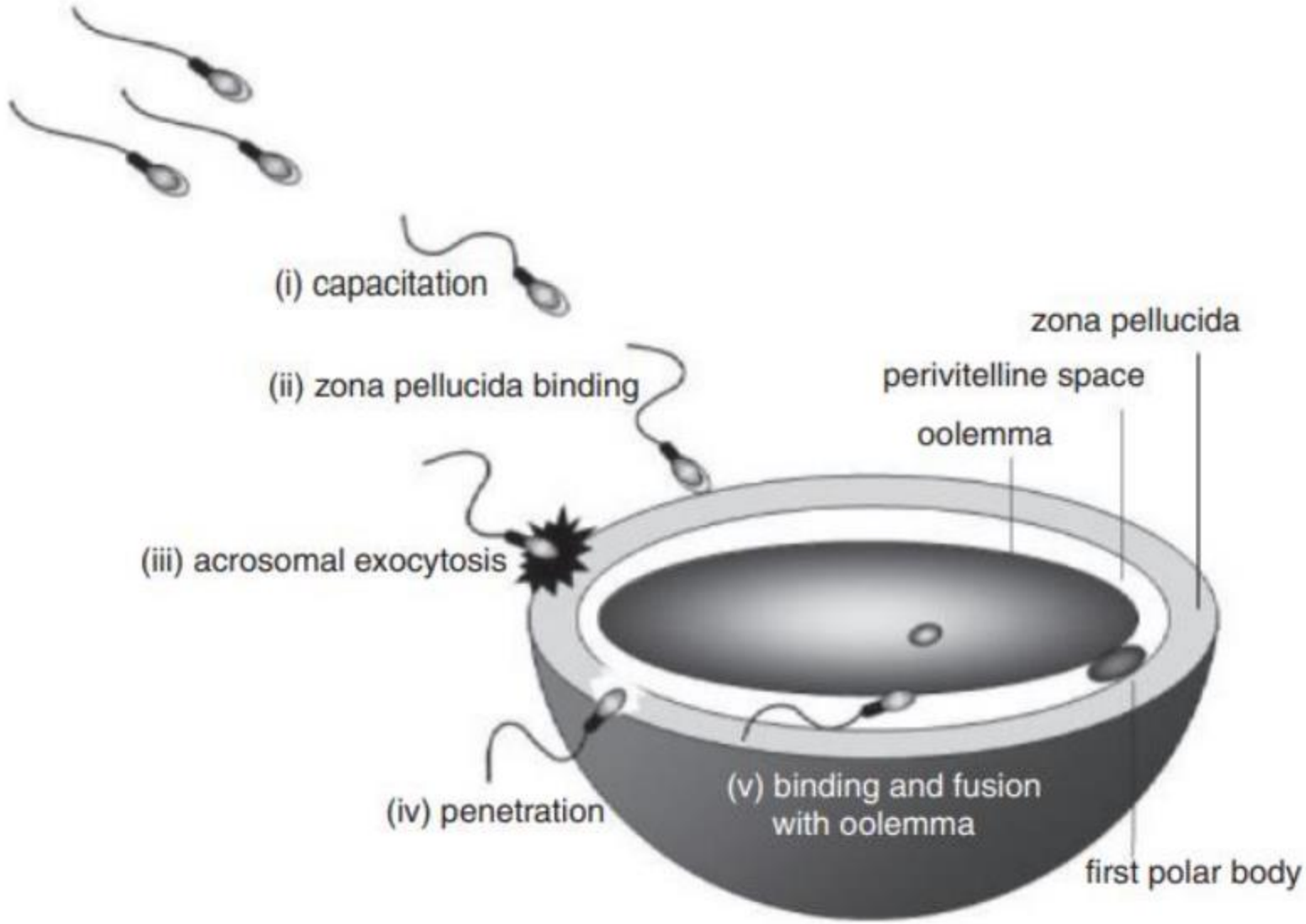
Andrologie

Soňa Kloudová

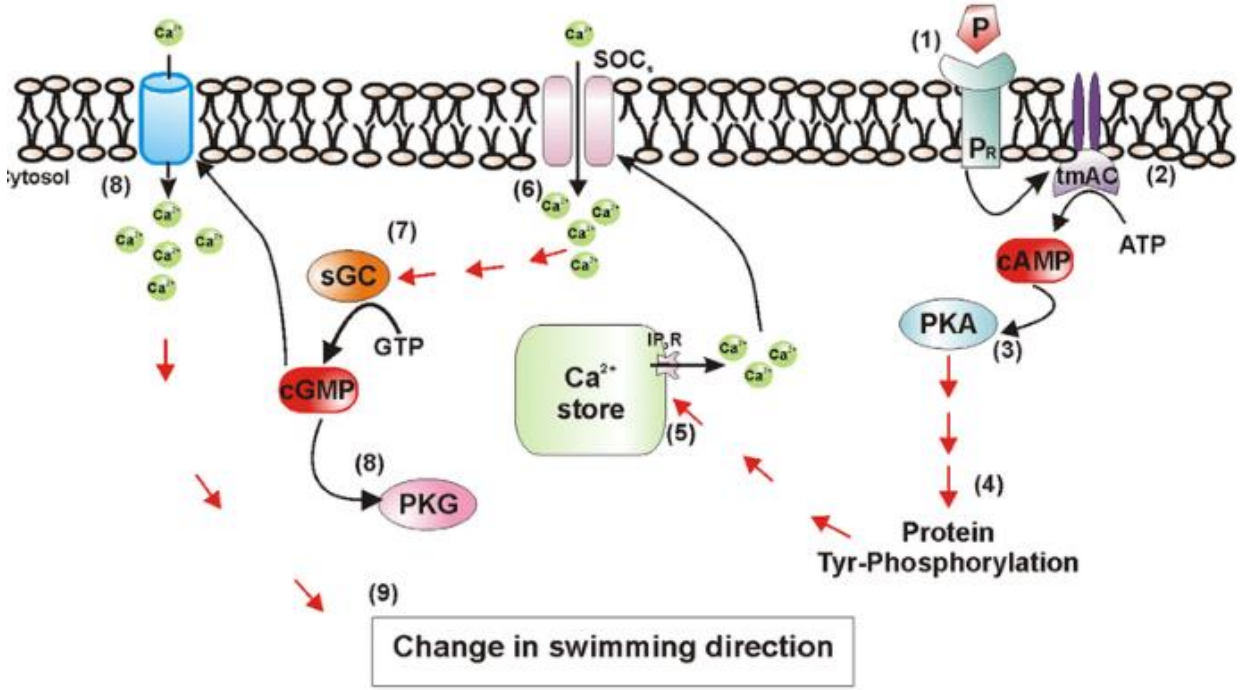
sona.kloudova@med.muni.cz

12.3.2024


(i) capacitation
(ii) zona pellucida binding
(iii) acrosomal exocytosis
(iv) penetration
zona pellucida
perivitelline space
oolemma
(v) binding and fusion
with oolemma
first polar body

• Spermie po svém vzniku ve varleti jsou nezralé a nepohyblivé→ maturace – v nadvarleti (optimální prostředí je tvořeno sekrety epiteliálních buněk) → zisk různých molekul proteinů a cholesterolu (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 (působí ve velmi nízkých koncentracích přibližně na 10% buněk)
-chemoatraktanty vylučuje i oocyt (hydrofobní nepeptidická látka-vázaná na protein)



https://www.researchgate.net/figure/Molecular-mechanisms-involved-in-the-sperm-chemotaxis-mediated-by-progesterone-1-P-P-R_fig10_40484423

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

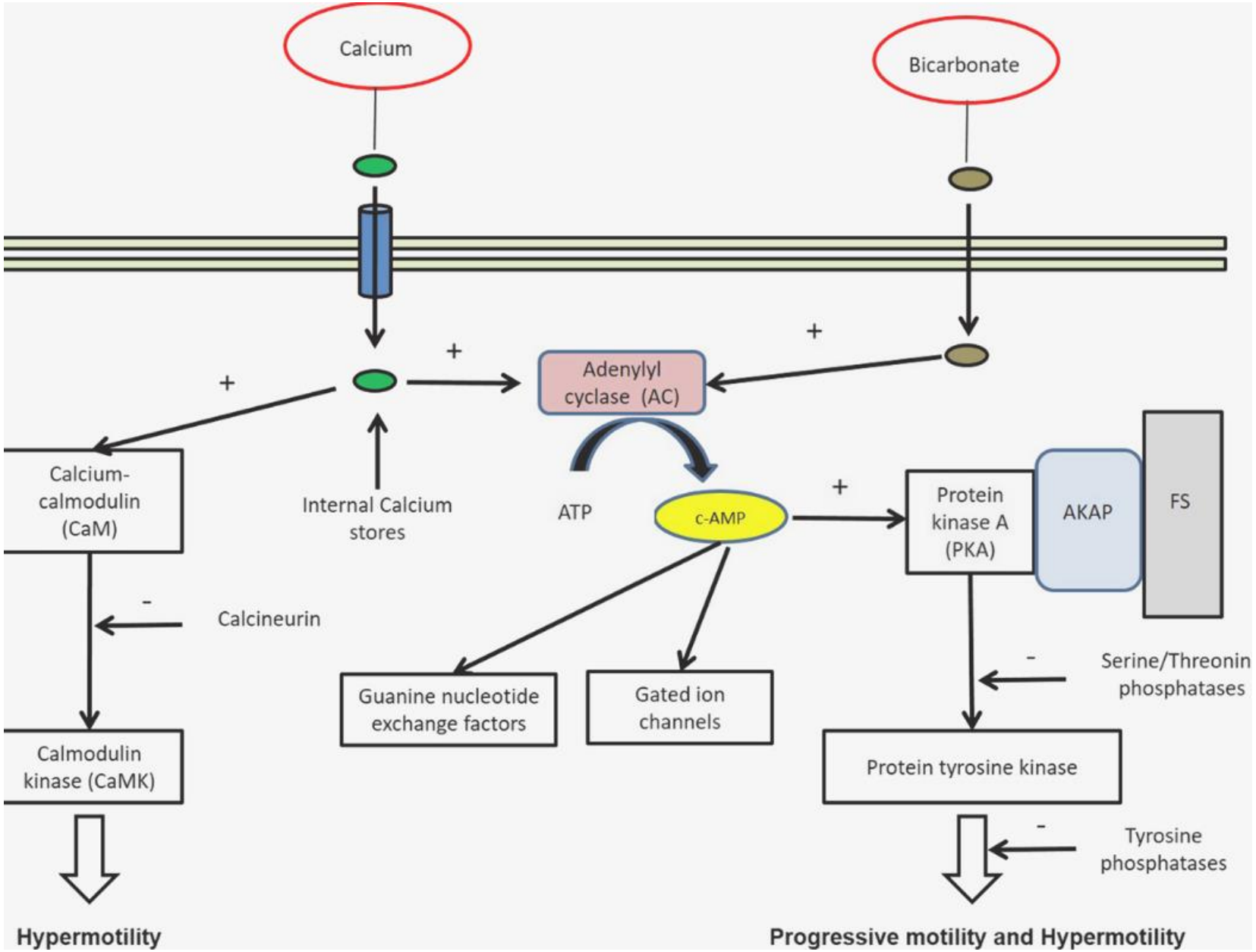
- **kapacitace** – série strukturálních a metabolických změn, kdy spermie získají schopnost interakce se ZP a akrozomální reakce:

-změny v koncentraci iontů (zejména Ca2+), reorganizace lipidů v membránězvýšená fluidita membrány, hyperpolarizaci membrány, intracelulárním pH, fosforylaci proteinů a koncentraci ROS

- rozpustná adenylyl cykláza – aktivace hydrogenuhličitanem a vápnatými ionty - s membránou asociované faktory nutné pro vazbu k oocytu a k fertilizaci –

- hyperaktivace- změny v pohybu bičíku- progresivní pohyb se mění v rázný 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)

Schematické znázornění signálních drah zapojených do regulace hyperaktivace spermií savců.
Progresivní motilita je regulována nízkou úrovní aktivity dráhy AC/cAMP/PKA, zatímco hyperaktivovaná motilita je indukována, když je druhá dráha aktivována na mnohem vyšší úroveň,
v kombinaci s aktivací dráhy kalmodulin kinázy (CaMK)



https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/157/5/REP-18-0541.xml

• 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

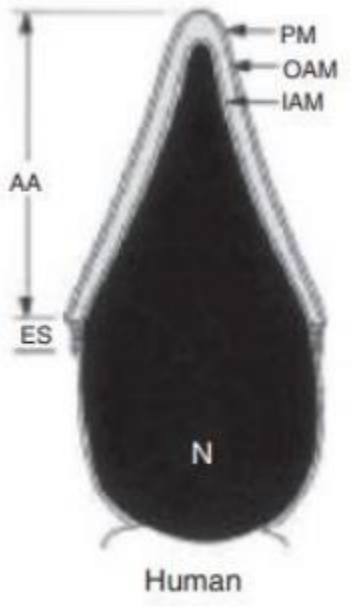
-k akrozomální reakci může docházet i předčasně (před setkáním s oocytem)-spontánní akrozomová reakce- spermie disponuje několika ochrannými mechanismy

-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), receptory k těmto proteinům se nachází v PM spermií

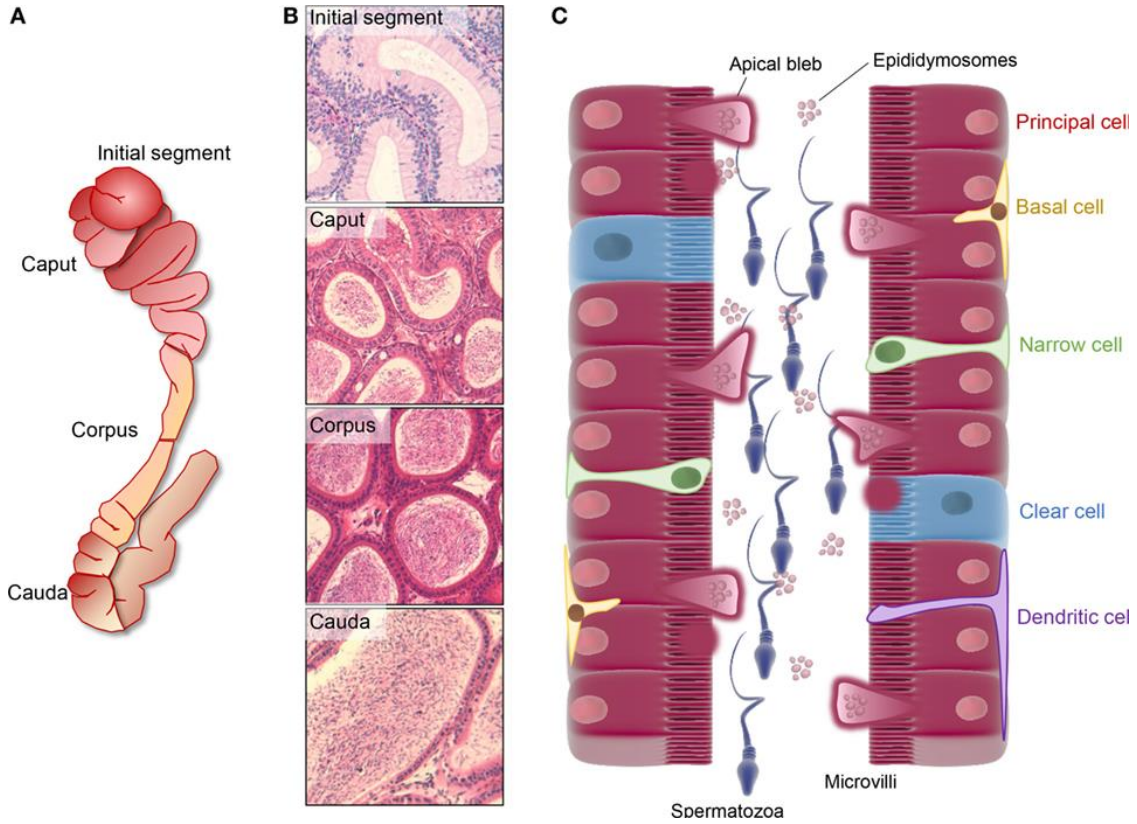
• Exocytóza akrozomů je proces zásadní pro úspěšnou fertilizaci

• Po kapacitaci a akrosomální reakci spermie dojde k fúzi s plasmatickou membránou oocytu



Maturace v nadvarleti

- Transport spermií nadvarletem – zhruba 11 dnů
- Spermie se v nadvarleti 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 nadvarleti 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



https://www.frontiersin.org/files/Articles/341053/fendo-09-00059-HTML/image_m/fendo-09-00059-g001.jpg

• Adherence proteinů k různým doménám (membrána nad akrozomem nebo eqvatoriálním 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 roli při vazbě na ZP nebo membránu oocytu.

