

Wybrane aspekty komórkowych mechanizmów regulujących interakcję plemnika i komórki jajowej u ssaków*)

DOROTA BUKOWSKA, BARTOSZ KEMPISTY*, **, KATARZYNA ZAORSKA*, PAWEŁ ANTOSIK, JOANNA PAWŁOWSKA, MICHAŁ NOWICKI*

Katedra Weterynarii, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski II,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

**Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej, Wydział Lekarski II,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

Otrzymano 06.09.2012

Zaakceptowano 12.02.2014

Bukowska D., Kempisty B., Zaorska K., Antosik P., Pawłowska J., Nowicki M.

Molecular aspects of sperm-oocyte activation during mammalian fertilization

Summary

Fertilization is a complex process which includes the recognition and fusion of an oocyte and a sperm and the development of a zygote that contains a double set of chromosomes. Each step in this process is precisely controlled at the molecular level in a cascade of biochemical reactions (cortical and acrosome reactions) that determine the future of both gametes. Biochemical reactions not only reorganize gametes in morphological, physiological, and biochemical terms, but also prepare them for the future coordinated communication. Molecular aspects of gamete development and fertilization include the reorganization of the cell membrane and ligand-receptor reactions that affect the recognition of gametes and lead to the formation of pronuclei and zygote development. This article discusses several aspects of the recognition, interaction, and fusion of a sperm and an oocyte. It also describes biochemical reactions involved in the development of gametes that are capable of fertilization.

Keywords: acrosome reaction, capacitation, cortical reaction, zygote

Zapłodnienie to proces wieloetapowego systemu oddziaływań receptorowych zachodzących między oocytami a plemnikiem, kończący się połączeniem materiału genetycznego obu gamet. Procesem, który zapewnia im zdolność do zapłodnienia, jest kapacytacja zachodząca w drogach rodnych samicy. Rozpoznanie gamet, reakcja akrosomowa, penetracja osłonki przejrzystej, reakcja korowa i fuzja gamet to następujące po sobie etapy prowadzące do powstania zygoty.

Molekularne aspekty kapacytacji

Kapacytacja, po raz pierwszy opisana przez Austina i Changa w 1951 r. (31), określana jest jako szereg zmian strukturalnych i biochemicznych plemnika, w wyniku których nabiera on zdolności do penetracji oocytu oraz do reakcji akrosomowej w trakcie zapłodnienia. Według wielu autorów, kapacytacja jest procesem odwracalnym i rozpoczyna się dopiero po usunięciu z powierzchni

plemnika tzw. czynników dekapacytacyjnych, gdyż ich ponowne dodanie do pożywki zawierającej zawieszony plemniki, które już przeszły kapacytację, powoduje, że stają się one niezdolne do zapłodnienia (7). Czynniki dekapacytacyjne pochodzą głównie z najądrza i płynu nasiennego, a należą do nich m.in.: glikoproteiny, białka stabilizujące akrosom, inhibitor transportu jonów wapnia – kaltryna, spermina, cholesterol. Istotną rolę odgrywa milieu jajowodu, w tym np. glikoproteina OVGPI regulująca procesy fosforylacji w plemnikach (24). Obniżenie zawartości cholesterolu, zwiększenie stosunku kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych oraz rearanżacja rozmieszczenia fosfolipidów w błonie komórkowej plemnika powodują znaczne upłynnienie i destabilizację błony, co zwiększa jej zdolność do fuzji z błoną komórkową oocytu i ułatwia zajście reakcji akrosomowej (22). Służą temu również zmiany w rozmieszczeniu białek powierzchniowych błony plemnika, czego efektem jest odsłonięcie miejsc receptorowych dla białek osłonki przejrzystej oocytu,

*) Praca finansowana z projektu Narodowego Centrum Nauki nr 2011/03/B/NZ4/02411 „OPUS”.

