

ЛЕКЦИЯ 6

ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

1. Стадии процесса оплодотворения.
2. Дистантное взаимодействие гамет. Концепция гамонов.
3. Контактное взаимодействие гамет: акросомная реакция, кортикальная реакция, ооплазматическая сегрегация.
4. Партеогенез. Андрогенез.

1. Стадии процесса оплодотворения

После своего выхода из гонад как яйцеклетка, так и спермий обречены на гибель в течение считанных часов, если они не сольются в процессе оплодотворения.

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

Существует несколько принципов классификации процесса оплодотворения:

по месту проникновения сперматозоида в яйцеклетку:

- наружное (оплодотворение происходит во внешней среде);
- внутреннее (оплодотворение происходит в половых путях самки);

по количеству сперматозоидов, участвующих в оплодотворении:

- моноспермное (один сперматозоид);
- полиспермное (два и более сперматозоидов).

У ряда животных возможна полиспермия, однако с ядром яйцеклетки сливается ядро *одного* спермия.

Взаимодействие половых клеток (гамет) канонически подразделяют на четыре стадии (фазы):

- дистантные взаимодействия;
- контактные взаимодействия;
- проникновение сперматозоида в яйцеклетку;
- слияние генетического материала.

2. Дистантные взаимодействия гамет. Концепция гамонов

Осуществляются на некотором расстоянии, до соприкосновения гамет друг с другом. Они направлены на повышение вероятности встречи сперматозоидов и яйцеклетки. Характерны для водных организмов с наружным типом оплодотворения. При этом животные сталкиваются с проблемой встречи спермиев и яиц при их низкой концентрации в среде, а также предотвращение оплодотворения яиц спермиями другого вида.

В ходе эволюции выработалось соответственно два механизма: видоспецифичное привлечение спермиев и видоспецифичная их активация.

Уже в ходе ранних исследований процесса оплодотворения возникло представление о **гамонах** — веществах, обеспечивающих активацию или блокирование отдельных его этапов.

Гамоны – вещества, выделяемые половыми клетками и способствующие оплодотворению. Яйцеклетка способна продуцировать **гиногамоны**, а сперматозоид — **андрогамоны**. Полагали, что гиногамон I — вещество, которое активирует движение сперматозоидов, преодолевая действие андрогамона I, подавляющего подвижность спермия. Гиногамон II расположен в периферической области яйца и вызывающий связывание его со сперматозоидами при взаимодействии с комплементарным ему андрогамоном II, встроенным в поверхностную оболочку спермия.

Видоспецифичное привлечение спермиев доказано для многих животных. Оно представляет собой род **хемотаксиса** – движения по градиенту концентрации какого-либо вещества. В 80-х гг. удалось идентифицировать два видоспецифичных аттрактанта сперматозоидов морских ежей — **сперакт** и **резакт**. Оба вещества, выделенные из студенистой оболочки яиц, относятся к пептидам и содержат 10 и 14 аминокислотных остатков соответственно. При взаимодействии со спермиями они стимулируют их метаболизм и увеличивают подвижность мужских гамет.

3. Контактное взаимодействие гамет: акросомная реакция, кортикальная реакция, ооплазматическая сегрегация

Первым ее этапом является **акросомная реакция**.

У морского ежа ее инициируют полисахариды студенистой оболочки — вызывают поступление Ca^{2+} в головку спермия. Это приводит к запуску процесса экзоцитоза, в результате которого акросомная мембрана сливается с цитоплазматической мембраной спермия и содержимое акросомного пузырька выделяется в окружающую среду. Помимо этого, активируется Na^+/H^+ -обменник, что приводит к снижению внутриклеточной концентрации протонов.

В результате повышения внутриклеточного pH наблюдается усиление полимеризации глобулярного актина и формирование актиновых филаментов, т. е. образование **акросомного выроста**. Помимо этого, высокий уровень pH активирует динеиновую АТФ-азу в шейке спермия, что приводит к увеличению подвижности спермия. Приток внутрь клетки ионов кальция, натрия и хлора повышает приток в него воды. Вызванное этим резкое повышение гидростатического давления, вероятно, также способствует удлинению акросомального выроста.