• 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 elektorstaticky navázané proteiny na povrchu spermie a podporuje aktivitu mitochondrií

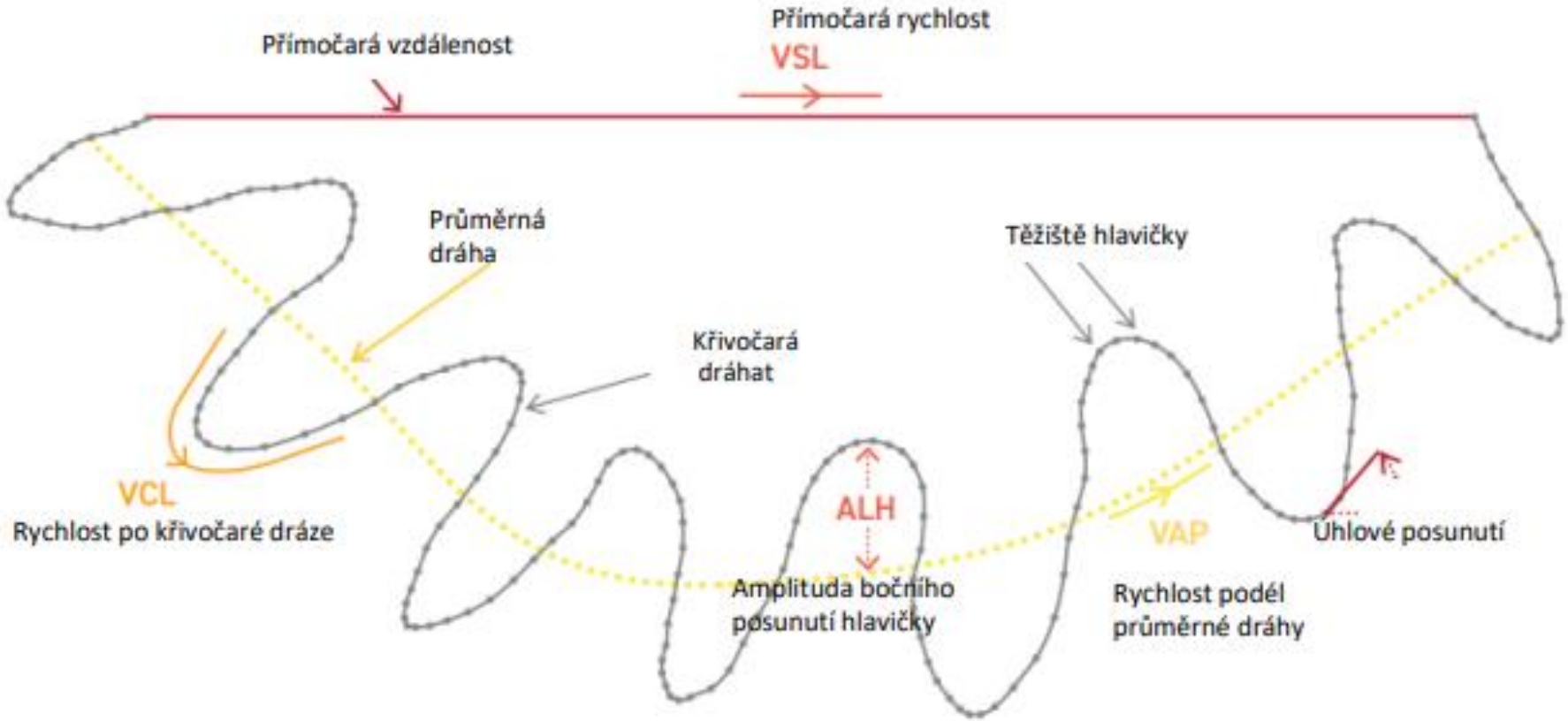
Motilita

- 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 (progresivní, rychlé, progresivní pomalé, neprogresivní, bez pohybu) a pomocí počítačové analýzy navíc frekvence kmitání bičíku, plocha kterou zahrnuje kmit bičíku, maximální amplituda vlny
- CASA (computer-aided semen analyzer) – pohyb hlavičky

(křivočará a přímočará rychlost, linearita)

- trajektorie, amplituda bočního posunutí hlavy


Přímočará vzdálenost
Přímočará rychlost
VSL
Průměrná
dráha
Křivočará
dráhat
Těžiště hlavičky
VCL
Rychlost po křivočaré dráze
ALH
Amplituda bočního
posunutí hlavičky
VAP
Rychlost podél
průměrné dráhy
Uhlové posunutí

µm/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 µm/s
- Podíl spermií pomalu progresivních (kategorie b) rychlost 5-25 µm/s
- Podíl spermií hýbajících se na místě (kategorie c)
- Podíl spermií bez pohybu (kategorie d)

Důležitost tréningu!

https://youtu.be/G42ep3OA5ws

Norma:

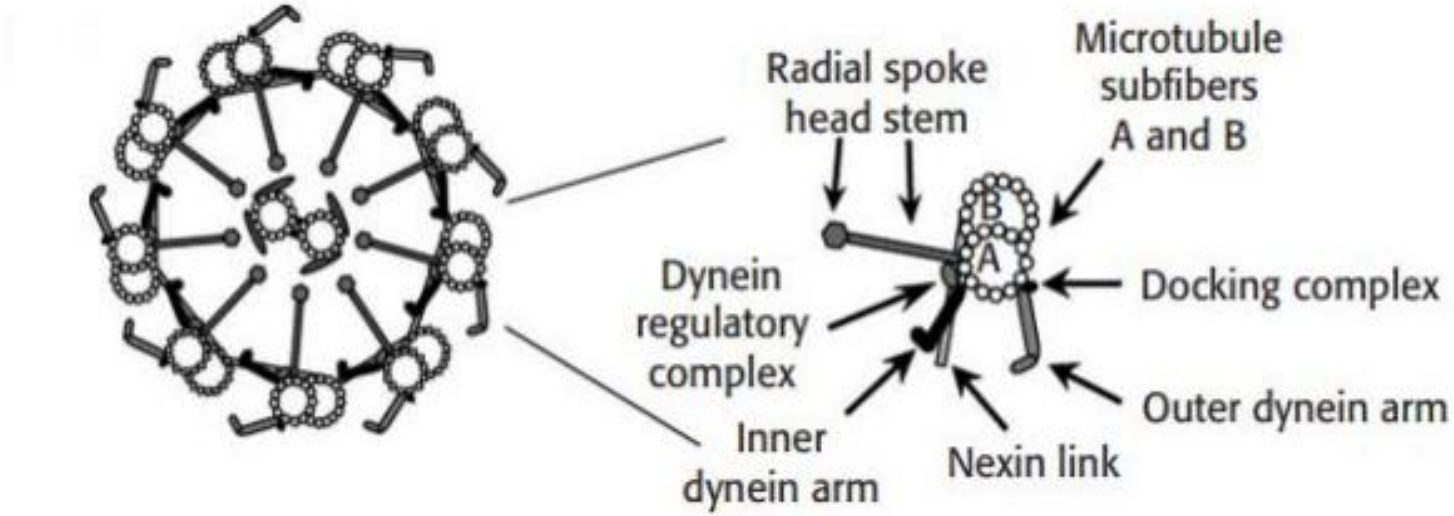
Podíl progresivních spermií ≥30%

Celkový podíl motilních spermií: ≥ 42%

• **Axonema** – struktura odpovědná za pohyb → vlny šířící se dozadu podél osy, aby vytvořily dopředný hnací tah

• 9 periferních dvojic mikrotubulů 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:

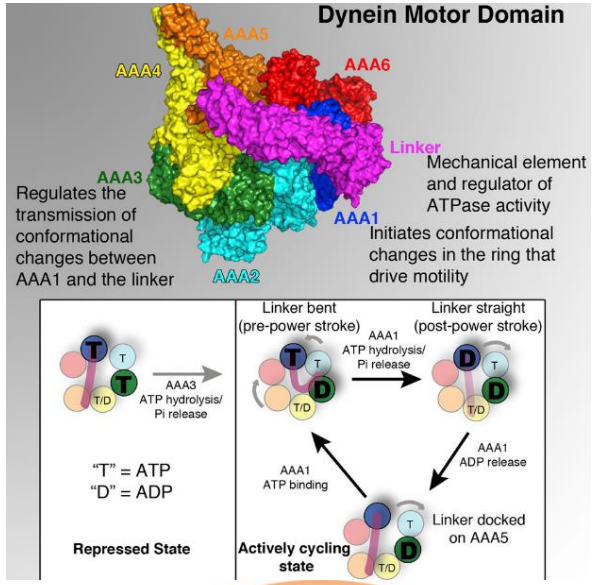
  těžký řetězec - centrální motorová část s vazebnými místy pro 4 ATP a mikrotubuly

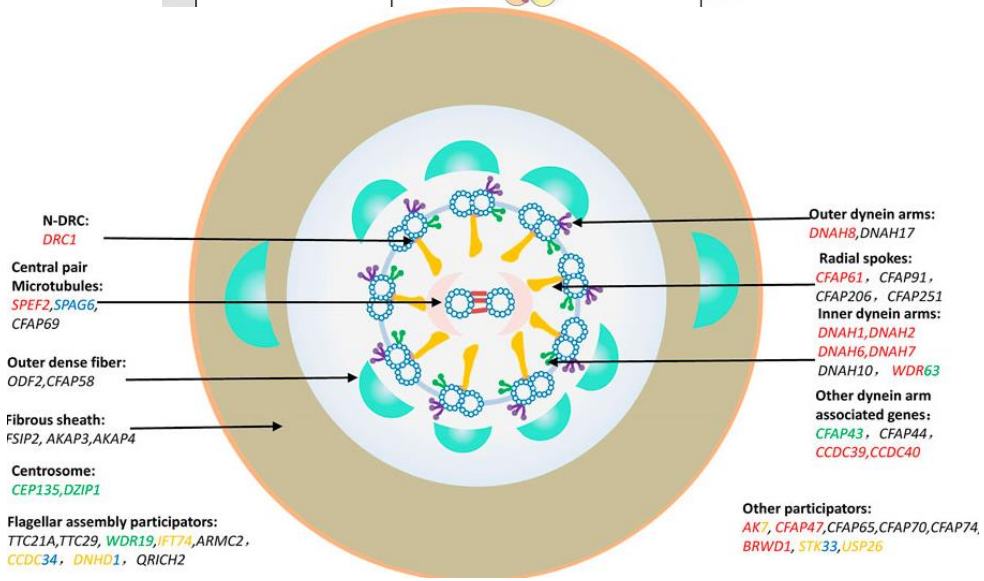
  střední řetězec – na bázi dyneinového ramene, ATP nesensitivní vazba ramen k mikrotubulům

  lehký řetězec – proteiny různých funkcí (vazba vápenatých iontů, struktury podobné thioredoxinu, struktury s repeticemi bohatými na leucin apod.)

