

***Первичные
Половые
клетки***

Четыре гипотезы происхождения ППК

(по Дыбану А.П., 1988)

Красным заштрихованы участки, с которыми связывают происхождение ППК.

1. Гипотеза половой плазмы:

Цитоплазматические детерминанты, ответственные за формирование ППК, образуются во время оогенеза.

2. Сегрегационная гипотеза:

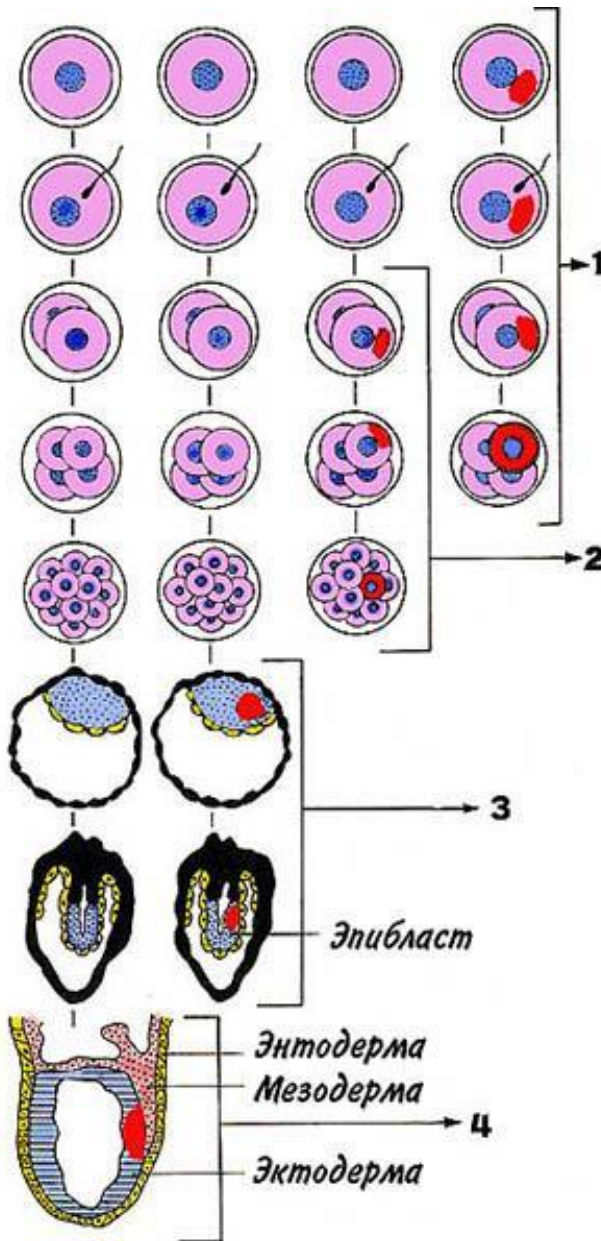
Половые детерминанты образуются в цитоплазме зиготы после оплодотворения. Как и в первом случае, эти цитоплазматические факторы попадают при дроблении только в некоторые бластомеры, которые и являются предшественниками ППК.

3. Гипотеза стволовых клеток:

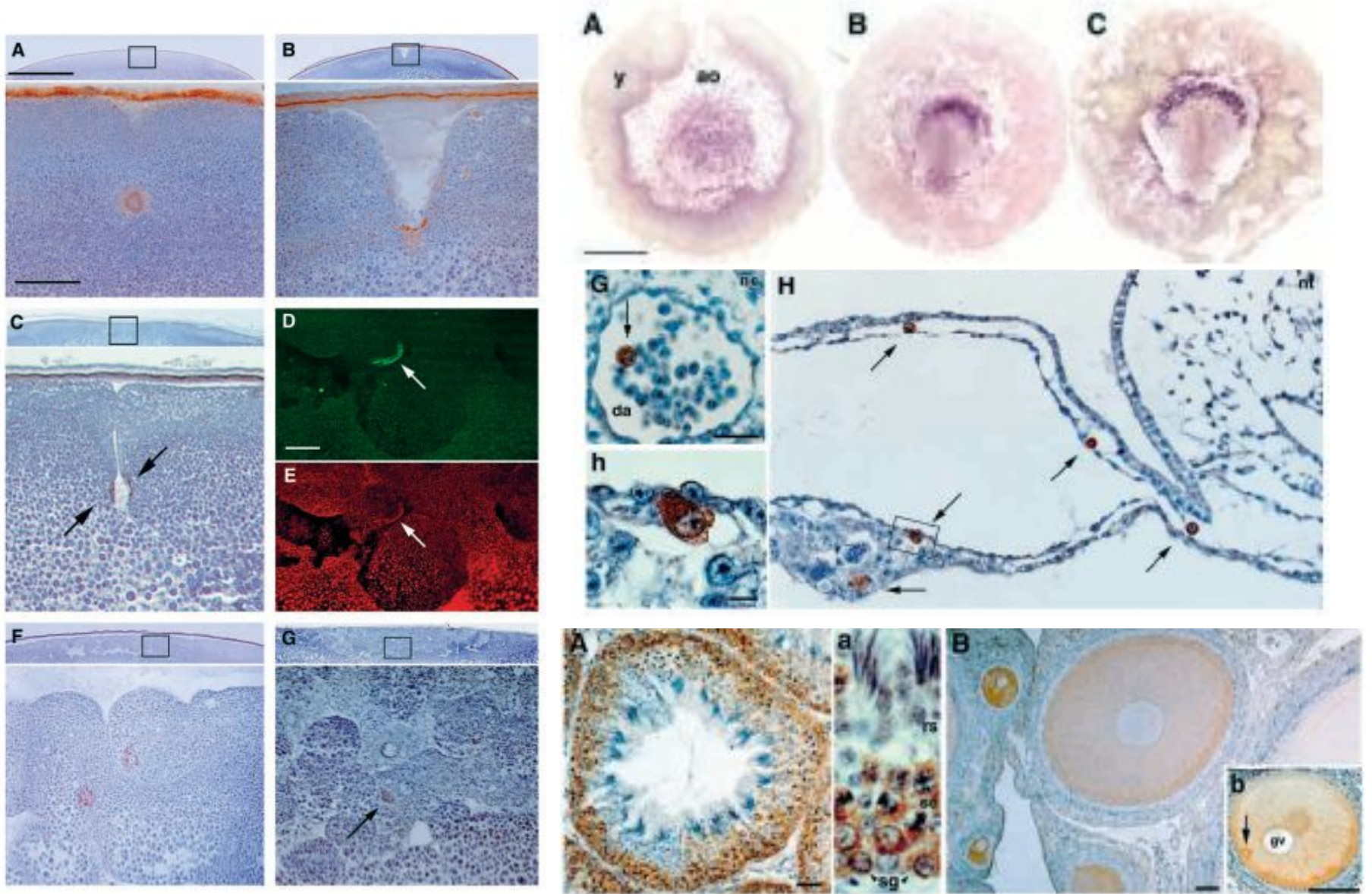
ППК обособляются во внутренней клеточной массе бластоцисты или в эпибласте до начала гаструляции и формирования зародышевых листков.

4. Гипотеза зародышевых листков:

ППК происходят от одного из трех зародышевых листков (эктодермы, энтодермы или мезодермы)

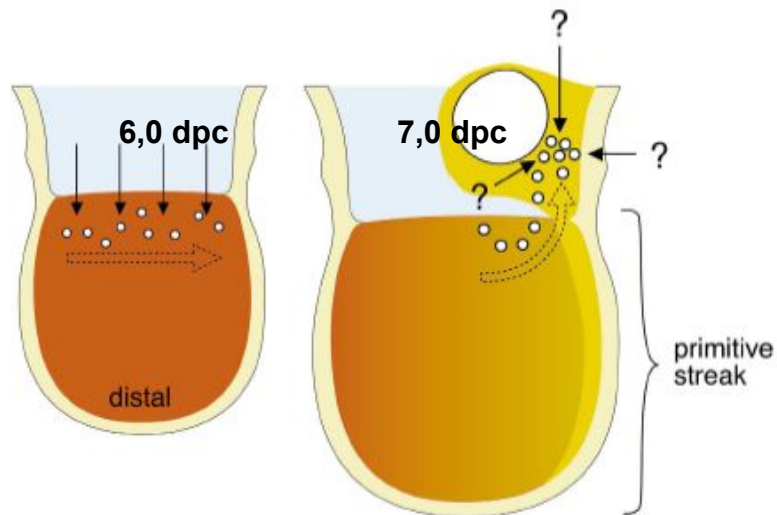


Выделение линии половых клеток у птиц:
CVG – маркер клеток полового ряда, гомолог гена *Vasa*



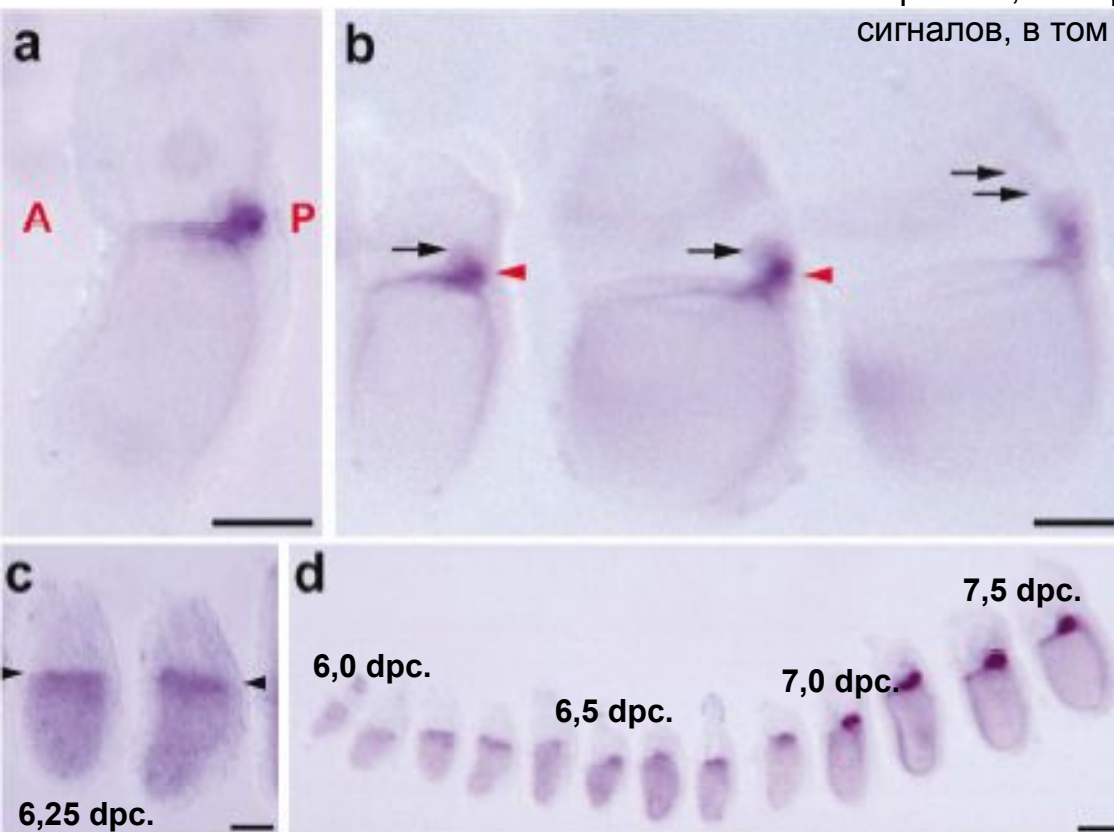
Выделение линии половых клеток у эмбриона мыши

McLaren (1999).



6.0 dpc: сигнал (черные стрелки), исходящий из внезародышевой эктодермы (голубая) воздействует на клетки проксимального слоя эпибласта (оранж.), превращая часть из них в предшественников половых клеток (PGC). Во время гаструляции эти клетки движутся в каудальную область первичной полоски и, потом, во внезародышевую область вместе с клетками внезародышевой мезодермы, выселяющейся из первичной полоски).

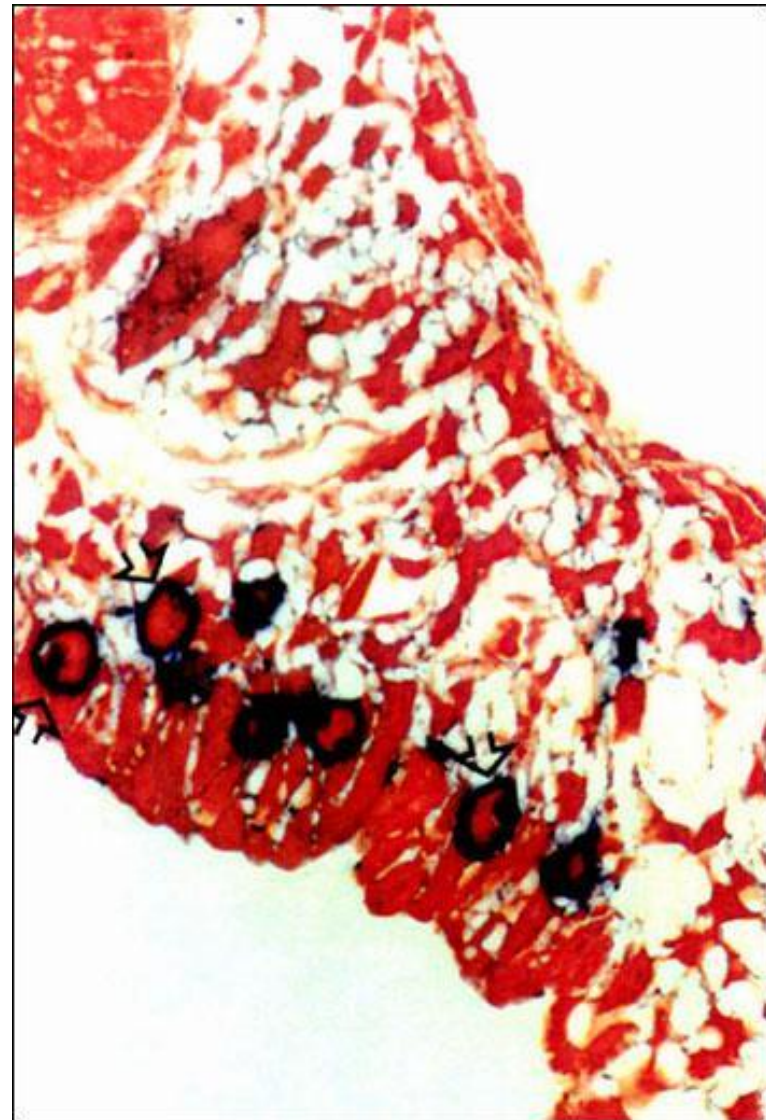
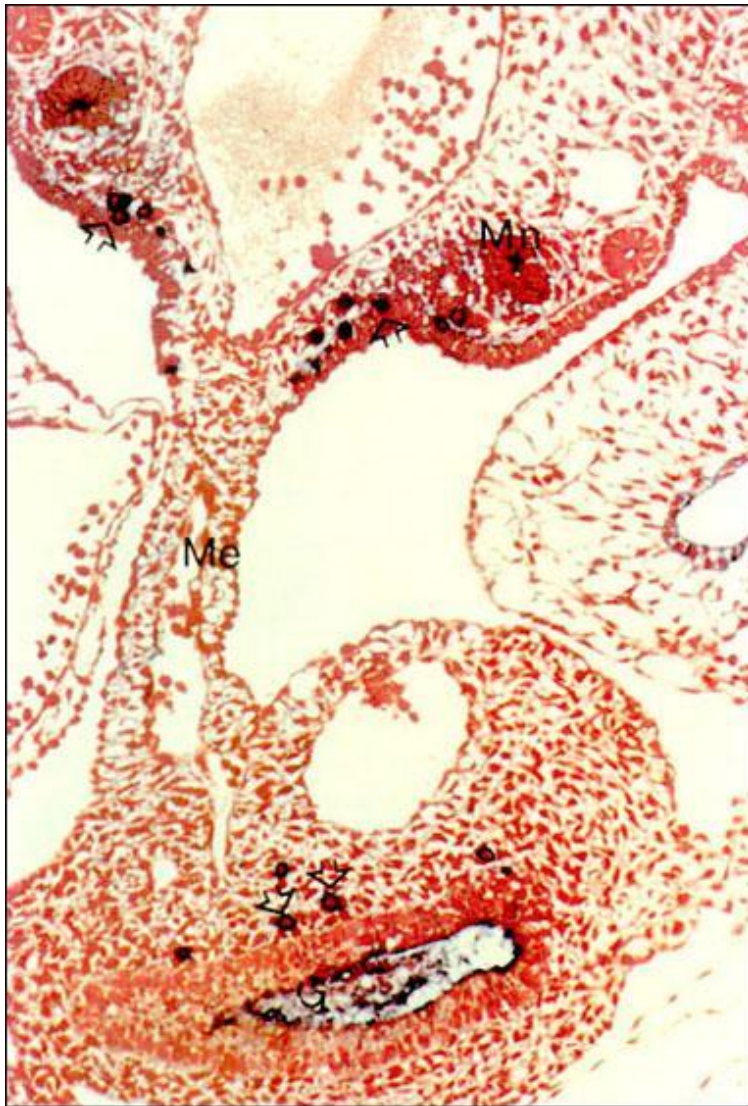
7.0 dp: внезародышевая мезодерма (желтая) формирует заднюю амниотическую складку (белая область – экзоцелом). Часть(?) предшественников PGC превращается в PGC. Вероятно, это происходит под влиянием дополнительных сигналов, в том числе и из области висцеральной энтодермы).



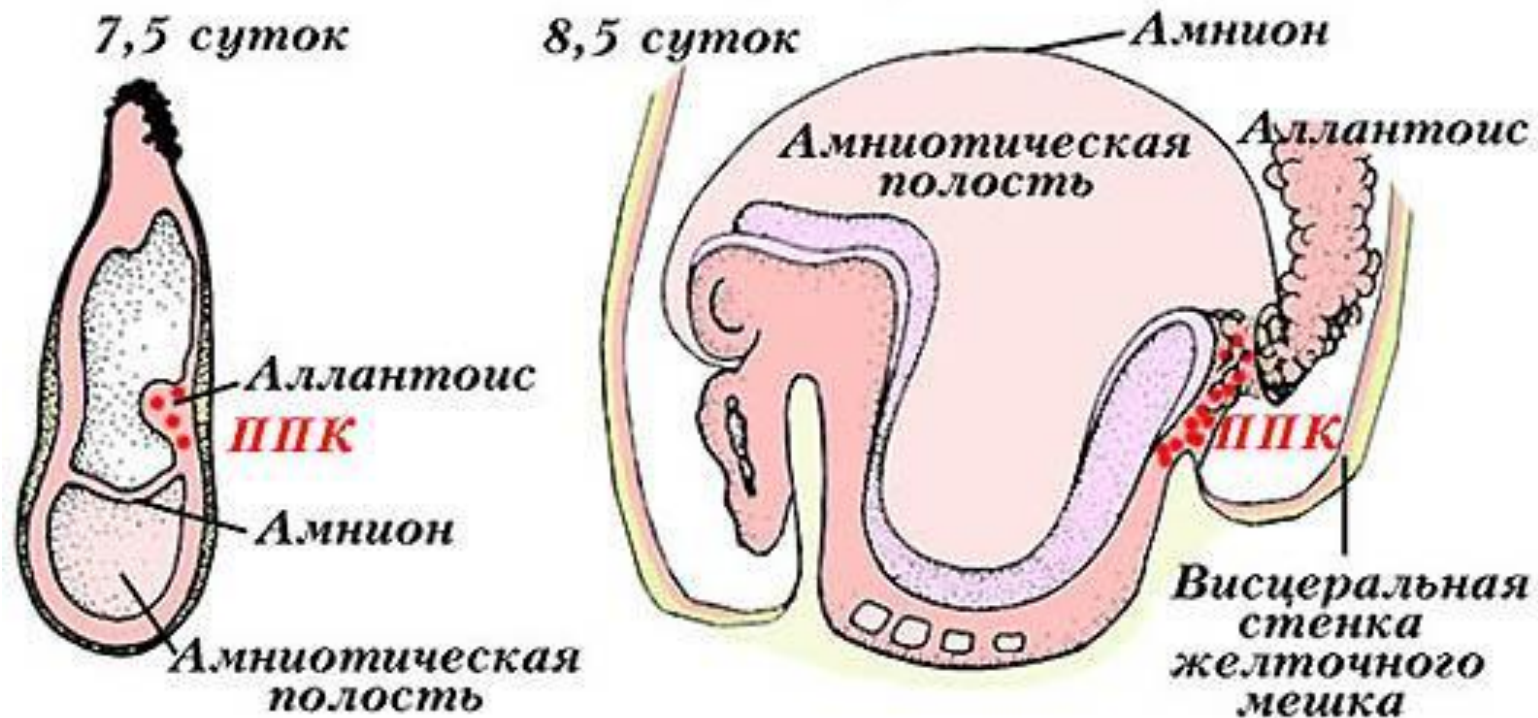
Saitou et al. (2002): **экспрессия гена *fragilis* во время гаструляции** (его экспрессия прослеживается на пути миграции предшественников половых клеток). (A. McLaren / *Developmental Biology* 262 (2003) 1–1513)

To date (2011), only a few genes that mark the onset of germ cell commitment in the epiblast—the outer layer of cells of the embryo—including tissue **non-specific alkaline phosphatase (TNAP)**, ***Blimp1***, ***Stella*** and ***Fragilis***—have been used with some success to detect PGC formation in *in vitro* model systems.

