

Received: 2011.08.03
Accepted: 2011.11.03
Published: 2011.11.25

Mechanizmy molekularne w procesie zapłodnienia: rola czynnika męskiego

Molecular mechanisms of fertilization: the role of male factor

Ewa Maria Kratz, Martyna Kamila Achcińska

Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Zapłodnienie, czyli połączenie gamety męskiej i żeńskiej, to proces skomplikowany i wieloetapowy. Złożoność procesu zapłodnienia, mnogość czynników, które mają nań wpływ, jak i warunki w jakich zachodzi powodują, że pozostaje on zjawiskiem nie w pełni zbadanym i zrozumianym. Zapłodnienie jest procesem precyzyjnie regulowanym i swoistym gatunkowo, jednak pewne mechanizmy zachodzące w komórkach są zbieżne u wielu gatunków ssaków. Poznanie mechanizmów tworzenia się gamet w gonadach męskich i żeńskich pozwala na zrozumienie zagadnień dotyczących zapłodnienia. Te z kolei umożliwiają analizę przyczyn niepłodności. Niepłodność jest obecnie coraz powszechniejszym zjawiskiem i dotyczyć może zarówno kobiet, jak i mężczyzn. Postęp medycyny laboratoryjnej, dzięki znajomości molekularnego podłoża interakcji gamet, umożliwia diagnozowanie większości przyczyn niepłodności oraz wyznacza kierunek dalszego postępowania w ich leczeniu. Procesowi zapłodnienia towarzyszy wiele reakcji biochemicznych, w których istotną rolę odgrywają glikoproteiny obecne w ludzkim nasieniu. Obecność glikanów umożliwia glikoproteinom uczestnictwo w oddziaływaniach międzykomórkowych, w tym także pomiędzy gametami. Analiza profilu i stopnia glikozylacji glikoprotein obecnych w nasieniu nie tylko przyczynia się do lepszego poznania mechanizmów towarzyszących procesowi zapłodnienia, ale także może stanowić dodatkowy marker diagnostyczny męskiej bezpłodności.

Praca ma na celu przybliżenie wybranych mechanizmów molekularnych zachodzących w obrębie męskich narządów rozrodczych związanych z procesem zapłodnienia, a także analizę ich wpływu na męską płodność.

Słowa kluczowe: molekularne mechanizmy zapłodnienia • płodność męska • bezpłodność

Summary

Fertilization, the fusion of male and female gametes, is an incompletely known, multistep, complex process, in which many factors participate. Fertilization is a precisely regulated, species-specific process, but some cellular mechanisms are similar for many mammal species. The studies of mechanisms of male and female gamete production enable understanding of fertilization issues and, as a result, make the analysis of the causes of infertility possible. Male and female infertility is a progressive phenomenon. The development of laboratory medicine enables the analysis of molecular aspects of the reactions between gametes, which may result in better diagnosis of many infertility cases and indicate the direction of therapeutic management. The fertilization process is accompanied by many biochemical reactions, in which glycoproteins present in human ejaculate play a very important role. Glycan structures enable glycoproteins to participate in the interactions between cells, including those between gametes. The analysis of the glycosylation

profile and degree of ejaculate glycoproteins not only contributes to deepening the knowledge about mechanisms accompanying the fertilization process, but also may be useful as an additional diagnostic marker of male infertility.

The aim of the present review is to approach selected molecular mechanisms occurring in the male genital tract, related to the fertilization process, as well as to analyze their influence on male fertility.

Key words: molecular mechanisms of fertilization • male fertility • infertility

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=967076>

Word count: 5565

Tables: –

Figures: 3

References: 123

Adres autorki: dr Ewa Maria Kratz, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii, Akademia Medyczna, ul. Bujwida 44a, 50-345 Wrocław, e-mail: kratz@immchem.am.wroc.pl

FIZJOLOGIA PROCESU ZAPŁODNIENIA

Proces zapłodnienia jest złożony z kilku następujących po sobie faz, tj. kapacytacji, rozpoznania gamet, reakcji akrosomalnej, przenikania przez osłonkę przejrzystą, fuzji gamet oraz reakcji niedopuszczających do polispermii. Po uprzednim przygotowaniu, gamety przystępujące do zapłodnienia reagują ze sobą dzięki systemowi gatunkowo swoistych receptorów.

Kapacytacja

W drogach rodnych kobiety plemniki ulegają procesowi kapacytacji (uzdatnianiu), podczas którego zostają przygotowane do zapłodnienia komórki jajowej [50,69]. Na przebieg kapacytacji mają wpływ substancje zawarte w płynie, w którym zawieszono są plemniki. Płyn ten zawiera wydzieliny tkanek jądrowych i najądrzy, męskich gruczołów dodatkowych: pęcherzyków nasiennych, prostaty oraz gruczołów opuszkowo-cewkowych, a także wydzielinę macicy oraz płyn pęcherzykowy [122].

Jedną z zachodzących podczas kapacytacji zmian w strukturze błon komórkowych plemnika, jest zwiększenie ich płynności na skutek oddziaływania albumin, które powodują usunięcie z błon komórki cholesterolu oraz innych steroli, a także niekowalencyjnie związanych glikoprotein [30,50,118]. Obecność albumin powoduje także obniżenie ilości kwasu sjałowego, gangliozydów oraz triglicerydów obecnych w błonie komórkowej plemnika [43]. Dodatkowym czynnikiem inicjującym reakcję kapacytacji *in vitro* jest metylo- β -cyklodekstryna (MBCD), której działanie polega na obniżeniu zawartości cholesterolu w błonie komórkowej plemnika oraz zaburzeniu działania tratw lipidowych. Jednakże stężenie krytyczne MBCD nie zostało jeszcze określone [55]. Obecne w błonie komórkowej tratwy lipidowe są małymi (10–200 nm), heterogennymi domenami (tzw. mikrodomeny), o wysokiej dynamice, wzbogaconymi w sterole i inne lipidy (sfingolipidy, glikolipidy), a także w białka zakotwiczone w błonie za pomocą glikozylfosfatydyloinozytolu. Tratwy mogą być stabilizowane tworząc większe struktury poprzez interakcje lipid-białko oraz białko-białko [56,84], dzięki czemu mogą stanowić

stabilne platformy umożliwiające agregację białek uczestniczących w oddziaływaniach pomiędzy plemnikiem a komórką jajową [87]. Ze względu na to, że tratwy lipidowe błon komórkowych gamet zawierają białka sygnałowe regulujące funkcje wewnątrzkomórkowe oraz przekazywanie sygnałów między komórkami, domeny te uznano za ważne dla procesu dojrzewania plemników, zapłodnienia i wczesnej embriogenezy [66]. W ludzkim najądrzu uwidoczonych jest sześć genów, znanych jako *HE1-HE6*. Mutacje *HE1* prowadzą do rozwoju śmiertelnej lizosomalnej choroby spichrzeniowej Niemann-Picka typu 2 (NPC2), polegającej na kumulacji cholesterolu w lizosomach. *HE1* to mała rozpuszczalna glikoproteina zbudowana ze 132 aminokwasów, która wiąże się z cholesterolem, lecz nie z jego pochodnymi, które mają hydrofilowy podstawnik na izooktylowym łańcuchu bocznym [51]. *HE1* wiąże się z cholesterolem *in vitro* i może regulować zawartość cholesterolu w plemnikach podczas ich przemieszczania się przez obszar najądrza. Jednakże w niektórych doniesieniach wykazano, że podczas wędrówki plemników przez najądrze stosunek całkowitej ilości fosfolipidów do całkowitej ilości cholesterolu nie zmienia się [88]. Kawano i wsp. [56] sugerują, że *HE1* reguluje liczbę lub położenie plemnikowych tratw lipidowych w najądrzach, w których magazynowane są dojrzałe plemniki. Uważane za jeden z rodzajów tratw lipidowych kaweole, to niewielkie wgłębienia błony komórkowej, powstające na skutek polimeryzacji białek nazywanych kaweolinami, będącymi palmitoilowanymi integralnymi białkami błonowymi, mającymi duże powinowactwo do cholesterolu [56,99]. Ze względu na to, że kaweoliny „znikają” po zakończeniu reakcji akrosomalnej, uważane są za białka regulujące przebieg reakcji akrosomalnej [95]. Hydrolazy, znajdujące się w drogach rodnych kobiety, powodują usunięcie sulfoglicerolipidów i sjałoglikoprotein. W wyniku tych przemian odsłonięte zostają enzymy, znajdujące się w błonie osłaniającej akrosom [67]. Zmianie ulega stosunek ilości kwasów tłuszczowych nasyconych do polinienasyconych (głównie arachidonowego, dokozapentaenowego oraz dokozahexaenowego), na korzyść tych drugich [88].

Podczas reakcji kapacytacji dochodzi do hiperaktywacji plemnika, która polega na zwiększeniu jego ruchliwości

na skutek wzrostu częstotliwości uderzenia i siły pchania witki, co prowadzi do zmiany toru ruchu gamety męskiej. Hiperaktywne plemniki poruszają się po torze zakrzywionym, dzięki czemu mogą przenikać do osłonki przejrzystej i zapłodnionej komórki jajowej. Plemniki przemieszczające się prostoliniowo w płynie nasiennym, nie mają zdolności zapłodnienia oocytu [103].

U prawie wszystkich gatunków ssaków składniki plazmy nasienia uważane są za jedne z najważniejszych czynników biorących udział w kapacytacji. Plazma nasienia zawiera m.in. płyn z pęcherzyków nasiennych, bogaty w aktywatory ruchu plemników, takie jak fruktoza czy kwas cytrynowy, będące głównym źródłem energii gamety męskiej, prostaglandyny tłumiące odpowiedź żeńskiego układu immunologicznego oraz czynnik koagulacji nasienia [65]. Płyn pęcherzyków nasiennych zapewnia plemnikom odpowiednie środowisko do ich przemieszczania się do bańki jajowodu [122]. Znane jest także zjawisko dekapacytacji, na które mają wpływ substancje zawarte w płynie nasiennym. Znany czynnik dekapacytacji są białka odkryte u myszy: autoantygen pęcherzyków nasiennych (SVA – seminal vesicle autoantigen) [48] oraz białko sekrecyjne 2 pęcherzyków nasiennych (SVS2 – seminal vesicle secretion 2) będące homologiem ludzkiej semenogeliny, w naturalny sposób regulujące płodność [57]. Po ejakulacji SVS2 (u myszy) lub semenogelina (u człowieka) wytrąca się w macicy i reaguje z główkami plemników oraz redukuje ich zdolność do zapłodnienia [48]. Ponadto obecność semenogeliny zapobiega fosforylacji białkowej tyrozyny w plemniku, indukcji reakcji akrosomalnej i kapacytacji [27].