a także zmiany w przepuszczalności błony komórkowej plemnika dla jonów, z których największe znaczenie mają kationy, w tym zewnątrzkomórkowe wolne jony wapnia. Jony Ca^{2+} są niezbędne zarówno do ukończenia kapacytacji, jak i reakcji akrosomowej, jednak istnieją różnice zależne od etapu przebiegu tych procesów i gatunku zwierzęcia. Stosunkowo małe stężenia Ca^{2+} są niezbędne do prawidłowego przebiegu kapacytacji u świni oraz myszy, natomiast znacznie wyższe u pozostałych gatunków ssaków (8). Kapacytacja jest procesem relatywnie długotrwałym, zajmującym godziny (u myszy około 1 godziny, u królika czy człowieka 5-6 godzin), charakteryzującym się powolnym i stopniowym napływem jonów wapnia do plemnika, podczas gdy reakcja akrosomowa jest procesem gwałtownym, trwającym zaledwie kilkanaście minut, dlatego też mechanizmy kontrolujące napływ wolnych jonów wapnia do komórki różnią się w zależności od procesu. W plemnikach ssaków zidentyfikowano trzy główne mechanizmy kontrolujące napływ jonów wapnia do komórki: (a) Ca^{2+} -ATPaza, działająca jak pompa wydalająca jony Ca^{2+} na zewnątrz komórki, (b) pompa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, powodująca wewnątrzkomórkowy napływ Ca^{2+} i wypływ Na^+ oraz (c) kanały wapniowe, umożliwiające ciągły napływ jonów Ca^{2+} do komórki (26). Największe znaczenie dla kapacytacji przypisuje się mechanizmowi Ca^{2+} -ATPazy, gdyż wykazano, że leki hamujące działanie tej pompy najsilniej przyspieszają kapacytację u bydła, świni, myszy czy człowieka (8). Niewiele wiadomo obecnie o funkcji pompy $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ w procesie kapacytacji, a kanałom wapniowym największe znaczenie przypisuje się raczej podczas reakcji akrosomowej niż kapacytacji, jako że działają one sprawniej niż Ca^{2+} -ATPaza i pozwalają na szybki i gwałtowny napływ jonów wapnia do komórki. Mniejsze znaczenie przypisuje się zmianom w stężeniu pozostałych kationów oraz anionów, tj. HCO_3^- , wpływającym na wzrost poziomu pH czy aktywację szlaku cyklicznego adenozynomonofosforanu cAMP w komórce w trakcie kapacytacji (18). Po zakończeniu kapacytacji plemniki związane zostają do czasu owulacji z nabłonkiem wyścielającym cieść jajowodu. Podlegają w tym czasie hiperaktywacji, polegającej na modyfikacji sposobu poruszania się, niezbędnej do uwolnienia się plemnika z cieści jajowodu i penetracji osłonki przejrzystej oocytu (28).

Wybrane aspekty rozpoznania gamet i interakcji plemnika z oocytem

Po interakcji plemnika z komórką jajową napotyka on na trzy warstwy stanowiące kompleks oocyt-komórki somatyczne: (a) wieniec promienisty, stanowiący warstwę komórek pęcherzykowych uwalnianych wraz z oocytem podczas owulacji, (b) osłonkę przejrzystą, (c) błonę komórkową (oolemę). Wyjątki stanowią: bydło domowe, owce, stekowce i torbacze, u których wieniec promienisty zostaje zniszczony enzymatycznie i plemniki pokonują tylko dwie bariery (11). Warstwa komórek pęcherzykowych, ściśle otaczających oocyt,

