

Oślonka przejrzysta w procesie zapłodnienia i rozwoju zarodkowym ssaka

© JADWIGA JAWORSKA-ADAMU, © ALEKSANDRA KRAWCZYK, © KAROL RYCERZ

Zakład Histologii i Embriologii, Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Otrzymano 29.09.2021

Zaakceptowano 01.12.2021

Jaworska-Adamu J., Krawczyk A., Rycerz K.

Zona pellucida in the process of fertilization and mammal embryonal development

Summary

In mammals, oocytes, fertilized eggs and pre-implantation embryos are surrounded by an acellular zona pellucida (*zona pellucida* – ZP). This structure has a fibro-spongy character but it undergoes constant modifications throughout its existence depending on many internal and external factors. ZP consists of glycoproteins marked as ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4, the presence of which is species different. ZP1 and probably ZP4 molecules stabilize the fibrillary skeleton of the zona pellucida formed of ZP2 and ZP3 protein polymers which are ligands for specific spermatozoid receptors. The oligosaccharide chains of ZP3 are responsible for the primary attachment of the male gamete which induces the acrosomal reaction. ZP2 enhances this connection by secondary binding to an acrosome-free spermatozoid. Additionally, oviductal specific glycoprotein 1 which plays a role in interspecific oocyte-sperm interactions, appears around the postovulatory oocyte surrounded by ZP. In addition, this protein modifies the resistance of ZP to the action of proteases released as a result of the cortical reaction during polysperma block. After fertilization, ZP not only protects the egg and then the embryo until implantation, but also has an embryotrophic effect. Understanding the molecular basics of the structure and properties of ZP can significantly improve animal fertility as well as reproductive rates.

Keywords: zona pellucida, oocyte, fertilisation, glycoproteins

Komórki jajowe ssaków otoczone są bezkomórkową macierzą zwaną osłonką przejrzystą (*zona pellucida* – ZP). Otoczka ta lokalizuje się między wewnętrzną warstwą komórek pęcherzykowych a błoną komórkową jaja. Między nimi znajduje się niewielka przestrzeń okołożółtkowa. ZP wytwarzana jest podczas oogenezy w rozwijających się pęcherzykach jajnikowych. Jej grubość wzrasta wraz z powiększaniem się średnicy komórki jajowej i pęcherzyka (59).

Poowulacyjne oocyty także otoczone są ZP, która warunkuje zapłodnienie. W procesie tym plemnik musi pokonać osłonkę, aby dotrzeć do oolemy, z którą ostatecznie ulega fuzji. U ssaków ZP stanowi barierę dla międzygatunkowego zapłodnienia. Po związaniu jaja z plemnikiem uniemożliwia dalsze wiązanie i penetrację nadliczbowych gamet męskich do zapłodnionego jaja w bloku polispermii (6, 19, 36, 46, 59). ZP odgrywa także rolę we wczesnym rozwoju zarodków do czasu implantacji blastocysty w macicy (19, 30). Przez cały okres swojego istnienia osłonka ta ulega strukturalnym i biochemicznym zmianom pod wpływem plemnika, jak też różnych czynników, w tym środowiskowych (15).

Skomplikowane mechanizmy powyższych procesów interesują naukowców od lat, jednakże wiele ich aspektów pozostaje dotychczas niewyjaśnionych. Poznanie ich molekularnych podstaw związanych z budową ZP może dostarczyć lepszego zrozumienia przyczyn niepłodności oraz poprawić wydajność stosowanych obecnie technik wspomaganego i kontrolowanego rozrodu u zwierząt.

