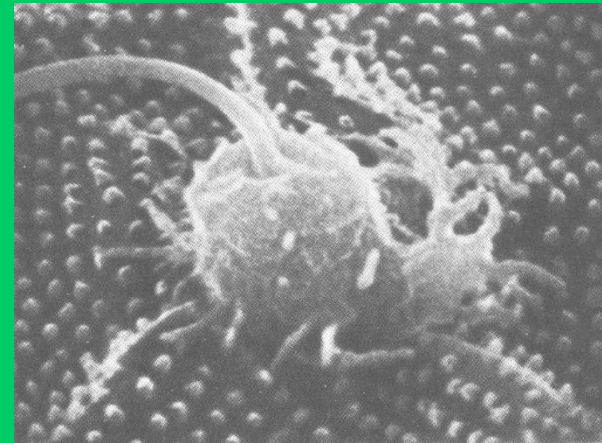


ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

лекция 3



Особенности процесса оплодотворения:

Оплодотворение – слияние сперматозоида с яйцеклеткой, завершающееся объединением их ядер в единое ядро оплодотворенного яйца (зиготы).

Готовность к оплодотворению определяется выделением направительных телец.

Функции:

- **половая** (комбинирование генов двух родителей) – передача генов от родителей потомкам;
- **репродуктивная** (создание нового организма) – включает инициацию в цитоплазме яйца тех реакций, которые позволяют продолжать развитие.

Роль спермия:

- **активация яйца** – побуждение яйцеклетки к началу развития;
- **внесение** в яйцеклетку генетического материала отца .

Классификация:

*по месту проникновения
сперматозоида в яйцеклетку:*

- **наружное** – во внешней среде;
- **внесение** – в половых путях самки.

*по количеству сперматозоидов,
участвующих в оплодотворении:*

- **моноспермное** – во внешней среде;
- **полиспермное** – в половых путях самки.

Стадии (фазы) оплодотворения:

- **дистантные взаимодействия** – осуществляются на некотором расстоянии, до соприкосновения гамет друг с другом;
- **контактные взаимодействия** – начинаются с момента контакта сперматозоида с третичной оболочкой яйцеклетки;
- **проникновение спермия в яйцеклетку** – в её основе лежит слияние плазматических мембран спермия и яйца;
- **слияние генетического материала** – приводит к формированию диплоидного ядра зиготы.

Дистантные взаимодействия гамет:

Направлены на повышение вероятности встречи сперматозоидов и яйцеклетки.

Характерны для водных организмов, с наружным типом оплодотворения.

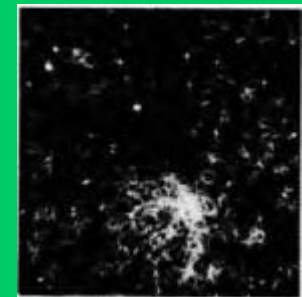
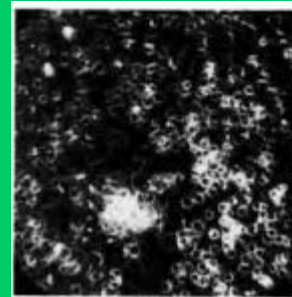
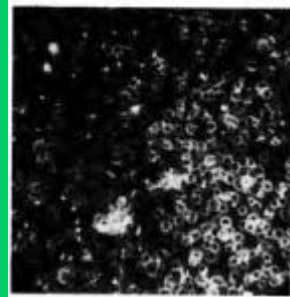
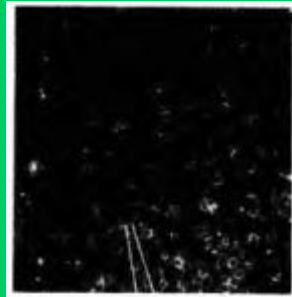
- встреча спермиев и яиц при их низкой концентрации в среде;
- предотвращение оплодотворения яиц спермиями другого вида.

Видоспецифичные привлечение спермиев и их активация (кишечнополостные, моллюски, иглокожие, первичнохордовые и т.п.)

Хемотаксис – движение по градиенту концентрации какого-либо вещества.

У морских ежей (пептиды студенистой оболочки яиц):

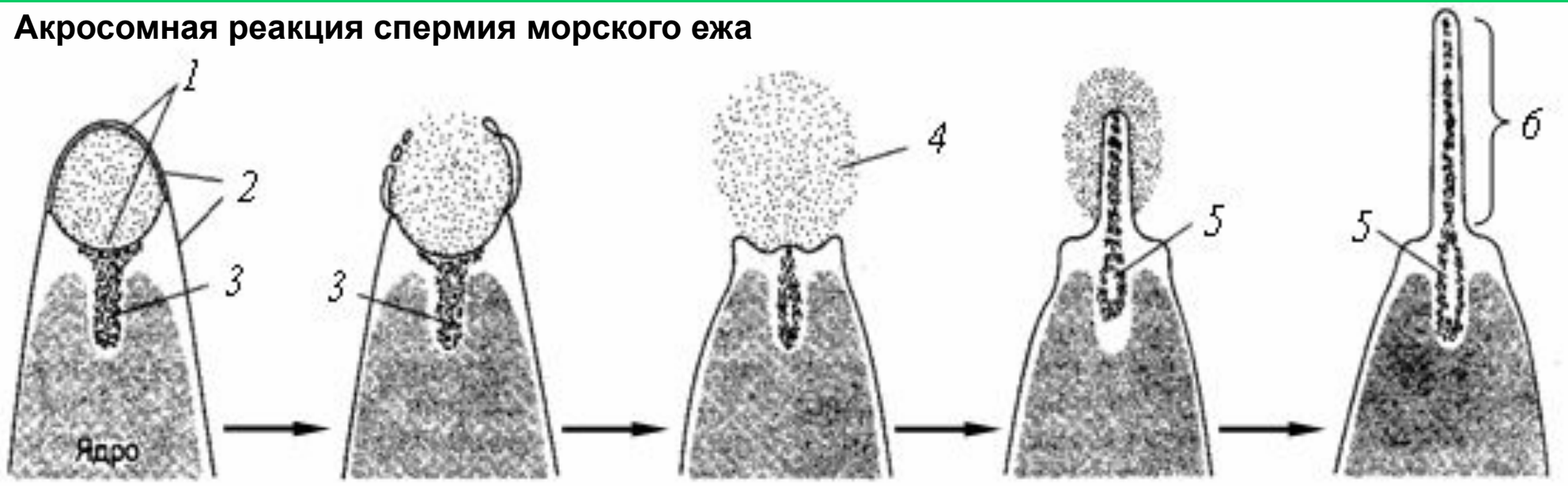
- **сперакт** (10 а.к.)
- **резакт** (14 а.к.)