pokonana zostaje przez plemniki w głównej mierze dzięki błonowemu białku PH-20. Białko to wykryto u świnki morskiej, a następnie znaleziono u wszystkich gatunków ssaków. N-końcowa domena białka PH-20 wykazuje aktywność hialuronidazy, która umożliwia plemnikowi „przebicie” się przez warstwę komórek pęcherzykowych i dotarcie do osłonki przejrzystej oocytu. Wykazano również, że na przebieg tego procesu nie wpływa hialuronidaza zawarta w akrosomie, gdyż tylko plemniki z nienaruszonym akrosomem są w stanie pokonać barierę komórek pęcherzykowych. Do innych białek umożliwiających lizę składników macierzy pozakomórkowej wieńca promienistego należy m.in. glikoproteina 2B1, podobna do PH-20, a wykryta u szczura. Nie wyklucza się jednak udziału innych białek, w tym enzymów, takich jak β -galaktozydaza czy arylosulfataza, obecnych na powierzchni plemnika (29). Związanie plemnika z osłonką przejrzystą oocytu stanowi pierwszy etap wzajemnego rozpoznania gamet, jest to wiązanie najmniej trwałe, lecz najbardziej restrykcyjne, o którym decyduje specyficzność gatunkowa. Budowa osłonki przejrzystej i mechanizm reakcji akrosomowej najlepiej zbadane zostały na modelu mysim (15). Osłonka przejrzysta myszy oraz pozostałych ssaków zbudowana jest z 3 rodzajów glikoprotein – tzw. białek ZP1, ZP2 i ZP3. U niektórych gatunków zidentyfikowano glikoproteinę ZP4, lecz jej rola nadal nie została w pełni wyjaśniona (14). Białka ZP2 i ZP3 tworzą struktury ułożone naprzemiennie i połączone cząsteczkami białka ZP1 za pomocą mostków disiarczkowych. Wykazano, że białka ZP2 i ZP3 mają zdolność wiązania z plemnikami, przy czym pierwotnym receptorem jest białko ZP3, które wykazuje powinowactwo do zewnętrznej błony plemnika. Badania dowodzą, że to nie sama struktura polipeptydowa ZP3 odpowiedzialna jest za wiązanie plemnika, ale związane boczne łańcuchy oligosacharydowe. Wykazano, że mutacja w genie ZP3 była powodem niepłodności u myszy ze znokautowanym genem kodującym to białko (ZP3^{-/-}). Myszy homozygotyczne pod względem tej mutacji posiadały oocyty całkowicie pozbawione osłonki przejrzystej, natomiast u myszy heterozygotycznych osłonka była znacznie cieńsza niż u form dzikich (21).

W błonie komórkowej plemnika myszy odkryto szereg białek receptorowych, którym przypisuje się funkcję wiązania z białkiem ZP3 osłonki przejrzystej oocytu (16). Jednym z nich jest β -1-4-galaktozylotransferaza, która, funkcjonując jako białko błonowe, nie wykorzystuje swoich właściwości enzymatycznych, ale na podobieństwo lektyn wiąże się z glikoproteinami osłonki. Trwają dyskusje na temat roli tego białka w zapłodnieniu, gdyż myszy ze znokautowanym genem β -1-4-galaktozylotransferazy wytwarzają plemniki nadal zdolne do zapłodnienia, zatem w wiązaniu plemnika z osłonką muszą uczestniczyć inne białka, obecne na powierzchni plemników). U myszy zidentyfikowano białko o masie 56 kDa, natomiast u człowieka – białko o masie 95 kDa, obydwa znajdujące się w rejonie

akrosomowym i zdolne do wiązania z białkiem ZP3. Rolę receptorów przypisuje się także spermadhezynom, małym białkom o masie 12-16 kDa, obecnym na powierzchni plemników wielu gatunków zwierząt, w tym psa, świni, konia i zdolnym do wiązania z ZP3 (30).