Первичные половые клетки (ППК) мыши, окраска на щелочную фосфатазу

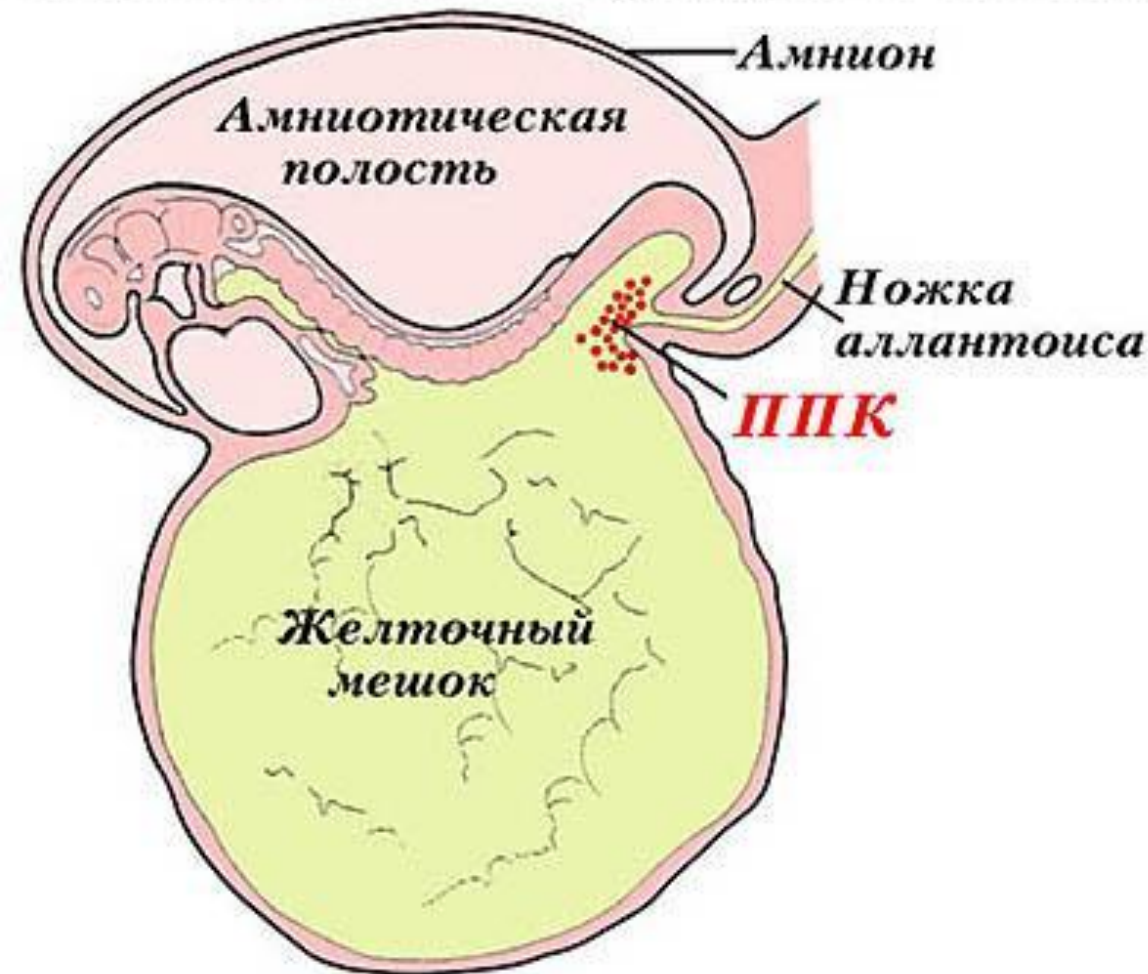


Выделение линии ППК у эмбриона мыши



| срок беременности | ППК, количество и локализация |
|-------------------|--|
| 7,25 суток | обособление линии ППК. Всего 4-8 клеток. Эмбрион на стадии зародышевого цилиндра |
| 7,5 суток | Начало гастрюляции. ППК во внезародышевой мезодерме (мезодерма желточного мешка) – всего 10-20 клеток |
| 8-9 суток | ППК в основании первичной полоски, в стенке желточного мешка, в энтодерме задней и средней кишки - всего около 75 клеток. |
| 9-10 суток | ППК формируют псевдоподии, давят на стенку задней кишки и через образовавшиеся щели переходят из энтодермальной выстилки кишки в мезенхиму кишки (ППК около 200 штук). |
| 10-11 суток | ППК - в мезенхиме дорзальной брыжейки и целомической выстилке закладки гонады. |
| 12-13 суток | ППК - заселяют закладки гонады (Всего их около 25.000 клеток). |

Выделение линии ППК у эмбриона человека

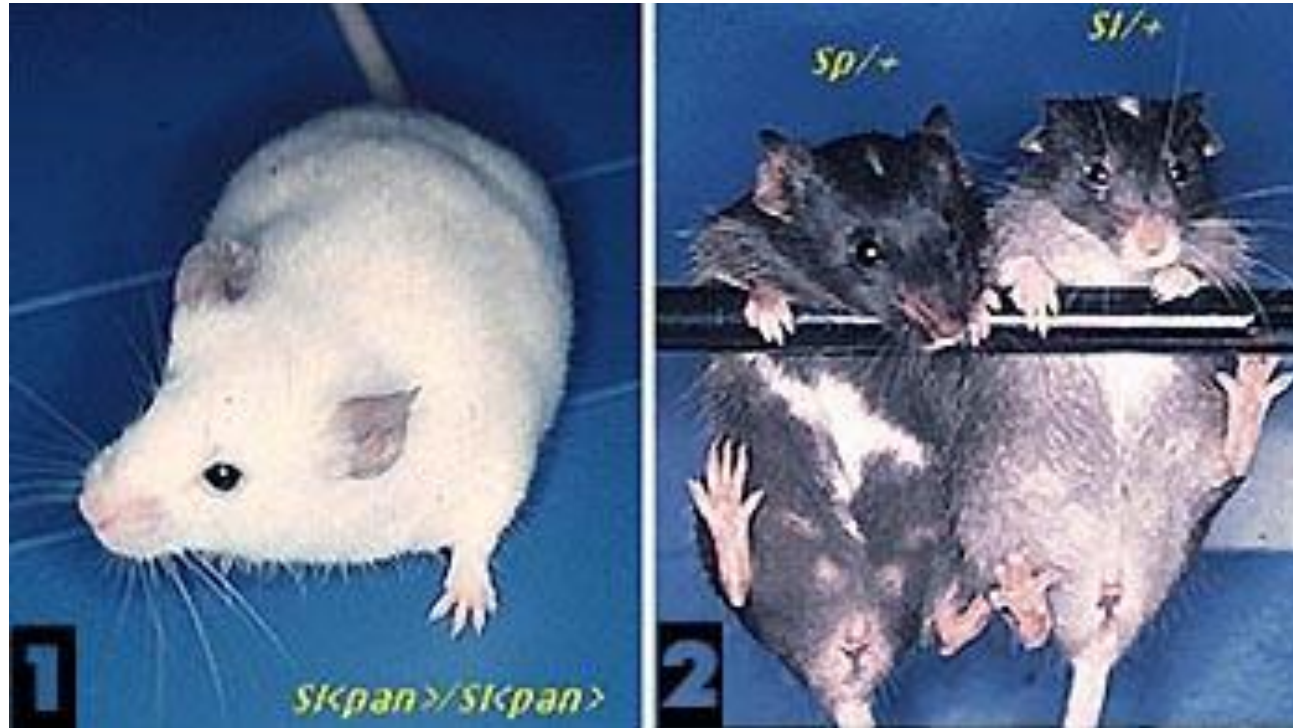


| срок беременности и | локализация ППК |
|---------------------|---|
| 24 суток | ППК в энтодерме желточного мешка. |
| 25 суток | ППК – в дистальных отделах желточного мешка, в том числе - в составе кроветворных островков |
| 26-28 суток | Часть ППК в мезенхиме и области отхождения аллантоиса (за счет гастрюляционных движений клеточных пластов). ППК, оказавшиеся в составе кроветворных островков, разносятся с током крови по всему телу эмбриона и обнаруживаются в крупных сосудах и капиллярах. |
| 33-34 суток | ППК, попавшие в кровеносную систему эмбриона, выходят из сосудов и скапливаются между дорзальной аортой и первичными почками. |
| 35-36 суток | Направленное движение ППК через мезенхиму в область развивающихся половых валиков |
| 37-45 суток | Все ППК вселились в закладку гонады |

Линии мышей, несущих мутации, при которых наблюдается снижение численности популяции ППК и нарушение в их миграции:

W – мутации в локусе *W*

Sl (*Steel*) – мутации в локусе *Sl*



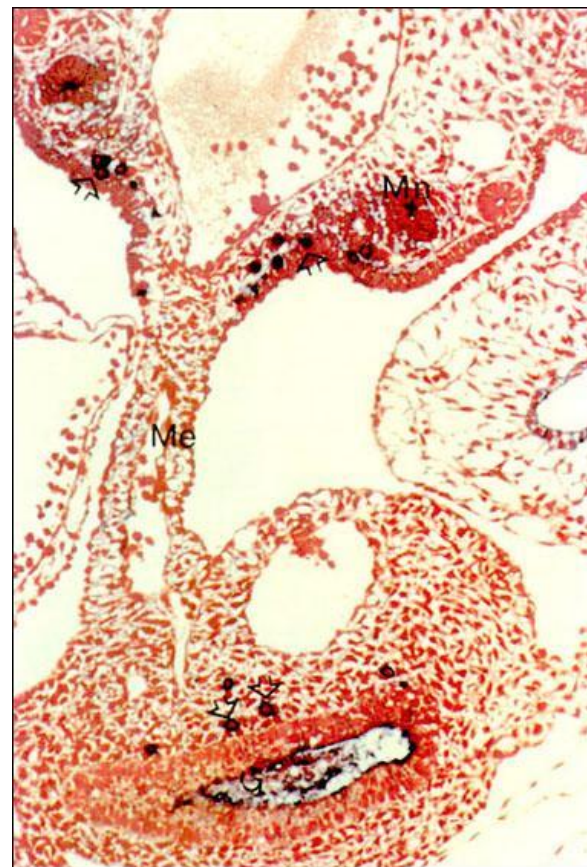
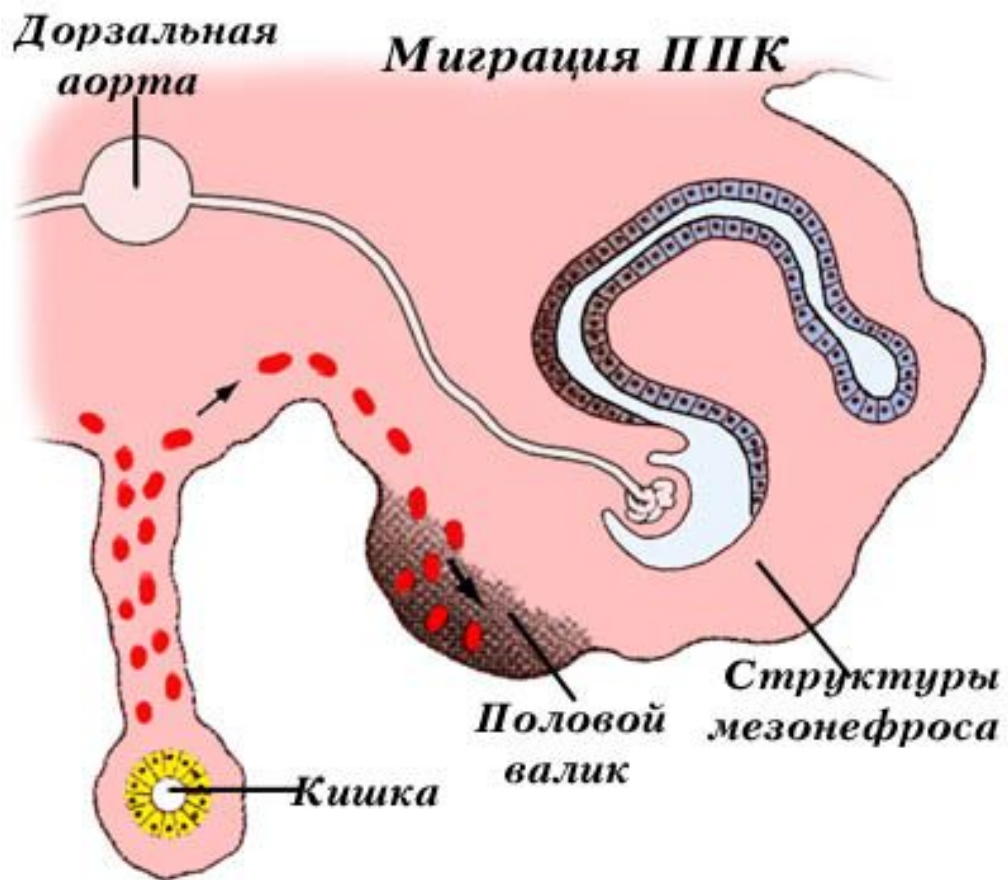
Мыши из коллекций Jackson's Laboratories (США), крупнейшего центра, хранящего генетические линии лабораторных животных:

Рис.1: у мыши окрашены только радужка глаз и уши.

Рис.2: меланоциты отсутствуют на некоторых участках тела мышей.

локус *W* несет ген рецептора тирозинкиназы (с-Kit)
локус *Sl* кодирует его лиганд (Kit-ligand или Steel factor – SLF).

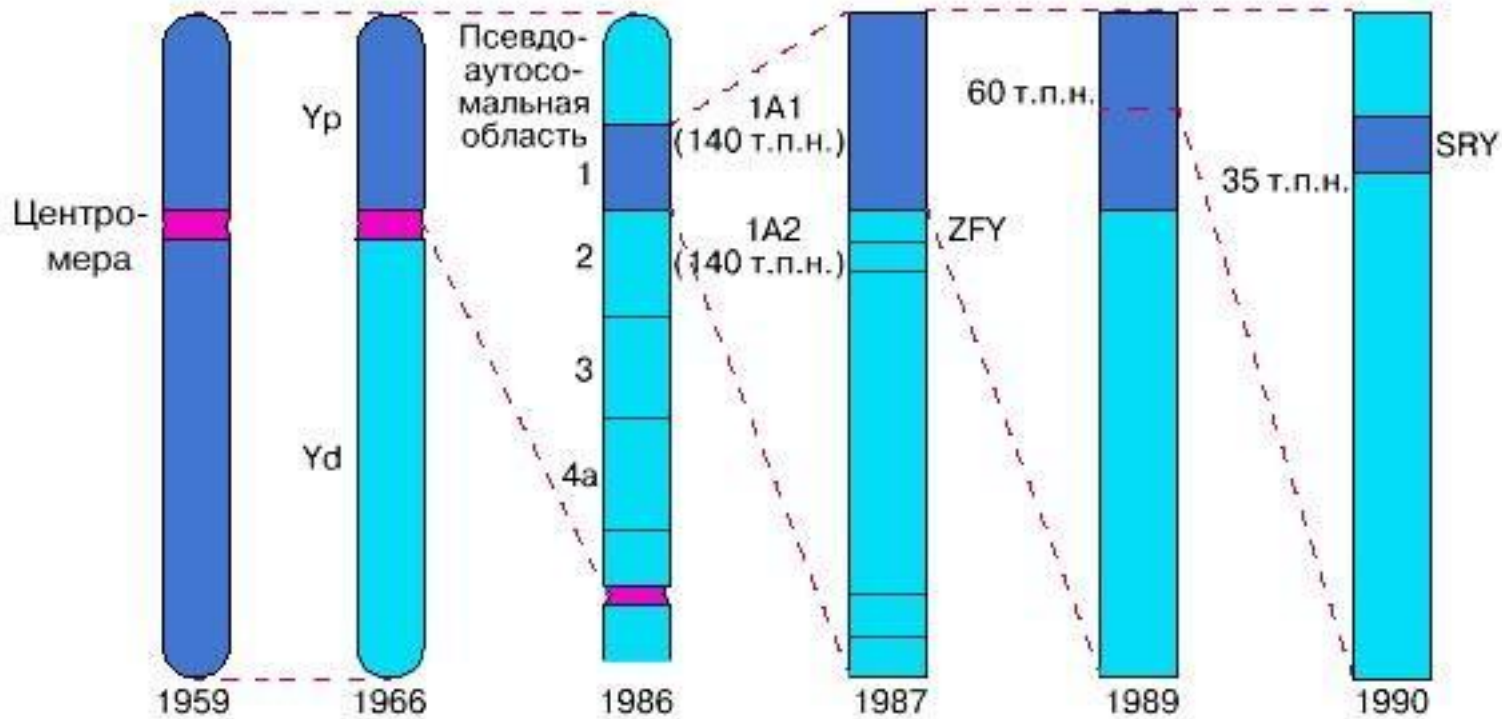
Высокая активность тирозинкиназы необходима для нормального процесса размножения и миграции ППК и клеток других популяций, мигрирующих в эмбриональный период развития (клетки нервного гребня, кроветворные клетки).



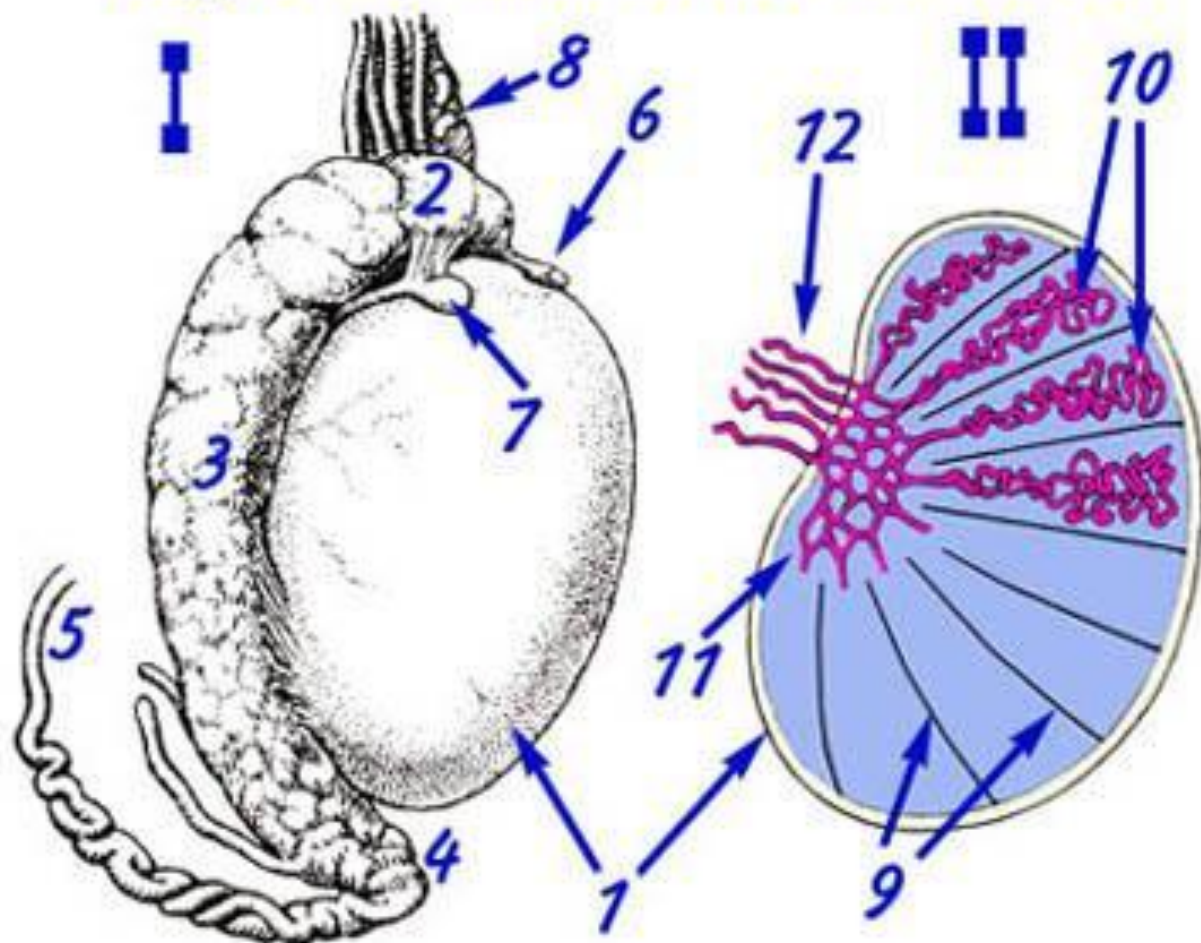
A light micrograph of a testis section stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a cross-section of seminiferous tubules. Within these tubules, numerous developing sperm cells are visible at various stages of spermatogenesis. The cells are stained purple, with darker purple indicating nuclei and lighter purple indicating cytoplasm and other cellular components. The tubules are arranged in a regular pattern, and the overall appearance is that of a healthy, active testis.

СПЕРМАТОГЕНЕЗ

История поиска на Y-хромосоме человека гена, ответственного за дифференцировку гонады по мужскому типу (по Sultan C. и др., 1991)



Строение семенника человека



Семенник: морфология и гистология

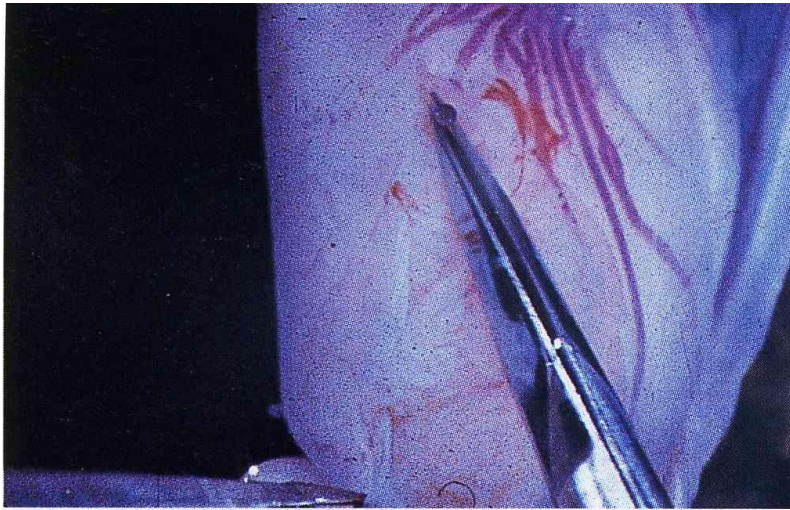


Fig. 19-2. Macrophotograph of testis showing excision of tunica albuginea and underlying seminiferous tubules.

