

ХЕТЧИНГ БЛАСТОЦИСТЫ У ЧЕЛОВЕКА

© 2017 г. Р. А. Шафеи^{а, *}, А. Г. Сыркашева^б, А. Ю. Романов^б, Н. П. Макарова^б,
Н. В. Долгушина^б, М. Л. Семёнова^а

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

^бНаучный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

*E-mail: 8329162@gmail.com

Поступила в редакцию 29.08.2016 г.

Ооцит человека окружен блестящей оболочкой — *zona pellucida* — эластичным, прозрачным внеклеточным матриксом, состоящим из специфических гликопротеинов. Блестящая оболочка сохраняется после оплодотворения и окружает развивающийся эмбрион человека на протяжении нескольких дней. Перед имплантацией эмбриону необходимо выйти из блестящей оболочки, чтобы установить клеточные контакты между трофэктодермой и эпителием эндометрия. Выход эмбриона из *zona pellucida* осуществляется на стадии бластоцисты и носит название “хетчинг”. В процессе хетчинга бластоциста разрывает блестящую оболочку и совершает активные движения для выхода через образовавшуюся в оболочке щель. Если микроскопическое описание хетчинга общеизвестно, то биохимические и цитологические основы хетчинга остаются малоизученными. Разрыв блестящей оболочки происходит под действием двух сил: механического давления растущей бластоцисты на оболочку и химическим растворением материала оболочки выделяемыми литическими ферментами. Существует лишь одна работа (Sathananthan et al., 2003), описывающая специализированные клетки в составе трофэктодермы, которые локально растворяют блестящую оболочку, способствуя появлению отверстия для выхода бластоцисты. Учитывая единичность работы и отсутствие развития данной темы самими авторами в последующее десятилетие, следует допускать существование специализированных клеток хетчинга с большой осторожностью. Литические ферменты, выделяемые клетками трофэктодермы для растворения блестящей оболочки, различны. В зависимости от вида млекопитающего, в процессе хетчинга принимают участие разные классы протеиназ: сериновые, цистеиновые, металлопротеиназы. Протеиназы, выделяемые трофэктодермой человека, не описаны. Еще в меньшей степени изучены механизмы активного движения бластоцисты при вылуплении. Показано лишь участие цитоскелета клеток трофэктодермы в механизме сжатия бластоцисты, и высказывается предположение об участии десмосом в согласованном изменении формы клеток трофэктодермы при сжатии. В данном обзоре обобщены данные литературы о возможных механизмах хетчинга в развитии эмбрионов человека, полученные в экспериментах *in vitro*, а также на животных моделях.

Ключевые слова: хетчинг, блестящая оболочка, *zona pellucida*, стрипсин, катепсин L, овастацин, SK3, эмбрион, экстракорпоральное оплодотворение

DOI: 10.7868/S0475145017010116

ВВЕДЕНИЕ

Ооцит человека (как и других млекопитающих животных) окружен слоем внеклеточного матрикса, называемого *zona pellucida*. В русской научной литературе традиционно используются термины “блестящая оболочка”, или реже “прозрачная оболочка”.

Оболочка ооцита человека построена из гликопротеинов, она эластична, прозрачна и имеет толщину 14–18 мкм (Balakier et al., 2012). *Zona pellucida* появляется у ооцитов в период роста, на стадии преантральных фолликулов, приблизи-

тельно за 3 месяца до овуляции (Odor and Blandau, 1969; Dietl, 1989; Jovine et al., 2007; Wassarmann, 2008), но основную роль играет в процессе оплодотворения и развития зародыша до имплантации. Достоверно известны три функции блестящей оболочки: узнавание сперматозоидами ооцита и запуск акросомной реакции (Clark, 2013), блок полиспермии (после оплодотворения *zona pellucida* теряет профиль узнавания сперматозоидами) (Sun, 2003) и удержание бластомеров вместе в период дробления (Bronson and McLaren, 1970; Suzuki et al., 1995). В научной литературе высказываются предположения и о других ее функ-

циях, например, участие в нормальном протекании фолликуло- и оогенеза (Wassarman and Litscher, 2012). После оплодотворения яйцеклетки блестящая оболочка сохраняется, таким образом, формирующийся эмбрион развивается внутри *zona pellucida* пока не достигнет стадии бластоцисты, которая осуществит выход из блестящей оболочки.

Перед имплантацией эмбриону необходимо освободиться от блестящей оболочки, чтобы осуществить непосредственный клеточный контакт с эпителием эндометрия. Процесс выхода эмбриона из *zona pellucida* называют хетчингом (от англ. *hatching* – вылупление). Хетчинг сопровождается частичным разрывом блестящей оболочки и последующим динамическим перемещением эмбриона в наружную среду. Процесс хетчинга происходит на стадии бластоцисты приблизительно на 5–6 день после оплодотворения и занимает несколько часов (Гоголевский, 1998; Sathananthan et al., 2003; Seshagiri et al., 2009). Только после выхода из *zona pellucida* бластоциста способна осуществить имплантацию в эндометрий матки и продолжить свое развитие.

Далеко не всем бластоцистам удается осуществить хетчинг. По некоторым данным, полученным *in vitro*, до 75% всех морфологически нормальных бластоцист человека оказываются неспособны к самостоятельному выходу из блестящей оболочки (Thurin et al., 1998). Неспособность к хетчингу может являться одной из важных причин привычной неудачи имплантации у человека (Seshagiri et al., 2009).

Несмотря на большое количество исследований, проведенных на животных моделях и эмбрионах человека *in vitro*, биомеханические и молекулярные механизмы хетчинга до сих пор неизвестны в полной мере и требуют дальнейшего изучения. Большую сложность в изучении механизмов выхода бластоцисты из оболочки, а также в строении и функционировании *zona pellucida* вообще, представляет разнообразие этих процессов у разных видов животных. В этой связи достаточно трудно проводить параллель между данными по хетчингу у человека и лабораторных животных.

СТРОЕНИЕ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ

Блестящая оболочка млекопитающих представляет собой разновидность желточных оболочек яйцеклеток позвоночных животных. Анализ структуры генов, кодирующих белки *zona pellucida* у млекопитающих и генов желточных оболочек других классов позвоночных показывает эволюционное родство этих структур и общность происхождения всех желточных оболочек позвоночных (Goudet et al., 2008).

Все белки ZP имеют сходное строение: N-концевую сигнальную последовательность, консервативный ZP домен, C-концевую последовательность, содержащую сайт специфического разрезания и трансмембранный домен. После разрезания предшественника ZP белка фурином участок, содержащий ZP домен, теряет контакт с плазматической мембраной и может взаимодействовать с другими ZP белками, формируя фибриллы. Блестящую оболочку человека формируют 4 типа гликопротеинов, обозначаемых соответственно ZP1, ZP2, ZP3 и ZP4 (Lefièvre et al., 2004). Предположительно эволюция блестящей оболочки млекопитающих шла путем утраты ряда структурных белков (Meslin et al., 2012). Так желточная оболочка ооцитов рыб (лат. *Zona radiata*) образована 6–7 типами белков, оболочка ооцитов амфибий образована 4–5 типами белков, желточная оболочка ооцитов птиц образована 5–6 типами белков (Darie et al., 2004; Barisone et al., 2007; Goudet et al., 2008; Serizawa et al., 2011). *Zona pellucida* млекопитающих, включая однопроходных и сумчатых (Meslin et al., 2012), состоят в типичном случае из 4 типов белков. Все белки оболочки ооцита у позвоночных животных относятся к 4 группам: ZPA (у человека – ZP2), ZPB (у человека – ZP1 и ZP4), ZPC (у человека – ZP3) и минорная группа ZPX (у человека и других млекопитающих отсутствуют). Несколько видов млекопитающих (мышь, собака, корова и, возможно, свинья), имеют в составе блестящей оболочки только 3 белка. Утрата этих белков у разных видов млекопитающих происходила независимо и, видимо, относительно недавно. Так, *zona pellucida* серой крысы состоит из четырех белков ZP1, ZP2, ZP3 и ZP4, а у эволюционно-родственного вида домовая мышь – только из трех: ZP1, ZP2, ZP3, при этом в геноме мыши присутствует псевдоген ZP4, поврежденный микроделецией и не производящий белка (Voja et al., 2005; Goudet et al., 2008). У собаки и коровы *zona pellucida* также построена из трех белков, но утраченным оказался белок ZP1, наличие псевдогенов которого также показано для этих видов (Goudet et al., 2008). Состав *zona pellucida* некоторых видов млекопитающих до сих пор уточняется. Так, ранее утверждалось, что блестящая оболочка кошки состоит из трех белков (Hargis et al., 1994; Goudet et al., 2008), однако позже для этого вида было однозначно показано наличие всех четырех ZP белков (Stetson et al., 2015).

