

# Postępy w badaniach zapłodnienia u ssaków i człowieka

\*Leopold Śliwa

Zakład Biologii Rozwoju Człowieka, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Collegium Medicum,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków  
Kierownik Zakładu: dr hab. Leopold Śliwa

---

## ADVANCES IN FERTILIZATION RESEARCH IN MAMMALS AND HUMAN

---

### Summary

Nowadays the *in vitro* fertilization and other reproductive problems are under intensive political and social debate in Poland. Unfortunately, the philosophical, ethical and world view arguments are more often quoted than embryological arguments. Because of the lack of common education and knowledge of this issue, the more information about reproductive problems in human and mammals as well as about scientific discoveries in this field should be propagated. Therefore, the admit of Nobel prize the author of *in vitro* fertilization method as the way in infertility treatment in 2010 was such an important moment. Moreover, the constant progress in medical science and discovery of molecular mechanisms of sperm capacitation, chemotaxis, gamete fusion, metabolic egg activation, first cell division and next zygote cleavage enable the infertility treatment at the stage of fertilization.

Key words: fertilization, fertilization *in vitro*, capacitation, chemotaxis, oocyte activation

---

Koniec XX i początek XXI wieku jest okresem szczególnie szybkiego rozwoju i postępu w naukach biologicznych i medycznych. Dotyczy to zwłaszcza dziedzin, w których priorytetem jest zdobywanie informacji i rozwój technologii w sposób całkowicie materialistyczny i nieskrępowany normami wierzeń, mitów i przesądów. Należą do tych dziedzin takie gałęzie, jak biochemia, biofizyka, biologia molekularna, genetyka, a w naukach medycznych farmakologia, chirurgia, kardiologia, neurologia i prawie cała medycyna praktyczna. Związane jest to, jak się wydaje, z przyjęciem materialistycznej koncepcji nauki. Problem postępu w naukach po raz pierwszy pojawił się już w VI wieku p.n.e., kiedy Tales z Miletu przedstawił pierwszą naukową koncepcję materialistyczną, w myśl której naukowe wyjaśnienie rzeczywistości nie uwzględniało wierzeń i mitów, a jedynie dedukcję opartą o sprawdzalne empirycznie fakty. Ten sposób myślenia pozwolił filozofom, ówczesnym naukowcom, uwolnić się od potrzeby odwoływania się do ideologii narzucanych przez ludzi niezajmujących się nauką, a jedynie po swojemu interpretujących często bezwartościowe zapisy lub przekazywane założenia czy narzucane odgórnie interpretacje. Ten kierunek filozoficzny zakładał, że nieznaną problem trzeba rozwiązać i wyjaśnić, a nie pozostawiać w sferze domysłów lub wierzeń, gdyż takie zaniechanie hamuje postęp cywilizacyjny. Dlatego w historii rozwoju naukowego ludzkości, owocne w nowe odkrycia i teorie są okresy odrzucania odgórnych uregulowań i nieskrępowanego działania badaczy, co szczególnie wyraźnie daje o sobie znać w obecnych czasach (1).

Tego szczęścia, do nieskrępowanych badań i praktycznego stosowania ich wyników, nie mają jednak embriologia, biologia rozwoju, a w medycynie dziedziny zajmujące się płodnością, zapłodnieniem, wczesnym rozwojem. Naukowcy parający się tą tematyką muszą zmagać się z licznymi ograniczeniami, niezrozumieniem, a czasami nawet wrogością. Podejmowanie dyskusji i przedstawianie faktów naukowych dotyczących, co jest szczególnie widoczne, zapłodnienia i najwcześniejszego rozwoju człowieka nieodmiennie budzi sprzeciw ludzi często nieobeznanych z postępem naukowym, jaki dokonał i dokonuje się obecnie. Już stosowanie w dyskusjach słownictwa i nomenklatury nasyconej ideologią utrudnia, a niekiedy nawet uniemożliwia porozumienie, a nawet obiektywne przedstawianie faktów i osiągnięć. Już samo stwierdzenie, że zygota jest „osobą ludzką” i ma pełnię praw przysługujących człowiekowi, a naukowcy i lekarze tworzą zarodki tylko po to, by takie „osoby” zabijać, ćwiartować czy kroić, uniemożliwia rzeczową, opartą na faktach dyskusję, kierując ją nieodmiennie na drogę retoryki ideologicznej. Myśli i poglądy te są rozwijane w licznych ulotnych publikacjach, a zwłaszcza na forach internetowych przez rozmaite kręgi działaczy mianujących się obrońcami życia (2, 3).

