

MAREK MALESZEWSKI

*Uniwersytet Warszawski
Instytut Zoologii
Zakład Embriologii
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
E-mail: maleszewski@biol.uw.edu.pl*

ZAPŁODNIENIE I ZAPŁODNIENIE *IN VITRO*

NAGRODA NOBLA Z BIOLOGII LUB MEDYCyny 2010

W 2010 r. nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny przyznana została brytyjskiemu fizjologowi Robertowi G. Edwardsowi. Komitet Noblowski nagrodził w ten sposób wybitne osiągnięcie, jakie ukoronowało wieloletnie badania nad rozrodem człowieka – urodzenia pierwszego dziecka, które rozwinęło się po skutecznym zapłodnieniu pozaustrojowym, czyli po zapłodnieniu *in vitro*. Krótkie doniesienie w czasopiśmie medycznym Lancet (STEPTOE i EDWARDS 1978) informowało o tym, że 25 lipca 1978 r. przyszła na świat dziewczynka, Luiza Brown, która rozwinęła się z zarodka powstałego i przez pierwsze dni rozwijającego się nie w organizmie matki, ale w laboratoryjnym inkubatorze. Stanowiło to przełom w poznaniu fizjologii rozrodu naszego własnego gatunku. Otworzyło to także nowe perspektywy w leczeniu niepłodności u tych ludzi, u których z różnych przyczyn zajście w ciążę, w sposób naturalny nie jest możliwe. Kluczowe znaczenie dla powodzenia tych badań miało nawiązanie przez Edwardsa współpracy z ginekologiem, Patrykiem Steptoe, pionierem laparoskopii, umożliwiającej pozyskiwanie oocytów z pęcherzyków jajnikowych kobiet. Zastosowanie tej techniki okazało się kluczowe w rozwinięciu metody zapłodnienia *in vitro*, a współpraca Edwardsa z Steptoe zaowocowała po kilku latach narodzinami pierwszego dziecka „z probówki”. Ten ogromny sukces obydwu naukowców został uhonorowany Nagrodą Nobla w ubiegłym roku, którą mógł

odebrać tylko Edwards, ponieważ Patryk Steptoe zmarł w 1988 r.

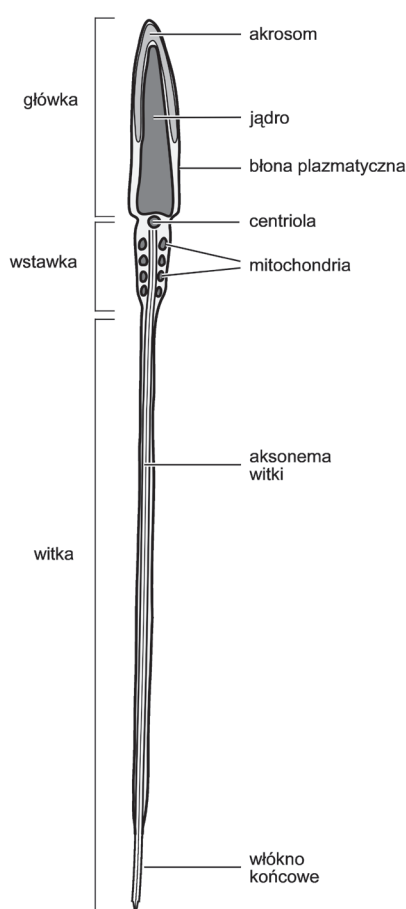
Celem tego artykułu jest przedstawienie, z konieczności bardzo skrótowe, współczesnej wiedzy na temat zapłodnienia u ssaków. Autor chciałby, by na tej podstawie czytelnik mógł uzmysłwić sobie, że dla skutecznego zapłodnienia *in vitro* konieczne jest, aby szereg skomplikowanych i nie do końca poznanych procesów zaszło w prawidłowy sposób w warunkach odmiennych od tych, w jakich zachodzą naturalnie w organizmie. Zwrócić należy także uwagę na to, że w pracy tej zapłodnienie przedstawiane jest z punktu widzenia biologa komórki. Pominięty został tu cały aspekt endokrynologiczny i ginekologiczny tego zagadnienia, nie dlatego by były one mniej ważne, ale po prostu dlatego, że autor będąc biologiem a nie lekarzem, nie czuje się kompetentny do wypowiedzania się na te tematy. W artykule dla przejrzystości cytowane są tylko nieliczne oryginalne prace badawcze, te które miały podstawowe znaczenie dla postępu dziedziny, którą się tu zajmujemy. Czytelników zainteresowanych źródłem pochodzenia przedstawionych szczegółowych informacji należy odesłać do dostępnych, bardzo wyczerpujących prac przeglądowych. Wśród nich mimo upływu czasu niezastąpioną lekturą na temat zapłodnienia w dalszym ciągu jest monografia *Mammalian fertilization* pióra YANAGIMACHIEGO (1994). Na temat tego, jak żeńskie drogi rozrodcze regulują funkcję i transport

plemników, czytelnik znajdzie informacje w przeglądzie poświęconemu temu zagadnieniu i opublikowanym w czasopiśmie „Human Reproduction” (SUAREZ i PACEY 2006). Mechanizmy molekularne, które kontrolują oddziaływania komórek rozrodczych podczas zapłodnienia, omówione są w aktualnym artykule autorstwa IKAWY i współaut. (2010). Szczególnie interesującym aspektem tej ostatniej pracy jest skonfrontowanie w niej wyników wcześniejszych badań nad mechanizmami zapłodnienia, uzyskanych za pomocą technik cytologicznych i biochemicznych, z analizą fenotypów tzw. myszach „nokautowych”, w których inaktywowano geny, których produkty, jak podejrzewano, kontrolują przebieg zapłodnienia. Obszernym źródłem informacji na temat wielu aspektów stosowania mikrochirurgicznych technik wspomaganego zapłodnienia jest natomiast kolejna praca przeglądowa napisana przez YANAGIMACHIEGO (2005). Jeśli chodzi o prace przeglądowe w języku polskim, to polecić można stosowne rozdziały z dwóch książek: *Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków* i *Molekularne podstawy embriogenezy* (SZCZYGIEL i współaut. 2002, MALESZEWSKI 2002). Interesujący i aktualny artykuł w języku polskim na temat mechanizmów zapłodnienia, przyczyn niepłodności u człowieka oraz tego, jak metody wspomaganego zapłodnienia pozwalają tę niepłodność przezwyciężyć, znaleźć można w jednym z ostatnich zeszytów czasopisma „Biologia w Szkole” (MEGLICKI 2010). Zainteresowanych mechanizmami aktywacji oocytu przez plemnik podczas zapłodnienia odesłać można do prac: po polsku w czasopiśmie „Postępy Biologii Komórki” (AJDUK 2007) oraz po angielsku w czasopiśmie „Reproductive Biology” (AJDUK i współaut. 2008). Wcześniejszy przegląd dotyczący zastosowania technik metod wspomaganego zapłodnienia w badaniach rozrodu ssaków, pióra autora tego artykułu, znajdzie czytelnik także w czasopiśmie KOMOS (MALESZEWSKI 1998).

