

Uvid u molekularne mehanizme tijekom oplodnje u sisavaca

Rajić, Ena

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:558043>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ena Rajić

**Uvid u molekularne mehanizme tijekom
oplodnje u sisavaca**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ena Rajić

**Insight into molecular events during
mammalian fertilisation**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu Sveučilišnog prijediplomskog studija Molekularne biologije na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Romane Gračan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Uvid u molekularne mehanizme tijekom oplodnje u sisavaca

Ena Rajić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tijekom oplodnje, spajanjem spermija i jajne stanice, nastaje diploidna zigota iz koje kreće razvitak cijeloga organizma. Uspješnost oplodnje osigurava kapacitacija tj. sazrijevanje spermija unutar ženskog spolnog sustava. Zahvaljujući ulasku HCO_3^- i Ca^{2+} te izlasku H^+ iona iz glave spermija te djelovanju progesterona dolazi do povišenja unutarstaničnog pH i hiperaktivacije spermija koja omogućuje prodor spermija do jajne stanice. Navođenju spermija potpomažu estrogeni koji uzrokuju pasivno kretanje spermija te kemotaksija, termotaksija i reotaksija – procesi koji su na molekularnoj razini povezani s povišenjem unutarstanične koncentracije Ca^{2+} spermija. Nakon približavanja gameta u jajovodu, dolazi do interakcije između SED-1 receptora na glavi spermija i zone pellucide što omogućuje vezanje ZP3 glikoproteina na $\beta 1,4$ -galactoziltransferazu-I spermija. Ova interakcija uzrokuje akrosomsku reakciju kojom se razgrađuje zona pellucida i omogućuje približavanje membrana oocite i spermija. U adheziji staničnih membrana važna je interakcija IZUMO1 (na glavi spermija) i Juno proteina (na oociti), dok proteini koji sudjeluju u fuziji staničnih membrana još uvijek nisu poznati. Također, tijekom oplodnje, povišenje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} uzrokuje kortikalnu reakciju. Njome dolazi do stvaranje fertilizacijske membrane te oslobađanja enzima ovastacina čijim djelovanjem dolazi do promjene strukture ZP2 glikoproteina, otvrdnuća zone pellucide i sprječavanja polispermije.

Ključne riječi: kapacitacija, akrosomska reakcija, kemotaksija, termotaksija, reotaksija, kortikalna reakcija
(29 stranica, 13 slika, 34 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv.prof.dr.sc. Romana Gračan

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Insight into molecular events during mammalian fertilisation

Ena Rajić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

During fertilisation, the fusion of the sperm and ovum forms a diploid zygote, marking the beginning of the organism's development. The success of fertilisation is ensured by capacitation, the maturation of sperm within the female reproductive system. The entry of HCO_3^- and Ca^{2+} and the exit of H^+ ions from the head of the sperm, as well as the effects of progesterone, all cause an increase in the intracellular pH and hyperactivation of the sperm, which facilitates its penetration toward the ovum. Sperm guidance within the female reproductive system is aided by estrogens, which promote passive movement, as well as chemotaxis, thermotaxis and rheotaxis - processes that are all dependent on the increase in sperm intracellular Ca^{2+} concentration. When the gametes meet in the oviduct, the interaction between the SED-1 receptor on the sperm head and the zona pellucida enables the binding of the ZP3 glycoprotein to β 1,4-galactosyltransferase-I on the sperm. This interaction triggers the acrosomal reaction, which dissolves zona pellucida. The adhesion of the cell membranes depends on the interaction of IZUMO1 (on the sperm head) and Juno protein (on the oocyte), while the proteins involved in their fusion are still unknown. The increase in intracellular Ca^{2+} concentration during fertilisation causes a cortical reaction, leading to the formation of a fertilisation membrane and the release of the enzyme ovastacin. Ovastacin alters the structure of the ZP2 glycoprotein, hardening the zona pellucida and preventing polyspermy.

Keywords: capacitation, acrosomal reaction, chemotaxis, thermotaxis, rheotaxis, cortical reaction

(29 pages, 13 figures, 34 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc.Prof. Romana Gračan, PhD

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. RAZVOJ JAJNE STANICE I NJEZINA GRAĐA.....	2
3. RAZVOJ ZRELIH SPERMIJA I NJIHOVA GRAĐA.....	4
4. NAVODENJE SPERMIJA U ŽENSKOM SPOLNOM SUSTAVU.....	7
4.1 Kemotaksija.....	7
4.2 Termotaksija.....	10
4.3 Reotaksija.....	12
4.4 Ženski spolni hormoni.....	13
5. KAPACITACIJA.....	14
6. AKROSOMSKA REAKCIJA.....	17
7. FUZIJA MEMBRANE JAJNE STANICE I SPERMIJA.....	20
7.1 Kortikalna reakcija i stvaranje fertilizacijske membrane.....	20
7.2 Promjena strukture ZP2 glikoproteina	22
8. ZAKLJUČAK.....	24
9. LITERATURA.....	26
10. ŽIVOTOPIS.....	29

1. UVOD

Jednostavno govoreći, oplodnja je spajanje muške i ženske gamete. To je proces kojim iz dvije haploidne stanice nastaje diploidna zigota – stanica iz koje će se daljnjim razvojem razviti cijeli organizam. Uspješna oplodnja je osnova razmnožavanja svih organizama koji se razmnožavaju spolno (Austin, 1977) pa tako i sisavaca, a izmjena genetičkog materijala između spermija i jajne stanice osigurava stvaranje novih genskih kombinacija bitnih za evoluciju. S druge strane, sagledavajući oplodnju iz perspektive molekularne biologije, ona predstavlja puno kompleksniji proces. Podrazumijeva splet preciznih i vrlo dobro reguliranih interakcija između spermija i jajne stanice (Austin, 1977) koje spermiju osiguravaju uspješan pronalazak jajne stanice i naposljetku fuziju s njome.

Osnova za oplodnju je ovulacija tj. ispuštanje jajne stanice, točnije sekundarne oocite, u jajovod (Guyton i Hall 2017). Oocita putuje jajovodom do ampularnog dijela, tamo se spaja s spermijem i nakon oplodnje prelazi u maternicu gdje se zigota implantira i kreće razvijati.

Spermiji sisavaca u ženski spolni sustav ulaze tijekom spolnoga čina, ejakulacijom. Ispušta ih se na milijune, no njihov broj se prolaskom kroz ženski spolni sustav postupno smanjuje i na kraju je za oplodnju potreban samo jedan. Na svome putu prema jajovodu tj. mjestu oplodnje, spermiji se u ženskom spolnom sustavu usmjeravaju posebnim mehanizmima navođenja (Eisenbach i Giojalas 2006), ali isto tako i dodatno sazrijevaju kako bi stekli sposobnost oplodivanja jajne stanice. Sazrijevanje spermija u ženskom spolnom sustavu naziva se još i kapacitacija (Ickowicz i sur. 2012).

Kako bi se zreli spermiji uspjeli spojiti sa oocitom, potreban je niz koraka. Prvo, spermij mora doći do zaštitnih ovojnica oocite i razgraditi ih kako bi mu se omogućio pristup membrani oocite. Ovaj korak je poznat kao akrosomska reakcija (Georgadaki i sur. 2016). Zatim, spermij se posebnim receptorima mora spojiti na membranu oocite te se njihove membrane moraju fuzionirati. Naposljetku, mora doći do fuzije jezgara i izmjene genetičkog materijala. U svakom od ovih koraka sudjeluje cijeli niz proteina i razni signalni putevi koji rade zajedno kako bi se osigurala fina regulacija i uspješnost oplodnje. Također, istovremeno s ulaskom spermija u jajnu stanicu, pobuđuju se posebni mehanizmi zaštite kojima se osigurava da jajnu stanicu oplodi samo jedan spermij. Upravo zbog ovoga, velikog broja mehanizama i uključenih proteina, mnogi koraci oplodnje u sisavaca su i dalje velika nepoznanica i biti će potrebna još mnoga istraživanja kako bi se stekao cjeloviti uvid u ovaj važan i fascinantno proces. Ovaj rad

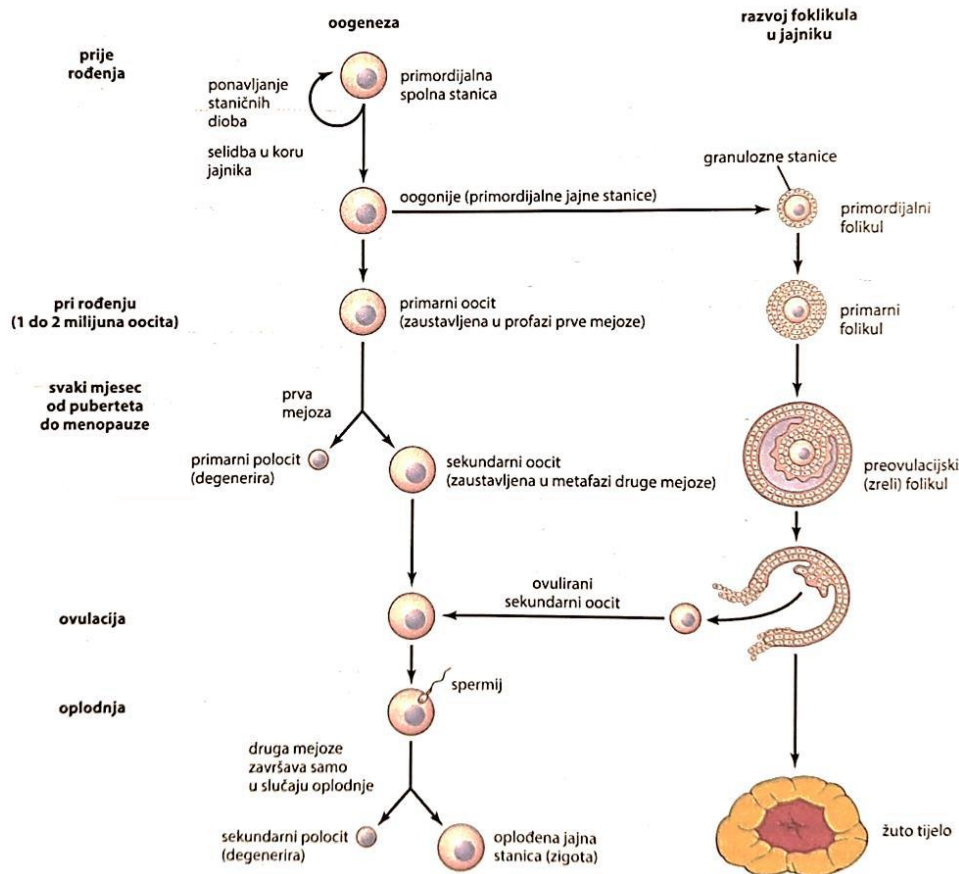
nudi detaljan pregled svih dosadašnjih saznanja o molekularnim mehanizmima koji stoje iza oplodnje u sisavaca.

2. RAZVOJ JAJNE STANICE I NJEZINA GRADA

Razvoj ženske spolne stanice, jajne stanice, kreće za vrijeme embrionalnog razvitka fetusa, a traje sve do same oplodnje. Proces sazrijevanja jajne stanice naziva se oogeneza i odvija se u jajniku, unutar jajnih folikula.