Struktura osłonki przejrzystej

ZP jako bezkomórkowa, półprzeźroczysta, glikoproteinowa macierz ma charakter włóknisto-gąbczasty. Osłonka ta stale ulega dynamicznym zmianom (59). We wczesnych pęcherzykach jajnikowych ma ona formę kłaczków. W późniejszych etapach, gdy oocyt rośnie, staje się ciągłą warstwą o wzrastającej gęstości i większym stopniu polimeryzacji (9, 26, 27). Grubość ZP różni się między gatunkami ssaków, co zależy od średnicy jaja (27). U oposa wynosi ona 1-2 μm , u myszy 5 μm , u człowieka 13-16 μm , natomiast u świni i bydła do 27 μm (16, 17, 22). W otoczce tej wyróżnia się warstwy: wewnętrzną, rdzeniową i zewnętrzną w odniesieniu do biochemicznych i fizycznych właści-

wości (21, 44). Wykorzystanie technik cytochemicznych do badań w mikroskopie elektronowym transmisyjnym oocytów świni *in vitro* pozwoliło na ujawnienie gęstej, fibrylarnej, mniej zwartej i uporządkowanej sieci w wewnętrznej i zewnętrznej warstwie. Ponadto nierówna powierzchnia zewnętrzna ZP posiadała pory. Natomiast rdzeniowa warstwa osłonki cechowała się gęstą strukturą nałożonych na siebie warstw pęczków fibryli. Taki układ może kontrolować przepuszczalność ZP, nadając jej półsztywność i elastyczność oraz ułatwiać plemnikom penetrację osłonki przejrzystej (23). Podobną budowę osłonki zaobserwowano u myszy, kota i psa (24). Obecność porów w ZP potwierdzono także u wielu innych gatunków ssaków przy użyciu transmisyjnego i niskopróżniowego skaningowego mikroskopu elektronowego. Szerokie i zwarte pory wykazano w osłonce m.in. u człowieka, myszy, konia, bydła, kota i psa (4, 21, 34, 38, 39). Największe pory były obserwowane w ZP królika i kota, zaś najmniejsze u bydła. Ponadto wykazano, że pory te były większe na zewnętrznej powierzchni ZP w porównaniu z jej wewnętrzną powierzchnią (18). U bydła ultrastrukturalne badania wykazały większą liczbę porów w osłonce dojrzałego oocytu w porównaniu do niedojrzałego jaja, jednakże ich rozmiar i kształt nie ulegają zmianie (4). Dodatkowo badania wykazały, że pory ZP zawierają cytoplazmatyczne wypustki komórek pęcherzykowych, prawdopodobnie w celu komunikacji z oocytom za pomocą złącz szczelinowych, co umożliwia dostarczenie do jaja substancji odżywczych (34, 38, 39).

Synteza osłonki przejrzystej

Osłonka przejrzysta u ssaków zbudowana jest z glikoprotein, których pochodzenie nie jest do końca poznane. Dowody wskazują, że białka te mogą być produkowane tylko przez oocyt, przez same komórki pęcherzykowe bądź też przez oba rodzaje komórek (27, 52). U myszy, szczura i chomika glikoproteiny ZP produkowane są jedynie przez oocyt (8, 32). Mysie komórki jajowe pierwotnych pęcherzyków nie wyrażają ekspresji białek ZP. Ich produkcja rozpoczyna się we wzrastających pęcherzykach jajnikowych (34, 48, 57). Badania skrawków jajników kota traktowanych przeciwciałem przeciwko osłonce pozwoliły na stwierdzenie produkcji glikoprotein wyłącznie przez komórki pęcherzykowe w każdym etapie rozwoju pęcherzyka jajnikowego (33). Natomiast u człowieka, świni, bydła, psa, królika i małpy glikoproteiny produkowane są zarówno przez oocyt, jak i komórki pęcherzykowe. Proces ten zachodzi głównie we wzrastających pęcherzykach. U człowieka wykazano, że synteza i gromadzenie glikoprotein rozpoczyna się już w oocycie pierwotnych pęcherzyków (25). U konia produkcja białek osłonki przez oocyt zachodzi wolno i w nieznacznym stopniu, stąd w ich syntezę szczególnie zaangażowane są komórki pęcherzykowe (34). Badania prowadzone *in vivo* wykazały, że

u konia ekspresja glikoprotein pojawia się w oocytach w późnych pierwotnych pęcherzykach jajnikowych. Następnie ich synteza zachodzi w komórce jajowej, jak też w komórkach pęcherzykowych. W dojrzałych pęcherzykach komórka jajowa hamuje produkcję glikoprotein, podczas gdy komórki pęcherzykowe kontynuują ich syntezę w przeciwieństwie do bydła i świni, dlatego uważa się, że komórki pęcherzyka jajnikowego konia mają kluczowe znaczenie dla integralności osłonki (34).