Контактные взаимодействия гамет: акросомная реакция

- поступление Ca^{2+} в головку спермия
- экзоцитоз акросомного пузырька (выброс протеолитических ферментов)
- активация Na^+/H^+ -обменника (защелачивание цитоплазмы)
- полимеризация глобулярного актина (образование акросомного выроста)
- активация динеиновой АТФ-азы (увеличение подвижности спермия)
- повышение осмотического давления (способствует удлинению акросомального выроста)

Акросомная реакция спермия морского ежа



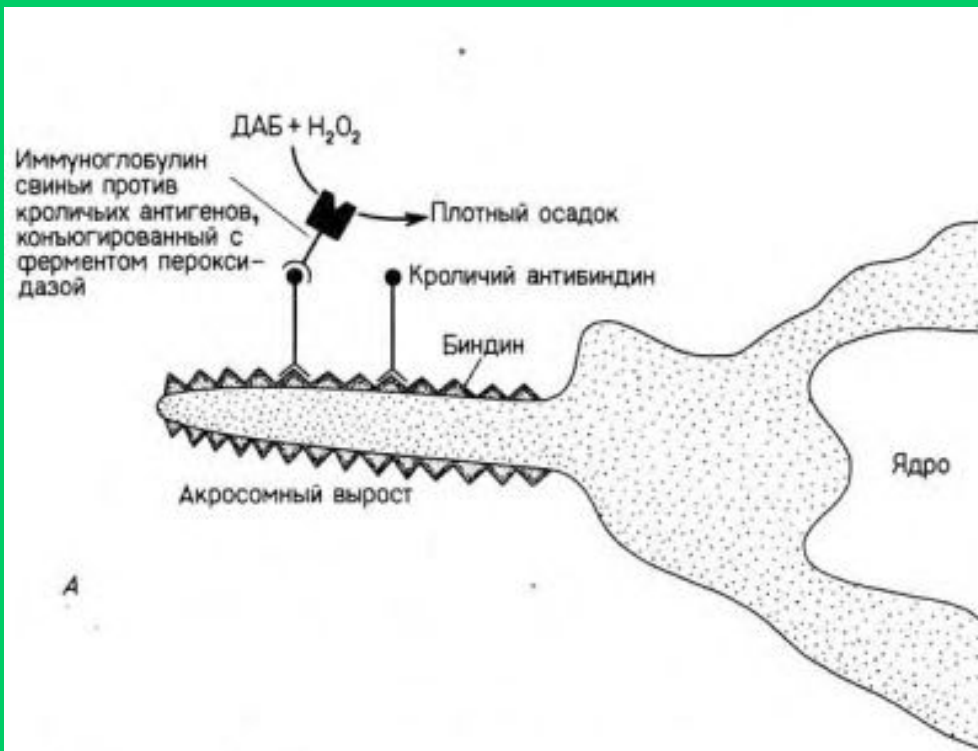
Контактные взаимодействия гамет:

Узнавание спермия и яйцеклетки

Морские ежи:

Видоспецифичное узнавание при помощи белка (**биндина**), расположенного на поверхности акросомного выроста.

На желточной оболочке яйца находится гликопротеиновый комплекс (рецептор), способный образовывать связи с биндином.



Локализация биндина на акросомном выросте (по Гилберту, 1993) ДАБ – диаминобензидин.

Капацитация (1):

Спермии млекопитающих после эякуляции не способны к акросомной реакции.

Капацитация – приобретение спермием оплодотворяющей способности

Половые пути самки принимают активное участие в процессе оплодотворения.

Суть процесса капацитации:

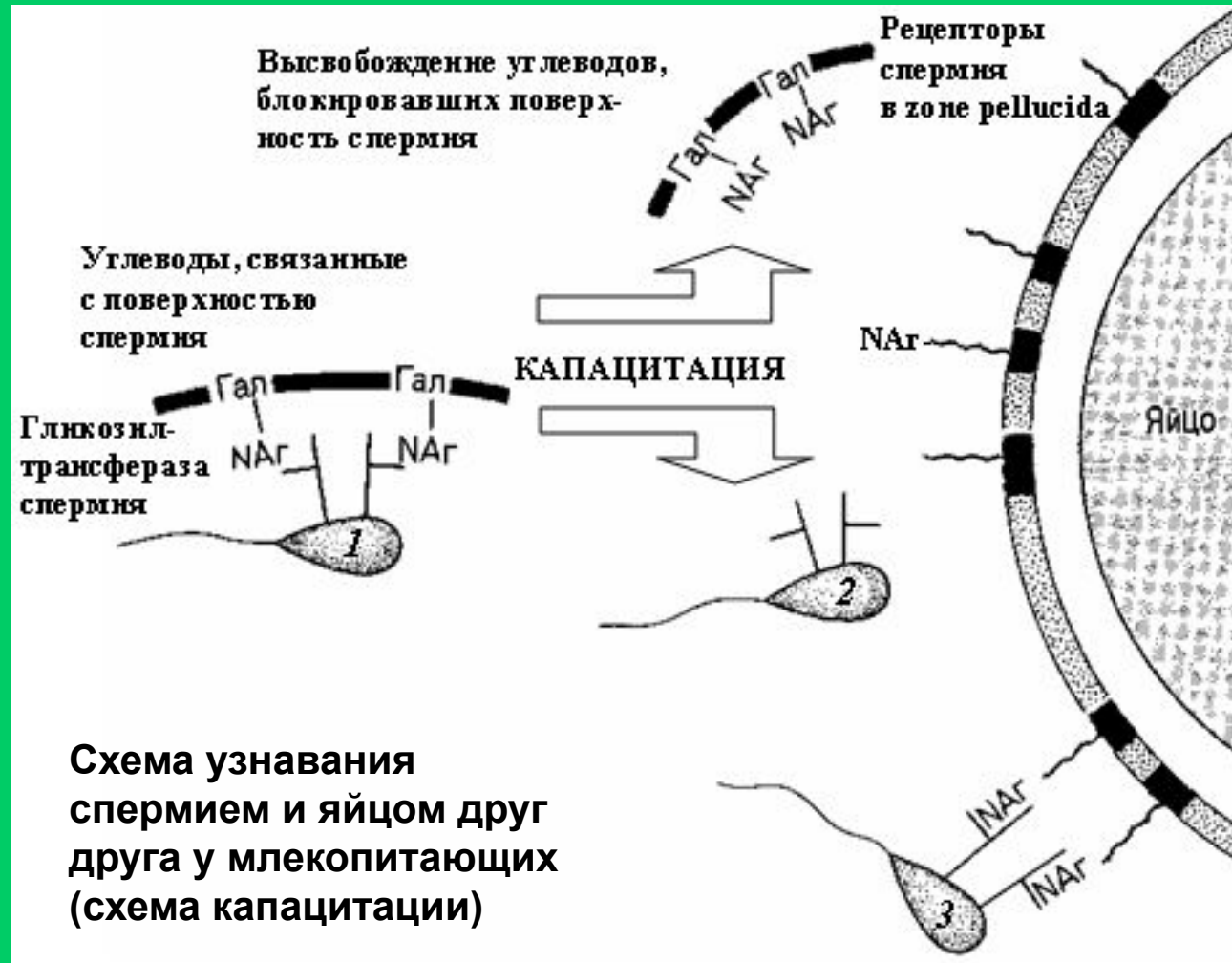
- изменение структуры клеточной мембраны;
Снижение соотношения холестерин : фосфолипиды в мембране спермия (молекулы альбумина половых путей самки отнимают холестерин у спермия) – дестабилизация мембраны акросомного пузырька – возможность осуществления акросомной реакции.
- удалении с поверхности спермия особых факторов
оставаясь на поверхности спермия “coating factors” препятствуют оплодотворению

Капацитация (2):

Поверхность спермия содержит

гликозилтрансферазу (узнаёт концевые остатки N-ацетилглюкозамина на прозрачной оболочке яйцеклетки)

В спермиях, не прошедших капацитации, **активные центры** фермента **блокированы** остатками N-ацетилглюкозамина (NAg) и галактозы (Гал).



При капацитации углеводы отделяются от поверхности спермия, **освобождая** активные центры гликозилтрансфераз.

Гликозилтрансферазы **узнают** N-ацетилглюкозаминовые остатки в молекуле гликопротеина, расположенного на поверхности прозрачной оболочки (рецептор спермия).

Проникновение спермия у млекопитающих:

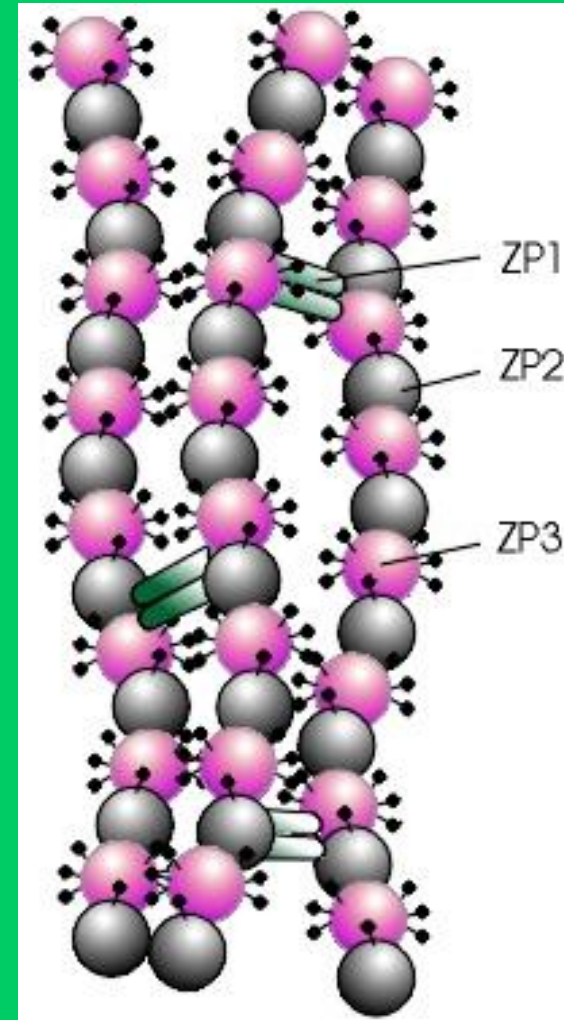
Блестящая оболочка яйцеклетки

– *видоспецифичный* барьер для связывания и проникновения спермиев собственного вида; Абсолютной (100 %) защиты от проникновения спермия другого вида не даёт (е.г. лошадь + осёл = мул), однако удаление блестящей оболочки позволяет оплодотворять яйцеклетку спермиями другого вида.



Типы гликопротеинов (*zona proteins*, ZP):

- **ZP1** – сшивает белки ZP2 и ZP3, находясь перпендикулярно по отношению к ним;
- **ZP2** – расположен параллельно поверхности яйца. Взаимодействует с *акрозином* (протеолитический фермент акросомы), лизирующим блестящую оболочку;
- **ZP3** – расположен параллельно поверхности яйца. Необходим для взаимодействия с рецепторами спермия: терминальной галактозой, N-ацетилглюкозамином, гликопротеином плазматической мембраны.

