

Активация ооцитов: фундаментальные и клинические аспекты

Ю.Ю.Громенко¹, Э.Ф.Галимова², Д.Д.Громенко², К.Ш.Галимов³, К.В.Булыгин^{3,4}, Ш.Н.Галимов²

¹Медицинский центр «Семья», Уфа, Российская Федерация;

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Российская Федерация;

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация;

⁴Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Оплодотворение и эмбриогенез у млекопитающих инициируются последовательностью молекулярных событий, которая получила название «активация ооцитов». Этот процесс включает серию характерных колебаний ионов кальция в клетке при участии специфической фосфолипазы C ζ , фермента сперматозоидов, вводимого в ооплазму при слиянии гамет и признанного в качестве основного фактора, ответственного за индукцию активации ооцитов. Большое количество биохимических и клинических доказательств подтверждает роль фосфолипазы C ζ в этом фундаментальном процессе, что имеет большое значение для диагностики и лечения бесплодия. В обзоре представлены сведения об особенностях строения, механизма действия и регуляции активности фермента в норме и патологии. Показано, что дефицит активации ооцитов связан с аномалиями в структуре, экспрессии и характере локализации фермента в сперматозоидах. Искусственная активация ооцитов с помощью ионофоров, которая представляет собой единственный терапевтический вариант, доступный в настоящее время при ее недостаточности, является предметом дискуссий, особенно в отношении потенциального эпигенетического воздействия на эмбрион. Поэтому оправдан интерес к созданию и применению человеческого рекомбинантного белка фосфолипазы C ζ в качестве альтернативной формы терапии. Обсуждаются возможности диагностического и клинического применения фермента для преодоления мужского бесплодия при дефиците активации ооцитов, а также более общих случаев этой патологии.

Ключевые слова: активация ооцитов, бесплодие, ионы кальция, фосфолипаза C ζ

Для цитирования: Громенко Ю.Ю., Галимова Э.Ф., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Булыгин К.В., Галимов Ш.Н. Активация ооцитов: фундаментальные и клинические аспекты. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2020; 19(5): 77–85. DOI: 10.20953/1726-1678-2020-5-77-85

Oocyte activation: fundamental and clinical aspects

Yu.Yu.Gromenko¹, E.F.Galimova², D.D.Gromenko², K.Sh.Galimov³, K.V.Bulygin^{3,4}, Sh.N.Galimov²

¹Medical Center 'Family', Ufa, Russian Federation;

²Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

³I.M.Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

⁴M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Fertilization and embryogenesis in mammals are initiated by a series of molecular events called 'oocyte activation.' This process includes a number of specific fluctuations of calcium ions in the cell with the involvement of specific phospholipase C ζ (PLC ζ), an enzyme of spermatozoa introduced into the ooplasm during gamete fusion and recognized as the main factor responsible for inducing oocyte activation. Substantial biochemical and clinical evidence supports the role of PLC ζ in this fundamental process, which is very important for the diagnosis and treatment of infertility. This literature review aims to provide some insight in the structure, mechanism of action, and regulation of PLC ζ activity in healthy individuals and people with pathological conditions. Oocyte activation deficiency is associated with abnormalities in the structure, expression, and location of this enzyme in spermatozoa. Artificial activation of oocytes using ionophores, which is the only therapeutic option currently available for patients with its insufficiency, is being debated, especially in terms of its potential epigenetic effects on the embryo. Therefore, interest towards the development of human recombinant PLC ζ as an alternative treatment is understandable. Researchers are currently discussing the possibility of diagnostic and clinical application of this enzyme to overcome male infertility associated with oocyte activation deficiency, as well as general aspects of this pathology.

Key words: oocyte activation, infertility, calcium ions, phospholipase C ζ

For citation: Gromenko Yu.Yu., Galimova E.F., Gromenko D.D., Galimov K.Sh., Bulygin K.V., Galimov Sh.N. Oocyte activation: fundamental and clinical aspects. Vopr. ginek. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology). 2020; 19(5): 77–85. (In Russian). DOI: 10.20953/1726-1678-2020-5-77-85

Для корреспонденции:

Громенко Юлия Юрьевна, кандидат медицинских наук, главный врач Медицинского центра «Семья»

Адрес: 450075, Уфа, пр-т Октября, 73/1

Телефон: (347) 246-1020

E-mail: info@medufa.ru

Статья поступила 02.12.2019 г., принята к печати 26.10.2020 г.

For correspondence:

Yulia Yu. Gromenko, MD, PhD, Head Physician, Medical Center «Family»

Address: 73/1 Oktyabrya ave., Ufa, 450075, Russian Federation

Phone: (347) 246-1020

E-mail: info@medufa.ru

The article was received 02.12.2019, accepted for publication 26.10.2020

Бесплодие является одной из фундаментальных проблем современного здравоохранения: по различным оценкам, каждая шестая-седьмая супружеская пара проходит курс лечения, часто с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), использование которых растет в геометрической прогрессии [1, 2]. В 2018 г. исполнилось 40 лет Луизе Браун, первому человеку, рожденному благодаря применению экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Создание и внедрение этой относительно простой процедуры стало важнейшим этапом разработки революционных инноваций в области биомедицины, таких как технологии стволовых клеток и регенеративной медицины, клонирование и трансгенные технологии, преимплантационная генетическая диагностика и редактирование генов для нокаута патогенных мутаций в эмбрионах [3, 4]. Перспективы в этой области очень многообещающие и могут стать основой для прогресса в лечении тяжелой патологии, такой как рак, ожирение, диабет, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания.

Наряду с несомненными достижениями следует признать, что лечение бесплодия по-прежнему сталкивается с многочисленными проблемами, в частности, с низкой частотой наступления беременности и повторными неудачами имплантации. Этому могут способствовать многие факторы, большинство которых обусловлены характером процесса размножения и оплодотворения человека, поэтому вероятность наступления беременности за цикл составляет менее 20% у здоровых пар [5].

Ежегодно в мире рождается более 400 000 детей в результате проведения 1,6 млн циклов ВРТ [3, 6]. Из-за кардинальных изменений в образе жизни общества, в особенности из-за заключения браков в зрелом возрасте и, соответственно, позднего наступления первой беременности и более частого деторождения после четвертого десятилетия жизни, потребность во ВРТ и стоимость лечения бесплодия растут во всем мире.

Экспансия ВРТ сопряжена с широким спектром медико-социальных, биологических, этических, юридических и иных проблем [7–10]. Настоящий обзор посвящен анализу литературы по одному из наиболее сложных аспектов репродуктивной биологии и медицины, ассоциированному с тонкими механизмами оплодотворения, а именно с активацией ооцитов (АО), которая рассматривается в качестве центрального звена в последовательности молекулярных событий при взаимодействии гамет [11, 12]. Особое внимание к этому процессу обусловлено тем, что его патология является частой причиной отсутствия оплодотворения при ВРТ, особенно при выполнении процедуры интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ) [13–15].

