

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

© Ш.Н. Галимов, Ю.Ю. Громенко, Э.Ф. Галимова

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия.

Оплодотворение и эмбриогенез у млекопитающих инициируются последовательностью реакций, которая получила название «активация ооцитов». Процесс включает серию колебаний ионов кальция при участии фермента сперматозоидов фосфолипазы С дзета, который проникает в ооплазму при слиянии гамет. В обзоре представлены сведения об особенностях структуры, механизма действия и регуляции активности фермента. Показано, что дефицит активации ооцитов связан с аномалиями в строении, экспрессии и паттернах локализации фермента. Искусственная активация ооцитов с помощью ионофоров как единственный терапевтический вариант, доступный в настоящее время, является предметом дискуссий, особенно в отношении потенциального эпигенетического воздействия на эмбрион. Поэтому оправдан интерес к созданию и применению человеческого рекомбинантного белка фосфолипазы С дзета в качестве альтернативной формы терапии. Обсуждаются возможности клинического применения фермента для преодоления мужского бесплодия при дефиците активации ооцитов, а также более общих случаев этой патологии.

Ключевые слова: *бесплодие, активация ооцитов, фосфолипаза С дзета, ионы кальция.*

MOLECULAR AND IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF FERTILIZATION IN HEALTH AND DISEASE

© Sh.N. Galimov, Yu.Yu. Gromenko, E.F. Galimova

Bashkir State Medical University, Ufa.

Fertilization and embryogenesis in mammals are initiated by a sequence of reactions called «oocyte activation». The process includes a series of oscillations of calcium ions with the participation of the sperm enzyme phospholipase C zeta, which enters the ooplasm during gamete fusion. The review provides information on the features of the structure, mechanism of action, and regulation of enzyme activity. It was shown that the oocyte activation deficiency is associated with abnormalities in the structure, expression, and localization patterns of the enzyme. Artificial activation of oocytes by ionophores as the only therapeutic option currently available is a matter of debate, especially with regard to the potential epigenetic effects on the embryo. Therefore, the interest in the creation and use of the human recombinant protein phospholipase C zeta as an alternative form of therapy is justified. Possibilities of the clinical application of the enzyme for overcoming male infertility with an oocyte activation deficiency, as well as more general cases of this pathology, are discussed.

Key words: *infertility, oocyte activation, phospholipase C zeta, calcium ions.*

Сегодня существует множество эффективных методов лечения бесплодия у женщин, однако у мужчин возможности коррекции ограничены [2, 16]. В мире от бесплодия страдает каждая седьмая супружеская пара, эта проблема затрагивает десятки миллионов человек. Разработка процедуры ЭКО явилась ключевым этапом создания

прорывных технологий в области биомедицины, достижения которой стали фундаментом для прогресса в терапии большинства тяжелых заболеваний. Наряду с этим, лечение бесплодия сталкивается с многочисленными проблемами, в частности, невысокой частотой наступления беременности и повторными неудачами имплантации [3, 16]. Этому может способствовать множество факторов, ассоциированных с характером процесса оплодотворения, поэтому вероятность беременности за цикл составляет менее 20% у здоровых пар [10].

В обзоре изложены литературные сведения о молекулярных и иммунологических механизмах активации ооцитов как основного звена в череде клеточных событий при взаимодействии гамет. Пристальное внимание к этому процессу связано с тем, что его нарушения являются причиной отсутствия оплодотворения при ВРТ, особенно при интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ).

Размножение млекопитающих подразумевает высвобождение и слияние гамет, которые контролируются специфическими клеточными программами, трансформирующими яйцеклетку и сперматозоид в тотипотентный эмбрион. После созревания ооциты «замирают» на этапе метафазы второго мейотического деления (МII). Ослабление блока МII необходимо для последующего эмбриогенеза. Этот процесс, наряду с серией синхронизированных явлений, включая экзоцитоз кортикальных гранул, предотвращение полиспермии и развитие пронуклеусов, обозначается термином «активация ооцитов» [13].

Оплодотворение невозможно без инициации подъема клеточной концентрации свободного кальция (Ca^{2+}) в ооците. Временные характеристики колебаний уровня Ca^{2+} видоспецифичны и имеют уникальные закономерности амплитуды, длительности и частоты [11]. Предотвращение спайков Ca^{2+} ингибирует активацию и эмбриогенез, в то время как микроинъекции Ca^{2+} запускают эмбриональное развитие до

стадии бластоцисты. Таким образом, пульсации кальция являются обязательным условием АО.