Glikoproteiny osłonki przejrzystej

Podstawowymi składnikami osłonki są trzy glikoproteiny ZP1 (ZPB), ZP2 (ZPA) i ZP3 (ZPC) (29, 46) wykazane u myszy i konia (3, 34). Dodatkowo wykryto czwartą glikoproteinę ZP4 u człowieka, makaka, szczura, chomika i kota domowego (6, 27, 29, 42, 53, 55). Natomiast u bydła, świni, delfina, psa i lisa nie zidentyfikowano glikoproteiny ZP1 (40, 60).

Pod względem chemicznym glikoproteiny złożone są z polipeptydów połączonych z łańcuchami oligosacharydowymi wiązaniami N- i O-glikozydowymi. W ZP3 łańcuch polipeptydowy składa się z ok. 400 aminokwasów oraz krótkich odgałęzień oligosacharydowych zawierających cukry proste (56). Glikoproteiny u poszczególnych gatunków zwierząt różnią się w ilości i rozmieszczeniu budujących je aminokwasów (45). U człowieka i myszy wykazano, że glikoproteiny osłonki są białkami konserwatywnymi. U człowieka rodzina genów kodujących ZP2 i ZP3 jest w 60-70% identyczna jak u myszy. Sekwencja aminokwasów ludzkiej glikoproteiny ZP2 jest identyczna w 57% z myszą oraz w 64% i 94,2% z obecną u świni i makaka. Ludzka ZP3 jest podobna w 67% do mysiej, a 74% do świńskiej i 93,9% do występującej u makaka. Ludzka ZP1 jest podobna w 64% do mysiej i w 96% do obecnej u makaka. Glikoproteina ZP4 strukturalnie wykazuje podobieństwo do ZP1, a jej sekwencja jest identyczna w 68% ze świńską i 92% wykrytą u makaka (27, 37).

Glikoproteiny są elementem strukturalnym osłonki przejrzystej, tworząc jej włókniste rusztowanie. U myszy wykazano, że ZP zbudowana jest z dimerów ZP3 i ZP2, które polimeryzują w długie filamenty. Struktury te wiązane są ze sobą krzyżowo cząsteczkami ZP1 zawierającymi dwa polipeptydowe łańcuchy zespolone mostkami disiarczkowymi. Białko to stanowi element stabilizujący osłonkę, na powierzchni której rozmieszczone są liczne glikoproteiny ZP3 (6, 28, 56). Za polimeryzację w fibryle odpowiadają duże domeny ZP występujące w glikoproteinach w postaci sfaldowanej trójlistnej kończyny (23, 26, 36).

Glikoproteiny ZP1 i ZP2 w osłonce przejrzystej niedojrzałych oocytów chomika i myszy wspólnie tworzą warstwę o masie cząsteczkowej 110-170 kDa, natomiast cząsteczki ZP3 są zlokalizowane w warstwie o niższej masie cząsteczkowej (55-70 kDa) (41).

U wielu gatunków ssaków (królika, świni, bydła, myszy, chomika, pawiana, rezusa i człowieka) wokół oocytów poowulacyjnych dodatkowo pojawia się jajowodowa specyficzna glikoproteina 1 (owiduktyna) (*oviduct-specific glycoprotein*, OVGP1). Białko to produkowane jest przez komórki wydzielnicze nabłonka jajowodu i wchodzi w skład płynu jajowodowego. U świni największe jej stężenie wykazano w lejku i bańce jajowodu. OVGP1 jest białkiem konserwatywnym (50). Jajowodowa glikoproteina u bydła, owcy i świni jest podobna pod względem długości oraz sekwencji aminokwasów. Podobną zależność wykazano pomiędzy OVGP1 u człowieka, rezusów i pawianów. Glikoproteinę tę wykazano nie tylko w ZP oocyta, ale także zarodków we wczesnym etapie rozwoju. Ponadto stwierdzono jej obecność w przestrzeni okołozółtkowej oraz oolemie jaja (50). Powinowactwo do osłonki przejrzystej posiadają także inne związki obecne w płynie jajowodowym u różnych gatunków zwierząt. Wśród nich należy wyróżnić m.in. osteopontynę (OPN) czy laktoferynę (40).