Jak wszystkie wielkie osiągnięcia naukowe, także opracowanie metod skutecznego zapłodnienia u ludzi opiera się na wcześniejszych badaniach. Ich wyniki stworzyły stosowną podstawę, pozwalającą na dokonanie ostatecznego, spektakularnego kroku, jakim było skuteczne pozaustrojowe zapłodnienie u człowieka. Badania nad zapłodnieniem u zwierząt zapoczątkowane zostały ponad sto lat temu, ale do lat 50. ubiegłego wieku prowadzone były przede wszystkim na płazach

i morskich bezkręgowcach. Wybór takiego obiektu badań był podyktowany przede wszystkim łatwością w uzyskiwaniu ich komórek rozrodczych w dużych ilościach. Ponadto zapłodnienie u tych zwierząt jest zewnętrzne i zachodzi w wodzie. W związku z tym w laboratorium łatwo było stworzyć warunki podobne do naturalnych, gdyż gamety uwolnione do wody są zdolne do zapłodnienia. Tymczasem okazało się, że plemniki ssaków uzyskane z ejakulatów nie mają tej zdolności, na co wskazywały pierwsze nieudane próby zapłodnienia pozaustrojowego. Dopiero użycie plemników pobranych z dróg rodnych samic pokrytych w naturalny sposób, doprowadziło do zapłodnienia komórki jajowej ssaka. Proces nabierania przez plemniki zdolności do zapłodnienia pod wpływem dróg rodnych samic nazwano kapacytacją. Bardziej szczegółowo zajmiemy się tym zjawiskiem w dalszej części tego artykułu. W tym miejscu należy jednak wskazać, że nie byłoby narodzin Luizy Brown i następnie kolejnych milionów dzieci, których rozwój zapoczątkowany został w laboratorium, gdyby nie odkrycie zjawiska kapacytacji plemników (CHANG 1959). Kolejnym wielkim osiągnięciem było wykazanie, że kapacytację można przeprowadzać *in vitro*, w stosownie dobranej pożywce. Tego ostatniego odkrycia, zasadniczego z punktu widzenia rozwoju metod wspomaganego reprodukcji, dokonał japoński uczonec, Ryuzo Yanagimachi, który pracował wówczas w Massachusetts, w laboratorium dr. M. C. Changa (odkrywcy kapacytacji). Właśnie tam Yanagimachi po raz pierwszy przeprowadził skuteczne zapłodnienie *in vitro* oocytów chomika plemnikami, które były pobrane z jądr samców, a następnie kapacytowane *in vitro*. Publikacja, która opisywała to osiągnięcie ukazała się w „Nature” w 1963 r. i była kamieniem milowym na drodze prowadzącej do opracowania metody zapłodnienia pozaustrojowego u człowieka (YANAGIMACHI i CHANG 1963). Profesor Yanagimachi w następnym roku objął stanowisko na Uniwersytecie Hawajskim w Honolulu, gdzie do dziś (obecnie na emeryturze) prowadzi badania nad rozmnażaniem i rozwojem zwierząt. O niektórych jego osiągnięciach będzie jeszcze mowa poniżej.

Plemniki (Ryc. 1) powstają w męskich gonadach – jądrach, po opuszczeniu których, przechodzą najpierw przez jądrze, a dalej przez nasieniowody. Charakterystyczną cechą, która sprawia, że plemnik jest niezwykle komórką, jest jego zdolność do ruchu, dzie-



Ryc. 1. Budowa plemnika ssaka (BORSUK i współaut. 2007).

ki posiadaniu witek. W warunkach naturalnych, a także podczas zapłodnienia *in vitro* przeprowadzanego klasyczną metodą (niżej będzie wyjaśnione, jaka dla tej metody jest alternatywa), tylko ruchliwe plemniki mogą zapładniać oocyty. Jednak plemniki wychodzące z jądra nie są jeszcze zdolne do zapłodnienia, między innymi (ale nie wyłącznie!) dlatego, że nie są jeszcze zdolne do poruszania się. Dojrzewanie plemników, prowadzące do nabrania przez nie zdolności do ruchu, zachodzi podczas ich przechodzenia przez najądrze. Przewód tego narządu to silnie zwinięta cewka, która u człowieka ma od 4 do 6 metrów długości. Podczas przebywania w świetle tego przewodu, co trwa kilka dni, plemniki podlegają całemu szeregowi nie do końca poznanych zmian – bardzo znacząco przebudowywana jest wtedy ich błona komórkowa, zarówno jeśli chodzi o skład, jak i lokalizację tworzących ją lipidów i białek, zarówno w rejonie główki plemnika, jak i jego witek. Zmiany zachodzą wtedy także w jądrze plemnika, pomiędzy resztami cysteinowymi

protamin – białek, które podczas spermiogenezy zastępują histony – powstają mostki dwusiarczkowe, które usztywniają i stabilizują chromatynę plemnika.

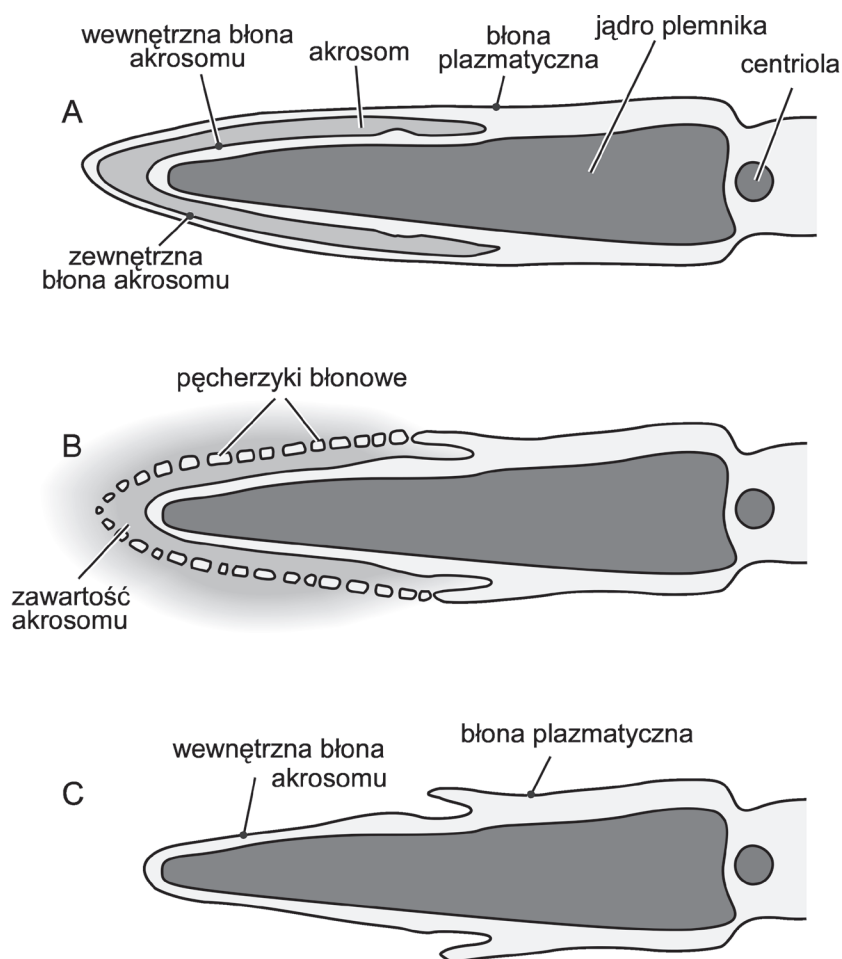
Ejakulowane plemniki trafiają do dróg rodnych samicy i choć są już wtedy zdolne do ruchu, to, jak już było wspomniane wyżej, nie są jeszcze zdolne do zapłodnienia i muszą przedtem przejść kapacytację. Zachodzi ona pod wpływem dróg rodnych samicy, które wydają się odgrywać zasadniczą rolę w przygotowaniu plemników do zapłodnienia oraz w regulacji ich transportu do bańki jajowodu, czyli do miejsca, w którym u ssaków dochodzi do spotkania i połączenia gamet. Współczesny obraz przebiegu zjawisk, które u ssaków poprzedzają powstanie zygoty, odbiega bowiem bardzo od popularnego obrazu wyścigu wielkiej kohorty plemników, w którym zwycięzcą zostaje najszybszy z nich, ten który pierwszy „dopadnie” owulowany oocyt. Na podstawie wielu dowodów sądzimy, że kapacytacja plemników i ich transport w drogach rodnych samicy są procesami powiązаныmi ze sobą i kontrolowanymi przez nabłonek wyścielający te drogi. Wiemy na przykład, że mimo tego, że w miejscu, gdzie deponowane są plemniki podczas kopulacji (u różnych gatunków może to być albo pochwa, albo macica), ich liczba jest olbrzymia, to do bańki jajowodu, gdzie zachodzi zapłodnienie, plemników dociera znacznie mniej. U człowieka w ejakulacie jest średnio ok. 200 mln plemników, tymczasem w miejscu zapłodnienia jest ich zwykle ok. 200. Ta różnica jest jeszcze większa u innych gatunków, np. u bydła domowego w bańce jajowodu zwykle znaleźć można zaledwie kilka plemników, mimo tego, że podczas kopulacji do dróg rodnych samicy dostają się aż 3 miliardy plemników. Także u świni, choć zwykle w miejscu zapłodnienia naliczyć można ok. 1000 plemników, to jest to bardzo niewiele w porównaniu z liczbą plemników w ejakulacie knura, która sięga 8 miliardów! Wizji „wyścigu plemników” przeczą także badania prowadzone u ludzi, zmierzające do ustalenia, jakie jest prawdopodobieństwo zajścia w ciążę w zależności od tego, jaki był odstęp czasowy pomiędzy kopulacją i owulacją. Stwierdzono, że choć to prawdopodobieństwo najwyższe jest wtedy, gdy stosunek miał miejsce w dniu owulacji, to jednak nie zmniejsza się ono istotnie, gdy miał on miejsce jeden lub dwa dni przed owulacją. Gdy odstęp ten był jeszcze dłuższy, to szansa zajścia w ciążę spadała, była jednak ciągle dość