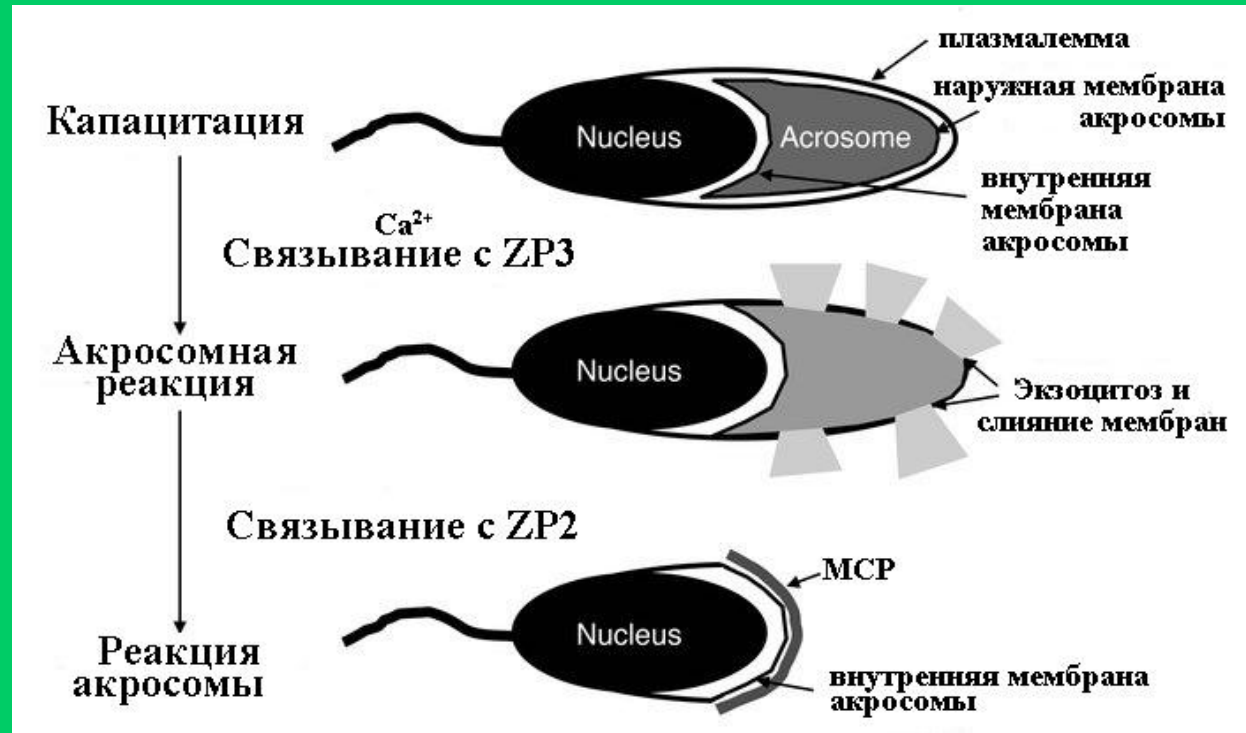


Проникновение спермия у млекопитающих:

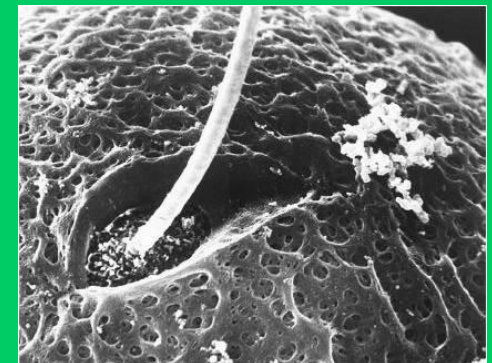
У млекопитающих активация сперматозоида не сопровождается ни образованием микроворсинок, ни образованием акросомного выроста.

Акросомная реакция у млекопитающих:

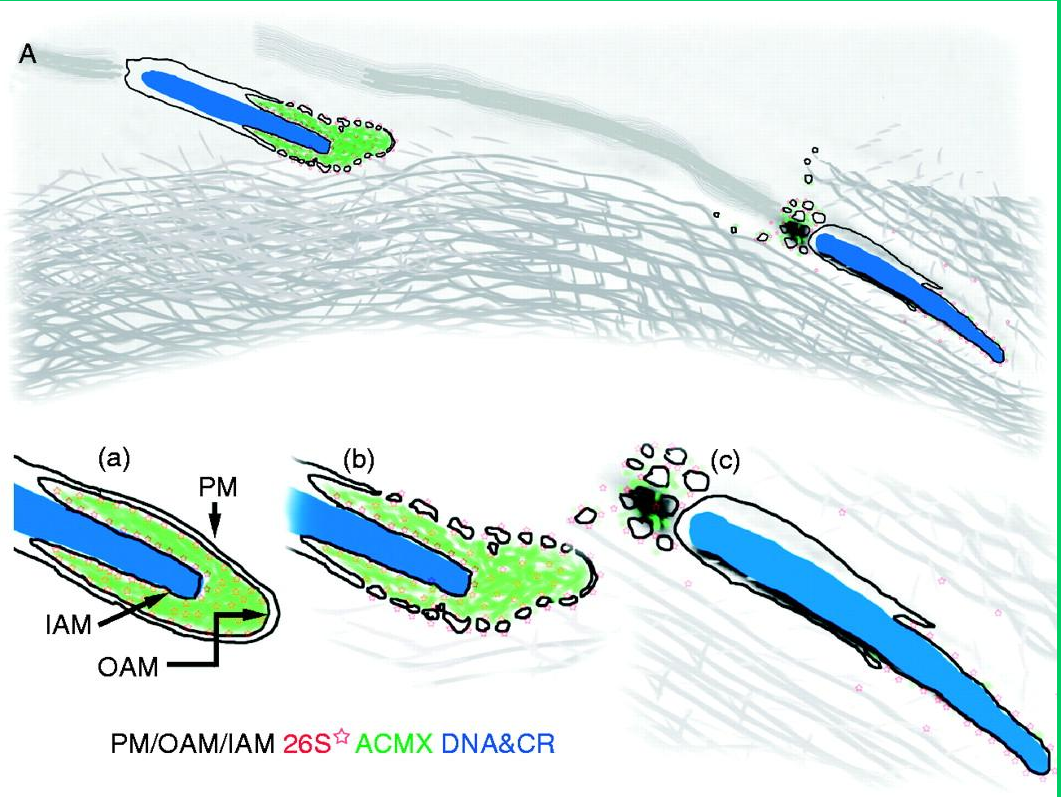
- сперматозоид контактирует с яйцом не вершиной, а боком;
- диссоциация наружной мембраны головки сперматозоида и мембраны акросомы (на поверхности, расположенной вдоль головки сперматозоида);
- ферменты акросомы растворяют клетки лучистого венца;
- сперматозоид вступает в контакт с блестящей оболочкой



Membrane cofactor protein (MCP; CD46) экспрессируется на внутренней мембране акросомы.