Funkcje glikoprotein osłonki przejrzystej

Glikoproteiny osłonki przejrzystej stanowią zasadniczy i integralny element strukturalny. Wśród nich ZP1, jak i prawdopodobnie ZP4 uważane są za kluczowe w stabilizacji jej włóknistej struktury (6, 28).

Glikoproteiny ZP odgrywają ważną rolę w interakcji plemnik–jajo oraz we wczesnym rozwoju zarodka. Myszy ze znokautowanym genem kodującym ZP3 były niepłodne. Ponadto u osobników homozygotycznych pod względem mutacji w genie tego białka oocyty nie posiadały osłonki przejrzystej. Natomiast ZP komórek jajowych myszy heterozygotycznych były cieńsze w porównaniu do form dzikich (27, 48). Podobnie brak osłonki przejrzystej lub jej ścięczenie obserwowano także w oocytach myszy pozbawionych genu ZP2. Natomiast u szczepów myszy ze znokautowanym genem ZP1 wykazano zmniejszoną płodność. Wokół oocytów obecna była osłonka przejrzysta o wyraźnie luźniejszej strukturze, co przemawiać może za udziałem ZP1 w stabilizacji jej struktury (3, 40). Natomiast badania króliczej osłonki przejrzystej pozbawionej glikoproteiny ZP4 dowiodły, że jest ona cieńsza, bardziej przepuszczalna i posiada niezorganizowaną porowatą strukturę. Zmiana ta nie ma jednak wpływu na przebieg owulacji, zapłodnienie i rozwój blastocysty *in vitro*. Natomiast *in vivo* zaobserwowano poważne zaburzenia rozwoju zarodków pozbawionych ZP4 (35).

Podczas zapłodnienia białka ZP uczestniczą w rozpoznaniu i związaniu gamet, stanowiąc ligandy dla swoistych receptorów plemnika. Badania *in vitro* wykazały, że izolowane i oczyszczone glikoproteiny selektywnie przyłączają się do miejsc wiążących zlokalizowanych w błonie komórkowej plemnika pokrywającej nienaruszony aksosom (23, 26, 36). Ligandem osłonki rozpoznawalnym przez receptory

powierzchniowe gamety męskiej jest ZP3. Boczne łańcuchy oligosacharydów tego białka odpowiadają za pierwszorzędowe (pierwotne) wiązanie z plemnikiem. Proces ten wyzwała reakcję akrosomową w gamecie męskiej (27, 49).

Z akrosomem plemnika poza ZP3 wiąże się także glikoproteina ZP4, co wykazano m.in. u królika (46). Zjawisko to potwierdzono także badaniami immunofluorescencyjnymi oczyszczonych, rekombinowanych ludzkich ZP3 i ZP4 znakowanych izotiocytrianem – fluoresceiną (FITC) (12). U bydła natomiast wykazano obecność heterokompleksu ZP3/ZP4, który bierze udział w wiązaniu plemnika (54). Na skutek reakcji akrosomowej w gamecie męskiej dochodzi do odsłonięcia macierzy akrosomu zdolnej do związania z ZP2. Połączenie to zwane jest drugorzędowym (wtórnym) i przyczynia się do stabilizacji już istniejącego wiązania osłonki przejrzystej z plemnikiem (11, 31, 58). Izolowane ZP2 zachowuje się odmiennie w porównaniu do ZP3. Białko to nie zapoczątkowuje reakcji akrosomowej ani nie stymuluje hyperaktywacji plemnika. Poza tym wiąże się z pozaakrosomową częścią główki gamety męskiej dopiero po reakcji akrosomowej (23, 26). Badania z użyciem mysiego oocyta i ludzkich glikoprotein wykazały, że plemnik człowieka przyłączył się do osłonki przejrzystej tylko w obecności ZP2, czego nie zaobserwowano w stosunku do ZP1, ZP3 i ZP4 (3). Reakcja akrosomowa prowadzi do aktywacji i uwolnienia licznych enzymów trawiących osłonkę przejrzystą, jednakże miejsca wiążące proteiny są tymczasowo maskowane przez OVGP1, co wydłuża czas trwania ZP. Proces ten zwany jest dojrzewaniem osłonki i pozwala na selektywny wybór plemnika zapładniającego oocyt (5, 14). Ponadto przypuszcza się, że połączenie OVGP1 z ZP ma znaczenie w międzygatunkowych specyficznych interakcjach oocyt–plemnik (51). Aktywność OVGP1 jest zróżnicowana gatunkowo. U myszy ze znokautowanym genem OVGP1 nie zaobserwowano różnic w częstości zapłodnienia komórek jajowych w porównaniu z myszami kontrolnymi. Wyniki te sugerują, że OVGP1 nie odgrywa kluczowej roli w zapłodnieniu u tego gatunku zwierząt. Podobnie u konia i szczura, u których nie wykazano jej obecności w jajowodzie (2).