- variabilita ve struktuře a funkci těchto jednotek

https://cell.com/fulltext/S0092-8674%2814%2901306-3





https://www.frontiersin.org/files/Articles/1034951/fgene-13-1034951-HTML/image_m/fgene-13-1034951-g002.jpg

- 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)

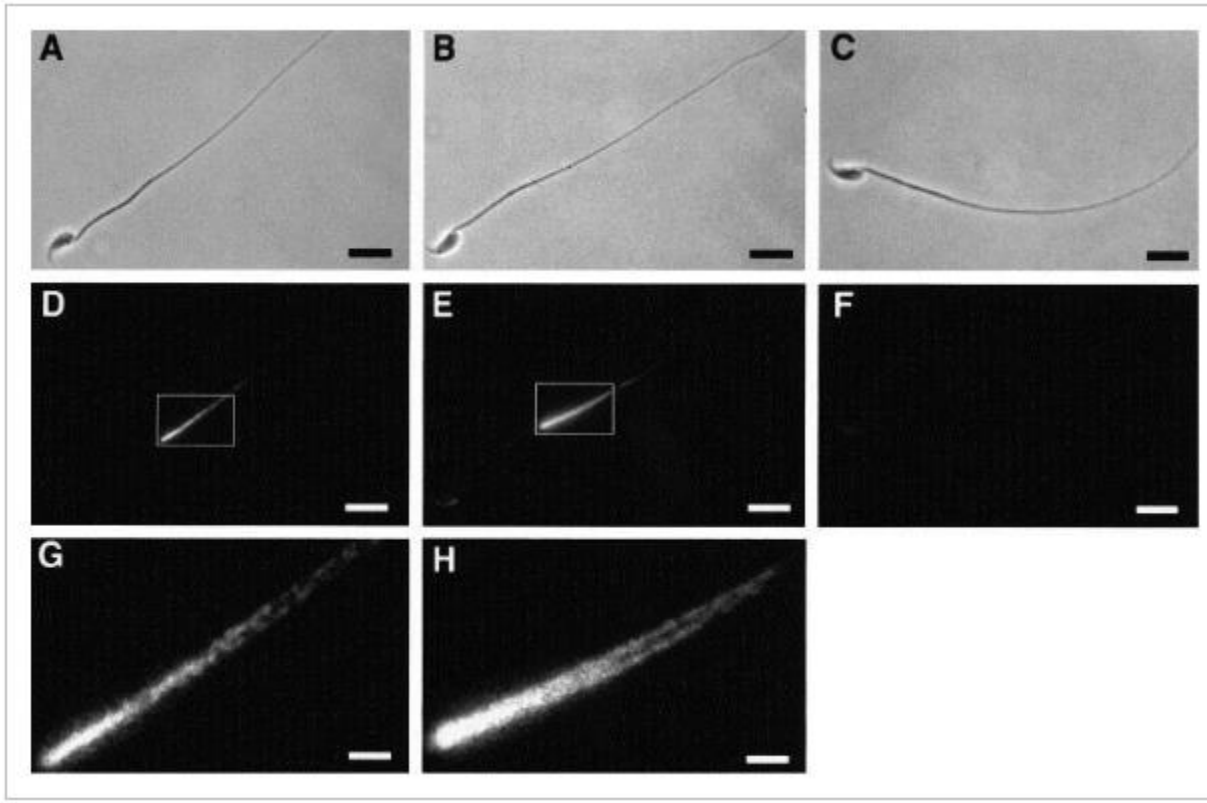
-opora a lešení pro enzymy které regulují a modifikují aktivitu dyneinů, senzor tlaku, mechanická zpětná vazba pro dyneinová ramena

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



https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2899%2900087-3

- Schopnost motilityje 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
- Hydriogenuhličitanový aniont (bikarbonát)– v semenné plasmě, aktivuje mnoho funkcí spermie, mimo jiné i iniciaci motility-zvyšuje intracelulární pH, stimuluje respirační aktivitu, zesiluje otevření napětím řízené kanály pro Ca2+a aktivují atypickou adenylyl cyklázu→ zvýšení koncentrace Ca2+ a cAMP→ stimulace pohybu

- Inhibitory fosfodiesterázy (↑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

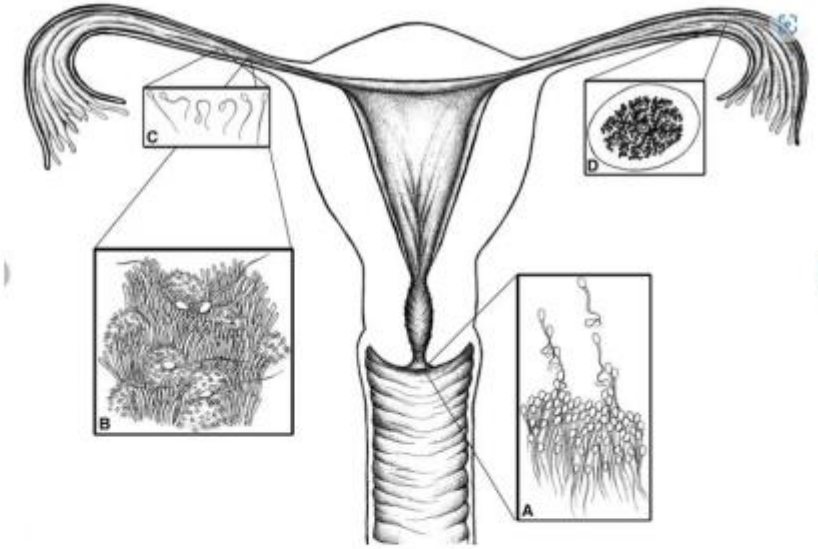
- Při kapacitaci spermií dochází k rychlému nárůstu buněčného cAMP a k efluxu cholesterolu z plazmatické embrány → zvýšení koncentrace hydrogenuhličitanových a vápenatých iontů →aktivace adenylylcyklázy → produkce dalších cAMP z ATP → hyperaktivní motilita a iniciace akrozomální reakce