Второй этап контактного взаимодействия гамет связан с узнаванием спермия и яйца.

На поверхности акросомного выроста располагается белок (**биндин**), ответственный за видоспецифичное узнавание у морских ежей. Бинтин связывается с находящимся на желточной оболочке яйца гликопротеиновым комплексом (рецептор).

Контактные взаимодействия гамет у млекопитающих имеют ряд особенностей, связанных с наличием у них внутреннего оплодотворения. При этом половые пути самки принимают активное участие в процессе оплодотворения.

Спермии млекопитающих сразу после эякуляции не способны к акросомной реакции, для этого они должны какое-то время находиться в половых путях самки. Условия, требующиеся для **капацитации** (приобретение спермием оплодотворяющей способности), варьируют в зависимости от вида.

Природа процесса капацитации заключается:

- в изменении структуры клеточной мембраны (снижение соотношения холестерин:фосфолипиды, дестабилизирующее мембрану);
- удалении с поверхности спермия особых факторов, которые, оставаясь на поверхности, препятствуют оплодотворению.

Поверхность спермия содержит фермент гликозилтрансферазу, способную узнавать концевые остатки N-ацетилглюкозамина на прозрачной оболочке яйцеклетки.

В спермиях, не прошедших капацитации, активные центры этого фермента блокированы углеводами (N-ацетилглюкозамина (NAc) и галактозы (Гал)). При капацитации эти углеводы отделяются от поверхности спермия, освобождая активные центры гликозилтрансфераз.

Теперь гликозилтрансферазы могут узнавать N-ацетилглюкозаминовые остатки (рецептор спермия) в молекуле гликопротеина, расположенного на поверхности прозрачной оболочки и представляющего, по сути.

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

Акросомная реакция млекопитающих:

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

Проникновение сперматозоида в яйцеклетку

Вслед за узнаванием спермия желточной (прозрачной) оболочкой яйца происходит лизис части этой оболочки в области головки спермия, в результате чего плазматические мембраны спермия и яйца сливаются. Поверхность яйца покрыта микроворсинками, контакт между сперматозоидом и яйцом вызывает полимеризацию актина и увеличение размеров микроворсинок, которые формируют **воспринимающий бугорок**.

У некоторых амфибий и многих беспозвоночных узнавание спермия и слияние с ним происходит в специализированных областях.

У млекопитающих активация спермия заканчивается слипанием задней мембраны акросомы и мембраны яйцеклетки, их разрывом и соединением свободных концов.

Предотвращение полиспермии. При нормальном моноспермном оплодотворении гаплоидные ядра спермия и яйца соединяются, образуя

диплоидное ядро зиготы, при этом восстанавливается присущее виду число хромосом. Полиспермия (проникновение множества спермиев) приводит у большинства животных к губительным последствиям.

Существуют механизмы защиты яйцеклетки от полиспермии.

Быстрый блок полиспермии. Сразу после контакта первого спермия с плазматической мембраной яйца она (мембрана) должна утрачивать способность сливаться с плазматической мембраной спермия. Быстрый блок полиспермии достигает этой цели путем изменения электрического потенциала плазматической мембраны яйца.

Медленный блок полиспермии. Быстрый блок полиспермии действует у морского ежа около 1 мин. Этого недостаточно для предотвращения полиспермии. Удаление избыточных спермиев осуществляется посредством **кортикальной реакции**. У млекопитающих кортикальная реакция вызывает изменение рецепторов спермиев, и они больше не удерживают сперматозоиды на поверхности яйца. Этот процесс изменения свойств рецепторов спермиев носит название **реакции прозрачной оболочки** или **реакции zona**.

Механизм кортикальной реакции сходен с механизмом акросомной реакции.