Razvoj jajnih stanica započinje kada spolne prastanice tijekom ranog embrionalnog perioda migriraju u koru jajnika koji se razvija i postaju oogonije. Daljnjim razvitkom vezivnog tkiva embrionalnog jajnika stvaraju se nove stanice koje su epitelnog karaktera i koje obaviju oogoniju, a nazivaju se granulosa (folikularne) stanice. Oogonija okružena jednim slojem granulosa stanica naziva se još i primordijalni folikul te predstavlja prvi razvojni oblik jajnih folikula (Guyton i Hall 2017).

Oogonije se do petog mjeseca fetalnog života dijele mitozom, stvaraju i povećavaju broj primarnih oocita koje onda zajedno s više slojeva folikularnih stanica sačinjavaju primarne folikule. Nakon petog mjeseca fetalnog života oogonije prestaju s mitotičkim diobama i od tada nadalje nema nastajanja novih primarnih oocita. Stoga se žensko dijete rodi s onoliko primarnih oocita koliko ih je do tada nastalo i njihov broj se ne povećava s godinama života djeteta. Primarne oocite koje jesu nastale, prije samog rođenja, ulaze u prvu mejotičku diobu koja se zaustavlja u profazi. Dioba se nastavlja nakon rođenja tj. tijekom puberteta pri čemu od primarne oocite nastaju dvije stanice sa haploidnim brojem kromosoma – velika sekundarna oocita i manja primarna polocita. Primarna polocita najčešće brzo propadne, dok sekundarna oocita ulazi dalje u drugu mejotičku diobu koja se zaustavlja u metafazi II. Sekundarna se oocita prije ovulacije nalazi unutar preovulacijskog folikula koji onda tijekom ovulacije pukne i otpusti ju u jajovod. Nakon ovulacije i ako dođe do oplodnje, nastavlja se druga mejotička dioba (Guyton i Hall 2017). Oogeneza i svi navedeni razvojni oblici folikula prikazani su na Slici 1.

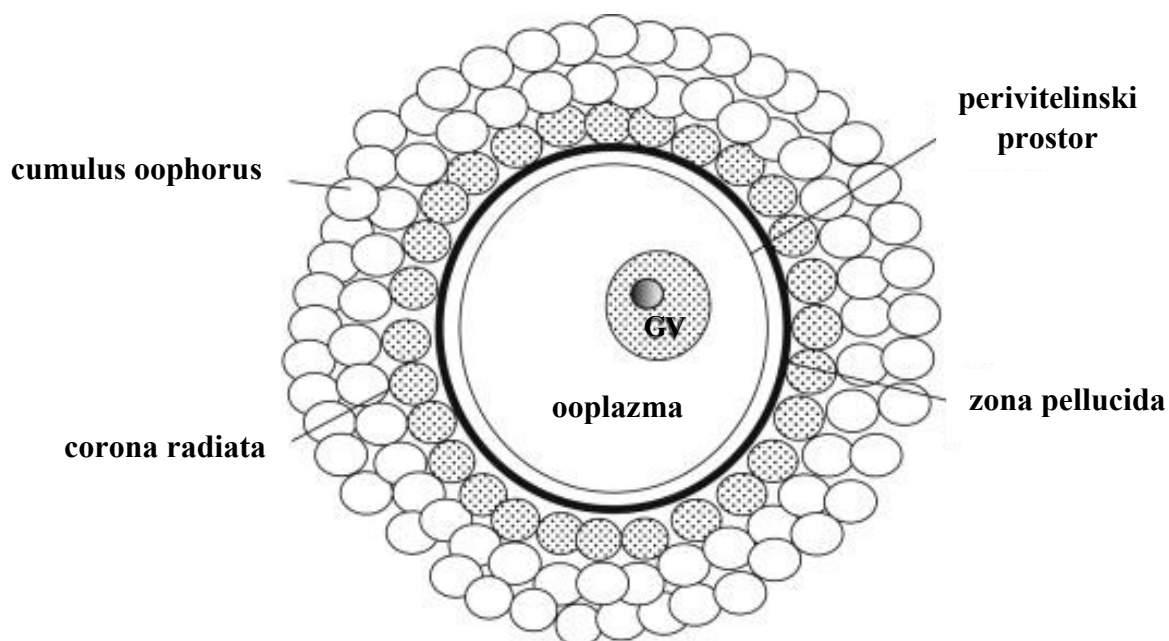


Slika 1: Oogeneza i svi razvojni oblici jajnih folikula do ovulacije. Preuzeto iz (Guyton i Hall 2017).

Stoga, ovulacijom u jajvod ulazi haploidna sekundarna oocita kojoj je mejoza zaustavljena u metafazi II i koja je obavijena s više ovojnica.

Staničnu membranu sekundarne oocite izvana obavija izvanstanični matriks koji se zbog svoje prozirnosti još naziva i zona pellucida (lat. pellucida, hrv. transparentno), a u svome sastavu sadržava različite glikoproteine (Georgadaki i sur. 2016). Neki od tih glikoproteina, kao što su dobro proučavani ZP-1, ZP-2, i ZP-3, važni su za međusobno prepoznavanje spermija i jajne stanice prije oplodnje (Gupta 2021). Zonu pellucidu izvana obavija sloj folikularnih stanica koji se naziva cumulus oophorus. Ova struktura važna je u podupiranju oplodnje (Georgadaki i sur. 2016). Unutarnji sloj cumulus-a oophorusa tj. sloj koji je najbliži zoni pellucidi naziva se corona radiata (Sadler 2008).

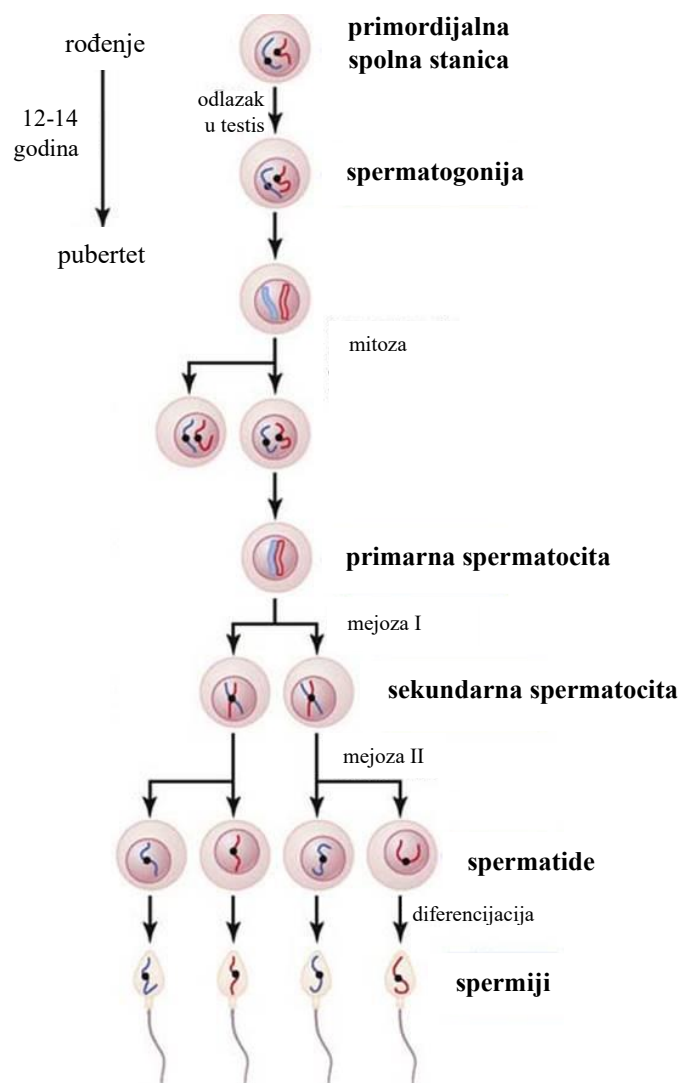
Struktura sekundarne oocite i njezinih ovojnica neposredno nakon ovulacije prikazana je na Slici 2.



Slika 2: Izgled sekundarne oocite i njezinih ovojnica neposredno nakon ovulacije. Staničnu membranu sekundarne oocite okružuje zona pellucida. Između stanične membrane sekundarne oocite i zone pellucide nalazi se perivitelinski prostor. Zonu pellucidu izvana okružuje sloj folikularnih stanica koji se naziva cumulus oophorus, a dio tih stanica koji je najbliži zoni pellucidi naziva se corona radiata. Ooplazma je citoplazma jajne stanice, a GV označava vidljivu jezgru. Preuzeto i prilagođeno prema (Cuasnicú i sur. 2018).

3. RAZVOJ ZRELIH SPERMIJA I NJIHOVA GRADA

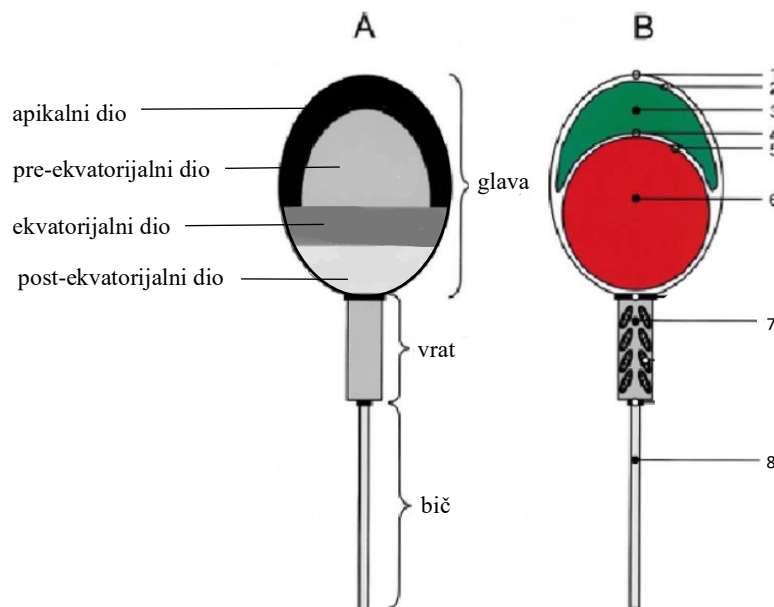
Razvoj muške spolne stanice, spermija, kreće kada i razvoj ženske spolne stanice tj. za vrijeme embrionalnog razvitka fetusa kada spolne prastanice odlaze u razvijajuće testise i postaju spermatogonije. Za razliku od oogonija, spermatogonije svoj razvoj nastavljaju i dovršavaju tijekom puberteta (najčešće u dobi između 12 do 14 godina). Od spermatogonije mitotičkim diobama nastaju primarne spermatocite od kojih prvom mejotičkom diobom nastaju sekundarne spermatocite. One se podijele drugom mejotičkom diobom i stvaraju spermatide koje se diferencijacijom i izduživanjem pretvaraju u spermije (Guyton i Hall 2017). Spermatogeneza i svi razvojni oblici spermija u testisima prikazani su na Slici 3.



Slika 3: Spermatogeneza i razvojni oblici spermija u testisima. Razvoj spermatogonije kod muškaraca kreće u pubertetu kada se spermatogonija mitozom podijeli na dvije primarne spermatocite. Primarna spermatocita se dalje dijeli mejozom pri čemu nakon prve mejotičke diobe nastaju sekundarne spermatocite, a nakon druge mejotičke diobe nastaju spermatide. Daljnjom diferencijacijom i izduživanjem spermatide se razvijaju u spermije. Preuzeto i prilagođeno prema (Guyton i Hall 2017).