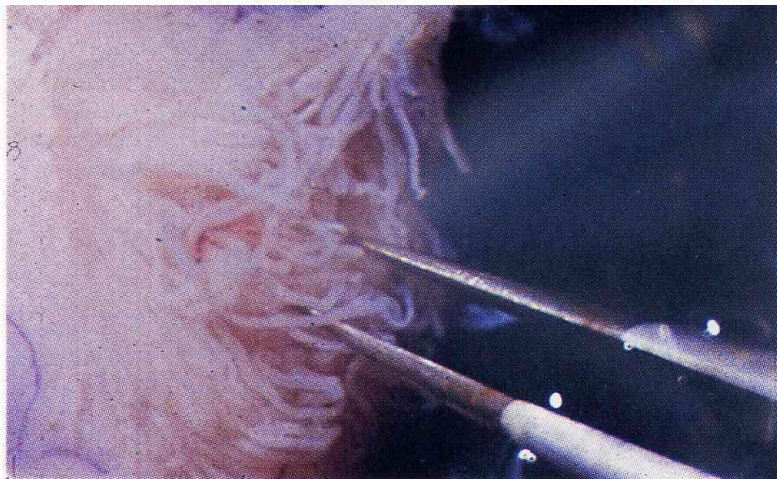
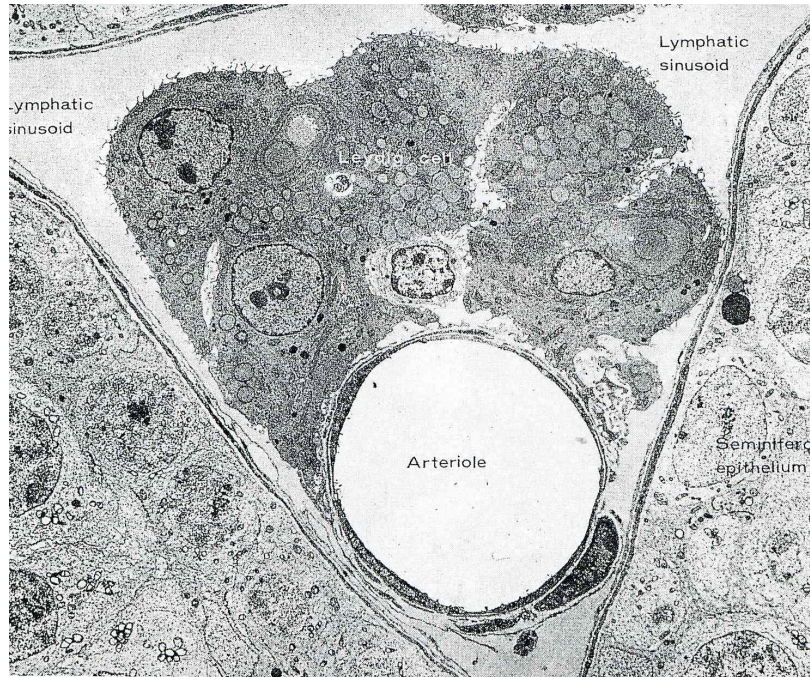
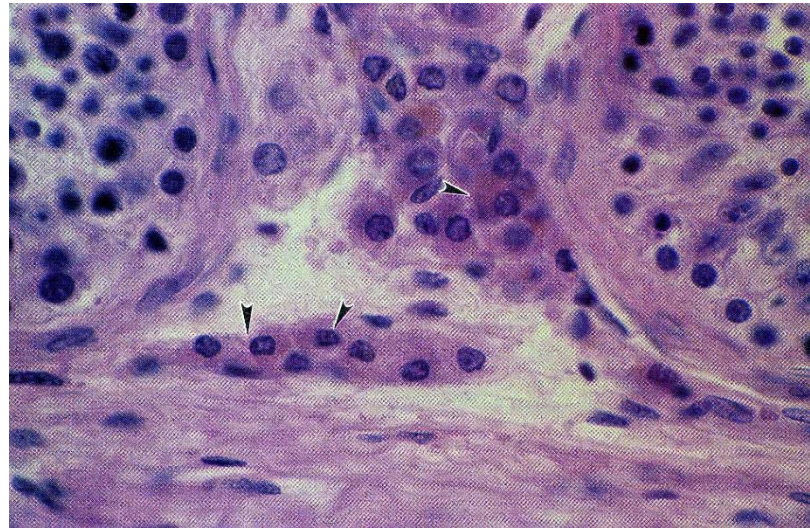


Fig. 19-4. Macrophotograph showing arrangement of seminiferous tubules within testis. Tunica albuginea has been removed to reveal seminiferous tubules. Compare with Figs. 19-2 and 19-5.

Семенник: морфология и гистология

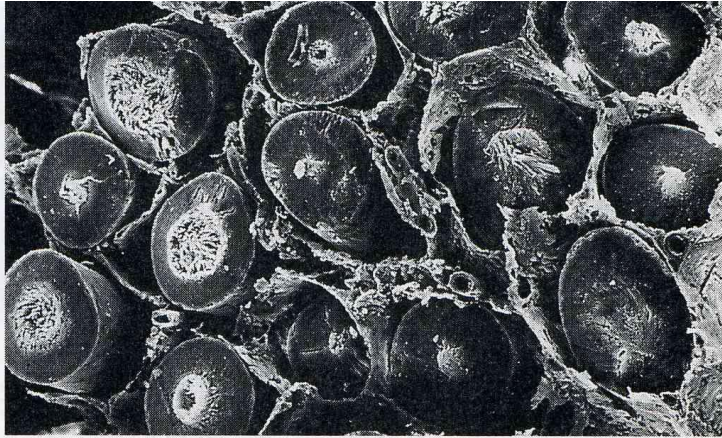
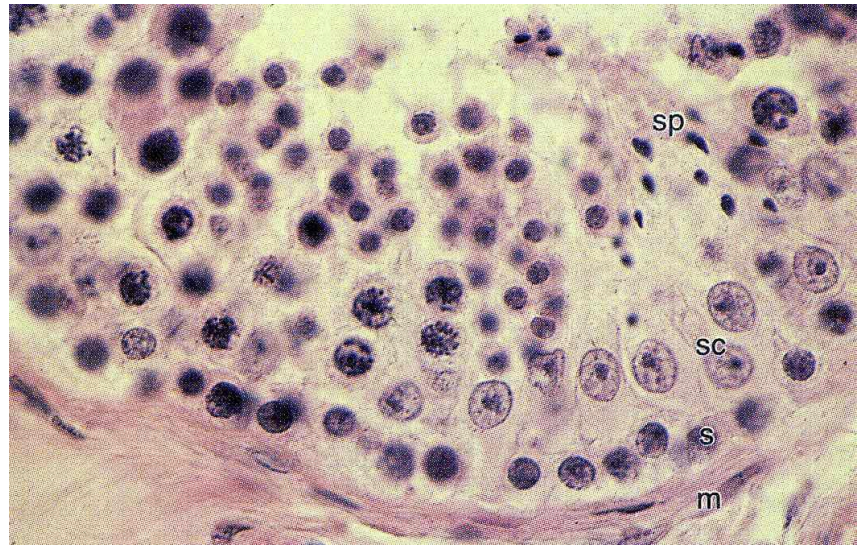
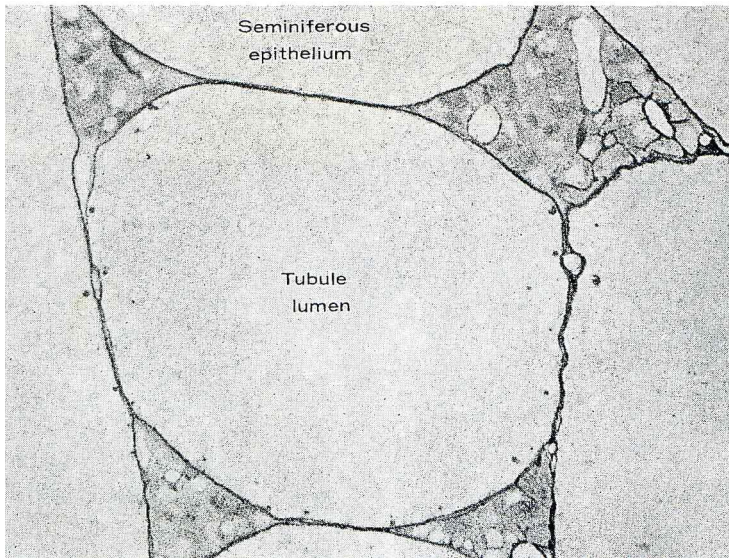
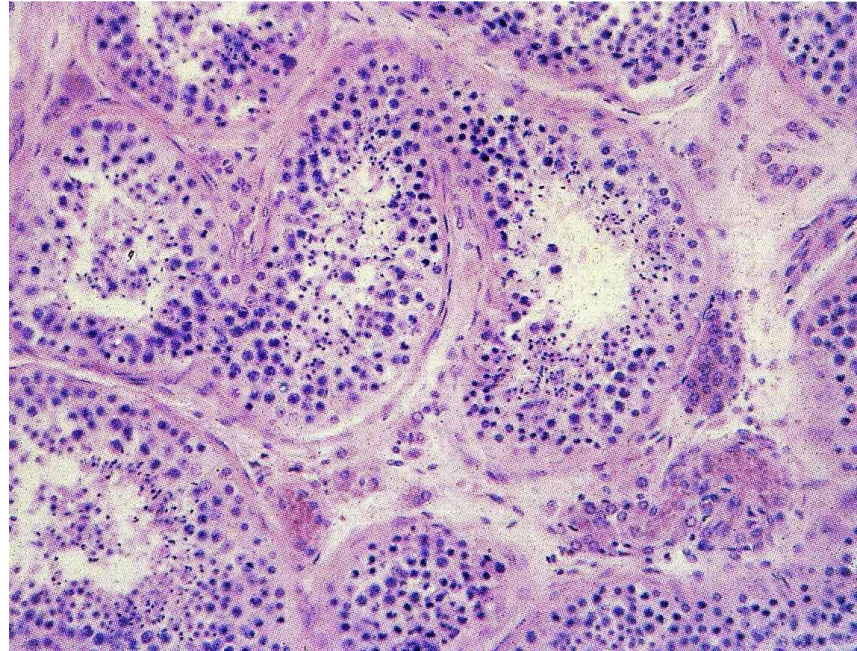
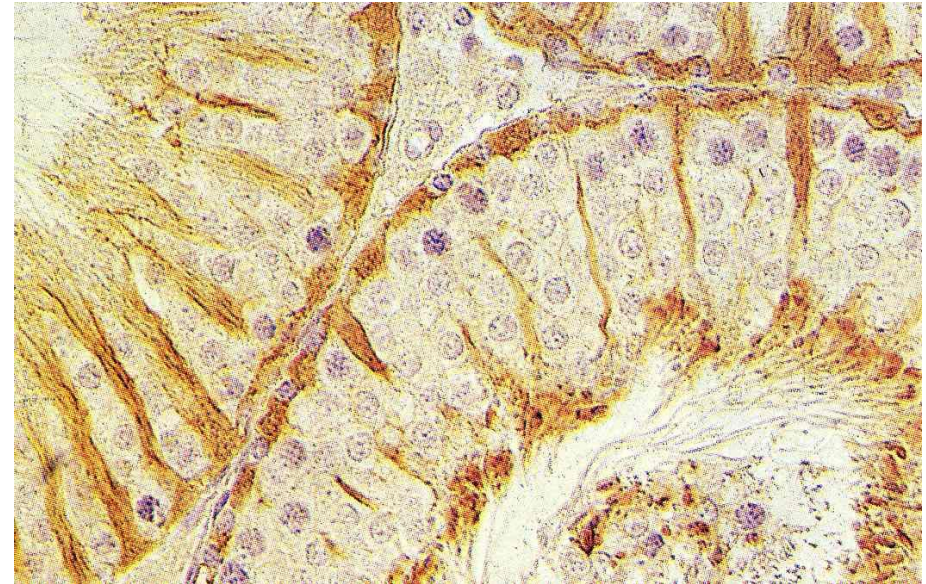
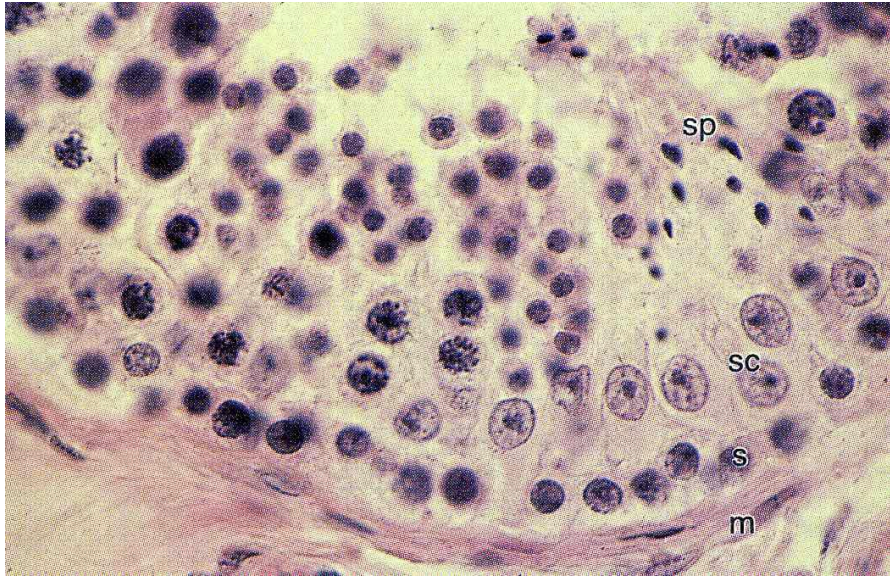


Fig. 19-5. Seminiferous tubules by SEM. Testis has been fractured to permit view. Small amounts of connective tissue can be seen around periphery of each tubule. Adjacent tubules exhibit different stages of spermatid development, as reflected by presence of flagellae. ($\times 70$.)



Строение стенки семенного канальца



**Иммуногистохимическое
окрашивание клеток Сертоли**
(окрашивание на один из ферментов,
участвующих в метаболизме глюкозы –
альдоз-редуктазу)

**Окраска
акридиновым
оранжевым**

Строение стенки семенного канальца



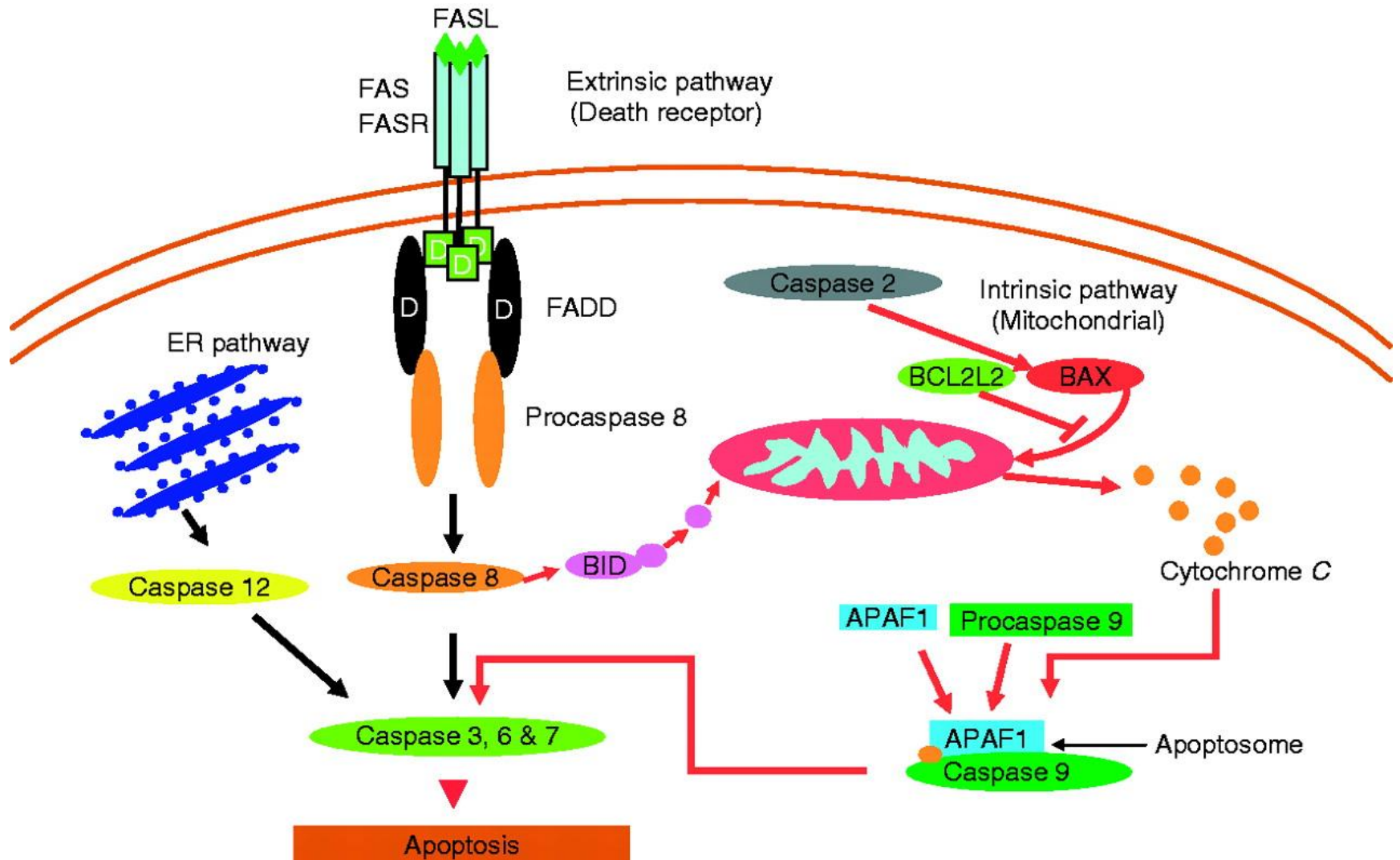
Клетки сперматогенного ряда:

1. – Сперматогоний, расположен в базальной части стенки семенного канальца
2. – Сперматоцит первого порядка
3. – Сперматоциты второго порядка
- 4 – Ранние (округлые) сперматиды
5. – Поздние (элонгированные) сперматиды

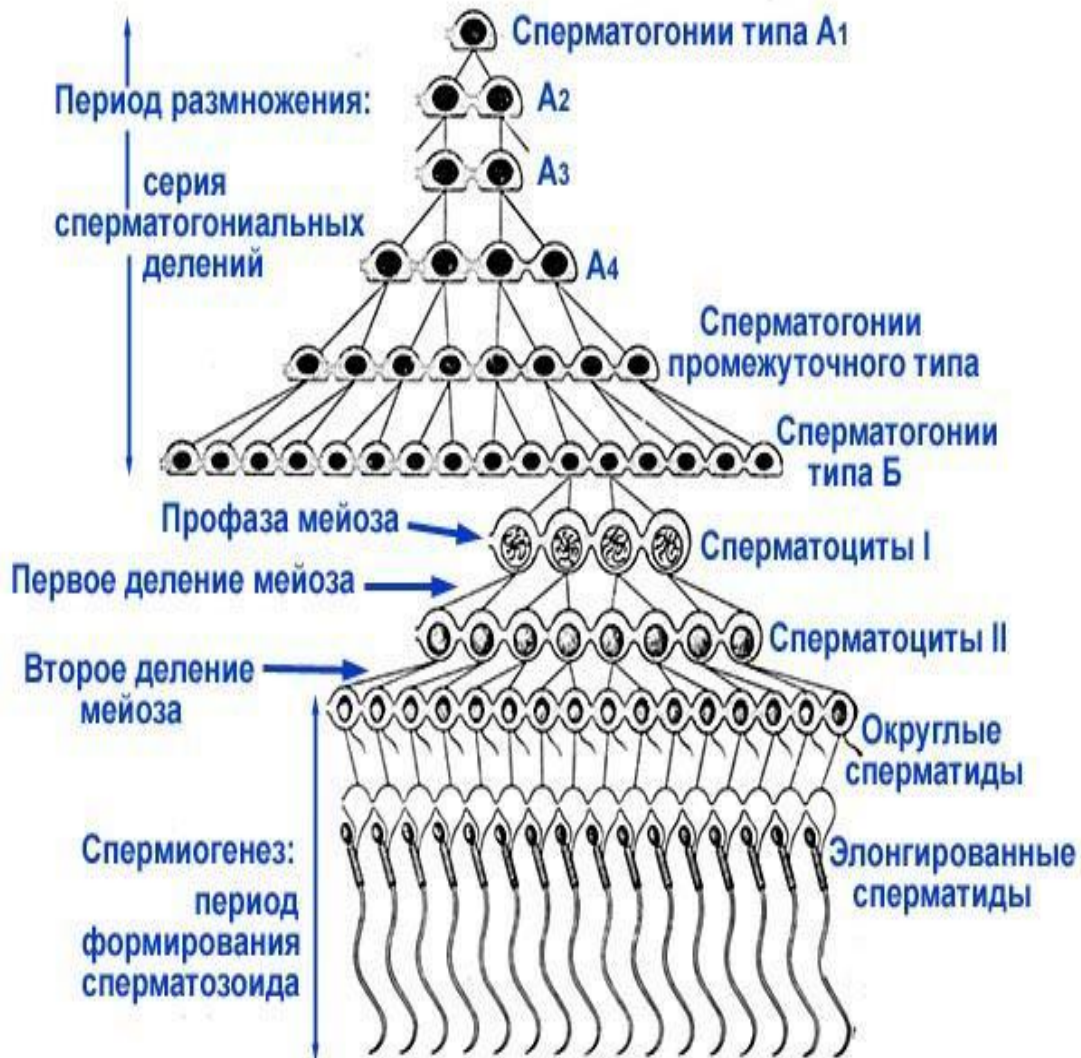
Другие элементы стенки семенного канальца:

6. – оболочка семенного канальца, состоит из нескольких базальных мембран (7) и двух клеточных слоев – внешнего (фибробластоподобные клетки) и внутреннего (8 – гладкомышечные клетки)
9. – Клетка Сертоли. Отростки соседних клеток Сертоли (10) соединены зонами плотных контактов, они отделяют друг от друга клоны сперматогенных клеток разных генераций.

Упрощенная схема каспаз-зависимого апоптозного пути в клетках сперматогенного ряда млекопитающих и человека описывающих три основные этапа (молекулярных механизма): уровень межклеточного взаимодействия (“рецептор смерти”) цитоплазматический уровень (ЭПР) и митохондриальный .