Poglądy te są wielkim nieporozumieniem i nadużyciem intelektualnym, moralnym i etycznym, wymagającym cierpliwego przedstawiania stanu wiedzy i wyjaśniania problemów biologicznych i medycznych oraz postępowania lekarzy starających się rozwiązać i stosować nowoczesne metody leczenia niepłodności, a tym samym pomagać wielu kobietom oczekującym własnego dziecka.

Wydawało się, że opracowanie i włączenie do arsenału metod leczenia niepłodności człowieka zabiegów zapłodnienia pozaustrojowego zwanego popularnie „metodą *in vitro*”, czego początkiem było urodzenie się Luizy Brown, co w 1978 roku opisali Steptoe i Edwards (4), poprawi stan wiedzy i zmusi oponentów do poszerzenia swoich poglądów opartych na faktach potwierdzonych naukowo, ale tak jednak się nie dzieje. Nastawienia sceptyków nie zmieniło również przyznanie Robertowi G. Edwardsowi w 2010 roku Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Opracowanie skutecznej i efektywnej metody było możliwe dzięki współpracy biologa embriologa i lekarza ginekologa otwartych na nowe prądy, zainteresowanych postępem i korzystających z najnowszych, w tym czasie, informacji i doświadczeń zdobytych przez badaczy z różnych dziedzin. Nie wszystkie jednak procesy biologiczne zachodzące w gametach, w zapłodnionym oocyte czy organizmie ciężarnej kobiety były im dobrze znane i wyjaśnione. Od tego czasu nasz stan wiedzy o przebiegu zapłodnienia i wczesnego rozwoju znacznie się poszerzył, dzięki wielokierunkowym badaniom, prowadzonym przede wszystkim na modelach zwierzęcych, i rozwojowi metod możliwych do zastosowania zarówno w badaniach laboratoryjnych, jak również klinicznych.

Przyrost wiedzy w każdej dziedzinie jest ostatnio lawinowy, a gromadzenie nowych informacji i formowanie odpowiednich, coraz bardziej jednoznacznych hipotez, jest bardzo dynamicznym procesem, co niejednokrotnie utrudnia śledzenie i wykorzystywanie postępu nauki. Dla pracujących w każdej dziedzinie istnieje konieczność przyswojenia podstawowego zasobu wiedzy, na którym można będzie rozwijać i wzbogacać swój pogląd na interesujące zagadnienia. Dla embriologów zajmujących się procesami zapłodnienia i wczesnego rozwoju taką pozycją wyjściową powinna być monografia „Mammalian fertilization” napisana w 1994 roku przez prof. Yanagimachi, wybitnego amerykańskiego naukowca, będąca częścią epokowej dla embriologii książki „The Physiology of Reproduction” (5). Zawarte w niej informacje są wstępem do poznawania biologicznych procesów prowadzących do powstania i rozwoju organizmu. Oczywiście postęp wiedzy owocuje wieloma nowszymi, przeglądowymi opracowaniami tematu, wśród których warto wymienić monografię autorstwa lkawy i wsp. uwzględniającą nie tylko klasyczne badania, ale również wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu technik z dziedziny biologii molekularnej i genetyki (6).

Również w polskojęzycznym piśmiennictwie nie brakuje opracowań z dziedziny biologii zapłodnienia i wczesnego rozwoju, jak również zastosowania wiedzy z tej dziedziny w medycynie. Jako najważniejsze warto wymienić książki „Molekularne podstawy embriogenezy” (7) oraz „Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych zwierząt” (8), a także omówienie związków pomiędzy zapłodnieniem a zastosowaniem metody *in vitro* wydrukowane z okazji przyznania Nagrody Nobla za opracowanie i rozwój medycznych postępowań zapłodnienia pozaustrojowego (9).