wysoka nawet wtedy, gdy plemniki trafiały do pochwy na 5 dni przed czasem, gdy mogło dojść do zapłodnienia. Wspomniane obserwacje pozwalają przypuszczać, że drogi rodne samicy ssaka odgrywają bardzo istotną rolę w regulacji stanu plemników oraz ich transportu z miejsca ich złożenia podczas kopulacji do miejsca zapłodnienia, i że ich rola nie ogranicza się tylko do biernego stwarzania środowiska dla kapacytacji. Nabłonek wyścielający te drogi, zwłaszcza szyjki macicy oraz części macicznej i cieśni jajowodu ma bardzo rozwiniętą powierzchnię ze względu na silne pofałdowanie wewnętrznej ściany. W utworzonych w ten sposób zagłębieniach zostają związane plemniki, których kapacytacja jest kontrolowana przez to środowisko. W tym świetle widzieć też należy kwestię chemotaksji plemników u organizmów z zapłodnieniem wewnętrznym, takich jak ssaki. Znaczenie chemotaksji polega tu prawdopodobnie na selektywnym mobilizowaniu i kierowaniu ruchu do oocytu tych plemników, które w danym momencie świeżo przeszły kapacytację i są gotowe do zapłodnienia. Źródłem chemoatraktantów może być oocyt, komórki pęcherzykowe lub też płyn uwalniany z pęcherzyka jajnikowego podczas owulacji. Coraz więcej dowodów świadczy o tym, że atraktantem może być progesteron, który może wpływać na sposób ruchu plemników, a chemotaksja służyć może u ssaków synchronizacji owulacji i kapacytacji oraz transportu gamet męskich. Sama kapacytacja plemników nie jest procesem do końca poznany. Wiemy, że obejmuje ona cały szereg różnych zjawisk, przygotowujących plemniki do fuzji z oocytem. Wiemy, że podczas kapacytacji plemników ssaków zachodzi reorganizacja błony komórkowej w wyniku usunięcia cholesterolu, co skutkuje zmianą płynności tej błony. Ma miejsce wówczas także usunięcie z błony plemnika pewnych białek oraz reszt cukrowych, dzięki czemu następuje odsłonięcie miejsc wiązania z osłonką przejrzystą oocytu. Obserwujemy również spadek potencjału błonowego w plemniku i w konsekwencji wypływ jonów K^+ i wejście jonów Ca^{2+} , a także fosforylację i w przemieszczenie niektórych białek (np. białek opiekuńczych szoku cieplnego) oraz modyfikacje zewnętrznej błony akrosomowej plemnika.

Okazuje się, że nie ma uniwersalnej pozycji do kapacytacji *in vitro* i plemniki różnych gatunków wymagają różnego jej składu oraz różnego czasu i warunków inkubacji. Dla przeprowadzenia skutecznego zapłod-

nienia *in vitro* u człowieka kluczowym zadaniem było wobec opracowanie metody, za pomocą której *in vitro* można kapacytować plemniki ludzkie. To osiągnięcie jest także zasługą Roberta Edwardsa, zesłorocznego laureata nagrody Nobla (EDWARDS i współaut. 1969).

Akrosom, to pęcherzyk wydzielniczy, wywodzący się z aparatu Golgiego, okrywający przednią część jądra plemnika i zawierający liczne enzymy hydrolityczne, które ułatwiają kontakt i połączenie się gamet. Uwolnienie jego zawartości do otoczenia nazywane jest reakcją akrosomową plemnika (Ryc. 2). Ten proces masowej egzocytozy, gdyż tak należy widzieć istotę reakcji akrosomowej, jest kolejnym etapem przygotowania plemnika do fuzji z oocytem. Obecnie uważa się, że fizjologiczna reakcja akrosomowa, czyli taka, którą przechodzi plemnik mający szansę na fuzję z oocytem, zachodzi po związaniu gamety męskiej na powierzchni osłonki przejrzystej oocytu. Tu należy się przyjrzeć temu, jakie bariery oddzielają oocyt od plemników, które przeszły kapacytację w drogach rodnych samicy i dotarły do miejsca zapłodnienia, czyli do bańki jajowodu. Po zajściu owulacji w bańce jajowodu znajdują się owulowane oocyty, które w tym miejscu mają szansę spotkać się z plemnikami zdolnymi do zapłodnienia. Każdy oocyt otoczony jest glikoproteinową osłonką przejrzystą oraz kilkoma warstwami komórek pęcherzykowych, które podczas owulacji wraz z oocytem uwolnione zostały z pęcherzyka jajnikowego. Plemnik, by wniknąć do oocytu, musi pokonać te bariery. Przedostanie się pomiędzy komórkami pęcherzykowymi jest możliwe prawdopodobnie dzięki aktywności hialuronidazy obecnej na powierzchni plemnika w rejonie jego akrosomu. W wyniku tej aktywności enzymatycznej trawione są połączenia między komórkami pęcherzykowymi, co pozwala plemnikowi na dotarcie do osłonki przejrzystej. Tam plemnik zostaje związany, a połączenie plemnika z glikoproteinami osłonki następuje w wyniku wiązania takiego typu, jakie widzimy pomiędzy receptorem, a jego ligandem. Osłonka przejrzysta oocytu ssaka zbudowana jest z trzech glikoprotein, oznaczonych ZP1, ZP2 i ZP3. Dość powszechnie sądzi się, że reszty cukrowe białek ZP3 i ZP2 uczestniczą w wiązaniu plemnika na powierzchni osłonki przejrzystej, a to wiązanie za pośrednictwem ścieżki sygnałowej zależnej od aktywacji fosfolipazy C i następnie kanałów wapniowych, zależnych od IP_3