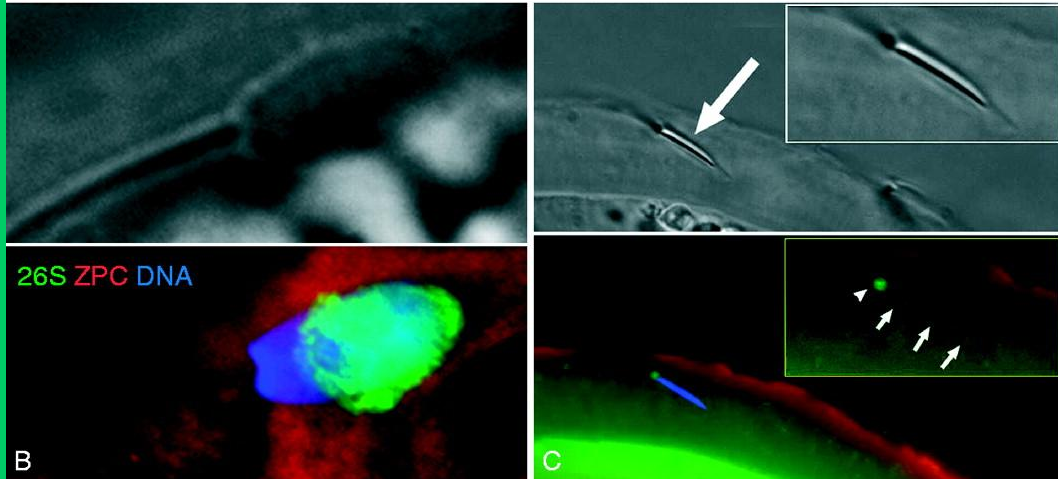
Проникновение спермия у млекопитающих:



А – экзоцитоз акросомы (иммунофлуорестенция и электронная микроскопия): а – интактная акросома, б – связывание спермия и блестящей оболочки, с – проникновение спермия через блестящую оболочку;

В – локализация протеасом у спермия, связанного с блестящей оболочкой яйцеклетки;

С – локализация протеасом у спермия, проходящего через блестящую оболочку.

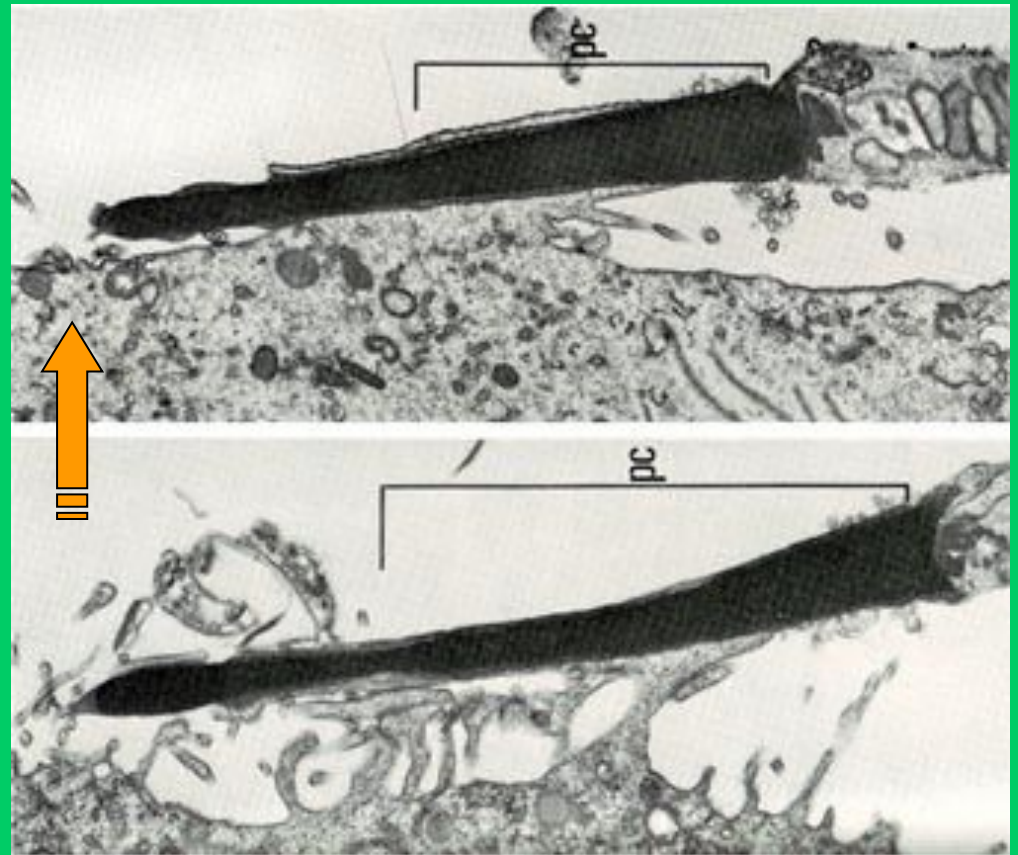


PM – плазмалемма, IAM (OAM) – внутренняя (наружная) мембрана акросомы, ACMX – матрикс акросомы, содержащий протеасомы (зелёный цвет), ZPC – рецептор спермия (красный цвет, для части В), DNA – ДНК (синий цвет).

Проникновение сперматозоида в яйцо:

Реакция активации сперматозоида заканчивается слипанием задней мембраны акросомы спермия и мембраны яйцеклетки, их разрывом и соединением свободных концов.

Формируется единая наружная мембрана, ограничивающая канал, через который ядро и проксимальная центриоль сперматозоида проникают в яйцо.