Spośród wielu czynników wpływających na przebieg reakcji kapacytacji, najważniejszym jest utrzymanie na odpowiednim poziomie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych, za co odpowiedzialne są trzy mechanizmy:

- 1) pompa sodowo-wapniowa, która wydalą Na^+ z komórki i jednocześnie umożliwia napływ Ca^{2+} do jej wnętrza,
- 2) kanały wapniowe, którymi jony Ca^{2+} dostają się do cytoplazmy oraz
- 3) Ca^{2+} -ATP-aza, która stymuluje usuwanie jonów wapnia z komórki na zewnątrz.

Aktywność tych mechanizmów nie jest jednoczesna. W zależności od etapu procesu zapłodnienia aktywacji ulegają inne mechanizmy. W czasie reakcji akrosomalnej aktywne są kanały wapniowe, a w czasie kapacytacji najprawdopodobniej Ca^{2+} -ATP-aza [75].

Istnieje wiele mechanizmów zapobiegających przedwczesnej kapacytacji. Czynnikiem dekapacytacji (DF – decapacitation factor), jeden z czynników obecnych w plazmie nasienia, mających wpływ na przebieg procesu zapłodnienia, jest glikoproteiną o masie 40 kDa, która wiąże się z glikozylfosfatydyloinozytolem, receptorem błonowym, zakotwiczonym na plemniku, w regionie za akrosomem [33]. Czynnikiem dekapacytacji jest uważany za pozytywny regulator aktywności Ca^{2+} -ATP-azy błonowej [1]. Innym białkiem, biorącym udział w procesie dekapacytacji jest inhibitor kinazy Raf-1 (RKIP-1 – Raf kinase inhibitor protein-1), występujący na powierzchni plemnika [79], pełniący także rolę receptora czynnika dekapacytacji [39]. U ssaków naczelnych, także u człowieka, podczas inkubacji plemników

in vitro wydzielany jest czynnik aktywujący płytki (PAF – platelet-activating factor), który dzięki wiązaniu z receptorem błonowym powoduje wzrost ruchliwości plemników, stymulując przebieg reakcji akrosomalnej i procesu zapłodnienia [91]. Bi i wsp. [6] zbadali czynnik dekapacytacji NYD-SP27, będący izoformą fosfolipazy C Zeta1, obecnej w akrosomie plemników ludzkich i mysich. Wykazano, że NYD-SP27 zostaje uwolniony z plemników podczas kapacytacji i reakcji akrosomalnej. Brak jonów HCO_3^- , głównego czynnika aktywującego proces kapacytacji, zapobiega uwalnianiu NYD-SP27 z plemników. Również zastosowanie przeciwciał anti-NYD-SP27 zapobiega uwalnianiu tego czynnika z plemników, redukuje liczbę plemników, które zakończyły kapacytację, a także hamuje reakcję akrosomalną indukowaną przez ATP i progesteron oraz hamuje sprzężoną z fosfolipazą C agonistycznie indukowaną mobilizację Ca^{2+} w plemniku. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy sugerują, że NYD-SP27 jest fizjologicznym inhibitorem fosfolipazy C, działającym jako wewnętrzny czynnik przeciwdziałający przedwczesnej kapacytacji plemników [6]. Kolejnym czynnikiem dekapacytacji jest białko SERPINE2, jeden z potencjalnych inhibitorów proteazy serynowej, modulator aktywności aktywatora plazminogenu i trombiny. Czynnikiem SERPINE2 jest obecny głównie w pęcherzykach nasiennych gryzoni, ale może także występować w wydzielinie pęcherzyków nasiennych i nabłonku śluzowym pęcherzyka nasiennego, najądrzach i nasieniowodach. W jądrach SERPINE2 jest obecny w spermatogoniach, spermatocytach, spermatydach, komórkach Leydiga i plemnikach. SERPINE2 wykryto także w czapeczce akrosomalnej plemników obecnych w jądrach i najądrzach i został uznany za istotne białko powierzchniowe plemników. Oczyszczona postać SERPINE2 może wiązać się z plemnikami obecnymi w najądrzach, a znaczną ilość SERPINE2 wykryto na plemnikach tuż po ejakulacji oraz obecnych w jajowodach. Jednakże SERPINE2 jest obecny głównie na plemnikach, które jeszcze nie uległy kapacytacji, co wskazuje, że SERPINE2 jest uwalniany przed zainicjowaniem procesu kapacytacji. Ponadto SERPINE2 może hamować *in vitro* reakcję kapacytacji inicjowaną przez albuminę wołową, zapobiegając połączeniu plemnika z komórką jajową, tym samym zapobiegając zapłodnieniu. Działanie SERPINE2 polega na przeciwdziałaniu wpływowi cholesterolu, jednego z czynników inicjujących proces kapacytacji [63].

Ważną rolę w przebiegu procesu zapłodnienia odgrywa reakcja fosforylacji aminokwasów, takich jak: seryna, treonina i tyrozyna. Największe znaczenie ma fosforylacja tyrozyny, co może być głównym, a nawet wyłącznym, wskaźnikiem przekazywania sygnałów w komórce [76]. Fosforylacja tyrozyny, wchodzącej w skład białek gamety męskiej, uważana jest za najważniejszą reakcję zachodzącą podczas procesu kapacytacji [32] oraz wiązania się plemnika z osłonką przejrzystą [92]. Jednym z fosforylowanych białek, o masie 51 ± 5 kDa, jest antygen zapłodnienia 1 (FA-1 – fertilization antigen-1), który pełni ważną rolę zarówno w procesie wiązania się błony plemnika z osłonką przejrzystą, jak i w procesie kapacytacji [77]. Inkubacja plemników z przeciwciałem monoklonalnym anti-FA-1 redukuje fosforylację tyrozyny podczas kapacytacji [77]. Zarówno rodzaj, jak i lokalizacja białek, które ulegają reakcji fosforylacji, mają wpływ na funkcje plemnika. W przypadku ludzkiej gamety męskiej w czasie kapacytacji znaczny wzrost fosforylacji

białek następuje w rejonie wtki, w głównej jej części, co ma znaczenie dla nabycia przez plemnik zdolności do ruchu hiperaktywnego [74]. Najważniejszymi białkami, które uczestniczą w reakcji fosforylacji tyrozyny, są białka kotwiczące kinazę A (AKAP – A-kinase anchoring proteins), a fosforylacji tyrozyny może ulegać białko wiążące wapń (CABYR – calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein), umiejscowione w głównej części wtki [61,73].

Zależne od cAMP (cykliczny adenozymonofosforan) kinazy białkowe typu A (PKA – protein kinase A) fosforylują grupy hydroksylowe w łańcuchach bocznych seryny i treoniny wybranych białek błon komórkowych. Swoistość substratowa PKA nie jest zbyt duża, więc regulacja aktywności tych enzymów odbywa się m.in. za pomocą białek kotwiczących PKA. AKAP mają zdolność wiązania się z PKA bez zmiany jej aktywności. Wobec powyższego fosforylacji najprawdopodobniej będą ulegały przede wszystkim białka znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie AKAP, a tym samym i PKA [15,64]. Białka kotwiczące kinazę A odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu plemników, gdyż uczestniczą w regulacji ich ruchu, kapacytacji i reakcji akrosomalnej. Ponadto wzrost stężenia cAMP w plemniku powoduje wzrost ilości ATP, co z kolei dodatkowo wpływa na większą ruchliwość męskiej gamety [32]. Wśród plemnikowych białek kotwiczących PKA można wyróżnić AKAP84 (AKAP1), AKAP110 (AKAP3), AKAP82 (AKAP4), AKAP95 (AKAP8), AKAP220 (AKAP11), WAVE-1 oraz MAP2 [16]. Oprócz wiązania z PKA, AKAP mogą także wiązać się z czterema grupami białek, homologicznymi do domeny dimeryzacji/dokowania RII (R2D2). Białka R2D2 w dużej ilości obecne są w jądrach. Uczestnictwo tych białek w funkcjonowaniu wici i rzęsek nie zależy od aktywności PKA oraz, w odróżnieniu od RII, nie wiążą one cAMP [29]. Nokaut genu AKAP4 u samców myszy skutkuje bezpłodnością spowodowaną brakiem ruchu plemników. Białko AKAP4, zwane także komponentą 1 osłony włóknistej, jest swoiste dla plemnika i występuje w osłonie włóknistej głównej części wici plemnika [15]. Fosforylacja białek, zachodząca w czasie kapacytacji, także może „aktywować” niektóre białka. Przykładem są kinazy aktywowane sygnałem zewnątrzkomórkowym ERK-1 i ERK-2 (ERK - extracellular signal-regulated kinases) [28].

ROZPOZNANIE GAMET

Receptory komórki jajowej

Receptory oocyty, rozpoznające domeny na powierzchni plemnika, znajdują się na osłonce przejrzystej. Po rozpoznaniu osłonka wiąże plemnik, inicjuje reakcję akrosomalną, a po zapłodnieniu komórki jajowej zapobiega polispermii [67]. Osłonkę przejrzystą (ZP – zona pellucida) budują glikoproteiny, z których najlepiej poznane to ZP1 (o masie 200 kDa), ZP2 (120 kDa) i ZP3 (83 kDa). Plemniki, które nie uległy reakcji akrosomalnej wiązane są przez receptor ZP3, natomiast po zajściu reakcji akrosomalnej wiązanie stabilizowane jest przez glikoproteinę ZP2 [50,67]. Glikoproteiny zbudowane są z polipeptydów, z którymi wiązaniem N- i O-glikozydowym połączone są oligosacharydy. Glikoproteiny osłonki przejrzystej są syntetyzowane przez oocyt w czasie fazy wzrostu (w pierwszych 2-3 tygodniach cyklu miesięczkowego u kobiet). W czasie owulacji ich wytwarzanie zostaje zatrzymane. Dimery

budujące ZP2 i ZP3 polimeryzują, tworząc długie filamenty, które budują osłonkę i są wiązane krzyżowo przez glikoproteinę ZP1 [114]. W badaniach na zwierzętach wykazano, że szczególną rolę w wiązaniu plemnika z osłonką przejrzystą odgrywają obecne na ZP3 N-glikany, zwłaszcza struktury wysokomannozowe oraz rozgałęzione łańcuchy typu złożonego [98,121]. Wygląda na to, że wszystkie cukry znajdujące się w pozycji końcowej, lub nieredukującej, w łańcuchach oligosacharydowych ZP3, uczestniczą w wiązaniu plemnika. Zaobserwowano, że plemnik wiąże się ze strukturami laktosaminowymi glikanów przyłączonych za pomocą wiązania O-glikozydowego, jednakże N-związane glikany mają także liczne łańcuchy laktosaminowe, które uczestniczą w wiązaniu plemników u ssaków. Niektóre N- i O-związane łańcuchy cukrowe zawierają epitop GalNAc β 1,4Gal, który może być ograniczony do wewnętrznej części ZP i uczestniczyć w kolejnych fazach wiązania plemnika i/lub penetracji [98].