Reakcja akrosomowa i penetracja osłonki przejrzystej

Związanie plemnika z osłonką przejrzystą powoduje zmianę konformacji jego receptorów, co prowadzi do uaktywnienia wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych, indukujących reakcję akrosomową. Zapoczątkowuje ją fuzja zewnętrznej błony akrosomowej z leżącą nad nią błoną komórkową plemnika, w wyniku czego powstają otwory i następuje rozproszenie błon otaczających akrosom i egzocytaza zawartych w nim enzymów (m.in. kwaśnej glikohydrolazy, esterazy, arylosulfatazy, proteinazy, fosfatazy czy fosfolipazy) (23). Naturalnym czynnikiem indukującym reakcję akrosomową jest też progesteron, wydzielany przez komórki pęcherzykowe wieńca promienistego i obecny w płynie pęcherzykowym. Czynnikiem niezbędnym do reakcji akrosomowej jest obecność jonów wapnia, które neutralizują wzajemnie ładunki obydwu błon i umożliwiają ich fuzję (17). Na drodze stymulacji progesteronem białek G w błonie komórkowej plemnika następuje aktywacja fosfolipazy C, co uruchamia szlak fosfatydyloinozytolowy, prowadząc tym samym do otwarcia kanałów wapniowych i nagłego, intensywnego, choć krótkotrwałego napływu jonów Ca^{2+} do wnętrza plemnika (19). Do połączenia błon przyczynia się także aktywacja fosfolipazy A2, która na drodze rozkładu fosfatydylocholino uwalnia izofosfatydylocholinę i kwas arachidonowy, będące związkami wywołującymi fuzję. Mechanizmy aktywujące kanały jonowe K i Cl w zewnętrznej błonie akrosomowej i błonie komórkowej plemnika powodują wzrost pH w plemniku, a to z kolei prowadzi do aktywacji i uwolnienia enzymów (25). W miejscach fuzji obydwu błon dochodzi do powstania pęcherzyków i egzocytazy enzymów zawartych w akrosomie. Jedyńm miejscem, w którym nie następuje fuzja, jest tzw. rejon równikowy plemnika, wykazujący największą stabilność i odgrywający rolę we właściwym wiązaniu plemnika z oolemą.

W wyniku reakcji akrosomowej plemnik traci część błony wiążącej go z białkiem ZP3 i następuje drugie, trwalsze wiązanie z osłonką przejrzystą. Pośredniczą tu: białko ZP2, jako drugorzędowy ligand dla receptorów plemnikowych (12), także białko PH-20 oraz inne białka, jak np. MC41, obecne w błonie pęcherzyków, tworzących się w trakcie reakcji akrosomowej, czy proakrozyna, obecna u myszy i świni (10). Tylko te plemniki, które przeszły reakcję akrosomową, są w stanie przejść przez osłonkę przejrzystą. Istnieją dwie główne hipotezy, tłumaczące mechanizm przejścia plemnika przez osłonkę. Pierwsza z nich zakłada wykorzystanie przez plemnik jedynie energii witki i mechaniczne przebicie osłonki, natomiast druga sugeruje współdziałanie ruchu plemnika i enzymów akrosomowych, przy czym

ruch witki ma tu znaczenie drugorzędne. Główną rolę przypisuje się zatem akrozynie, enzymowi, który występuje w akrosomie w postaci nieaktywnej proakrozyny i ulega aktywacji pod wpływem reakcji akrosomowej, a następnie trawi osłonkę w miejscu wiązania plemnika. Argumentem przemawiającym przeciwko tej hipotezie jest fakt, iż myszy ze znokautowanym genem akrozyny wytwarzają plemniki nadal zdolne do zapłodnienia, nie jest to więc enzym niezbędny do przejścia plemników przez osłonkę (1).

Indukcja reakcji korowej i fuzja gamet

Reakcja korowa i przebicie osłonki są procesami krótkotrwałymi – u chomika trwają nie dłużej niż 10 minut, natomiast u myszy około 15-20 minut (27). Po przejściu przez osłonkę plemnik szybko pokonuje przestrzeń okołoołtkową i trafia w bezpośrednie sąsiedztwo błony komórkowej oocyty, gdzie następuje trzecie i najtrwalsze wiązanie obydwu gamet. Wiązanie to jest niespecyficzne gatunkowo i może zajść na całej powierzchni błony komórkowej oocyty, za wyjątkiem obszaru leżącego bezpośrednio nad wrzecionem metafazowym i pierwszym ciałkiem kierunkowym. Miejsce to jest pozbawione mikrokosmków, a pod błoną komórkową brak jest ziaren korowych. U większości ssaków łozyskowych rejonem plemnika, który ulega fuzji z oolemą, jest jego rejon równikowy, w którym błona komórkowa i zewnętrzna błona akrosomowa zostają nadal zachowane po reakcji akrosomowej (3). W pierwszym etapie wiązania plemnika mikrokosmki oolemy obejmują przednią część główki plemnika, a następnie wchodzi w kontakt z wewnętrzną błoną akrosomową plemnika i obejmują region równikowy, wciągając plemnik w głąb cytoplazmy i umożliwiając fuzję obydwu gamet. Związanie plemnika na błonie komórki jajowej możliwe jest dzięki wzajemnemu oddziaływaniu białek mikrokosmków oolemy, działających jak receptory, wraz z białkami segmentu równikowego plemnika, pełniącymi funkcję ligandów. Zidentyfikowano szereg białek transbłonowych, należących do rodziny ADAM (disintegrin and metalloprotease domain), zlokalizowanych w rejonie równikowym plemnika i charakteryzujących się obecnością sekwencji ECD (kwas glutaminowy-cysteina-kwas asparaginowy) zlokalizowanej w pozakomórkowej domenie dezintegrynowej (20). Domeny te mogą być rozpoznawane przez receptory oolemy. Najlepiej poznanymi białkami ADAM są: fertylina β i kerytestina. Fertylinie (określanej dawniej jako białko PH-30) przypisuje się rolę zarówno w wiązaniu, jak i fuzji plemnika z komórką jajową. Istnieje szereg badań na myszach ze znokautowanym genem fertyliny, sugerujących wyraźny związek tego białka ze zdolnością plemników do wiązania i fuzji z oolemą, a tym samym z zachowaniem płodności samców. Innymi białkami, mogącymi funkcjonować jako ligandy, są witronektyna i fibronektyna, obydwa białka zawierające charakterystyczne sekwencje RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy), rozpoznawane przez receptory