Формирование блестящей оболочки свиньи имеет особый характер. Формально *zona pellucida* свиньи состоит из 4-х ZP белков, однако кодируются они всего тремя генами. Ген ZPA, сходный с геном ZP2 других млекопитающих, производит полипептидную цепь, расщепляющуюся в ходе посттрансляционных изменений на два белка, функционально соответствующих ZP2 и ZP1 других млекопитающих. Собственный же ген ZP1 в

геноме свиньи не обнаружен, как, впрочем, не обнаружен и псевдоген ZP1. Это дает возможность предположить, что утраченный в ходе эволюции ген ZP1 был компенсирован процессингом белка ZP2, приводящим к образованию сходного с ZP1 белка (Hedrick and Wardrip, 1986; Goudet et al., 2008).

Однозначно показано, что сам растущий ооцит человека синтезирует белки ZP (Eberspaecher et al., 2001). Однако существуют работы, указывающие на то, что синтез белков ZP осуществляется также фолликулярными клетками. Методом иммунофлуоресценции была продемонстрирована локализация белков ZP1, ZP2 и ZP3 в фолликулярных клетках растущих фолликулов человека (Gook et al., 2008). Косвенным признаком двоякого происхождения блестящей оболочки человека может служить ее двухслойная визуализация в поляризованном свете. Возможно, такая двухслойность связана с тем, что оболочка прирастает изнутри гликопротеинами, синтезируемыми в ооците, а снаружи – гликопротеинами, синтезируемыми клетками теки (Keefe et al., 1997; Shen et al., 2005; Swiatecka et al., 2014).

Для разных видов млекопитающих существуют достаточно противоречивые данные о том, какой тип клеток вырабатывает белки *zona pellucida*: сам ооцит или окружающие его клетки фолликула. У мыши синтез всех трех гликопротеинов осуществляет исключительно ооцит (Rankin et al., 2000), а у кролика, коровы, свиньи и обыкновенной игрунки белки блестящей оболочки по некоторым данным присутствуют и в ооците, и в фолликулярных клетках (Kolle et al., 1998; Lee, 2000; Sinowatz et al., 2001; Vogner et al., 2004). У собаки лишь ZP1 выделяется ооцитом, а ZP2 и ZP3 – фолликулярными клетками, окружающими ооцит (Blackmore et al., 2004). Джьюгеноу и Рудольф в 2001 году опубликовали работу, в которой утверждают, что у кошки белки *zona pellucida* синтезируются только клетками текальной оболочки фолликула, и ооцит не участвует в образовании блестящей оболочки (Jewgenow and Rudolph, 2001). Это противоречит представленным ранее данным, согласно которым белки ZP локализуются у кошки как в ооците, так и в клетках теки (Barber et al., 2001). Также получены данные, что у лошади белки, составляющие *zona pellucida*, имеют исключительно фолликулярное происхождение (Kolle et al., 2007).

Такие разнородные данные требуют критической оценки – необходимо понять, какие доказательные методы использовали авторы. В большей части – это иммуногистохимическое окрашивание гистологических срезов.

Белки ZP проходят посттрансляционную модификацию: часть полипептидной цепи отщепляется, проходит гликозилирование и модифи-

цированные белки выводятся во внеклеточное пространство путем везикулярного транспорта, где формируют трехмерную структуру блестящей оболочки. Точное взаиморасположение белков ZP1, ZP2, ZP3 и ZP4 в трехмерной структуре зоны не известно. Большинство моделей строения предложено для эмбрионов мыши, *zona pellucida* которых построена из трех белков (ZP4 утрачен мышью в ходе эволюции). В общем, все модели сходятся в том, что во внеклеточном пространстве белки ZP организуются в фибриллы, сшиваемые между собой. У мыши фибриллы образованы белками ZP2 и ZP3, связанными друг с другом попеременно (на эти белки приходится около 90% массы зоны ооцита мыши), также внутри фибрилл встроены белки ZP1, именно они ответственны за “сшивку” разных фибрилл между собой (ZP1 из разных фибрилл связываются друг с другом) (Han et al., 2010; Monné and Jovine, 2011; Louros et al., 2013). Роль белка ZP4 в строении *zona pellucida* человека не ясна. Исходя из того факта, что у ряда млекопитающих отсутствует ZP1 (корова, собака), можно предположить, что ZP4 выполняет сходную роль по сшиванию фибрилл ZP2/ZP3 друг с другом.

Фибриллы *zona pellucida* слишком малы, чтобы их можно было рассмотреть даже в электронный микроскоп (Familiari et al., 2008). Предположения о строении фибрилл основаны на анализе трехмерной структуры белков зоны (Monné and Jovine, 2011). На основании эффекта двойного лучепреломления в поляризованном свете, свойственного исключительно внутреннему слою блестящей оболочки, сделано предположение о различной ориентации фибрилл во внутреннем и внешнем слоях блестящей оболочки. Предполагают, что во внутреннем слое фибриллы имеют преимущественно радиальное расположение, а во внешнем слое – ламинальное расположение (Keefe et al., 1997).

Электронно-микроскопические изображения свидетельствуют о губчатой и пористой структуре блестящей оболочки (Novo et al., 2012), но происхождение этих пор и губчатой структуры неизвестно. Вероятно, пористая структура зоны – это результат воздействия на нее фолликулярных клеток, которые пронизывают блестящую оболочку своими отростками и таким образом контактируют с ооцитом. Непосредственно перед овуляцией фолликулярные клетки разрывают контакты с ооцитом и извлекают отростки из пор блестящей оболочки (Huang and Wells, 2010), а после овуляции поверхность зоны быстро сглаживается и поры “затягиваются” (Familiari et al., 2008). Однако достаточных оснований для утверждения, что пористость оболочки возникает как результат взаимодействия фолликулярных клеток с ооцитом, нет. Блестящая оболочка эмбриона проницаема для всех растворенных в воде веществ. Кроме того, через нее могут проходить антитела и некоторые ви-

русы (Sellens and Jenkinson, 1975; Van Soom et al., 2010).

ФУНКЦИИ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ

Ряд опубликованных научных работ указывает на необходимость присутствия блестящей оболочки для нормального формирования ооцита в период фолликулогенеза. Так мыши с искусственно поврежденным геном ZP2, либо ZP3 (технология “генного нокаута”) не формируют *zona pellucida* вовсе (Liu et al., 1996; Rankin et al., 1996; Rankin et al., 2001; Wassarman and Litscher, 2012). В яичниках таких мышей большая часть фолликулов подвергается дегенерации, зачастую ооциты в фолликулах отсутствуют или формируются лишь небольшое количество ооцитов, которые не имеют блестящей оболочки. Роль *zona pellucida* в фолликуло- и оогенезе остается неясной. В этой связи интересна работа турецких исследователей, показавших, что в ходе фолликулогенеза (начиная со стадии антрального фолликула) происходит накопление и локализация фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) на *zona pellucida* (Celik-Ozenci et al., 2003). Можно предположить, что матрикс блестящей оболочки служит ориентиром для установления фолликулярными клетками контактов с ооцитом.

