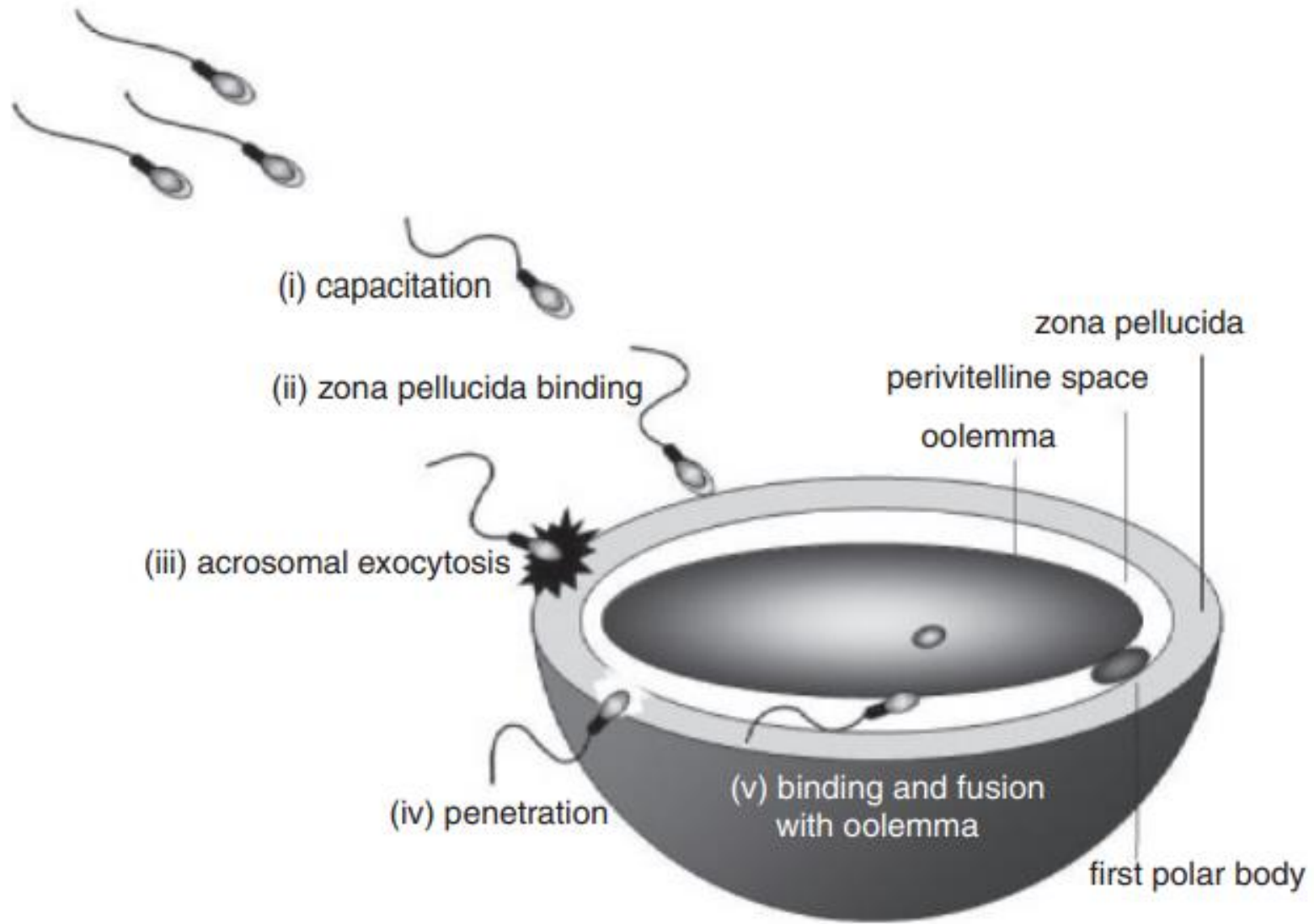


Andrologie

Soňa Kloudová

sona.kloudova@med.muni.cz

7.3.2023



- Spermie po svém vzniku ve varleti jsou nezralé a nepohyblivé → **maturace**
 - získání proteinů a cholesterolu produkovaných v nadvarleti (modifikace)
 - změny okolních podmínek (teplota, osmotické podmínky, koncentrace iontů, ejakulace, podmínky v ženském reprodukčním traktu → motilita)
- **Chemotaxe**- různé chemické stimuly v prostředí – peptidy, proteiny, mastné kyseliny
 - u savců je zřejmě nejdůležitějším chemoatraktantem progesteron (kumulární buňky)
 - odorantový receptor (OR) spřažený s G proteinem – hOR17-4 – důležitá role u lidských spermií
 - ne všechny spermie budou reagovat na chemoatrakci (zřejmě variabilita v heterogenitě OR)- jeden z možných mechanismů selekce