- прикрепление спермия к рецептору плазмалеммы и активация G-белка.
- стимуляция активности фосфолипазы C – расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP₂) на диацилглицерол (DAG) и инозитолтрифосфат (IP₃).
- активация Na⁺/H⁺-антипортера (DAG, посредством протеинкиназы C) – усиление белкового синтеза, репликации ДНК, перемещения морфогенетических детерминант в цитоплазме (в сочетании с активностью Ca²⁺-связывающих белков).
- высвобождение Ca²⁺ (из внутриклеточных депо) – посредством IP₃. Кальциевая волна приводит к экзоцитозу кортикальных гранул (медленный блок полиспермии), а также активация НАД-киназы (синтез липидных компонентов мембраны de novo).

Слияние генетического материала

У млекопитающих процесс сближения пронуклеусов продолжается около 12 часов (у морского ежа — всего 1 час). Головка спермия у млекопитающих проникает не перпендикулярно поверхности яйца, а почти по касательной к ней, сливаясь с многочисленными микроворсинками. Пока ядро ооцита млекопитающего завершает второе мейотическое деление, мужской пронуклеус увеличивается в размерах. Затем оба пронуклеуса перемещаются навстречу друг другу, реплицируя ДНК в процессе миграции.

Ядра женской и мужской половых клеток превращаются в пронуклеусы, сближаются, **наступает стадия синкариона**.

Ядерная оболочка сперматического ядра распадается. После проникновения спермия в цитоплазму яйца мужской пронуклеус совершает поворот на 180° так, что центриоль спермия оказывается расположенной

между мужским и женским пронуклеусом. После чего пронуклеусы перемещаются навстречу друг другу (танец пронуклеусов).

Когда пронуклеусы приходят в контакт, происходит конденсация хроматина с образованием видимых хромосом, которые (у большинства животных) располагаются на общем митотическом веретене первого деления дробления (центриоли присутствуют в яйцеклетках млекопитающих изначально, а не передаются зародышу от спермия). Таким образом, у млекопитающих истинно диплоидное ядро впервые появляется не у зиготы, а у двухклеточного зародыша.

Преобразование цитоплазмы яйца

После проникновения сперматозоида скорость метаболизма увеличивается в 70-80 раз, начинаются интенсивные перемещения слоев цитоплазмы яйцеклеток друг относительно друга. Иногда при этом происходит расслоение различных частей ооплазмы — **ооплазматическая сегрегация**. В ходе этого процесса намечаются основные элементы пространственной организации зародыша.

В большинстве случаев ооплазматическая сегрегация влияет не на конечную дифференцировку клеток, а на ближайшие этапы развития — дробление и гастрюляцию (**проморфогенез**).

4. Партеногенез. Андрогенез

Яйца многих животных могут быть активированы естественно или искусственно без участия сперматозоида.

Партеногенез — развитие, происходящее без оплодотворения (участия сперматозоида). Такой процесс называется **девственным размножением** или **партеногенезом** (из греч. *parthenos* – девственница, *genesis* – происхождение, развитие).

Андрогенез – явление гораздо более редкое, и когда он происходит (естественный или искусственный), развитие идет без женского пронуклеуса на базе мужского ядра и мужского пронуклеуса (табак, кукуруза, тутовый шелкопряд).

Естественный партеногенез обнаружен у ос, пчел, ряда чешуекрылых, у некоторых видов ящериц и змей, типичен для летних поколений ряда ракообразных и коловраток. Успешные опыты по *искусственному партеногенезу* были выполнены А. А. Тихомировым в 1886 году. Ему удалось стимулировать развитие неоплодотворенных яиц тутового шелкопряда кратковременным нагреванием или потиранием их щеткой. Естественный партеногенез чаще всего случается при незавершенном оплодотворении, т. е. в тех случаях, когда имела место активация яйцеклетки, но ядро сперматозоида не участвовало в оплодотворении (**гиногенез**). При искусственном партеногенезе, когда существует возможность экспериментально удалить женский пронуклеус, развитие зародыша может осуществиться только за счет мужского пронуклеуса (**андрогенез**).