Механизмы активации ооцитов

Размножение млекопитающих включает в себя согласованное высвобождение и слияние мужских и женских гамет путем оплодотворения, которое опосредуется рядом сложных клеточных программ, превращающих объединенные яйцеклетку и сперматозоид в тотипотентный эмбрион. После созревания ооциты млекопитающих останавливаются в развитии на этапе метафазы второго мейотического деления (MII) после исключения первого полярного тела, прошед-

шего первое мейотическое деление в яичнике [16]. Ослабление блока MII является предпосылкой для последующего эмбриогенеза, происходящего либо во время, либо сразу после слияния гамет. Этот процесс, наряду с серией синхронизированных одновременных событий, включая, но не ограничиваясь ими, экзоцитоз кортикальных гранул, предотвращение полиспермии и развитие пронуклеусов, в совокупности называют «активацией ооцитов» [17, 18].

Для всех изученных на сегодняшний день типов оплодотворения характерна инициация повышения уровня внутриклеточной концентрации свободного кальция (Ca^{2+}) в ооците, хотя в некоторых случаях, например, у *Drosophila melanogaster*, активация может происходить до оплодотворения [19]. В яйцеклетках некоторых позвоночных, таких как иглокожие, лягушки и рыбы, происходит однократное изменение концентрации Ca^{2+} , в то время как у млекопитающих и некоторых морских беспозвоночных наблюдается серия повторяющихся колебаний ионов кальция. Примечательно, что временные закономерности уровня Ca^{2+} являются видоспецифичными с уникальными закономерностями амплитуды, длительности и частоты [20, 21]. Однако, независимо от характеристик, осцилляции кальция являются обязательным условием АО. Предотвращение спайков Ca при добавлении хелаторов ингибирует активацию и эмбриогенез, в то время как микроинъекции Ca^{2+} запускают эмбриональное развитие до стадии бластоцисты [22, 23].

Пульсации ионов кальция в ооцитах млекопитающих являются прямым следствием их высвобождения из внутриклеточных депо, опосредованного инозитолтрифосфатом (ИФ-3) [24]. Блокирование, снижение уровня или аффинности рецепторов ИФ-3 в ооцитах млекопитающих ингибировало колебания Ca^{2+} и собственно процесс АО, в то время как увеличение концентрации цитозольного ИФ-3 является постоянным признаком оплодотворения, что также подтверждает важность инозитолфосфат-опосредованного пути скачков содержания кальция.

Ооциты млекопитающих очень чувствительны к точному профилю осцилляции Ca^{2+} , возникающему при оплодотворении. Характер этих колебаний влияет на ранние профили экспрессии эмбриональных белков, а также определяет образование бластоцисты и успех трансплантации эмбрионов [18, 25]. Изменение амплитуды и частоты спайков кальция сопровождалось изменениями скорости прогрессирования клеточного цикла ооцитов. Учитывая, что скорость прогрессирования клеточного цикла зиготы человека после оплодотворения предлагается в качестве показателя оптимального эмбриогенеза [26], характер осцилляции Ca^{2+} при АО может иметь большое значение для последующих эмбриогенных событий.

Факторы активации ооцитов

Происхождение и химическая природа факторов, ответственных за мобилизацию кальция в ооцитах, являются предметом оживленной дискуссии. Имеются многочисленные доказательства, подтверждающие наличие в сперме биологически активных соединений, способных индуцировать высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо после диффузии в яйцеклетку [27, 28].

Действительно, инъекция цитозольных экстрактов сперматозоидов в ооциты млекопитающих вызывает длительную серию колебаний Ca^{2+} , идентичных тем, которые наблюдаются при оплодотворении и приводят к успешному возобновлению клеточного цикла и эмбриогенезу. Данные наблюдения справедливы для широкого разнообразия видов [29]. Более того, успешное применение интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов, которая исключает большинство клеточных режимов трансдукции Ca^{2+} , является дополнительным аргументом в поддержку гипотезы доминирующей роли спермальных индукторов.

Стимуляция фосфатидилинозитольного сигнального пути является ключевым компонентом изменений кальциевого гомеостаза, наблюдаемых при оплодотворении, когда внутриклеточный ИФ-3 генерируется гидролизом фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (ФИФ2) наряду с диацилглицеролом с помощью фосфолипазы C (ФЛС). ИФ-3 связывается с ИФ-3-рецептором на эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к высвобождению Ca^{2+} . Однако, хотя некоторые ооциты млекопитающих могут использовать альтернативные мишени, такие как рианодиновый рецептор, для дополнительного выброса Ca^{2+} , нет убедительных данных, свидетельствующих о физиологическом участии таких агентов, как рианодин, циклическая АДФ-рибоза или НАДФ, в активации ооцитов млекопитающих [20].

Одним из первых кандидатов на роль потенциального активатора ооцитов был белок с молекулярной массой 33 кДа (осциллоген), идентифицированный в экстрактах спермальных фракций, способных вызывать высвобождение Ca^{2+} [30]. Однако дальнейшие исследования показали его непричастность к этому процессу. В качестве альтернативы рассматривалась укороченная форма тирозинкиназного рецептора c-Kit – tr-kit, который индуцировал партеногенетическую активацию. Последующие исследования подтвердили, что tr-kit активировал фосфолипазу $\text{C}\gamma 1$ посредством фосфорилирования с помощью Src-подобной киназы Fyn, хотя эмпирические доказательства роли tr-kit в высвобождении Ca^{2+} остаются сомнительными [31].

Другим активно обсуждаемым претендентом на эту роль стал постакросомальный оболочечный белок, связывающий домен WW, так называемый PAWP, который опосредованно, через взаимодействие с yes-ассоциированным белком (YAP), активировал ооциты путем индукции фосфолипазы $\text{C}\gamma$ аналогично механизму, характерному для нейронов [32]. Микроинъекции рекомбинантного бычьего PAWP инициировали прогрессирование клеточного цикла в заблокированных на стадии MII ооцитах свиньи, крупного рогатого скота, макаки и Хепорус, о чем свидетельствовало образование пронуклеусов. Кроме того, рекомбинантный белок PAWP человека или комплементарная РНК при микроинъекции в ооциты мыши и человека генерировали изменения уровня Ca^{2+} , которые блокировались при одновременной инъекции пептида, действующего как конкурентный ингибитор PAWP.

В более поздних работах было показано, что ни tr-kit-, ни PAWP-опосредованная трансдукция не включают этап IP3-опосредованного высвобождения Ca^{2+} , критически важного компонента переходных процессов, наблюдаемых во время активации [20]. В дальнейшем предполагаемая функцио-

нальная роль PAWP была опровергнута в серии биохимических исследований [33], в которых не было предоставлено прямых доказательств его влияния на осцилляции кальция в яйцеклетках. Кроме того, сперматозоиды, полученные от мышей с нулевой PAWP, остаются способными инициировать колебания Ca^{2+} , характерные для нормального оплодотворения, что указывает на то, что этот белок не может играть главную роль в стимуляции ооцитов [34]. По-видимому, PAWP и tr-kit способны к активации яйцеклеток в нефизиологических условиях *in vitro*, далеких от реальных событий при зачатии, либо, что более вероятно, не являются основными участниками процесса [28].