Glikoproteiny osłonki przejrzystej odgrywają także znaczącą rolę we wczesnym rozwoju zarodka. ZP otacza rozwijające się embriony, aż do momentu implantacji w macicy. Stąd też uważa się, że osłonka przejrzysta zaangażowana jest w rozwój blastocysty i zapobiega zagnieżdżeniu zarodka w jajowodzie (ciąża pozamaciczna) (59). Kluczową rolę przypisuje się właściwościom strukturalnym ZP4, które zapewniają właściwą ochronę zarodka podczas rozwoju przedimplantacyjnego (35). Funkcję embriotroficzną przypisuje się także OVGP1. Inkubacja *in vitro* owczych oocytów i plemników z tą glikoproteiną skutkowała wzrostem częstości podziałów i liczby blastocyst.

Ten ostatni efekt osiągnięto także, hodując zarodki w obecności OVGP1 (1, 10).

Modyfikacje osłonki przejrzystej po zapłodnieniu

U ssaków w wyniku fuzji plemnika z oolemą rozwija się szereg mechanizmów zabezpieczających przed wnikaniem kolejnych plemników, co określa się mianem bloku polispermii. Zjawisko to zachodzi na poziomie osłonki przejrzystej, jak też oocytu. Blok polispermii głównie na poziomie ZP odgrywa znaczącą rolę u człowieka, psa i chomika syryjskiego. U królika i kreta zachodzi na poziomie oolemy i przestrzeni okołozółtkowej. Natomiast u myszy, szczura, kota i kawaii domowej mechanizmy ograniczające fuzję wielu plemników z oocytem rozwijają się w podobnym stopniu na obu tych poziomach (11).

Blok polispermii dotyczący ZP zachodzi na skutek kontaktu plemnika z oolemą. Osłonka ulega wówczas enzymatycznym modyfikacjom przez zawartość ziaren korowych stanowiących organella wydzielnicze oocytu. Ziarna korowe ulegają fuzji z oolemą i na drodze egzocytozy uwalnianie są enzymy (proteazy, glikozydazy, peroksydaza, kwaśna fosfataza) lektyny i cynk do przestrzeni okołozółtkowej (13, 19, 43). U myszy ZP cechuje się w tym czasie zmniejszeniem zawartości porów w wyniku wzrostu jej gęstości (47). Zgodnie z obserwacjami ludzkich embrionów w mikroskopie elektronowym sugeruje się, że wiązki filamentów na wewnętrznej powierzchni ZP ulegają fuzji i kondensacji (20).