Последовательность событий при сперматогенезе



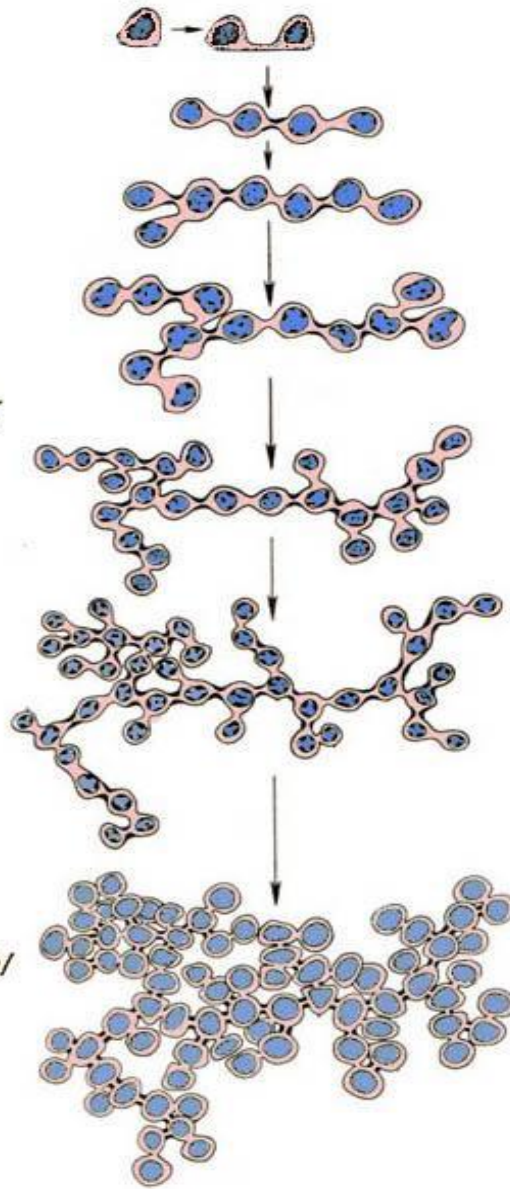
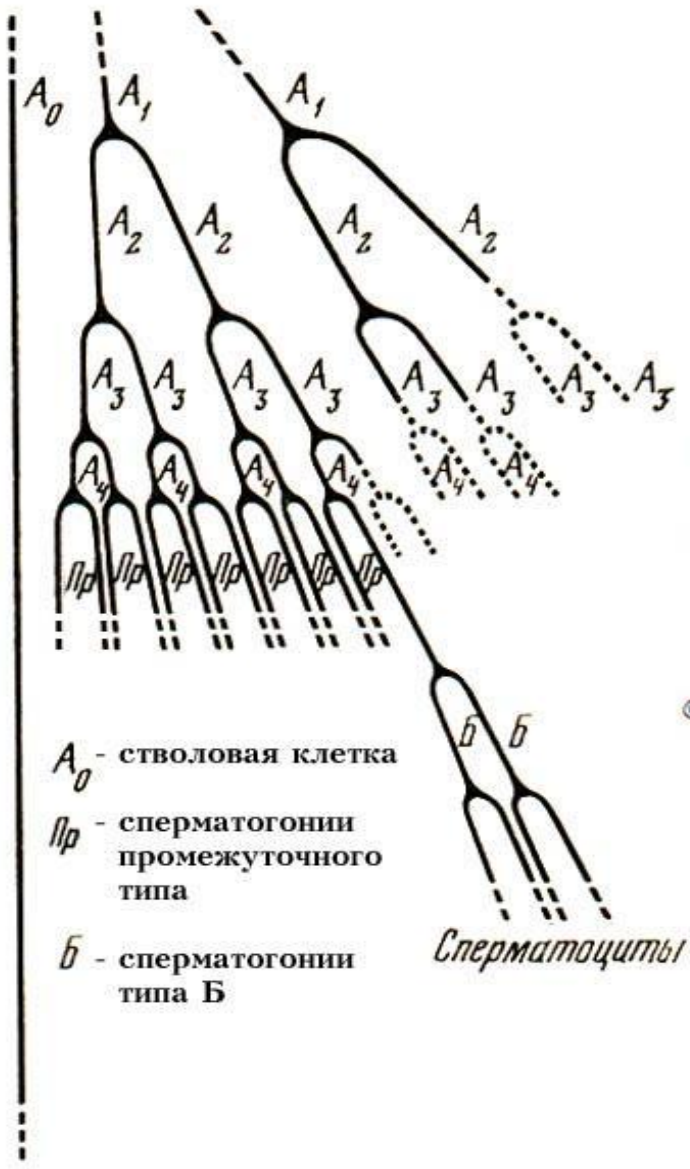
Периодизация сперматогенеза:

1 период: Митотическое размножение мужских половых клеток. В этот период половые клетки называют гониями (при сперматогенезе – сперматогониями)

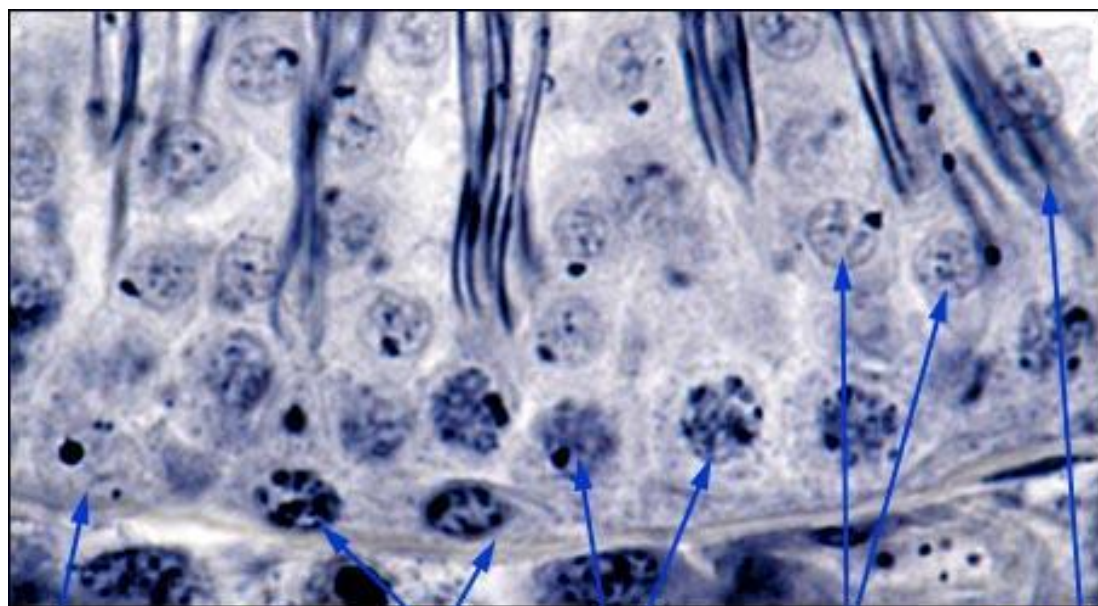
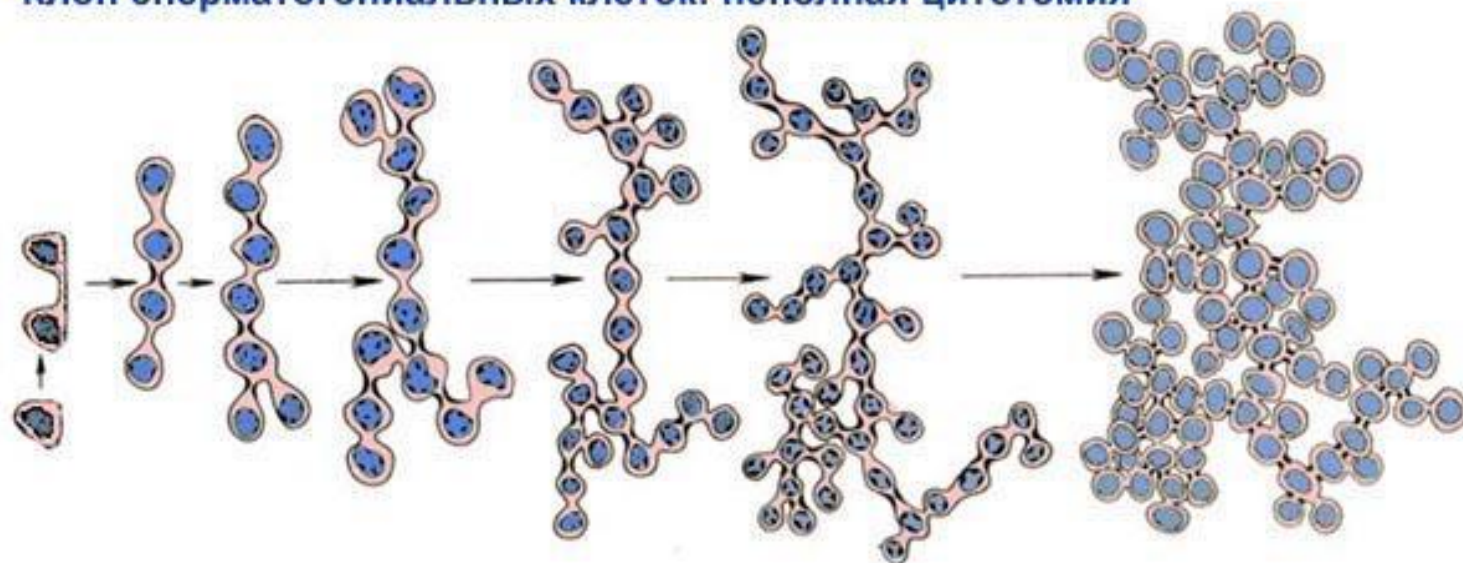
2 период: Мейоз. Этот период включает в себя профазу мейоза и два мейотических деления – редукционное и эквационное. Мужскую половую клетку в этот период называют сперматоцитом.

3 период: Спермиогенез - период, во время которого происходят постмейотические цитологические преобразования гаплоидной клетки - сперматиды, приводящие к формированию сперматозоида.

Формирование синцитиального клона сперматогенных клеток



Клон сперматогониальных клеток: неполная цитотомия



ядро клетки
Сертоли

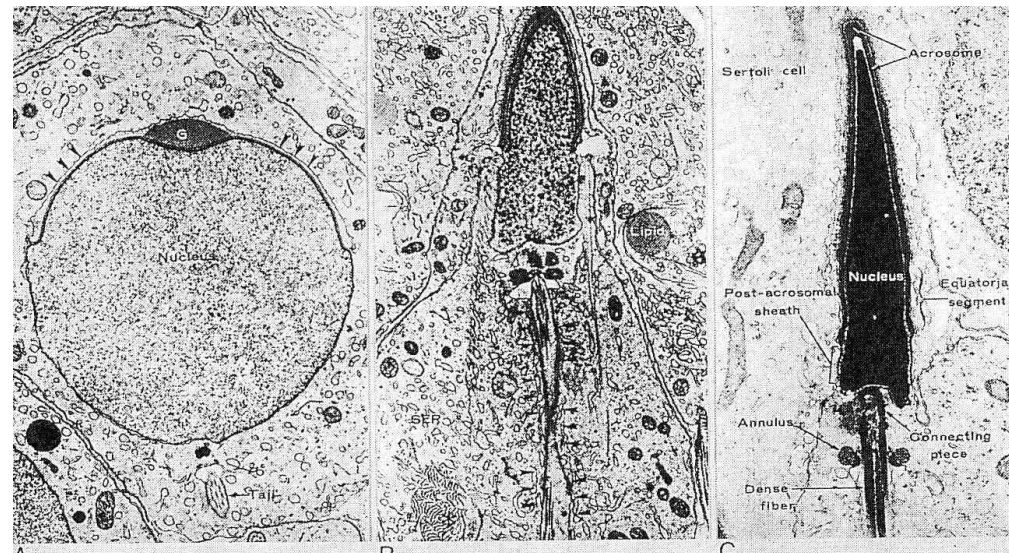
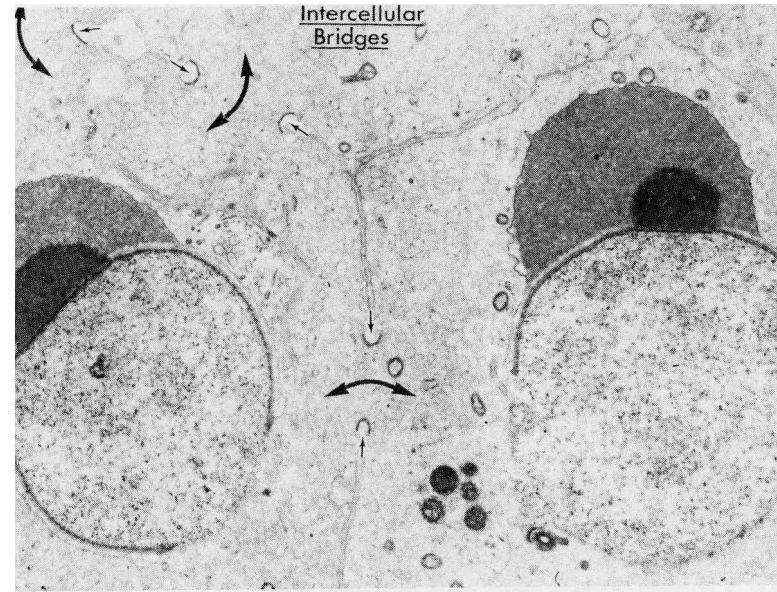
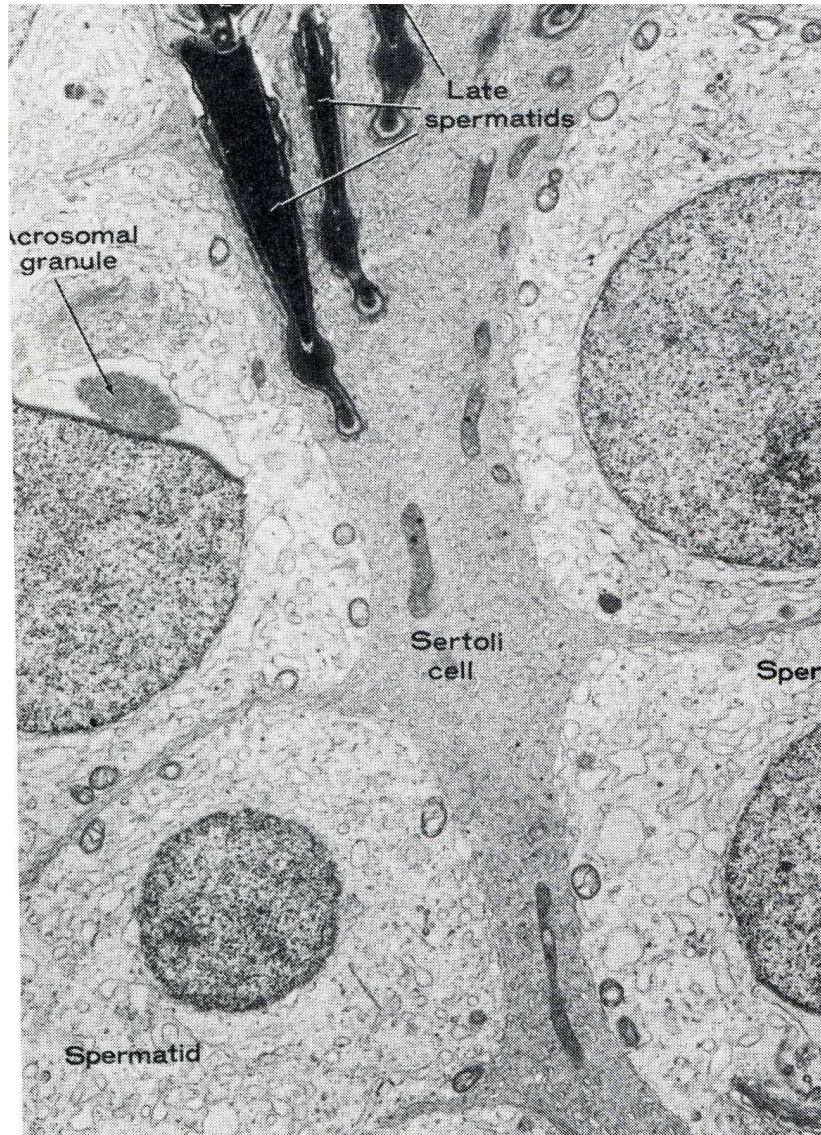
Сперматогонии

Сперматоциты I

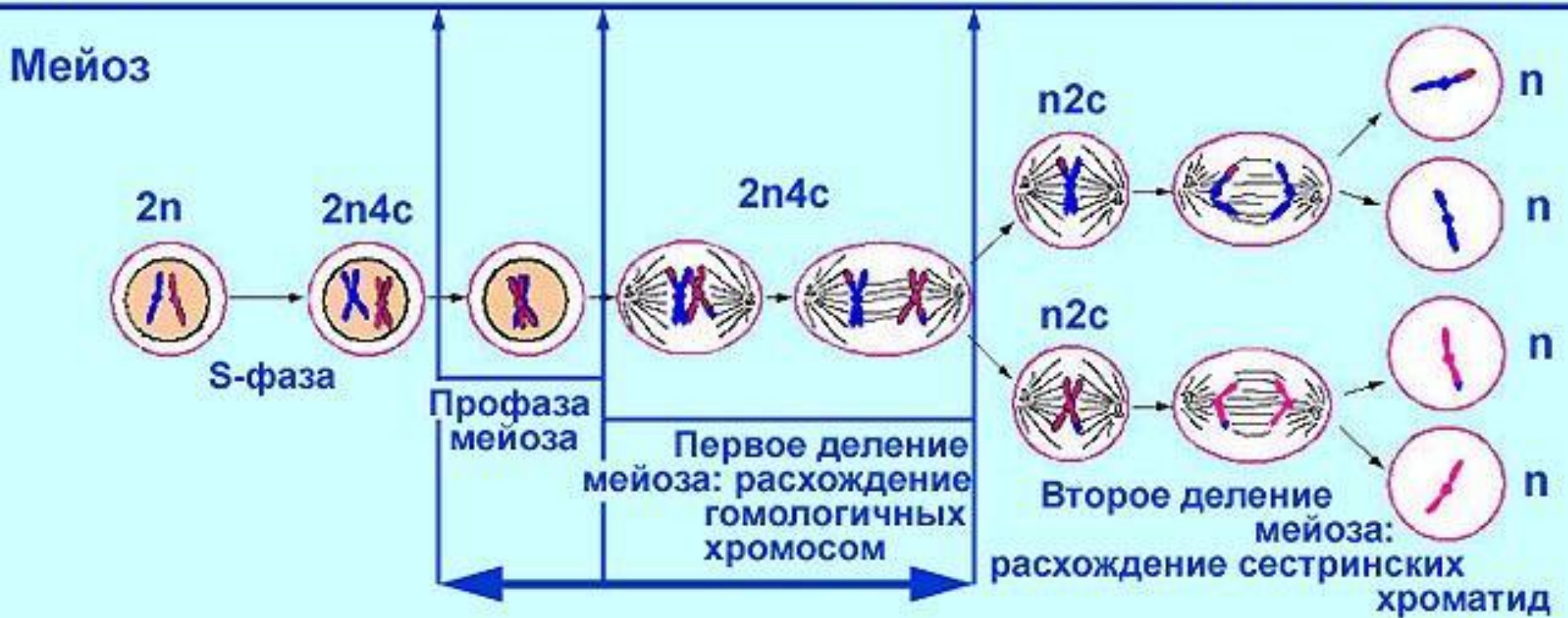
Ранние
сперматиды

Поздние
сперматиды

Ультраструктура стенки семенного канальца

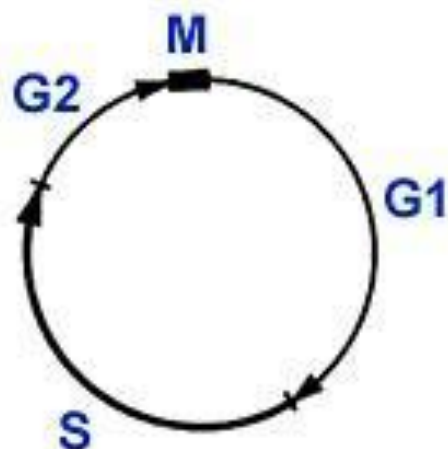


Чем отличается мейоз от митоза?