Opracowanie technik laboratoryjnych oraz procedur klinicznych stosowanych w trakcie standardowego zapłodnienia pozaustrojowego, kiedy pobrany z jajnika oocyt umieszcza się w odpowiednim płynie inkubacyjnym i dodaje zawieszinę plemników, nie wyczerpało możliwości badań z dziedziny biologii reprodukcji. Uzyskane w trakcie badań

na zwierzętach wyniki pozwoliły, po ich klinicznym zastosowaniu, na pokonanie ograniczeń podstawowej metody i zwiększyły prawdopodobieństwo osiągnięcia sukcesu w postaci urodzenia się dziecka u par do tej pory uznawanych za bezpłodne. Techniki te to SUZI (ang. *Subzonal Sperm Injection*), czyli mikrochirurgiczne wprowadzanie pod osłonkę przejrzystą oocytu wyselekcjonowanego pojedynczego plemnika, oraz ICSI (ang. *Intracytoplasmic Sperm Injection*), kiedy pojedynczy plemnik, a nawet pobrana z jądra spermatyda, przy użyciu odpowiednich mikromanipulatorów zostaje umieszczony bezpośrednio w cytoplazmie oocytu. Oba te zabiegi nie powodują uszkodzeń powstającej zygoty, a jednocześnie ułatwiają rozpoczęcie rozwoju zarodka. Techniki po przetestowaniu na zwierzętach są z powodzeniem stosowane klinicznie u człowieka (10, 11).

Aby doszło do zapłodnienia, konieczny jest proces zaplemnienia, czyli złożenia nasienia w drogach rodnych samicy, u której jednocześnie z jajników uwolnione zostały w trakcie owulacji dojrzałe oocyty. W ejakulatach ssaków może znajdować się nawet kilka miliardów plemników, a u człowieka jest ich przeciętnie około 200 milionów. Plemniki przemieszczają się z pochwy do bańkowej części jajowodu, podlegając selekcji i wielu przemianom (kapacytacji) umożliwiającymi kontakt gamet, pokonanie osłon i połączenie się obu gamet. Ostatecznie do bańki jajowodu dociera około 200 plemników, a kontakt z osłonką przejrzystą nawiązuje mniej niż 100. Badanie procesów ruchu plemników w drogach rodnych zaowocowało poznaniem procesu ich chemotaksji, czyli ukierunkowanego gradientem stężenia substancji przemieszczania się w stronę owulatu. Początkowo udało się udowodnić, że chemoatraktantem jest płyn pęcherzykowy i liczne zawarte w nim substancje, między innymi hormony i czynniki wzrostu. Obecnie za najaktywniej działającą substancję chemotaktyczną uważa się progesteron, zwłaszcza wydzielany przez komórki steroidogenne osłonki promienistej oocytu. Dzięki asymetrycznemu działaniu tego hormonu na błony komórkowe plemników zmienia on lokalnie metabolizm komórkowy, co owocuje zmianą kierunku ruchu i aktywnym ich przemieszczaniem się w stronę źródła pochodzenia chemoatraktanta, czyli w normalnym zapłodnieniu owulatu zawierającego dojrzały oocyt. Zjawisko to w naturalnych warunkach zwiększa prawdopodobieństwo kontaktu gamet, a tym samym zapłodnienia. W klasycznej metodzie zapłodnienia pozaustrojowego wymagającego wielu manipulacji gametami, jak również odbywającego się w sztucznych płynach inkubacyjnych nie może ono mieć jednak miejsca, co w praktyce rekompensowane jest wyższym stężeniem plemników w okolicy komórki jajowej (12, 13).