Receptory plemnika

W przypadku człowieka udział w rozpoznawaniu gamet bierze co najmniej 9 białek, o masie 11–25 kDa. Białko plemnika SP56 (sperm protein 56) jest receptorem, rozpoznającym glikoproteinę ZP3 osłonki przejrzystej i należy do grupy białek regulujących układu dopełniacza [21,68]. Białko 1 wiążące osłonkę przejrzystą (ZBPPI – zona pellucida binding protein 1) jest słabiej wiązane przez osłonkę w obecności proakrozyny, co może sugerować ich współzawodnictwo na początkowym etapie zapłodnienia. Badania wykazały, że myszy pozbawione genu kodującego ZBPPI są bezpłodne [13]. U człowieka wykryto także geny kodujące zonadhezynę, wielodomenowe białko błonowe, które w specyficzny sposób wiąże się z osłonką przejrzystą oocyty [105]. Zonadhezyna jest umiejscowiona w zewnętrznej błonie akrosomu, nie zaś w błonie komórkowej, w związku z czym początkowo uważano, że jej funkcja jest raczej ograniczona do reakcji akrosomalnej, niż do rozpoznania pomiędzy plemnikiem a komórką jajową. Jednakże wykazano, że reakcja wiązania pomiędzy plemnikiem a komórką jajową lub penetracji komórki jajowej przez plemnik była znacząco obniżona, gdy mysie plemniki podczas reakcji kapacytacji inkubowano z przeciwciałami antyzonadhezyny [105,106]. Białko 10 plemnika (SP-10 – sperm protein 10) jest białkiem swoistym jądrowo, pojawiającym się na spermatydach, uczestniczącym w oddziaływaniach pomiędzy plemnikiem i osłonką przejrzystą. Jednak SP-10 przypuszczalnie może także odgrywać rolę w oddziaływaniach plemnik-oolemma [42]. Badania *in vitro* hamowania procesu zapłodnienia za pomocą mono- i poliklonalnych przeciwciał anty-SP10 wykazały znaczne obniżenie zdolności plemników do połączenia z oocytem, czego powodem było obniżenie zdolności wiązania plemnika z ZP2 osłonki przejrzystej [23].

Uważa się, że tratwy lipidowe odgrywają rolę w agregacji białek o określonych receptorach, lecz budowa struktur multimericznych, takich jak np. multimericznego kompleksu rozpoznającego osłonkę przejrzystą (MZRC – multimeric zona recognition complex), sugeruje istnienie większej liczby cząsteczek o właściwościach agregacyjnych. W związku z powyższym, wydaje się oczywistym, że wiele cząsteczek białek opiekuńczych (chaperons) jest umiejscowionych wewnątrz tratw lipidowych [78,87]. Cząsteczki opiekuńcze, zwane też białkami szoku cieplnego (HSPs – heat shock

proteins), odgrywają dobrze poznaną rolę pośredników w procesie fałdowania białka i kierowaniu go do miejsca przeznaczenia, gromadzeniu multimetrycznych struktur białkowych oraz transporcie białek przez błony [72]. Na powierzchni plemników ssaków obecnych jest wiele białek opiekuńczych, wśród których są też białka wykrywane wewnątrz błon (np. HSP90B1, HSPA8, HSPD1) [72]. Białka te, jako markery tratw lipidowych, nie tylko są umiejscowione w tym samym obszarze błony komórkowej plemnika, ale wykazano także, że HSP90B1 i HSPD1 podlegają fosforylacji tyrozyny związanej z kapacytacją, tj. modyfikacji potranslacyjnej niezbędnej do zajścia tego procesu [4].

Na powierzchni ludzkich plemników jest obecnych wiele białek złożonych, o dużej masie cząsteczkowej, spośród których są też takie, które wykazują powinowactwo do osłonki przejrzystej [86]. Redgrove i wsp. [86] zidentyfikowali niektóre ze składników multimetrycznego proteasomu 20S oraz zawierający chaperoniny kompleks TCP-1 (CCT). Autorzy potwierdzili hipotezę, że reakcja kapacytacji prowadzi do gromadzenia się i/lub uaktywnienia złożonych białek multimetrycznych odpowiedzialnych za pośredniczenie w reakcji pomiędzy plemnikiem a osłonką przejrzystą [86]. Kompleks TCP-1 jest odpowiedzialny za prezentację, stabilizację i/lub gromadzenie się cząsteczek oddziałujących z osłonką przejrzystą, a także może regulować tworzenie się wielocząsteczkowych kompleksów białkowych [41]. Proteasom 20S, to duży kompleks proteazowy odpowiedzialny za selektywną degradację ubikwitynowanych białek [86], czyli takich, które w procesie ubikwitynacji zostały „oznakowane” i przeznaczone do degradacji [12]. W ten sposób degradowane są w cytoplazmie białka nieprawidłowo zsynchronizowane, źle rozmieszczone w strukturach subkomórkowych lub starzejące się [80]. Kompleksy proteasomowe mogą być różnorodnie aktywowane podczas dojrzewania plemników i w ten sposób przygotowywane do funkcjonalnej roli w oddziaływaniu plemnik-komórka jajowa [86].

REAKCJA AKROSOMALNA

Reakcja akrosomalna, ostatni etap aktywacji gamety męskiej, jest niezbędna do późniejszej penetracji osłonki przejrzystej przez plemnik i może zachodzić dzięki enzymom akrosomalnym, uwalnianym w czasie tego procesu. Reakcja akrosomalna przygotowuje również plemnik do fuzji z oolemmą i może być indukowana przez płyn pęcherzykowy, progesteron, oocyty oraz związki chemiczne, takie jak jonofor Ca^{2+} [107]. Reakcję akrosomalną podzielić można na trzy główne etapy:

- fuzję plazmalemy z zewnętrzną błoną akrosomu i formowanie pęcherzyków akrosomalnych;
- uwalnianie enzymów akrosomu;
- ekspozycję wewnętrzną błony akrosomalnej wraz z przyłączonymi do niej enzymami, głównie hialuronidazą i akrozyną [32].

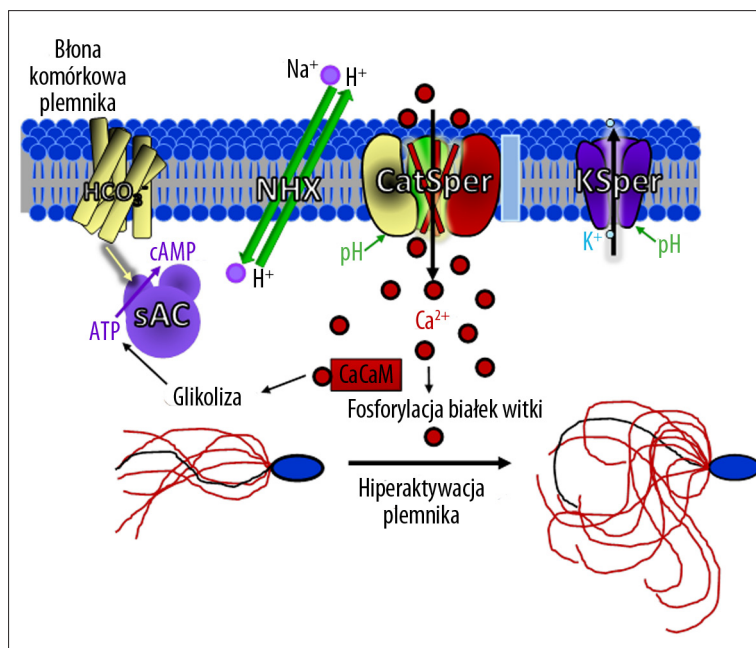
Plemnik, który przeszedł przez proces kapacytacji, może wejść w interakcję z komórkami wzgórką jajonośnego lub osłonką przejrzystą komórki jajowej [32]. Receptory plemnika, takie jak białko SP56, receptor dla ZP3 obecny w akrosomie, czy p95 (protein 95) [68,90,113], po połączeniu z ligandem ZP3 powodują aktywację fosfatyzacji, kinaz tyrozynowych [5] oraz heterotrimerycznych białek G,

które mają wpływ na wzrost pH wewnątrz plemnika [89]. Aktywacja powyższych enzymów oraz białek powoduje napływ jonów Ca^{2+} na skutek otwarcia kanałów wapniowych [83]. Dyfuzja Ca^{2+} do wnętrza komórki jest przyczyną inaktywacji Na^+K^+ATP -azy i w efekcie gwałtownego napływu jonów Na^+ do wnętrza komórki. Dokomórkowy przyływ Na^+ wywołuje, za pośrednictwem nośnika Na^+/H^+ , wypływ jonów H^+ i wzrost pH. Istnieje hipoteza, że oprócz nośnika Na^+/H^+ na migrację jonów H^+ ma wpływ także progesteron. Hormon ten powoduje również aktywację kanałów Cl^- gamety męskiej. Napływ jonów Cl^- do komórki pobudza nośnik Cl^-/HCO_3^- , który usuwa z komórki Cl^- i pompuje jony HCO_3^- do jej wnętrza [82]. Wzrastające pH, przez napływ HCO_3^- i wypływ H^+ , aktywuje cyklazę adenylołą, która wytwarza cAMP. Cykliczny adenozymonofosforan także oddziałuje na wymiennik Na^+/H^+ przez pośrednią lub bezpośrednią jego aktywację. Wzrost pH wewnątrz komórki plemnika powoduje aktywację kanałów CatSper (cation channel of sperm) i napływ jonów Ca^{2+} . Zmiana pH aktywuje także kanały KSper (K^+ channel of sperm), wypompowujące jony K^+ na zewnątrz komórki. Powstająca przez to hiperpolaryzacja błony komórkowej również działa na kanały CatSper i napływające nimi jony Ca^{2+} . Jony wapnia, które przemieszczają się do wnętrza gamety, powodują aktywację kalmoduliny i kinazy kalmodulinowej, czego efektem jest wzrost wytwarzania adenozyntrofosforanu (ATP), fosforylacja białek witki oraz zwiększenie wytrzymałości plemnika i amplitudy uderzeń witki, czyli nabycie przez gametę zdolności do ruchu hiperaktywnego (ryc. 1) [14]. Jony Ca^{2+} , z udziałem lub bez kalmoduliny, wpływają od wewnątrz na błonę plazmatyczną oraz od zewnątrz na zewnętrzną błonę akrosomu. Efektem jest neutralizacja ładunku obu błon, co ułatwia ich fuzję, która zachodzi dzięki wiązaniu fosfolipidów i ich rozdzieleniu fazowemu. Aktywowane jonami Ca^{2+} białkowe fosfolipazy, np. fosfolipaza A2, powodują hydrolizę sąsiednich fosfolipidów do lizofosfolipidów i kwasu arachidonowego [40]. Po przebudowie błon komórkowych jony Ca^{2+} gromadzą się, a jony H^+ opuszczają wnętrze akrosomu. Zachodzi przemiana nieaktywnej proakrozyny do enzymatycznie aktywnej akrozyny oraz uwolnienie enzymów akrosomalnych [68]. Akrozyna ma zdolność modyfikacji innych białek akrosomalnych, a także została opisana jako białko wiążące osłonkę przejrzystą [47].