Další krok dozrávání se odehrává v děloze – fyziologické, biochemické a biofyzikální modifikace umožňující oplození:

- **kapacitace** – série strukturálních a metabolických změn, kdy spermie získají schopnost interakce se ZP a akrozomální reakce:

-změny v koncentraci iontů (zejména Ca^{2+}), reorganizace lipidů v membráně-
zvýšená fluidita membrány, hyperpolarizaci membrány, intracelulárním pH,
fosforylaci proteinů a koncentraci ROS

- **rozpustná adenyl cykláza** – aktivace hydrogenuhličitánem a vápníkem
- s membránou asociované faktory nutné pro vazbu k oocytu a k fertilizaci
- **Hyperaktivace**- změny v pohybu bičíku- progresivní pohyb se mění v různý asymetrický pohyb bičíku s vysokou amplitudou, střídající se s obdobím téměř bez hybnosti - tato změna má zřejmě spermiím pomoci v pohybu v ženském reprodukčním traktu (průchod cervikálním hlenem, průchod oviduktem, penetrace kumulu oophoru)

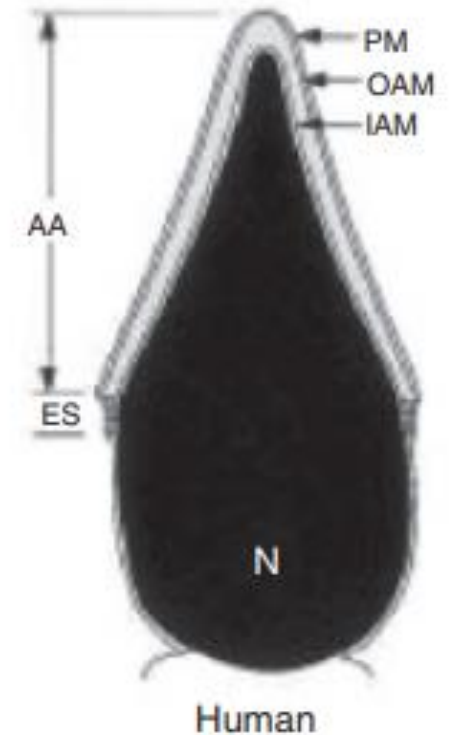
- Po maturaci a kapacitaci se spermie naváže k ZP oocytu a podstupuje **akrozomální reakci**

-akutní nárůst vápenatých iontů (přechodné receptorové potenciálové kanály), na procesu akrozomální reakce a interakci s oocytem se podílí mnoho akrozomálních molekul

Odhalení vnitřní akrozomální membrány spermie-interakce s ZP oocytu během penetrace do oocytu

-plasmatická membrána spermie fuzuje s akrosomální membránou (uvolnění enzymatického obsahu) → natrávení ZP a uvolnění proteinů pokrývajících vnitřní akrozomální membránu → interakce s membránou oocytu

- Zona pellucida obsahuje 3 proteiny interagující se spermií : ZP1, ZP2 a ZP3 (myš)
- Exocytóza akrozomů je proces zásadní pro úspěšnou fertilizaci
- Po kapacitaci a akrosomální reakci spermie splyne dojde k fúzi s plasmatickou membránou oocytu