Результаты этих и других исследований однозначно свидетельствовали о том, что главным фактором активации ооцитов у млекопитающих должна быть специфическая ФЛС гамет. Ооциты млекопитающих содержат множественные варианты фермента, включая β -, γ - и δ -изоформы [35]. Удаление ФЛС $\beta 1$ изменяло профили осцилляции Ca^{2+} при активации, но не отменяло ее. Наоборот, избыточная экспрессия вызывала спонтанные колебания кальция, изменяя (но не предотвращая) профили Ca^{2+} , наблюдаемые при оплодотворении. В то же время рекомбинантный белок и комплементарная РНК ФЛС $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\delta 1$, $\delta 3$ и $\delta 4$ не были способны вызывать высвобождение Ca^{2+} при инъекции в ооциты мыши. В совокупности такие результаты указывают на то, что изоформы ФЛС ооцитов прямо не участвуют в их активации, но могут потенциально оказывать влияние на дальнейшее развитие оплодотворения [20].

Фосфолипаза C ζ – фактор сперматозоидов млекопитающих

Конкретный изофермент ФЛС, который, как полагает большинство авторов, в первую очередь ответственен за активацию ооцитов млекопитающих, был впервые идентифицирован с использованием баз данных мышинных маркерных экспрессирующих последовательностей для описания новой специфичной для семенников фосфолипазы C дзета – ФЛС ζ [36]. Последующие исследования определили другие гомологи этого фермента в сперматозоидах человека, хомяка, обезьяны и лошади. ФЛС ζ содержит характерные X- и Y-каталитические домены, которые образуют активный сайт, общий для всех ФЛС, один домен C2 и четыре связанных домена EF-рука [37]. Основное различие между ФЛС ζ и другими ФЛС заключается в отсутствии либо домена гомологии к плекстрину, либо домена гомологии к протеинкиназе Src, что делает ее наименьшей из известных фосфолипаз млекопитающих с молекулярной массой 70 кДа у людей и около 74 кДа у мышей.

Мутация каталитических доменов ФЛС ζ , необходимых для гидролиза ФИФ2, полностью отменяет высвобождение Ca^{2+} в ооцитах, что указывает на ее способность выступать посредником в этом процессе через продукцию ИФ-3 [38]. Домены EF-рук обладают высокой чувствительностью к кальцию, обеспечивая способность к индукции его колебаний Ca^{2+} даже при минимальных уровнях в яйцеклетках.

Хотя точная физиологическая роль домена C2 у ФЛС ζ остается неясной, экспериментальные данные указывают на возможность низкоаффинного связывания с мембран-

ными фосфолипидами: фосфатидилинозитол-3-фосфатом (ФИФ3) и фосфатидилинозитол-5-фосфатом (ФИФ5). Индукция точечной мутации в домене С2 приводила к потере активности ФЛС ζ при инъекции фермента в ооциты в физиологических концентрациях. Однако введение недостаточной по С2-домену ФЛС ζ в очень высоких нефизиологических концентрациях сопровождалось возникновением спайков Ca^{2+} и активацией ооцитов. Дальнейшая биохимическая оценка позволила заключить, что, хотя эта мутация не влияла на каталитические свойства ФЛС ζ , она снижала способность домена С2 связываться с фосфатидилинозитолом [39].

Другой участок, имеющий значение для активности ФЛС ζ , удлинённый линкер ХУ, является наименее консервативной областью фермента. Линкер ХУ экспонирует положительно заряженные остатки в непосредственной близости от каталитического домена Y. Причины, лежащие в основе высокой вариабельности ХУ-линкеров, остаются неясными, но этот феномен может объяснить видоспецифическую разницу паттерна осцилляций Ca^{2+} , наблюдаемых для различных изоферментов ФЛС ζ млекопитающих. В целом, именно ХУ-линкер играет ключевую роль в регуляции активности фермента и его способности взаимодействовать со своим субстратом ФИФ2 совместно с доменом EF-рук [40].

Доказательства ведущей роли ФЛС ζ как фактора активации ооцитов были получены в многочисленных исследованиях. Наиболее существенно то, что инъекция рекомбинантной кРНК и самого фермента в ооциты мыши приводила к изменениям Ca^{2+} , которые были аналогичны колебаниям, наблюдаемым при оплодотворении, а также поддерживали эмбриональное развитие до стадии бластоцисты. Уникальным является то обстоятельство, что характерная картина осцилляций кальция может быть вызвана в диапазоне концентраций рекомбинантного белка, соответствующим количеству ФЛС ζ , обнаруженным в отдельном сперматозоиде [20]. В то же время наиболее близкий ФЛС ζ гомолог ФЛС $\delta 1$ индуцировал колебания Ca^{2+} на уровне, превышающем 1 пг на ооцит, что намного больше реальных клеточных концентраций.

С момента первоначальной идентификации ФЛС ζ ключевым доказательством, необходимым для подтверждения его идентичности как фактора сперматозоидов, является исследование трансгенных животных, у которых фермент был удален. A.Nachem et al. сообщили о создании двух таких трансгенных мышинных линий, где нормальная экспрессия ФЛС ζ была изменена посредством методики редактирования генома CRISPR/Cas9 [41]. Одна линия была создана с делецией 22 нуклеотидов в экзоне 3, расположенной на N-конце перед EF-руками, вторая линия была создана с делецией из 17 нуклеотидов в экзоне 5, расположенной в начале X-домена. Авторы указали, что сперматозоиды, полученные от таких генетически модифицированных самцов, не вызывали колебаний кальция в ооцитах, демонстрируя тем самым, что ФЛС ζ является физиологическим триггером зачатия. Также было установлено, что небольшая часть ооцитов оплодотворяется нокаутированными сперматозоидами с инициацией эмбриогенеза после значительной задержки по времени. То есть самцы, нокаутированные

по ФЛС ζ , оказались субфертильными, а не бесплодными, поскольку естественное спаривание приводило к уменьшению размера помета.

В другой, очень близкой по дизайну работе [42], эти наблюдения в целом были подтверждены. Отличие состояло в том, что авторы добились удаления всех кодирующих экзонов. Полученные мыши с нулевым содержанием ФЛС ζ также были субфертильными, а при проведении ИКСИ с этими сперматозоидами флуктуаций кальция не наблюдалось. Яйцеклетки, оплодотворенные такой спермой, имели множественные пронуклеусы, что согласуется с их неспособностью в отсутствие фермента блокировать проникновение других сперматозоидов.