Kontrolowany wpływ przez kanały jonowe magazynowanego w akrosomie Ca^{2+} , jest także regulowany przez substancje pośredniczące, takie jak np. 1,4,5-trifosforan inozytolu (IP3) [24,111]. U ssaków receptory dla IP3 są obecne na zewnętrznej błonie akrosomu, a IP3 jest syntetyzowany w odpowiedzi na kontakt z osłonką przejrzystą lub progesteronem, po hydrolizie polifosfoinozydów i fosfatydylocholinę przez fosfolipazę C [82]. Zależna od IP3 mobilizacja Ca^{2+} bezpośrednio aktywuje fuzję jąder pęcherzyków *in vitro*, a uwolnienie wapnia z akrosomu może ponadto odgrywać ważną rolę sprzyjając wydarzeniom związanym z fuzją błon, a w rezultacie akrosomalnej egzocytozie [24,111].

PENETRACJA OSŁONKI PRZEJRZYSTEJ

Plemnik, zanim zapłodni komórkę jajową, musi być zdolny do związania się z jej osłonką przejrzystą i jej penetracji oraz ukończenia reakcji akrosomalnej przed fuzją z oolemmą



Ryc. 1. Model aktywacji kanałów jonowych plemnika. Jony HCO_3^- napływając do wnętrza komórki aktywują rozpuszczalną cyklazę adenylową (sAC – soluble adenylyl cyclase). W efekcie wzrasta synteza cAMP, który pośrednio lub bezpośrednio aktywuje wymiennicz jonowy Na^+/H^+ (NHX – Na^+/H^+ exchange). W ten sposób wzrasta pH, aktywowane zostają kanały CatSper i KSper. Dzięki kanałom KSper następuje depolaryzacja błony komórkowej, a jony Ca^{2+} , napływające przez kanały CatSper, aktywują kalmodulinę (CaCaM – calmodulin) i kinazę kalmodulinową. Powoduje to fosforylację białek wtki, wzrost amplitudy jej uderzeń i stymuluje wytwarzanie ATP. W ten sposób zwiększa się wytrzymałość plemnika, który staje się hiperaktywny (na podstawie [75] zmodyfikowano)

[31]. Rolę w wiązaniu obu gamet odgrywają glikoproteiny osłonki: ZP3, która indukuje reakcję akrosomalną oraz ZP2 utrzymująca powstałe już wiązanie [50,67]. Ganguly i wsp. [36] wykazali, że u człowieka glikoproteina ZP1 uczestniczy w wiązaniu plemników, które zakończyły proces kapacytacji oraz indukuje akrosomalną egzocytozę. U niektórych gatunków, w tym także u człowieka, zidentyfikowano ZP4, lecz jej rola ciągle pozostaje do wyjaśnienia [60]. Yauger i wsp. [119] w badaniach na myszach wykazali, że obecność ZP4 niewystarczająco wspomaga reakcję oddziaływania plemnika z osłonką przejrzystą, w związku z czym do rozpoznania gamet są potrzebne także inne glikoproteiny. Na penetrację osłonki przez gametę męską mają wpływ także ruchomość wtki, która zwiększa się w czasie kapacytacji oraz obecność akrozyny aktywowanej w czasie reakcji akrosomalnej [2]. Przez wiele lat sądzono, że enzym ten niezbędny jest do penetracji osłonki przejrzystej, jednak udowodniono, że nawet plemniki pozbawione akrozyny zdolne są do zapłodnienia oocytu [117], aczkolwiek brak akrozyny sprawia, że penetracja osłonki jest utrudniona [2]. Istnieją także inne enzymy, które mogą brać udział w penetracji osłonki: jądrowa proteaza serynowa 5 (TESP5 – testicular serine protease 5), zakotwiczona w błonie plemnika [45], oraz składający się z wielu podjednostek proteolityczny holoenzym proteasomowy, znajdujący się w akrosomie [104]. W czasie penetracji macierz akrosomu jest stopniowo rozpraszana, a ruch plemnika pozbawia go białek, znajdujących się na jego powierzchni (ryc. 2). Odślawiają się wówczas „nowe” białka akrosomu, przylegające do kolejnych, głębszych powierzchni osłonki. Plemnik tworzy sobie drogę, dosięgając kolejnych części osłonki przejrzystej, jednocześnie „pozbywając się” białek akrosomu [38].

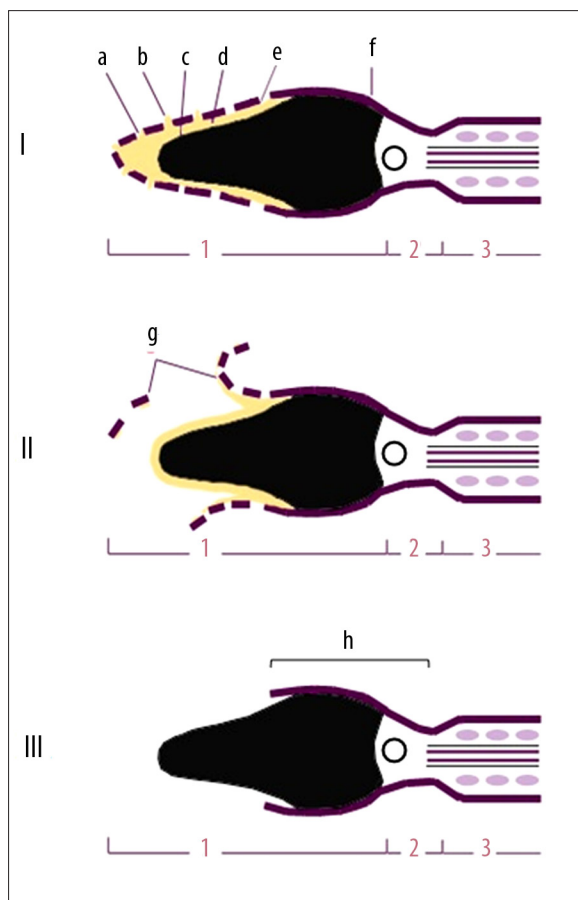
FUZJA PLEMNIKA I KOMÓRKI JAJOWEJ

Adhezja i fuzja gamet dotyczą różnych regionów błon komórkowych. Fuzja wizualnie przypomina fagocytozę [94] i zachodzi w równikowej części główki plemnika, podczas gdy wierzchołek, ograniczony przez wewnętrzną błonę akrosomalną, włączany jest w pęcherzyk pochodzący

z oolemy [9]. Dochodzi do elongacji mikrokosmków z oolemy poza wierzchołek główki plemnika i ich połączenia z wewnętrzną błoną akrosomalną [9]. Następnie plemnik zostaje wchłonięty, a uderzenia wtki ustają wraz z fuzją błon komórkowych, ponieważ nie są niezbędne do wchłonięcia główki plemnika przez oocyt [8].

Połączenie gamet zachodzi bezpośrednio po penetracji ZP i uczestniczy w niej plemnik, który uległ reakcji akrosomalnej [100]. To, że jedynie plemnik, który zakończył reakcję akrosomalną jest zdolny do fuzji z komórką jajową wskazuje na to, że plemnikowe antygeny są ekspresjonowane lub aktywowane wyłącznie po zakończeniu reakcji akrosomalnej. Wiele antygenów plemnikowych, jak np. Mn9, CD46 i glikoproteina Izumo, ulega aktywacji dopiero po zakończeniu reakcji akrosomalnej [50].

Do grupy związków uczestniczących w fuzji plemnika z oolemą należą integryny oraz ich receptory glikoproteinowe, znajdujące się na powierzchni komórek organizmu, biorące udział w oddziaływaniach między nimi. Zmiany właściwości adhezji komórek wiążą się bezpośrednio ze zmianami ekspresji integryn na ich powierzchni, a receptory dla integryn odgrywają również rolę w procesach związanych z zapłodnieniem. Pod względem chemicznym integryny są glikoproteinowymi heterodimerami, zbudowanymi z podjednostek α i β . Na N-końcu obu podjednostek znajduje się region łączący integrynę z ligandem, a pojedyncza integryna może wiązać więcej niż jeden ligand. Najwcześniej opisanym wiązaniem było połączenie integryny z sekwencją aminokwasową RGD (Arg-Gly-Asp), która obecna jest w fibronektynie i witronektynie [8]. Adhezja z udziałem integryn nie jest wyłącznie działaniem mechanicznym. Ma znaczenie w przekazywaniu sygnału z komórki na zewnątrz oraz z otoczenia do komórki. Przykładami przekazu sygnału dokomórkowego jest działanie antyportera Na^+/H^+ , napływ jonów Ca^{2+} [14] i fosforylacja tyrozyny w grupie białek cytoplazmatycznych [32,76]. Funkcją integryn w procesie zapłodnienia jest umożliwienie wzajemnej adhezji gamet.



Ryc. 2. Schemat przebiegu reakcji akrosomalnej. W reakcji akrosomalnej następuje fuzja błony komórkowej i zewnętrznej akrosomu (I). W drugim etapie reakcja akrosomalna jest zakończona. Macierz akrosomu jest rozpraszana, a ruch plemnika pozbawia go białek powierzchniowych (II). W kolejnym etapie główka plemnika jest otoczona tylko wewnętrzną błoną akrosomalną. Tak przygotowany plemnik jest gotowy do połączenia się z komórką jajową (III); **a** – pory; **b** – wydostająca się zawartość akrosomu; **c** – wewnętrzna błona akrosomu; **d** – zawartość akrosomu (enzymy); **e** – zewnętrzna błona akrosomu; **f** – błona komórkowa; **g** – białka akrosomu, odrywające się podczas penetracji; **h** – region postakrosomalny; **1** – główka; **2** – szyjka; **3** – wstawka [38]

Błona komórkowa oocytu zawiera receptory integrynowe, rozpoznające fibronektynę i witronektynę, które obecne są na błonie komórkowej plemnika. Fibronektyna ulega ekspresji na powierzchni plemnika w czasie kapacytacji [35], natomiast witronektyna syntetyzowana jest podczas spermatogenezy i obecna jest na wewnętrznej błonie akrosomalnej [11]. Antagonistycznie do integryn działają dezintegryny, peptydy izolowane z jadu gadów, mające wysokie powinowactwo do integryn. Jedną z nich jest echistatyna, która blokując funkcję adhezyjną integryn RGD-zależnych, hamuje adhezję plemników do oocytu, lecz nie wpływa na penetrację gamet już związanych [8].