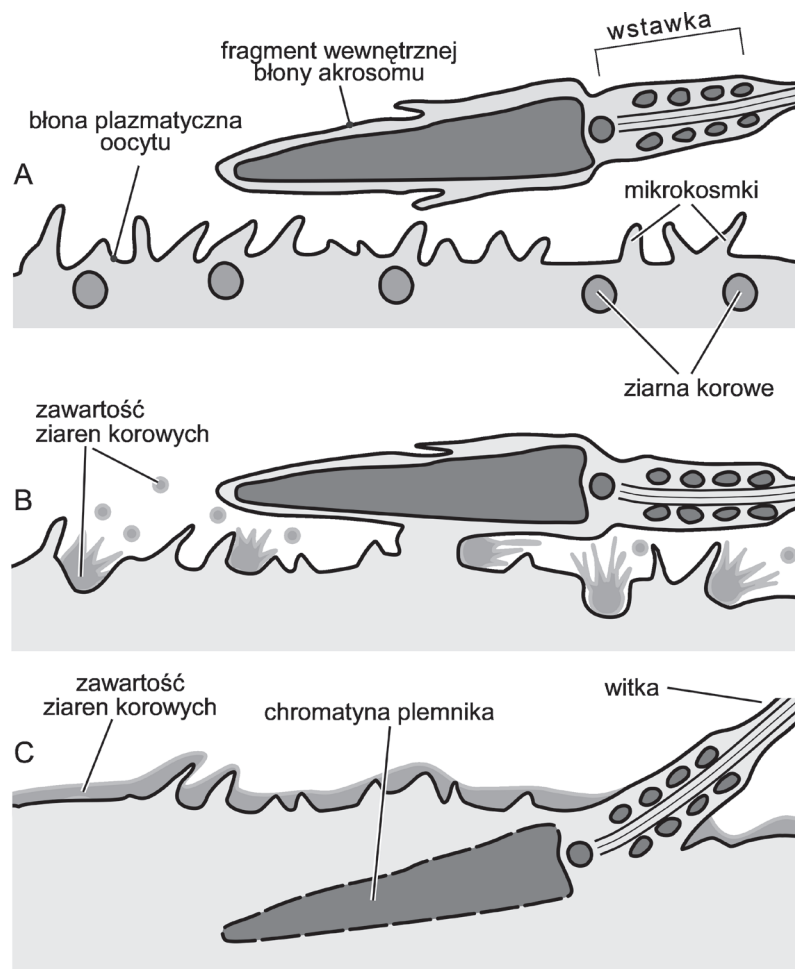


Ryc. 2. Przebieg reakcji akrosomowej (BORSUK i współaut. 2007).

(1,4,5-trójfosforan inozytoli), stymuluje reakcję akrosomową plemnika. Jednakże analiza fenotypów myszy, w których inaktywowano geny kodujące enzymy odpowiedzialne za glikozylację białek ZP wykazała znacznie mniejsze niż dotychczas sądzono znaczenie w zapłodnieniu reszt cukrowych białek osłonki przejrzystej. Jeszcze mniej jasno przedstawia się sprawa białek, które uczestniczą w wiązaniu gamet ze strony plemnika. Fenotypy myszy „nokautowych” pozbawionych białek, co do których przypuszczano, że pełnią rolę receptorów wiążących się z ligandami osłonki, są skomplikowane i trudne do wyjaśnienia. Sądzi się, że białka należące do rodziny białek ADAM (ang. a disintegrin and metalloprotease domain) regulują ten proces ze strony plemnika, ciągle jednak mechanizm molekularny pierwszego etapu wiązania gamet, polegającego na związaniu plemnika na osłonce przejrzystej, pozostaje w dużym stopniu niewyjaśniony i wymaga dalszych badań. Na szczęście dla zapłodnienia *in vitro* proces

ten wydaje się przebiegać w warunkach laboratoryjnych wydajnie i zapewne w sposób fizjologiczny, tak że nasza niekompletna wiedza co do jego mechanizmów nie upośledza możliwości przeprowadzania zapłodnienia pozaustrojowego.

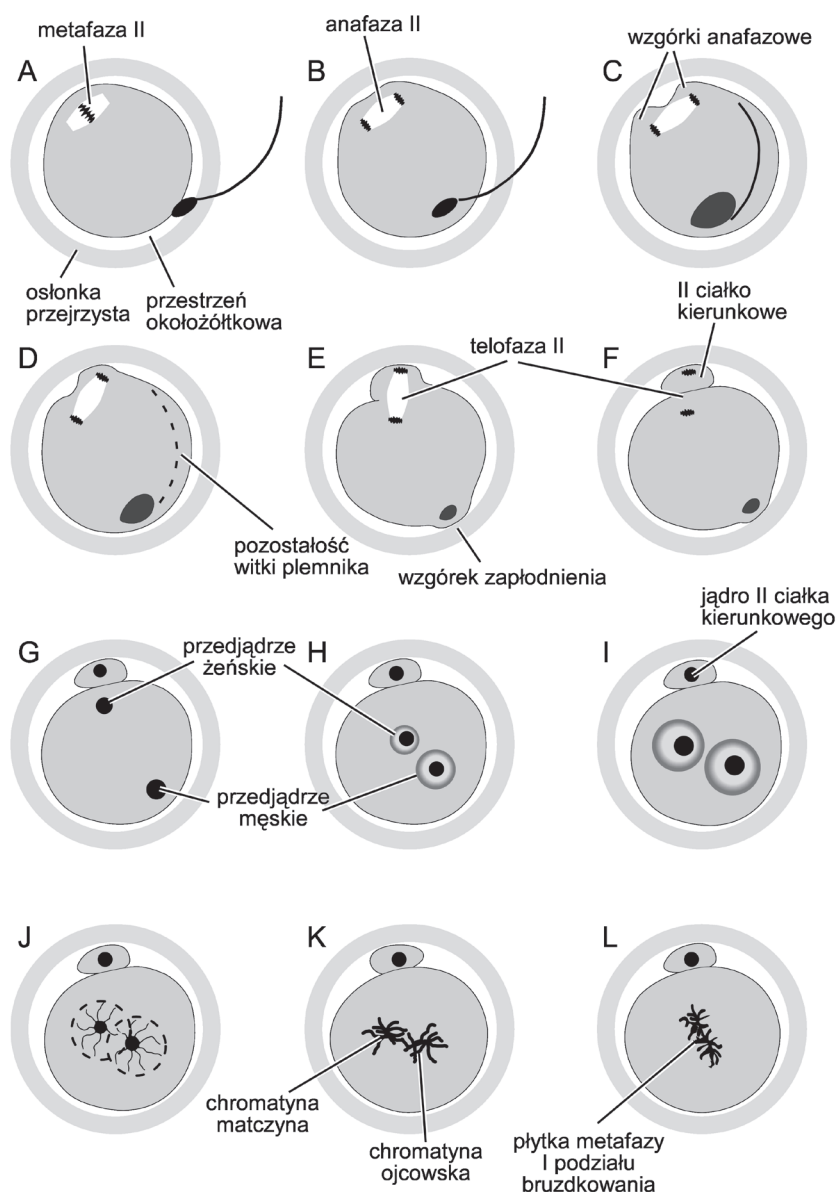
Wniosek zamykający poprzedni akapit odnosi się także do kolejnych etapów zapłodnienia, to znaczy do przenikania plemnika przez osłonkę przejrzystą oraz do fuzji błon komórkowych gamet. Do przejścia plemnika przez osłonkę przejrzystą niezbędny jest jego ruch, stąd niektórzy badacze uważają, że odbywa się to dzięki mechanicznemu oddziaływaniu jego główki na osłonkę. Najprawdopodobniej jednak w tym etapie zapłodnienia oprócz mechanicznego działania poruszającego się plemnika uczestniczą także enzymy proteolityczne uwalniane podczas reakcji akrosomowej. Po wnikięciu pod osłonkę przejrzystą plemnik wchodzi w kontakt z błoną komórkową oocytu, wiąże się na jej powierzchni i następnie fuzjuje