Одним из важнейших отличий этих экспериментов было исследование кинетики кальция в яйцеклетках на фоне ЭКО. При стандартной процедуре с фертильной спермой происходит 3–4 колебания кальция ежечасно в течение 3 ч и более. Однако когда тот же анализ был выполнен с использованием «нулевых» сперматозоидов, наблюдалось не более двух-трех спайков, и они были отсрочены примерно на 1 ч по сравнению с нормой. Эти факты позволили выдвинуть гипотезу, согласно которой в сперматозоидах содержится второй фактор, ответственный за осцилляции кальция [28]. Он получил название «sperm cryptic activating factor» – SCAF (таинственный активирующий фактор спермы). Природа его неизвестна, а способность выделять кальций в яйцеклетке наблюдается только в отсутствие ФЛС ζ . Является ли SCAF дополнительным механизмом, рудиментарным по природе, или же он играет неизвестную уникальную функцию в активации ооцитов, еще предстоит установить.

Одна из проблем идентификации SCAF состоит в том, что его присутствие в сперме маскируется доминирующей активностью ФЛС ζ . Кроме того, в настоящее время единственный доступный метод его определения заключается в использовании гамет, лишенных фермента. Возможно, что это уже известный белок сперматозоидов, не получивший пока широкого признания или недостаточно исследованный (упомянутые выше tr-kit и PAWP). Если SCAF является наследием эволюционного прошлого, следует проанализировать активацию яйцеклеток у видов, которые не содержат ФЛС ζ . Для полноты картины не следует оставлять без внимания феномен повышения уровня SCAF в ответ на потерю ФЛС ζ в результате процесса так называемой генетической компенсации, когда «нокаут» одного гена может повлиять на экспрессию других генов из-за необходимости компенсировать дефицит жизненно важного белка.

Существенная разница в активности SCAF в процедурах ИКСИ и ЭКО может быть обусловлена двумя обстоятельствами. Во-первых, ингибирование SCAF при ИКСИ, вероятно, связано с негативным влиянием среды при иммобилизации сперматозоида в процессе подготовки к инъекции. Во-вторых, слияние мембран гамет при ЭКО может быть условием активации SCAF. При введении сперматозоида в цитоплазму ооцита посредством ИКСИ этап взаимодействия мембран исключается.

Примечательно, что колебания кальция, генерируемые SCAF, наступают с лаг-периодом около 1 ч и имеют тенденцию к увеличению амплитуды [42]. Очевидно, в это время

происходит смешивание мембран гамет и формирование метаболического пути, ведущего к высвобождению кальция. С другой стороны, сперматозоид является источником мРНК, и задержка может быть временем, необходимым для синтеза нового белка. Не исключено, что SCAF представляет собой мРНК сперматозоида, транспортируемую в яйцеклетку, и которая должна быть транслирована. Если это так, Sperm Base может быть полезной базой данных для изучения кандидатов в SCAF.

Существование второго фактора, активирующего яйцеклетку сперматозоида, не умаляет значения ФЛС ζ . У ооцитов, оплодотворенных лишенной этого фермента спермой, часто развивается полиспермия из-за отсутствия достаточных колебаний кальция для предотвращения проникновения других сперматозоидов [41, 42]. Тем не менее гипотеза, что SCAF существует, представляет широкое поле для дальнейших поисков по его идентификации и определению роли в событиях, происходящих при оплодотворении и на ранних стадиях развития.

Активация ооцитов, фосфолипаза C ζ и бесплодие

Учитывая важность ФЛС ζ для оплодотворения, дефекты активации ооцитов могут лежать в основе некоторых форм бесплодия, когда происходит нарушение оплодотворения. Сперматозоиды бесплодных мужчин, которые не смогли оплодотворить ооциты после рутинной процедуры ЭКО и ИКСИ, не способны вызывать колебания Ca^{2+} при инъекции в ооциты или же вызывают колебания, которые редуцированы по частоте и амплитуде [43]. Кроме того, такие сперматозоиды демонстрируют отсутствие, пониженные уровни или патологические паттерны локализации фермента в головке сперматозоида. В гене ФЛС ζ таких пациентов были идентифицированы множественные мутации, ассоциированные со снижением активности фермента в гаметех [44].

Бесплодие затрагивает во всем мире приблизительно 12% пар, около 7% мужчин страдает бесплодием [1]. Известные в настоящее время генетические факторы могут быть причиной порядка 30% случаев мужского бесплодия, а более 50% случаев остаются необъясненными. Сегодня стало возможным уменьшить проблемы, связанные с бесплодием, с помощью ВРТ. Успешность этой методологии отражается в оценках, что она обеспечивает до 7% общего уровня рождаемости в отдельных странах.

Однако некоторые состояния, такие как тяжелое мужское бесплодие (19–57% случаев бесплодия), остаются неизлечимыми. ЭКО и ИКСИ потенциально могут быть ключом к решению проблемы, однако результат достигается только после нескольких циклов лечения бесплодия. Существенным фактором может быть рецидив патологии имплантации эмбриона, что является причиной неудачных исходов даже при использовании современных технологий [45]. Глобально частота наступления беременности и уровень рождаемости при ВРТ остаются относительно низкими, редко превышая 40%. Беременность и роды с помощью рутинных ЭКО/ИКСИ остаются на уровне 22–23% за цикл [3, 4]. С такой статистикой тесно связаны наблюдения о том, что низкие показатели наступления беременности ассоциированы с плохим эмбриональным развитием после лечения бесплодия.

Примечательно, что низкая эффективность ВРТ может быть связана с параметрами оплодотворения. Действительно, установлена связь между концентрацией ФЛС ζ и способностью к активации ооцитов и эмбриогенезом: инъекции увеличивающихся доз фермента сопровождаются увеличением частоты и амплитуды колебаний Ca^{2+} , которые, в свою очередь, влияют на профили экспрессии генов во время раннего эмбриогенеза [46]. Эффективные дозы ФЛС ζ , приводящие к успешной активации и физиологическому развитию до стадии бластоцисты, изменяются в 4-кратном диапазоне, что соответствует пределам концентраций фермента в сперматозоидах фертильных мужчин.

Такие наблюдения очень важны с практической точки зрения, учитывая, что частота и амплитуда Ca^{2+} играет роль в уплотнении, образовании бластоцисты и скорости успешной трансплантации 4-клеточных эмбрионов [25]. Поскольку скорость образования 2- и 4-клеточных стадий ооцитов человека после оплодотворения является индикатором нормального эмбриогенеза [26], характер колебаний Ca^{2+} при оплодотворении критически важен не только для активации ооцитов, но и для последующего развития эмбриона. Таким образом, разумно предположить, что управляемые ФЛС ζ профили осцилляции кальция детерминируют эмбриогенез и отклонения в уровнях фермента могут лежать в основе не только бесплодия (инфертильности), но также и случаев пониженной фертильности (субфертильности), когда ФЛС ζ в ооцитах достаточно, чтобы вызвать активацию, но недостаточно для инициации эмбрионального развития.