Maturace v nadvarletí

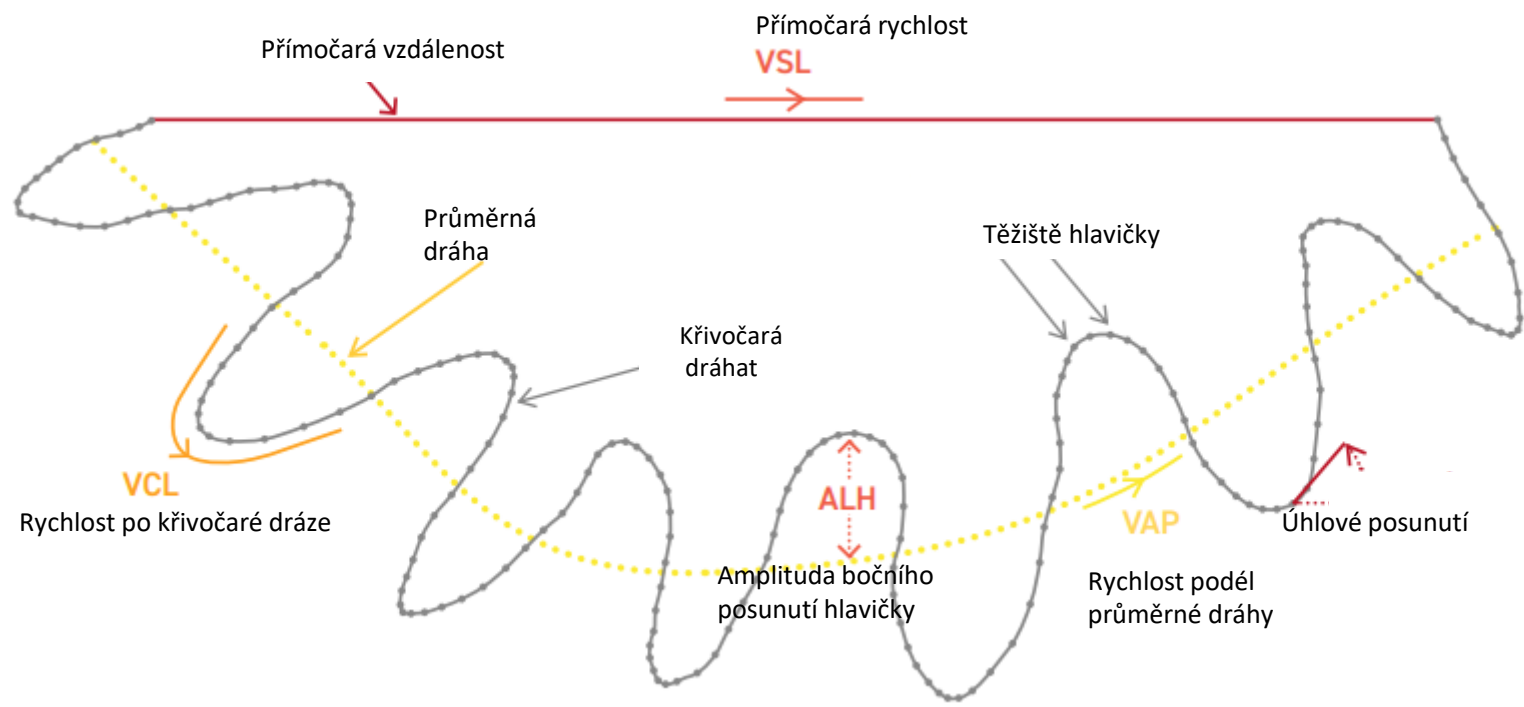
- Transport spermií nadvarletem—zhruba 11 dnů
- Spermie se v nadvarletí pohybují různým prostředím- setkávají se s různými stimuly, získávají různé proteiny a setkávají se s ve vodě rozpustnými částicemi s nízkou molekulární hmotností→ regulace objemu buňky
- V **proximálním nadvarletí** jsou vystaveny působení enzymů a proteinům, podílejícím se na modifikaci membrány (splynutí spermie s oocytem)
- **střední region nadvarlete**- další modifikace membrány- aktivace dalších enzymů a proteinů asociovaných s transportem sterolů, které mohou modifikovat membránu a umožnit příjem GPI vázaných proteinů
- Více **distálně** se zvyšuje koncentrace glukosidázy a proteázy, proteinů zapojených do vazby k ZP a fúzi s oocytem, hlavního maturačního antigenu CD52, antimikrobiální aktivity a dekapacitačních faktorů → přežití před ejakulací

- Adherence proteinů k různým doménám (membrána nad akrozomem nebo ekvatoriálním segmentem) závisí na povaze proteinů, složení membrány a prostředí, ve kterém se spermie nachází. V případě kapacitující spermie je místem reakce membrána akrosomu, v případě akrozom reagované spermie je místem reakce ekvatoriální segment – umístění pak může určovat roly při vazbě na ZP nebo membránu oocyty.
- Membrány i proteiny jsou modifikovány během průchodu nadvarletem **rozdílnou enzymatickou aktivitou** (glykosyl transferázy, glykosidázy, proteázy) různých regionů nadvarlete; dochází k sekreci různých makromolekul, které se váží k maturující spermii, k sekreci nízkomolekulárních iontů a organických osmolytů, které jsou přijímány a regulují objem buňky, udržují spermii v klidovém stavu (nízký obsah Na^+ iontů a vysoký obsah K^+ → toto iontové prostředí zároveň pomáhá držet elektrostaticky navázané proteiny na povrchu spermie a podporuje aktivitu mitochondrií

Motilita

- Schopnost motility získávají spermie v nadvarleti, nicméně pohyblivé jsou až po smísení se semennou plasmou; později v ženském pohlavním traktu je aktivován hyperaktivní pohyb
- Hodnotí se: podíl pohyblivých spermií, frekvence kmitání bičíku, plocha kterou zahrnuje kmit bičíku, maximální amplituda vln
- CASA (computer-aided semen analyzer) – pohyb hlavičky (křivočará a přímočará rychlost, linearita trajektorie, amplituda bočního posunutí hlavy





$\mu\text{m/s}$

Hodnocení motility v laboratoři:

Na nativním preparátu, při fázovém kontrastu, vždy 2 vzorky a 200 spermií

- Podíl spermií rychle progresivních (kategorie **a**): rychlost vyšší než 25 $\mu\text{m/s}$
- Podíl spermií pomalu progresivních (kategorie **b**) rychlost 5-25 $\mu\text{m/s}$
- Podíl spermií hýbajících se na místě (kategorie **c**)
- Podíl spermií bez pohybu (kategorie **d**)

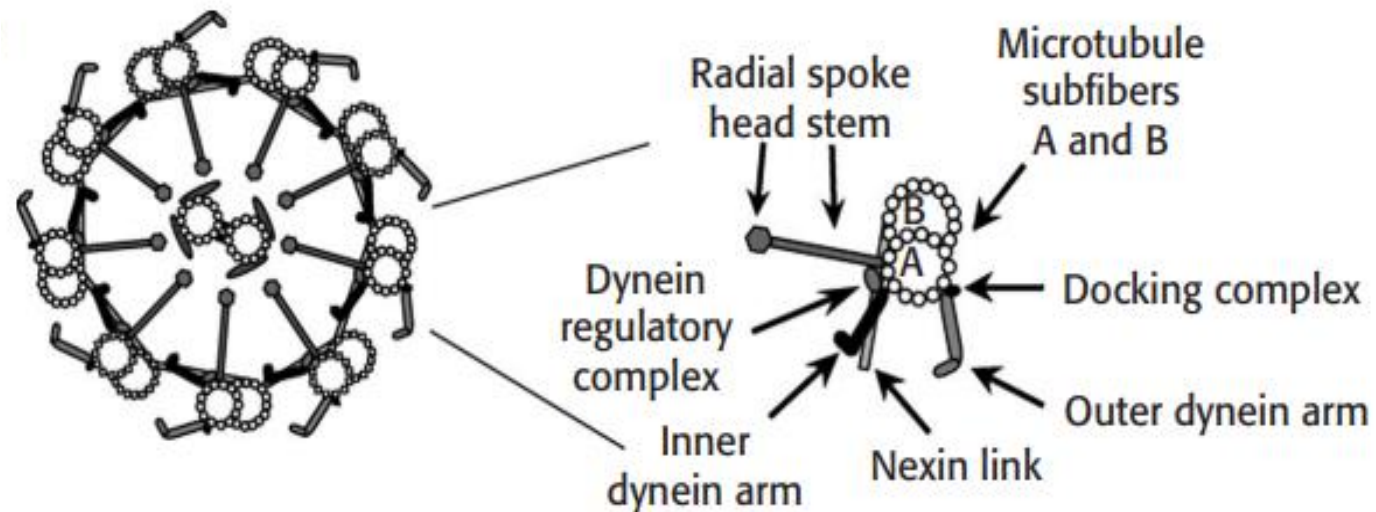
Důležitost tréninku!

Norma:

Podíl progresivních spermií $\geq 30\%$

Celkový podíl motilních spermií: $\geq 42\%$

- Axonema – struktura odpovědná za pohyb → vlny šířící se dozadu podél osy, aby vytvořily dopředný hnací tah
- 9 periferních mirotubulových dabletů a dva centrální mikrotubuly, dyneinová ramena vyčnívají z mikrotubulu A směrem k mikrotubulu B přilehlého dabletu → aktivní posuv mikrotubulů
- Sousedící mikrotubuly jsou k sobě připojeny nexiny a k centrálním mikrotubulům vybíhají obklopující radiální spojky



- **Dynein** – konverze chemické energie hydrolýzou ATP do mechanické energie pohybu
- vnější dyneinová ramena jsou rozmístěna 24 nm od sebe podél mikrotubulu A a jsou k němu přichyceny a drženy v ATP nesensitivním stavu pomocí tří peptidů (dyneinový dokovací komplex)
 - ovlivňují maximální rychlost klouzání vnějších dvojic mikrotubulů
- Vnitřní dyneinová ramena jsou rozmístěna po 96 nm
 - ovlivňují tvar vlny, regulují symetrie úderů, poskytují dodatečnou sílu potřebnou k udržení rychlosti
- Dyneinové rameno:
 - těžký řetězec** - centrální motorová část s vazebnými místy pro 4 ATP a mikrotubuly
 - střední řetězec** – na bázi dyneinového ramene, ATP nesensitivní vazba ramen k mikrotubulům
 - lehký řetězec** – proteiny různých funkcí (vazba vápenatých iontů, struktury podobné thioredoxinu, struktury s repetitivy bohatými na leucin apod.)
- variabilita ve struktuře a funkci těchto jednotek