Особую роль блестящая оболочка играет во взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки при оплодотворении (Gupta, 2015). Она является одним из барьеров, осуществляющих так называемый “блок полиспермии” – препятствие проникновению двух и более сперматозоидов в яйцеклетку (Sun, 2003). Связывание сперматозоида и блестящей оболочки видоспецифично: например, сперматозоид крысы не связывается с *zona pellucida* мыши и наоборот, сперматозоид человека не связывается с *zona pellucida* крысы (Hoodbhoj et al., 2005). На поверхности сперматозоида имеются гипотетические рецепторы узнавания всех 4 белков *zona pellucida*. И хотя сами рецепторы достоверно не изучены, но описано связывание сперматозоидов с отдельными белками блестящей оболочки. Сперматозоид связывается как непосредственно с полипептидными частями гликопротеинов ZP, так и со специфическими олигосахаридными остатками гликопротеинов ZP (Gupta, 2015). Охарактеризованы места связывания (головка или средняя часть сперматозоида), а также осуществляется ли связывание до или после запуска акросомной реакции (Gupta, 2015). Взаимодействие сперматозоида с блестящей оболочкой происходит в два этапа: узнавание/связывание и запуск акросомной реакции (Gupta and Bhandari, 2011). Известно, что на гликопротеинах ZP существует множество сайтов связывания для сперматозоидов, но до сих пор окончательно не установлено, какие из них вызывают запуск акро-

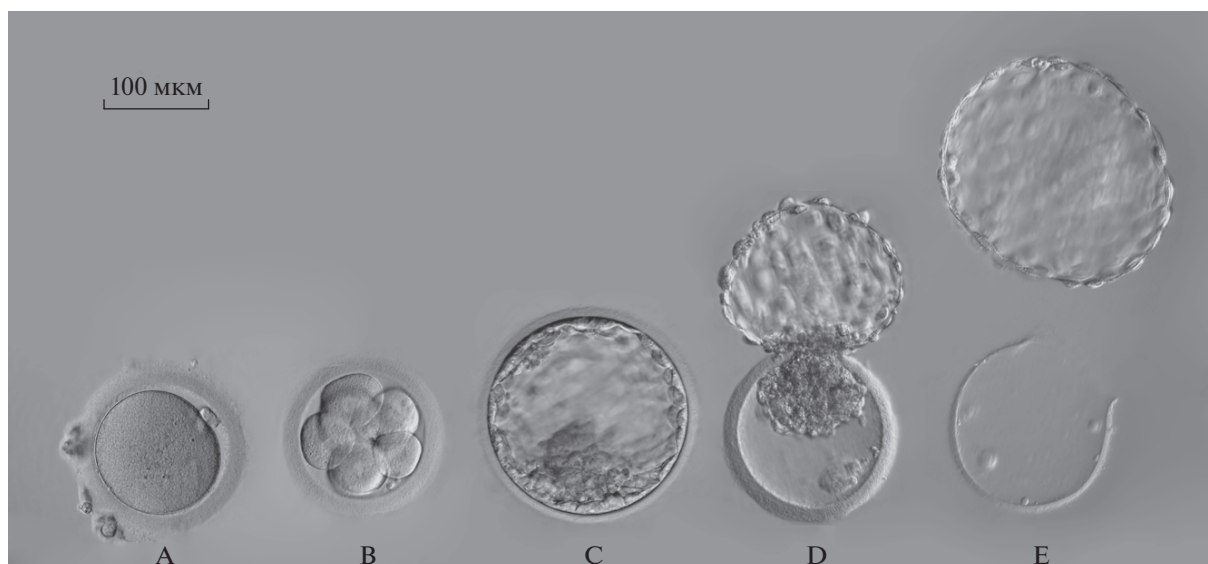
сомной реакции – полученные экспериментальные данные противоречивы даже для мыши – наиболее хорошо изученного объекта. Но даже эти противоречивые данные нельзя автоматически перенести на человека, так как строение *zona pellucida* и механизм блока полиспермии у мыши и человека различны.

После слияния мембран сперматозоида и ооцита происходит запуск кортикальной реакции – из ооцита наружу выбрасываются до 10 различных видов литических ферментов, модифицирующих блестящую оболочку (Sun, 2003; Liu, 2011). Ферменты кортикальных гранул отщепляют олигосахаридные остатки от белков ZP, а от белка ZP2 также участок полипептидной цепи. В результате такой модификации *zona pellucida* больше не способна инициировать акросомную реакцию и не позволяет сперматозоидам подойти к ооците для повторного оплодотворения. Таким образом, реализуется блок полиспермии на уровне блестящей оболочки. Ряд экспериментальных данных указывает на то, что существует параллельный механизм реализации блока полиспермии на уровне ооциты, препятствующий повторному слиянию сперматозоида с ооцитом (Mio et al., 2012; Bianchi and Wright, 2014).

Модификацию блестящей оболочки после осуществления кортикальной реакции часто описывают как “затвердевание зоны” (англ. “zona hardening”). Для ооцитов мыши показано действительное возрастание физической жесткости (в 2.6–2.7 раза) и вязкости (в 4.44 раза) блестящей оболочки вскоре после оплодотворения (Drobnis et al., 1988; Murayama et al., 2006; Kim and Kim, 2013). Подобное исследование со сходными результатами было сделано и для ооцитов коровы (Vossaccio et al., 2012). Однако следует учесть, что во всех подобных работах измеряли не жесткость изолированной блестящей оболочки, а деформацию ооцита или эмбриона, окруженного блестящей оболочкой, в ответ на надавливание, предполагая, что вязкость цитоплазмы ооцита/зиготы остается постоянной, что не вполне корректно.

Помимо участия в оогенезе и оплодотворении блестящая оболочка очевидно нужна для удержания blastomerov вместе в период дробления эмбриона (Bronson and McLaren, 1970; Suzuki et al., 1995). Клетки эмбриона на стадии дробления имеют слабую адгезию друг к другу, без блестящей оболочки эмбрион человека в течение первых 4 дней развития легко рассыпается на отдельные клетки.

Ввиду проницаемости блестящей оболочки для всех растворимых в воде веществ ее барьерная функция представляется не очевидной. Крупные молекулы (например, сывороточный альбумин), антитела и даже некоторые вирусы проникают сквозь блестящую оболочку (Sellens and Jenkinson, 1975; Van Soom et al., 2010). Существуют рабо-



Блестящая оболочка на разных этапах преимплантационного развития человека *in vitro* (микрофотография, увел. 200×, контрастирование по Хоффману). А: ооцит, окруженный блестящей оболочкой (0 ч развития). В: эмбрион на стадии дробления, окруженный блестящей оболочкой (44 ч развития). С: эмбрион на стадии бластоцисты, блестящая оболочка истончена вследствие расширения бластоцисты (118 ч развития). D: бластоциста совершает хетчинг – выход из блестящей оболочки (126 ч развития). Е: бластоциста полностью вышла из блестящей оболочки (140 ч развития).

ты, указывающие на возможность накопления регуляторных белков в *zona pellucida* или в перивителлиновом пространстве. Например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) обнаруживается в составе блестящей оболочки в период фолликулогенеза (Celik-Ozenci et al., 2003), а гликопротеин GP215 из трубной жидкости накапливается в перивителлиновом пространстве (Karur and Johnson, 1986).

Также можно предположить, что *zona pellucida* защищает эмбриональные клетки от контакта с иммунными клетками матери и препятствует инициации иммунного ответа (Clark, 2010). Однако если бы подобная барьерная функция существовала, то она действовала на протяжении лишь 2–3 дней на последних этапах преимплантационного развития: с момента появления специфических эмбриональных антигенов на поверхности клеток до выхода эмбриона из блестящей оболочки. Важность защиты эмбриона от иммунной системы матери в течение столь короткого периода представляется сомнительной.

ДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХЕТЧИНГА

Современные представления о хетчинге основаны на многочисленных наблюдениях за бластоцистами человека и млекопитающих *in vitro* (рисунков). Общая схема выхода эмбриона человека из блестящей оболочки представляется следующей: спустя 4–5 дней после оплодотворения эмбрион на стадии бластоцисты активно транспор-

тирует воду в полость бластоцисты, благодаря чему увеличивается в диаметре приблизительно в 1.5 раза. Согласно Киркегард и соавт. средний диаметр бластоцисты увеличивается с 120 до 160–180 мкм, бластоциста оказывает механическое воздействие на *zona pellucida* – блестящая оболочка растягивается и истончается – ее толщина уменьшается с 18 до 5 мкм (Kirkegaard et al., 2012). Затем происходит разрыв *zona pellucida* с образованием щелевидного отверстия, и бластоциста, продолжая увеличиваться в размере, выпячивает часть трофобласта в образовавшуюся щель. В этот период бластоциста начинает совершать так называемые “сокращения” – серию последовательных сжатий и раздуваний, благодаря которым эмбрион полностью покидает блестящую оболочку (Sathananthan et al., 2003).