Plemniki powstające w kanalikach nasiennych, dojrzewające w najądrzy czy obecne w plazmie nasienia nie są zdolne do zapłodnienia. Wymagają one zmian zachodzących pod wpływem środowiska dróg rodnych samicy lub odpowiednio skomponowanych płynów inkubacyjnych. Przemiany te, których istota nie jest jeszcze ostatecznie wyjaśniona, nazywane są kapacytacją plemników. Pod wpływem czynników zawartych w płynach dróg rodnych zachodzą dynamiczne zmiany w błonie komórkowej plemników. Staje się ona bardziej płynna dzięki eliminacji cholesterolu, jednocześnie zanikają pewne białka oraz reszty cukrowe, co prowadzi od odsłonięcia receptorów odpowiedzialnych za łączenie się z osłonką przejrzystą. Błona zmienia

również właściwości cytofizjologiczne. Obserwuje się spadek potencjału błonowego i ucieczkę jonów  $K^+$  połączoną z napływem  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy. Opisano również zmiany biochemiczne, fosforylację i modyfikację właściwości biologicznych zawartych w niej białek opiekuńczych szoku cieplnego. Opisane w modelowych doświadczeniach procesy stanowią problem dla procedur klinicznych, gdyż do chwili obecnej nie udało się wyprodukować uniwersalnego płynu inkubacyjnego do sztucznej kapacytacji koniecznej przy procedurze zapłodnienia *in vitro* u człowieka (14-16).

Połączenie się plemnika i oocytu poprzedzone jest nawiązaniem kontaktu gamety męskiej z galaretowatą osłonką przejrzystą (*zona pellucida*) gamety żeńskiej. Ten swoisty gatunkowo proces nie jest jeszcze ostatecznie znany. Biorąc w nim udział specyficzne białka osłonki oznaczone jako ZP1, ZP2 i ZP3. Najważniejsze wydają się ZP3, które po przyłączeniu plemnika pobudzają w nim aktywność fosfolipazy C oraz kanałów wapniowych, a tym samym stymulują lokalną reakcję akrosomową, połączoną z wydzielaniem specyficznych enzymów, ułatwiającą pokonywanie osłonki i przemieszczenie się plemnika w stronę błony komórkowej oocytu – oolemy. Jednak jak wykazały badania prowadzone z zastosowaniem „nokautowanych”, czyli zmodyfikowanych genetycznie myszy, procesy zależne od białek ZP nie są ostatecznie konieczne do zapłodnienia. Inną grupą białek i systemów interakcji międzykomórkowych, którym przypisuje się obecnie ważną rolę, są osłonkowe białka z rodziny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloprotease domain*). Białka te po aktywowaniu przez plemniki przyspieszają i ułatwiają przebieg procesu zapłodnienia, a ich nieprawidłowe formy mogą prowadzić do niepłodności, choć mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko nie zostały jeszcze ostatecznie wyjaśnione (17-19).

Po pokonaniu osłonki przejrzystej plemnik nawiązuje bezpośredni kontakt z błoną komórkową oocytu, co powinno doprowadzić do fuzji gamet i utworzenia zygoty. Moment ten jest koniecznym warunkiem rozpoczęcia procesów rozwoju zarodka. Za nawiązywanie kontaktu błonowego odpowiedzialne są odpowiednie białka błon komórkowych obu gamet. Nie są one jednak swoiste gatunkowo, a bariery zapobiegające hybrydogenezie są obecne w osłonce przejrzystej. Badania, mające wyjaśnić mechanizmy fuzji błon gamet, są prowadzone z wykorzystaniem myszy modyfikowanych genetycznie, czyli pozbawionych możliwości syntezy białek określonego typu. Na tej drodze poznano w ostatnich latach liczne białka istotne dla poprawnego zapłodnienia. Jednym z nich jest plemnikowe białko nazwane IZUMO (nazwa ta pochodzi od japońskiej świątyni Shinto poświęconej małżeństwu). Plemniki samców myszy pozbawione możliwości jego syntezy nie nawiązują kontaktu z oolemmą i tym samym osobniki tak zmodyfikowane są całkowicie bezpłodne. W przypadku samic takim kluczowym białkiem jest CD9, gdyż samice pozbawione genu odpowiedzialnego za jego kodowanie nie zachodzą w ciążę. Jednak nie udało się jeszcze ustalić bezpośredniego związku i możliwości współdziałania obu tych białek w trakcie fuzji błon gamet (20-22).