Ryc. 3. Fuzja błon plazmatycznych oocyty i plemnika podczas zapłodnienia i reakcja korowa oocyty (BORSUK i współaut. 2007).

z nią (Ryc. 3). Białka zaangażowane w fuzję błon komórkowych gamet są przedmiotem intensywnych badań i, podobnie jak to było w pracach poświęconych wiązaniu plemnika na osłonce przejrzystej, obecnie najważniejszą ich metodą jest obserwowanie mechanizmów zaburzeń płodności myszy, u których inaktywowano geny kodujące te białka, które we wcześniejszych pracach zidentyfikowano jako możliwe regulatory tego kluczowego etapu zapłodnienia. Obraz, jaki wyłania się z dotychczas uzyskanych wyników jest daleki od klarownego. W plemniku zidentyfikowano białko należące do rodziny immunoglobulin, które nazwano IZUMO (nazwa ta pochodzi od japońskiej świątyni Shinto o tej nazwie, a poświęconej małżeństwu). Samce myszy pozbawione funkcjonalnej kopii tego genu są zupełnie sterylne, chociaż ich plemniki mogą penetrować osłonkę przejrzystą i wchodzić w kontakt z błoną komórkową oocyty. Plemniki takie są jednak zupełnie

niezdolne do fuzji z oocytem, co pokazuje, że IZUMO plemnika jest niezbędne dla jego fuzji z oocytem. Wiemy także, że ze strony oocyty niezbędne do zapłodnienia jest białko CD9, należące do rodziny tetraspanin. Choć białko to rozpowszechnione jest w komórkach wielu typów i wcześniej przypisywano mu różne funkcje, to z wielkim zaskoczeniem stwierdzono, że „nokaut” tego genu fenotypowo przejawia się tylko w oocytach, a brak białka CD9 czyni oocyty owulowane przez samice homozygotyczne względem tej mutacji prawie zupełnie niezdolnymi do fuzji z plemnikami. Tetraspanina CD9 wydaje się więc niezbędna w zapłodnieniu i jak dotąd jest jedynym poznanym białkiem oocyty, któremu można przypisać rolę konieczną w tym procesie. Jednakże nie udało się wykazać żadnego bezpośredniego oddziaływania pomiędzy IZUMO plemnika a CD9 oocyty. Prawdopodobnym jest, że za indukowanie fuzji gamet odpowiedzialna może być zło-



Ryc. 4. Zapłodnienie owulowanego oocyta i przebieg pierwszego cyklu komórkowego zygoty ssaka (schemat oparty na przebiegu zapłodnienia u myszy).

A. plemnik pod osłonką przejrzystą oocyta; **B.** anafaza II podziału mejotycznego. Po redukcji mostków dwusiarczkowych jądro plemnika, który zfuzywał z oocytem traci otoczkę jądrową i rozpoczyna dekondensację; **C.** anafaza/telofaza II podziału mejotycznego. Widoczne charakterystyczne wypuklenia cytoplazmy nad rozchodzącymi się grupami chromatyny żeńskiej. Plemnik w trakcie dekondensacji; **D., E. i F.** telofaza II podziału mejotycznego: **D.** rozpoczyna się obrót wrzeciona kariokinetycznego i wciąganie jednego wzgórka. Chromatyna męska rozpoczyna fazę rekondensacji; **E.** wrzeciono kariokinetyczne w pozycji niemal prostopadłej do powierzchni zygoty. Rozpoczyna się cytokineza – odcinanie II ciała kierunkowego. Plemnik rekondensuje, tworzy się wzgórek zapłodnienia; **F.** drugie ciało kierunkowe całkowicie odcięte. Widoczny wzgórek zapłodnienia nad chromatyną męską; **G.** Faza G1 I cyklu komórkowego (zygotycznego). Wczesne przedjądrze żeńskie widoczne w okolicy II ciała kierunkowego, przedjądrze męskie na przeciwległym biegunie zygoty, wzgórek zapłodnienia całkowicie wciągnięty; **H.** faza S. Przedjądrza rosną i syntetyzują DNA, migrując w cytoplazmie zygoty w kierunku jej centrum; **I.** faza G2, przedjądrza usytuowane centralnie lub niemal centralnie; **J. i K.** profaza pierwszego podziału mitotycznego (bruzdkowania): **J.** w przedjądrzach dochodzi do kondensacji chromosomów, rozpadają się ich otoczki jądrowe; **K.** w cytoplazmie zygoty widoczne dwie grupy chromosomów, jedna pochodząca od matki a druga od ojca; **L.** prometafaza I podziału bruzdkowania, chromosomy matczyne i ojcowskie ustawiają się we wspólnej płytce metafazowej (BORSUK i współaut. 2007).

żona konformacja ich błon komórkowych, sprzyjająca fuzji, w organizacji której uczestniczyć mogą wykryte białka konieczne dla tego etapu zapłodnienia. Predestynowana do takiej roli może być zwłaszcza tetraspanina CD9, gdyż wiadomo, że białka należące do tej rodziny uczestniczą w organizacji błon komórkowych poprzez oddziaływania z innymi białkami i tworzenie tzw. sieci tetraspaninowej w błonie.