Существуют значительные противоречия в данных по срокам хетчинга для бластоцист человека *in vitro*. В ранних работах указывалось, что бластоцисты начинают процесс хетчинга на 6 день после оплодотворения (Lopata and Heu, 1989), на рубеже 20 и 21 веков в большей части работ время начала хетчинга указано как 5 день (Sathananthan et al., 2003) либо 6 день (Vecek and Zaninovic, 2003) после оплодотворения. В современных работах, выполненных на большой выборке эмбрионов (более 100) с использованием метода покадровой съемки, указывают время начала хетчинга менее 5 суток от момента оплодотворения: 107.8–116.1 ч (Kirkegaard et al., 2012) и 106.2–118.2 ч (Serdarogullari et al., 2014). Такие различия в данных очевидно обусловлены значительным прогрессом в тех-

нологии культивирования преимплантационных эмбрионов человека *in vitro*, который произошел за последние 20 лет. Более быстрое развитие эмбрионов и повышение частоты наступления беременности свидетельствуют о приближении условий культивирования к естественным. В этой связи можно предположить, что бластоциста человека *in vivo* приступает к хетчингу в период между 4 и 5 сут после оплодотворения. Вопрос о том, насколько процессы хетчинга, наблюдаемые *in vitro*, соответствуют процессам хетчинга, происходящим *in vivo*, остается открытым. Ряд авторов указывает на то, что протеолитические ферменты, выделяемые эндометрием, могут ускорять процессы хетчинга *in vivo* (Vajta et al., 2010).

Разрыв прозрачной оболочки происходит в области муральной трофэктодермы (часть трофэктодермы, окружающий полость бластоцисты). Остается открытым вопрос: специфично ли место, где происходит разрыв зоны, или разрыв происходит в случайном месте из-за общего снижения прочности блестящей оболочки. Процесс выхода бластоцисты человека из зоны был детально проанализирован методами световой и электронной микроскопии в работе, опубликованной 12 лет назад международной исследовательской группой (Sathanathan et al., 2003). Этими исследователями были обнаружены морфологические особенности клеток трофэктодермы, располагающихся в области разрыва *zona pellucida*, и они назвали их “клетками, разрывающими оболочку” (англ. “zona-breaker cells”). В период хетчинга эти клетки приобретают шаровидную форму и формируют пальцевидные выросты. Также в этой статье было показано, что “разрывающие оболочку” клетки располагаются в зоне предстоящего хетчинга и характеризуются наличием большого числа микроворсинок, лизосом и, по-видимому, активно секреторируют везикулы. Это соответствует представлениям о том, что процесс хетчинга зависит как от механических, так и от химических факторов. Кроме того, в этих клетках были визуализированы крупные пучки сократительных тонофиламентов, проходящих вдоль разрыва блестящей оболочки наподобие сфинктера или воронки. Однако, как это уже обсуждалось выше, такие клетки располагаются в области уже сформированного разрыва зоны, и не очень понятно, появляются ли морфологически различные “zona-breaker cells” в составе трофэктодермы или форма их клеток меняется во время продвижения трофэктодермы через разрыв в блестящей оболочке. Трофэктодерма поздних бластоцист выражено реагирует на механические воздействия, например, единичное прикосновение тонкой стеклянной иглой приводит к резкому коллапсу полости бластоцисты, хотя целостность трофэктодермы при этом не нарушается (Kimura et al., 2012). Такая реакция на механические воздействия связана с активностью десмосом, объ-

единяющих трофобласт в общую механоиндивидуальную систему. При локальном воздействии на клетки трофэктодермы поздней бластоцисты происходит резкая перестройка тонофиламентов и сжатие клеток, а десмосомы, обеспечивающие механическую связь между клетками, инициируют процесс такой же перестройки цитоскелета в соседних клетках пласта. Так что появление “сжатых” клеток трофэктодермы в месте разрыва оболочки может быть связано именно с локальным воздействием краев разрыва зоны на механо-чувствительную систему клеток, а не со специфической функцией “разрыва зоны” определенных клеток трофэктодермы.

Большой интерес исследователей в области изучения процесса хетчинга представляет формирование так называемых трофэктодермальных выростов (англ. TER – trophoectodermal projections), существование которых были показаны для многих видов млекопитающих – грызунов, овец, коров и приматов. Процесс формирования трофэктодермальных выростов (ТЭВ) у бластоцисты человека был описан с использованием метода покадровой съемки в режиме реального времени (Gonzales et al., 1996). В этой статье ТЭВ были описаны как единичные пальцевидные цитоплазматические выросты трофэктодермы длиной до 29 мкм, прорывающие блестящую оболочку, но их детальная морфология не была приведена. При коллапсировании бластоцисты, сформированные ТЭВ, отрываются от трофэктодермы, остаются вне зоны и быстро дегенерируют. Такие ТЭВ не были обнаружены у ранних бластоцист или у дегенерирующих бластоцист, но недавно было показано, что длинные пальцевидные филоподии формируются и на более ранних стадиях преимплантационного развития. Так, было показано, что компактизация эмбрионов мыши происходит с участием длинных пальцевидных филоподий (Fierro-Gonzalez et al., 2013). В самом начале компактизации некоторые из клеток эмбриона формируют несколько длинных филоподий, содержащих большое количество E-кадгерина, которые распластаются по поверхности соседних клеток, инициируя процесс адгезии клеток морулы. Также авторы статьи считают, что эти филоподии контролируют процесс изменения формы клеток, в результате чего эти клетки растягиваются по поверхности соседних клеток и формируют трофэктодерму. Высокое содержание актина в ТЭВ показано в экспериментах с использованием иммунофлуоресцентной окраски и конфокальной микроскопии (Seshagiri et al., 2009; Lu et al., 2012). Данные исследований ТЭВ у человека совпадают с данными, полученными на других видах млекопитающих, и свидетельствуют об участии ТЭВ в процессе хетчинга бластоцисты за счет прохождения через блестящую оболочку и инициации ее разрыва (Seshagiri et al., 2009). Также представляется возможным предполагать, что по-

сле хетчинга такие ламеллоподобные ТЭВ участвуют в передвижении бластоцисты по поверхности эндометриального эпителия и в инициации процесса имплантации.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ХЕТЧИНГА

Кроме динамических механизмов хетчинга, в процессе ослабления прочности блестящей оболочки важную роль играет ее ферментативная деградация. Роль протеиназ в процессе хетчинга не вызывает сомнений: показано, что добавление ингибиторов протеиназ в культуральную среду к бластоцистам приводит полному блокированию процесса (Pan et al., 2015).

В зависимости от вида млекопитающего, в процессе хетчинга принимают участие разные классы протеиназ: сериновые, цистеиновые, металлопротеиназы. На данный момент основным вопросом остается выявление протеиназ хетчинга, специфичных для человека, однако исследования в данной области крайне немногочисленны по этическим соображениям и носят характер предположений и экстраполяций. Ранее существовала гипотеза, что в хетчинге у человека принимает участие стрипсин – протеиназа, отвечающая за процесс хетчинга и у некоторых других видов млекопитающих. Предполагается, что данная протеиназа синтезируется как клетками эмбриона, так и клетками маточного эндометрия (Гоголевский, 1998; O'Sullivan et al., 2002).