Razvijeni spermij sastoji se od tri glavna dijela: glave, vrata i repa. Glava spermija može se podijeliti na četiri dijela: apikalni, pre-ekvatorijalni, ekvatorijalni i post-ekvatorijalni. Glavninu citoplazme glave zauzimaju kondenzirana haploidna jezgra te akrosom koji se nalazi apikalno od nje. Akrosom ili akrosomski mjehurić sadrži brojne hidrolitičke enzime i obavljen je

vlastitom membranom. Dio membrane akrosoma koji se nalazi uz jezgru naziva se unutarnja membrana akrosoma, a dio membrane bliže vrhu glave spermija naziva se vanjska membrana akrosoma. Važnost hidrolitičkih enzima akrosoma je u tome što omogućuju razgradnju zone pellucide i prodor glave spermija prema membrani jajne stanice (Flesch i Gadella 2000). Detaljni prikaz dijelova glave i položaj njezinih sastavnica prikazan je na Slici 4.



Slika 4: Prikaz zrelog spermija i položaj njegovih unutarstaničnih dijelova. **(A)** Glava spermija se može podijeliti na četiri dijela: apikalni, pre-ekvatorijalni, ekvatorijalni i post-ekvatorijalni. Na glavu spermija nastavlja se vrat pa onda rep. **(B)** 1 - stanična membrana, 2 - vanjska membrana akrosoma, 3 - akrosom, 4 - unutarnja membrana akrosoma, 5 - jezgrina membrana, 6 - jezgra, 7 - vrat spermija, 8 - rep ili bič spermija. Preuzeto i prilagođeno prema (Flesch i Gadella 2000)

Na glavu spermija nastavlja se vrat. On je bogat staničnim elementima kao što su mikrotubuli i centrioli, ali također i mitohondrijima koji služe kao izvor energije za pokretanje spermija (Georgadaki i sur. 2016).

Naposlijetku, na vrat spermija nastavlja se rep. Rep spermija još se naziva i bičem te se sastoji od središnjeg skeleta sastavljen od 11 mikrotubula koji se zajedničkim imenom nazivaju aksonema i tanke stanišne membrane, koja obavija aksonemu (Guyton i Hall 2017). Uloga repa je ta što svojim gibanjem omogućuje pokretanje spermija.

Unatoč tome što spermiji iz sjemenih kanalića testisa izlaze zreli, oni svoju pokretljivost stječu tek dolaskom u dosjemenik. Uz stjecanje pokretljivosti, u dosjemeniku spermiji podliježu

i drugim promjenama kao što su dodatna kondenzacija DNA, smanjenje veličine glave spermija i ulaganje dodatnih glikoproteina u sastav njihove membrane (Georgadaki i sur. 2016).

4. NAVODENJE SPERMIJA U ŽENSKOM SPOLNOM SUSTAVU

Zreli i pokretni spermiji u ženski spolni sustav ulaze tijekom spolnog čina, ejakulacijom. Unatoč tome što je za oplodnju jajne stanice potreban samo jedan spermij, tijekom ejakulacije ispuštaju se milijuni (Guyton i Hall 2017). Iako se na putu prema oociti tj. putovanjem kroz ženski spolni sustav taj broj postupno smanjuje i mnogi spermiji odumru, postoje različiti mehanizmi zaštite i navođenja koji na kraju ipak omogućuje nekolicini spermija uspješan pronalazak jajne stanice.

Prvo, dolaskom u ženski spolni sustav, spermiji se susreću s njegovom vrlo niskom pH vrijednosti koja kod ljudi iznosi između 4,0 i 4,9 (Mishra i sur. 2018). Ova kiselost prvenstveno ima zaštitnu ulogu, onemogućuje rast mnogih štetnih mikroorganizama i sprječava nastajanje infekcija, no štetno djeluje i na spermije. Zbog toga su spermiji u ejakulatu okruženi sjemenom tekućinom koja ima zaštitna svojstva i čiji lužnati pH neutralizira kiselost ženskog spolnog sustava (Guyton i Hall 2017).

Nadalje, dugo se mislilo da se spermiji u ženskom spolnom sustavu kod sisavaca kreću bez usmjeravanja te da je putovanje do oocite kao utrka do cilja, no danas se zna da to nije tako i objašnjena su tri bitna mehanizma navođenja spermija: kemotaksija, termotaksija i reotaksija.

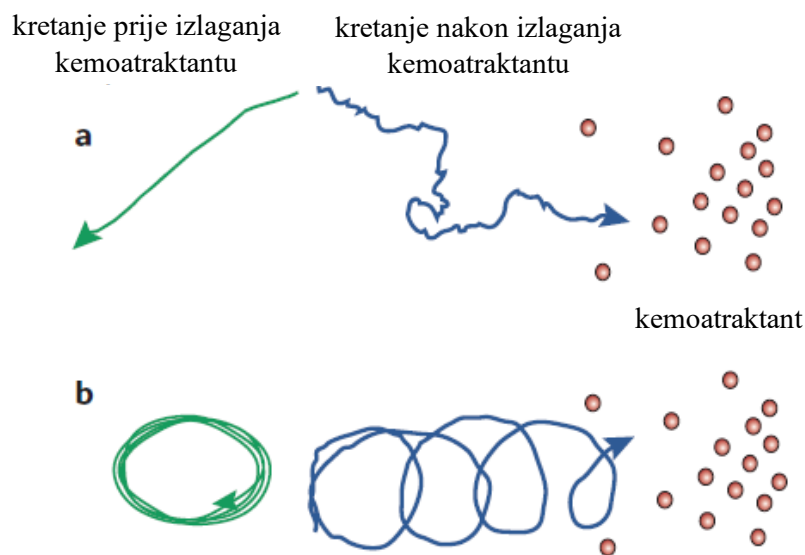
4.1 Kemotaksija

Kemoatraktant je naziv za molekulu koja privlači određene stanice. Posljedično, kemotaksija je pojam koji opisuje kretanje stanica u smjeru gradijenta kemoatraktanta (Eisenbach i Giojalas 2006).

Važnost kemotaksije u navođenju spermija kod sisavaca prepoznata je relativno nedavno, unatoč tome što je kod morskih vrsta fenomen uočen već tijekom 1960-tih (Eisenbach i Giojalas 2006). Razlog je bio u tome što je u eksperimentima sa spermijima sisavaca, za razliku od spermija morskih organizama, samo mali broj spermija odgovarao na kemotaktičke signale što je značajno otežalo uočavanje važnosti ovog mehanizma navođenja kod sisavaca. Danas se zna da je razlog za smanjeni odgovor spermija bio taj što da bi spermij reagirao na kemotaktički

podražaj, on mora dodatno sazrijeti unutar ženskog spolnog sustava tj. proći proces kapacitacije (vidi sljedeći odlomak). Dokaz za ovo su istraživanja koja su pokazala da odstranjivanjem kapacitiranih spermija iz uzorka spermija dolazi do potpunog gubitka kemotaksije (Eisenbach 1999).

Kao što je već rečeno, kemotaksija je najviše istraživana na beskralježnjacima te su zbog toga upravo na takvim modelima doneseni zaključci pomoću kojih se ovaj mehanizam navođenja također pokušava objasniti i kod sisavaca. Na slatkovodnim i morskim beskralježnjacima pokazano je da postoji više mogućih odgovora stanica na kemoatraktant, a vrsta odgovora ovisi o različitom načinu kretanja spermija prije izlaganja kemoatraktantu. Zbog toga, spermiji su podijeljeni u dvije kategorije. U prvu kategoriju pripadaju spermiji koji plivaju u ravnim linijama, a prilikom izlaganja kemoatraktantu putanja kretanja im se naglo promjeni prema izvoru kemoatraktanta. U drugu kategoriju spadaju spermiji koji se tijekom normalnih uvjeta kreću u krugovima, a kada se izlože kemoatraktantu putanja im poprimi spiralni oblik prema izvoru kemoatraktanta. Ova dva različita, a dobro istražena odgovora na kemoatraktant, prikazani su na Slici 5.



Slika 5: Ilustrativni prikaz dva moguća načina reakcije spermija na kemoatraktant. Vrsta odgovora ovisi o različitom načinu kretanja spermija prije izlaganja kemoatraktantu. Zelenom i plavom bojom prikazane su putanje kretanja spermija prije i poslije izlaganja kemoatraktantu. Crvene kuglice predstavljaju kemoatraktant. **(a)** Spermiji koji prije izlaganja kemoatraktantu plivaju u ravnim linijama putanju naglo promijene prema izvoru kemoatraktanta. **(b)** Spermiji

koji se prije izlaganja kemoatraktantu kreću u krugovima, mijenjaju svoju putanju u spiralnu, također prema izvoru kemoatraktanta. Preuzeto i prilagođeno prema (Eisenbach i Giojalas 2006).

Za razliku od dobro proučavanih beskralježnjaka, jedino što se zna za sisavce je da njihovi spermiji obično plivaju ili u ravnim ili blago zakrivljenim linijama (Eisenbach i Giojalas 2006) te da se uvijek kreću prema izvoru kemoatraktanta (Yoshida i Yoshida 2011). Međutim, mehanizam promjene kretanja kao odgovora na kemoatraktant nije još detaljno istražen.

Za razliku od toga, nešto što je istraživano jest mjesto sekrecije i kemijska priroda kemoatraktanta. Pokazano je da se kemoatraktanti mogu izlučivati ili unutar jajnog folikula i prilikom ovulacije izbaciti u jajovod kao dio folikularne tekućine ili se sekretiraju nevezano za jajni folikul - unutar same oocite i stanica cumulus-a ophorusa oocite koja je već izbačena u jajovod (Eisenbach i Giojalas 2006). Tijekom godina predložene su mnoge molekule kao potencijalni kemoatraktanti u sisavcima, no jedini dokazani zasada je samo progesteron. On se sekretira i iz cumulus-a ophorusa, i iz folikularne tekućine. S druge strane, kemoatraktant/i koji se sekretira/ju iz same oocite još uvijek nisu identificirani.

Istraživanja kojima je progesteron dokazan kao kemoatraktant (Teves i sur. 2006) indiciraju da je vjerojatno jedan, od dosada pronađena dva receptora za progesteron na spermijima sisavaca, kemotaktički receptor. Međutim, modeli točnog prijenosa signala potaknutog progesteronom nisu jednoznačni i postoji više mišljenja. Neki znanstvenici smatraju da su u prijenos signala uključene cAMP ovisna i cGMP ovisne kinaze koje svojim djelovanjem potaknu ulaz Ca^{2+} iona u spermij (Teves i sur. 2009), dok drugi zagovaraju da progesteron direktno aktivira jedan specifičan kationski kanal koji se naziva, CatSper (eng. *Cation/Calcium Channel of Sperm*), bez podizanja unutarstanične koncentracije cAMP-a (Lishko i sur. 2011; Strünker i sur. 2011).

Unatoč razlikama u mišljenju vezano za točan mehanizam prijenosa signala, na molekularnoj razini spermija jesu zamijećene određene promjene inducirane u prisustvu progesterona, kao što su npr. depolarizacija stanične membrane spermija, povišenje unutarstanične pH vrijednosti i aktivacija određenih kinaza (Eisenbach i Giojalas 2006). No, zbog toga što progesteron ima važnu ulogu i u drugim dijelovima oplodnje kao što su hiperaktivacija spermija, kapacitacija i akrosomska reakcija, većina navedenih molekularnih promjena se povezuje s potonjim

procesima te još nije sigurno je li neka od gore navedenih molekularnih promjena povezana isključivo s kemotaktičkim odgovorom spermija na progesteron.