Enzymy uwalniane z ziaren korowych modyfikują glikoproteiny ZP3 i ZP2. Zjawisko to zwane jest reakcją osłony i rozwija się w ciągu minuty od momentu kontaktu plemnika z ooplazmą (7). W ZP3 zmianom ulega struktura łańcuchów oligosacharydowych pod wpływem glikozydazy. Natomiast ZP2 na skutek działania proteinaz (owostacyny – astacyny z rodziny metaloendoproteaz) ulega rozszczepieniu, co uniemożliwia dalsze przyłączanie plemników. Mutacja genu kodującego to białko skutkuje obecnością nienaruszonego ZP2 i możliwością dalszego wiązania plemników mimo wcześniejszego zapłodnienia i reakcji korowej (3, 13). W następstwie tych enzymatycznych modyfikacji ZP twardnieje i traci właściwości ligandu dla receptorów plemnika (59). Wśród innych czynników związanych z twardnieniem osłonki po zapłodnieniu wymienić należy także opisaną wcześniej OVGP1. Białko to może modyfikować oporność do proteolizy, kontrolując tym samym polispermie (50). OVGP1 pozostaje związana z ZP do stadium blastocysty np. u bydła (10). Dodatkowo wykazano, że uwalniane z ziaren korowych lektyny także mogą blokować wiązanie plemnika. Natomiast cynk powoduje wzrost gęstości ZP oraz grubości fibryli, przez co również może odgrywać istotną rolę w blokowaniu polispermii (47).

Interakcje plemnik–oocyt to niezwykle skomplikowany pod względem molekularnym, biochemicznym

i ultrastrukturalnym zespół swoistych gatunkowo procesów. W ich przebiegu kluczową rolę odgrywa glikoproteinowa ZP, która wpływa na przebieg oogenezy, zapłodnienia i przedimplantacyjne zarodki. Stąd poznanie molekularnych podstaw związanych z jej budową oraz właściwościami może w istotny sposób poprawić płodność zwierząt, jak również wskaźniki reprodukcji.

Piśmiennictwo

1. Abe H., Hoshi H.: Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology* 1997, 23, 171-183.
2. Araki Y., Nohara M., Yoshida-Komiya H., Kuramochi T., Ito M., Hoshi H., Shinkai Y., Sendai Y.: Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization. *Biochem. J.* 2003, 374, 551-557.
3. Avella M. A., Xiong B., Dean J.: The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Mol. Hum. Reprod.* 2019, 19, 279-289.
4. Báez F., Camargo A., Gestal G. D. A.: Ultrastructural imaging analysis of the zona pellucida surface in bovine oocytes. *Microsc. Microanal.* 2019, 25, 1032-1036.
5. Bedford J. M.: Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2004, 79, 429-460.
6. Bhakia H. H., Refai F. H., Avella M. A.: The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *Development* 2019, 146, 1-13.
7. Bielański A., Eaglesome M. D., Ruhnke H. L., Hare W. C. D.: Isolation of *Mycoplasma bovis* from intact and microinjected preimplantation bovine embryos washed or treated with trypsin or antibiotics. *J. Vitro Fert. Embryo Transf.* 1989, 6, 236-241.
8. Bleil J. D., Wassarman P. M.: Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 1980, 20, 873-882.
9. Bokhove M., Jovine L.: Structure of zona pellucida module proteins. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2018, 130, 413-442.
10. Buhi W. C.: Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 2002, 123, 355-362.
11. Bukowska D., Kempisty B., Zaorska K., Antosik P., Pawłowska J., Nowicki M.: Molecular aspects of sperm-oocyte activation during mammalian fertilization. *Med. Weter.* 2014, 70, 269-273.
12. Chakravarty S., Kadunganattil S., Bansal P., Sharma R. K., Gupta S. K.: Relevance of glycosylation of human zona pellucida glyco-proteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis. *Mol. Reprod. Dev.* 2008, 75, 75-88.
13. Coy P., Aviles M.: What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2010, 85, 593-605.
14. Coy P., Canovas S., Mondejar I., Saavedra M. D., Romar R., Grullon L., Matas C., Aviles M.: Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 15809-15814.
15. Drobnis E. Z., Andrew J. B., Katz D. F.: Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: Is zona hardening a mechanical phenomenon. *J. Exp. Zool.* 1988, 245, 206-219.
16. Dunbar B. S., Avery S., Lee V., Prasad S., Schwahn D., Schwoebel E., Skinner S., Wilkins B.: The mammalian zona pellucida: Its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and development expression. *Reprod. Fertil. Dev.* 1994, 6, 331-347.
17. Dunbar B. S., Maresh G. A., Washenik K.: Ovarian development and formation of the mammalian zona pellucida. [w:] Dietl J. J. (red.): *The mammalian egg coat: structure and function.* Springer Berlin 1989, 38-48.
18. Dudkiewicz A., Williams W.: Fine structural observations of the mammalian zona pellucida by scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microsc.* 1977, 317-324.
19. Fahrenkamp E., Algarra B., Jovine L.: Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 2020, 87, 326-340.
20. Familiari G., Heyn R., Relucenti M., Sathananthan H.: Structural changes of zona pellucida during fertilization and embryo development. *Front. Biosci.* 2008, 13, 6730-6751.
21. Familiari G., Relucenti M., Heyn R., Micara G., Correr S.: Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc. Res. Tech.* 2006, 69, 415-426.
22. Fléchon J. E., Kopečný V., Pivko J., Pavlok A., Motlik J.: Texture of zona pellucida of the mature pig oocyte. The mammalian egg envelope revised. *Reprod. Nutr. Dev.* 2004, 44, 207-218.