- Viz video normální vs hyperaktivovaný pohyb
- What hyperactive sperm looks like - Curious (science.org.au)

Stimulace pohybu v ženském pohlavím traktu

Mnoho chemických i fyzikálních stimulů →

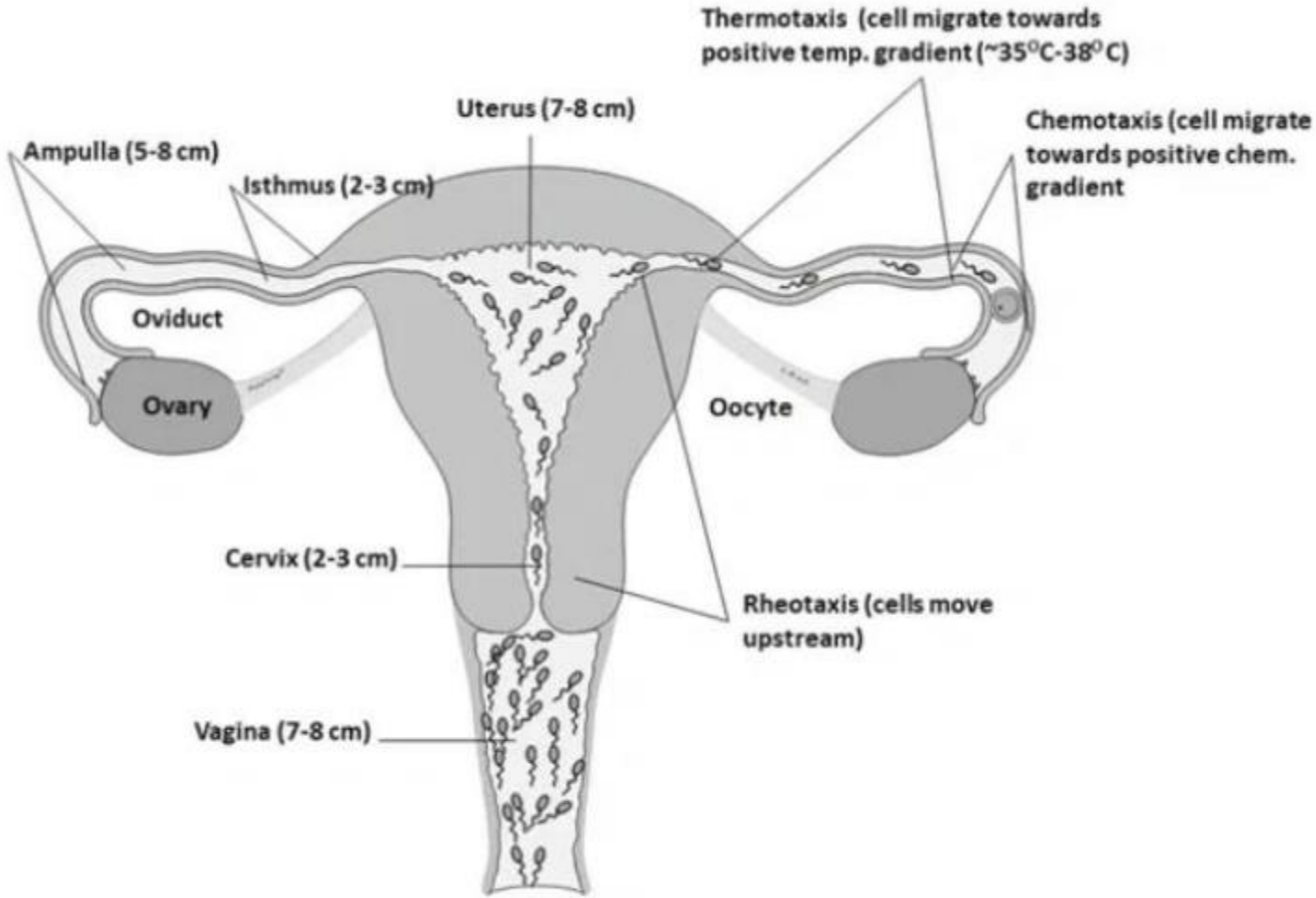
- Chemotaxe – pohyb stimulovaný chemoatraktantem; progesteron, estrogen, ANP (atrial natriuretic peptid), chemický gradient
- Haptotaxe -buňky se pohybují ve směru gradientu molekul
- Termotaxe- pohyb v reakci na teplotní rozdíl (mezi isthmem a místem oplození je až 2◦C)
- Rheotaxe –odmytí bakterií, dalších buněk a buněčných úlomků z ejakulátu, selekce na základě motility-pohyb proti proudu



a

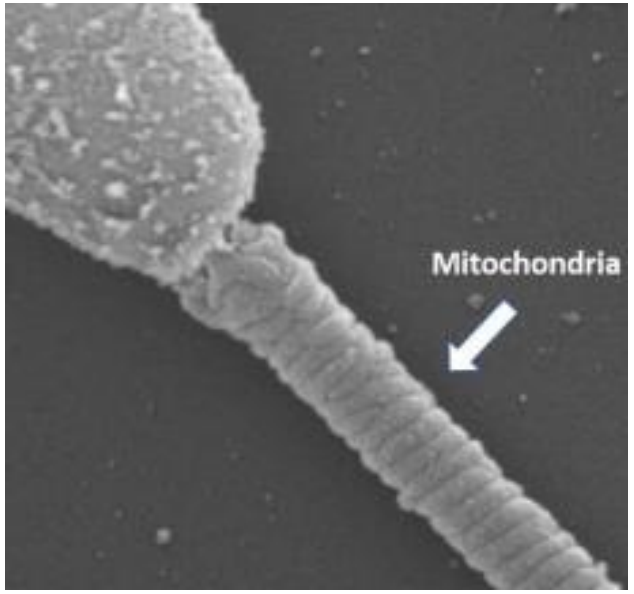
A: spermie vstupují do cervikálního hlenu na zevním čípk
B: interakce s endosalpingeálním epitelem vejcovodu
C: hyperaktivovaný pohyb ve vejcovodu
D: oocyt v kumulu