Участие цистеиновых протеиназ в хетчинге наиболее подробно изучено на модели сирийского хомячка, строение *zona pellucida* которого имеет большое сходство со строением зоны ооцитов человека (Sireesha et al., 2008). В экспериментах с использованием ингибиторов протеиназ было показано, что из трех классов цистеиновых протеиназ в хетчинге принимают участие только катепсины. Эти ферменты, локализованные преимущественно в лизосомах, имеют и другие важные функции. Например, у человека они участвуют в процессе деградации внеклеточного матрикса, в тех случаях, когда секретируются клетками (Koblinski et al., 2000). Также было установлено, что добавление катепсинов L, P или B, обладающих высокой протеазной активностью, в культуральную среду ведет к полному растворению блестящей оболочки и что в клетках бластоцисты в период, предшествующий хетчингу, идет синтез катепсинов L и P. Методом иммунофлуоресцентного анализа было показано, что эти катепсины четко визуализируются в зоне ТЭВ бластоцисты в период хетчинга (Sireesha et al., 2008).

В человеческом геноме также присутствуют гены катепсинов L (*CTSL*), B (*CTSB*) и других катепсинов. Присутствие катепсина L было обнаружено в клетках трофэктодермы и внутренней кле-

точной массы (Adjae, 2005), однако данные, непосредственно бы подтверждавшие их роль в хетчинге у человека, в литературе отсутствуют. Определение транскрипции, синтеза и экскреции катепсинов человеческой бластоцистой могло бы стать перспективной темой дальнейших исследований.

Матриксные металлопротеиназы, способные гидролизовать любые белки внеклеточного матрикса тоже могут принимать участие в процессе хетчинга бластоцист человека. Роль цинковых металлопротеиназ в раннем эмбриональном развитии показана для многих видов позвоночных (Sterchi et al., 2008). Особое внимание в этих работах уделяется субсемейству астациновых протеиназ, к которым также относятся протеиназы хетчинга позвоночных: альвеолин, овастацин, нефрозин и некоторые другие протеиназы этой группы. У человека из них присутствует только ген овастацина, который также есть и у домового мыши (*Mus musculus*). Овастацин относится к группе филогенетически родственных хетчинговых протеиназ, которые участвуют в разрушении оболочки оплодотворения у многих беспозвоночных и позвоночных животных (Quesada et al., 2004). Кроме того, овастацин участвует в формировании блока полиспермии у мышей. Он накапливается в кортикальных гранулах ооцита, а затем при слиянии мембраны сперматозоида с ооцитарной происходит экскреция кортикальных гранул и расщепление ZP2 под действием овастацина (Burkart et al., 2012). Синтез овастацина у мыши наблюдается не только в ооците, но и в эмбрионе на стадии дробления, начиная со вторых суток развития, что свидетельствует о возможном наличии у овастацина иных функций. Учитывая эволюционную связь и схожесть строения овастацина с протеазами хетчинга других видов (Quesada et al., 2004), логично предположить участие овастацина в процессах хетчинга человека и мыши, однако остается необъясненной временная разобщенность между зарегистрированным появлением овастацина в клетках раннего эмбриона и хетчингом. Для изучения участия овастацина в процессах хетчинга у человека необходимы дальнейшие исследования по изучению содержания овастацина в трофэктодерме эмбриона пятых суток культивирования, особенно в “zona-breaker” клетках, активное участие которых в локальном лизисе *zona pellucida* пока не доказано. Вопрос выявления других протеиназ хетчинга на данный момент остается открытым.

В регуляции хетчинга также участвует большое количество разнообразных цитокинов, факторов роста, вторичных мессенджеров, транскрипционных факторов и гормонов (Kane et al., 1997; Sargent et al., 1998; Seshagiri et al., 2009). Так, например, добавление гепарин-связывающего эпидермального фактора роста (HB-EGF) в

культуральную среду к развивающимся эмбрионам человека не только ускоряло формирование blastocисты, но и приводило к увеличению доли blastocист, способных к самостоятельному хетчингу (Sargent et al., 1998; Kawamura et al., 2012). Сходные данные получены на животных моделях для эпидермального фактора роста (EGF), трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), лейкемия-ингибирующего фактора (LIF) (Mishra and Seshagiri, 2000; Seshagiri et al., 2002). По-видимому, это участие в процессе хетчинга опосредованное — стимуляция внутриклеточных процессов в преимплантационных эмбрионах при добавлении в среду для культивирования ростовых факторов приводит к формированию большего числа blastocист, способных совершить хетчинг. Так, в ряде работ было показано, что в норме клетки преимплантационных эмбрионов человека выделяют набор ростовых факторов и рецепторов к ним, что необходимо для поддержания нормальных темпов развития (Richter, 2008; Thouas et al., 2015).

Роль кальция в регуляции эмбриогенеза изучается давно и не вызывает сомнений; в том числе активно исследуются кальций-зависимые процессы, связанные с хетчингом. Так, например, была исследована экспрессия гена *KCNN3* (SK3, Ca²⁺-зависимый K⁺-канал) в blastocистах, совершивших нормальный хетчинг *in vitro*, и в неспособных к хетчингу blastocистах (Lu et al., 2012). Ген *KCNN3* присутствует в геноме большого числа видов животных (более 100), его экспрессия в blastocисте была обнаружена и у человека, и у мыши. В то же время, экспрессии родственных ему генов *KCNN1* и *KCNN2* в blastocисте выявлено не было, а экспрессия гена *KCNN4* не исследовалась. Было показано, что уровень экспрессии гена *KCNN3* в человеческих blastocистах, неспособных к хетчингу, в два раза ниже, чем в нормальных blastocистах ($p < 0.05$, $n = 3$), что свидетельствует о важной роли Ca²⁺-зависимых калиевых каналов в процессе хетчинга. Кроме того, на мышинной модели был исследован уровень экспрессии гена *KCNN3*, который оказался выше в трофэктодерме и увеличивался по мере преимплантационного развития blastocисты. Было показано, что нокаут гена *KCNN3* приводит к снижению синтеза F-актина, участвующего в формировании ТЭВ, и нарушениям хетчинга blastocисты (Lu et al., 2012). В экспериментах по изучению *KCNN3* в других, в том числе опухолевых, тканях человека показано, что *KCNN3*-опосредованная гиперполяризация приводит к повышению клеточной подвижности (Potier et al., 2006; Girault et al., 2011; Clarysse et al., 2014) и этот процесс тоже может иметь значение для нормального протекания хетчинга. Также высказываются предположения, что активация Ca²⁺-зависимых K⁺-каналов может являться механизмом инициации процесса

хетчинга, но экспериментальных доказательств этому предположению пока нет.

ВЛИЯНИЕ *IN VITRO* МАНИПУЛЯЦИЙ НА ПРОЦЕСС ХЕТЧИНГА У ЧЕЛОВЕКА

Развитие эмбриона *in vitro*, предположительно, происходит медленнее, чем *in vivo*, поэтому и хетчинг при проведении экстракорпорального оплодотворения потенциально может происходить медленнее. Мы также предполагаем, что эмбрион при культивировании *in vitro* находится в субоптимальных условиях, поскольку состав культуральных сред не идентичен содержимому полости маточных труб и матки. Вследствие этого может происходить изменение конфигурации блестящей оболочки. Некоторые дополнительные экстракорпоральные процедуры также могут приводить к структурным изменениям блестящей оболочки. Так, по некоторым данным, криоконсервация ооцитов может являться причиной уплотнения *zona pellucida* и ее большей устойчивости к протеолитическим ферментам (Ko et al., 2008).

Недавно группа ученых из Дании провела исследование, посвященное влиянию метода оплодотворения *in vitro* на протекание хетчинга и клинический результат ЭКО (Kirkegaard et al., 2013). В работе сравнивали хетчинг у эмбрионов, полученных методом “инсеминации *in vitro*” и методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку — ИКСИ. Исследователи выделили два типа хетчинга: с предшествующей пенетрацией блестящей оболочки трофэктодермальными выростами и без таковой. В первом случае выход blastocисты происходил через постепенно расширяющееся отверстие блестящей оболочки, во втором — наблюдали быстрый и обширный разрыв *zona pellucida* со стремительной экстраузией blastocисты. Было показано, что использование метода ИКСИ ведет к развитию хетчинга по первому типу (97.7% всех наблюдений против 55.8% в группе без ИКСИ, $p < 0.001$). Также авторы показали, что при оплодотворении методом ИКСИ хетчинг начинается раньше, чем без ИКСИ (95.9 против 99.7 ч после оплодотворения, $p < 0.001$). Таким образом, локальное повреждение зоны при ИКСИ оказывает существенное влияние на динамику процесса хетчинга. В то же время важно отметить, что влияния метода оплодотворения и типа спонтанного хетчинга на уровень возникновения беременности в этом исследовании выявлено не было.

