

МЕХАНИЗМЫ ПРОГЕСТЕРОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В СПЕРМАТОЗОИДАХ

Коробкина Ю.Д., Балабин Ф.Н., Симоненко Е.Ю., Свешникова А.Н.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: juliajessika@gmail.com

Поступила в редакцию: 16.07.2018.

Аннотация. В человеческих сперматозоидах акросомная реакция и гиперактивация, два важных события оплодотворения, регулируются концентрацией свободных ионов кальция в цитоплазме клетки. Оба данных события могут быть индуцированы стероидным гормоном прогестероном, который опосредованно активирует находящийся в жгутике сперматозоида кальциевый канал CatSper. Сквозь него ионы кальция входят в клетку и диффундируют в шейку сперматозоида, где присутствует изоформа фермента фосфолипазы C PLC δ . Её активность повышается при повышении концентрации ионов кальция; она катализирует производство вторичного мессенджера инозитолтрифосфата из мембранного фосфолипида фосфатидилинозитола 4,5-бисфосфата. Инозитолтрифосфат активирует расположенные на кальциевом депо сперматозоида RNE инозитолтрифосфатные канал-рецепторы, способствуя выходу ионов кальция в цитоплазму.

Ключевые слова: сперматозоиды, кальциевая сигнализация, математическое моделирование, прогестерон.

Свободные ионы кальция являются универсальными переносчиками сигнала внутри клетки; их концентрация в цитоплазме зависит от работы десятков различных каналов, регулируемых активацией клеточных рецепторов. Кальций, в свою очередь, быстро и часто обратимо активирует различные клеточные ферменты и катализирует закрытие собственных каналов в мембране.

Кальциевая сигнализация встречается практически во всех, даже невозбудимых, клетках эукариот. Исключением не являются и человеческие сперматозоиды.

Кальциевый сигнал является одним из важных регуляторов процесса оплодотворения. Два ключевых события оплодотворения – акросомная реакция и гиперактивация – индуцируются повышением концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме клетки [1].

Акросомная реакция (рис. 1) – экзоцитоз акросомы, фермент-содержащей органеллы, находящейся в передней части головки спермия. Её содержимое – гиалуронидаза и акрозин – способно растворять прозрачную оболочку яйцеклетки [1].

Гиперактивация – изменение характера движения жгутика спермия для облегчения его перемещения в вязкой среде. Гиперактивация связана с изменением характера потребления кислорода в митохондриях [2].

Было показано, что повышение концентрации кальция может быть индуцировано стероидным гормоном прогестероном [6]. Он опосредованно активирует кальциевый канал CatSper, расположенный в хвостовом отделе спермия, через который кальций из внешней среды входит в клетку.

CatSper – один из важнейших кальциевых каналов в сперматозоиде; ток через данный канал – один из немногих кальциевых токов, которые можно обнаружить в зрелом спермии. Данный канал расположен в середине жгутика, однако, как ни странно, является важной частью механизма, приводящего к акросомной реакции. В покое он ингибируется 2-арахидоноилглицеролом, в избытке присутствующем в мембране клетки. Липаза AVHD2, которая расщепляет ингибитор, напрямую активируется прогестероном [1].

Вошедшие через CatSper в клетку ионы кальция диффундируют в головку спермия, где находится фермент фосфолипаза C. В человеческих сперматозоидах присутствует несколько изоформ фосфолипазы C, однако существенно активной является только одна – фосфолипаза C δ , чья активность повышается при повышении концентрации ионов кальция. Фосфолипаза C катализирует производство инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ3), активирующего каналы-рецепторы к ИФ3 (ИФ3Р), расположенные в мембране внутриклеточного хранилища кальция в сперматозоиде. Открытие каналов-рецепторов способствуют выходу ионов кальция в цитоплазму. В отличие от большинства соматических клеток, в которых кальциевым депо является эндоплазматический