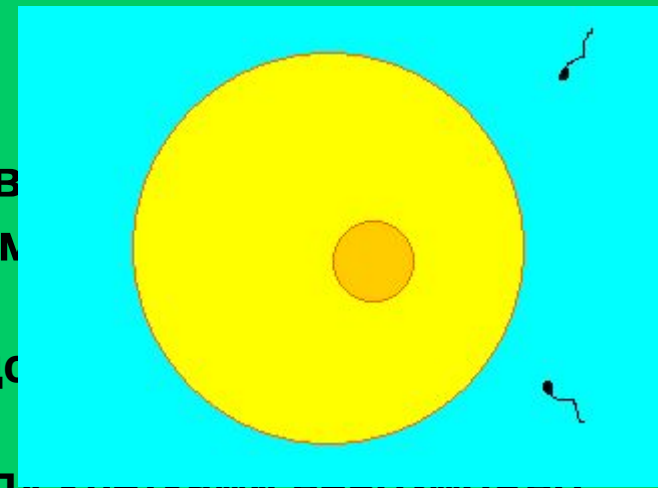


Проникновение спермия в яйцеклетку хомячка (по Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. 1970. Electron microscope studies of sperm incorporation into the hamster egg. American Journal of Anatomy 138:429-462).

Быстрый блок полиспермии:

Полиспермия (проникновение множества спермиев в большинство животных к губельным последствиям)

Возникает **триплоидное ядро** (каждая хромосома представлена в 3-х копиях)



Полноценное распределение триплоидного набора между клетками невозможно. Одни клетки получают лишние копии некоторых хромосом, тогда как у других эти хромосомы отсутствуют (атипичное развитие и гибель эмбриона).

Быстрый блок полиспермии (1 мин) достигает этой цели путем **изменения электрического потенциала** плазматической мембраны яйца.

Открытие ионных каналов в яйце индуцируется прикреплением к нему спермия.



Мембранный потенциал в яйце морского ежа до и после оплодотворения

Медленный блок полиспермии:

Кортикальная реакция – действует через 1 мин после прикрепления спермия.

В её основе Ca^{2+} -зависимое слияние кортикальных гранул с плазмалеммой (выделение содержимого в область между плазмалеммой и желточной оболочкой)

У млекопитающих кортикальная реакция не вызывает образования оболочки оплодотворения (**реакция прозрачной оболочки** или *zona reaction*)

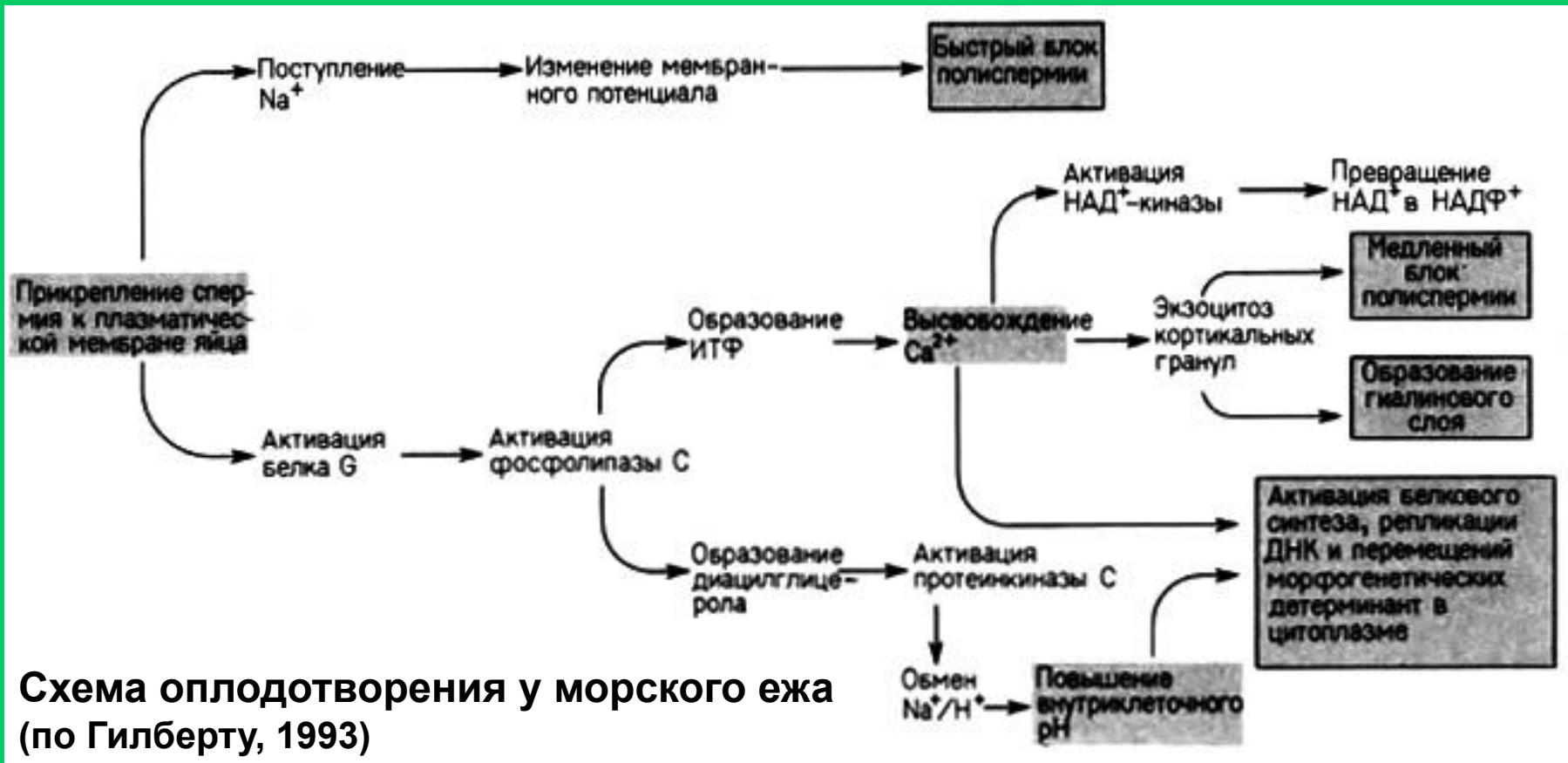


Схема оплодотворения у морского ежа (по Гилберту, 1993)