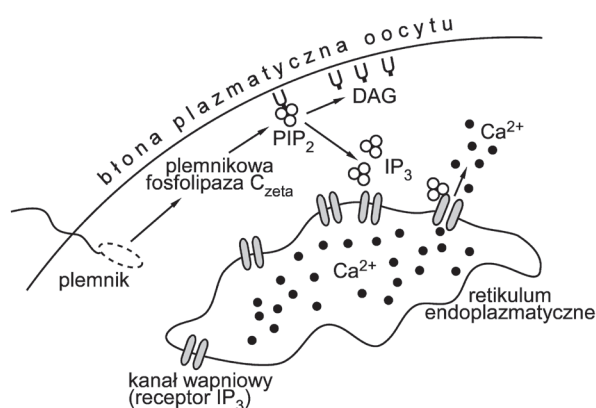
Po fuzji błon gamet jądro plemnika wnika do cytoplazmy oocyty. Wnikający plemnik indukuje w oocycie cały szereg zmian, które zbiorczo noszą nazwę aktywacji. Owulowane oocyty ssaków, tak jak i większości kręgowców, są zablokowane w metafazie drugiego podziału mejotycznego. Najbardziej spektakularnym przejawem aktywacji po wnikięciu plemnika jest wyjście oocyty z tego bloku, dokończenie drugiego podziału mejotycznego, co wiąże się z wyrzuceniem drugiego ciała kierunkowego i przejście do interfazy pierwszego zarodkowego cyklu mitotycznego (Ryc. 4). Cytoplazma aktywowanego oocyty stwarza odpowiednie warunki do przekształcenia się jądra plemnika w jądro interfazowe – przedjądrze męskie, chromatyna oocyty w tym samym czasie tworzy przedjądrze żeńskie. Genomy pochodzące od obu osobników rodzicielskich zarodka pozostają osobno, każdy w swoim przedjądrzu przez cały pierwszy cykl zarodkowy, dopóki nie utworzą wspólnej płytki metafazowej pierwszego podziału bruzdkowania zarodka (Ryc. 4).

Wyjście z bloku metafazowego i przejście zapłodnionego oocyty do interfazy zygotycznej wynika z tego, iż wnikający plemnik inaktywuje w oocycie czynniki odpowiedzialne za blok w fazie M cyklu komórkowego. Równowaga pomiędzy syntezą i degradacją białka regulatorowego tej fazy cyklu – cykliny B zostaje po zapłodnieniu przesunięta w kierunku jej proteolizy. Cyklina B jest podjednostką regulatorową, która w połączeniu z kinazą CDK1, należącą do rodziny kinaz zależnych od cyklin, tworzy kompleks MPF (ang. M-phase promoting factor), którego wysoka aktywność w owulowanym oocycie utrzymuje go w bloku mejotycznym. Degradacja cykliny B po wnikięciu plemnika powoduje to, że blok ten zostaje zniesiony.

Bezpośrednią przyczyną aktywacji oocyty, do którego wniknął plemnik, są zaindukowane w jego cytoplazmie, w konsekwencji fuzji gamet, oscylacyjne zmiany stężenia wolnych jonów Ca^{2+} . Zaobserwowano, że już w kilkadziesiąt sekund po fuzji błon plemni-

ka i oocyty w cytoplazmie gamety żeńskiej gwałtownie wzrasta stężenie jonów wapnia, które wkrótce potem zmniejsza się prawie do poziomu początkowego. Następnie takie oscylacje stężenia jonów Ca^{2+} powtarzają się cyklicznie w cytoplazmie zapłodnionego oocyty aż do momentu, gdy wytworzą się w nim interfazowe przedjądrza, co trwa zwykle kilkadziesiąt minut. Podwyższone stężenie jonów wapnia w cytoplazmie oocyty indukuje w nim tzw. blok przeciwko polispermii, czyli reakcję zapobiegającą wnikaniu kolejnych plemników do oocyty już zapłodnionego. Najlepiej poznanym, choć zapewne nie jedynym mechanizmem, który zapobiega polispermii jest reakcja korowa, czyli wyrzucenie zawartości tzw. ziaren korowych do przestrzeni pod osłonką przejrzystą. Ziarna korowe, to obłonione pęcherzyki zlokalizowane w oocycie w jego warstwie powierzchniowej, tuż pod błoną komórkową. W aktywowanym oocycie ziarna te fuzją z błoną komórkową, a ich zawartość ulega egzocytizie. Ponieważ są w niej obecne enzymy glikolityczne i proteolityczne, to po uwolnieniu modyfikują one glikoproteiny osłonki przejrzystej w taki sposób, że w ciągu kilku minut od wnikięcia pierwszego plemnika przestaje być ona zdolna do wiązania kolejnych gamet męskich. Inny blok przeciwko wnikaniu dodatkowych plemników rozwija się w tym czasie na poziomie błony komórkowej oocyty – jego mechanizm pozostaje jednak ciągle niewyjaśniony.

Bezpośrednim mediatorem zmian jakie zachodzą po wnikięciu plemnika w aktywowanym oocycie są oscylacyjne zmiany stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Już od dość dawna wiadomo było, że oscylacje stężenia Ca^{2+} w aktywowanym oocycie są kontrolowane przez kanały wapniowe, które są zlokalizowane w błonach siateczki śródplazmatycznej i są zależne od IP₃. Sugerowało to zaangażowanie fosfolipazy C w aktywację, nie wiadomo było jednak w jaki sposób fuzja gamet powoduje pobudzenie aktywności tego enzymu. Badania tego zagadnienia przyniosły kilka lat temu dość zaskakującą odpowiedź. Okazało się mianowicie, że w wyniku fuzji gamet plemnik wnosi do cytoplazmy oocyty czynnik aktywujący, którym jest specyficzna dla gamet męskich forma fosfolipazy C (nazwana PLC ζ), której aktywność prowadzi do powstania w oocycie oscylacji cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} i w ten sposób do aktywacji oocyty (Ryc. 5).



Ryc. 5. Uwalnianie jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej pod wpływem czynnika aktywującego (fosfolipazy C ζ) wnoszonego przez plemnik. PIP_2 – bisfosforan fosfatydyloinozytolu; IP_3 – tris-fosfoinozytol; DAG – diacyloglicerol (BORSUK i współaut. 2007).

Jeżeli chodzi o zapłodnienie *in vitro*, to stwierdzić można, że w tych warunkach aktywacja oocyty najprawdopodobniej przebiega tak samo, jak to się dzieje podczas zapłodnienia fizjologicznego. A jeżeli nawet istnieją jakieś różnice w przebiegu tego procesu *in vitro* i *in vivo*, to nie mają one wpływu na zdolności rozwojowe zarodka, który powstaje w wyniku zapłodnienia laboratoryjnego. Co ważniejsze, okazało się, że plemnik, do tego, by spełnić swoją rolę rozwojową, wcale nie musi wnikać do oocyty na drodze fuzji, tak jak się to dzieje podczas zapłodnienia zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, przeprowadzanego klasyczną metodą opracowaną przez Edwardsa i Steptoe. Może on bowiem być do oocyty po prostu wstrzyknięty.

Tu przechodzimy do kolejnego osiągnięcia badań nad rozrodem zwierząt, a w tym i człowieka, mianowicie do zastosowania technik mikrochirurgicznych do wspomaganie rozrodu. Najważniejsza z nich to metoda ICSI (ang. intracytoplasmic sperm injection), polegająca na mikrochirurgicznym wstrzyknięciu plemnika do oocyty. Mikrochirurgia jest tu stosowana zamiast naturalnie przebiegającej fuzji gamet, która w klasycznej metodzie zapłodnienia *in vitro* zachodzi najprawdopodobniej tak samo, jak to się dzieje podczas zapłodnienia naturalnego. Możliwość zastosowania ICSI ma olbrzymie znaczenie choćby w sytuacji, gdy mamy do czynienia z niepłodnością męską związaną z zaburzeniami fizjologii nasienia: liczby plemników w ejakulacie, ich ruchliwości, kształtu czy też

funkcjonalności plemnika na poszczególnych etapach zapłodnienia przebiegającego naturalnie.