Zaključiti se može da postoji još mnogo prostora i potrebe za daljnjim istraživanjima ovog mehanizma usmjeravanja kod sisavaca s obzirom na veliki broj i dalje nedogovorenih pitanja.

4.2 Termotaksija

Termotaksija označava usmjereno kretanje spermija ovisno o temperaturnom gradijentu. Kod ljudi, spermiji se kreću prema višoj temperaturi (Eisenbach i Giojalas 2006).

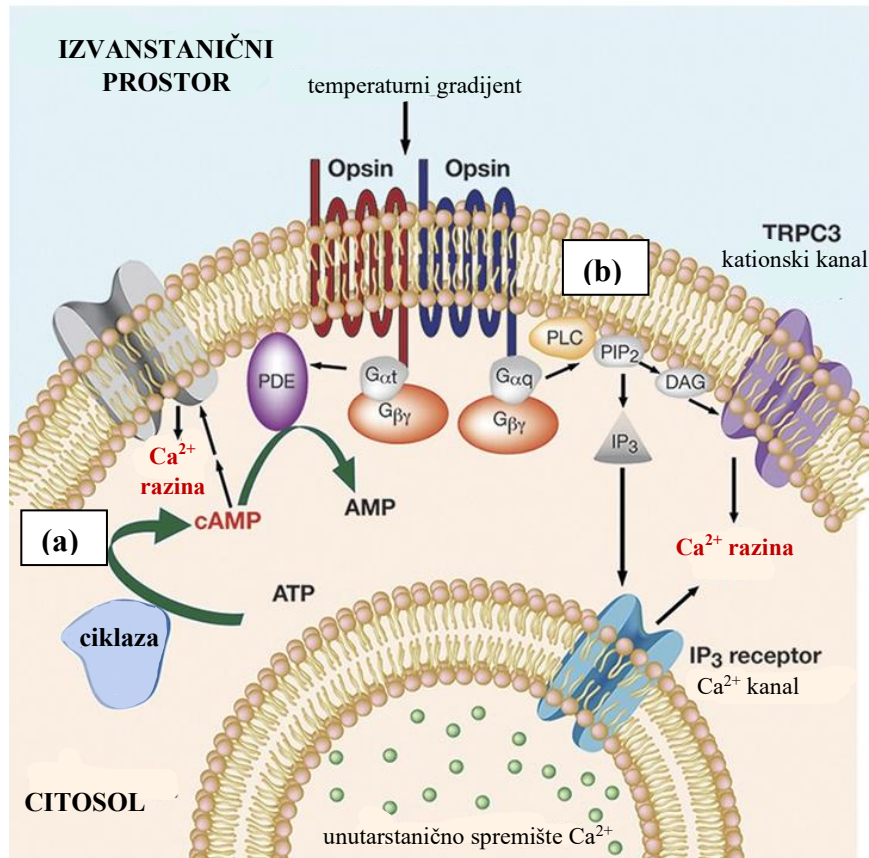
Mjesto oplodnje u jajovodu tj. ampularni dio jajovoda je kod nekih sisavaca dokazano 1- 2 °C topliji od početnog dijela tj. istmusa (Hunter i Nichol 1986) te se pomoću tog temperaturnog gradijenta spermiji usmjeravaju prema mjestu oplodnje. Prije ovulacije razlika u temperaturi iznosi 0,8 +/- 0,2°C, a nakon ovulacije se poveća i iznosi 1,6 +/- 0,1°C (Bahat i sur. 2005). Na taj način, ovulacijom se ženski spolni sustav priprema za ulazak spermija i oplodnju.

Za razliku od kemotaksije koja djeluje kao sustav navođenja pretežito kada se spermij i jajna stanica nalaze blizu (Suarez, 2015), termotaksija usmjerava spermije na dužem putu tj. na veće udaljenosti (Cerezales i sur. 2015). Kao i kod kemotaksije, smatra se da samo kapacitirani spermiji mogu reagirati termotaktički (Bahat i sur. 2003). Na molekularnoj razini, dokazano je da je termotaktički odgovor povezan s povišenjem unutarstanične koncentracije Ca²⁺ (Bahat i Eisenbach 2010).

Ono što je dugo bila velika nepoznanica u razumijevanju termotaksije kod sisavaca bila je kemijska struktura termoreceptora. Znalo se da na spermijima ne postoje klasični termoreceptori koje druge stanice koriste pa nije bilo jasno na koji način spermiji “osjećaju” promjene u temperaturi. No, današnja novija istraživanja su pronašla odgovor na to pitanje i ukazuju na to da termoreceptori spermija pripadaju skupini opsina (Pérez-Cerezales i sur. 2015). Opsini su inače poznatiji po svojoj ulozi u oku gdje djeluju kao fotoreceptori za vid te se dugo mislilo da im je to jedina funkcija. No, pronalazak svih 9 poznatih vrsta opsina u spermijima sisavaca ukazao je na nove funkcije ovih molekula i na njihovu važnost u termotaksiji.

Opsini inače pripadaju GPCR (eng. *G protein-coupled receptor*) obitelji receptora (Morra i sur. 2018), te nakon što registriraju promjene u temperaturi, aktiviraju puteve prijenosa signala

u spermiju. Do sada su u termotaksiji razjašnjena dva puta prijenosa signala kojima je krajnji cilj povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} . Signalni putevi i njihovi detaljniji opisi prikazani su na Slici 6.



Slika 6: Stanica spermija sisavca i prikaz dva puta prijenosa signala za koje se zna da su uključena u termotaksiju i da su povezana s opsinskim termoreceptorima. Cilj obaju signalnih puteva je povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} jer ona utječe na pokrete spermija i usmjeravanje njegova kretanje (Bahat i Eisenbach 2010). Opsinski termoreceptori su GCPR pa njihovim podraživanjem, kao kod svih GCPR-ova, dolazi do odvajanja alfa podjedinica G proteina i aktivacije nekog drugog proteina.

(a) Put prijenosa signala posredovan cikličkim nukleotidima.

Alfa podjedinica G proteina aktivira PDE (fosfodiesterazu) koja cAMP pretvara u AMP i na taj način smanjuje njegovu unutarstaničnu koncentraciju. cAMP u citoplazmi potiče ulazak Ca^{2+} iz izvanstanične tekućine, a stvara se iz ATP-a pomoću enzima ciklaze.

(b) Put prijenosa signala posredovan fosfolipazom C (PLC).

Alfa podjedinica G proteina aktivira PLC koja uzrokuje hidrolizu PIP2 (fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata) na IP3 (inozitol-1,4,5-trifosfat) i DAG (diacil-glicerol). DAG djeluje na TRPC3 (eng. *short transient receptor potential channel 3*) kationske kanale i uzrokuje ulazak izvanstaničnog Ca^{2+} , dok IP3 djeluje na IP3 receptor- Ca^{2+} kanale i uzrokuje otpuštanje Ca^{2+} iz unutarstaničnih odjeljaka.

(Sivom bojom su prikazane komponente signalnih puteva koje nisu još dokazane). Slika je preuzeta i prilagođena prema (Pérez-Cerezales i sur. 2015).

4.3 Reotaksija

Pozitivna reotaksija jedan je od novije otkrivenih mehanizama navođenja spermija sisavaca na veće udaljenosti, a podrazumijeva sposobnost spermija da se orijentira i pliva u suprotnom smjeru od onoga u kojem teče tekućina koja ga okružuje (Miki i Clapham 2013).

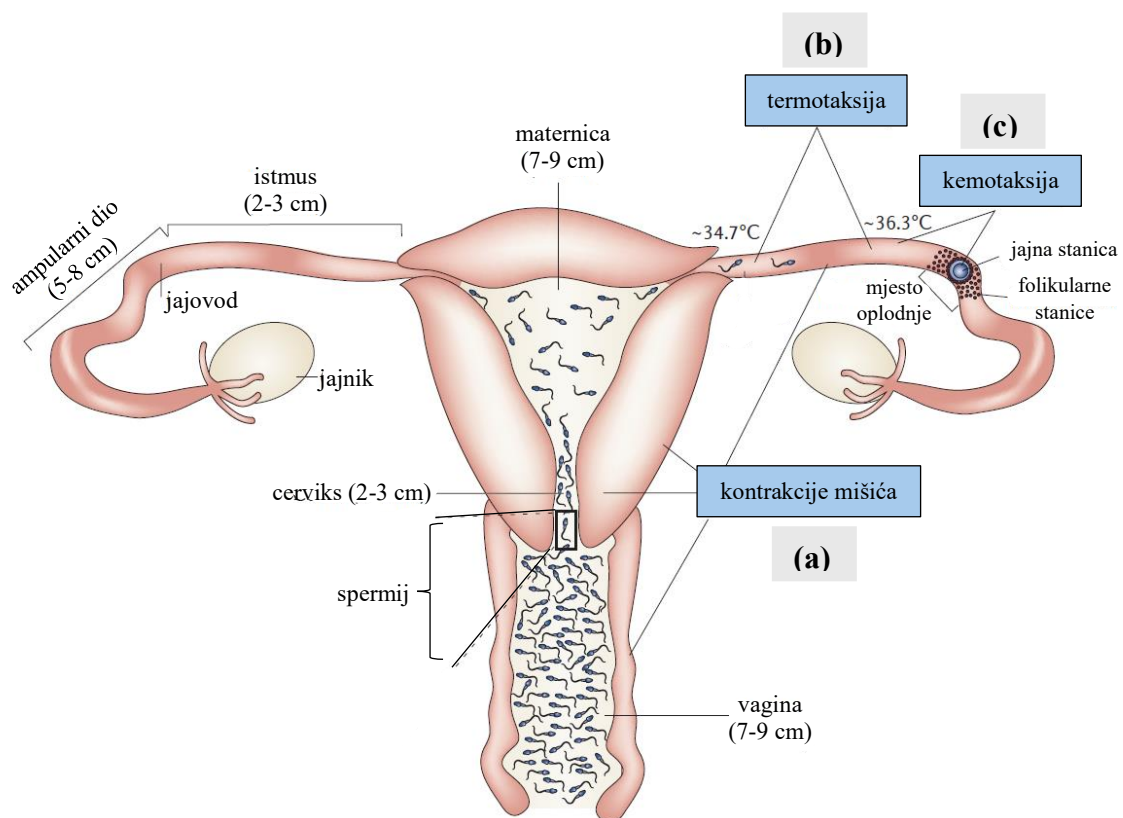
Pokazano je da se unutar četiri sata od spolnog odnosa inducira protok tekućine iz jajovoda prema maternici pod utjecajem hormona prolaktina. Prolaktin je jedan od hormona koji se oslobađa tijekom seksualnog uzbuđivanja te se smatra da on potiče sekreciju tekućine u jajovodu i stvara protok koji omogućuje usmjeravanje spermija prema jajovodu.