Кроме всего прочего при анализе процесса хетчинга у человека надо учитывать, что на структуру блестящей оболочки могут влиять индивидуальные особенности пациентки, как генетические, так и связанные с патологическим протеканием предшествующих процессов, например, оогенеза. В то же время при исследовании патологий зоны не

было выявлено корреляций с такими факторами как возраст пациентки или курение (Pöckylä et al., 2011).

Вероятнее всего, изменение структуры блестящей оболочки, а именно ее утолщение, может приводить не только к отсутствию оплодотворения, но и к неудачам хетчинга. При этом единичные исследования, посвященные неудачам хетчинга у человека, не содержат информации об оценке морфологии *zona pellucida* ооцитов и эмбрионов, вследствие чего данная гипотеза не имеет экспериментальных данных для подтверждения. Причинами утолщения *zona pellucida* может быть как само по себе изменение зоны *zona pellucida*, так и замедленное дробление эмбриона, во время которого происходит физиологическое истончение *zona pellucida*.

Аномальная секреция протеиназ на сегодняшний день является наиболее распространенной гипотезой неудачи хетчинга, подтвержденной экспериментальными данными (Pan et al., 2015). На сегодняшний день известны гены, отвечающие за хетчинг у млекопитающих, и большой интерес представляют исследования, посвященные патогенетическим механизмам аномальной секреции протеаз у человека (Ozawa et al., 2012).

Также одной из причин неудач хетчинга может быть отсутствие дифференцировки трофобласта и появления “zona-breaker” cells. Тем не менее, при тщательном анализе данных литературы нами не было найдено публикаций относительно данного феномена.

В исследовании с использованием морфокинетического наблюдения было продемонстрировано нарушение хетчинга вследствие наличия между трофэктодермой и блестящей оболочкой экстраклеток, не участвующих в формировании бластоцисты (Sathananthan et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, механизмы хетчинга бластоцисты человека *in vitro* изучены не полностью, многие выводы носят характер экстраполяции с животных моделей. Требуется подтверждение полученных данных для эмбрионов человека. Однако известно, что хетчинг происходит за счет динамических механизмов (увеличение бластоцисты, приводящее к истончению блестящей оболочки, ее интенсивное сокращение, образование выростов клеток трофэктодермы) и биохимических механизмов (секреция протеиназ). По этическим причинам более полными являются данные о динамических механизмах хетчинга, в то время как данные о молекулярных механизмах хетчинга у человека во многом противоречивы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гоголевский П.А. Вспомогательный хетчинг: показания, применение, результаты // Проблемы репродукции. 1998. Т. 4. № 1. С. 10–13.
- Adjaye J. Whole-genome approaches for large-scale gene identification and expression analysis in mammalian preimplantation embryos // *Reprod. Fertil. Dev.* 2005. V. 17. № 1–2. P. 37–45.
- Balakier H., Sojecki A., Motamedi G. et al. Is the *zona pellucida* thickness of human embryos influenced by women’s age and hormonal levels? // *Fertil. Steril.* 2012. V. 98. № 1. P. 77–83.
- Barber M.R., Lee S.M., Steffens W.L. et al. Immunolocalization of *zona pellucida* antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants // *Theriogenology.* 2001. V. 55. № 8. P. 1705–1717.
- Barisone G.A., Krapf D., Correa-Fiz F. et al. Glycoproteins of the vitelline envelope of Amphibian oocyte: biological and molecular characterization of ZPC component (gp41) in *Bufo arenarum* // *Mol. Reprod. Dev.* 2007. V. 74. № 5. P. 629–640.
- Bianchi E., Wright G.J. Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization // *Cell Cycle.* 2014. V. 13. № 13. P. 2019–2020.
- Blackmore D.G., Baillie L.R., Holt J.E. et al. Biosynthesis of the canine *zona pellucida* requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. № 2. P. 661–668.
- Bleil J.D., Wassarman P.M. Structure and function of the *zona pellucida*: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte’s *zona pellucida* // *Dev. Biol.* 1980. V. 76. № 1. P. 185–202.
- Boccaccio A., Frassanito M.C., Lamberti L. et al. Nanoscale characterization of the biomechanical hardening of bovine *zona pellucida* // *J. R. Soc. Interface.* 2012. V. 9. № 76. P. 2871–2882.
- Bogner K., Hinsch K.D., Nayudu P. et al. Localization and synthesis of *zona pellucida* proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary // *Mol. Hum. Reprod.* 2004. V. 10. № 7. P. 481–488.
- Boja E.S., Hoodbhoy T., Garfield M. et al. Structural conservation of mouse and rat *zona pellucida* glycoproteins. Probing the native rat *zona pellucida* proteome by mass spectrometry // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 50. P. 16445–16460.
- Bronson R.A., McLaren A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the *zona pellucida* // *J. Reprod. Fertil.* 1970. V. 22. № 1. P. 129–137.
- Burkart A.D., Xiong B., Baibakov B. et al. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the *zona pellucida* to prevent polyspermy // *J. Cell Biol.* 2012. V. 197. № 1. P. 37–44.
- Caballero-Campo P., Chirinos M., Fan X.J. et al. Biological effects of recombinant human *zona pellucida* proteins on sperm function // *Biol. Reprod.* 2006. V. 74. № 4. P. 760–768.
- Celik-Ozenci C., Akkoyunlu G., Kayisli U.A. et al. Localization of vascular endothelial growth factor in the *zona pellucida* of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles // *Histochem. Cell. Biol.* 2003. V. 120. № 5. P. 383–390.