Осцилляции ионов кальция в ооцитах млекопитающих обусловлены их выходом из внутриклеточных депо, опосредованного инозитолтрифосфатом (ИФ-3) [5]. Ооциты весьма чувствительны к точному профилю спайков Ca^{2+} , поскольку от характера этих колебаний зависит профиль экспрессии эмбриональных белков, а также процессы бластоцистогенеза и трансплантации эмбрионов. Принимая во внимание, что скорость прогрессирования клеточного цикла зиготы после оплодотворения предлагается в качестве показателя оптимального развития эмбриона [9], характер осцилляции Ca^{2+} при АО может иметь определяющее значение для эмбриогенеза.

Что касается природы факторов, ответственных за выброс кальция в ооцитах, то имеются доказательства наличия в сперме химических соединений, способных индуцировать мобилизацию Ca^{2+} после проникновения в яйцеклетку [8]. Успешное применение ИКСИ является вспомогательным доводом в поддержку гипотезы ведущей роли спермальных индукторов.

Стимуляция фосфатидилинозитольного каскада является необходимым этапом сдвигов кальциевого гомеостаза при оплодотворении и включает генерацию ИФ3 путем гидролиза фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (ФИФ2) с помощью фосфолипазы С (ФЛС). ИФ3 связывается со своим рецептором эндоплазматической сети, что сопровождается выделением Ca^{2+} . Конкретный изофермент ФЛС, который отвечает за активацию ооцитов млекопитающих, был впервые идентифицирован Saunders et al. в 2002 г. и получил название фосфолипаза С дзета – ФЛСζ [15]. Доказательства определяющей роли ФЛСζ были получены в многочисленных исследованиях. Так, что инъекция рекомбинантной кРНК и собственно фермента в ооциты приводила к изменениям Ca^{2+} , которые были аналогичны явлениям при оплодотворении, а также стимулировала

эмбриональное развитие. Примечательно, что характерный профиль колебаний кальция индуцировался в диапазоне концентраций рекомбинантного белка, соответствующих количеству фермента в отдельном сперматозоиде.

Наиболее важным доказательством идентичности ФЛСζ как фактора сперматозоидов, является изучение трансгенных животных с удаленным ферментом. Установлено, что сперматозоиды, полученные от модифицированных самцов с делецией нуклеотидов в 3 или 5 экзонах фермента, не активировали выделения кальция в ооцитах, подтверждая, что ФЛСζ является физиологическим стимулятором зачатия [7].

Дефекты активации ооцитов, сопряженные с недостаточностью ФЛСζ, могут лежать в основе некоторых форм бесплодия. Сперматозоиды бесплодных мужчин, которые не смогли оплодотворить ооциты после процедуры ЭКО/ИКСИ, оказались не способны вызывать спайки кальция, или вызывали колебания низкой частоты и амплитуды. В гене ФЛСζ у таких пациентов были найдены множественные мутации [6].

Показана также связь между концентрацией ФЛСζ, скоростью активации ооцитов и эмбриогенезом: введение возрастающих доз фермента приводило к росту частоты и амплитуды колебаний Ca^{2+} , которые изменяли профиль экспрессии генов в раннем эмбриогенезе [17]. С практической точки зрения важно, что дозы ФЛСζ, приводящие к успешной активации и физиологическому развитию до стадии бластоцисты, изменяются в диапазоне, который соответствует пределам концентраций фермента в фертильных сперматозоидах.

Клиническая роль ФЛСζ определяется тем, что сперматозоиды, неспособные активировать ооциты даже при ИКСИ, или полностью лишены способности инициировать потоки Ca^{2+} , либо вызывают аномальные амплитуды колебаний. С этих позиций наличие дефектных копий ФЛСζ объясняет отдельные варианты мужского бесплодия [6].

В клинике недостаточность ИКСИ обычно преодолевается при помощи искусственной активации ооцитов, например, посредством индукции высвобождения Ca^{2+} . Наиболее распространенным средством АО является ионофор A23187 (кальцимицин) [4, 14]. Иономицин, также используемый для активации ооцитов, более специфичен по сравнению с A23187 и может активировать ряд специфических ферментов для стимуляции экспрессии генов. Широкое применение этих агентов остается ограниченным, поскольку ооциты человека не очень чувствительны к ионофорам. Основной вопрос сводится к тому, что ионофоры не могут вызвать характерный профиль высвобождения Ca^{2+} , необходимый для полноценной активации гамет у людей.

Поэтому важно, чтобы активация происходила в физиологических условиях, и использование препаратов ФЛСζ может представлять перспективный метод коррекции этого процесса. Конструирование рекомбинантного ФЛСζ-белка было задачей лабораторий по всему миру с разной степенью успеха. В 2013 г. Nomikos et al. [12] заявили о получении высокоактивного варианта человеческой ФЛСζ, которая индуцировала характерные колебания Ca^{2+} при инъекции в ооциты.