- **Dyneinový regulační komplex** – 7 polypeptidů, pevně navázán na svazek mikrotubulů, lešení pro enzymy modulující aktivitu dyneinu, senzor napětí či deformace axonemy se zpětnou vazbou rameni dyneinu
- **Radiální paprsky**-struktury tvaru T, přiléhají k vnitřním dyneinovým ramenům a jsou ukotveny na mikrotubulech A, směřují k centrálnímu páru mikrotubulů
- **Centrální mikrotubuly a radiální paprsky**- nejsou nezbytné pro pohyb; mechanický a chemický převodník signálu-řízení velikosti a tvaru pohybu bičíku, modifikace pohybu v závislosti na konkrétním signálu; regulují velocitu klouzání; ovlivňují pohyb ve dvou nebo třech dimenzích a plochu kmitání bičíku

- **α a β tubuliny** – zásadní význam pro pohyb, globulární proteiny (50-55 kDa, heterodimery (jeden α a jeden β řetězec)
- Podélné spojení tubulinů vytváří protofilamenta (a laterální spojení 13. a 11. protofilamenta tvoří mikrotubuly A a B)
- Vnější dabletové mikrotubuly jsou vázány nexiny (pravděpodobně v souvislosti s dyneinovým regulačním komplexem)

- **Fibrózní pochva** – obklopuje axonema, denzní vlákna (proteinová vlákna bohatá na cystein, serin a prolin, vysoký stupeň přemostění zinek dependentními disulfidy); každý dablet je asociován s vnějším denzním vláknem; zajištění elasticity a zřejmě i určitá role v regulaci motility

-tvořena třemi longitudinálními sloupci přichycenými k mikrotubulovým dabletům, které probíhají podél hlavní části bičíku → toto uspořádání a dvojitá sulfidová vazba mezi proteiny umožňují ovlivňovat pohyb (rovinu i tvar plochy ve které se bičík pohybuje)

-opora a lešení pro enzymy které regulují a modifikují aktivitu dyneinů, senzor tlaku, mechanická zpětná vazba pro dyneinová ramena

Proteiny nacházející se ve fibrózní pochvě:

- Rhophilin – protein lokalizovaný na vnějším povrchu denzních vláken, váže se na něj ropporin, protein specifický pro spermie, přichycený k vnitřní straně fibrózní pochvy,
- Enzymy asociované s glykolýzou: glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza-S, hexokináza HK-1-S, glutathion S transferáza
- **Mitochondrie** –naléhají těsně a spirálovitě na fibrózní pochvu
-odolnost proti hypotonickým podmínkám a schopnost využívat laktát

- Schopnost motility získána během průchodu nadvarletem, ale projeví se až po smísení se semennou plasmou
- **zdroje ATP**: cukry semenné plasmy –**glukóza a fruktóza** – udrží spermie v pohybu po hodiny
- Pro motilitu je důležitá zejména **glykolýza** (i když oxidativní fosforylace v mitochondriích je pro produkci ATP účinnější) –**glyceraldehyd- 3 fosfát dehydrogenáza- S** - specifický pro spermie, 90% produkce ATP
- **Bikarbonát** (hydrogenuhličitan) – v semenné plasmě, aktivuje mnoho funkcí spermie, mimo jiné i iniciaci motility-zvyšuje intracelulární pH, stimuluje respirační aktivitu, zesiluje otevření napětím řízené kanály pro Ca^{2+} a aktivují atypickou adenyl cyklázu → zvýšení koncentrace Ca^{2+} a cAMP → stimulace pohybu

- Inhibitory fosfodiesterázy (\uparrow cAMP) v léčivech stimulují motilitu spermií
- Využití v IVF-teophylin
- cAMP stimulují PKA (protein kináza A)
- Pro pohyb je následně zásadní složení PKA a AKAP (A kinase anchoring protein)
- Regulační podjednotky PKA byly nalezeny na fibrózní pochvě i na vnějších denzních vláknech ne však v mikrotubulech- hraje roli v klouzání fibrózní pochvy po přiléhajících vnějších denzních vláknech



- Při kapacitaci spermií dochází k rychlému nárůstu buněčného cAMP a k efluxu cholesterolu z plazmatické membrány → zvýšení koncentrace hydrogenuhličitanových a vápenatých iontů → aktivace adenylylcyklázy → produkce dalších cAMP z ATP → **hyperaktivní motilita** a iniciace akrozomální reakce