oolemy. Obydwa te białka ulegają także ekspresji na powierzchni kapacytowanych plemników. Sugeruje się, że białka te, podobnie jak fertylina, odgrywają znaczącą rolę zarówno w wiązaniu, jak i fuzji plemnika z oocytem (2).

Receptorami dla białek powierzchniowych plemnika są także glikoproteiny zwane integrynami, zbudowane z dwóch glikozylowanych podjednostek: α i β . Integryny wiążą się z charakterystycznymi sekwencjami aminokwasowymi obecnymi w białkach powierzchniowych plemników i są obecne u wszystkich gatunków ssaków. We wzajemnym wiązaniu i fuzji gamet uczestniczyć mogą również inne białka, jak np. białko CD9, oddziałujące poprzez tworzenie kompleksów z integrynami i pozostałymi białkami błonowymi (tetraspaninami) oocytu. Za interakcję gamet odpowiedzialne mogą być także inne receptory, charakterystyczne dla oddziaływań w obrębie układu immunologicznego, jak np. Fc γ , CD46 czy C1qr (4).

Wniknięcie plemnika do cytoplazmy oocytu indukuje w nim szereg przemian, co widoczne jest np. po wzroście stężenia wolnych jonów wapnia. Inicjowany jest on początkowo w miejscu kontaktu gamet i wkrótce obejmuje cały obszar cytoplazmy oocytu, choć nadal nie jest do końca wyjaśniony mechanizm wyzwalający oscylacyjne zmiany Ca^{2+} wewnątrz komórki jajowej. Jedną z hipotez zakłada, podobnie jak w przypadku reakcji akrosomowej, że połączenie ligandów plemnikowych z ligandami oolemy prowadzi do zmiany konformacji tych ostatnich, co pociąga za sobą aktywację białek G i szlaku fosfatydyloinozytolowego, a w efekcie do uwolnienia zmagazynowanych dużych ilości jonów Ca^{2+} (13). Zgodnie z tą hipotezą, fuzja gamet nie jest niezbędna do aktywacji oocytu, jako że wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie zachodzi przed fuzją. Drugą z hipotez zakłada istnienie tzw. czynnika cytozolowego plemnika, wnoszonego do oocytu wraz z plemnikiem i uwalnianego do cytoplazmy oocytu w trakcie fuzji gamet (6). Z teorią tą wiąże się wiele faktów, m.in. taki, że bezpośrednie wstrzyknięcie lizatów plemnikowych do cytoplazmy oocytu wywoływało oscylacyjne zmiany stężenia jonów wapnia, co sugeruje jednocześnie, że fuzja obydwu gamet jest niezbędna do aktywacji oocytu. Wzrost stężenia jonów wapnia jest pierwszym i najważniejszym elementem aktywacji oocytu, ponieważ w jego następstwie następuje szereg reakcji prowadzących w efekcie do wzrostu pH ooplazmy, reakcji korowej i bloku polispermii. Ponadto, dochodzi wówczas do powstania przedjądra męskiego, dokończenia przez oocyt drugiego podziału mejotycznego, wyrzucenia drugiego ciała kierunkowego i wykształcenia przedjądra żeńskiego, zawierającego haploidalny zestaw chromosomów (13).