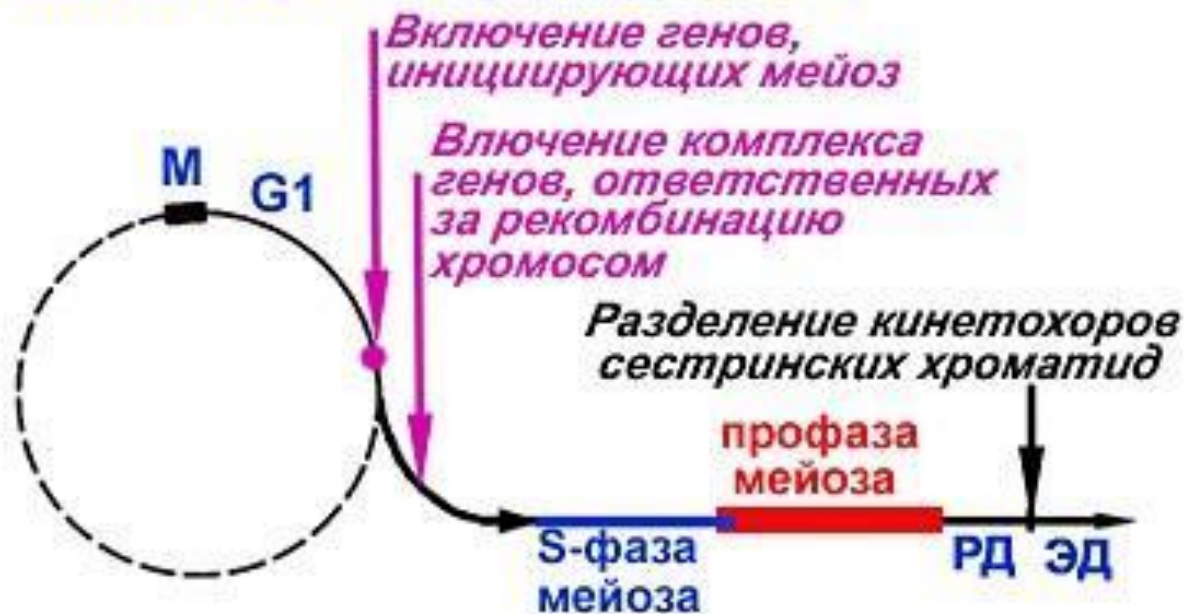


Клеточные циклы в сперматогенезе:

Сперматогонии

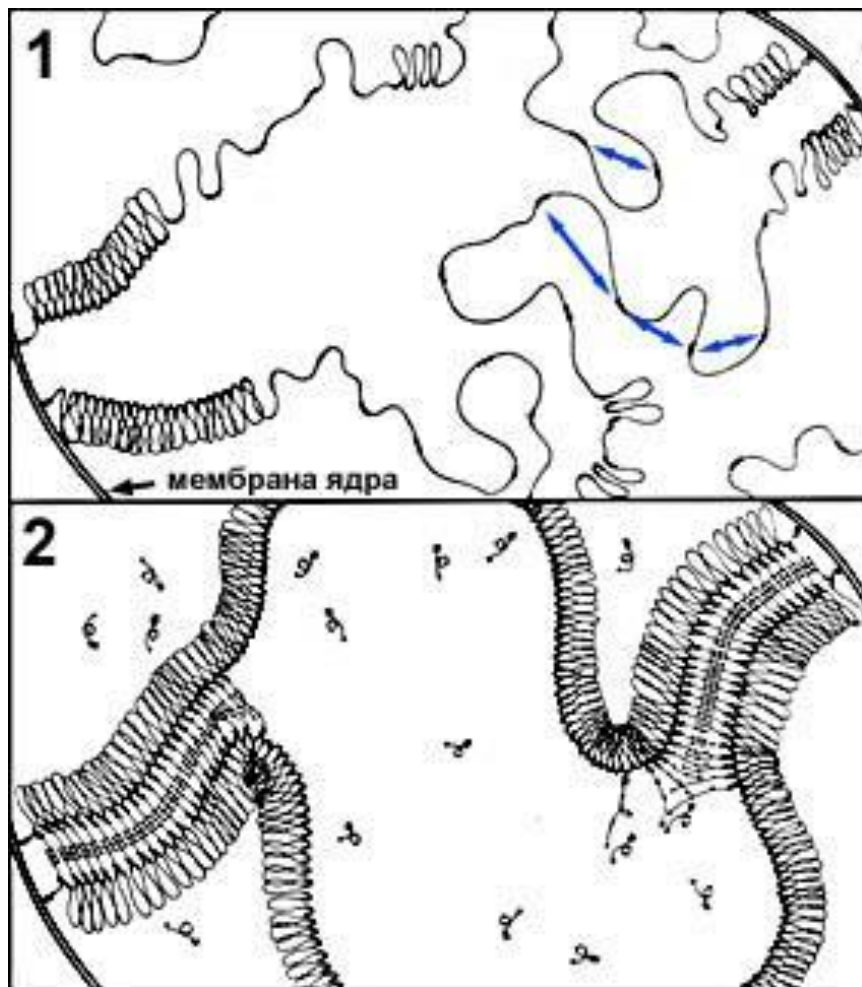


Сперматоциты - переход к мейозу



Синаптонемный комплекс

Сборка синаптонемного комплекса в лептотене (1) и зиготене (2).



Строение СК
(пахитена)

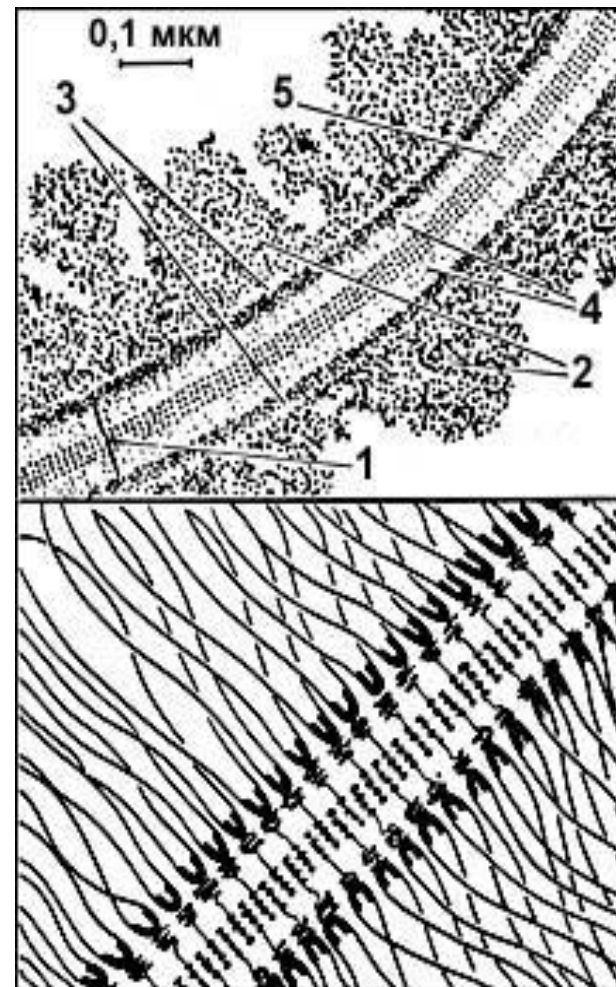
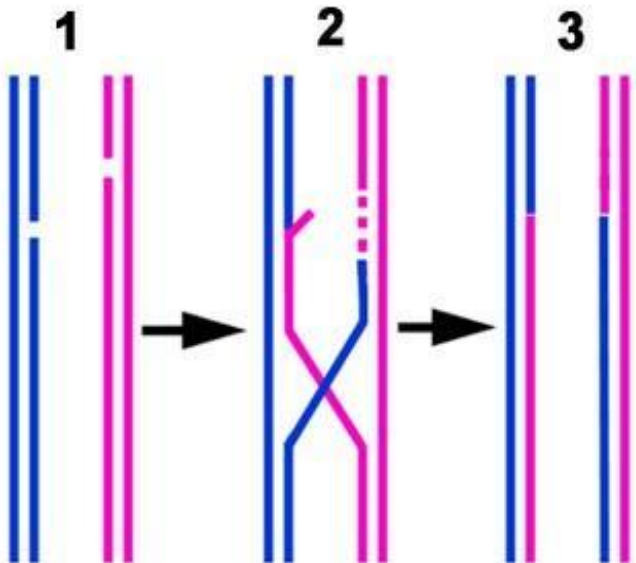
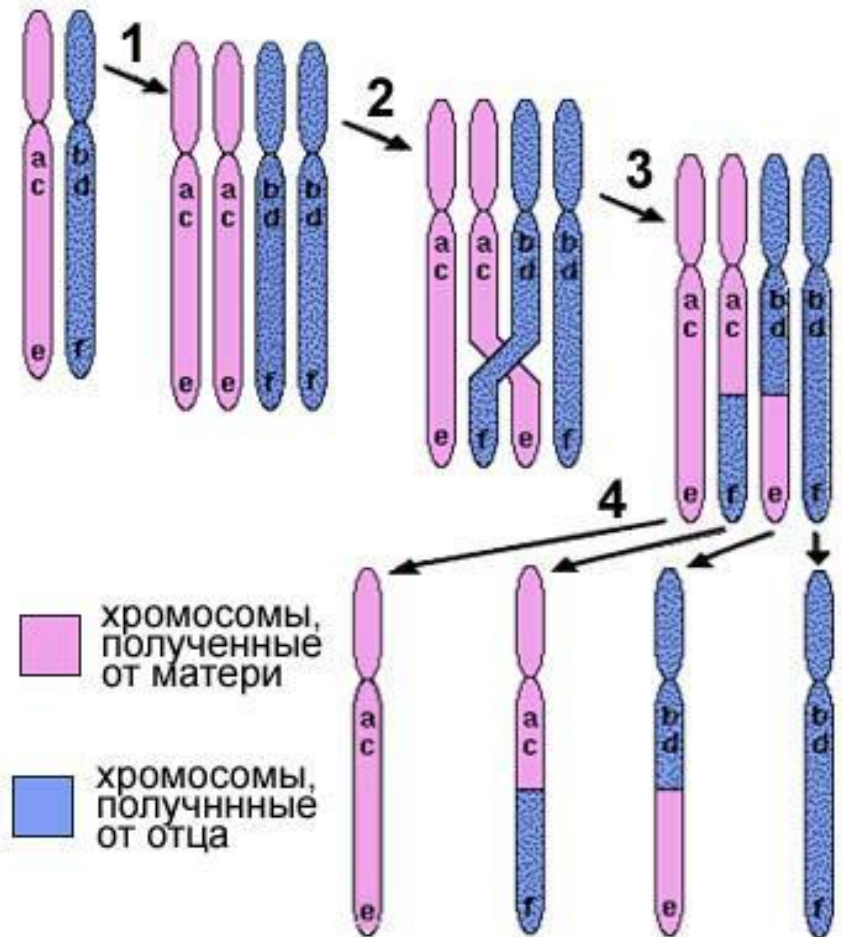


Схема кроссинговера.



1. Разрывы в одной из хроматид каждой гомологичной хромосомы (синим показана отцовская хромосома, розовым – материнская).
2. Перекрест хроматид. Недостающий участок достраивается по конъюгировавшей цепи.
3. Результат: гомологичные хромосомы после обмена участками.

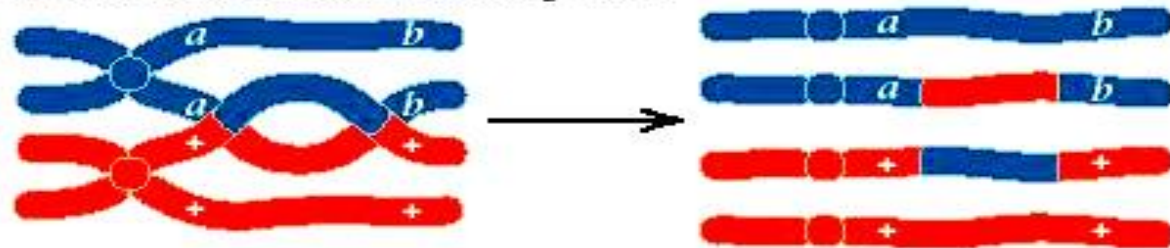


Во время этого процесса, происходящего в половых клетках на стадии профазы мейоза, гомологичные хромосомы обмениваются своими участками.

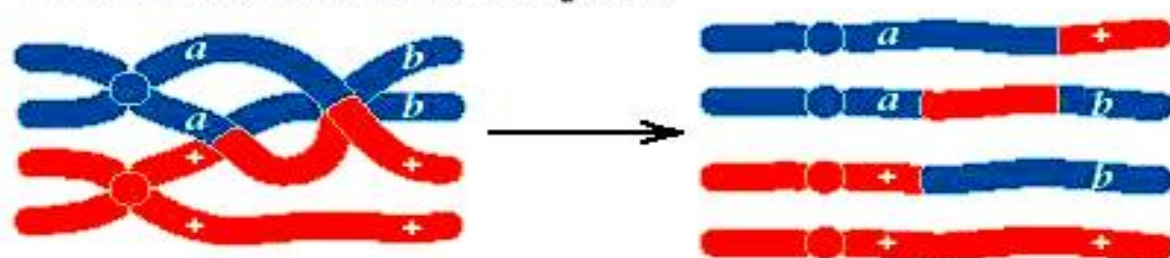
В результате хромосомы гамет не являются идентичными хромосомам соматических клеток данной особи: часть хромосом содержит как гены, полученные от отца, так и гены полученные от матери.

Таким образом, при кроссинговере увеличивается генетическое разнообразие гамет, что дает большее количество генетических комбинаций в следующем поколении.

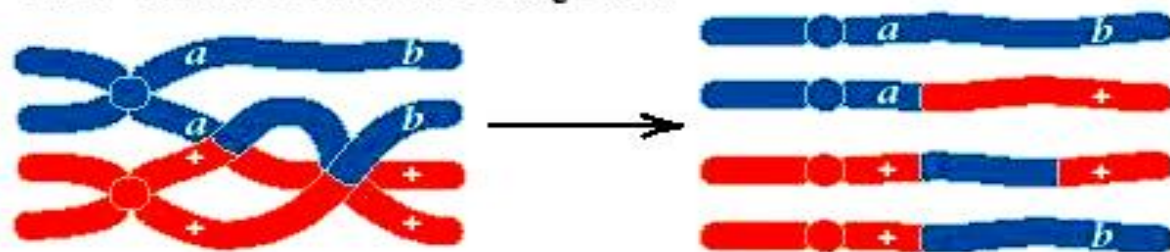
(A) Two-strand double crossing-over



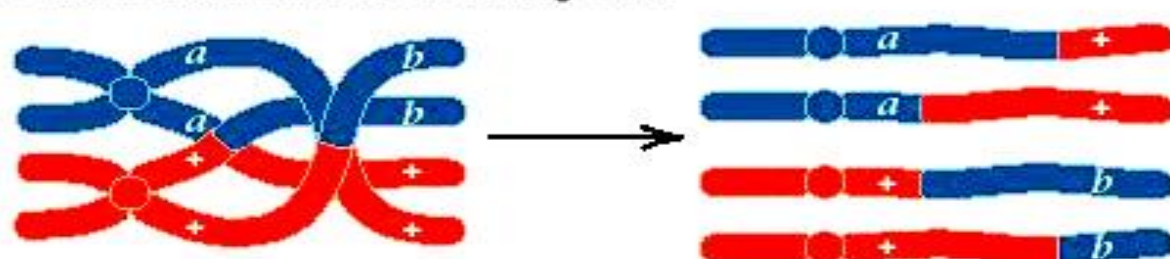
(B) Three-strand double crossing-over



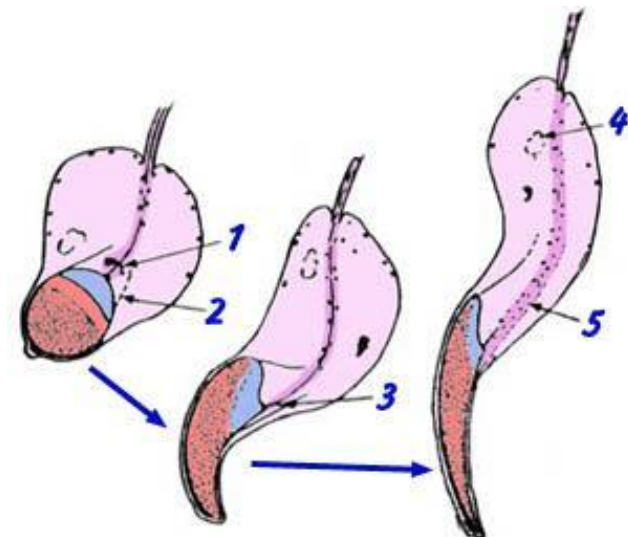
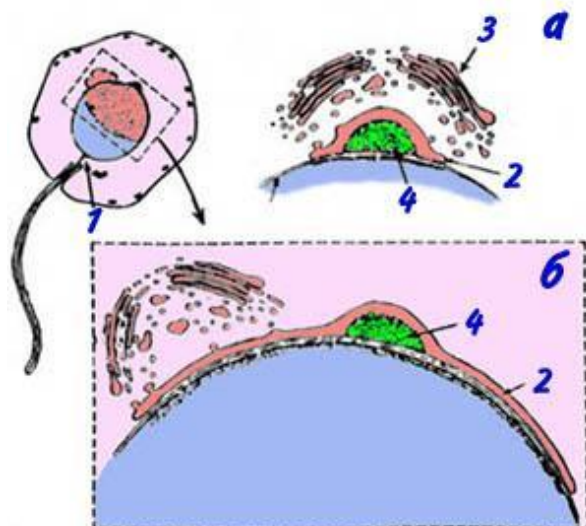
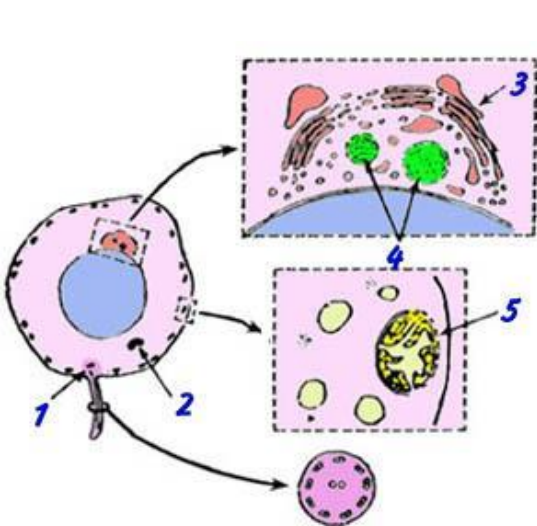
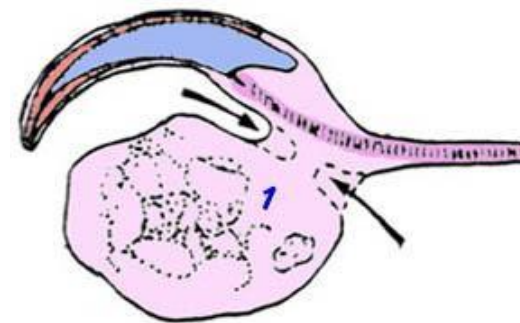
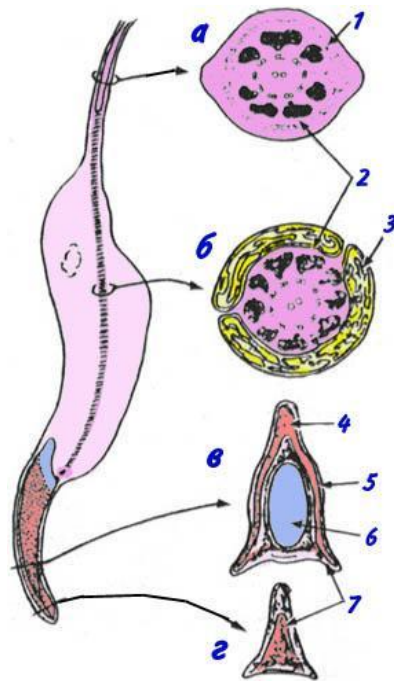
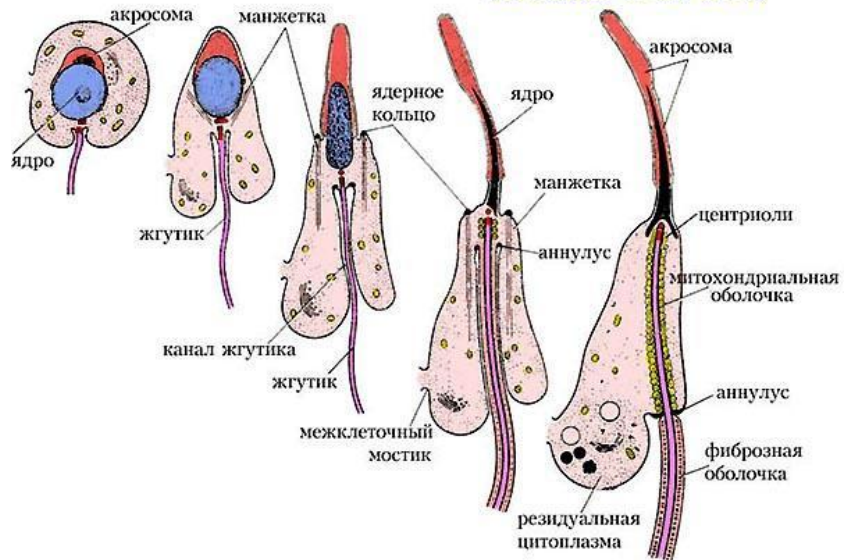
(C) Three-strand double crossing-over



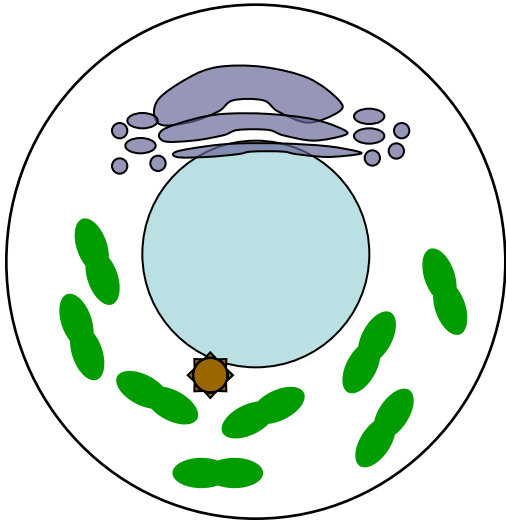
(D) Four-strand double crossing-over



Дифференцировка сперматиды морской свинки (no Fawcett et al., 1971)