- Clark G.F. The mammalian *zona pellucida*: a matrix that mediates both gamete binding and immune recognition? // Syst. Biol. Reprod. Med. 2010. V. 56. № 5. P. 349–364.
- Clark G.F. The role of carbohydrate recognition during human sperm–egg binding // Hum. Reprod. 2013. V. 28. № 3. P. 566–577.
- Clarysse L., Guéguinou M., Potier-Cartereau M. et al. cAMP-PKA inhibition of SK3 channel reduced both Ca²⁺ entry and cancer cell migration by regulation of SK3-Orai1 complex // Pflugers. Arch. 2014. V. 466. № 10. P. 1921–1932.
- Darie C.C., Biniousek M.L., Jovine L. et al. Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry // Biochemistry. 2004. № 43. P. 7459–7478.
- Dietl J. Ultrastructural aspects of the developing mammalian *zona pellucida* // The Mammalian Egg Coat: Structure and Function. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1989. P. 49–60.
- Drobnis E., Andrew J., Katz D. Biophysical properties of the *zona pellucida* measured by capillary suction: is zona hardening a mechanical phenomenon // J. Exp. Zool. 1988. V. 245. № 2. P. 206–219.
- Eberspaecher U., Becker A., Bringmann P. et al. Immunohistochemical localization of *zona pellucida* proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries // Cell. Tissue. Res. 2001. V. 303. № 2. P. 277–287.
- Familiari G., Heyn R., Relucenti M. et al. Structural changes of the *zona pellucida* during fertilization and embryo development // Front. Biosci. 2008. V. 1. № 13. P. 6730–6751.
- Fierro-González J.C., White M.D., Silva J.C. et al. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction // Nat. Cell. Biol. 2013. V. 15. № 12. P. 1424–1433.
- Girault A., Haelters J.P., Potier-Cartereau M. et al. New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and occurrence of metastasis // Current. Cancer. Drug. Targets. 2011. V. 11. № 9. P. 1111–1125.
- Gonzales D.S., Jones J.M., Pinyopummintr T. et al. Trophoctoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts // Hum. Reprod. 1996. V. 11. № 12. P. 2739–2745.
- Gook D.A., Edgar D.H., Borg J. et al. Detection of *zona pellucida* proteins during human folliculogenesis // Hum. Reprod. 2008. V. 23. № 2. P. 394–402.
- Goudet G., Mugnier S., Callebaut I. et al. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of *zona pellucida* genes during evolution of vertebrates // Biol. Reprod. 2008. V. 78. № 5. P. 796–806.
- Gupta S.K., Bhandari B. Acrosome reaction: relevance of *zona pellucida* glycoproteins // Asian. J. Androl. 2011. V. 13. № 1. P. 97–105.
- Gupta S.K. Role of *zona pellucida* glycoproteins during fertilization in human // J. Reprod. Immunol. 2015. V. 108. P. 90–97.
- Han L., Monné M., Okumura H. et al. Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3 // Cell. 2010. V. 143. № 3. P. 404–415.
- Harris J.D., Hibler D.W., Fontenot G.K. et al. Cloning and characterization of *zona pellucida* genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families // DNA Seq. 1994. V. 4. № 6. P. 361–393.
- Hedrick J.L., Wardrip N.J. Isolation of the *zona pellucida* and purification of its glycoprotein families from pig oocytes // Analyt. Biochem. 1986. V. 157. P. 63–70.
- Hoodbhoy T., Joshi S., Boja E.S. et al. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 1. P. 12721–12731.
- Huang Z., Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome // Mol. Hum. Reprod. 2010. V. 16. № 10. P. 715–725.
- Izquierdo-Rico M.J., Jiménez-Movilla M., Llop E. et al. Hamster *zona pellucida* is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4 // J. Proteome Res. 2009. V. 8. № 2. P. 926–941.
- Jewgenow K., Rudolph M. Timing and location of *zona pellucida* synthesis during oogenesis in domestic cats—an ultrastructural immunohistological investigation // J. Reprod. Fertil. Suppl. 2001. V. 57. P. 23–29.
- Jovine L., Qi H., Williams Z. et al. Features that affect secretion and assembly of *zona pellucida* glycoproteins during mammalian oogenesis // Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 2007. V. 63. P. 187–201.
- Kane M.T., Morgan P.M., Coonan C. Peptide growth factors and preimplantation development // Hum. Reprod. Update. 1997. V. 3. № 2. P. 137–157.
- Kapur R.P., Johnson L.V. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos // J. Exp. Zool. 1986. V. 238. № 2. P. 249–260.
- Kawamura K., Chen Y., Shu Y. et al. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth *in vitro* using autocrine/paracrine growth factors // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. e49328.
- Keefe D., Tran P., Pellegrini C. et al. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster *zona pellucida* // Hum. Reprod. 1997. V. 12. № 6. P. 1250–1252.
- Kiefer S.M., Saling P. Proteolytic processing of human *zona pellucida* proteins // Biol. Reprod. 2002. V. 66. № 2. P. 407–414.
- Kim J., Kim J. Viscoelastic characterization of mouse *zona pellucida* // IEEE Trans. Biomed. Eng. 2013. V. 60. № 2. P. 569–575.
- Kimura T.E., Merritt A.J., Lock F.R. et al. Desmosomal adhesiveness is developmentally regulated in the mouse embryo and modulated during trophoctoderm migration // Dev. Biol. 2012. V. 369. № 2. P. 286–297.
- Kirkegaard K., Hindkjaer J.J., Ingerslev H.J. Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis // Hum. Reprod. 2012. V. 27. № 1. P. 97–105.
- Kirkegaard K., Hindkjaer J.J., Ingerslev H.J. Hatching of *in vitro* fertilized human embryos is influenced by fertilization method // Fertil. Steril. 2013. V. 100. № 5. P. 1277–1282.
- Ko C.S., Ding D.C., Chu T.W. et al. Changes to the meiotic spindle and *zona pellucida* of mature mouse oocytes fol-

- lowing different cryopreservation methods // *Anim. Reprod. Sci.* 2008. V. 105. № 3–4. P. 272–282.
- Koblinski J.E., Ahram M., Sloane B.F.* Unraveling the role of proteases in cancer // *Clin. Chim. Acta.* 2000. V. 291. № 2. P. 113–135.
- Kolle S., Sinowatz F., Boie G. et al.* Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo // *Mol. Reprod. Dev.* 1998. V. 49. № 2. P. 435–443.
- Kolle S., Dubois C.S., Caillaud M. et al.* Equine zona protein synthesis and ZP structure during folliculogenesis, oocyte maturation, and embryogenesis // *Mol. Reprod. Develop.* 2007. V. 74. № 7. P. 851–859.
- Lee V.H.* Expression of rabbit *zona pellucida*-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development // *Biol. Reprod.* 2000. V. 63. № 2. P. 401–408.
- Lefièvre L., Conner S.J., Salpekar A. et al.* Four *zona pellucida* glycoproteins are expressed in the human // *Hum. Reprod.* 2004. V. 19. № 7. P. 1580–1586.
- Liu C., Litscher E.S., Mortillo S. et al.* Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a *zona pellucida* and infertility in female mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 11. P. 5431–5436.
- Liu M.* The biology and dynamics of mammalian cortical granules // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011. V. 9. P. 149.
- Lopata A., Hey D.L.* The potential of early human to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture // *Hum. Reprod.* 1989. V. 4. Suppl. P. 87–94.
- Louros N.N., Iconomidou V.A., Giannelou P. et al.* Structural analysis of peptide-analogues of human *zona pellucida* ZP1 protein with amyloidogenic properties: insights into mammalian *zona pellucida* formation // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. e73258.
- Lu Y.C., Ding G.L., Yang J. et al.* Small-conductance calcium-activated K (+) channels 3 (SK3) regulate blastocyst hatching by control of intracellular calcium concentration // *Hum. Reprod.* 2012. V. 27. № 5. P. 1421–1430.
- Magerkurth C., Töpfer-Petersen E., Schwartz P. et al.* Scanning electron microscopy analysis of the human *zona pellucida*: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 4. P. 1057–1066.
- Menezes J., Gunasheela S., Sathananthan H.* Video observations on human blastocyst hatching // *Reprod. Biomed. Online.* 2003. V. 7. № 2. P. 217–218.
- Meslin C., Mugnier S., Callebaut I. et al.* Evolution of genes involved in gamete interaction: evidence for positive selection, duplications and losses in vertebrates // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 9. P. 44–48.
- Michelmann H.W., Rath D., Töpfer-Petersen E. et al.* Structural and functional events on the porcine *zona pellucida* during maturation, fertilization and embryonic development: a scanning electron microscopy analysis // *Reprod. Domest. Anim.* 2007. V. 42. № 6. P. 594–602.
- Mio Y., Maeda K.* Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 199. № 6. P. 660. P. 1–5.
- Mio Y., Iwata K., Yumoto K. et al.* Possible mechanism of polyspermy block in human oocytes observed by time-lapse cinematography // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012. V. 29. № 9. P. 951–956.
- Mishra A., Seshagiri P.B.* Heparin binding-epidermal growth factor improves blastocyst hatching and trophoblast outgrowth in the golden hamster // *Reprod. Biomed. Online.* 2000. V. 1. № 3. P. 87–95.
- Monné M., Jovine L.* A structural view of egg coat architecture and function in fertilization // *Biol. Reprod.* 2011. V. 85. № 4. P. 661–669.
- Murayama Y., Mizuno J., Kamakura H. et al.* Mouse *zona pellucida* dynamically changes its elasticity during oocyte maturation, fertilization and early embryo development // *Human. Cell.* 2006. V. 19. № 4. P. 119–125.
- Novo S., Barrios L., Ibáñez E. et al.* The *zona pellucida* porosity: three-dimensional reconstruction of four types of mouse oocyte *zona pellucida* using a dual beam microscope // *Microsc. Microanal.* 2012. V. 18. № 6. P. 1442–1449.
- O'Sullivan C.M., Liu S.Y., Karpinka J.B. et al.* Embryonic hatching enzyme strypsin/ISP1 is expressed with ISP2 in endometrial glands during implantation // *Mol. Reprod. Dev.* 2002. V. 62. № 3. P. 328–334.
- Odor D.L., Blandau R.J.* Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis // *Am. J. Anat.* 1969. V. 124. № 2. P. 163–186.
- Ozawa M., Sakatani M., Yao J. et al.* Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst // *BMC Dev. Biol.* 2012. V. 12. P. 33.
- Pan X., Wang X., Wang X. et al.* Nitric oxide regulates blastocyst hatching in mice // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. V. 8. № 5. P. 6994–7001.
- Pöykkylä R.M., Lakkakorpi J.T., Nuojua-Huttunen S.H. et al.* Sequence variations in human ZP genes as potential modifiers of *zona pellucida* architecture // *Fertil. Steril.* 2011. V. 95. № 8. P. 2669–2672.
- Potier M., Joulin V., Roger S. et al.* Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration // *Mol. Cancer. Ther.* 2006. V. 5. № 11. P. 2946–2953.
- Quesada V., Sánchez L.M., Alvarez J. et al.* Identification and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 25. P. 26627–26634.
- Rankin T., Familiari M., Lee E. et al.* Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a *zona pellucida* and are infertile // *Development.* 1996. V. 122. № 9. P. 2903–2910.
- Rankin T., Soyak S., Dean J.* The mouse *zona pellucida*: folliculogenesis, fertility, and preimplantation development // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000. V. 163. № 1–2. P. 21–25.
- Rankin T.L., O'Brien M., Lee E. et al.* Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development // *Development.* 2001. V. 128. № 7. P. 1119–1126.
- Richter K.S.* The importance of growth factors for preimplantation embryo development and *in vitro* culture // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2008. V. 20. № 3. P. 292–304.
- Sargent I.L., Martin K.L., Barlow D.H.* The use of recombinant growth factors to promote human embryo development in serum-free medium // *Hum. Reprod.* 1998. Suppl. 13. V. 4. P. 239–248.
- Sathananthan H., Menezes J., Gunasheela S.* Mechanics of human blastocyst hatching *in vitro* // *Reprod. Biomed. Online.* 2003. V. 7. № 2. P. 228–234.