Za razliku od kemotaksije i termotaksije, reotaksija je moguća i kod nekapacitiranih i kod kapacitiranih spermija. Na molekularnoj razini reotaktički odgovor spermija povezuje se s CatSper kanalima i ulaskom Ca^{2+} iona. Iako u našem organizmu postoji mnogo vrsta kanala za Ca^{2+} , CatSper kanali su specifični i nalaze se isključivo na bičevima spermijima (Strünker i sur. 2011). Ulazak Ca^{2+} iona kroz ove kanale i povišenje njegove unutarstanične koncentracije uzrokuje hiperaktivnost spermija te mijenja njihovo kretanje iz cirkularno - planarnog u rotacijsko. Upravo se rotacijsko gibanje pokazalo nužnim za pravilni reotaktički odgovor spermija (Miki i Clapham 2013).

4.4 Ženski spolni hormoni

Uz sve već navedene mehanizme navođenja, bitno je spomenuti da u navođenju važnu ulogu ima i sami ženski spolni sustav. Ženski spolni hormoni, ponajviše estrogene, svojim djelovanjem utječu na aktivnost sekretornog epitela i kontraktilnost cerviksa, maternice te jajovoda (Georgadaki i sur. 2016). Poticanjem kontrakcija ovih dijelova i poticanjem pojačanog izlučivanja sluzi/mukoze, estrogene potpomažu pasivnom kretanju spermija kroz ženski spolni sustav. Također, hormon oksitocin, koji se oslobađa tijekom spolnog odnosa stimulacijom neurohipofize, ima slično djelovanje (Georgadaki i sur. 2016).

Na Slici 7. prikazan je ilustrativni sažetak svih spomenutih mehanizama navođenja spermija prema jajovodu i jajnoj stanici.



Slika 7: Prikaz putovanja spermija kroz ženski spolni sustav, uz istaknute mehanizme navođenja. Brojevi u zagradama označuju duljinu organa. **(a)** Ulaskom spermija u ženski spolni sustav, njihovo je kretanje potpomognuto kontrakcijama vagine, cerviksa, maternice i jajovoda. Kontraksije su uzrokovane ženskim spolnim hormonima, ponajviše estrogenima. **(b)** Dolaskom spermija u početni dio jajovoda tj. istmus spermiji pomoću opsinskih receptora na svojoj površini osjećaju temperaturni gradijent prisutan u jajovodu i zahvaljujući termotaksiji počinju

se kretati prema ampularnom dijelu jajovoda koji je 2 °C topliji od istmusa. (c) Na malim udaljenostima između spermija i jajne stanice, spermije kreće privlačiti kemoatraktant progesteron koji se izlučuje iz cumulus-a oophorusa i iz folikularne tekućine. Mehanizam kretanja spermija prema izvoru kemoatraktanta naziva se kemotaksija. U navođenju spermija prema jajnoj stanici važnu ulogu ima još i reotaksija, no ona nije prikazana na slici. Preuzeto i prilagođeno prema (Eisenbach i Giojalas 2006).

5. KAPACITACIJA

Kapacitacija označava proces sazrijevanja i aktivacije spermija unutar ženskog spolnog sustava (Georgadaki i sur. 2016). Proces je od ključne važnosti za uspješnu oplodnju jer njime spermiji dobivaju sposobnost prodiranja u sloj stanica cumulus-a oophorusa koji okružuje jajnu stanicu, sposobnost vezanja na odgovarajući receptor na jajnoj stanici te im omogućuje uspješnost akrosomske reakcije kojom se ostvaruje fuzija spermija i jajne stanice (Eisenbach i Giojalas 2006). Kapacitacija je vrlo dobro istražen proces i na molekularnoj razini, stoga se zna se da podrazumijeva promjene u koncentraciji iona, povišenje unutarstaničnog pH, hiperpolarizaciju stanične membrane te promjene obrazaca fosforilacije proteina (Delgado-Bermúdez i sur. 2022).

Iako su spermiji već u ejakulatu pokretni, oni nisu potpuno spremni za oploditi jajnu stanicu. Kako bi postali spremni za oplodnju i kako bi mogli probiti gusti sloj stanica koje okružuju jajnu stanicu, potrebno ih je hiperaktivirati. Hiperaktivacija podrazumijeva „kretanje koje je karakterizirano povećanim brzinom, smanjenom linearnosti, povećanom amplitudom bočnih pomaka glave i naglim pokretima biča naprijed-nazad“ (Eisenbach i Giojalas 2006). Ovo je jedan od ključnih koraka kapacitacije i izravno je povezan s povišenjem unutarstanične pH vrijednosti spermija (Delgado-Bermúdez i sur. 2022).

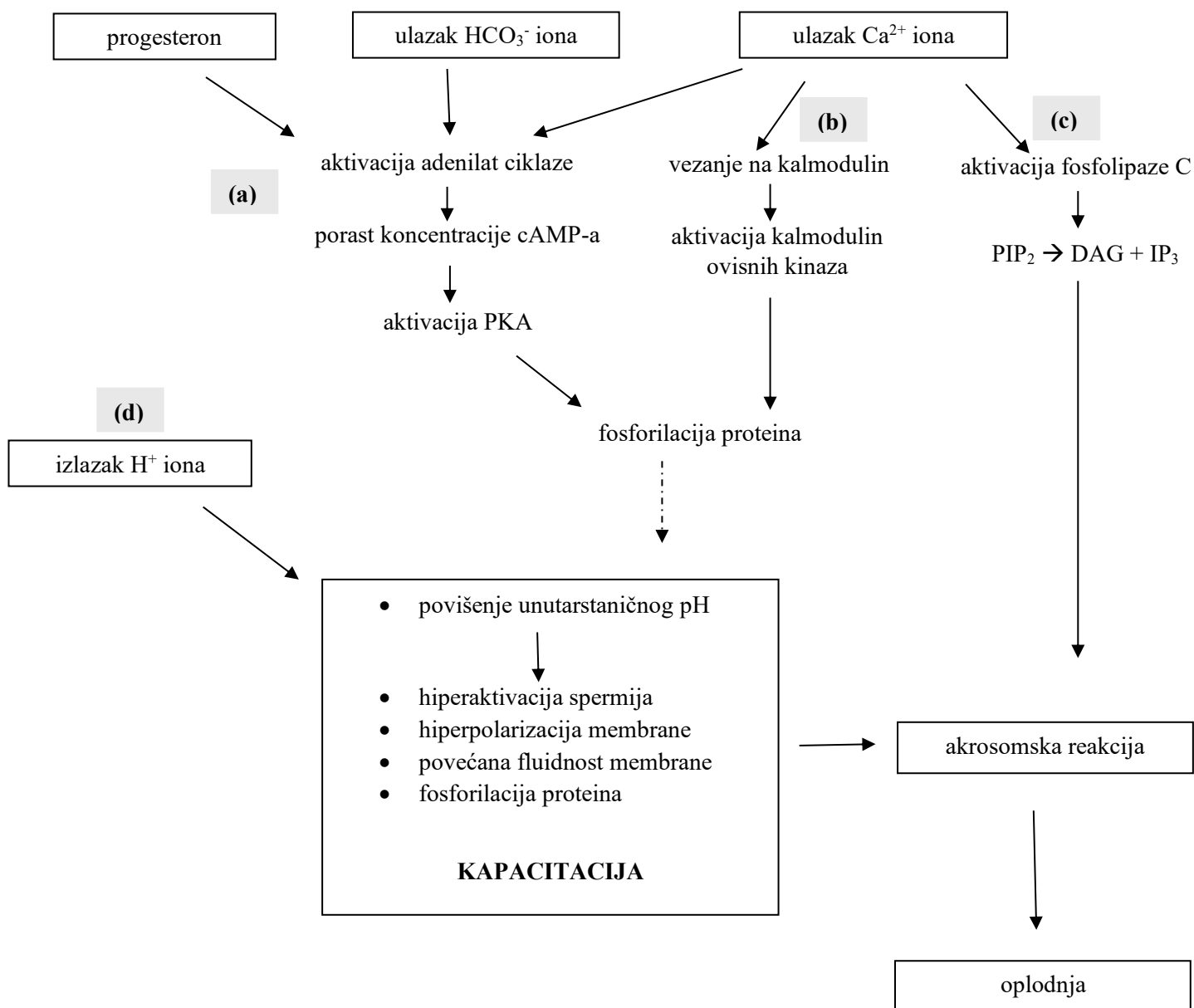
Za uspješnu hiperaktivaciju i povišenje unutarstanične pH vrijednosti nužan je protok iona, ponajviše Ca^{2+} i HCO_3^- iona (Delgado-Bermúdez i sur. 2022). Oba iona sudjeluju u aktivaciji adenilat ciklaze koja povisuje unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a koji onda aktivira protein kinazu A (PKA signalni put). Zatim, PKA aktivira različite fosforilacijske kaskade koje uzrokuju mnoge od već prije nabrojanih molekularnih promjena kao npr. povišenje unutarstaničnog pH. Alternativno, Ca^{2+} ioni mogu aktivirati i fosfolipazu C ili se vezati na kalmodulin prisutan u glavi i biču spermija. Aktivacijom fosfolipaze C, iz PIP₂, nastaju sekundarni glasnici IP₃ i DAG koji su bitni u regulaciji akrosomske reakcije. Vezanjem na

kalomodulin, aktiviraju se kalmodulin ovisne kinaze koje također imaju svoju ulogu u hiperaktivaciji. Iako na membrani spermija postoje različiti kanali za Ca^{2+} ione, njihov prijenos najčešće se odvija preko pH osjetljivih, naponom reguliranih CatSper kanala koji su specifični isključivo za spermije.

Unatoč velikoj važnosti Ca^{2+} iona, prvi korak kapacitacije započinje s ulaskom HCO_3^- iona. Na membrani spermija se nalaze dvije vrste kanala za transport HCO_3^- iona, a to su $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotransporter i $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiporter (Delgado-Bermúdez i sur. 2022). Oba transportera su sekundarni ionski transporter koji kao izvor energije za prijenos jednog iona u suprotnom smjeru od njegovog koncentracijskog gradijenta koriste elektrokemijski gradijent drugog iona. Također, pripadaju superobitelji „*solute carrier*“ transportera tj. SLC superobitelji. Razlika između njih je u tome što je $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ transporter najviše aktivan tijekom inicijacije kapacitacije i odgovoran je za brz i nagao ulazak HCO_3^- , dok je funkcija $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ transportera dugoročno održavanje ulaska HCO_3^- tijekom kapacitacije (Delgado-Bermúdez i sur. 2022).

Uz spomenute Ca^{2+} i HCO_3^- ione, za povišenje unutarstaničnog pH spermija važan je i izlazak H^+ iona koji se prenose naponom reguliranim HVCN1 kanalima, monokarboksilat transporterima (MCTs) ili Na^+/H^+ transporterima (NHEs). Isto tako bitno je spomenuti da u kapacitaciji, iako u manjoj mjeri, sudjeluju i Na^+ , K^+ i Cl^- ioni (Delgado-Bermúdez i sur. 2022).

Osim iona, u regulaciji unutarstanične pH vrijednosti sudjeluje i hormon progesteron koji aktivira adenilat ciklazu i PKA signalni put. Svi navedeni mehanizmi i molekule koje sudjeluju u kapacitaciji shematski su prikazani na Slici 8.