Mov 4

Mov 5

Mov 6

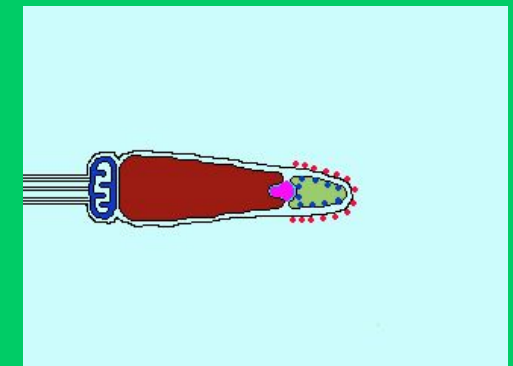
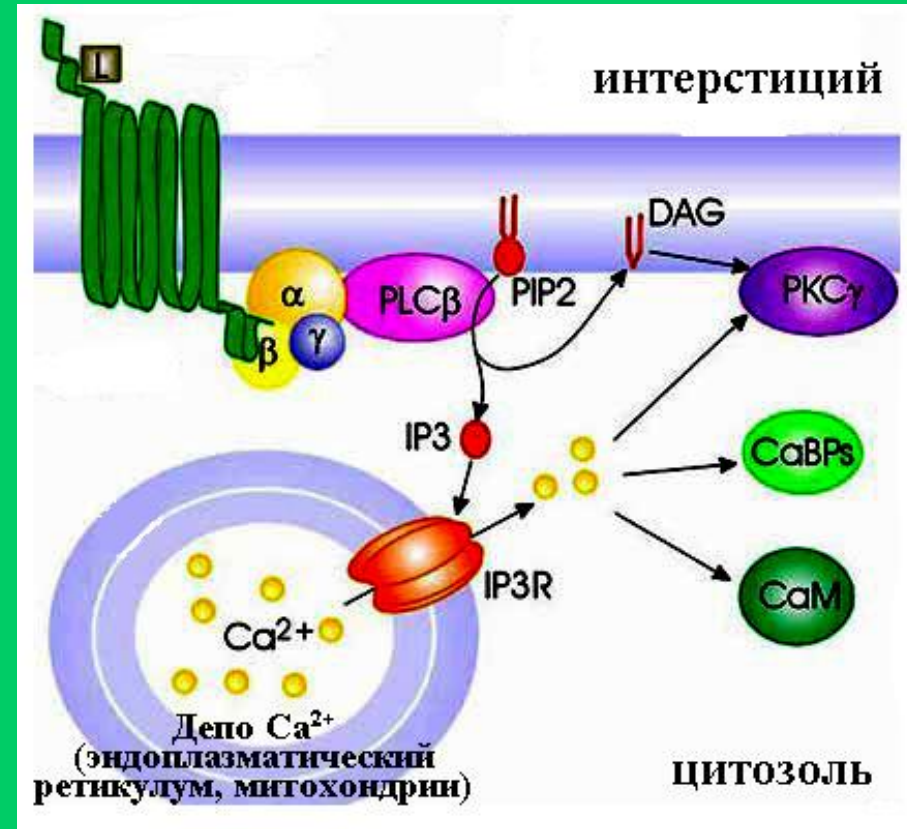
Медленный блок полиспермии:

- **вителлиновая деламиназа**: отделяет желточную оболочку от цитоплазматической мембраны яйцеклетки;
- **сперморецепторная гидролаза**: освобождает поверхность яйца от осевших на желточной оболочке сперматозоидов, лизируя сайты их соединения;
- **мукополисахариды**: создают осмотический градиент, обуславливающий поступление воды из цитоплазмы яйца в пространство между желточной оболочкой и плазматической мембраной (*перивителлиновое пространство*);
- **пероксидаза**: вызывает затвердевание оболочки оплодотворения (образование поперечных связей между остатками тирозина соседствующих белков);
- **гиалин**: поддерживает бластомеры в период дробления.



Механизм кортикальной реакции:

- **Прикрепление** спермия к рецептору плазматической мембране яйца
- **активация G-белка**
- **стимуляция активности фосфолипазы C** – расщепляет фосфатидинозитол-4,5-бифосфат (PIP_2) на *диацилглицерол* – DAG (связан с мембраной) и *инозитолтрифосфат* – IP_3 (диффундирует в цитоплазму).
- **активация Na^+/H^+ -антипортера** (DAG, посредством протеинкиназы C) – усиление белкового синтеза, репликации ДНК, перемещения морфогенетических детерминант в цитоплазме.
- **высвобождение Ca^{2+}** (из внутриклеточных депо) – посредством IP_3 , что приводит к экзоцитозу кортикальных гранул (медленный блок полиспермии), а также активация НАД-киназы (синтез липидных компонентов мембраны *de novo*).

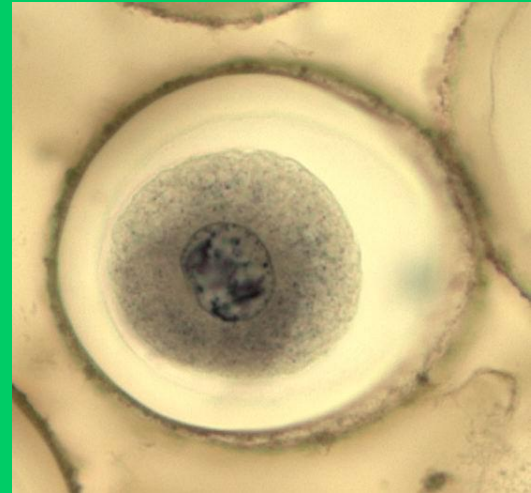
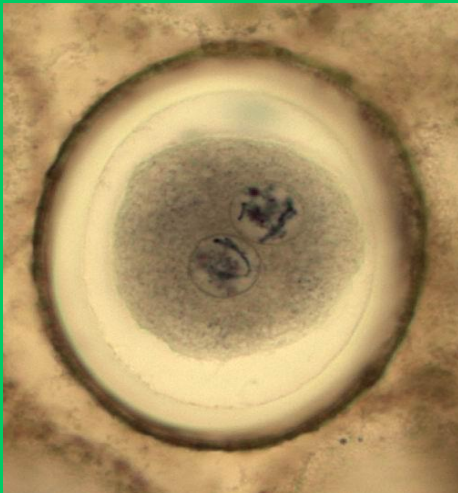


Слияние генетического материала (1):

Митохондрии спермия и жгутик разрушаются и в цитоплазме развивающихся взрослых организмов не обнаруживаются (митохондрии передаются от материнского организма, а центриоли от отцовского, хотя в яйцеклетках млекопитающих они изначально присутствуют в яйцеклетке).