23. Florman H. M., Jungnickel M. K., Sutton K. A.: Regulation of the acrosome reaction. *Int. J. Dev. Biol.* 2008, 52, 503-510.
24. Greve J. M., Wassarman P. M.: Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.* 1985, 181, 253-264.
25. Gook D. A., Edgar D. H., Borg J., Martic M.: Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 2008, 23, 394-402.
26. Gupta S. K., Bansal P., Ganguly A., Bhandari B., Charakabarti K.: Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 2009, 83, 50-55.
27. Gupta S. K., Bhandari B., Shrestha A., Biswal B. K., Palaniappan C., Malhotra S. S., Gupta N.: Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res.* 2021, 349, 665-678.
28. Gupta S. K., Chakravarty S., Suraf K., Bansal P., Ganguly A., Jain M. K., Bhandari B.: Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007, 63, 203-216.
29. Harris J. D., Hibler D. W., Fontenot G. K., Hsu K. T., Yurewicz E. C., Sacco A. G.: Cloning and characterization of zona pellucida genes cDNA from variety of mammals species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 1994, 4, 361-393.
30. Hasegawa A., Fukus A., Shibahara H.: The current perspectives on the mammalian zona pellucida. *J. Mamm. Ova Res.* 2017, 34, 57-64.
31. Ikawa M., Inoue N., Benham A. M., Okabe M.: Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J. Clin. Invest.* 2010, 120, 984-994.
32. Izquierdo-Rico M. J., Gimeno L., Jimenez-Cervantes C., Ballesta J., Aviles M.: Biosynthesis of hamster zona pellucida is restricted to the oocyte. *Theriogenology* 2011, 75, 463-472.
33. Jewgenow K., Rudolf M.: Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats – An ultrastructural immunohistochemical investigation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2001, 57, 23-29.
34. Kölle S., Dubois C. S., Caillaud M., Lahuec C., Sinowatz F., Goudet G.: Equine zona protein synthesis and ZP structure during folliculogenesis, oocyte maturation, and embryogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 2007, 74, 851-859.
35. Lamas-Toranzo I., Balvis N. F., Querejeta-Fernández A., Izquierdo-Rico M. J., González-Brusi L., Lorenzo P. L., García-Rebollar P., Avilés M., Bermejo-Álvarez P.: ZP4 confers structural properties to the zona pellucida essential for embryo development. *eLife* 2019, 8, 1-18.
36. Litscher E. S., Wassarman P. M.: Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol. Histopathol.* 2007, 22, 337-347.
37. Louros N. N., Iconomidou V. A., Giannelou P., Hamdrakas S. J.: Structural analysis of peptide-analogues of human zona pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: Insights into mammalian zona pellucida formation. *PLoS One* 2013, 8, 1-10.
38. Lunn M. O., Wright S. J.: Imaging the zona pellucida of canine and feline oocyte using scanning electron microscopy. *Microsc. Microanal.* 2009, 15, 2-14.
39. Martinova Y., Petrov M., Mollova M., Rahhev P., Ivanova M.: Ultrastructural study of cat zona pellucida during oocyte maturation and fertilization. *Animal Reprod. Science* 2008, 108, 425-434.
40. Moros-Nicolás C., Chevret P., Jiménez-Movilla M., Algarra B., Cots-Rodríguez P., González-Brusi L., Avilés M., Izquierdo-Rico M. J.: New insights into mammalian egg zona pellucida. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 2, 1-22.
41. Oikawa T., Sendai Y., Kurata S., Yanagimachi R.: A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Res.* 1988, 19, 113-122.