Slika 8: Shematski prikaz uloge Ca²⁺, HCO³⁻, H⁺ iona te progesterona u različitim signalnim putevima tijekom kapacitacije u spermijima sisavaca. **(a)** Ulazak Ca²⁺ i HCO³⁻ kroz odgovarajuće kanale te vezanje progesterona na svoje receptore, aktivira se PKA signalni put. Aktivira se adenilat ciklaza koja povisuje unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a, cAMP aktivira protein kinazu A te ona onda kroz fosforilaciju različitih proteina potiče kapacitaciju. **(b)** Ca²⁺ ioni mogu potaknuti kapacitaciju vezanjem na kalmodulin i aktivacijom kalmodulin ovisnih kinaza. **(c)** Također, Ca²⁺ mogu biti bitni regulatori akrosomske reakcije aktivacijom fosfolipaze C koja od PIP₂ stvara DAG i IP₃ (oni djeluju kao sekundarni glasnici). **(d)** Izlazak H⁺ iona kroz odgovarajuće kanale doprinosi kapacitaciji povišenjem unutarstanične pH vrijednosti.

6. AKROSOMSKA REAKCIJA

Nakon kapacitacije, spermiji su spremni za oploditi jajnu stanicu. Da bi došlo do uspješne oplodnje, potrebno je da spermij prepozna specifične proteine na ovojnici jajne stanice, da se ispuste hidrolitički enzimi iz akrosoma spermija te da se razgrade zaštitne ovojnice jajne stanice kako bi se stanične membrane spermija i jajne stanice približile. Egzocitoza hidrolitičkih enzima iz akrosoma spermija naziva se akrosomskom reakcijom (Florman i sur. 2008).

Specifični proteini na površini jajne stanice koje prepoznaje spermij po svojoj su građi glikoproteini i nalaze se na zoni pellucidi zbog čega se nazivaju ZP proteini (Gupta, 2021). Ljudska zona pellucida sadržava četiri različita ZP proteina – ZP1, ZP2, ZP3 i ZP4, no to ne vrijedi za sve sisavce. Npr. iako su ZP1 i ZP4 glikoproteini prisutni kod svih placentarnih sisavaca, postojanje ZP2 i ZP3 glikoproteina dokazano je samo kod nekih skupina (Goudet i sur. 2008).

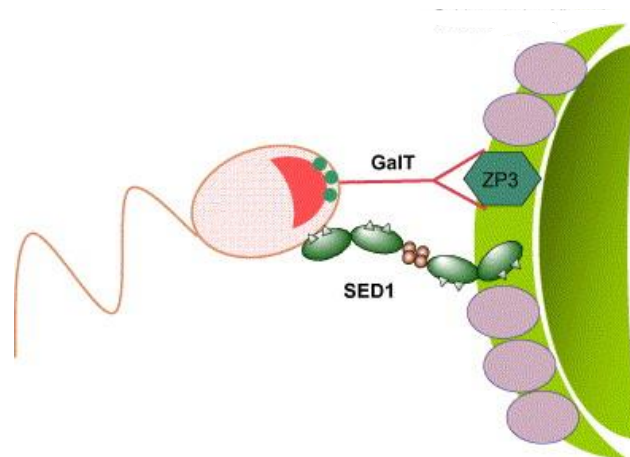
Unatoč razlikama u broju različitih ZP glikoproteina kod različitih skupina sisavaca, uloge zone pellucide u ovoj fazi oplodnje su za sve skupine jednake i podrazumijevaju zaštitu jajne stanice, regulaciju vezanja spermija i sprječavanje polispermije (Gupta 2021). Također, pokazano je da su upravo mutacije u glikoproteinima zone pellucide jedan od mogućih razloga neplodnosti u žena (Gupta 2021).

U svome radu, Gupta (2021) pokušao je pomoću dva različita modela detaljnije istražiti uloge svakog od četiri navedena glikoproteina u sastavu ljudske zone pellucide. Prvi model podrazumijevao je upotrebu transgeničnih miševa koji bi na površini svoje zone pellucide, uz mišje ZP proteine, ekspimirali po još jedan odabrani ljudski ZP protein te se pratila uspješnost spajanja ljudskog spermija sa takvim stanicama. Ako je spajanje spermija i jajne stanice bilo uspješno, to bi značilo da je ZP protein koji je ekspimiran na površini mišje zone pellucide onaj koji je bitan u prepoznavanju spermija i jajne stanice. Drugi model rađen je pomoću nativnih/rekombinantnih ZP ljudskih proteina koji su ekspimirani u bakteriji te se njime također pratila uspješnost prepoznavanja spermija i jajne stanice, ali isto tako i uloga pojedinog proteina u indukciji akrosomske reakcije.

Dva modela nisu dala jednoznačne zaključke. Model s transgeničnim miševima pokazao da je ZP2 glikoprotein važan u povezivanju spermija i jajne stanice, dok ZP1, ZP3 i ZP4 najvjerojatnije nisu. S druge strane, model s nativnim i/ili rekombinantnim glikoproteinima pokazao je da i ZP1, ZP3 i ZP4 imaju ulogu u spajaju spermija i jajne stanice te u indukciji akrosomske reakcije. Autor ovoga rada je ukazao na nedostatke modela sa transgeničnim

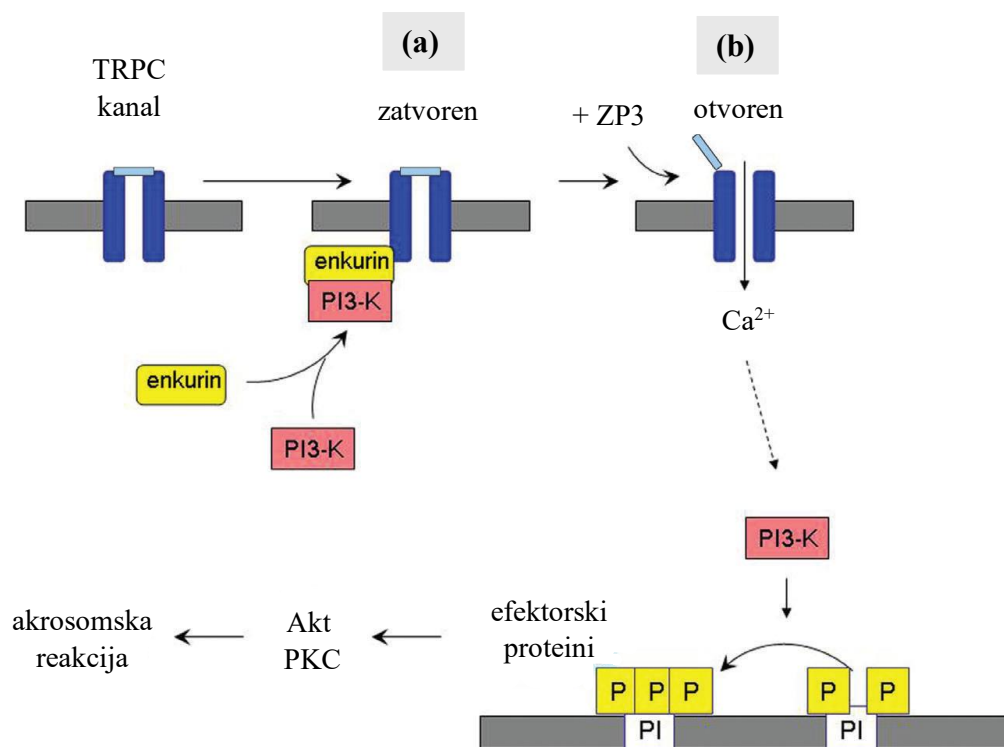
miševima koji su mogli uzrokovati nepodudarne rezultate. Tako je spomenuto da je moguće da raspored ljudskih glikoproteina u transgeničnim miševima drugačiji od onog u stvarnim uvjetima, da u mišjoj zoni pellucidi bitne domene za interakciju spermija i jajne stanice nisu jednako dostupne spermijima kao što je to u ljudskoj zoni pellucidi te je ukazano na mogućnost utjecaja razlika između posttranslacijskih modifikacija u ljudskom i mišjem organizmu. Sve ovo je moglo utjecati na uspješnost tj. neuspješnost vezanja spermija na određeni glikoprotein. Stoga, točne uloge svakog ZP glikoproteina kod sisavaca još nisu sa sigurnošću pokazane.

Za uspješno prepoznavanje spermija i jajne stanice uz ZP glikoproteine, važni su i proteini na površini glave spermija. Smatra se da je za inicijalnu adheziju spermija za zonu pellucidu važan spermijski protein SED-1 te da ta interakcija omogućuje vezanje ZP3 glikoproteina na β 1,4-galaktoziltransferazu-I (GalT) koja se nalazi na glavi spermija. Ovom interakcijom se potiče agregacija GalT na površini spermija i unutarstanični odgovor koji na kraju dovodi do egzocitoze akrosomalnog sadržaja (Copland i sur. 2009). Uključenost spermalnog SED-1 proteina u prepoznavanju jajne stanice prikazana je na Slici 9.



Slika 9: Uključenost spermalnog SED-1 proteina u prepoznavanju jajne stanice. Na površini glave spermija nalazi se protein SED-1 koji je važan u inicijalnoj adheziji spermija za zonu pellucidu. Ta interakcija omogućuje vezanje ZP3 glikoproteina na β 1,4-galactoziltransferazu-I (GalT) koja se također nalazi na glavi spermija. Ovom interakcijom se potiče agregacija GalT na površini spermija i unutarstanični odgovor koji na kraju dovodi do egzocitoze akrosomalnog sadržaja. Preuzeto iz (Shur i sur. 2006).

Na molekularnoj razini, pretpostavlja se da se unutarstanični odgovor sastoji od aktivacije G proteina, povišenja unutarstaničnog pH spermija i ulaska Ca^{2+} iona, slično kao kod kapacitacije. No, posebnost ovdje je da se sve više ukazuje na važnost TRCP (eng. *canonical transient receptor potential*) kanala na membrani spermija za održavanje ulaska Ca^{2+} iona i poticanje akrosomalne egzocitoze (Florman i sur. 2008). Na zatvoreni TRCP kanal, jednom svojom domenom, vezan je protein enkurin. Taj protein u svojoj građi sadrži i specifične motive koji mu omogućuju vezanje Ca^{2+} iona, a svojom drugom domenom vezan je za PI3-K (1-fosfatidilinozitol-3 kinazu) čime omogućuje njezinu lokalizaciju u blizini TRCP kanala. Stoga, prilikom interakcije ZP3 glikoproteina i spermija, dolazi do otvaranja TRCP kanala i ulaska Ca^{2+} u glavu spermija. Ca^{2+} ioni još nepoznatim mehanizmom aktiviraju PI3-K koja fosforilacijom PIP2 stvara PIP3. Jednom kada nastane, PIP3 aktivira proteinske kinaze Akt (protein kinaza B) i PKC (protein kinaza C) koje pomoću interakcije sa različitim elementima sekretorne mašinerije akrosoma uzrokuju egzocitozu (Florman i sur. 2008). Konkretnije, dolazi do fuzije vanjske membrane akrosoma s membranom spermija na više pozicija i otpuštaju se hirolitčki enzimi (Georgadaki i sur. 2016). Navedeni mehanizam unutarstaničnog odgovora koja uzrokuje akrosomalnu reakciju prikazan je na Slici 10.