Mechanizmy ograniczające polispermie

Jednym z pierwszych mechanizmów ograniczających polispermie jest etapowość reakcji uaktywniających plemniki w trakcie wędrówki przez drogi rodne samicy i znaczne ograniczenie ich liczby przed dotarciem do

miejsca zapłodnienia. Właściwy blok przeciwko polispermii działa na etapie osłonki przejrzystej i oolemy. W trakcie zapłodnienia białko ZP2, wchodzące w skład osłonki przejrzystej, przechodzi ograniczoną proteolizę, tworząc jeden lub więcej małych peptydów, co skutkuje stwardnieniem osłonki i jest nazywane tzw. wolnym zahamowaniem polispermii. Za utworzenie trwałego bloku przeciwko polispermii odpowiedzialna jest reakcja korowa, do której dochodzi w momencie kontaktu pierwszego plemnika z błoną komórkową oocytu. Polega ona na fuzji błon otaczających ziarna korowe z błoną komórkową oocytu. Fuzja uwarunkowana jest oscylacyjnymi zmianami stężenia jonów Ca^{2+} w ooplazmie, co skutkuje masowym uwolnieniem enzymów korowych, w skład których wchodzi m.in. mukopolisacharydy, proteazy, glikozydazy, kwaśna fosfataza oraz peroksydaza (5). Enzymy te już w przestrzeni okołoołtkowej wykazują działanie modyfikujące składniki osłonki przejrzystej, powodując zmianę jej właściwości i tym samym uniemożliwiając wiązanie na jej powierzchni innych plemników. Właściwość ta określana jest mianem reakcji osłony, następuje w ciągu minuty od momentu wniknięcia plemnika do ooplazmy i poza modyfikacją białek ZP2 obejmuje również zmiany w strukturze reszt oligosacharydowych ZP3. Istnieje też blok polispermii na poziomie cytoplazmy oocytu, jest to jednak najslabiej poznany mechanizm i wiadomo jedynie, że zależy od obecności osłonki przejrzystej, gdyż sztuczne pozbawienie zapłodnionych oocytów myszy osłonki powoduje zanik bloku i ponowną zdolność oolemy do fuzji z plemnikami (5). Zapłodnione oocyty, pozbawione osłonki rozwijają wprawdzie kolejny blok przeciwko polispermii na poziomie oolemy, ale następuje to dopiero po upływie 40-60 minut od momentu wniknięcia pierwszego plemnika i nie zależy od aktywacji oocytu, ale od kontaktu błon komórkowych gamet (9).

U człowieka, psa i chomika syryjskiego blok przeciwko polispermii działa głównie na etapie osłonki przejrzystej, u królika i kreta – na poziomie oolemy/przestrzeni okołoołtkowej, przy czym w zapłodnionych oocytach tych gatunków często obserwuje się dodatkowe plemniki w przestrzeni okołoołtkowej, natomiast u myszy, szczura, kota czy świnki morskiej – na obydwu tych poziomach w podobnym stopniu.

Mechanizmy regulujące interakcję komórki jajowej i plemnika u ssaków to zespół swoistych gatunkowo procesów regulowanych przez wieloczynnikowe systemy receptorowe, a polegających na rozpoznaniu gamet, penetracji i fuzji.

Piśmiennictwo

1. Baba T., Azuma S., Kashiwabara S., Toyoda Y.: Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zone pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 31845-31849.
2. Bronson R., Peresleni T., Golightly M., Preissnar K.: Vitronectin is sequestered within human spermatozoa and liberated following the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 2000, 6, 977-982.