Integryny nie są jedynymi czynnikami, które mają wpływ na interakcję między gametami. W oolemmie ssaków odnaleziono także receptor Fc γ , rozpoznający fragment Fc immunoglobuliny G (IgG) [10], receptor C1q dla białek układu dopełniacza [34] oraz receptor CR3 [3]. Na plemniku po zajęciu reakcji akrosomalnej, na wewnętrznej błonie akrosomalnej,

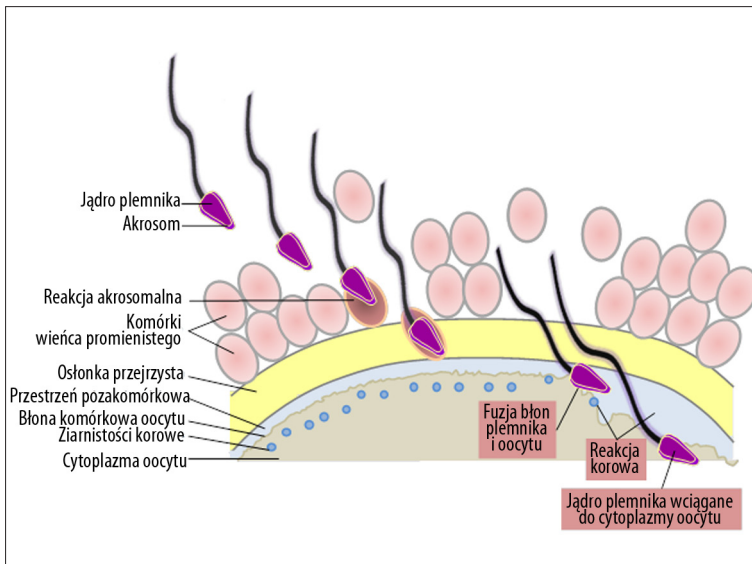
prezentowany jest natomiast antygen CD46 [17]. Sugeruje się także rolę składnika dopełniacza C3b jako białka łączącego antygen CD46 plemnika z receptorem CR3 oolemy [3]. Adhezja i fuzja gamet ma także związek z ekspresją na powierzchni plemnika fertyliny, heterodimerycznej glikoproteiny należącej do grupy białek transportowych ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain) zawierających domenę dezintegryny i metaloproteinazy [7]. Kolejnym czynnikiem uczestniczącym w fuzji gamet jest tetraspanina CD9, białko obecne na powierzchni komórki jajowej, niezbędne w procesie zapłodnienia [70]. Wykazano, że u myszy pozbawionych CD9 fuzja gamet nie jest możliwa [50].

BLOKADA POLISPERMII

Pierwszy z kolejno następujących po sobie mechanizmów zapobiegających polispermii, zachodzący w jajowodach, polega na zatrzymaniu plemników poprzez ich wiązanie przez komórki nabłonkowe znajdujące się w końcowym regionie cieśni, co prowadzi do obniżenia ich zdolności do poruszania się oraz skrócenia czasu ich przeżycia [25,102]. Mechanizm ten pozwala na uniknięcie masywnego, jednoczesnego napływu plemników w pobliżu oocytu [25]. Po pierwszym kontakcie z plemnikiem, komórka jajowa ssaków uruchamia dwa różne typy reakcji zapobiegających polispermii. Pierwszy z nich, najszybszy, blokuje polispermię przez depolaryzację błony oocytu, ale nie jest obserwowany u ssaków. U ssaków następuje wolniejsza i słabsza, ale dobrze scharakteryzowana reakcja, najprawdopodobniej wzmacniająca sygnalizację poprzez Ca²⁺ [37] oraz reakcja osłonki przejrzystej, proces tzw. powolnego bloku polispermii, potęgująca egzocytozę ziaren korowych umieszczonych w cytoplazmie komórki jajowej [25]. Egzocytoza ziaren korowych jest wywołana przez wahania oscylacji Ca²⁺ indukowane przez połączenie z komórką jajową plemniki i jak dotąd uważana jest za najważniejszy mechanizm zależny od komórki jajowej odpowiedzialny za blokadę polispermii u większości ssaków domowych [25]. Otwierane są kanały wapniowe i jony Ca²⁺ wnikają do komórki jajowej z przestrzeni pozakomórkowej oraz uwalniane są z części gładkiej retikulum endoplazmatycznego [67]. Jeden lub więcej receptorów na powierzchni oocytu połączonych jest z białkami G lub kinazą tyrozynową [71], a rozpuszczalny czynnik plemnikowy (SSF – soluble sperm factor) po iniekcji do cytoplazmy oocytu powoduje ich aktywację [26]. Wzrost ilości jonów wapnia wewnątrzkomórkowego warunkuje dezaktywację czynnika cytostaticznego (CSF – cytostatic factor), utrzymującego oocyt w stadium metafazy II, oraz czynnika promującego fazę M (MPF – maturation/mitosis promoting factor). Aktywacja oocytu wskutek napływu jonów wapnia powoduje także zajście reakcji korowej. W czasie tej reakcji następuje fuzja ziarnistości korowych z błoną komórki jajowej i uwolnienie z nich proteaz do przestrzeni okołoołtkowej. Uwolnienie proteaz przebiega jako egzocytoza, której skutkiem jest zmiana fizycznych i chemicznych właściwości osłonki przejrzystej, dzięki czemu staje się ona nieprzepuszczalna dla innych plemników [67]. Kolejne etapy procesu zapłodnienia przedstawia ryc. 3.

ROLA GLIKOPROTEIN W PROCESIE ZAPŁODNIENIA

Procesowi zapłodnienia towarzyszy wiele reakcji biochemicznych, w których niebagatelną rolę odgrywają



Ryc. 3. Główne etapy procesu zapłodnienia. Akrosom gamety męskiej zawiera wiele enzymów hydrolitycznych. W drogach rodnych kobiety plemniki ulegają kapacytacji, która umożliwia zajście reakcji akrosomalnej. W pobliżu komórki jajowej, najprawdopodobniej na skutek stymulacji przez komórki wieńca promienistego oraz osłonkę przejrzystą, plemnik uwalnia zawartość akrosomu w procesie egzocytozy i dochodzi do penetracji osłonki przejrzystej. Z osłonką przejrzystą łączą się wyłącznie plemniki, które uległy reakcji akrosomalnej, a ich zdolność do penetracji nie trwa zbyt długo. Komórki wieńca promienistego zawierają kwas hialuronowy, który zostaje uwolniony podczas zapłodnienia (na podstawie [50] zmodyfikowano)

glikoproteiny obecne w nasieniu. Obecność glikanów umożliwia glikoproteinom uczestnictwo w oddziaływaniach międzykomórkowych, w tym także między gametami [18].

Znaną i ważną glikoproteiną jest fibronektyna (FN), która bierze udział w wielu oddziaływaniach międzykomórkowych, pełniąc funkcje adhezyjne [116], będąca ważnym składnikiem tkanki łącznej oraz wielu płynów ludzkiego organizmu, w tym również plazmy nasienia [115]. Dzięki obecności wielu domen fibronektyna jest zdolna do wiązania heparyny, fibryny, fibrynogenu, kolagenu, IgG oraz białka dopełniacza C1q [81]. Fibronektyna występująca w plazmie nasienia jest wytwarzana przez gruczoły dodatkowe i wydzielana do kanalików najądrza, skąd później dostaje się do płynu nasiennego [115]. Obecna na powierzchni plemnika fibronektyna, w chwili uszkodzenia gamety zostaje uwalniana, co objawia się wzrostem jej stężenia w plazmie nasienia. Tuż po ejakulacji dimery fibronektyny wraz z semenogeliną tworzą w plazmie nasienia strukturę żelu [46]. Podczas upłyniania nasienia fibronektyna jest fragmentowana przez antygen swoisty dla prostaty (PSA – prostate specific antigen) [62], a oznaczenie stężenia fibronektyny przed lizą jest dodatkowym wskaźnikiem płodności męskiej [46]. Obecność fragmentów FN w plazmie nasienia ludzkiego wykazały także badania Kątnik-Prastowskiej i wsp. [54], niezależnie od wyników standardowego badania nasienia, przy jednoczesnym całkowitym braku postaci natywnej FN. Zaobserwowano, że w patologicznych plazmach nasienia obecne były fragmenty o masach cząsteczkowych mieszczących się w granicach 60–120 kDa, w przeciwieństwie do normozoospermicznych plazm nasienia, w których dodatkowo obecne były fragmenty FN o masach 125–200 kDa [54].

Badania Kątnik-Prastowskiej i wsp. [53] dotyczące stopnia i profilu glikozylacji fibronektyny obecnej w plazmie nasienia ludzkiego, wykazały istnienie zależności pomiędzy wzrostem stężenia FN a spadkiem ekspresji końcowego kwasu sjałowego przyłączonego zarówno wiązaniem α 2,3, jak i α 2,6. Usjałowane glikokoniugaty mają zdolność ochraniać części polipeptydowej przed działaniem enzymów proteolitycznych, szczególnie miejsc o znaczeniu funkcjonalnym. Odsjałowane glikoproteiny z odsłoniętą resztą

galaktozy lub N-acetylgalaktozoaminy, są szybko usuwane z organizmu przez receptory swoiste dla asjałoglikoprotein, obecne m.in. na plemnikach [52]. Niebagatelną rolę w procesach biochemicznych zachodzących w ludzkim organizmie odgrywa także stopień i profil fukozytacji glikoprotein. Fukozylowane struktury cukrowe typu Lewis^x i/lub Lewis^y biorą udział w interakcji i wiązaniu gamet, tym samym przyczyniając się do zapłodnienia [18]. Kratz i wsp. [59] wykazali po raz pierwszy dla FN plazmy nasienia ekspresję UEA-reaktywnej fukozy na jej glikanach, co może sugerować obecność struktur cukrowych typu Lewis^y. Analiza stopnia i profilu glikozylacji FN obecnej w plazmie nasienia ludzkiego wykazała charakterystyczny dla grupy pacjentów z leukocytospermią spadek stopnia fukozytacji rdzeniowej (fukoza α 1,6) oraz dystalnej (fukoza α 1,2 i α 1,3) z jednoczesnym wzrostem ekspresji końcowego kwasu sjałowego przyłączonego zarówno wiązaniem α 2,3, jak i α 2,6 [59]. W przypadku podwyższonego stężenia FN, obserwowano nieprawidłowości w parametrach nasienia, np. niewielką ruchliwość plemników [46]. Jednakże oprócz fibronektyny, na nieprawidłowe wyniki standardowej oceny nasienia mają wpływ również inne czynniki, takie jak np. stany zapalne, a rola fibronektyny w procesie zapłodnienia nie została jeszcze do końca poznana [115].