Клиническая роль ФЛС ζ

Очевидно, что сперматозоиды, неспособные активировать ооциты даже после ИКСИ, по-видимому, либо полностью лишены способности инициировать выброс Ca^{2+} , либо вызывают уменьшенные или аномальные амплитуды колебаний. Поэтому обнаружение дефектных версий ФЛС ζ может объяснить некоторые случаи мужского бесплодия [38, 44].

В настоящее время случаи недостаточности ИКСИ обычно клинически разрешаются путем искусственной активации ооцитов, включая индукцию высвобождения Ca^{2+} . Наиболее распространенным клиническим средством АО является ионофор A23187 (кальцимицин) [47]. Вторым наиболее распространенным ионофором, используемым для активации ооцитов, является иониоцин, который более специфичен для Ca^{2+} по сравнению с A23187 и может активировать кальмодулинзависимую киназу и фосфатазу для стимуляции экспрессии генов.

Однако клиническое применение таких химических агентов остается ограниченным, поскольку ооциты человека не очень чувствительны к большинству ионофоров. Главная проблема заключается в том, что ионофоры не способны вызвать характерный профиль высвобождения Ca^{2+} , необходимый для полноценной активации ооцитов у людей. Единственным ионофором Ca^{2+} , о котором сообщалось до настоящего времени, способным вызывать серию колебаний, а не единичные спайки, является хлорид стронция SrCl_2 , но эффективность солей стронция в ооцитах человека остается дискуссионной [18].

Тем не менее ИКСИ в сочетании с искусственной активацией ооцитов существенно увеличивает вероятность оплодотворения и последующее наступление беременности [12, 14, 18, 20, 38]. Наряду с этим ряд исследователей указывает на небольшое или незначительное улучшение показателей оплодотворения и беременности [47]. Такая ситуация может быть связана с неполным воспроизведением физиологического паттерна осцилляций кальция. Большинство клинически применяемых ионофоров Ca^{2+} вызывают один большой переходный процесс. Кроме того, ионофоры высвобождают кальций неконтролируемым образом из всех внутриклеточных депо, включая те, которые обычно не участвуют в активации. Нефизиологические пути, вовлеченные во время АО, могут влиять на активность белков и ферментов, неспецифичных для этого процесса. Наконец, ионофоры, такие как A23187, оказывают множественное воздействие на клеточный гомеостаз, последствия которого остаются мало исследованными и могут быть сопряжены с долговременными генетическими, эпигенетическими, метаболическими и патологическими эффектами [24].

Для преодоления этих противоречий принципиально важно, чтобы процедура активации ооцитов выполнялась в условиях, максимально приближенных к физиологическим, и использование препаратов ФЛС ζ может представлять перспективный метод коррекции патологии этого процесса. С этих позиций создание рекомбинантного человеческого ФЛС ζ -белка было целью многих лабораторий по всему миру с различной степенью успеха. Первоначально ФЛС ζ была получена в клеточных лизатах млекопитающих в неочищенной форме. В 2013 г. M.Nomikos et al. заявили о производстве очищенной и высокоактивной версии человеческой рекомбинантной ФЛС ζ , которая индуцировала характерные колебания Ca^{2+} при инъекции в ооциты мыши и человека [48].

Применение нативной рекомбинантной ФЛС ζ в качестве дополнения к существующим протоколам АО было успешно реализовано в различных вариантах. Продемонстрировано, что негативные эффекты мутантного фермента могут быть эффективно преодолены при введении очищенного рекомбинантного белка ФЛС ζ , а показатели процедуры ИКСИ после инъекции такого фермента были сопоставимы с использованием контрольной спермы [14, 48].

Создание и выделение рекомбинантной ФЛС ζ представляет собой качественный биотехнологический прорыв в помощи пациентам с повторными неудачами ВРТ, однако остается неясным, может ли наличие такой «терапевтической» формы фермента помочь другим типам пациентов, у которых оплодотворение наступает, но эмбриогенез не происходит. Очевидно, уровни ФЛС ζ в сперматозоидах могут оказывать значительное и прямое влияние на скорость и эффективность эмбриогенеза, что лежит в основе многочисленных случаев рецидивирующей недостаточности имплантации.

Учитывая такие факторы, ФЛС ζ представляет собой не только клинически релевантную терапевтическую мишень, но и диагностический биомаркер, который может помочь в определении требований к лечению бесплодия у пациентов мужского пола, потенциально снижая количество циклов, необходимых для достижения беременности [49].

Главной научной проблемой сегодня остаются неизвестные факторы, лежащие в основе экспрессии ФЛС ζ . S.Yelumalai et al. было продемонстрировано, что уровни и паттерны локализации фермента коррелировали с частотой оплодотворения после ИКСИ, но не ЭКО [50]. Этот факт убедительно свидетельствует о том, что ФЛС ζ является серьезным претендентом на полезный прогностический и диагностический маркер для ИКСИ. Кроме того, это исследование подчеркнуло, что причины изменения экспрессии ФЛС ζ , патологии ее локализации в сперматозоидах и точные молекулярные механизмы дисфункции до сих пор неизвестны.

Аномальная экспрессия ФЛС ζ особенно очевидна в глобозооспермических эякулятах, хотя гетерогенность фермента распространяется и на нормозооспермические образцы [15]. Механизмы изменений экспрессии ФЛС ζ и причины, по которым одни мужчины страдают от дефицита фермента, а другие сохраняют фертильность, в настоящее время остаются умозрительными, что представляет собой серьезную проблему при трансляции в клиники новых методов диагностики и коррекции недостаточности ФЛС ζ . Предполагается, что ответ на эти вопросы может быть получен на основе исследований некодирующих областей ДНК, которые могут быть вовлечены в регуляцию активности ФЛС ζ , в частности, двунаправленного промотора, общего с CAPZA3, и потенциально интронной ДНК. Логично предположить, что любые проблемы в промоторной или интронной областях могут оказывать влияние на экспрессию ФЛС ζ и, следовательно, на состояние фертильности.

После обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, снипы) в пределах ФЛС ζ в последние годы все больше внимания уделяется данным исследованиям. Три интронных снипа ФЛС ζ были идентифицированы у нормозооспермического пациента с рецидивирующей полной недостаточностью оплодотворения [51]. Все SNP локализовались в интронной ДНК, которая, как считается, активно участвует во всех этапах процессинга мРНК. Интроннесущие гены имеют повышенную экспрессию белка по сравнению с интронненесущими генами, так как первые продуцируют больше мРНК [52]. Следовательно, генетические варианты (как SNP, так и мутации), расположенные в интроннесущих генах, могут оказывать влияние на продукцию мРНК и влиять на экспрессию конечного продукта. Ген ФЛС ζ человека состоит из 15 экзонов с интронами, охватывающими промежуточные последовательности [38]. Поэтому представляется целесообразным анализ интронов ФЛС ζ для оценки наличия других снипов и их способности влиять на экспрессию белка. Это могло бы быть правдоподобным объяснением значительных изменений степени экспрессии ФЛС ζ , наблюдаемых у фертильных и бесплодных пациентов. Более того, было подсчитано, что порядка 50% генетических нарушений у человека являются результатом дискретного характера сплайсинга, что подчеркивает важность интронов и их функции на геномном уровне [53].