Сперматозоид – специализированная клетка



Поверхностные белки

Акросома

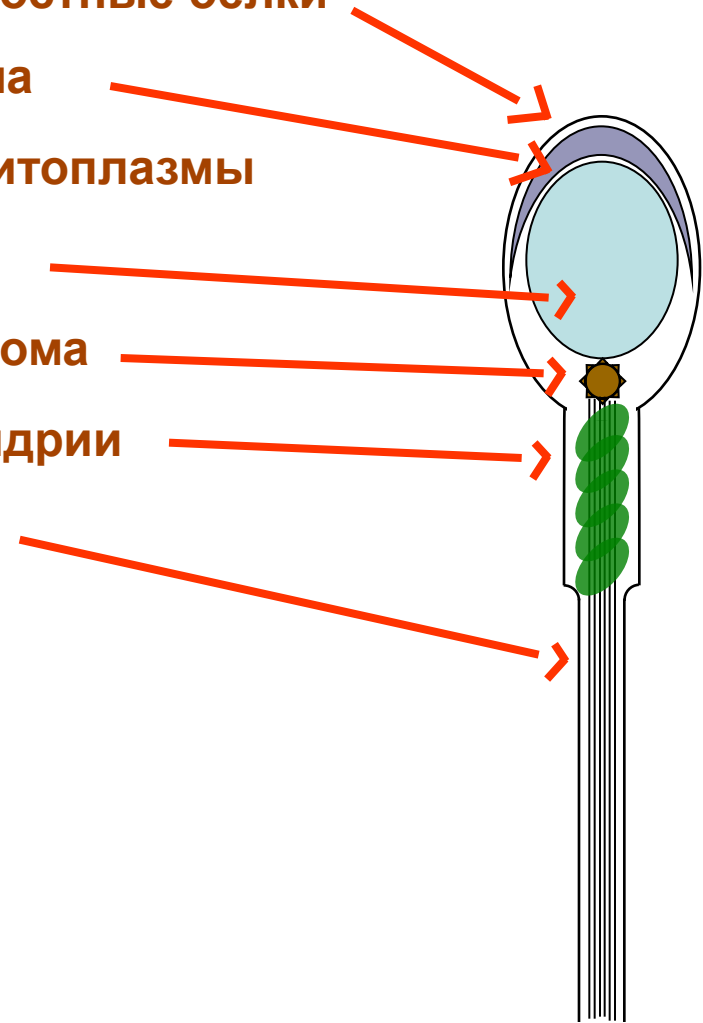
Белки цитоплазмы

Ядро

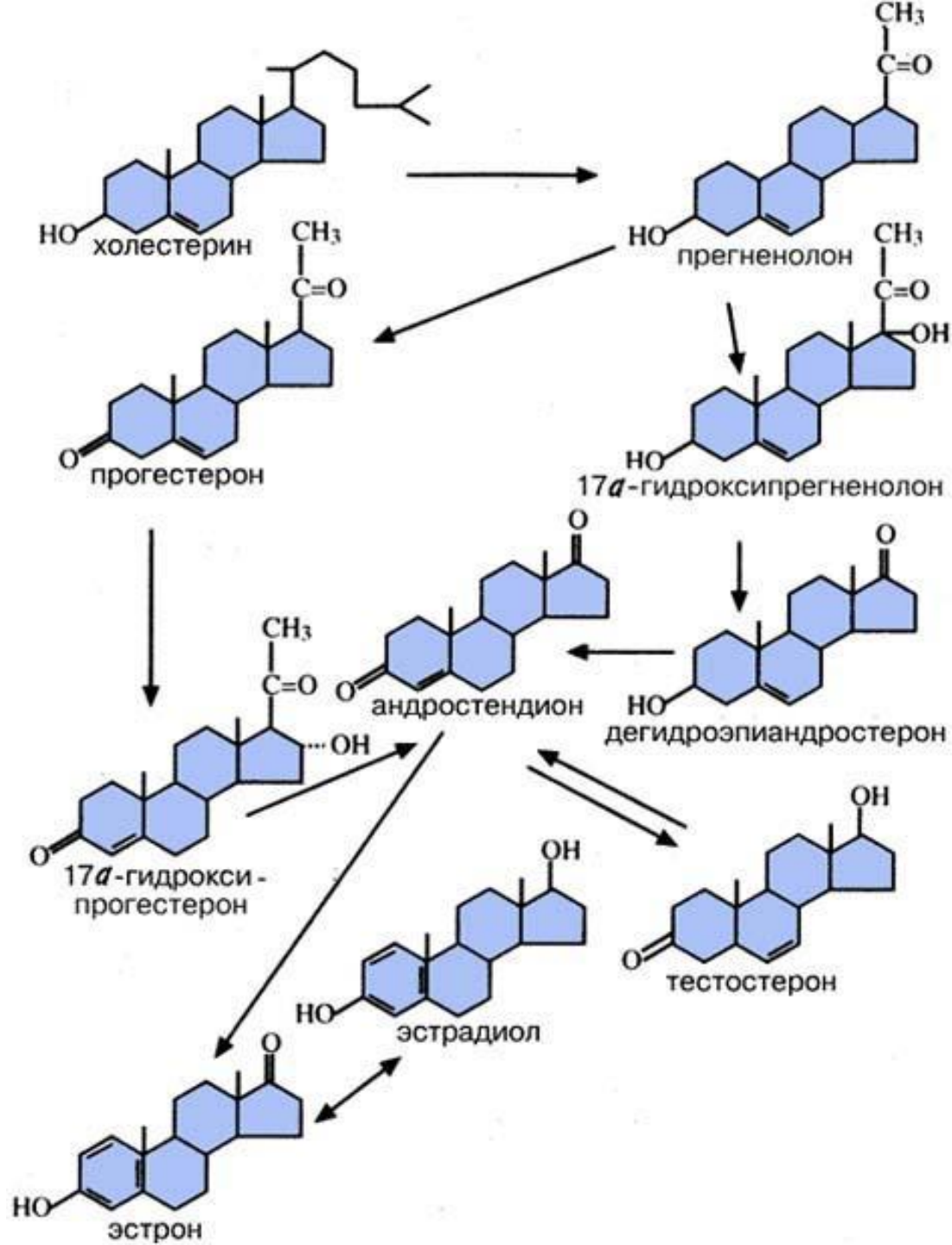
Центросома

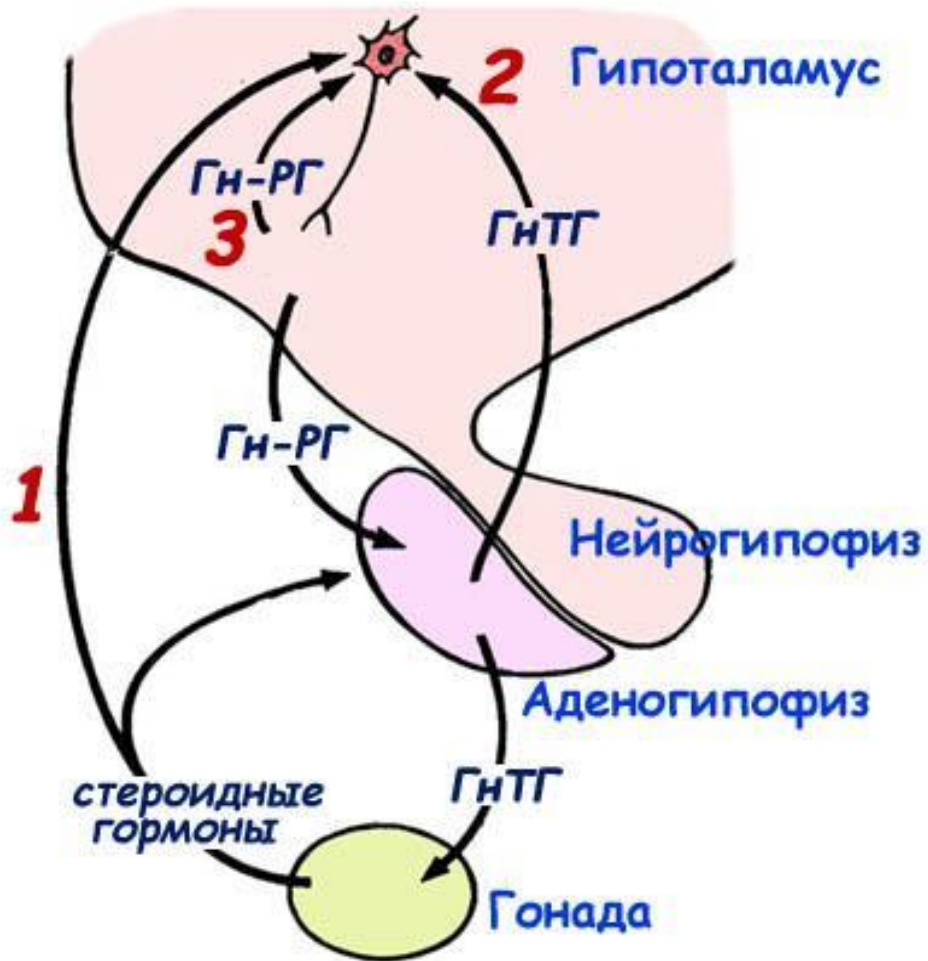
Митохондрии

Жгутик



**Гормональная
регуляция
сперматогенеза**



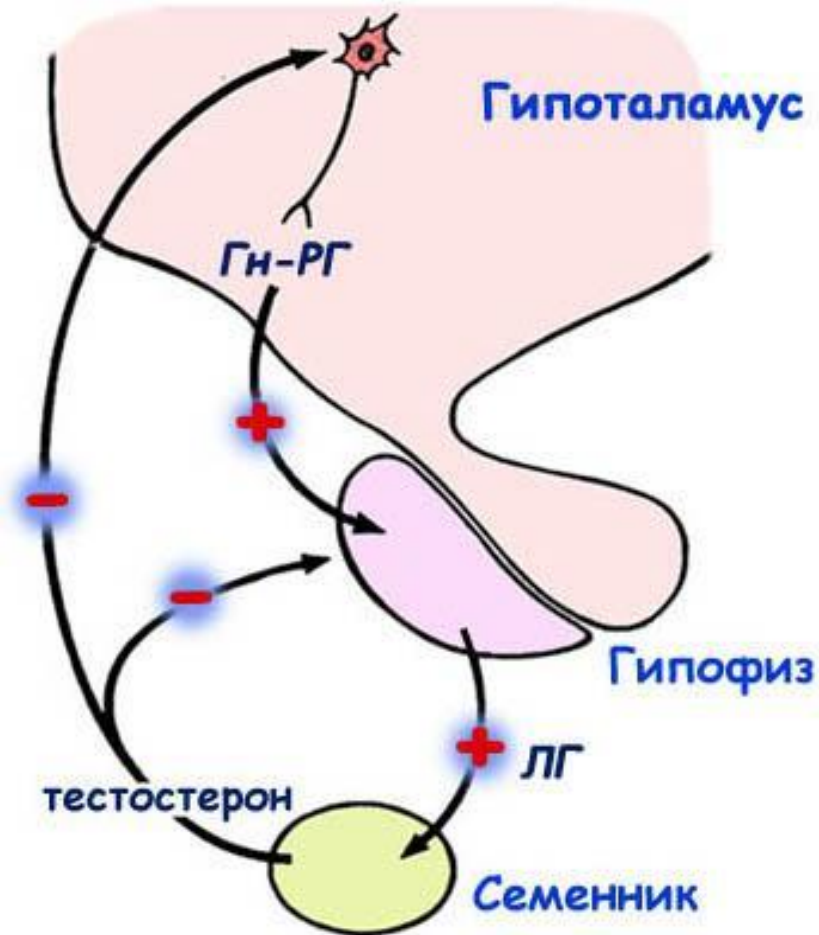


ГнТГ - гонадотропные гормоны гипофиза
 Гн-РГ - гонадотропин-рилизинг гормон

Гомеостатические механизмы обратной связи:

1. Длинная петля обратной связи: стероидные гормоны гонады воздействуют на секрецию гормонов гипоталамуса и гипофиза
2. Короткая петля обратной связи: гонадотропные гормоны гипофиза воздействуют на секрецию рилизинг-факторов гипоталамуса
3. Ультракороткая петля обратной связи: гормоны гипоталамуса регулируют собственную секрецию в пределах центральной нервной системы.

Система обратных связей, поддерживающая тоническую секрецию гормонов гипоталамуса и гипофиза и постоянный уровень тестостерона в крови



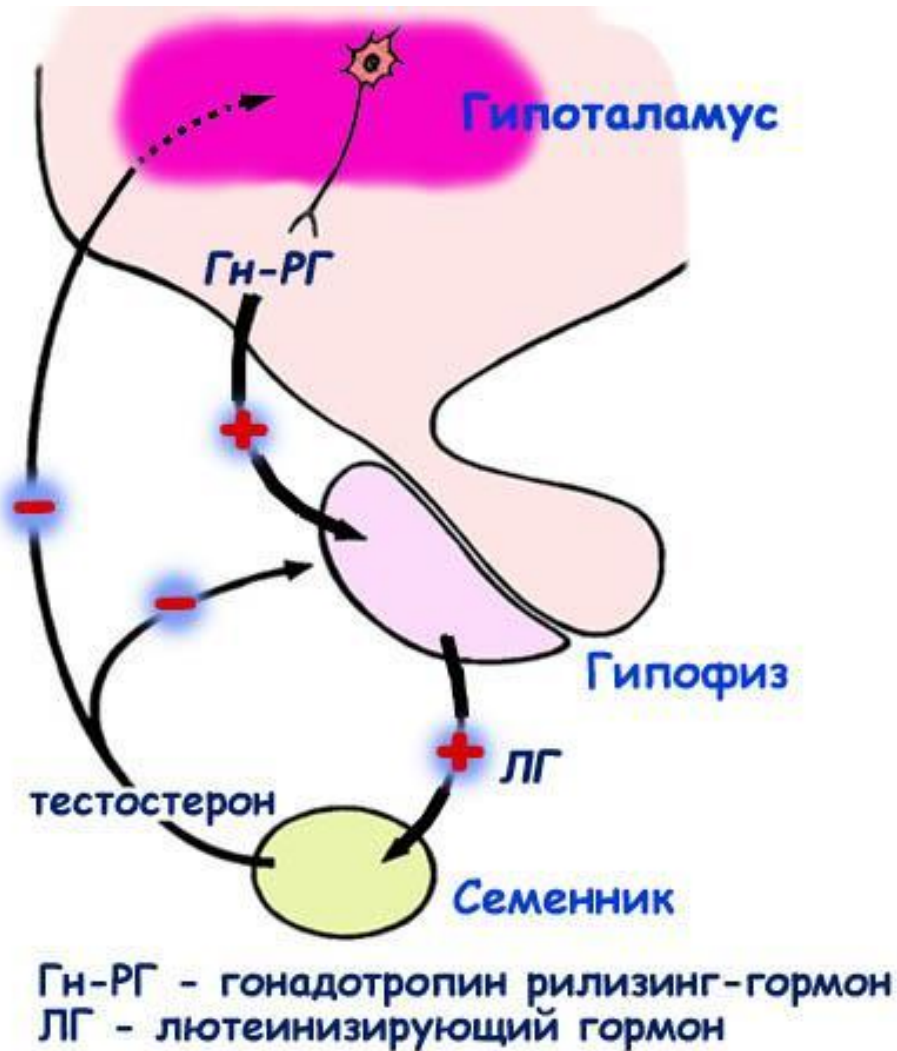
При повышении уровня тестостерона в крови уменьшается выработка гормонов гипоталамуса и гипофиза
(отрицательная обратная связь)

При снижении уровня гормонов гипофиза в крови снижается и выработка стероидных гормонов гонадой (положительная прямая связь)

При понижении уровня тестостерона в крови увеличивается выработка гормонов гипоталамуса и гипофиза.
(отрицательная обратная связь)

Гн-РГ - гонадотропин рилизинг-гормон
ЛГ - лютеинизирующий гормон

Схема гормональной регуляции сперматогенеза при половом созревании



Клетки гипоталамуса становятся менее чувствительными к отрицательной обратной связи.

В результате увеличивается выработка релизинг-фактора в гипоталамусе, гонадотропных гормонов в аденогипофизе и выработка тестостерона в семеннике.

Выработка тестостерона постепенно увеличивается, до тех пор, пока система не выйдет на новый устойчивый уровень, характерный для взрослого организма.

Сперматогенез у грызунов

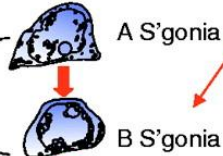
Sites & effects

- FSH establishes a full complement of cells that is sustained through to adulthood
- FSH act as a proliferative (not survival) factor
- T supports differentiation & survival in early postnatal life



Sertoli cells

- FSH supports survival via the intrinsic apoptotic pathway, not proliferation
- FSH (absence of T) partially restores cell number
- FSH (low level of T) fully restores cell number



A S'gonia

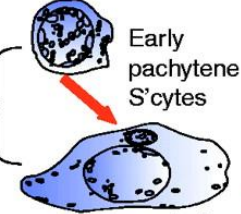
B S'gonia

- FSH & T support entry into meiosis and survival via the intrinsic & the extrinsic apoptotic pathways, not proliferation



PL S'cytes

- FSH & T promote survival via the intrinsic & extrinsic apoptotic pathways, not proliferation



Early pachytene S'cytes

Late pachytene S'cytes

- FSH & T support the completion of meiosis & progression into round s'tids

- FSH & T support adhesion of round s'tids to Sertoli cells
- T regulates the p-FAK-c-Src protein complex via the ERK signaling pathway
- T supports completion of spermiogenesis and survival via both the intrinsic & the extrinsic apoptotic pathways

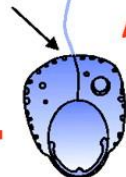


Secondary S'cytes

- FSH & T support spermiation in by β 1-integrin in an ILK-independent mechanism



Elongated S'tids



Step 8 round S'tids

- Identification of other FSH and T regulated adhesion molecules/complexes



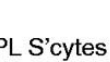
Early round S'tids



Late pachytene S'tids



Early pachytene S'cytes



B S'gonia

A S'gonia

Sertoli cells

Gaps in knowledge

- Whether B spermatogonia are directly regulated by FSH and/or T?

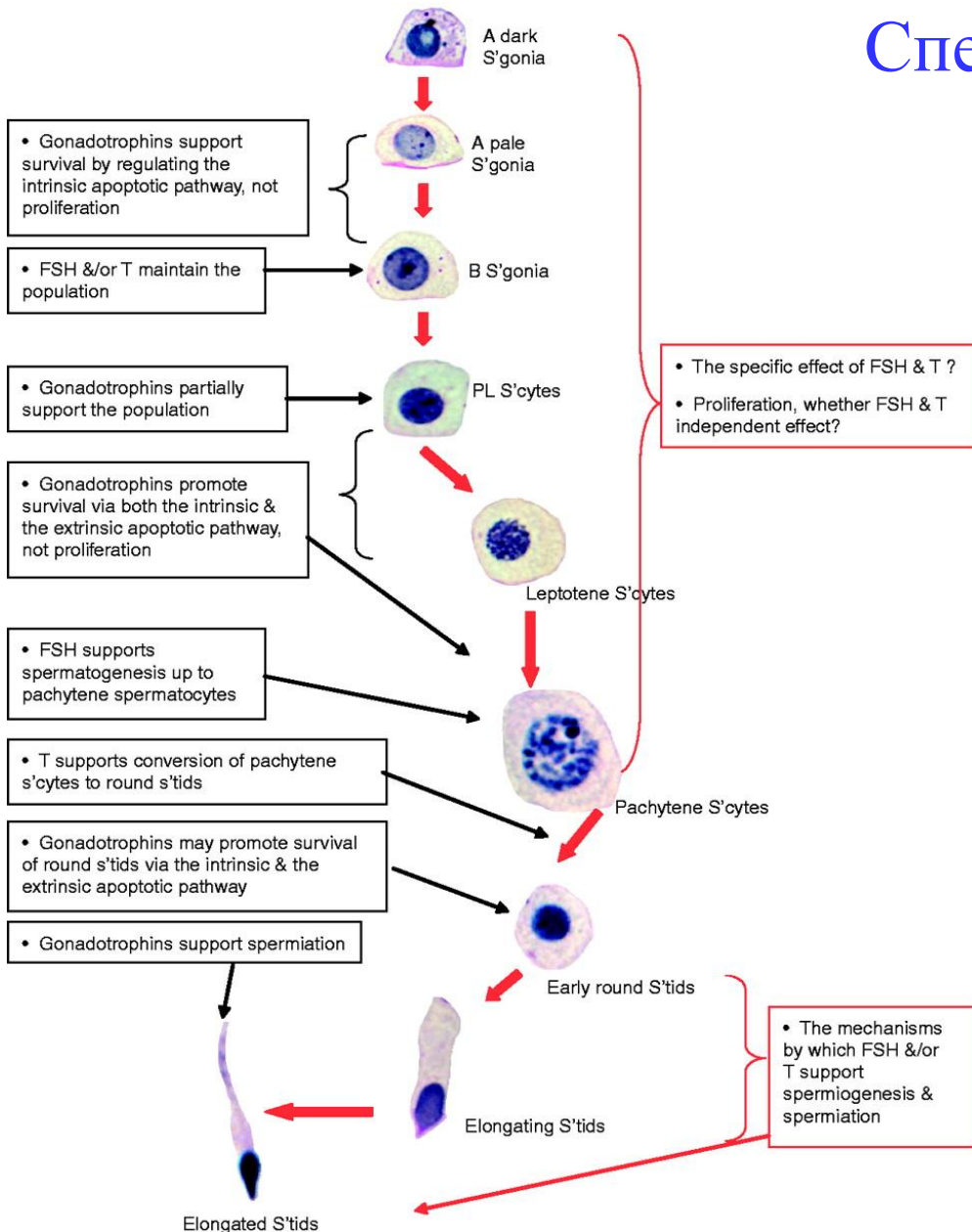
- Proliferation, whether FSH & T independent effect?