Ядро яйца преобразуется в *женский пронуклеус*, а сперматическое ядро в *мужской пронуклеус*.

После проникновения в цитоплазму мужской пронуклеус поворачивается на 180° (центриоль спермия оказывается располагается между мужским и женским пронуклеусом). Ее микротрубочки удлиняются, вступая в контакт с женским пронуклеусом, после чего пронуклеусы перемещаются навстречу друг другу.



Слияние генетического материала (2):

У млекопитающих процесс сближения пронуклеусов продолжается около 12 часов (у морского ежа – всего 1 час).

Контакт пронуклеусов приводит к разрушению их ядерных оболочек, конденсации хроматина и образованию видимых хромосом (располагаются на общем митотическом веретене первого деления дробления).

У млекопитающих истинно диплоидное ядро появляется у 2-х клеточного эмбриона.

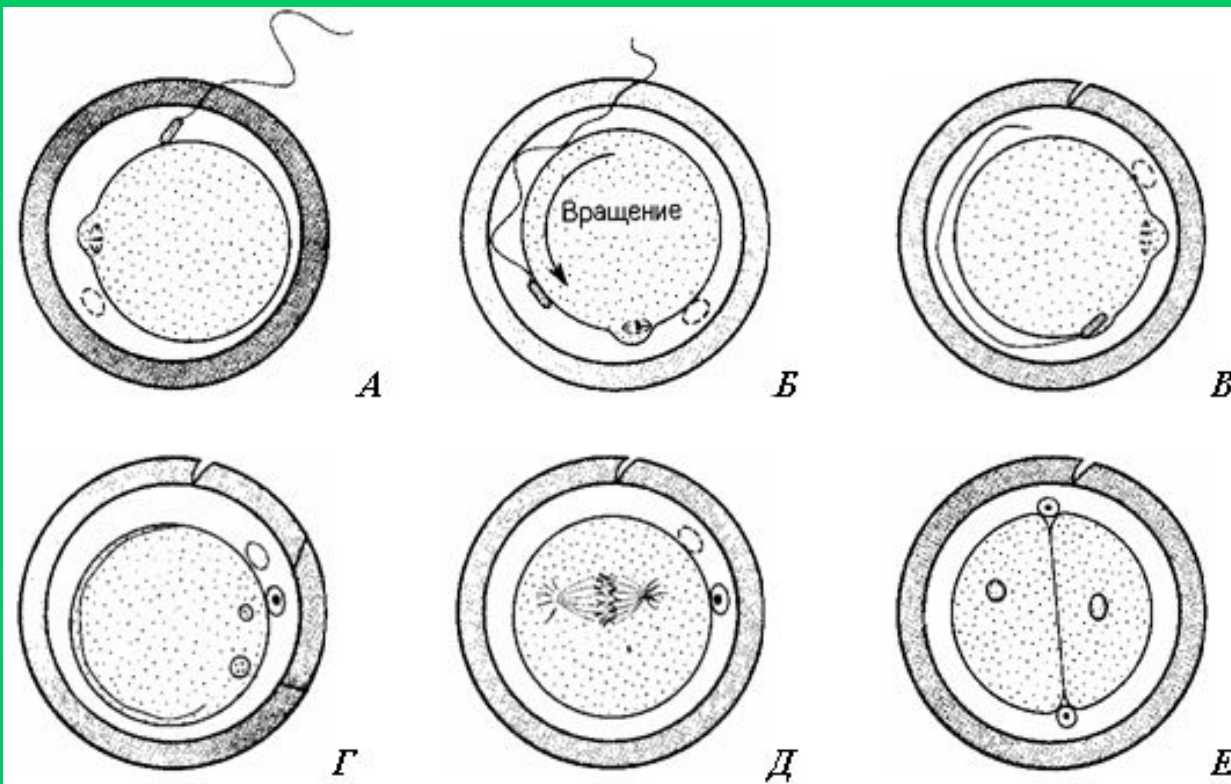


Схема процесса оплодотворения у хомячка (по Гилберту, 1993):

А – спермий прикрепляется к яйцу; Б – прикрепление спермия к яйцу и взмахи его хвоста вызывают вращение яйца; В – плазматические мембраны спермия и яйца сливаются; Г – формируются пронуклеусы; Д – начинается первое деление дробления; Е – двух клеточный зародыш

Ооплазматическая сегрегация:

После оплодотворения скорость метаболизма увеличивается в 70–80 раз.

Слои цитоплазмы яйцеклеток интенсивно перемещаются друг относительно друга.

Ооплазматическая сегрегация – расслоение (отмешивание) различных частей цитоплазмы яйцеклетки (зиготы).

Ооплазматическая сегрегация влияет не на конечную дифференцировку клеток, а на ближайшие этапы развития – дробление и гаструляцию (*проморфогенез*).

Партеногенез:

Развитие, происходящее без оплодотворения (участия сперматозоида).

Естественный партеногенез: осы, пчелы, ряда чешуекрылых, виды ящериц и змей, типичен для летних поколений ряда ракообразных и коловраток. Различают *гиногенез* и *андрогенез*;

Искусственный партеногенезу: стимуляция развитие неоплодотворенных яиц тутового шелкопряда (Тихомиров, 1886).

У млекопитающих партеногенетическое развитие останавливается на ранних стадиях. В женских хромосомах заблокированы участки ДНК, присутствующие в активной форме в мужских хромосомах (у млекопитающих между пронуклеусами имеются функциональные различия).