Фрагментация ДНК, окислительный стресс или уровни экспрессии ФЛС ζ , являются потенциальными биомаркерами качества спермы и, следовательно, статуса фертильности [49, 54]. Анализ взаимосвязей этих факторов выявил наличие отрицательной корреляции между иммунореактивностью

ФЛС ζ и 8-гидрокси-20-деоксигуанозин (8-OH-dG), биомаркером окислительного стресса [55]. Эти данные представляют интерес для разработки прогностического биотеста, с помощью которого можно оценить качество спермы для ВРТ.

Актуальность эндогенного подхода к терапии дефицита АО обусловлена тем, что использование искусственных активаторов сопряжено с развитием побочного действия на ооциты и эмбрионы [47]. Поэтому искусственная активация показана только в тех случаях, когда это оправдано дополнительными данными, например доказанным дефицитом ФЛС ζ [56]. Поэтому сегодня первостепенной задачей является разработка альтернативной, более безопасной и адекватной методики АО с применением человеческого рекомбинантного белка ФЛС ζ .

В дополнение к потенциальным терапевтическим достоинствам производство этого белка необходимо для создания моноклональных антител, которые могут быть использованы для определения точной локализации ФЛС ζ в сперматозоидах [50]. Ранее с этой целью использовались поликлональные антитела, неспецифические по своей природе. В настоящее время трехмерная структура белка ФЛС ζ остается неизвестной, хотя компьютерное моделирование предполагает, что он обладает сильной гомологией с PLCd1. Расшифровка структуры фермента поможет понять особенности его функционирования, доменную архитектуру и характер конформационных изменений, которые происходят во время активации ооцитов и взаимодействия с другими макромолекулами с целью оценки посттрансляционных модификаций и разработки таргетных препаратов для регуляции его активности.

Заключение

С повышением осведомленности о ФЛС ζ и ее фундаментальной роли в активации ооцитов количество выявленных клинических случаев, связанных с ее дефицитом, продолжает увеличиваться. Осведомленность пациентов о ФЛС ζ и ее роли в зачатии оказала заметное влияние на продвижение исследований в этой области, в частности, благодаря активному обсуждению в Интернете на форумах и блогах по фертильности. ФЛС ζ получила широкое признание в качестве «фактора спермы», который играет исключительно важную роль при оплодотворении млекопитающих. Многочисленные независимые исследования определили, что ФЛС ζ является единственным физиологическим стимулом, не только необходимым для запуска колебаний Ca^{2+} при активации ооцитов, но и для определения компетентности последующего эмбриогенеза. Однако, несмотря на значительное улучшение понимания уникальных биохимических свойств этого фермента, точные механизмы действия и регуляции ФЛС ζ в процессе оплодотворения еще предстоит полностью выяснить.

В настоящее время также сообщается о многочисленных клинических ассоциациях, которые напрямую связывают мужское бесплодие и дефицит АО с пониженным/отсутствующим уровнем экспрессии и мутированными формами ФЛС ζ . Такие находки требуют глубоких исследований молекулярного механизма, который ФЛС ζ использует при оплодотворении. Коллективные глобальные усилия многочисленных групп показали, что все части белка ФЛС ζ важны для активности, однако в настоящее время неясно, как эти компоненты дей-

ствуют в совокупности. Другие проблемы также требуют решения, как, например, точные механизмы поддержания ФЛС ζ в сперматозоидах в неактивном состоянии с последующей направленной активацией после доставки в ооцит. Перспективна и идентификация внутриклеточных везикул, на которые нацелена ФЛС ζ внутри ооцитов, что может пролить свет на то, как фермент функционирует после слияния гамет.

По мере появления многочисленных клинических отчетов стало очевидным, что некоторые случаи мужского бесплодия могут быть разрешены при использовании ФЛС ζ в качестве лечебного и диагностического средства. Однако пока клиническая доступность этого подхода ограничена вследствие недостаточной специфичности используемых методик и оборудования. Так, в большинстве лабораторий применялись неспецифические антитела к ферменту, а для определения уровней РНК ФЛС ζ использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, который имеет спорную значимость. Таким образом, несмотря на то, что действительно были достигнуты обнадеживающие успехи в этом направлении, крайне важно, чтобы были расшифрованы теоретические аспекты функционирования ФЛС ζ в сочетании со всесторонним клиническим тестированием, прежде чем можно будет рекомендовать широкое клиническое применение энзиматически индуцированной активации ооцитов [18, 24, 47, 57].

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература/References

1. Давыдов АИ, Таирова МБ, Шахламова МН. Абляция, эксцизия, склерозирование: что лучше при эндометриомах яичников малых размеров? Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019;18(4):138-140. / Davydov AI, Tairova MB, Shakhlamova MN. Ablation, excision, sclerotherapy: what is better in cases of small ovarian endometriomas? Vopr. ginek. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology). 2019;18(4):138-140. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-4-138-140 (In Russian).
2. Щербак ЛН, Проскурнина ЕВ, Пахомова ДА, Ушаков ИЛ, Алексеев АВ, Даренская МА, и др. Оксидантно-антиоксидантный профиль фолликулярной жидкости: влияние генеза бесплодия, схемы стимуляции овуляции, препарата для анестезии. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2020; 19(1):20-31. / Shcherbakova LN, Proskurnina EV, Pakhomova DA, Ushakov IL, Alekseev AV, Darenskaya MA, et al. Oxidant-antioxidant profile of follicular fluid: impact of the genesis of infertility, ovulation stimulation regimens, and an anaesthetic. Vopr. ginek. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology). 2020;19(1):20-31. DOI: 10.20953/1726-1678-2020-1-20-31 (In Russian).
3. Sadeghi MR. The 40th Anniversary of IVF: Has ART's Success Reached Its Peak? J Reprod Infertil. 2018;19(2):67-8.
4. Winston RML. The 40th anniversary of human IVF: time to celebrate and time to reflect. Reproduction. 2018 Jul;156(1):E1-E3. DOI: 10.1530/REP-18-0293