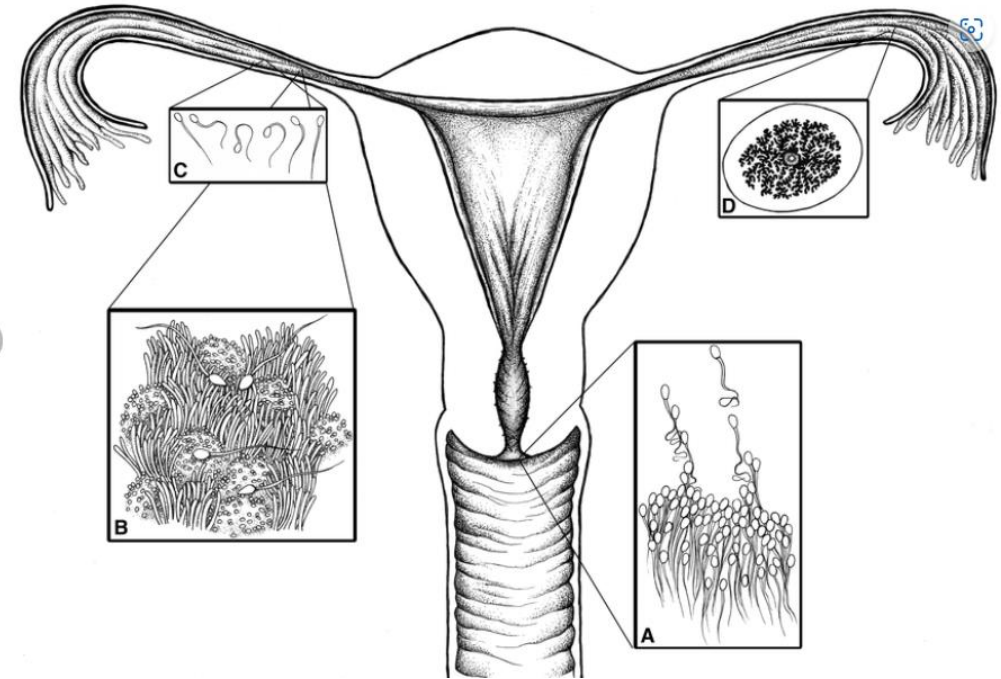
Viz video normální vs hyperaktivovaný pohyb

- [What hyperactive sperm looks like - Curious \(science.org.au\)](https://www.science.org.au/curious/development/what-hyperactive-sperm-looks-like)

Stimulace pohybu v ženském pohlavím traktu

Mnoho chemických i fyzikálních stimulů →

- Chemotaxe – progesteron, estrogen, ANP (atrial natriuretic peptid), chemický gradient
- Haptotaxe
- Termotaxe – teplotní rozdíl mezi isthmem a místem oplození je až 2°C
- Rheotaxe – odmytí bakterií, dalších buněk a buněčných úlomků z ejakulátu, selekce na základě motility



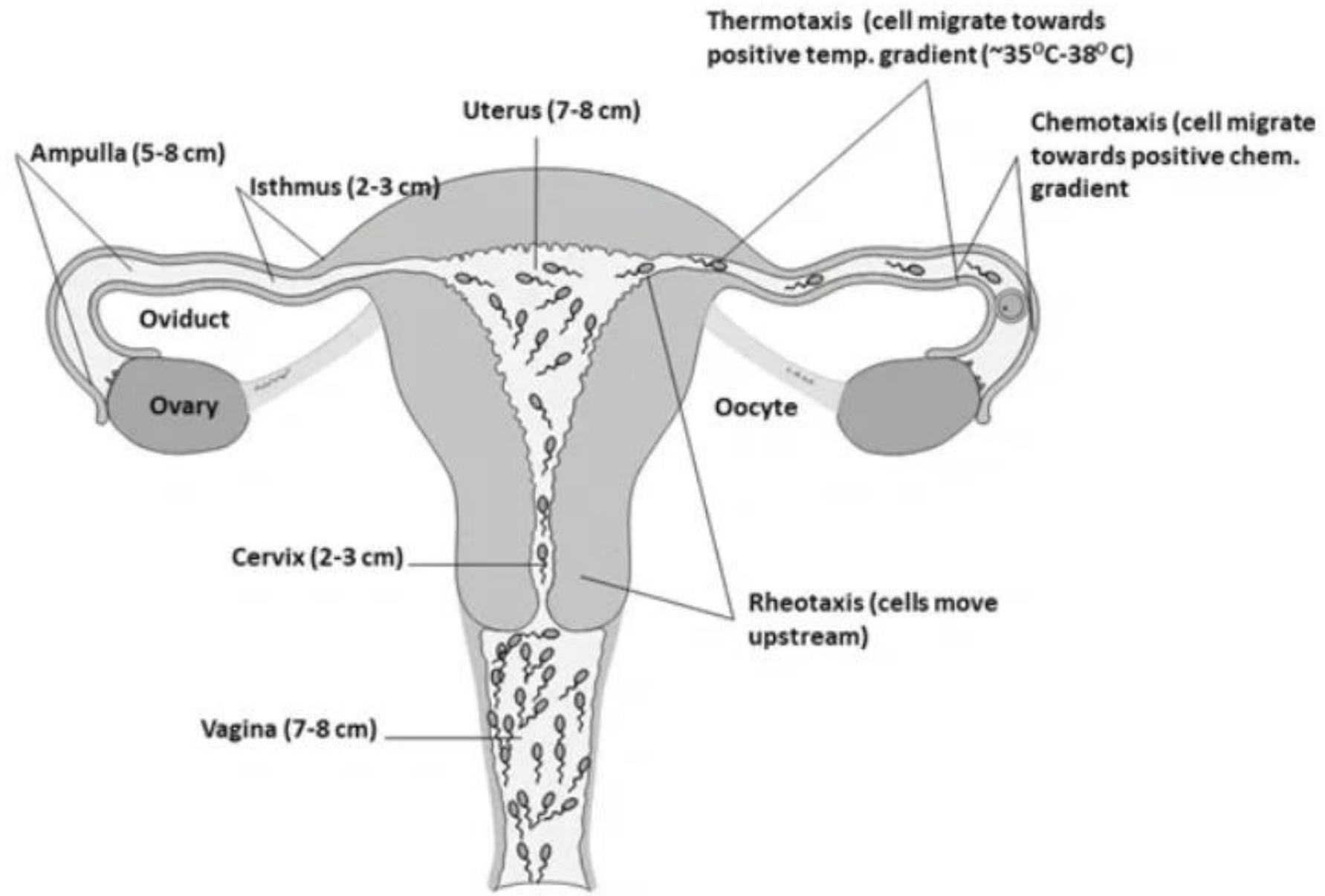
A: spermie vstupují do cervikálního hlenu na zevním čípku