Slika 10: Ilustrativni prikaz signalnog puta u spermijima sisavaca koji dovodi do akrosomske reakcije. **(a)** Na površini spermija prije interakcije s jajnom stanicu nalaze se zatvoreni TRCP

(eng. *canonical transient receptor potential*) kanali. Na zatvorene TRCP kanale se, jednom svojom domenom, veže protein enkurin dok je svojom drugom domenom vezan za PI3-K (1-fosfatidilinozitol-3 kinazu). Na ovaj način enkurin omogućuje lokalizaciju PI3-K u blizini TRCP kanala. **(b)** Kada dođe do interakcije između ZP glikoproteina jajne stanice i spermija, otvaraju se TRCP kanali i to uzrokuje ulazak Ca^{2+} u glavu spermija. Ca^{2+} ioni još nepoznatim mehanizmom aktiviraju PI3-K koja fosforilacijom PIP2 stvara PIP3. Jednom kada nastane, PIP3 aktivira proteinske kinaze Akt (protein kinaza B) i PKC (protein kinaza C) koje pomoću interakcije sa različitim elementima sekretorne mašinerije akrosoma uzrokuju egzocitozu hidrolitičkih enzima. Preuzeto i prilagođeno prema (Florman i sur. 2008).

7. FUZIJA MEMBRANE JAJNE STANICE I SPERMIJA

Nakon što su se otpustili hidrolitički enzimi iz akrosoma, oni razgrađuju zonu pellucidu i time omogućuju dolazak spermija do stanične membrane jajne stanice. U adheziji staničnih membrana važna je interakcija IZUMO1 (na glavi spermija) i Juno proteina (na jajnoj stanici), dok proteini koji sudjeluju u fuziji staničnih membrana još uvijek nisu poznati (Bianchi i sur. 2024).

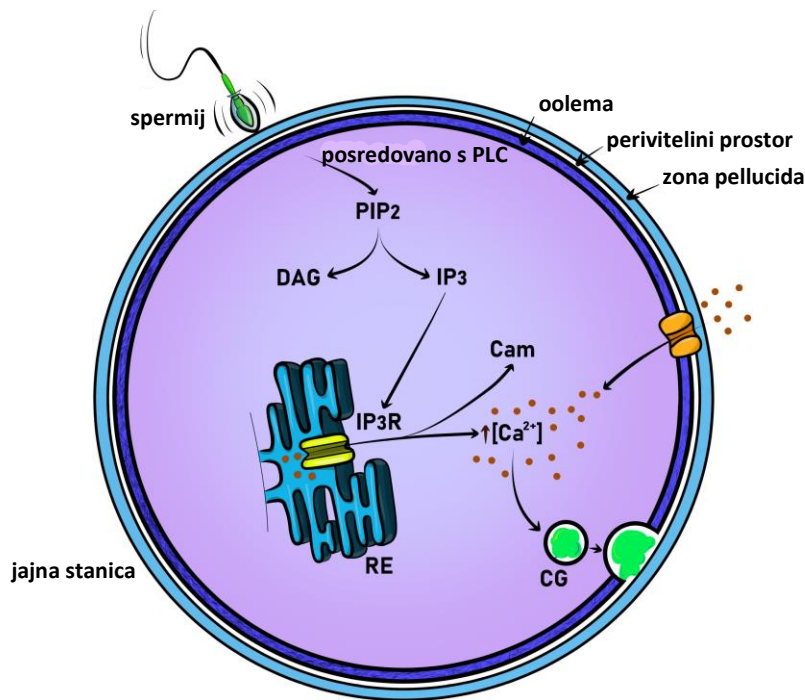
Nakon fuzije membrana dolazi do fuzija jezgara i nastanka zigote. Proces oplodnje je u tom trenutku završen.

7.1 Kortikalna reakcija i stvaranje fertilizacijske membrane

Tijekom oplodnje sisavaca vrlo je bitno osigurati da jajnu stanicu ne oplodi više od jednog spermija. Kada bi se jajna stanica sisavaca oplodila s više spermija, što se još naziva i polispermijom, došlo bi do povećanja broja kromosoma u zigoti – letalne anomalije koja onemogućuje pravilan razvitak embrija (Rojas i sur. 2021).

U sprječavanju polispermije važnu ulogu imaju kortikalne granule – organeli koji su specifični za jajnu stanicu i koji se nalaze ispod njezine stanične membrane. Sintetiziraju se prilikom sazrijevanja jajne stanice, a u sisavaca su najviše bogate proteinima, uključujući i glikoproteine. Spajanje kortikalnih granula sa staničnom membranom i egzocitoza njihova sadržaja u prostor između stanične membrane i zone pellucide (perivitelini prostor) povezane su sa povišenjem unutarstanične koncentracije Ca^{2+} koje se dogodi prilikom oplodnje u skoro svim organizmima. Nakon egzocitoze kortikalnih granula dolazi do stvaranja fertilizacijske

membrane – fizičke barijere koje sprječava ulazak drugih spermija (Rojas i sur. 2021). Prijenos signala koji uzrokuje povišenje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} iona i egzocitozu kortikalnih granula ilustrativno je prikazan na Slici 11.

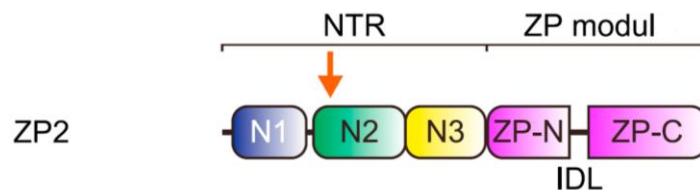


Slika 11: Shematski prikaz univerzalnih regulatora u egzocitozi kortikalnih granula i stvaranju fertilizacijske membrane. Ulazak spermija u jajnu stanicu aktivira PLC koja stvara DAG i IP3. IP3 se veže na svoj receptor, IP3R, koji se nalazi na endoplazmatskom retikulumu i uzrokuje otpuštanje unutarstaničnih zaliha Ca^{2+} u citoplazmu jajne stanice. Kod sisavaca, Ca^{2+} ioni ulaze i iz izvanstaničnog prostora. Povišena koncentracija citoplazmatskog kalcija uzrokuje fuziju kortikalnih granula sa staničnom membranom jajne stanice i egzocitozu njihova sadržaja u perivitelinu prostor. Nakon nekog vremena, u tom prostoru stvori se fertilizacijska membrana – fizička barijera koja sprječava ulazak drugih spermija tj. polispermiju. Nastanak fertilizacijske membrane nije prikazan na slici. Oolema = stanična membrana jajne stanice, ZP = zona pellucida, CG = kortikalna granula (eng. *cortical granule*). Preuzeto i prilagođeno prema (Rojas i sur. 2021).

7.2. Promjena strukture ZP2 glikoproteina

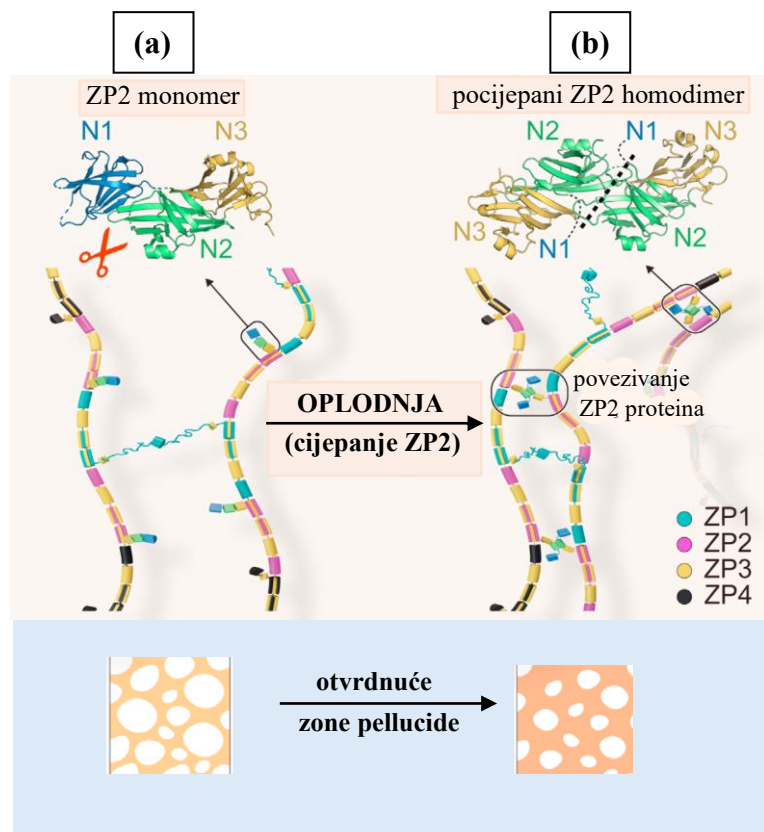
Nedavno, otkriveno je da ispuštanje sadržaja kortikalnih granula u perivitelini prostor podrazumijeva i ispuštanje određenih enzima koji mogu promijeniti strukturu zone pellucide nakon oplodnje i na taj način dodatno zaštititi stanicu od polispermije.

U ovaj su proces uključeni specifično ZP2 glikoproteini. Kao i ostali ZP glikoproteini, ZP2 na svojoj C terminalom kraju imaju visoko konzerviranu ZP domenu (ili ZP modul) koja se sastoji od dvije imunoglobulinske podjedinice – ZP-N i ZP-C koje spaja poveznica IDL (eng. *interdomain linker*). Specifičnost ZP2 proteina je u njihovoj N terminalnoj domeni (NTR) koja se sastoji od tri podjedinice N1, N2 i N3 (Nishio i sur. 2024). Građa ZP2 glikoproteina prikazana je na Slici 12.



Slika 12: Građa ZP2 proteina. Na C terminalnom kraju ima visoku konzerviranu ZP domenu (ZP modul) koja j prisutna kod svih ZP proteina. Ta domena se sastoji od dvije imunoglobulinske podjedinice – ZP-N i ZP-C koje spaja poveznica IDL (eng. *interdomain linker*). Specifičnost ZP2 proteina je u njihovoj N terminalnoj domeni (NTR) koja se sastoji od tri podjedinice N1, N2 i N3. Preuzeto i prilagođeno prema (Nishio i sur. 2024).

Kao takvi, ZP2 glikoproteini zajedno s drugim ZP proteinima sačinjava filamente koji su sastavni dio matriksa zone pellucide. Danas se zna da se unutar sadržaja kortikalnih granula nalazi i jedan enzim koji se kod miševa naziva ovastacin (Ovst) te da je on odgovoran za promjenu strukture ZP2 proteina, a posljedično i same zone pellucide, nakon oplodnje (Nishio i sur. 2024). Nakon ulaska jednog spermija u jajnu stanicu, ovastacin cijepa N2 podjedinicu ZP2 glikoproteina te omogućuje stvaranje ZP2 homodimera tj. povezivanje ZP2 glikoproteina iz jednog filameta matriksa sa ZP2 glikoproteinom iz drugog. Zbog novonastalog povezivanja, filamenti matriksa zone pellucide međusobno se približe, matriks otvrdne te na taj način dodatno fizički, uz već spomenutu fertilizacijsku membranu, onemogućuje ulazak dodatnih spermija u jajnu stanicu. Promjene u matriksu zone pellucide koje sprječavaju polispermiju ilustrativno su prikazane na Slici 13.