Создание нативной ФЛСζ представляет собой биотехнологический прорыв в помощи пациентам с повторными неудачами ВРТ, однако неясно, будет ли полезен такой фермент пациентам, у которых оплодотворение наступает, но эмбриогенез не происходит. ФЛСζ является также диагностическим маркером, который призван уточнить требования к коррекции мужского бесплодия, потенциально снижая количество циклов, необходимых для достижения беременности. Серьезной проблемой остаются неизвестные факторы, лежащие в основе экспрессии ФЛСζ. Показано, что уровни и паттерны локализации фермента коррелировали с частотой оплодотворения после ИКСИ, но не ЭКО [18]. Этот факт указывает, что ФЛСζ является главным претендентом как прогностический критерий именно для ИКСИ. Можно также констатировать, что список

биомаркеров качества спермы и фертильного статуса в целом пополнился, наряду с показателями фрагментации ДНК и окислительного стресса, таким современным индикатором, как уровень экспрессии ФЛСζ.

Таким образом, ФЛСζ является признанным фактором сперматозоидов, которому принадлежит центральное место в механизмах оплодотворения млекопитающих. В независимых исследованиях продемонстрировано, что этот фермент является физиологическим триггером, необходимым не только для инициации выброса Ca^{2+} при активации ооцитов, но и для определения компетентности эмбриогенеза. Несмотря на значительный прогресс в расшифровке уникальных биохимических и иммунологических свойств этого фермента, точные механизмы функционирования ФЛСζ еще предстоит выяснить [1, 9].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 19-115-00008).

ЛИТЕРАТУРА

1. Галимова Э.Ф., Галимов Ш.Н. Мужская фертильность: модифицируемые и немодифицируемые факторы риска // Проблемы репродукции. - 2015; 5: 89-95.
2. Галимов Ш.Н., Божедомов В.А., Галимова Э.Ф., Павлов В.Н., Сухих Г.Т. Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты. - М: ГЭОТАР-Медиа, - 2020.
3. Павлов В.Н., Галимова Э.Ф., Ахмадуллина Г.Х., Галимов Ш.Н. Медико-биологические, социальные и культурно-образовательные аспекты охраны мужского здоровья. // Профилактическая и клиническая медицина. - 2014; 2(51): 5-13.
4. Литвинов В.В., Сулима А.Н., Харитонов М.А. и др. Клинический случай преодоления бесплодия, обусловленного мужским

фактором, методом интрацитоплазматической инъекции морфологически нормального сперматозоида с активацией ооцитов Ca^{2+} -ионофором. // Андрология и генитальная хирургия. - 2019; 2(3): 78-85.

5. Anifandis G, Michopoulos A, Daponte A, Chatzimeletiou K, Simopoulou M, Messini C, et al. Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects. // Syst Biol Reprod Med. - 2019; 65(1): 3-11.

6. Escoffier J, Lee HC, Yassine S, Zouari R, Martinez G, Karaouzène T, et al. Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WWbinding protein PAWP. // Hum Mol Genet. - 2016; 25: 878-91.

7. Hachem A, Godwin J, Ruas M, Lee HC, Ferrer Buitrago M, Ardestani G, et al. PLC ζ is the physiological trigger of the Ca^{2+} oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. // Development. - 2017; 14: 2914–2924.

8. Jones K.T. Mammalian sperm contain two factors for calcium release and egg activation: Phospholipase C zeta and a cryptic activating factor. // Mol Hum Reprod. - 2018; 24(10): 465-468. Doi: 10.1093/molehr/gay038.

9. Kashir J., Nomikos M., Lai F. Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions // Adv Biol Regul. - 2018; 67: 148-162. Doi: 10.1016/j.jbior.2017.10.012.

10. Leushuis E, van der Steeg J, Steures P, Repping S, Bossuyt PM, Mol BW, et al. Semen analysis and prediction of natural conception // Hum. Reprod. - 2014. Vol. 29. P. 1360-1367.

11. Machaty Z. Signal transduction in mammalian oocytes during fertilization. // Cell Tissue Res. - 2016; 363(1): 169–183.

12. Nomikos M, Kashir J, Swann K, Lai FA. Sperm PLC ζ : from structure to Ca^{2+} oscillations, egg activation and therapeutic potential. // FEBS Lett. - 2013; 587: 3609–3616.

13. 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.
14. Santella L, Dale B. Assisted yes, but where do we draw the line? // *Reprod Biomed Online.* - 2015; 31(4): 476-478. Doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.013.
15. 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; 129: 3533-3544.
16. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. // *Clin. Biochem.* - 2018; 62: 2-10. Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
17. 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; 65: 22-30.
18. 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; 104: 561–568.