B: interakce s endosalpingeálním epitelem vejcovodu

C: hyperaktivovaný pohyb ve vejcovodu

D: oocyt v kumulu

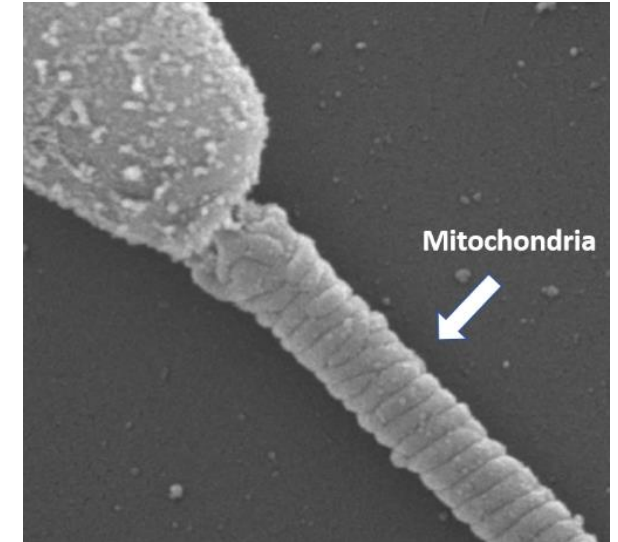
[Human female reproductive tract illustrating stages of gamete... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)



[Sperm swimming in the female reproductive tract \(beezbiotech.com\)](http://beezbiotech.com)