Semenogelina (Sg), główne białko odpowiedzialne za koagulację nasienia, jest syntetyzowana w pęcherzykach nasiennych, a następnie na skutek działania antygeny swoiste dla prostaty ulega fragmentacji podczas procesu upłyniania nasienia. Powstałe fragmenty o różnych funkcjach fizjologicznych, takich jak np. transportowanie jonów cynku, aktywność antybakteryjna, czy też aktywowanie hialuronidazy, odgrywają ważną rolę w regulacji nabywania przez plemniki zdolności do procesu kapacytacji oraz do ruchu postępowego [27,101]. Natywna semenogelina najprawdopodobniej jest odpowiedzialna za spowolnienie ruchu plemników poprzez ich aglutynację. Mechanizm działania semenogeliny nie jest w pełni poznany, jednak niewłaściwa jej degradacja wpływa na obniżenie męskiej płodności. Semenogelina oraz jej fragmenty blokują proces kapacytacji oraz towarzyszących mu mechanizmów w stężeniach znacznie niższych, niż te obserwowane w plazmie nasienia i mogą odgrywać ważną rolę w zapobieganiu przedwczesnej

kapacytacji. Efekt działania Sg zależy od czasu i stopnia proteolizy przez PSA, a każda zmiana może wpłynąć na fizjologię nasienia i męską płodność [27].

Kolejną ważną glikoproteiną plazmy nasienia jest $\alpha 1$ -kwasna glikoproteina (AGP), jedno z białek ostrej fazy. Poland i wsp. [85] wykazali, że AGP plazmy nasienia ma większą masę cząsteczkową niż AGP osocza krwi (odpowiednio: 47 i 43 kDa), co wynika z jej odmiennej struktury oligosacharydowej. Ponadto wykazano istnienie zależności pomiędzy stopniem glikozylacji AGP a jej stężeniem w plazmie nasienia ludzkiego [85]. W plazmach nasienia o fizjologicznych stężeniach AGP dominowały gliki dwuantenowe, z fukozą przyłączoną wiązaniem $\alpha 1,3$ do GlcNAc i końcowym kwasem sjałowym przyłączonym zarówno wiązaniem $\alpha 2,3$, jak i $\alpha 2,6$ [58]. Plazmy nasienia o ekstremalnie wysokich stężeniach AGP charakteryzowały się przewagą glikanów trój- i czteroantennowych, o niskiej zawartości fukozy wchodzącej w skład struktur Lewis^x oraz słabej reaktywności ze sjałoswoistymi lektynami, szczególnie z lektyną z *Maackia amurensis* swoistą wobec kwasu sjałowego przyłączonego wiązaniem $\alpha 2,3$ [58]. Wykazano także istnienie związanych ze stężeniem różnic w typie fukozytacji. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia AGP spada ekspresja fukozytowanych struktur oligosacharydowych typu Lewis^x, natomiast pojawiają się fukozylowane struktury typu Lewis^a, nieobecne w plazmach nasienia o niskich stężeniach AGP [85]. Kratz i wsp. [59] wykazali także, że gliki AGP plazmy nasienia oprócz ekspresji fukozy charakterystycznej dla struktur typu Lewis^x i Lewis^a, charakteryzują się obecnością fukozy UEA-reaktywnej, co może świadczyć o obecności struktur cukrowych typu Lewis^y [59]. Analiza profilu i stopnia glikozylacji AGP w plazmach nasienia pochodzących od pacjentów z leukocytospermią wykazała wzrost ekspresji końcowego kwasu sjałowego przyłączonego wiązaniem $\alpha 2,3$, z jednoczesnym wzrostem ekspresji LTA-reaktywnej fukozy struktur oligosacharydowych typu Lewis^x, w porównaniu z pacjentami normozoospermicznymi [59].

Glikoproteiną modulującą funkcje plemników w drogach rodnych kobiety jest glikodelina, która dzięki obecności na jej powierzchni glikanów typu złożonego uczestniczy w procesach biologicznych związanych z reprodukcją człowieka oraz w reakcjach immunologicznych [96,120]. W plazmie nasienia ludzkiego obecna jest jedna z czterech glikoform glikodeliny – glikodelina S, której wysokie stężenie oraz duża kinetyka wiązania umożliwia jej szybkie oddziaływanie na plemniki [19]. Rola glikodeliny S polega na hamowaniu indukowanego przez albuminę wypływu cholesterolu z plemników [19,120]. Z uwolnieniem cholesterolu z błony komórkowej plemników związany jest proces kapacytacji [110], a hamujące działanie glikodeliny S na wypływ cholesterolu najprawdopodobniej zapobiega przedwczesnej kapacytacji, przed wniknięciem plemnika do jamy macicy. Ma to duże znaczenie, gdyż zdolność ludzkich plemników do zapłodnienia ulega obniżeniu w ciągu kilku godzin od kapacytacji, przez co tracą one zdolność do reakcji akrosomalnej indukowanej przez osłonkę przejrzystą [22]. Związana z plemnikami glikodelina S jest usuwana podczas przechodzenia plemników przez śluz szyjkowy [19]. Jakkolwiek plazma nasienia nie zawiera albuminy, to płyn macicy zawiera jej dużo. Usuwanie glikodeliny S umożliwia albuminie obecnej w jamie macicy inicjację kapacytacji

plemników wnikających do macicy [120]. Deglikozytowana glikodelina S nie ma właściwości hamujących reakcję kapacytacji, a wręcz przeciwnie, stymuluje go, co potwierdza znaczenie glikozylacji w tym procesie [96].

Innymi glikoproteinami uczestniczącymi w procesach związanych z zapłodnieniem są immunoglobuliny i tak np. immunoglobulina G (IgG) oraz immunoglobulina A (IgA), skierowane przeciw *Chlamydia trachomatis*, mogą wpływać niekorzystnie na jakość spermy [49]. Jedną z przyczyn autoagresji jest niedrożność dróg wyprowadzających nasienie. Przykładem mogą być mężczyźni poddani zabiegowi wazektomii – aż u 70% pacjentów obecne były przeciwciała przeciwplemnikowe [20]. Najczęściej wykrywanymi w surowicy przeciwciałami przeciwplemnikowymi są IgG, mogą jednak pojawiać się także IgA [123]. Immunoglobuliny klasy A i G obecne w nasieniu skierowane mogą być m.in. przeciw antygenowi zapłodnienia (FA-1 – fertilization antigen 1). Przeciwciała te opłaszczając powierzchnię plemników mogą powodować ich aglutynację lub inhibicję kapacytacji czy też reakcji akrosomalnej [93]. Przykładem może być przeciwciało monoklonalne AcrC5F10, należące do immunoglobulin klasy G, które może hamować aktywację proakrozyny, jej wiązanie z ZP2 osłonki przejrzystej oraz reakcję akrosomalną [109]. Przeciwciała wytwarzane w drogach rodnych kobiety mogą unieruchamiać plemniki, zakłócać procesy zapłodnienia, a także hamować przebieg reakcji następujących po zapłodnieniu [97]. Wysokie stężenia IgG i IgA uczestniczących w aglutynacji plemników, nieprawidłowości w budowie główki plemnika oraz znacznie niższe stężenie białek akrosomalnych, częściej obserwuje się u pacjentów z nieprawidłowymi parametrami nasienia, niż u pacjentów normozoospermicznych [108].

Ekspresja niektórych glikoprotein, jak np. Izumo, niezbędna jest do fuzji gamet [44,50]. Izumo, to powszechnie występująca, specyficzna glikoproteina błonowa, zlokalizowana w rejonie akrosomu. Zawiera ona jedną domenę zewnątrzkomórkową, która sekwencją aminokwasową przypomina immunoglobuliny oraz przypuszczalnie jedno miejsce glikozylacji. Przeciwciała skierowane przeciw jednemu z segmentów białka Izumo, mimo że nie mają wpływu na ruchliwość plemnika, utrudniają zespolenie gamet, a stopień zahamowania fuzji plemnika z oolemmą jest proporcjonalny do ich stężenia. Ponadto wyżej wspomniany segment białka Izumo ma zdolność zmniejszania reaktywności skierowanych przeciw niemu przeciwciał. Ze względu na swoistość ekspresji białek Izumo na błonie plemników i ich istotnej roli w procesie fuzji plemnika do komórki jajowej, białka te mogą się stać nowym antygenem wykorzystywanym w immunoantykoncepcji [112].

PODSUMOWANIE

Oddziaływanie gamet jest skomplikowaną reakcją, w którą zaangażowanych jest wiele czynników i mechanizmów, a ich poznanie ma wartość nie tylko merytoryczną, ale również praktyczną. W rzeczywistości rolę odgrywają zarówno czynniki makro- jak i mikroskopowe. Stwarza to ogromne możliwości diagnostyczne, co jest tym cenniejsze, że idiopatyczne przyczyny niepłodności stanowią wciąż spory odsetek spośród pozostałych, znanych przyczyn. Na każdym etapie zapłodnienia, tj. podczas kapacytacji plemników, rozpoznania gamet, reakcji akrosomalnej,

penetracji osłonki przejrzystej, fuzji gamet czy blokady polispermii, może się zdarzyć reakcja niefizjologiczna, która może stać się przyczyną niemożności poczęcia dziecka.