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



Sperm swimming in the female reproductive tract (beezbiotech.com)

Mitochondrie spermií



- významná role pro schopnost oplození oocytu, zdroj ATP

pro primární homeostázu a částečně pro pohyb

- Oxidační fosforylace
- proces generování ATP a funkční dynamika nejsou plně objasněny
- Ca2+ -hlavní regulátor oxidační fosforylace; primární metabolický mediátor pro produkci NAD, regulace enzymatické aktivity pyruvátdehydrogenázy, isocytrátdehydrogenázy a α-ketoglutarátdehydrogenázy, produkce ATP (posforylace 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)

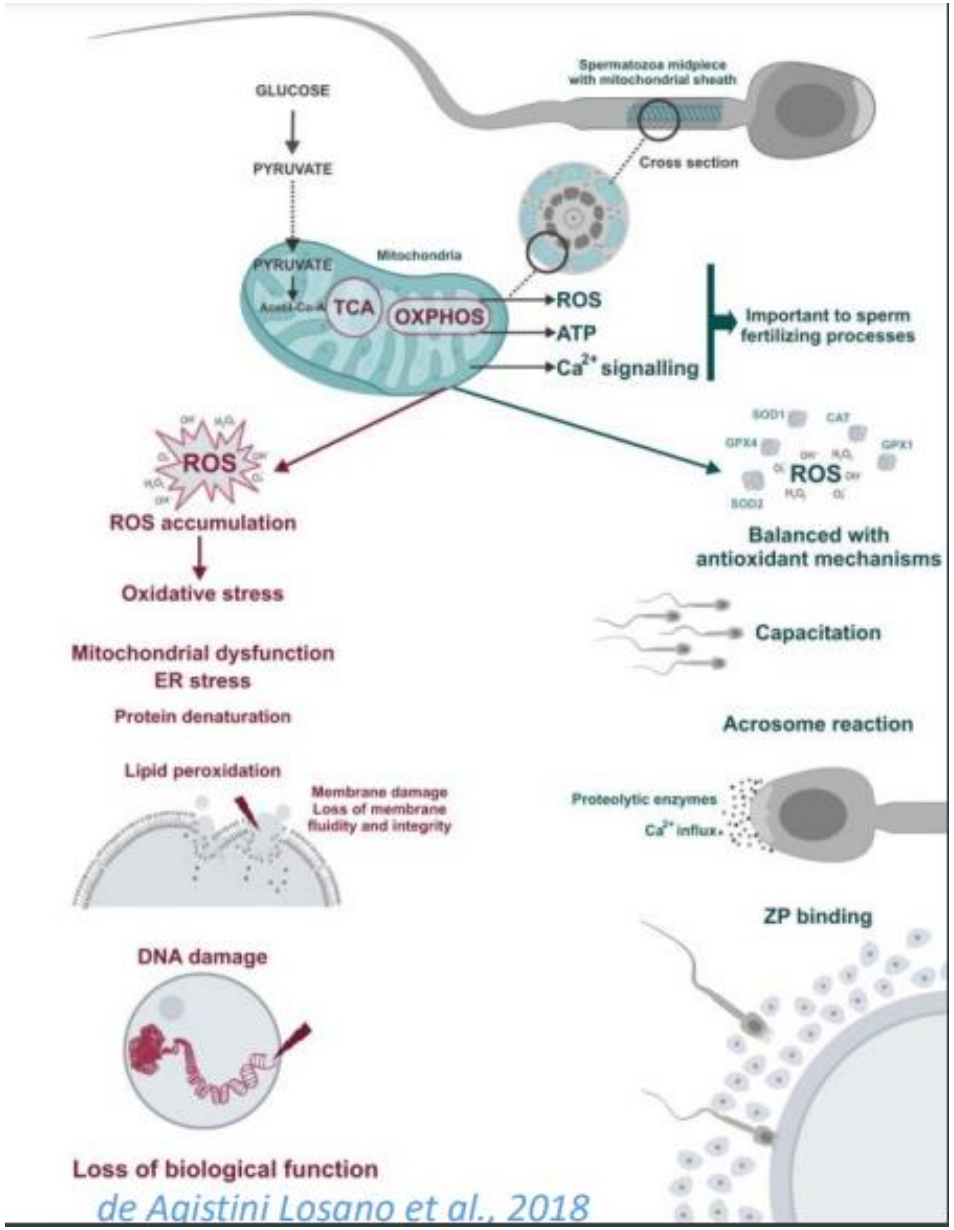
https://info.selectbreeders.com/blog/the-sperm-mitochondrion-organelle-of-many-functions

Fyziologická a patologická funkce mitochondrií spermií

ROS - důležitá role ve fyziologii spermií

- spouštěče procesů oplodnění (hyperaktivace, akrozomální reakce a vazba spermie na oocyt) mitochondriální dysfunkce→ nerovnováha mezi produkcí ROS a antioxidační kapacitou → oxidační stres → poškození struktur spermií, peroxidace lipidů plazmatické membrány a poškození DNA → ztráta biologických funkcí spermií

- reparace struktur spermií není možná- chybí cytoplazmatické reparační enzymy



Mechanismus vziku 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 prekursory 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 antioxidnatů jako přídavků do média?