42. Okabe M.: The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 2013, 140, 4471-4479.
43. Papi M., Brunelli R., Sylla L., Parasassi T., Monaci M., Mauluci G., de Spirito M.: Mechanical properties of zona pellucida hardening. *Eur. Biophys.* 2010, 39, 987-992.
44. Pavani K. C., Rocha A., Oliveira E., Moreira da Silva Sousa M.: Novel ultrastructural findings in bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 2020, 143, 88-97.
45. Pavlok A.: Interaction of the plasma membrane of mouse, rat and hamster oocytes with human spermatozoa in vitro. *Folia Biol. (Praha)* 1980, 26, 188-193.
46. Prasad S. V., Skinner S. M., Carino C., Wang N., Cartwright J., Dunbar B. S.: Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs* 2000, 166, 148-164.
47. Que E. L., Duncan F. E., Bayer A. R., Philips S. J., Roth E. W., Bleher R., Halloran T. V.: Zinc sparks induce phyiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Integr. Biol.* 2017, 9, 135-144.
48. Rankin T., Familiari M., Lee E., Ginsberg A., Dwyer N., Blanchette-Mackie J., Drago J., Westphal H., Dean J.: Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 1996, 122, 2903-2910.
49. Rankin T., Soyol S., Dean J.: The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000, 163, 21-25.
50. Rapala Ł., Starzyński R., Trzeciak P., Duszewska A. M.: Structure and function oviduct-specific glycoprotein 1. *Postępy Biol. Kom.* 2011, 38, 507-516.
51. Schmidt A., Mavrogianis P. A., O'Day-Bowman M. B., Verhage H. G.: Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 46, 201-207.
52. Sinowatz F., Kölle S., Töpfer-Petersen E.: Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cell Tissues Organs* 2001, 168, 24-35.
53. Stetson I., Avila M., Moros C., García-Vázquez F. A., Gimeno L., Torrecillas A., Alpaga C., Bernardo-Pisa M. V., Ballesta J.: Four glycoproteins are expressed in the cat zona pellucida. *Theriogenology* 2015, 83, 1162-1173.
54. Suzuki K., Tatebe N., Kojima S., Hamano A., Orita M., Yonezawa N.: The hinge region of bovine zona pellucida glycoprotein ZP3 is involved in the formation of the sperm-binding active ZP3/ZP4 complex. *Biomolecules* 2015, 5, 3339-3353.
55. Topper E. K., Kruijt L., Calvete J., Mann K., Töpfer-Petersen E., Woelders H.: Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol. Reprod. Development* 1997, 46, 344-350.
56. Vanderhyden B. C., Laughlin M. C., Rutledge J. M., Armstrong D. T.: Zona drilling increases the penetrability of rat oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 1989, 40, 953-960.
57. Wassarman P. M.: Zona pellucida glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 24285-24289.
58. Wassarman P. M., Jovine L., Litscher E. S.: Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet. Genom Res.* 2004, 105, 228-234.
59. Wassarman P. M., Litscher E. S.: Mammalian fertilization the egg's multipotential zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* 2008, 52, 665-676.
60. Yonezawa N., Kanai-Kitayama S., Kitayama T., Hamano A., Nakano M.: Porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 is responsible for the sperm-binding activity of the ZP3/ZP4 complex. *Zygote* 2012, 20, 389-397.

Adres autora: dr Aleksandra Krawczyk, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: aleksandra.krawczyk@up.lublin.pl