Połączenie błon komórkowych plemnika i oocytu jest kluczowym zdarzeniem w procesie zapłodnienia. Fuzja błon gamet jest konieczna do pobudzenia całego szeregu reakcji i zdarzeń określanych jako aktywacja rozwojowa komórki jajowej. Przede wszystkim umożliwia wprowadzenie

nie jądra komórkowego plemnika zawierającego męską część materiału genetycznego do ooplazmy, stymuluje dokończenie zablokowanego w II podziale mejotycznym i wydzielania ciała kierunkowego, wyzwała reakcje zabezpieczające przed polispermia, a przede wszystkim szereg zmian cytofizjologicznych, będących treścią pierwszego cyklu komórkowego zygoty zakończonego podziałem bruzdkowania. Zmiany metaboliczne w ooplazmie decydują w pierwszym rzędzie o przekształceniu zmodyfikowanej chromatyny jądra plemnikowego i przekształceniu go w przedjądrze męskie zdolne do połączenia się (kariogamii) z przedjądrzem żeńskim w celu utworzenia diploidalnego jądra zygotycznego, co jest koniecznym warunkiem prawidłowego rozwoju zarodka i całego organizmu. Dokończenie zablokowanego w metafazie II mejozy jest możliwe po zmianie metabolizmu białek regulujących cykle komórkowe zwanych cyklinami. Stan nieaktywności wrzeczona podziałowego oocytu jest utrzymywany poprzez działanie czynnika MPF (ang. *M phase promoting factor*), którym jest kompleks cykliny B białka regulatorowego z enzymem, kinazą CDK1, enzymem z rodziny kinaz zależnych od cyklin, których aktywność wpływa na wiele procesów cytologicznych. W czasie aktywacji ma miejsce szybki rozkład i degradacja cykliny B, a tym samym obniżenie poziomu MPF. Zmiana ta prowadzi do zdjęcia bloku podziałowego i po anafazie II mejozy ekscentrycznego podziału ooplazmy, co jest widoczne jako oddzielenie się od oocytu małej, praktycznie pozbawionej cytoplazmy komórki nazywanej ciałkiem kierunkowym (23-25).

Dla zapewnienia prawidłowego rozwoju osobnika koniecznym jest uformowanie w momencie zapłodnienia diploidalnego genomu utworzonego przez materiał genetyczny matki i ojca dostarczony przez dwie gamety. Połączenie się oocytu z dwoma plemnikami, zjawisko polispermii, jest letalne i uniemożliwia rozwój. Przyczyną degeneracji takiej zygoty jest nie tylko zachwiana równowaga genetyczna, ale przede wszystkim zaburzenia procesów podziału mitotycznego poprzez formowanie nieprawidłowych, zawierających trzy bieguny podziałowe wrzeczion kariokinetycznych. Tego typu nieprawidłowości w działaniu cytoskieletu całkowicie uniemożliwiają nie tylko prawidłowy rozdział chromosomów, ale przede wszystkim formowanie regularnych bruzd podziałowych, co zawsze prowadzi do fragmentacji komórek i braku bruzdkowania. Zapewnienie monospermicznego zapłodnienia jest wynikiem tworzenia przez oocyt bloku przeciwko polispermii. Proces ten polega na zmianach w warstwie korowej ooplazmy i wydzieleniu, na drodze egzocytozy, zawartości ziaren korowych, mikropęcherzyków zawierających substancje o charakterze mukopolisacharydowym oraz enzymatycznym. Enzymatyczna zawartość ziaren wpływa na strukturę białek ZP osłonki przejrzystej, powodując jej utwardzenie, co uniemożliwia wiązanie i penetrację przez plemniki. Tak zmieniona osłonka jest również istotnym czynnikiem decydującym o prawidłowym kształtowaniu się blastocysty, jak również jej przemieszczeniu się w jajowodzie w kierunku macicy bez podejmowania przez zarodek prób implantacji. Dotarcie osłoniętego utwardzoną osłonką zarodka do macicy i tam uwolnienie się dojrzałej blastocysty jest warunkiem prawidłowego przebiegu ciąży. Procesy bloku przeciwko polispermii są stymulowane, podobnie jak cały przebieg aktywacji wzrostem w ooplazmie poziomu jonów wapnia (26, 27).