W rzeczywistości na niepłodność składa się wiele bardzo złożonych procesów, które niejednokrotnie trudno w pełni zdiagnozować.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adeoya-Osiguwa S.A., Fraser L.R.: Evidence for Ca²⁺-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 1996; 44: 111–120
- [2] Adham I.M., Nayernia K., Engel W.: Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 1997; 46: 370–376
- [3] Anderson D.J., Abbott A.F., Jack R.M.: The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 10051–10055
- [4] Asquith K.L., Baleato R.M., McLaughlin E.A., Nixon B., Aitken R.J.: Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J. Cell. Sci.*, 2004; 117: 3645–3657
- [5] Bailey J.L.: Factors regulating sperm capacitation. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 2010; 56: 334–348
- [6] Bi Y., Xu W.M., Wong H.Y., Zhu H., Zhou Z.M., Chan H.C., Sha J.H.: NYD-SP27, a novel intrinsic decapacitation factor in sperm. *Asian J. Androl.*, 2009; 11: 229–239
- [7] Blobel C.P.: Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev. Reprod.*, 2000; 5: 75–83
- [8] Bronson R.A., Fusi F.M.: Integrins and human reproduction. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996; 2: 153–168
- [9] Bronson R.A., Fusi F., Cooper G.W., Phillips D.: Antisperm antibodies induce polyspermy by promoting adherence of human sperm to zona-free hamster eggs. *Hum. Reprod.*, 1990; 5: 690–696
- [10] Bronson R.A., Fusi F.M., Fleit H.B.: Monoclonal antibodies identify Fc gamma receptors on unfertilized human oocytes but not spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.*, 1992; 21: 293–307
- [11] Bronson R., Peresleni T., Golightly M., Preissner K.: Vitronectin is sequestered within human spermatozoa and liberated following the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000; 6: 977–982
- [12] Bubko I., Gruber B.M., Anuszevska E.L.: Rola proteasomu w terapii chorób nieuleczalnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 314–325
- [13] Buffone M.G., Foster J.A., Gerton G.L.: The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int. J. Dev. Biol.*, 2008; 52: 511–522
- [14] Carlson A.E., Quill T.A., Westenbroek R.E., Schuh S.M., Hille B., Babcock D.F.: Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 32238–32244
- [15] Carnegie G.K., Means C.K., Scott J.D.: A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life*, 2009; 61: 394–406
- [16] Carr D.W., Newell A.E.: The role of A-kinase anchoring proteins (AKaps) in regulating sperm function. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2007; 63: 135–141
- [17] Cervoni F., Oglesby T.J., Adams E.M., Milesifluet C., Nickells M., Fenichel P., Atkinson J.P., Hsi B.L.: Identification and characterization of membrane cofactor protein of human spermatozoa. *J. Immunol.*, 1992; 148: 1431–1437
- [18] Chalabi S., Easton R.L., Patankar M.S., Lattanzio F.A., Morrison J.C., Panico M., Morris H.R., Dell A., Clark G.F.: The expression of free oligosaccharides in human seminal plasma. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 32562–32570
- [19] Chiu P.C., Chung M.K., Tsang H.Y., Koistinen R., Koistinen H., Seppälä M., Lee K.F., Yeung W.S.: Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 25580–25589
- [20] Clayton R., Moore H.: Experimental models to investigate the pathology of antisperm antibodies: approaches and problems. *Hum. Reprod. Update*, 2001; 7: 457–459
- [21] Cohen N., Wassarman P.M.: Association of egg zona pellucida glycoprotein mZP3 with sperm protein sp56 during fertilization in mice. *Int. J. Dev. Biol.*, 2001; 45: 569–576
- [22] Cohen-Dayag A., Tur-Kaspa I., Dor J., Mashiach S., Eisenbach M.: Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 11039–11043
- [23] Coonrod S.A., Herr J.C., Westhusin M.E.: Inhibition of bovine fertilization *in vitro* by antibodies to SP-10. *J. Reprod. Fertil.*, 1996; 107: 287–297
- [24] Costello S., Michelangeli F., Nash K., Lefevre L., Morris J., Machado-Oliveira G., Barratt C., Kirkman-Brown J., Publicover S.: Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction*, 2009; 138: 425–437
- [25] Coy P., Avilés M.: What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2010; 85: 593–605
- [26] Dale B., DeFelice L.J., Ehrenstein G.: Injection of a soluble sperm fraction into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia*, 1985; 41: 1068–1070
- [27] de Lamirande E.: Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2007; 33: 60–68
- [28] de Lamirande E., Gagnon C.: The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol. Hum. Reprod.*, 2002; 8: 124–135
- [29] Fiedler S.E., Bajpai M., Carr D.W.: Identification and characterization of RHOA-interacting proteins in bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 2008; 78: 184–192
- [30] Flesch F.M., Brouwers J.F., Nievelein P.F., Verkleij A.J., van Golde L.M., Colenbrander B., Gadella B.M.: Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell Sci.*, 2001; 114: 3543–3555
- [31] Florman H.M., Ducibella T.: Fertilization in mammals. W: The Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, red.: J. D. Neill. Elsevier, New York 2006, 55–112
- [32] Frączek M., Kurpisz M.: System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 523–534
- [33] Fraser L.R.: Interactions between a decapacitation factor and mouse spermatozoa appear to involve fucose residues and a GPI-anchored receptor. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998; 51: 193–202
- [34] Fusi F., Bronson R.A., Hong Y., Ghebrehwet B.: Complement component C1q and its receptor are involved in the interaction of human sperm with zona-free hamster eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991; 29: 180–188
- [35] Fusi F.M., Lorenzetti I., Vignali M., Bronson R.A.: Sperm surface proteins after capacitation. Expression of vitronectin on the spermatozoan head and laminin on the sperm tail. *J. Androl.*, 1992; 13: 488–497
- [36] Ganguly A., Bukovsky A., Sharma R.K., Bansal P., Bhandari B., Gupta S.K.: In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Hum. Reprod.*, 2010; 25: 1643–1656
- [37] Gardner A.J., Evans J.P.: Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2006; 18: 53–61
- [38] Gerton G.L.: Function of the sperm acrosome. W: Fertilization, red.: D.M. Hardy. Academic Press, San Diego 2002, 265–302
- [39] Gibbons R., Adeoya-Osiguwa S.A., Fraser L.R.: A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1. *Reproduction*, 2005; 130: 497–508
- [40] Goldman R., Ferber E., Zort U.: Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. *FEBS Lett.*, 1992; 309: 190–192
- [41] Guenther M.G., Yu J., Kao G.D., Yen T.J., Lazar M.A.: Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. *Genes Dev.*, 2002; 16: 3130–3135
- [42] Hamatani T., Tanabe K., Kamei K., Sakai N., Yamamoto Y., Yoshimura Y.: A monoclonal antibody to human SP-10 inhibits *in vitro* the binding of human sperm to hamster oolemma but not to human Zona pellucida. *Biol. Reprod.*, 2000; 62: 1201–1208
- [43] Harrison R.A., Gadella B.M.: Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 2005; 63: 342–351
- [44] Hayasaka S., Terada Y., Inoue N., Okabe M., Yaegashi N., Okamura K.: Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients. *Fertil. Steril.*, 2007; 88: 214–216