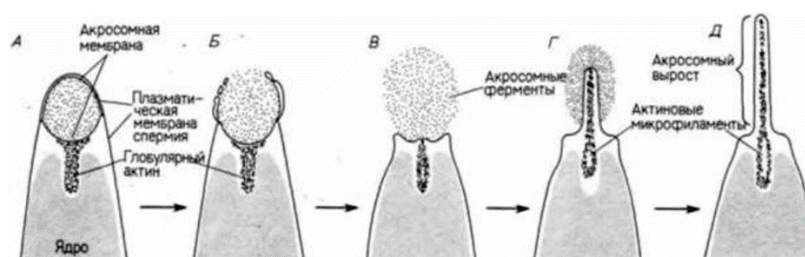


Рисунок 1. Акросомная реакция (Гилберт С. Биология развития в трех томах, т.1)

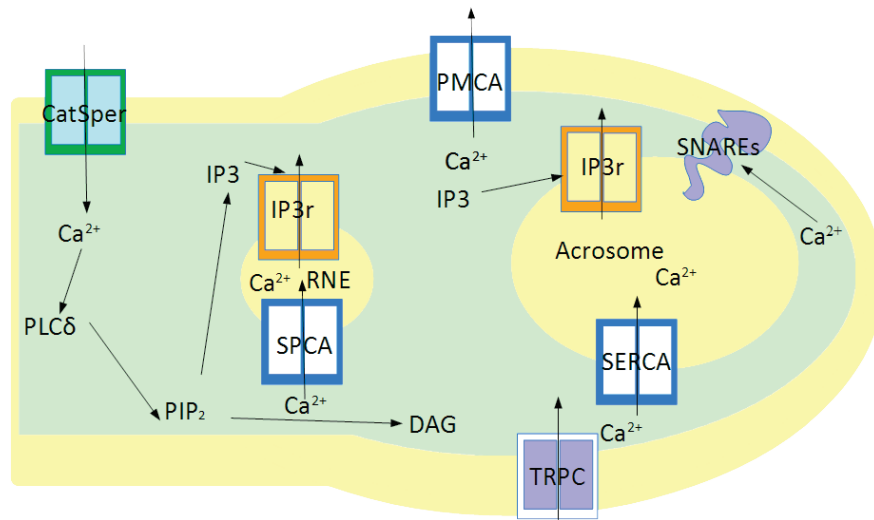


Рисунок 2. Схема кальциевой сигнализации в сперматозоиде

ретикулум, в сперматозоиде им служит специфичная для данного типа клеток органелла RNE (redundant nuclear envelope), образующаяся из ядерной оболочки в ходе созревания сперматозоида.

Целью настоящей работы является анализ механизмов кальциевой сигнализации в сперматозоидах при стимуляции канала CatSper прогестероном.

Для исследования активации сперматозоидов прогестероном было использовано два подхода, эксперимент и математическое моделирование. Эксперименты проводились на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse TI; образцы, полученные от здоровых доноров, инкубировались с чувствительной к концентрации кальция флуоресцентной меткой Fura Red и фиксировались в проточных камерах, покрытых поли-L-лизином (рис. 3). Изменение флуоресценции кальциевой метки при активации сперматозоидов 5 μM раствором прогестерона регистрировалось в режиме эпифлуоресценции; местоположение клеток контролировалось в режиме DIC. Далее относительное изменение флуоресценции пересчитывалось в абсолютную концентрацию кальция.

Также на основе существующей модели кальциевой сигнализации в сперматозоидах [1] и схемы реакций (рис. 3) была построена система дифференциальных уравнений в частных производных. Данная система была проинтегрирована с помощью библиотеки SciPy языка программирования Python и программного пакета COPASI. Подбор констант модели производился на основе существующих экспериментальных данных по динамике концентрации кальция в цитоплазме [1, 5].

В отличие от существующих моделей кальциевой сигнализации в сперматозоидах, в данной работе проводилось моделирование динамики кальция в кальциевом депо RNE. Также нами была использована другая модель ИФЗР, соответствующая типу рецептора, присутствующего в сперматозоидах [2, 3]. Ещё одним отличием являлось то, что оценки максимального тока в случае полностью открытых ИФЗР были основаны на количестве копий ИФЗР в спермии, полученных на основе данных о протеомике сперматозоида, и экспериментальной зависимости тока через единичный ИФЗР от концентрации кальция в депо [4].