- Sellens M.H., Jenkinson E.J. Permeability of the mouse *zona pellucida* to immunoglobulins // J. Reprod. Fertil. 1975. V. 42. № 1. P. 153–157.
- Serdarogullari M., Findikli N., Goktas C. et al. Comparison of gender-specific human embryo development characteristics by time-lapse technology // Reprod. Biomed. Online. 2014. V. 29. № 2. P. 193–199.
- Serizawa M., Kinoshita M., Rodler D. et al. Oocytic expression of *zona pellucida* protein ZP4 in Japanese quail (*Coturnix japonica*) // Anim. Sci. J. 2011. V. 82. № 2. P. 227–235.
- Seshagiri P.B., Mishra A., Ramesh G. et al. Regulation of peri-attachment embryo development in the golden hamster: role of growth factors // J. Reprod. Immunol. 2002. V. 53. № 1–2. P. 203–213.
- Seshagiri P.B., Sen Roy S., Sireesha G. et al. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching // J. Reprod. Immunol. 2009. V. 83. № 1–2. P. 79–84.
- Sharma N., Kumar R., Renaux B. et al. Implantation serine proteinase 1 exhibits mixed substrate specificity that silences signaling via proteinase-activated receptors // PLoS One. 2011. V. 6. № 11. e27888.
- Shen Y., Stalf T., Mehnert C. et al. High magnitude of light retardation by the *zona pellucida* is associated with conception cycles // Hum. Reprod. 2005. V. 20. № 6. P. 1596–1606.
- Sinowatz F., Kolle S., Topfer-Petersen E. Biosynthesis and expression of *zona pellucida* glycoproteins in mammals // Cells. Tissues. Organs. 2001. V. 168. № 1–2. P. 24–35.
- Sireesha G.V., Mason R.W., Hassanein M. et al. Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster // Mol. Hum. Reprod. 2008. V. 14. № 6. P. 337–346.
- Sterchi E.E., Stöcker W., Bond J.S. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases // Mol. Aspects. Med. 2008. V. 29. № 5. P. 309–328.
- Stetson I., Avilés M., Moros C. et al. Four glycoproteins are expressed in the cat *zona pellucida* // Theriogenology. 2015. V. 83. № 7. P. 1162–11673.
- Sun Q.Y. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs // Microsc. Res. Tech. 2003. V. 61. № 4. P. 342–348.
- Suzuki H., Togashi M., Adachi J. et al. Developmental ability of zona-free mouse embryos is influenced by cell association at the 4-cell stage // Biol. Reprod. 1995. V. 53. № 1. P. 78–83.
- Swiatecka J., Bielawski T., Anchim T. et al. Oocyte *zona pellucida* and meiotic spindle birefringence as a biomarker of pregnancy rate outcome in IVF-ICSI treatment // Ginekol. Pol. 2014. V. 85. № 4. P. 264–271.
- Thouas G.A., Dominguez F., Green M.P. et al. Soluble ligands and their receptors in human embryo development and implantation // Endocr. Rev. 2015. V. 36. № 1. P. 92–130.
- Thurin A., Rogberg L., Lundin K. et al. Assisted hatching: is it worthwhile? // Human Reprod. 1998. V. 13. P. 45.
- Vajta G., Rienzi L., Bavister B.D. Zona-free embryo culture: is it a viable option to improve pregnancy rates? // Reprod. Biomed. Online. 2010. V. 21. № 1. P. 17–25.
- Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A. et al. Is the *zona pellucida* an efficient barrier to viral infection? // Reprod. Fertil. Dev. 2010. V. 22. № 1. P. 21–31.
- Veeck L., Zaninovic N. Blastocyst hatching // An Atlas of Human Blastocysts. London: Parthenon Publishing, 2003. P. 159–171.
- Wassarman P.M. *Zona pellucida* glycoproteins // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 36. P. 24285–24289.
- Wassarman P.M., Litscher E.S. Influence of the *zona pellucida* of the mouse egg on folliculogenesis and fertility // Int. J. Dev. Biol. 2012. V. 56. № 10–12. P. 833–839.

Blastocyst Hatching in Humans

R. A. Shafei^{a,*}, A. G. Syrkasheva^b, A. Yu. Romanov^a, N. P. Makarova^b,
N. V. Dolgushina^b, and M. L. Semenova^a

^aMoscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bKulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: 8329162@gmail.com

Received August 29, 2016

The human oocyte is surrounded by the *zona pellucida*—an elastic, transparent extracellular matrix consisting of specific glycoproteins. The *zona pellucida* is preserved after fertilization and surrounds the developing human embryo for a few days. The embryo needs to get out of the *zona pellucida* before implantation to establish cell contacts between the trophoctoderm and endometrial epithelium. The release of the embryo from the *zona pellucida* is carried out at the stage of the blastocyst and called zona hatching. During zona hatching the blastocyst breaks the *zona pellucida* and performs active movements to escape through a gap formed in the zona. While microscopic description of zone hatching is well known, biochemical and cytological basis of zone hatching remains poorly understood. The break of the *zona pellucida* occurs under the influence of two forces: mechanical pressure of the growing blastocyst on the zone and chemical dissolution of the zone material with secreted lytic enzymes. There is only one paper (Sathananthan et al., 2003), which describes the specialized cells in the trophoctoderm that locally dissolve the *zona pellucida*, promoting the emergence of the hole for blastocyst release. Taking into account the singleness of the paper and the absence of further development of this subject by the authors in the following decade, the existence of specialized cells for zone hatching should be assumed with great care. Lytic enzymes, secreted by cells of the trophoctoderm for dissolving the *zona pellucida*, are different. Depending on the species of the mammal, different classes of proteases par-

ticipate in the zone hatching process: serine proteases, cysteine proteases, metalloproteinases. Proteases, secreted by human trophoctoderm, are not described. The mechanisms of the active movement during blastocyst hatching are investigated to a lesser degree. Only the involvement of the cytoskeleton of trophoctoderm cells in the mechanism of blastocyst compression was shown, and the participation of desmosomes in the coordinated change in the form of trophoctoderm cells during compression is suggested. This review summarizes literature data on the possible mechanisms of zone hatching in the development of human embryos, obtained in experiments *in vitro*, as well as in animal models.

Keywords: zona hatching, *zona pellucida*, strypsin, cathepsin L, ovastacin, SK3, embryo, *in vitro* fertilization