- [45] Honda A., Yamagata K., Sugiura S., Watanabe K., Baba T.: A mouse serine protease TESP5 is selectively included into lipid rafts of sperm membrane presumably as a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 16976–16984
- [46] Hoshi K., Sasaki H., Yanagida K., Sato A., Tsuiiki A.: Localization of fibronectin on the surface of human spermatozoa and relation to the sperm-egg interaction. *Fertil. Steril.*, 1994; 61: 542–547
- [47] Howes L., Jones R.: Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J. Reprod. Immunol.*, 2002; 53: 181–192
- [48] Huang Y.H., Kuo S.P., Lin M.H., Shih C.M., Chu S.T., Wei C.C., Wu T.J., Chen Y.H.: Signals of seminal vesicle autoantigen suppresses bovine serum albumin-induced capacitation in mouse sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 338: 1564–1571
- [49] Idahl A., Abramsson L., Kumlin U., Liljeqvist J.A., Olofsson J.I.: Male serum *Chlamydia trachomatis* IgA and IgG, but not heat shock protein 60 IgG, correlates with negatively affected semen characteristics and lower pregnancy rates in the infertile couple. *Int. J. Androl.*, 2007; 30: 99–107
- [50] Ikawa M., Inoue N., Benham A.M., Okabe M.: Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J. Clin. Invest.*, 2010; 120: 984–994
- [51] Infante R.E., Wang M.L., Radhakrishnan A., Kwon H.J., Brown M.S., Goldstein J.L.: NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 15287–15292
- [52] Kątnik-Prastowska I.: Struktura i biologia kwasów sjałowych. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2003; 12: 653–663
- [53] Kątnik-Prastowska I., Kratz E.M., Faundez R., Chelmońska-Soyta A.: Lower expression of the $\alpha 2,3$ -sialylated fibronectin glycoform and appearance of the asialo-fibronectin glycoform are associated with high concentrations of fibronectin in human seminal plasma with abnormal semen parameters. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006; 44: 1119–1125
- [54] Kątnik-Prastowska I., Przybysz M., Chelmońska-Soyta A.: Fibronectin fragments in human seminal plasma. *Acta Biochim. Pol.*, 2005; 52: 557–560
- [55] Kato Y., Shoen S., Nagao Y.: Capacitation status of activated bovine sperm cultured in media containing methyl- β -cyclodextrin affects the acrosome reaction and fertility. *Zygote*, 2011; 19: 21–30
- [56] Kawano N., Yoshida K., Miyado K., Yoshida M.: Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *J. Lipids*, 2011; 2011: 264706
- [57] Kawano N., Yoshida M.: Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biol. Reprod.*, 2007; 76: 353–361
- [58] Kratz E., Poland D.C., van Dijk W., Kątnik-Prastowska I.: Alterations of branching and differential expression of sialic acid on alpha-1-acid glycoprotein in human seminal plasma. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 331: 87–95
- [59] Kratz E.M., Faundez R., Kątnik-Prastowska I.: Fucose and sialic acid expressions in human seminal fibronectin and $\alpha 1$ -acid glycoprotein associated with leukocytospermia of infertile men. *Dis. Markers*, 2011; 31: 317–325
- [60] Lefèvre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I.A., Monk M., Hughes D.C., Barratt C.L.: Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.*, 2004; 19: 1580–1586
- [61] Li Y.F., He W., Mandal A., Kim Y.H., Digilio L., Klotz K., Flickinger C.J., Herr J.C., Herr J.C.: CABYR binds to AKAP3 and Ropporin in the human sperm fibrous sheath. *Asian J. Androl.*, 2011; 13: 266–274
- [62] Lilja H., Oldbring J., Rannevik G., Laurell C.B.: Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J. Clin. Invest.*, 1987; 80: 281–285
- [63] Lu C.H., Lee R.K., Hwu Y.M., Chu S.L., Chen Y.J., Chang W.C., Lin S.P., Li S.H.: SERPINE2, a serine protease inhibitor extensively expressed in adult male mouse reproductive tissues, may serve as a murine sperm decapacitation factor. *Biol. Reprod.*, 2011; 84: 514–525
- [64] Luconi M., Cantini G., Baldi E., Forti G.: Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front. Biosci.*, 2011; 16: 1315–1330
- [65] Luo C.W., Lin H.J., Chen Y.H.: A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 6913–6921
- [66] Maehashi E., Sato C., Ohta K., Harada Y., Matsuda T., Hirohashi N., Lennarz W.J., Kitajima K.: Identification of the sea urchin 350-kDa sperm-binding protein as a new sialic acid-binding lectin that belongs to the heat shock protein 110 family: implication of its binding to gangliosides in sperm lipid rafts in fertilization. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 42050–42057
- [67] Marianowski P.: Molekularne aspekty procesu zapłodnienia. *Nowa Medycyna-Ginekologia VII*, 1999; 6: 5–6. <http://www.czytelniamedyczna.pl/1201,molekularne-aspekty-procesu-zaplodnienia.html> (25.07.2011)
- [68] Miller D.J., Shi X., Burkin H.: Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog. Horm. Res.*, 2002; 57: 37–73
- [69] Mitchell L.A., Nixon B., Aitken R.J.: Analysis of chaperone proteins associated with human spermatozoa during capacitation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2007; 13: 605–613
- [70] Miyado K., Yamada G., Yamada S., Hasuwa H., Nakamura Y., Ryu F., Suzuki K., Kosai K., Inoue K., Ogura A., Okabe M., Mekada E.: Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, 2000; 287: 321–324
- [71] Moore G.D., Kopf G.S., Schultz R.M.: Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Dev. Biol.*, 1993; 159: 669–678
- [72] Naaby-Hansen S., Herr J.C.: Heat shock proteins on the human sperm surface. *J. Reprod. Immunol.*, 2010; 84: 32–40
- [73] Naaby-Hansen S., Mandal A., Wolkowicz M.J., Sen B., Westbrook V.A., Shetty J., Coonrod S.A., Klotz K.L., Kim Y.H., Bush L.A., Flickinger C.J., Herr J.C.: CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation. *Dev. Biol.*, 2002; 242: 236–254
- [74] Nassar A., Mahony M., Morshedi M., Lin M.H., Srisombut C., Oehninger S.: Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil. Steril.*, 1999; 71: 919–923
- [75] Navarro B., Kirichok Y., Chung J.J., Clapham D.E.: Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.*, 2008; 52: 607–613
- [76] Naz R.K., Rajesh P.B.: Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2004; 2: 75
- [77] Naz R.K., Zhu X.: Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding for human FA-1 antigen. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002; 63: 256–268
- [78] Nixon B., Bielanowicz A., McLaughlin E.A., Tanphaichitr N., Ensslin M.A., Aitken R.J.: Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J. Cell. Physiol.*, 2009; 218: 122–134
- [79] Nixon B., MacIntyre D.A., Mitchell L.A., Gibbs G.M., O'Bryan M., Aitken R.J.: The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol. Reprod.*, 2006; 74: 275–287
- [80] Pandey U.B., Nie Z., Batlevi Y., McCray B.A., Ritson G.P., Nedelsky N.B., Schwartz S.L., DiProspero N.A., Knight M.A., Schuldiner O., Padmanabhan R., Hild M., Berry D.L., Garza D., Hubbert C.C., Yao T.P., Baehrecke E.H., Taylor J.P.: HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 2007; 447: 859–863
- [81] Pankov R., Yamada K.M.: Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.*, 2002; 115: 3861–3863
- [82] Patrat C., Serres C., Jouannet P.: Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 2000; 62: 1380–1386
- [83] Perez-Reyes E.: Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.*, 2003; 83: 117–161
- [84] Pike L.J.: Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.*, 2006; 47: 1597–1598
- [85] Poland D.C., Kratz E., Vermeiden J.P., De Groot S.M., Bruyneel B., De Vries T., Van Dijk W.: High level of 1-acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis(a) groups on its glycans: supporting evidence for a prostatic origin. *Prostate*, 2002; 52: 34–42
- [86] Redgrove K.A., Anderson A.L., Dun M.D., McLaughlin E.A., O'Bryan M.K., Aitken R.J., Nixon B.: Involvement of multimeric protein complexes in mediating the capacitation-dependent binding of human spermatozoa to homologous zonae pellucidae. *Dev. Biol.*, 2011; 356: 460–474
- [87] Reid A.T., Redgrove K., Aitken R.J., Nixon B.: Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J. Androl.*, 2011; 13: 88–96

- [88] Rejraji H., Sion B., Prensier G., Carreras M., Motta C., Frenoux J.M., Vericel E., Grizard G., Vernet P., Drevet J.R.: Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.*, 2006; 74: 1104–1113
- [89] Rockwell P.L., Storey B.T.: Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca²⁺ changes monitored by fluo-3. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000; 55: 335–349
- [90] Roldan E.R., Shi Q.X.: Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front. Biosci.*, 2007; 12: 89–104
- [91] Roudebush W.E., Massey J.B., Elsner C.W., Shapiro D.B., Mitchell-Leef D., Kort H.I.: The significance of platelet-activating factor and fertility in the male primate: a review. *J. Med. Primatol.*, 2005; 34: 20–24
- [92] Sakkas D., Leppens-Luisier G., Lucas H., Chardonnes D., Campana A., Franken D.R., Urner F.: Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol. Reprod.*, 2003; 68: 1463–1469
- [93] Samuel A.S., Naz R.K.: Isolation of human single chain variable fragment antibodies against specific sperm antigens for immunocontraceptive development. *Hum. Reprod.*, 2008; 23: 1324–1337
- [94] Sathananthan A.H., Chen C.: Sperm-oocyte membrane fusion in the human during monospermic fertilization. *Gamete Res.*, 1986; 15: 177–186
- [95] Selvaraj V., Asano A., Buttke D.E., McElwee J.L., Nelson J.L., Wolff C.A., Merdiushev T., Fornés M.W., Cohen A.W., Lisanti M.P., Rothblat G.H., Kopf G.S., Travis A.J.: Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm. *J. Cell. Physiol.*, 2006; 206: 636–646
- [96] Seppälä M., Koistinen H., Koistinen R., Chiu P.C., Yeung W.S.: Glycosylation related actions of glycodeelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum. Reprod. Update*, 2007; 13: 275–287
- [97] Shibahara H., Koriyama J., Shiraiishi Y., Hirano Y., Suzuki M., Koyama K.: Diagnosis and treatment of immunologically infertile women with sperm-immobilizing antibodies in their sera. *J. Reprod. Immunol.*, 2009; 83: 139–144
- [98] Shur B.D.: Reassessing the role of protein-carbohydrate complementarity during sperm-egg interactions in the mouse. *Int. J. Dev. Biol.*, 2008; 52: 703–715
- [99] Smart E.J., Graf G.A., McNiven M.A., Sessa W.C., Engelman J.A., Scherer P.E., Okamoto T., Lisanti M.P.: Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 7289–7304
- [100] Stein K.K., Primakoff P., Myles D.: Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 6269–6274
- [101] Su S.F., Wang Z.J.: Advances in the study of Semenogelin I from human seminal vesicles. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2009; 15: 364–366
- [102] Suarez S.S.: Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J. Dev. Biol.*, 2008; 52: 455–462
- [103] Suarez S.S., Ho H.C.: Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell. Mol. Biol.*, 2003; 49: 351–356
- [104] Sutovsky P., Manandhar G., Mccauley T.C., Caamaño J.N., Sutovsky M., Thompson W.E., Day B.N.: Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.*, 2004; 71: 1625–1637
- [105] Tardif S., Cormier N.: Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *Mol. Hum. Reprod.*, 2011; 17: 661–668
- [106] Tardif S., Wilson M.D., Wagner R., Hunt P., Gertsenstein M., Nagy A., Lobe C., Koop B.F., Hardy D.M.: Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 24863–24870
- [107] Tesarik J.: Comparison of acrosome reaction inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 1985; 74: 383–388
- [108] Ulcova-Gallova Z., Gruberova J., Vrzalova J., Bibkova K., Peknicova J., Micanova Z., Topolcan O.: Sperm antibodies, intra-acrosomal sperm proteins, and cytokines in semen in men from infertile couples. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2009; 61: 236–245
- [109] Veaute C., Liu de Y., Furlong L.I., Biancotti J.C., Baker H.W., Vazquez-Levin M.H.: Anti-human proacrosin antibody inhibits the zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction of ZP-bound spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 2010; 93: 2456–2459
- [110] Visconti P.E., Westbrook V.A., Chertihin O., Demarco I., Sleight S., Diekmann A.B.: Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.*, 2002; 53: 133–150
- [111] Walensky L.D., Snyder S.H.: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell. Biol.*, 1995; 130: 857–869
- [112] Wang M., Lv Z., Shi J., Hu Y., Xu C.: Immunocontraceptive potential of the Ig-like domain of Izumo. *Mol. Reprod. Dev.*, 2009; 76: 794–801
- [113] Wassarman P.M.: Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *Bioessays*, 2009; 31: 153–158
- [114] Wassarman P.M., Litscher E.S.: Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs*, 2001; 168: 36–45
- [115] Wennemuth G., Meinhardt A., Mallidis C., Albrecht M., Krause W., Renneberg H., Aumüller G.: Assessment of fibronectin as a potential new clinical tool in andrology. *Andrologia*, 2001; 33: 43–46
- [116] Wierzbicka-Patynowski I., Schwarzbauer J.E.: The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 3269–3276
- [117] Yamagata K., Murayama K., Okabe M., Toshimori K., Nakanishi T., Kashiwabara S., Baba T.: Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 10470–10474
- [118] Yano R., Matsuyama T., Kaneko T., Kurio H., Murayama E., Toshimori K., Iida H.: Bactericidal/permeability-increasing protein is associated with the acrosome region of rodent epididymal spermatozoa. *J. Androl.*, 2010; 31: 201–214
- [119] Yauger B., Boggs N.A., Dean J.: Human ZP4 is not sufficient for taxon-specific sperm recognition of the zona pellucida in transgenic mice. *Reproduction*, 2011; 141: 313–319
- [120] Yeung W.S., Lee K.F., Koistinen R., Koistinen H., Seppälä M., Chiu P.C.: Effects of glycodeelins on functional competence of spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.*, 2009; 83: 26–30
- [121] Yonezawa N., Kanai S., Nakano M.: Structural significance of N-glycans of the zona pellucida on species-selective recognition of spermatozoa between pig and cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 2007; 63: 217–228
- [122] Yoshida M., Kawano N., Yoshida K.: Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008; 65: 3446–3457
- [123] Zini A., Phillips S., Lefebvre J., Baazeem A., Bissonnette F., Kadoch I.J., Gabriel M.S.: Anti-sperm antibodies are not associated with sperm DNA damage: a prospective study of infertile men. *J. Reprod. Immunol.*, 2010; 85: 205–208

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.