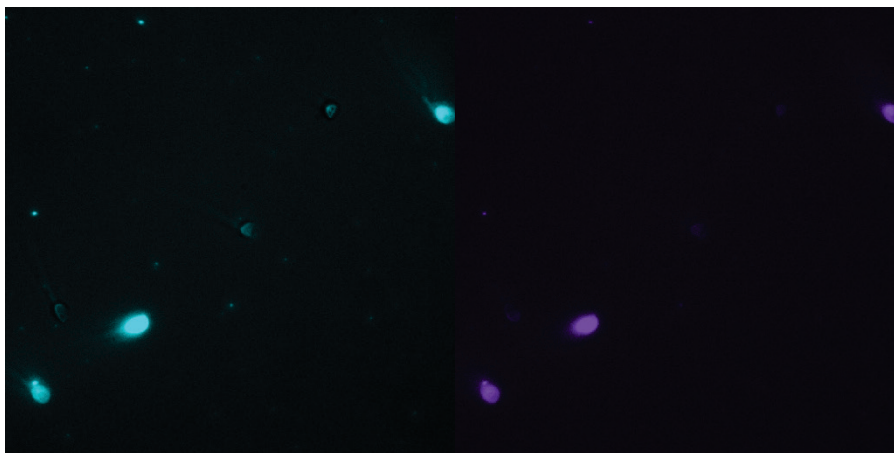


Рисунок 3. Имобилизированные на полилизине сперматозоиды, окрашенные Fura Red. Слева – флуоресценция связавшейся с кальцием краски, справа – несвязавшейся

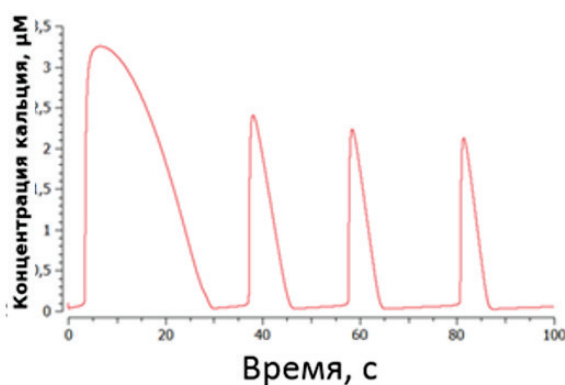


Рисунок 4. Предсказанные с помощью математического моделирования кальциевые осцилляции

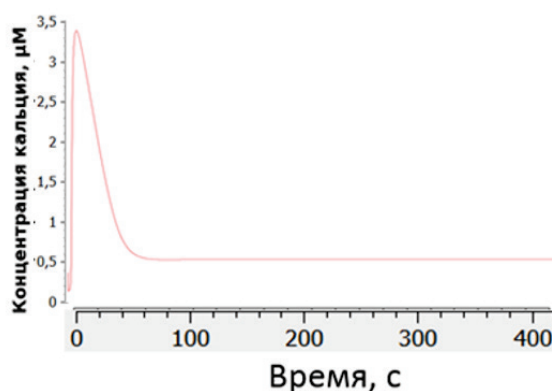


Рисунок 5. Результат математического моделирования – одиночный кальциевый пик

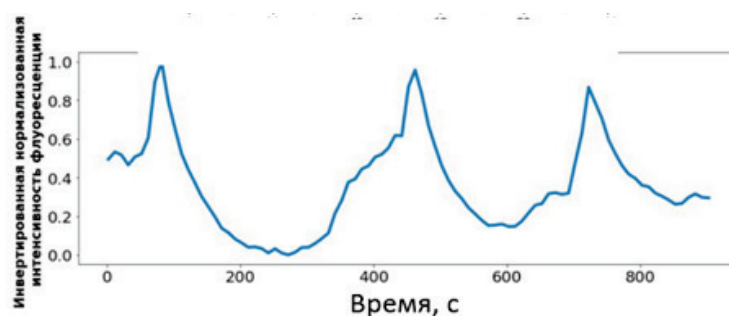


Рисунок 6. Кальциевые осцилляции в сперматозоиде, активированном 5 μM прогестероном. Осцилляторный ответ