Диаграмма, суммирующая воздействие ФСГ и тестостерона на сперматогенез:

Слева – существующие экспериментальные данные (черные рамки)

Справа – нерешенные вопросы (красные рамки)

Сперматогенез у человека



Диаграмма, суммирующая воздействие ФСГ и тестостерона на сперматогенез:

Слева – существующие экспериментальные данные (черные рамки)

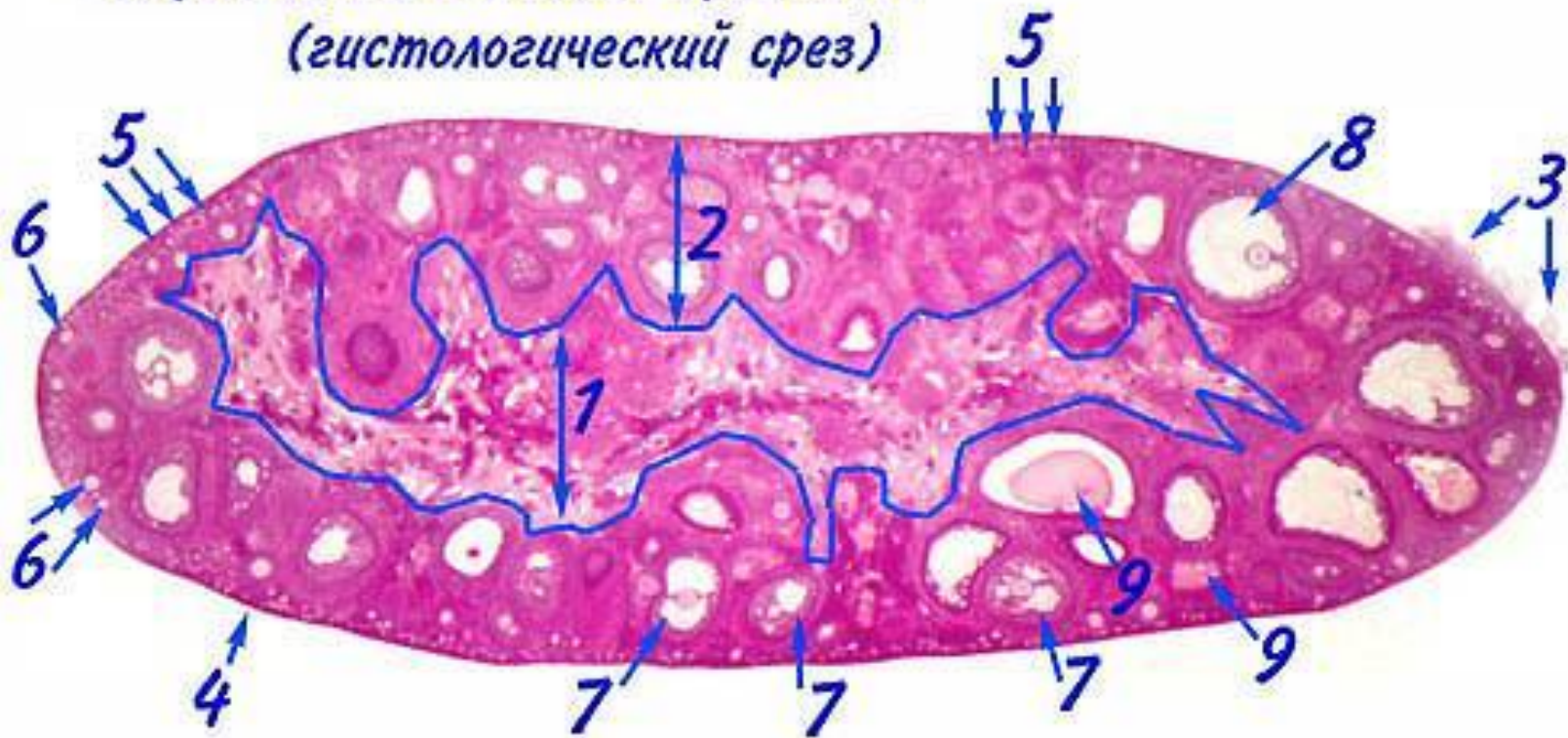
Справа – нерешенные вопросы (красные рамки)



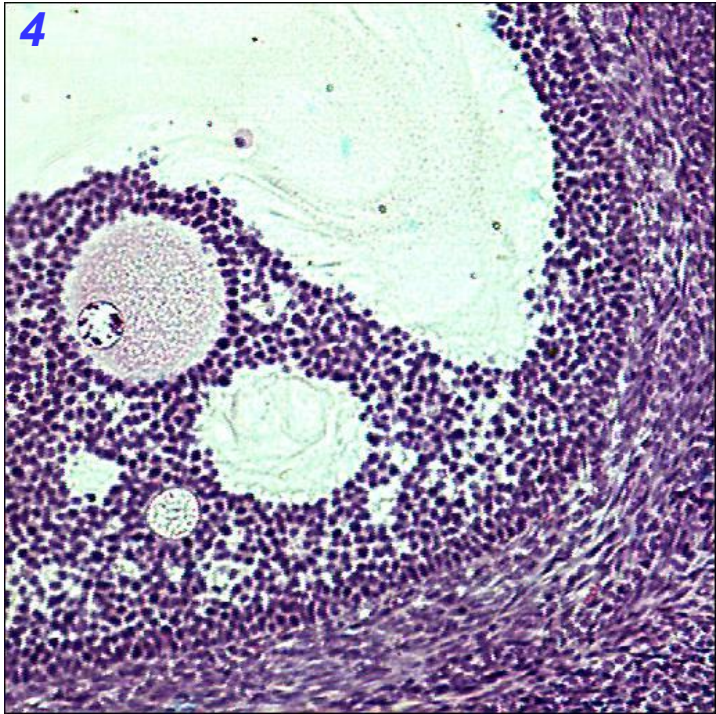
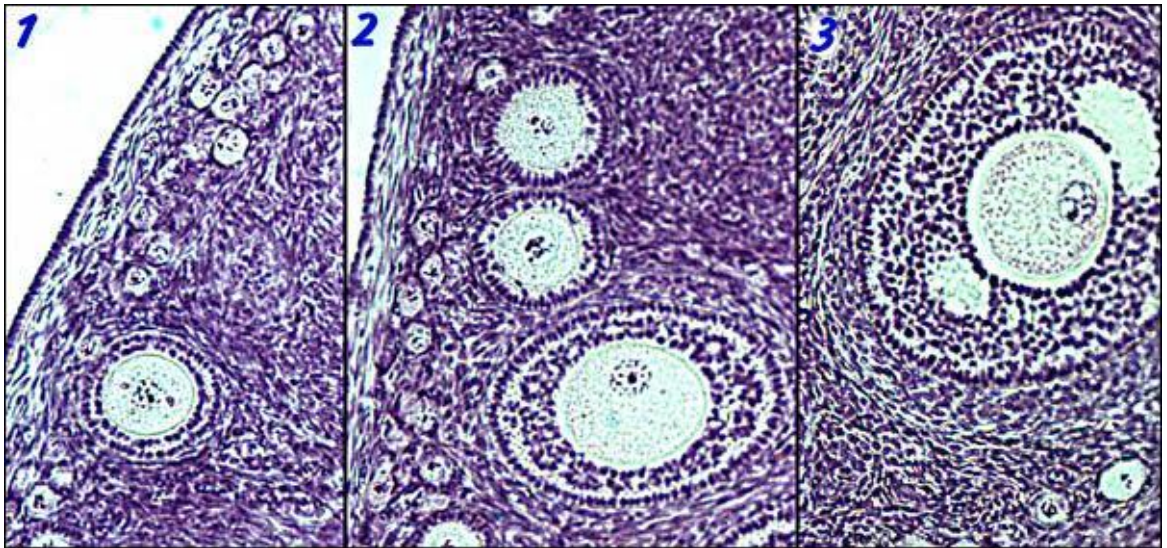
ООГЕНЕЗ



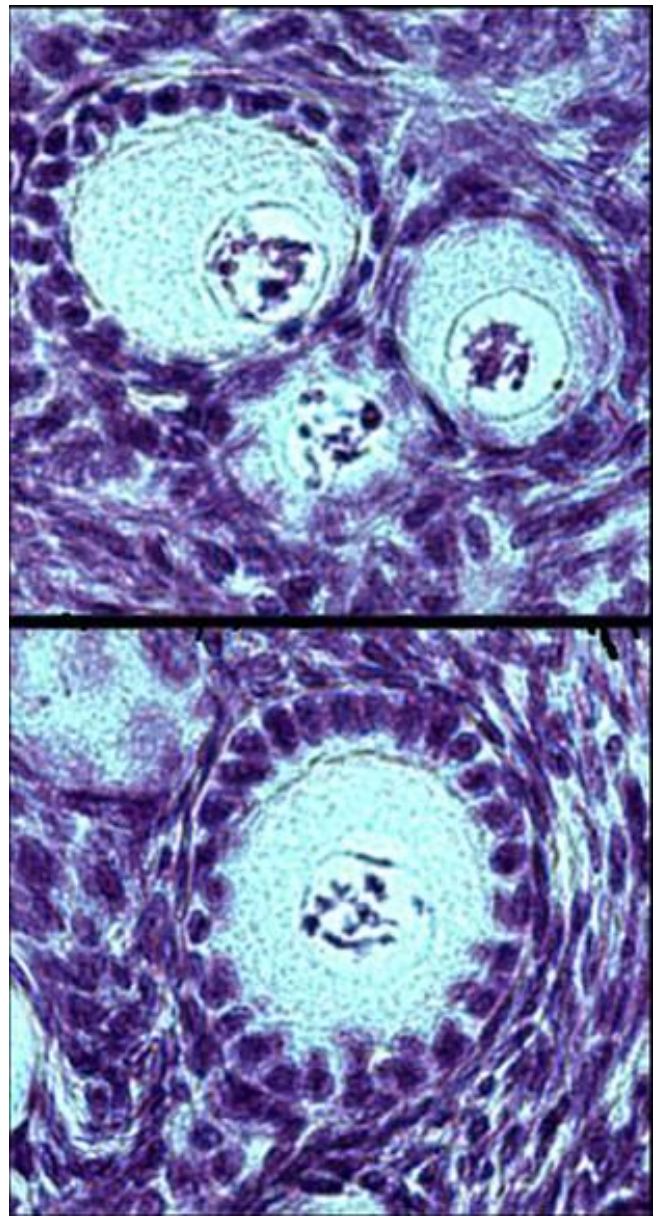
Строение яичника кролика (гистологический срез)



1. – Медулярная область яичника (*medulla ovarii*).
2. - Кортикальная область яичника (*cortex ovarii*).
3. - Остаток мезентерия яичника.
4. - Белочная оболочка.
5. - Примордиальные фолликулы
6. - Первичные фолликулы
7. - Вторичные или лакунарные фолликулы
8. - Третичный или преовуляторный фолликул (или антральный фолликул, или Графов пузырек (в честь анатома Д.Р.Граафа, впервые описавшего его)
9. - Атретические фолликулы: Большая часть фолликулов, вступивших в рост, погибают на разных этапах фолликулогенеза. На месте погибших вторичных или третичных фолликулов формируются так называемые белые тела.



Яичник кролика

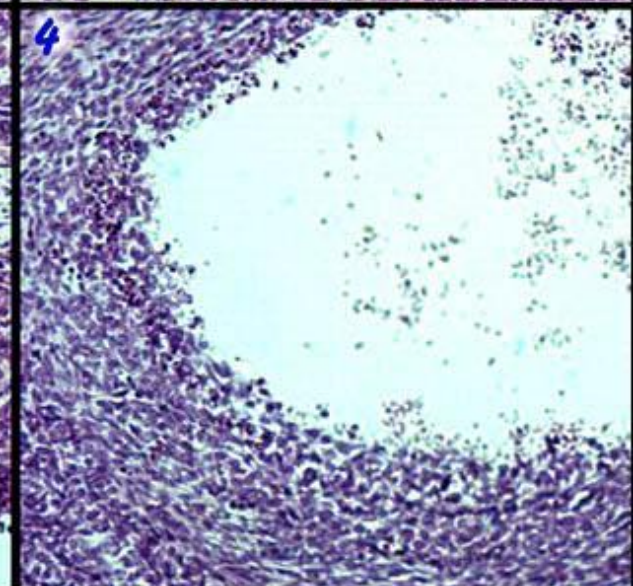
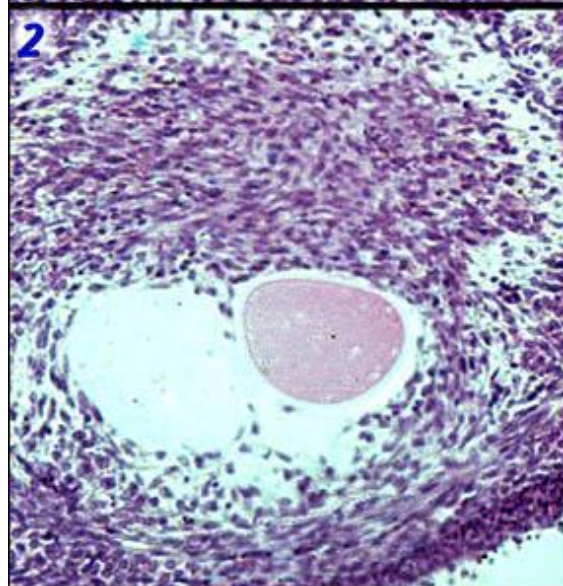
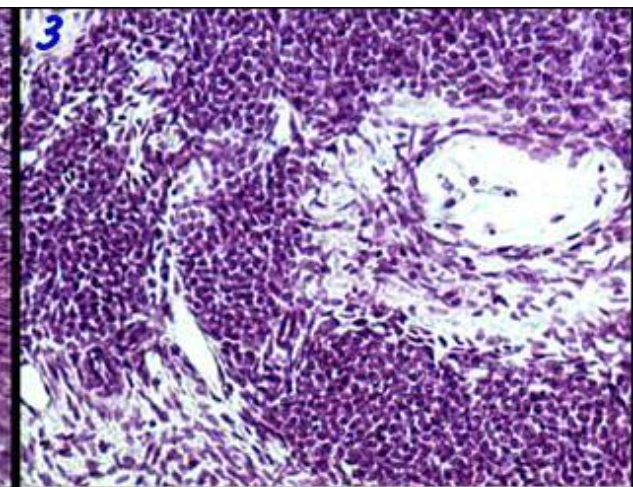
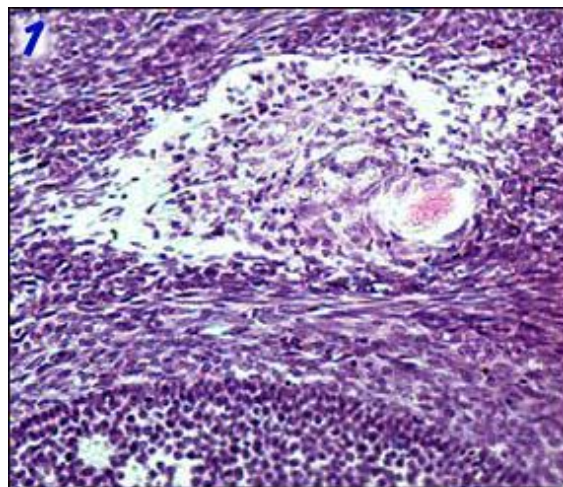


Стадии роста фолликулов

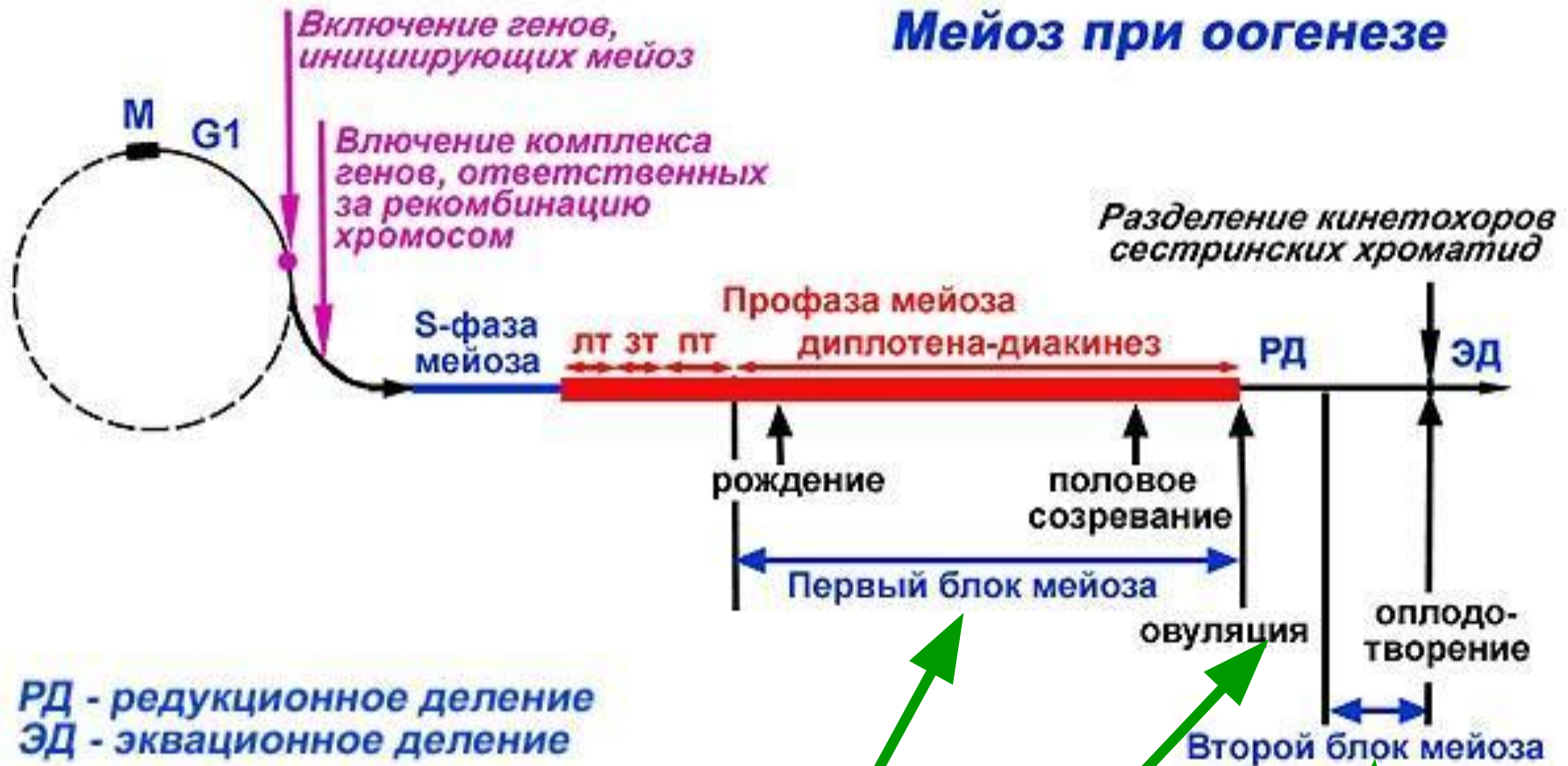
(no McNatty et al. 1999, 2007, Montgomery et al. 2001, Barnett et al. 2006, Edson et al. 2009)

| тип (стадия роста) фолликула | название стадии фолликула | морфологические характеристики клеток гранулезы |
|-------------------------------------|--|--|
| тип 1 | примордиальный | 1 слой плоских клеток |
| тип 2 | первичный | 1 слой клеток кубической формы |
| тип 3 | вторичный | 2-4 слоя клеток |
| тип 4 | большой преантральный | 4-6 слоев клеток |
| тип 5 | антральный | >5 слоев клеток |
| тип 5+ | антральный гонадотропин зависимый | >5 слоев клеток |

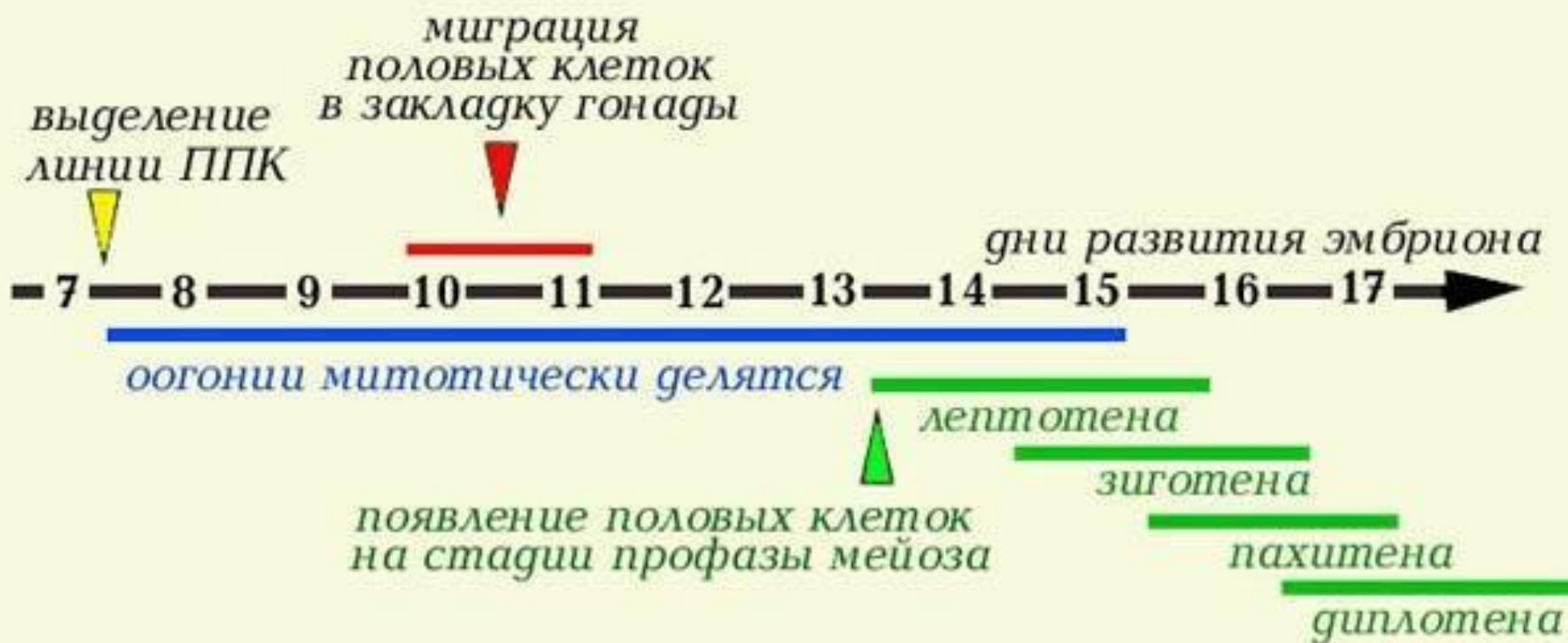
Атрезия фолликулов



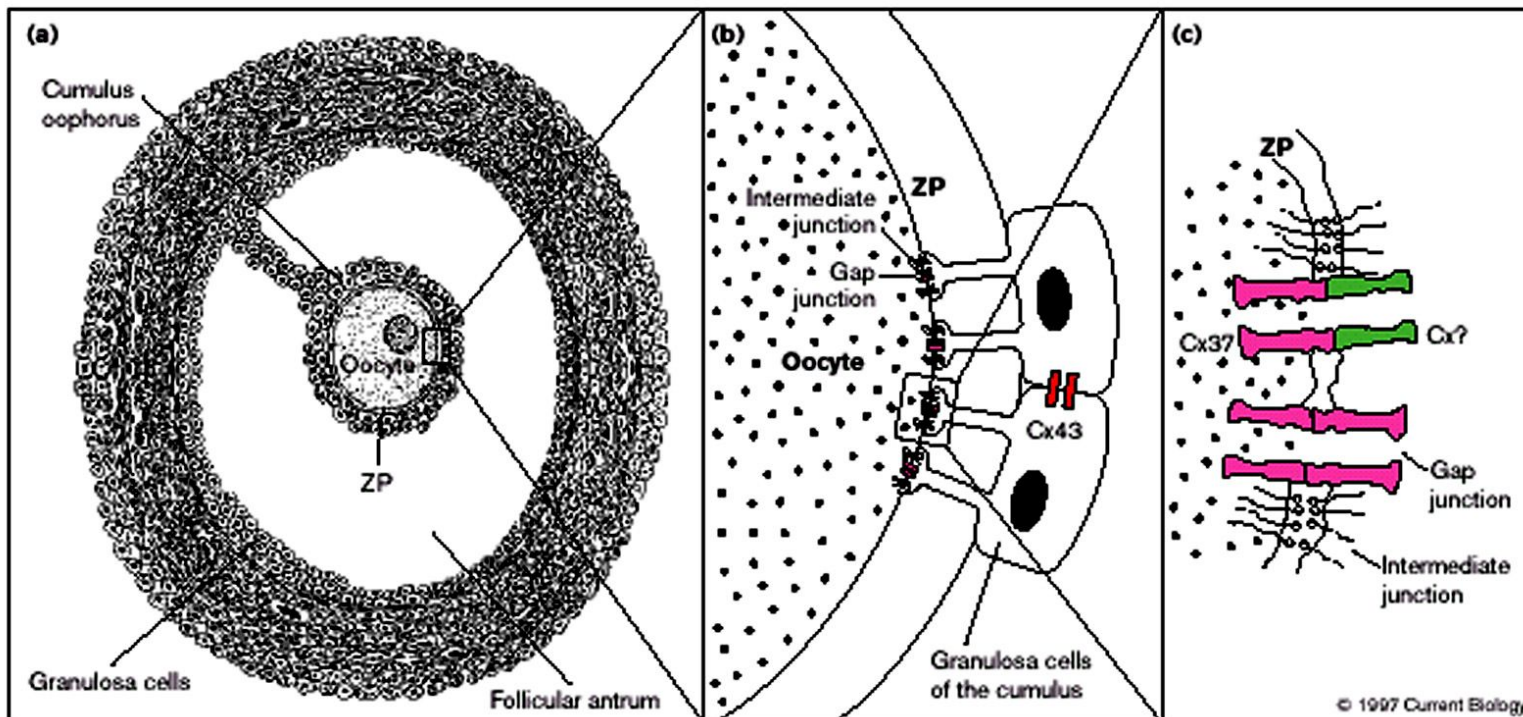
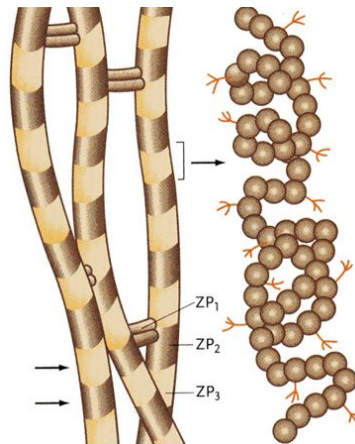
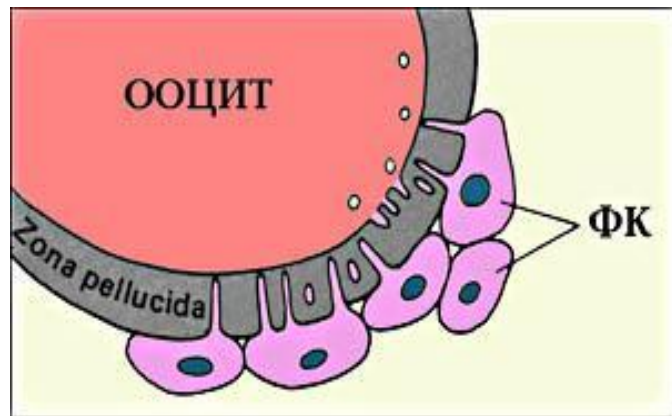
Мейоз при оогенезе

