim. Et Biophys. Acta-Biomembr.* – 2020. -1862: 183382.

Яровая Е. В., Шерчкова Т. А., Машкина Е. В., Анализ ассоциации полиморфизма гена *ATP8A1* с патозооспермией // «Живые и биокосные системы». – 2025. – № 53; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-53/article-4>; DOI: 10.18522/2308-9709-2025-53-4

Coleman J.A., Quazi F., Molday R.S. Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport // *Biochim Biophys Acta.* - 2013. – V. 1831 (3). – P. 555-574.

Curia C.A., Ernesto J.I., Stein P., Busso D., Schultz R.M., Cuasnicu P.S., Cohen D.J. Fertilization induces a transient exposure of phosphatidylserine in mouse eggs // *PLoS One.* – 2013. – V. 8(8). - e71995.

Das M., Xu B., Lin L., Chakrabarti S., Shivaswamy V., Rote N.S. Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWo model of human villous cytotrophoblast // *Placenta.* – 2004. – V. 25 (5). – P. 396-407.

De Vries K.J., Wiedmer T., Sims P.J., Gadella B.M. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells // *Biol Reprod.* – 2003. – V. 68. – P. 2122–2134.

Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // *J Immunol.* – 1992. – V. 148. – P. 2207–2216.

Gadella B.M., Harrison R.A. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells // *Biol Reprod.* – 2002. – V. 67. – P. 340–350.

Lan Z., Tian Y., Li C., Wang Y., Yi P., Zhang R. ATP8A1-translocated endosomal phosphatidylserine fine-tunes the multivesicular body formation and the endo-lysosomal traffic // *iScience.* – 2025. – V. 28 (3). – P. 111973.

Mark V., Elferink R., Paulusma C.C. P4 ATPases: Flippases in Health and Disease // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – P. 7897–7922.

Matsudaira T., Mukai K., Noguchi T., et al. Endosomal phosphatidylserine is critical for the YAP signalling pathway in proliferating cells // *Nat Commun.* – 2017. – V. 8 (1). - P. 1246.

Pocognoni C.A., Nawara T., Bhatt J.M., Lee E., Jian X., Randazzo P., Sztul E. The lipid flippase ATP8A1 regulates the recruitment of ARF effectors to the trans-Golgi Network // *Arch Biochem Biophys.* – 2024. – V. 758. – P. 110049.

Takada N., Naito T., Inoue T., Nakayama K., Takatsu H., Shin H.W. Phospholipid-flipping activity of P4-ATPase drives membrane curvature // *EMBO J.* – 2018. – V. 37. - e97705.

Uchida Y., Hasegawa J., Chinnapen D., et al. Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. – V. 108 (38). – P. 15846-15851.

Yap Y.T., Li Y.H., Li W., Banerjee P., Zhang Z. ATP8a1, an IFT27 binding partner, is dispensable for spermatogenesis and male fertility // *Mol Reprod Dev.* – 2021. – V. 88 (5). – P. 371-375.

Zhang Y., Liu H., Li W., Zhang Z., Shang X., Zhang D., Li Y., Zhang S., Liu J., Hess R.A., Pazour G.J., Zhang Z. Intraflagellar transporter protein (IFT27), an IFT25 binding partner, is essential for male fertility and spermiogenesis in mice // *Dev Biol.* - 2017. – V. 432 (1). – P. 125-139.

Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids // *Biochim Biophys Acta.*- 2004. – V. 1636 (2-3). – P. 119-28.

Статья поступила в редакцию 4 сентября 2025 г.

Поступила после доработки 12 сентября 2025 г.

Принята к печати 14 сентября 2025 г.

Received September 4, 2025

Revised September 12, 2025

Accepted September 14, 2025