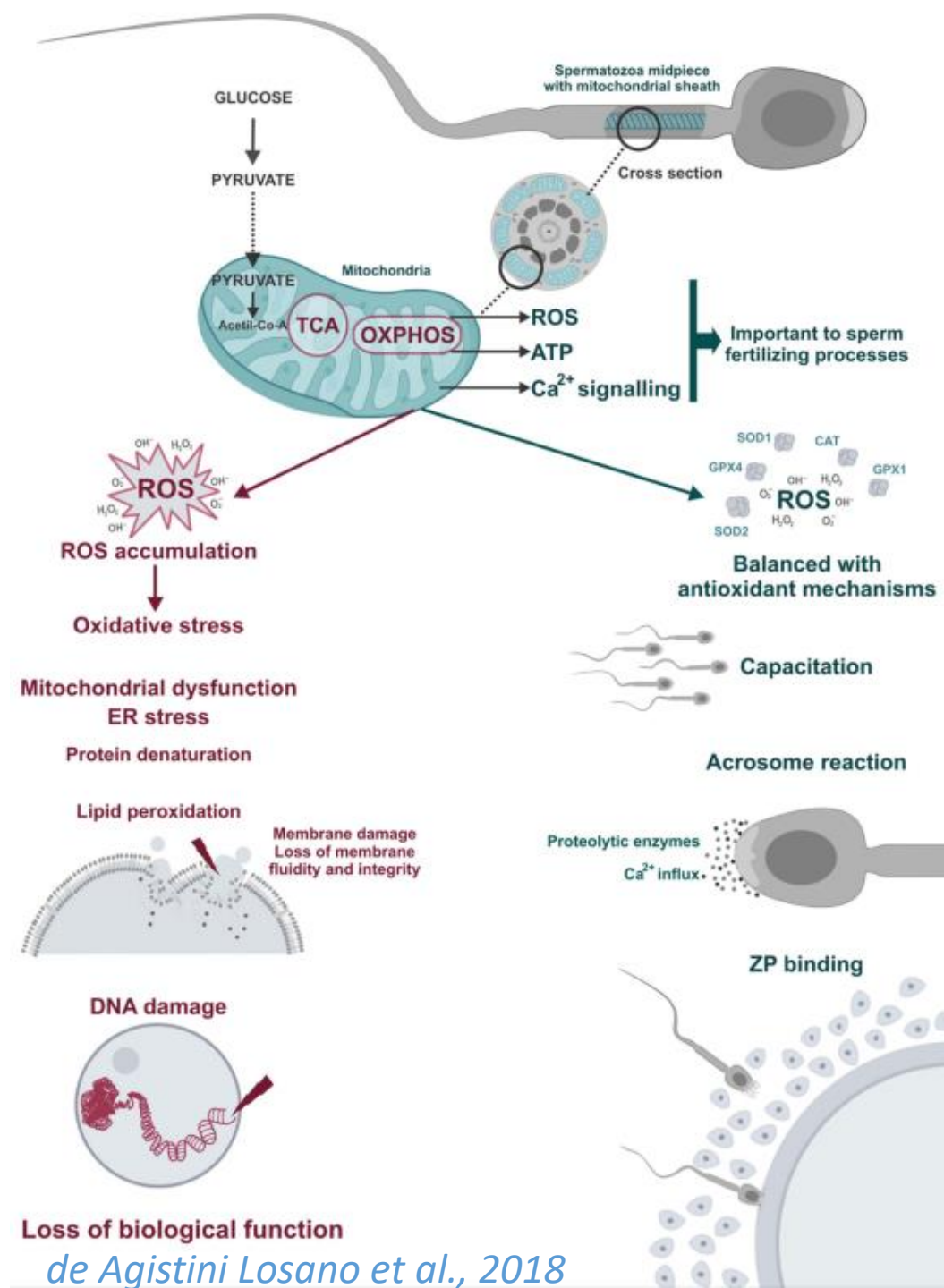
Mitochondrie spermii

- významná role pro schopnost oplození oocyty, zdroj ATP pro primární homeostázu a částečně pro pohyb
- Oxidační fosforylace
- proces generování ATP a funkční dynamika nejsou plně objasněny
- Ca^{2+} -hlavní regulátor oxidační fosforylace; primární metabolický mediátor pro produkci NAD, regulace enzymatické aktivity pyruvátdehydrogenázy, isocytrátdehydrogenázy a α -ketoglutarátdehydrogenázy, produkce ATP (fosforylace ADP), podílí se na apoptóze (spuštění proapoptických signálů)
- Významné generátory ROS (spermie jsou extrémně náchylné k oxidačnímu stresu-malý objem cytoplasmy, nízká antioxidační aktivita, vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin v membránách)



Fyziologická a patologická funkce mitochondrií spermii

ROS - důležitá role ve fyziologii spermii
- spouštěče procesů oplodnění (hyperaktivace, akrozomální reakce a vazba spermie na oocyt)
mitochondriální dysfunkce → nerovnováha mezi produkcí ROS a antioxidační kapacitou → oxidační stres → poškození struktur spermii, peroxidace lipidů plazmatické membrány a poškození DNA → ztráta biologických funkcí spermii
-reparace struktur spermii není možná- chybí cytoplazmatické reparační enzymy



Mechanismus vzniku ROS v mitochondriích

- Mitochondriální prostředí je bohaté na kyslík a elektrony → redukce kyslíku na vodu (konečný produkt oxidační fosforylace)
- Některé elektrony unikají procesu oxidační fosforylace a váží se na molekulární kyslík → superoxidový anion → reakční kaskáda generující další ROS (peroxid vodíku, hydroxylový radikál)
- Asi 2% metabolitovaného kyslíku se mění na superoxidový anion
- ROS jsou zahrnuty do spuštění mnoha funkčních procesů - kapacitace, akrozomální reakce, interakce se ZP
- Antioxidační mechanismus - **SOD (superoxid dismutáza)** - dismutace dvou molekul superoxidového aniontu na kyslík a peroxid vodíku

- Problematika oxidačního stresu je široce diskutována, dalšími zdroji ROS jsou kulaté buňky- leukocyty i vývojové prekursorů spermií
- Byla popsána souvislost mezi neplodností a poškozenými mitochondriemi, nicméně spermie s vysokým mitochondriální membránovým potenciálem byly detekovány i ve spermatu plodných mužů
- Byla také popsána korelace mezi nižším BR (blastulation rate-podíl tvorby blastocyst) a zvýšeným oxidačním stresem v ejakulátu
- K poškození mitochondrií dochází i během kryokonzervace spermií, což může mít za následek poškození DNA spermií, snížení motility apod- využití antioxidantů jako přísad do média?