5. Давыдов АИ, Рубина ЕВ, Шахламова МН. Эктопическая беременность после экстракорпорального оплодотворения: факторы риска и патофизиологические механизмы. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2017;16(2):50-58. / Davydov AI, Rubina EV, Shakhlamova MN. Ectopic pregnancy after in vitro fertilization: risk factors and pathophysiological mechanisms. *Vopr. ginek. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology)*. 2017;16(2): 50-58. DOI: 10.20953/1726-1678-2017-2-50-58 (In Russian).
6. Kushnir VA, Barad DH, Albertini DF, Darmon SK, Gleicher N. Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004–2013. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):6. DOI: 10.1186/s12958-016-0225-2
7. Трифонова НС, Жукова ЭВ, Гринева АМ, Александров ЛС, Борисова НИ. ЭКО с использованием донорских ооцитов и суррогатное материнство. Психологические особенности пациентов. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2019;18(1):87-95. / Trifonova NS, Zhukova EV, Grinyeva AM, Aleksandrov LS, Borisova NI. IVF with donor oocytes and surrogate motherhood. Psychological specificities of patients. *Vopr. ginek. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology)*. 2019;18(1):87-95. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-1-87-95 (In Russian).
8. Chen M, Heilbronn LK. The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART). *J Dev Orig Health Dis*. 2017;8(4): 388-402. DOI: 10.1017/S2040174417000228
9. Jiang Z, Wang Y, Lin J, Xu J, Ding G, Huang H. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017 Oct;44:90-104. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.07.004
10. Berntsen S, Söderström-Anttila V, Wennerholm U-B, Laivuori H, Loft A, Oldereid NB, et al. The health of children conceived by ART: 'the chicken or the egg?'. *Hum Reprod Update*. 2019;25(2):137-158. DOI: 10.1093/humupd/dmz001
11. Tosti E, Ménéz Y. Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. *Hum Reprod Update*. 2016 Jun;22(4):420-39. DOI: 10.1093/humupd/dmw014
12. Yeste M, Jones C, Amdani SN, Coward K. Oocyte Activation and Fertilisation: Crucial Contributors from the Sperm and Oocyte. *Results Probl Cell Differ*. 2017;59:213-39. DOI: 10.1007/978-3-319-44820-6_8
13. Azad N, Nazarian H, Ghaffari Novin M, Masteri Farahani R, Piryaei A, Heidari MH, et al. Oligoasthenoteratozoospermic (OAT) men display altered phospholipase C ζ (PLC ζ) localization and a lower percentage of sperm cells expressing PLC ζ and post-acrosomal sheath WW domain-binding protein (PAWP). *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(2):178-184. DOI: 10.17305/bjbm.2017.2208
14. Sanusi R, Yu Y, Nomikos M, Lai FA, Swann K. Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C ζ . *Mol Hum Reprod*. 2015;21(10):783-91. DOI: 10.1093/molehr/gav042
15. Chithiwala ZH, Lee HC, Hill DL, Jellerette-Nolan T, Fissore R, Grow D, et al. Phospholipase C-zeta deficiency as a cause for repetitive oocyte fertilization failure during ovarian stimulation for in vitro fertilization with ICSI: a case report. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(9):1415-9. DOI: 10.1007/s10815-015-0531-1
16. Sanders JR, Jones KT. Regulation of the meiotic divisions of mammalian oocytes and eggs. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(4):797-806. DOI: 10.1042/BST20170493
17. Machaty Z, Miller AR, Zhang L. Egg Activation at Fertilization. *Adv Exp Med Biol*. 2017;953:1-47. DOI: 10.1007/978-3-319-46095-6_1
18. Kashir J, Nomikos M, Lai FA. Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions. *Adv Biol Regul*. 2018 Jan;67:148-162. DOI: 10.1016/j.jbior.2017.10.012
19. Xu YR, Yang WX. Calcium influx and sperm-evoked calcium responses during oocyte maturation and egg activation. *Oncotarget*. 2017;8(51):89375-90. DOI: 10.18632/oncotarget.19679
20. Kashir J, Nomikos M, Lai FA, Swann K. Sperm-induced Ca $^{2+}$ release during egg activation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Aug 1;450(3):1204-11. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.078
21. Machaty Z. Signal transduction in mammalian oocytes during fertilization. *Cell Tissue Res*. 2016 Jan;363(1):169-183. DOI: 10.1007/s00441-015-2291-8
22. Fulton BP, Whittingham DG. Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature*. 1978 May 11;273(5658):149-51. DOI: 10.1038/273149a0
23. Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol*. 1992 Jan;149(1): 80-9. DOI: 10.1016/0012-1606(92)90265-i
24. Anifandis G, Michopoulos A, Daponte A, Chatzimeletiou K, Simopoulou M, Messini CI, et al. Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects. *Syst Biol Reprod Med*. 2019 Feb;65(1):3-11. DOI: 10.1080/19396368.2018.1516000
25. Miyazaki S, Ito M. Calcium signals for egg activation in mammals. *J Pharmacol Sci*. 2006;100(5):545-52. DOI: 10.1254/jphs.cpj06003x
26. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1115-21. DOI: 10.1038/nbt.1686
27. Swann K, Lai FA. Egg Activation at Fertilization by a Soluble Sperm Protein. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):127-49. DOI: 10.1152/physrev.00012.2015
28. Jones KT. Mammalian sperm contain two factors for calcium release and egg activation: Phospholipase C zeta and a cryptic activating factor. *Mol Hum Reprod*. 2018 Oct 1;24(10):465-468. DOI: 10.1093/molehr/gay038
29. Coward K, Ponting CP, Zhang N, Young C, Huang CJ, Chou CM, et al. Identification and functional analysis of an ovarian form of the egg activation factor phospholipase C zeta (PLC ζ) in pufferfish. *Mol Reprod Dev*. 2011 Jan;78(1):48-56. DOI: 10.1002/mrd.21262
30. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*. 1996 Jan 25; 379(6563):364-8. DOI: 10.1038/379364a0
31. Sette C, Paronetto MP, Barchi M, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P. Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase. *EMBO J*. 2002 Oct 15;21(20):5386-95. DOI: 10.1093/emboj/cdf553
32. Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, et al. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *FASEB J*. 2014 Oct;28(10):4434-40. DOI: 10.1096/fj.14-256495
33. Nomikos M, Sanders JR, Kashir J, Sanusi R, Buntwal L, Love D, et al. Functional disparity between human PAWP and PLC ζ in the generation of Ca $^{2+}$ oscillations for oocyte activation. *Mol Hum Reprod*. 2015 Sep;21(9):702-10. DOI: 10.1093/molehr/gav034
34. Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm postacrosomal WW domain-binding protein is not required for mouse egg activation. *Biol Reprod*. 2015 Oct;93(4):94. DOI: 10.1095/biolreprod.115.131441
35. Igarashi H, Knott JG, Schultz RM, Williams CJ. Alterations of PLC β 1 in mouse eggs change calcium oscillatory behavior following fertilization. *Dev Biol*. 2007 Dec 1;312(1):321-30. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.09.028
36. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 2002 Aug;129(15):3533-44.
37. Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*. 2008 Jun 30;41(6):415-34. DOI: 10.5483/bmbrep.2008.41.6.415
38. Amdani SN, Yeste M, Jones C, Coward K. Phospholipase C zeta (PLC ζ) and male infertility: Clinical update and topical developments. *Adv Biol Regul*. 2016 May; 61:58-67. DOI: 10.1016/j.jbior.2015.11.009
39. Nomikos M, Stamatidis P, Sanders JR, Beck K, Calver BL, Buntwal L, et al. Male infertility-linked point mutation reveals a vital binding role for the C2 domain of sperm PLC ζ . *Biochem J*. 2017 Mar 7;474(6):1003-1016. DOI: 10.1042/BCJ20161057

40. Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, Georgilis A, Gonzalez-Garcia JR, Nounesis G, et al. Novel regulation of PLC ζ activity via its XY-linker. *Biochem J*. 2011 Sep 15;438(3):427-32. DOI: 10.1042/BJ20110953
41. Hachem A, Godwin J, Ruas M, Lee HC, Ferrer Buitrago M, Ardestani G, et al. PLC ζ is the physiological trigger of the Ca²⁺ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development*. 2017 Aug 15;144(16):2914-2924. DOI: 10.1242/dev.150227
42. Nozawa K, Satouh Y, Fujimoto T, Oji A, Ikawa M. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Sci Rep*. 2018 Jan 22;8(1):1315. DOI: 10.1038/s41598-018-19497-6
43. Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod*. 2009 Oct;24(10):2417-28. DOI: 10.1093/humrep/dep207
44. Escoffier J, Lee HC, Yassine S, Zouari R, Martinez G, Karaouzen T, et al. Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Hum Mol Genet*. 2016 Mar 1;25(5):878-91. DOI: 10.1093/hmg/ddv617
45. Моисеева ИВ, Тюмина ОВ, Мельников ВА, Власов ДН. Оценка эффективности экстракорпорального оплодотворения при селективном переносе одного эмбриона. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2018;17(4): 65-71. / Moiseeva IV, Tyumina OV, Melnikov VA, Vlasov DN. The evaluation of efficiency in the treatment of infertile women by elective single embryo transfer (eSET) in IVF programs. *Vopr. ginekolog. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology)*. 2018;17(4):65-71. DOI: 10.20953/1726-1678-2018-4-65-71 (In Russian).
46. Yamaguchi T, Ito M, Kuroda K, Takeda S, Tanaka A. The establishment of appropriate methods for egg-activation by human PLCZ1 RNA injection into human oocyte. *Cell Calcium*. 2017 Jul;65:22-30. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.03.002
47. Santella L, Dale B. Assisted yes, but where do we draw the line? *Reprod Biomed Online*. 2015;31(4):476-8. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.06.013
48. Nomikos M, Kashir J, Swann K, Lai FA. Sperm PLC ζ : from structure to Ca²⁺ oscillations, egg activation and therapeutic potential. *FEBS Lett*. 2013 Nov 15;587(22):3609-16. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.10.008
49. Nazarian H, Azad N, Nazari L, Piryaei A, Heidari MH, Masteri-Farahani R, et al. Effect of Artificial Oocyte Activation on Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Outcomes in Patients with Lower Percentage of Sperm Containing Phospholipase C ζ : A Randomized Clinical Trial. *J Reprod Infertil*. 2019 Jan-Mar;20(1):3-9.
50. Yelumalai S, Yeste M, Jones C, Amdani SN, Kashir J, Mounce G, et al. Total levels, localization patterns, and proportions of sperm exhibiting phospholipase C zeta are significantly correlated with fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2015 Sep;104(3):561-8.e4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.018
51. Durban M, Barragán M, Colodron M, Ferrer-Buitrago M, De Sutter P, Heindryckx B, et al. PLC ζ disruption with complete fertilization failure in normozoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Jun;32(6):879-86. DOI: 10.1007/s10815-015-0496-0
52. Gallegos JE, Rose AB. The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci*. 2015 Aug;237:8-15. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.04.017
53. Sibley CR, Blazquez L, Ule J. Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet*. 2016 Jul;17(7):407-421. DOI: 10.1038/nrg.2016.46
54. Павлов ВН, Галимова ЭФ, Терегулов БФ, Кайбышев ВТ, Галимов ШН. Молекулярные и метаболические аспекты мужского бесплодия. *Вестник урологии*. 2016;4(2):40-59. / Pavlov VN, Galimova EF, Teregulov BF, Kaybishev VT, Galimov ShN. Molecular and metabolic aspects of male infertility. *Urology herald*. 2016;4(2):40-59. (In Russian).
55. Park JH, Kim SK, Kim J, Kim JH, Chang JH, Jee BC, et al. Relationship between phospholipase C zeta immunoreactivity and DNA fragmentation and oxidation in human sperm. *Obstet Gynecol Sci*. 2015 May;58(3):232-8. DOI: 10.5468/ogs.2015.58.3.232
56. Van Blerkom J, Cohen J, Johnson M. A plea for caution and more research in the 'experimental' use of ionophores in ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2015 Apr;30(4):323-4. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.02.002
57. Ferrer-Buitrago M, Bonte D, Dhaenens L, Vermorgen S, Lu Y, De Sutter P, et al. Assessment of the calcium releasing machinery in oocytes that failed to fertilize after conventional ICSI and assisted oocyte activation. *Reprod Biomed Online*. 2019;38(4):497-507. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.12.035

Информация о соавторах:

Булыгин Кирилл Владимирович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры анатомии человека Сеченовского Университета; доцент кафедры нормальной и топографической анатомии Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
Телефон: (499) 629-7657
E-mail: kirill-bh-red@yandex.ru

Галимова Эльмира Фанисовна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Башкирского государственного медицинского университета
Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
Телефон: (347) 272-4173
E-mail: efgalimova@mail.ru

Громенко Дарья Дмитриевна, студентка лечебного факультета Башкирского государственного медицинского университета
Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
Телефон: (347) 272-4173
E-mail: dasha.gromenko@mail.ru

Галимов Камил Шамилович, студент института клинической медицины им. Н.В.Склифосовского Сеченовского Университета
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
Телефон: (495) 609-1400
E-mail: sngalim@mail.ru

Галимов Шамиль Нариманович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии Башкирского государственного медицинского университета
Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
Телефон: (347) 273-5816
E-mail: sngalim@mail.ru

Information about co-authors:

Kirill V. Bulygin, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Human Anatomy, I.M.Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Associate Professor at the Department of Normal and Topographic Anatomy, M.V.Lomonosov Moscow State University
Address: 8/2 Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russian Federation
Phone: (499)629-7657
E-mail: kirill-bh-red@yandex.ru

Elmira F. Galimova, MD, PhD, DSc, Leading Research Fellow, Central Research Laboratory, Bashkir State Medical University
Address: 3 Lenin str., Ufa, 450008, Russian Federation
Phone: (347)272-4173
E-mail: efgalimova@mail.ru

Darya D. Gromenko, Student, General Medicine, Bashkir State Medical University
Address: 3 Lenin str., Ufa, 450008, Russian Federation
Phone: (347) 272-4173
E-mail: dasha.gromenko@mail.ru

Kamil Sh. Galimov, Student, N.V.Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M.Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
Address: 8/2 Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russian Federation
Phone: (495) 609-1400
E-mail: sngalim@mail.ru

Shamil N. Galimov, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Bashkir State Medical University
Address: 3 Lenin str., Ufa, 450008, Russian Federation
Phone: (347) 273-5816
E-mail: sngalim@mail.ru