To, że plemnik wstrzyknięty do oocyty może funkcjonować tak, jak plemnik wnikający tam podczas normalnego zapłodnienia, po raz pierwszy wykazał Yanagimachi (UEHARA i YANAGIMACHI 1976). W doświadczeniu tym zastosowane były oocyty i plemniki chomika, bardzo podatne na manipulacje tego typu. Jednak ze względu na nierozwiązane do dziś problemy z hodowlą *in vitro* i transferem zarodków u tego gatunku, nie można było w pełni określić potencjału rozwojowego zygot powstałych po zapłodnieniu przez ICSI. Do zapłodnienia u człowieka technikę tę po raz pierwszy zastosował z powodzeniem włoski badacz Gianpiero Palermo, pracujący w Centrum Medycyny Reprodukcyjnej Vrije Universiteit w Brukseli (PALERMO i współaut. 1992). Podjęcie próby ICSI do oocytów ludzkich było rozwinięciem stosowanej już wcześniej metody mikrochirurgicznego wspomaganie rozrodu, polegającej na wprowadzaniu pojedynczego plemnika pod osłonkę przezrystą oocyty. Technika ta, nazwana SUZI (ang. subzonal sperm injection), miała za zadanie zwiększać prawdopodobieństwo zapłodnienia w przypadkach niskiej liczby plemników lub ich małej ruchliwości, które to zaburzenia obniżały bardzo szansę udanego klasycznego zapłodnienia *in vitro*. W przypadku SUZI fuzja gamet zachodzić jednak musi siłami natury, natomiast ICSI to krok dalej, gdyż metoda ta omija wszystkie etapy normalnego zapłodnienia, z fuzją błon komórkowych plemnika i oocyty włącznie. Opracowanie metody ICSI z zastosowaniem oocytów i plemników myszy, u tego gatunku znacznie trudniejsze niż u chomika i u człowieka, dokonane także w laboratorium Yanagimachiego, pozwoliło na prowadzenie całego szeregu badań nad zapłodnieniem u tego modelowego organizmu oraz nad samym ICSI (KIMURA i YANAGIMACHI 1995). Wyniki tych doświadczeń potwierdziły zaskakujące wnioski jakie nasuwało wcześniejsze skuteczne zastosowanie ICSI w programie zapłodnienia *in vitro* u człowieka. Połączenie gamet podczas ICSI przebiega zupełnie inaczej niż podczas zapłodnienia zachodzącego siłami natury. Gdy plemnik fuzjuje z oocytem, jego błona komórkowa zostaje wbudowana w błonę komórkową gamety żeńskiej, a do cytoplazmy wnika jego jądro otoczone otoczką jądrową. Wnikający plemnik jest także pozbawiony akrosomu, gdyż jego zawar-

tość została uwolniona podczas reakcji akrosomowej, która zaszła po związaniu plemnika na osłonce przejrzystej oocytu. Podczas ICSI sytuacja jest odmienna: do oocytu wstrzykiwany jest cały plemnik, okryty błoną komórkową i z nienaruszonym akrosomem. Błona komórkowa plemnika podczas ICSI jest zwykle lokalnie uszkodzana, gdyż przed iniekcją do cytoplazmy plemnik jest unieruchamiany przez przyciśnięcie witki pipetą iniekcyjną do dna szalki, w której prowadzi się zabieg. Tym niemniej plemnik wprowadzony do oocytu pozostaje okryty błoną komórkową, co nigdy nie zdarza się podczas naturalnego zapłodnienia. Jednak zarówno obserwacje poczynione podczas ICSI u człowieka, jak i szczegółowe badania wykorzystujące ICSI u myszy pokazały, że mimo tych różnic aktywacja oocytu, przekształcenie jądra plemnika w przedjądrze męskie i rozwój zarodka po ICSI przebiegają tak samo jak po zapłodnieniu naturalnym. Błona komórkowa i akrosom plemnika wstrzykniętego do oocytu bardzo szybko rozpraszają się w jego cytoplazmie, zaś aktywacja oocytu podczas ICSI zachodzi pod wpływem oscylacji stężenia jonów Ca^{2+} , które plemnik wstrzyknięty indukuje tak samo skutecznie jak plemnik, który z oocytem sfuzjował. Dalsze doświadczenia, które wykorzystywały mysz jako model wykazały, że normalny rozwój zachodzić może również wtedy, gdy do oocytu wstrzyknięty jest plemnik niezdolny do ruchu lub zniekształcony w wyniku wad genetycznych. To samo stwierdzono, gdy do ICSI u myszy zastosowano plemniki martwe: zamrażane bez krioprotektantów, liofilizowane czy też pochodzące z martwych samców, nawet takich, których całe ciała były zamrażane i przechowywane przez kilka lat. Okazało się też, że same główki plemników, a nawet ich izolowane jądra, są w stanie zastąpić całe plemniki, gdy wstrzyknie się je do cytoplazmy oocytów. Ogólna konkluzja z tych doświadczeń była taka, że, przynajmniej u myszy, dla rozwoju zarodka potrzebne jest tylko jądro plemnika, a wszystkie inne elementy i przystosowania tej komórki są konieczne dla jej funkcji podczas naturalnego zapłodnienia, ale nie są niezbędne dla rozwoju zarodka i są zbędne, gdy plemnik zostaje mikrochirurgicznie wprowadzony do oocytu. Wniosek ten potwierdzały wyniki eksperymentów, w których przeprowadzono skuteczne zapłodnienie przy pomocy ICSI, w którym zamiast plemników użyto komórek z wcześniejszych stadiów spermatogenezy: spermatyd i spermatocytów. Jedyną

różnicą w tych doświadczeniach, w porównaniu ze „zwykłym” ICSI, było to, że po wprowadzeniu komórek spermatogenicznych do oocytu konieczne było jego sztuczne pobudzenie do rozwoju, gdyż w komórkach tych nie ma jeszcze wykształconego czynnika (zapewne PLC ζ), który odpowiada za aktywację oocytu podczas zapłodnienia.

Obecnie większość klinik przeprowadzających zapłodnienie *in vitro* u ludzi wykorzystuje technikę ICSI. Stosuje się ją, gdy prowadzone wcześniej próby konwencjonalnego zapłodnienia pozaustrojowego zakończyły się niepowodzeniem. Często też jest metodą pierwszego wyboru, zwłaszcza, gdy badanie parametrów nasienia wskazuje na to, że szanse powodzenia standardowej procedury zapłodnienia pozaustrojowego są nikłe. Metoda ICSI pozwala też w razie konieczności na użycie do zapłodnienia plemników pobranych drogą biopsji z jąder pacjentów. U tych z nich, u których jako przyczynę bezpłodności stwierdza się zaburzenia spermiogenezy, czyli procesu, podczas którego spermatyda przekształca się w plemnik, przy zapłodnieniu mikrochirurgicznym możliwe jest użycie spermatyd, które także pobiera się z jąder. Procedura wstrzykiwania spermatyd do oocytu w celu przeprowadzenia zapłodnienia nosi nazwę ROSI (ang. round spermatid injection).