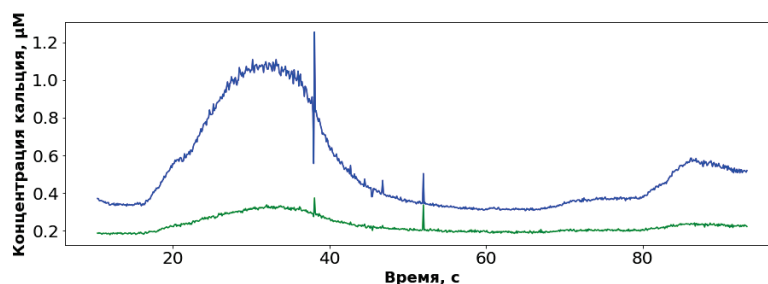


Рисунок 7. Ответ на активацию 5 мМ прогестероном. Зеленая кривая – концентрация кальция в головке сперматозоида, голубая – в шейке

Экспериментально нами были обнаружены два типа динамики концентрации кальция в человеческих сперматозоидах при активации прогестероном. Большая часть клеток отвечала на стимуляцию начальным пиком концентрации кальция и дальнейшим её стабильным поднятием по сравнению с концентрацией покоя (рис. 7). Примерно в 10 % клеток наблюдались следующие за начальным пиком низкочастотные осцилляции ($T \sim 300$ с) (рис. 6). В существующей литературе также были описаны осцилляции концентрации кальция при активации прогестероном, но их период составлял ~ 60 с [2].

Построенная нами математическая модель в зависимости от параметров связывания кальция с инозитолтрифосфатным рецептором способна описывать как одиночный пик концентрации кальция (рис. 5), так и осцилляторный ответ (рис. 4).

Таким образом, нами был подтвержден путь прогестероновой активации гиперактивации и акросомной реакции в сперматозоидах, а также построена достоверная модель кальциевой сигнализации в данной клетке.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

Список литературы / References:

1. Li L.F. [et al.] Modeling of progesterone-induced intracellular calcium signaling in human spermatozoa. *J. Theor. Biol.*, 2014.
2. Kuroda Y., Kaneko S., Yoshimura Y., Nozawa S., Mikoshiba K. Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptors in human sperm? *Life Sci.*, 1999, vol. 65 (2), pp. 135-43.
3. Cai X., Li X., Qi H., Wei F., Chen J., Shuai J. Comparison of gating dynamics of different IP3R channels with immune algorithm searching for channel parameter distributions. *Phys Biol.*, 2016, vol. 13 (5), pp. 056005.
4. Horia Vais, Kevin Foskett J., Don-On Daniel Mak. Unitary Ca²⁺ current through recombinant type 3 InsP3 receptor channels under physiological ionic conditions. *J. Gen. Physiol.*, 2010, vol. 136 (6), pp. 687-700.
5. Xia J., Reigada D., Mitchell C.H., Ren D. CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biol. Reprod.*, 2007, vol. 77 (3), pp. 551-559.
6. Lishko P.V., Botchkina I.L., Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca_v2 channel of human sperm. *Nature*, 2011, vol. 471 (7338), pp. 387-391.

MECHANISMS OF PROGESTERONE-INDUCED CALCIUM SIGNALING IN SPERMATOZOA

Korobkina J.D., Balabin F.N., Simonenko E.Yu., Sveshnikova A.N.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory, 1, 119991, Moscow, Russia; e-mail: juliajessika@gmail.com

Abstract. In human spermatozoa acrosome reaction and hyperactivation, two important fertilization events, are regulated by free calcium ion concentration in cell cytosol. Both of those events can be induced by progesterone, a steroid hormone which indirectly activates CatSper. CatSper is a cation channel located in sperm flagella; calcium ions enter cytosol through the open channel and then diffuse into spermatozoon midpiece, where a specific isoform of phospholipase C, PLC δ , is located. Activity of this enzyme is upregulated by calcium concentration rise; PLC δ catalyzes inositol-1,4,5-triphosphate production from a membrane phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. IP3 activates IP3 channel-receptors located on the spermatozoon calcium store, redundant nuclear envelope (RNE), and thus induces calcium release into cell cytoplasm through those receptors.

Key words: *spermatozoa, calcium signaling, mathematical modeling, progesterone.*