3. Bronson R. A., Fusi F., Cooper G. W., Phillips D. M.: Antisperm antibodies induce polyspermy by promoting adherence of human sperm to zona – free hamster eggs. *Hum. Reprod.* 1990, 5, 690-696.
4. Cervoni F., Oglesby T. J., Adams E. M., Milesifluet C., Nickells P., Atkinson J. P., His B. L.: Identification and characterization of membrane cofactor protein of human spermatozoa. *J. Immunol.* 1992, 148, 1431-1437.
5. Coy P., Avilés M.: What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2010, 85, 593-605.
6. Fissore R. A., Gordo A. C., Wu H.: Activation of development in mammals: Is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 1998, 49, 43-52.
7. 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.
8. Fraser L. R.: Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995, 7, 905-925.
9. Gadella B. M., Evans J. P.: Membrane fusions during mammalian fertilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011, 713, 65-80.
10. Howes L., Jones R.: Interactions between zonapellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 2002, 53, 181-192.
11. Hyttel P., Greve T., Callesen M.: Ultrastructure of in vivo fertilization in superovulated cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1988, 82, 1-13.
12. 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.
13. Kline D.: Activation of the mouse egg. *Theriogenology* 1996, 45, 81-90.
14. Lefevre L., Conner S. J., Salpekar A., Olofowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I. A., Monk M., Hughes D. C., Barratt C. L.: Four zonapellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* 2004, 19, 1580-1586.
15. McLeskey S. B., Dowds C., Carballada R., White R. R., Saling M.: Molecules involved in mammalian sperm – egg interaction. *Int. Rev. Cytol.* 1998, 177, 57-113.
16. Miller D. J., Macek M. B., Shur B. D.: Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyltransferase and egg – coat ZP3 mediates sperm – egg binding. *Nature* 1992, 357, 589-593.
17. 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.
18. Osycka-Salut C., Diez F., Burdet J., Gervasi M. G., Franchi A., Bianciotti L. G., Davio C., Perez-Martinez S.: Cyclic AMP efflux, via MRPs and A1 adenosine receptors, is critical for bovine sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* 2014, 20, 89-99.
19. Perez-Reyes E.: Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 2003, 83, 117-161.
20. Primakoff P., Myles D. G.: The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 2000, 16, 83-87.
21. Rankin T., Familiari M., Lee E., Ginsberg A., Dwyer N., Blanchette-Mackie J., Drago J., Westphal H., Dean J.: Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zonapellucida and are infertile. *Development* 1996, 122, 2903-2910.
22. Rejraji H., Sian 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.
23. Roldan E. R., Shi Q. X.: Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front. Biosci.* 2007, 12, 89-104.
24. Saccary L., She Y. M., Oko R., Kan F. W.: Hamster oviductin regulates tyrosine phosphorylation of sperm proteins during in vitro capacitation. *Biol. Reprod.* 2013, 38, 1-11.
25. Santi C. M., Orta G., Salkoff L., Visconti P. E., Darszon A., Trevino C. L.: K^+ and Cl^- channels and transporters in sperm function. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2013, 102, 385-421.
26. Shukla K. K., Mahdi A. A., Rajender S.: Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. 2012, 33, 777-788.
27. Stewart-Savage J., Bavister B. D.: Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster egg after sperm fusion. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 30, 390-395.
28. Suarez S. S., Ho H. C.: Hypractivation of mammalian sperm. *Cell Mol. Biol.* 2003, 49, 351-356.
29. Tantibhedhyangkul J., Weerachayanukul W., Carmona E., Xu H., Anupriwan A., Michaud D., Tanphaichitr N.: Role of sperm surface arylsulfatase A in mouse sperm – zonapellucida binding. *Biol. Reprod.* 2002, 67, 212-219.
30. Töpfer-Petersen E., Romero A., Varela P. F., Ekhlasi-Hundrieser M., Dostàlovà Z., Sanz L., Calvete J. J.: Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 1998, 30, 217-224.
31. Visconti P. E., Galantino-Homer H., Moore G. D., Bailey J. L., Ning X., Fornes M., Kopf G. S.: The molecular basis of sperm capacitation. *J. Androl.* 1998, 19, 242-248.

Adres autora: mgr inż. Katarzyna Zaorska, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: katarzyna.zaorska@gmail.com