Podsumowując, szybki rozwój badań nad reprodukcją i rozwojem zwierząt, a w tym i człowieka, którego świadkami byliśmy zwłaszcza w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, zrewolucjonizował to, jak widzimy rozwój naszego gatunku. Opracowano techniki, które często umożliwiają przezwyciężenie przyczyn życiowej tragedii, którą bez wątpliwości dla większości ludzi jest konstatacja własnej niepłodności. Z drugiej strony, techniki te pozwalają na dalszy rozwój badań nad fizjologią rozrodu i reprodukcji u naszego gatunku oraz u innych zwierząt.

Uprawniona wydaje się tu również szersza konkluzja, że dziedzina biomedycyny poświęcona mechanizmom rozrodu i rozwoju wyraźnie pokazuje, jak z pracami aplikacyjnymi nierozłącznie związane są badania podstawowe. To, że tylko taki rozwój nauki i technologii jest skuteczny, udowadniają miliony ludzi na świecie, których marzenie o posiadaniu potomstwa spełniło się w dużej mierze dzięki wysiłkom kilku pionierów medycyny reprodukcyjnej. Kilkadziesiąt lat temu prowadzili oni badania, wydające się w owym czasie bardzo dalekimi od związku z realnymi

problemami człowieka, a przez niektórych osądzone nawet jako wątpliwe etycznie i nie zasługujące na finansowanie. Po upływie tych lat komitet przyznający Nagrodę Nobla stwierdził, że ponieważ nagroda ta zgodnie z wolą jej fundatora należy się tym, których

prace przyniosły ludzkości największy pożytek, to uzasadnionym jest, by właśnie z tego względu została ona przyznana za tak znaczące osiągnięcie w badaniach rozrodu człowieka, jakim było opracowanie metody zapłodnienia pozaustrojowego.

ZAPŁODNIENIE I ZAPŁODNIENIE *IN VITRO*

Streszczenie

Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w roku 2010 przyznana została Robertowi G. Edwardsowi za opracowanie skutecznej metody zapłodnienia pozaustrojowego u człowieka. Zwieńczeniem wieloletnich badań, prowadzonych przez Edwardsa nad fizjologią rozrodu naszego gatunku, było przyjscie na świat w dniu 25 lipca 1978 roku pierwszego dziecka, którego rozwój zapoczątkowany został poza organizmem matki, w wyniku zapłodnienia *in vitro*. Zanim stało się to możliwe, koniecznym było dokonanie szeregu odkryć i opracowanie wielu metod wspomagania rozrodu. Jako jedno z najważniejszych wskazać można odkrycie zjawiska kapacytacji plemników i znalezienie metod przeprowadzania tego procesu *in vitro*. Od dnia, w którym

prace w tej dziedzinie po raz pierwszy zakończyły się sukcesem, prawie 4 miliony dzieci urodziły się na świecie w wyniku stosowania zapłodnienia pozaustrojowego. Kolejnym wielkim przełomem w w medycynie reprodukcyjnej człowieka było zastosowanie techniki ICSI, w której plemnik jest wstrzykiwany mikrochirurgicznie do cytoplazmy oocyty. Dzięki tej metodzie możliwym stało się przezwyciężenie niepłodności wielu typów, także takich, które nie pozwalały na zastosowanie klasycznego zapłodnienia *in vitro*. Zapłodnienie pozaustrojowe dramatycznie zmieniło oblicze medycyny rozrodu. Techniki opracowane dla jej potrzeb okazały się być także bardzo przydatne w badaniach naukowych nad rozrodem i rozwojem człowieka oraz innych gatunków.

FERTILIZATION AND FERTILIZATION *IN VITRO* 2010 NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE

Summary

Nobel Prize in Physiology or Medicine 2010 was awarded to Robert G. Edwards for the development of *in vitro* fertilization. His research in the field of human reproduction culminated in success on 25 July, 1978, when the first child conceived through IVF (*in vitro* fertilization) was born. Several technical advances and discoveries were required before successful human IVF could be achieved, one of them was the ability to capacitate human sperm *in vitro*. Since then almost 4 million babies have been

born due to human IVF. The development of intracytoplasmic sperm injection (ICSI), in which single spermatozoon is injected into the cytoplasm of the oocyte, was a technological breakthrough, which makes possible to treat many types of infertility. Human IVF has radically changed the field of reproductive medicine. Techniques of artificial reproduction were also important in advancement of our knowledge on reproductive physiology and development of the man and other animals.

LITERATURA

- AJDUK A., 2007. *Rola jonów wapnia w aktywacji rozwoju zarodkowego ssaków*. Post. Biol. Kom. 34, 715–729.
- AJDUK A., MAŁAGOCKI A., MALESZEWSKI M., 2008. *Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca²⁺ oscillations*. Reprod. Biol. 8, 3–22.
- BORSUK E., CIEMERYCH M. A., OŹDŻEŃSKI W., 2007. *Rozwój ssaków – mysz*. [W:] *Ćwiczenia z biologii rozwoju zwierząt*. MALESZEWSKI M. (red.). Wydawnictwa Naukowe Uniwersytetu Warszawskiego.
- CHANG M. C., 1959. *Fertilization of rabbit ova in vitro*. Nature 184, 466–467.
- IKAWA M., INOUE N., BENHAM A., OKABE M., 2010. *Fertilization: a sperm journey to and interaction with the oocyte*. J. Clin. Invest. 120, 984–994.
- EDWARDS R. G., BAVISTER B. D., STEPTOE P. C., 1968. *Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro*. Nature 221, 632–635.
- KIMURA Y., YANAGIMACHI R., 1995. *Intracytoplasmic sperm injection in the mouse*. Biol. Reprod. 52, 709–720.
- MALESZEWSKI M., 1998. *Zastosowanie metod wspomaganych zapłodnienia w badaniach rozrodu ssaków*. Kosmos 1998, 201–208.
- MALESZEWSKI M., 2002. *Zapłodnienie i początek rozwoju organizmu*. [W:] *Molekularne podstawy embriogenezy*. KRZANOWSKA H., SOKÓŁ-MISIAK W. (red.). PWN, Warszawa, 203–226.
- MEGLICKI M., 2010. *Niepłodność u człowieka: przyczyny i metody leczenia wykorzystujące zapłodnienie pozaustrojowe*. Biologia w Szkole 6, 5–17.

- PALERMO G., DEVROEY H. J. P., VAN STEIRTEGHEM A. C., 1992. *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. Lancet 340, 17-18.
- STEPTOE P. G., EDWARDS R. G., 1978. *Birth after the reimplantation of a human embryo*. Lancet 2, 366.
- SUAREZ S. S., PACEY A. A., 2006. *Sperm transport in the female reproductive tract*. Hum. Reprod. Update 12, 23-37.
- SZCZYGIEL M., MALESZEWSKI M., KURPISZ M., 2002. *Molekularne podstawy interakcji pomiędzy plemnikiem a komórką jajową*. [W:] *Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych zwierząt*. KURPISZ M. (red.). Termedia, Poznań, 205-214.
- UEHARA T., YANAGIMACHI R., 1976. *Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm into male pronuclei*. Biol. Reprod. 15, 467-470.
- YANAGIMACHI R. 1994. *Mammalian fertilization*. [W:] *The Physiology of Reproduction, Second Edition*. KNOBIL E., NEILL J. D. (red.). Raven Press Ltd., New York, 189-317.
- YANAGIMACHI R. 2005. *Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals*. Reprod. Biomed. Online 10, 247-288.
- YANAGIMACHI R., CHANG M.C., 1963. *Fertilization of hamster eggs in vitro*. Nature 200, 281-282.