Slika 13: Sprječavanje polispermije u sisavaca uzrokovano promjenom strukture ZP2 glikoproteina i matriksa zone pellucide. **(a)** Prikaz ZP2 glikoproteina u monomernom obliku, prije oplodnje. **(b)** Nakon ulaska jednog spermija u jajnu stanicu dolazi do promjene strukture ZP2 glikoproteina – cijepa se N2 podjedinica njegove N terminalne regije (NTR-a). Cijepanje omogućuje povezivanje ZP2 proteina iz različitih filamenata matriksa što uzrokuje međusobno približavanje filamenata matriksa zone pellucide i njezino otvrdnuće. Na ovaj se način stvara fizička barijera koja sprječava ulazak drugih spermija nakon oplodnje. Preuzeto i prilagođeno prema (Nishio i sur. 2024).

8. ZAKLJUČAK

Oplodnja je spajanje muške i ženske gamete, a u sisavaca se događa u ampularnom dijelu jajovoda. Njome nastaje zigota – diploidna stanica iz koje kreće razvoj čitavog organizma. Muške gamete su spermiji i oni se razvijaju iz spermatogonija u sjemenicima, a pokretnost stječu u dosjemeniku. Milijuni spermija u ženski spolni sustav dolaze tijekom spolnog čina, ejakulacijom, no njihov se broj, putovanjem prema jajovodu, postupno smanjuje jer je za oplodnju potreban samo jedan spermij. Ženska gameta je jajna stanica. Tijekom ovulacije u jajovod se izbacuje sekundarna oocita kojoj je stanična membrana okružena ovojnicom – zonom pellucidom, koja je bogata ZP glikoproteinima, i slojem folikularnih stanica koji se naziva cumulus oophorus.

Za uspješnu oplodnju ključno je da spermiji dodatno sazriju unutar ženskog spolnog sustava u procesu kapacitacije. Zahvaljujući ulasku HCO_3^- i Ca^{2+} te izlasku H^+ iona kroz odgovarajuće kanale na glavi spermija te djelovanju progesterona dolazi do povišenja unutarstaničnog pH. Ova promjena uzrokuje hiperaktivaciju spermija koju karakteriziraju brže kretanje, nagli pokreti glave i biča nužni za prodor spermija do oocite.

Usmjeravanju spermija kroz ženski spolni sustav pomažu i sustavi navođenja. Ženski spolni hormoni, ponajviše estrogeni, uzrokuju kontrakcije rodnice, cerviksa, maternice i jajovoda i potpomažu pasivnom kretanju spermija. Reotaksijom se spermiji pokreću u suprotnom smjeru od protoka tekućine koji se nakon spolnog čina, pod utjecajem prolaktina, inducira iz jajovoda prema maternici. Zahvaljujući opsinskim termoreceptorima na njihovoj površini, spermiji se termotaksijom privlače prema ampularnom dijelu jajovoda koji je 2°C topliji od istmusa. Kemotaksijom se spermiji usmjeravaju na male udaljenosti, a kemoatraktant je progesteron kojega luče folikularne stanice oocite. Na termotaktičke i kemotaktičke podražaje mogu reagirati samo kapacitirani spermiji. U reotaksiji, termotaksiji i reotaksiji, na molekularnoj razini, glavnu ulogu ima povišenje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} .

Nakon približavanja gameta u jajovodu, dolazi do interakcije između SED-1 receptora na glavi spermija i zone pellucide što omogućuje vezanje ZP3 glikoproteina na $\beta 1,4$ -galactoziltransferazu-I (GalT) spermija. Ova interakcija uzrokuje egzocitozu hidrolitičkih enzima iz akrosoma spermija, odnosno akrosomsku reakciju kojom se razgrađuje zona pellucida i omogućuje približavanje membrana oocite i spermija. U adheziji staničnih membrana važna je interakcija IZUMO1 (na glavi spermija) i Juno proteina (na oociti), dok proteini koji sudjeluju u fuziji staničnih membrana još uvijek nisu poznati.

Također, tijekom oplodnje sisavaca bitno je osigurati da ne dođe do polispermije. Oplodnjom dolazi do povišenja unutarstanične koncentracije Ca^{2+} što uzrokuje egzocitozu sadržaja kortikalnih granula u perivitelni prostor (kortikalnu reakciju) i stvaranje fertilizacijske membrane koja onemogućuje prodor drugih spermija. Isto tako, u sprječavanju polispermije, ulogu ima i ZP2 protein koji zbog djelovanja enzima ovastacina promjeni svoju strukturu i uzorkuje otvrdnuće zone pellucide.

8. LITERATURA

- Austin, C. R. (1977). Mammalian fertilization mechanisms. *Nature*, 270(5632).
<https://doi.org/10.1038/270084a0>
- Bahat, A. i Eisenbach, M. (2010). Human sperm thermotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ channel. *Biology of Reproduction*, 82(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080127>
- Bahat, A., Eisenbach, M., & Tur-Kaspa, I. (2005). Perioovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Human Reproduction*, 20(8).
<https://doi.org/10.1093/humrep/dei006>
- Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L. C., Breitbart, H., & Eisenbach, M. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract [1]. U: *Nature Medicine* (Vol. 9, Issue 2).
<https://doi.org/10.1038/nm0203-149>
- Bianchi, E., Jiménez-Movilla, M., Cots-Rodríguez, P., Viola, C., & Wright, G. J. (2024). No evidence for a direct extracellular interaction between human Fc receptor–like 3 (MAIA) and the sperm ligand IZUMO1. *Science Advances*, 10(8).
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adk6352>
- Cerezales, S., Boryshpolets, S., & Eisenbach, M. (2015). Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance. *Asian Journal of Andrology*, 17(4).
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.154308>
- Copland, S. D., Murphy, A. A., & Shur, B. D. (2009). The mouse gamete adhesin, SED1, is expressed on the surface of acrosome-intact human sperm. *Fertility and Sterility*, 92(6). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.004>
- Cuasnicú, P. S., Cohen, D. J., Da Ros, V. G., & Muñoz, M. W. (2018). Mechanisms involved in mammalian gamete interaction. In *Encyclopedia of Reproduction*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64465-3>
- Delgado-Bermúdez, A., Yeste, M., Bonet, S., & Pinart, E. (2022). A Review on the Role of Bicarbonate and Proton Transporters during Sperm Capacitation in Mammals. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 11).
<https://doi.org/10.3390/ijms23116333>
- Eisenbach, M. (1999). Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. In *Developmental Genetics* (Vol. 25, Issue 2).
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1999\)25:2<87::AID-DVG2>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1999)25:2<87::AID-DVG2>3.0.CO;2-4)
- Eisenbach, M., & Giojalas, L. C. (2006). Sperm guidance in mammals - An unpaved road to the egg. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 4).
<https://doi.org/10.1038/nrm1893>
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* (Vol. 1469, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)

- Florman, H. M., Jungnickel, M. K., & Sutton, K. A. (2008). Regulating the acrosome reaction. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6). <https://doi.org/10.1387/ijdb.082696hf>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 38, Issue 4). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
- Goudet, G., Mugnier, S., Callebaut, I., & Monget, P. (2008). Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. In *Biology of Reproduction* (Vol. 78, Issue 5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064568>
- Gupta, S. K. (2021). Human Zona Pellucida Glycoproteins: Binding Characteristics With Human Spermatozoa and Induction of Acrosome Reaction. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.619868>
- Guyton A., Hall J. (2017): Reprodukcijske i hormonske funkcije muškaraca; funkcija epifize. U: Raič, A. (ur.) Medicinska fiziologija, 13. IZD. Zagreb, Medicinska naklada, str. 1021-1023
- Guyton A., Hall J. (2017): Fiziologija žene prije trudnoće i ženski spolni hormoni. U: Raič, A. (ur.) Medicinska fiziologija, 13. IZD. Zagreb, Medicinska naklada, str. 1037-1039
- Hunter, R. H. F., & Nichol, R. (1986). A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77(2). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770599>
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: Role of protein kinases. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.1038/aja.2012.81>
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338). <https://doi.org/10.1038/nature09767>
- Miki, K., & Clapham, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology*, 23(6). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.007>
- Mishra, A. K., Kumar, A., Swain, D. K., Yadav, S., & Nigam, R. (2018). Insights into pH regulatory mechanisms in mediating spermatozoa functions. In *Veterinary World* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.852-858>
- Morra, G., Razavi, A. M., Pandey, K., Weinstein, H., Menon, A. K., & Khelashvili, G. (2018). Mechanisms of Lipid Scrambling by the G Protein-Coupled Receptor Opsin. *Structure*, 26(2). <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.11.020>
- Nishio, S., Emori, C., Wiseman, B., Fahrenkamp, D., Dioguardi, E., Zamora-Caballero, S., Bokhove, M., Han, L., Stsiapanava, A., Algarra, B., Lu, Y., Kodani, M., Bainbridge, R. E., Komondor, K. M., Carlson, A. E., Landreh, M., de Sanctis, D., Yasumasu, S., Ikawa, M., & Jovine, L. (2024). ZP2 cleavage blocks polyspermy by

- modulating the architecture of the egg coat. *Cell*, 187(6).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.013>
- Pérez-Cerezales, S., Boryshpolets, S., Afanзар, O., Brandis, A., Nevo, R., Kiss, V., & Eisenbach, M. (2015). Involvement of opsins in mammalian sperm thermotaxis. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16146>
- Rojas, J., Hinostroza, F., Vergara, S., Pinto-Borguero, I., Aguilera, F., Fuentes, R., & Carvacho, I. (2021). Knockin' on Egg's Door: Maternal Control of Egg Activation That Influences Cortical Granule Exocytosis in Animal Species. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.704867>
- Sadler T.W. (2008): Gametogeneza: razvoj muških i ženskih spolnih stanica. U: Matekalo Draganović, J. (ur.) Langmanova Medicinska embriologija, 10. IZD. Zagreb, Školska knjiga, str. 23-27
- Shur, B. D., Rodeheffer, C., Ensslin, M. A., Lyng, R., & Raymond, A. (2006). Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1–2).
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.037>
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R., & Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471(7338). <https://doi.org/10.1038/nature09769>
- Suarez, S. S. (2015). Gamete and Zygote Transport. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00005-3>
- Teves, M. E., Barbano, F., Guidobaldi, H. A., Sanchez, R., Miska, W., & Giojalas, L. C. (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 86(3).
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.080>
- Teves, M. E., Guidobaldi, H. A., Uñates, D. R., Sanchez, R., Miska, W., Publicover, S. J., Garcia, A. A. M., & Giojalas, L. (2009). Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS ONE*, 4(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008211>
- Yoshida, M., & Yoshida, K. (2011). Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca²⁺. In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 17, Issue 8).
<https://doi.org/10.1093/molehr/gar041>

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 2002. godine u Splitu. Osnovnu školu završila sam u Zagrebu te 2017. upisala XV. gimnaziju (MIOC) koju sam završila 2021. godine. Od 2010. do 2020. godine bila sam članica kluba sinkroniziranog klizanja Zagrebačke pahuljice od čega sam od 2016. do 2018. godine bila članica hrvatske juniorske reprezentacije, a od 2018. do 2020. godine članica hrvatske seniorske reprezentacije u sinkroniziranom klizanju. Od 2014. do 2022. godine bila sam kategorizirana sportašica pri Hrvatskom olimpijskom odboru. Prijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2021. godine. Članica sam Udruge studenata biologije – BIUS od 2022. godine u sklopu koje sam sudjelovala u organizaciji Simpozija studenata bioloških usmjerenja – SiSB, u 2023. godini (članica tima za marketing) i 2024. (voditeljica tima za administraciju i ponude). U 2024. godini bila sam voditeljica radionice u znanstvenoj manifestaciji Dan i noć biologije.