Mechanizm znanego od dawna oscylacyjnego wzrostu poziomu jonów wapniowych w ooplazmie, podstawowego stymulowania procesów aktywacyjnych, nadal jest przedmiotem intensywnych badań embriologów. Stężenie jonów wapniowych w ooplazmie w tym przypadku zależy od funkcjonowania kanałów błonowych zlokalizowanych w siateczce śródplazmatycznej. Mediatorem zamykania i otwierania tych kanałów jest trisfosfoinozytol (IP<sub>3</sub>), którego synteza zależy w komórkach od aktywności fosfolipazy C. Zależność ta sugeruje kluczowe znaczenie enzymu w procesie aktywacji metabolicznej zapłodnionego oocytu. Początkowo sugerowano, że jego aktywność zależy od odpowiednich receptorów błonowych komórki jajowej stymulowanych poprzez białka błonowe plemnika. Jednak ostatecznie udowodniono możliwość wprowadzania do ooplazmy tego enzymu z cytoplazmy plemników bezpośrednio w trakcie fuzji błon gamet. Początkowo fosfolipaza C określona została roboczo jako czynnik aktywacyjny plemnika lub oscylina. W trakcie badań biochemicznych zaklasyfikowano go ostatecznie jako specyficzną dla plemników, męską formę fosfolipazy (PLC $\zeta$ ). Wyniki tych badań stały się, między innymi, naukową podstawą opracowania najnowszych technik stosowanych w zapłodnieniu pozaustrojowym, jaką jest ICSI, gdyż wbrew wcześniejszym twierdzeniom niekonieczna jest fuzja błon gamet dla aktywacji oocytu i rozpoczęcia procesów rozwojowych, wystarczy wprowadzenie do ooplazmy jądra komórkowego gamety męskiej oraz dostarczenie chemicznego bodźca do inicjacji rozwoju (28-30).

W wyniku skomplikowanych procesów biologicznych zapłodnienia powstaje zygota, która jest na pewno komórką ludzką, ale w żadnym wypadku osobnikiem czy „osobą ludzką”. Gdyby przyjąć to ostatnie założenie, to biorąc pod uwagę ciągłość życia, należałoby uznać, że gamety, oocyt czy plemnik, jest połową istoty ludzkiej, może połową człowieka. Taki pogląd jest już krańcowo karkołomny i filozoficznie wydumany w oderwaniu od rzeczywistości i niezgodny z powszechnie przyjętymi zasadami i prawami przyrody, i mam nadzieję, że nie doczeka się szerszego propagowania nawet przez ortodoksyjnych zwolenników podporządkowywania prawd naukowych wierzeniom, legendom czy mitom. Często błędne lub niepełne założenia mają swoje źródło w niedostatecznej wiedzy naukowej ograniczonej do wiadomości wyniesionych ze szkoły, w najlepszym wypadku średniej, lub lektury artykułów pisanych przez ideologów, a nie naukowców znających najnowsze osiągnięcia światowe. Słysząc również argumenty mówiące, że literatura naukowa jest trudna i hermetyczna, ale w dyskusjach na tak ważne tematy konieczne jest opieranie się na zawartych w niej sprawdzonych eksperymentalnie i rzeczowych argumentach. □

#### Piśmiennictwo

1. Tatariewicz W: Historia filozofii. Tom I. Filozofia starożytna i średnio-wieczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005: 390. 2. Gula J:

Problemy człowieczeństwa człowieka nie narodzonego. [W:] Gałkowski JW, Gula J (red.): W imieniu dziecka poczętego. Rzym-Lublin 1991: 146-159. 3. Ford NM: Kiedy powstałem? Problem początku jednostki ludzkiej w historii, w filozofii i w nauce. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995: 140. 4. Steptoe PG, Edwards AS: Birth after the reimplantation of human embryos. *Lancet* 1978; 2: 366-367. 5. Yanagimachi R: Mammalian Fertilization. [In:] Knobil E, Neill J (eds.): *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd, New York 1994: 189-317. 6. Ikawa M, Inoue N, Benham A, Okabe M: Fertilization: a sperm journey and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 2010; 120: 984-994. 7. Krzanowska H, Sokół-Misiak W (red.): *Molekularne podstawy embriogenezy*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002: 326. 8. Kurpisz M (red.): *Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych zwierząt*. Termedia, Poznań 2002: 379. 9. Maleszewski M: Zapłodnienie i zapłodnienie *in vitro*. Nagroda Nobla z biologii lub medycyny. *Kosmos* 2010; 60: 5-16. 10. Palermo G, Devroey HJP, van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18. 11. Yanagimach R: Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in human and animals. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 247-288. 12. Śliwa L: Chemotaxation of mouse spermatozoa induced by certain hormones. *Arch Androl* 1995; 35: 105-110. 13. Śliwa L: Chemotaksja plemników – ważny a mało znany proces podczas zapłodnienia. *Folia Med Cracov* 2003; 44: 153-158. 14. Śliwa L: The effects of selected chemoattractant hormones on mouse sperm acrosome reaction *in vitro*. *Acta Biol Cracov Ser Zool* 1998; 40: 53-58. 15. Marianowski P: Molekularne aspekty procesu zapłodnienia. *Nowa Medycyna* 1999; 6: 5-6. 16. Ickowicz D, Finkelstein M, Haim B: Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 2012; 14: 816-821. 17. Clark GF: The molecular basis of mouse sperm-zona binding: a still unresolved issue in developmental biology. *Reproduction* 2011; 142: 377-381. 18. Clark GF, Dell A: Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem* 2006; 281: 13853-13856. 19. Talbot P, Shur B, Myles DG: Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2003; 68: 1-9. 20. Miyada K, Yamada G, Yamada S et al.: Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 2000 Jan 14; 287(5451): 321-324. 21. Stein KK, Primakoff P, Myles D: Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci* 2004; 117: 6269-6274. 22. Naz RK: Status of contraceptive vaccines. *J Reprod Immunol* 2009; 80: 897-904. 23. Borsuk K, Ciemierych MA, Ożdżeński W: Rozwój ssaków – mysz. [W:] Maleszewski W (red.): *Ćwiczenia z biologii rozwoju zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Warszawskiego 2007: 98-143. 24. Krauchunas AR, Wolfner MF: Molecular changes during egg activation. *Curr Top Dev Biol* 2013; 102: 267-292. 25. Papale L, Fiorentino A, Montag M, Tomasi G: The zygote. *Human Reprod* 2012; 27 (suppl. 1): 22-49. 26. Gadella BM: Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2010; 67: 267-287. 27. Raz T, Skuitelsky E, Amihai D et al.: Mechanisms leading to cortical reaction in the mammalian egg. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 295-203. 28. Miao YL, Williams CJ: Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization. *Mol Reprod Dev* 2012; 79: 742-756. 29. Kashir J, Jones C, Coward K: Calcium oscillations, oocyte activation, and phospholipase C zeta. *Adv Exp Med Biol* 2012; 740: 1095-1121. 30. Miao YL, Stein P, Jefferson WN et al.: Calcium influx-mediated signaling is required for complete mouse egg activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 4169-4174.

nadesłano: 27.02.2013

zaakceptowano do druku: 25.04.2013

Adres do korespondencji:

\*Leopold Śliwa

Zakład Biologii Rozwoju Człowieka UJ-CM

ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków

tel.: +48 (12) 422-99-49

e-mail: leosliwa@cm-uj.krakow.pl