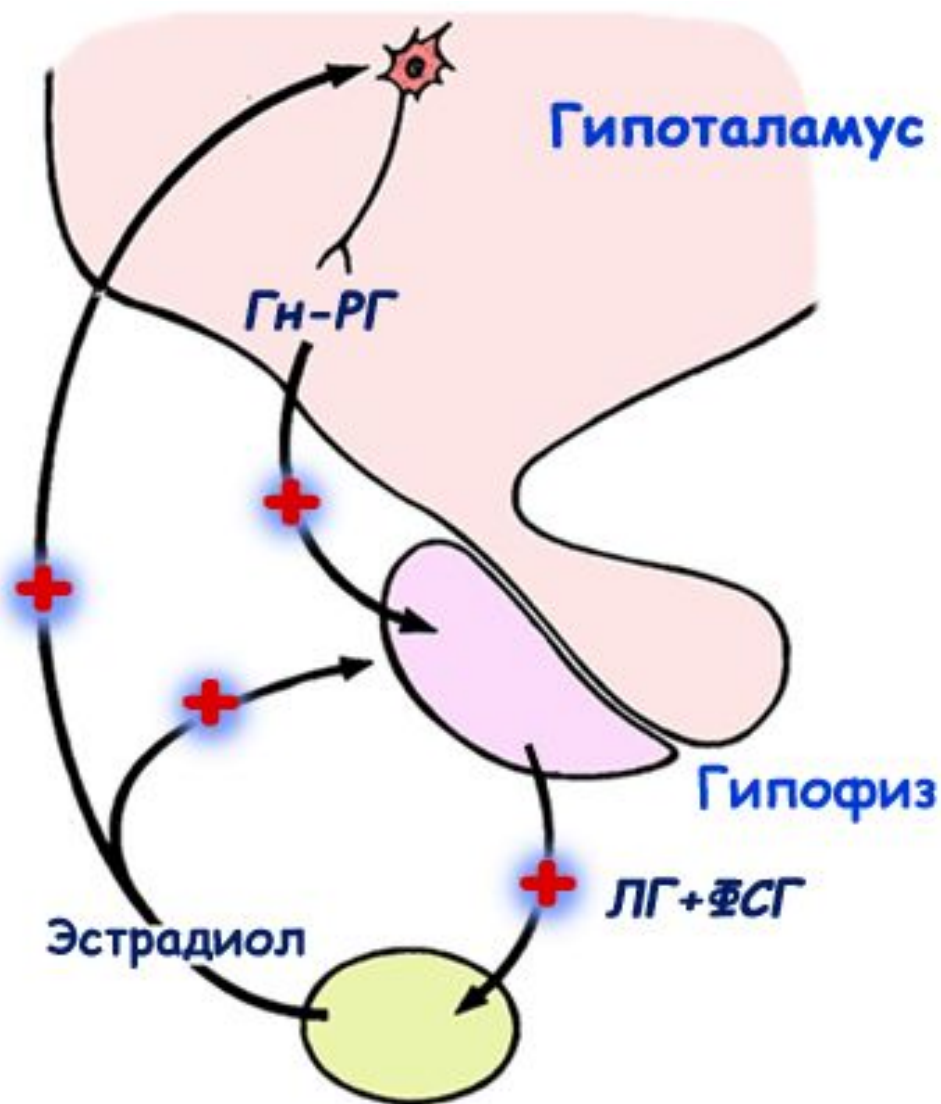


Размножение женских половых клеток в эмбриогенезе мыши

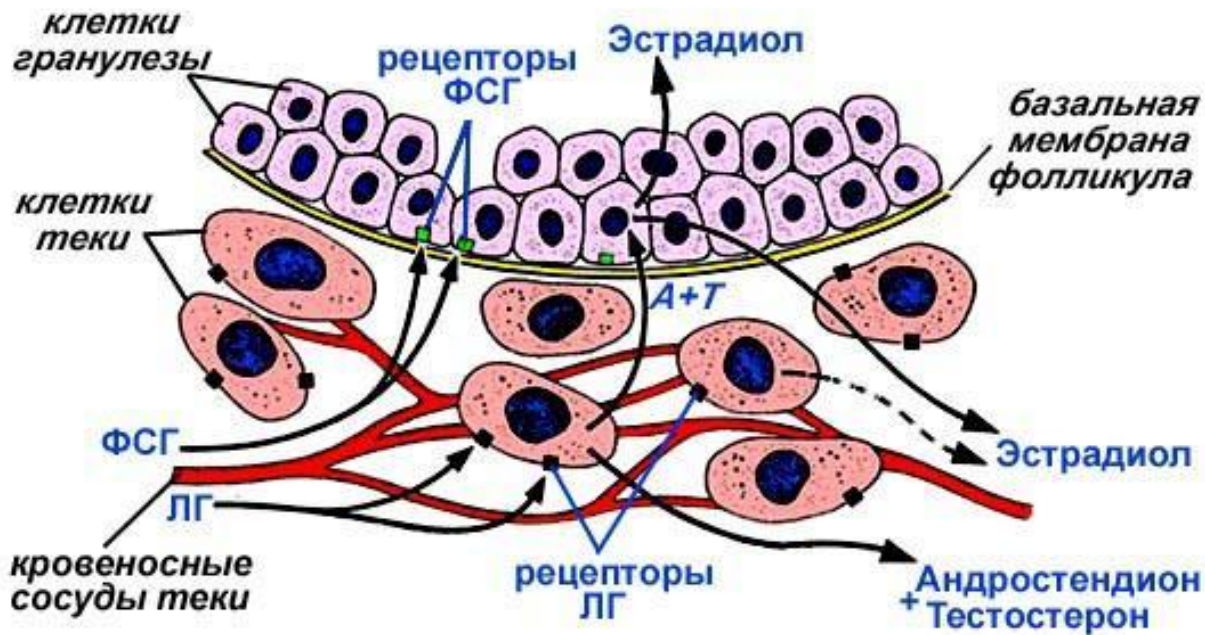


Взаимодействие ооцита с фолликулярными клетками

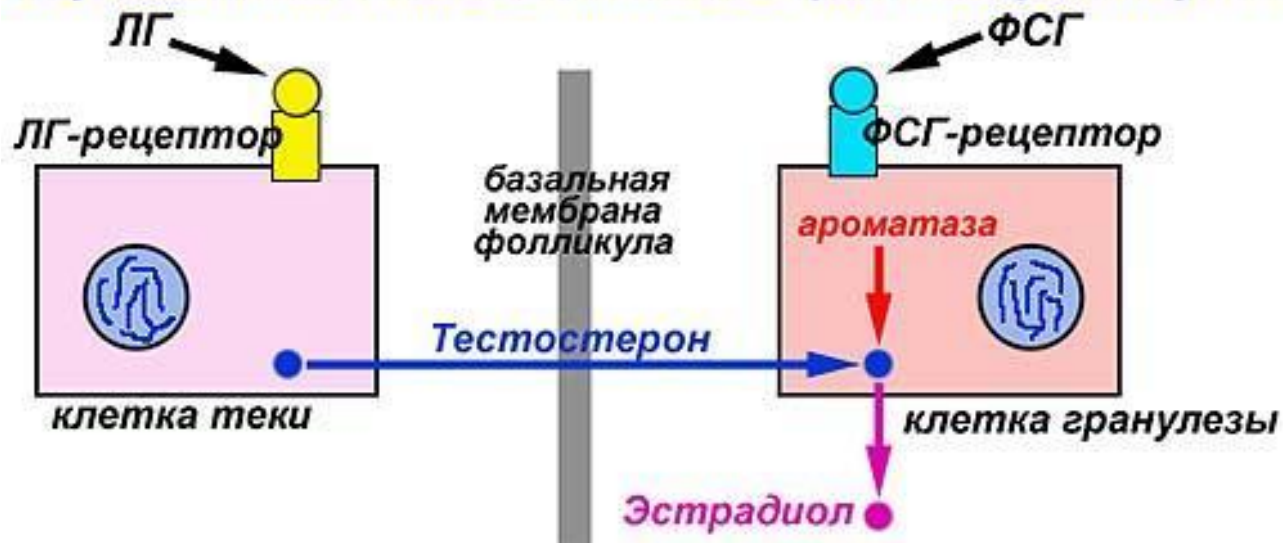




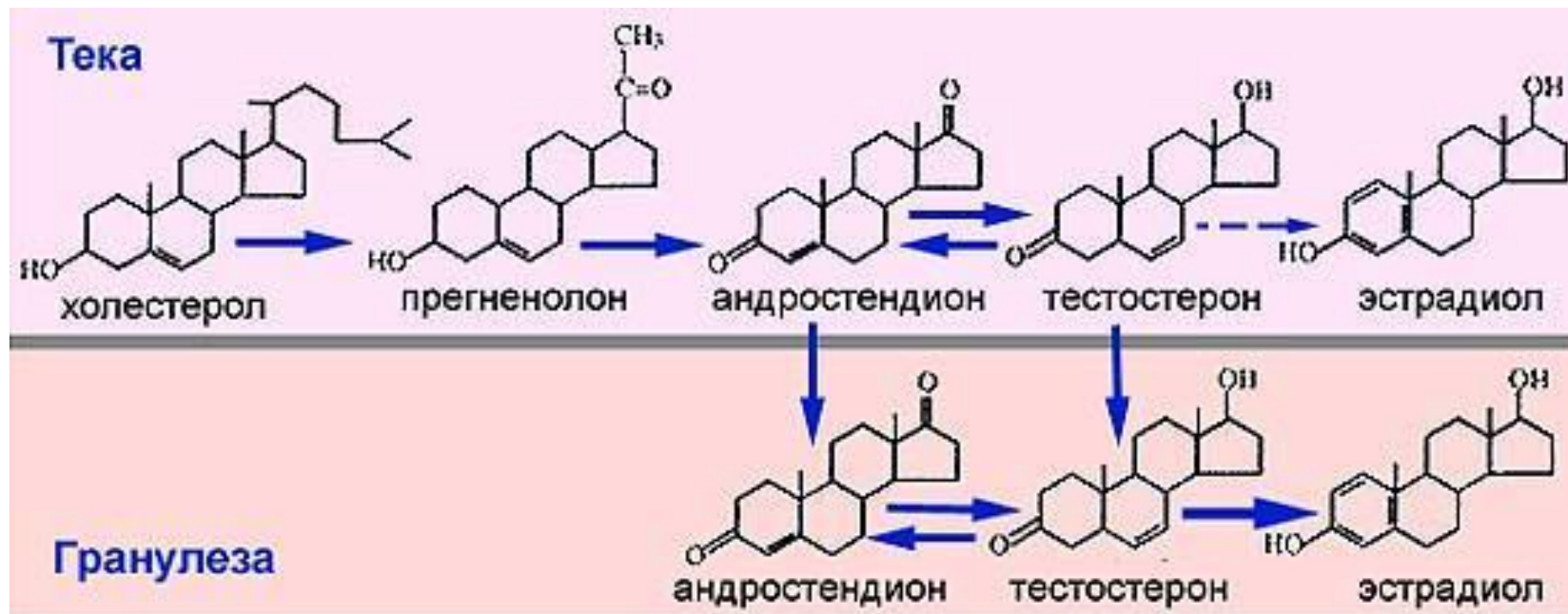
Гн-РГ - гонадотропин рилизинг-гормон
ЛГ - лютеинизирующий гормон
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон



Двухклеточная система синтеза эстрогенов фолликулом

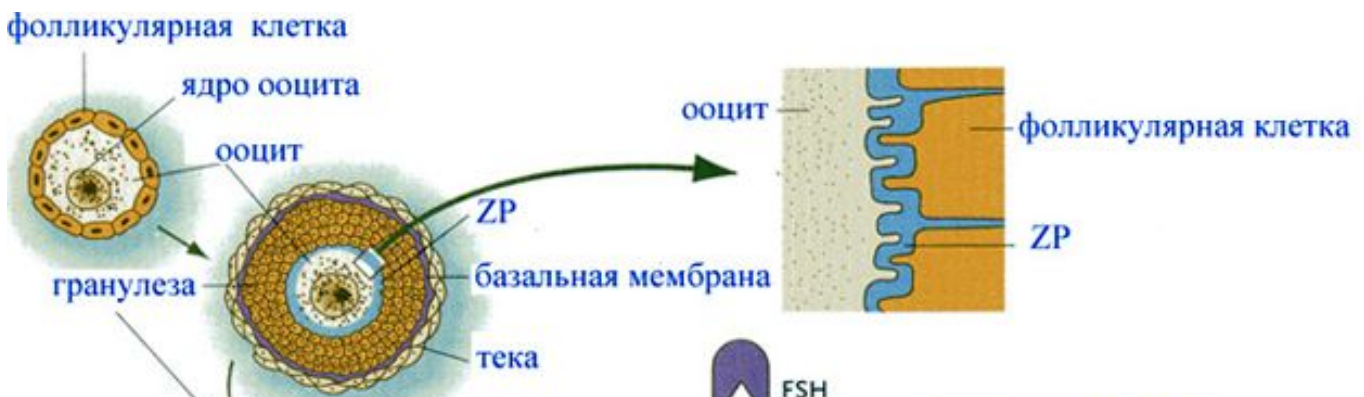


Стероидные гормоны яичника

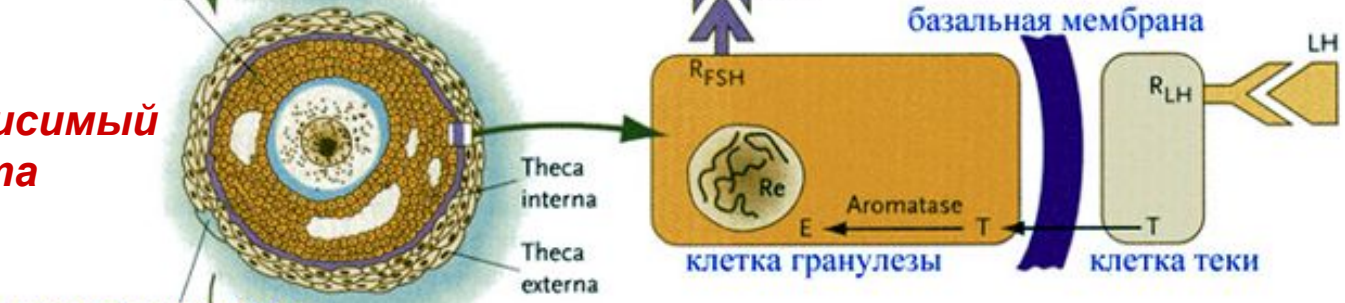


Двухклеточная система регуляции роста фолликула и овуляции

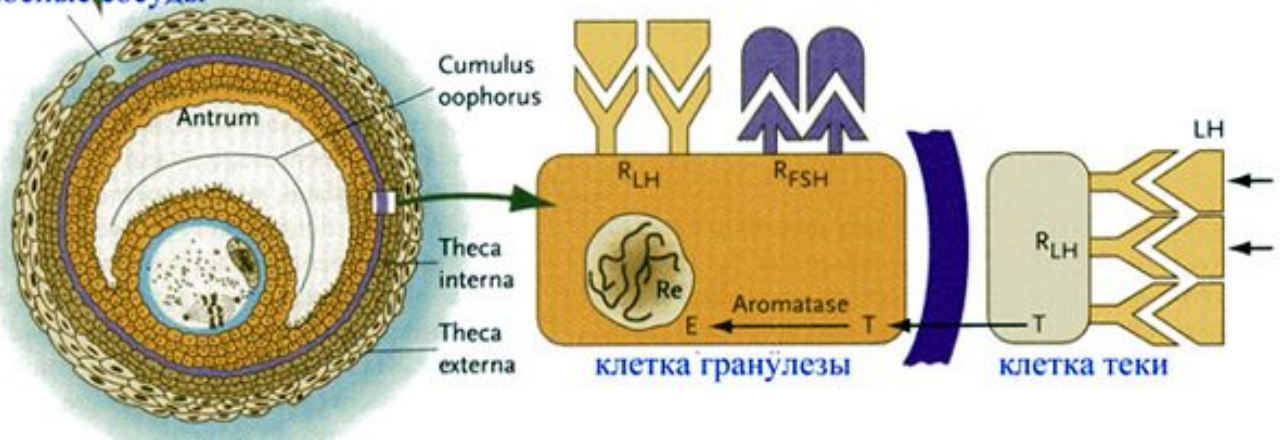
**гормоно-
независимый
период роста**



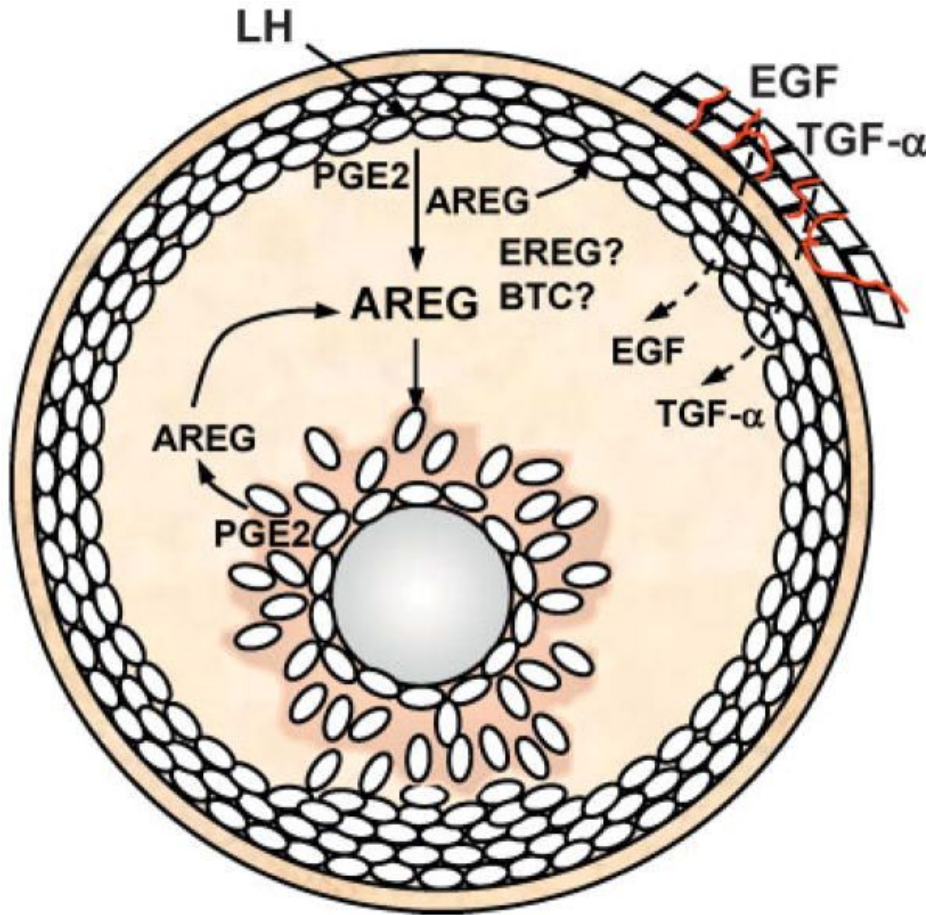
**гормонозависимый
период роста**



овуляция

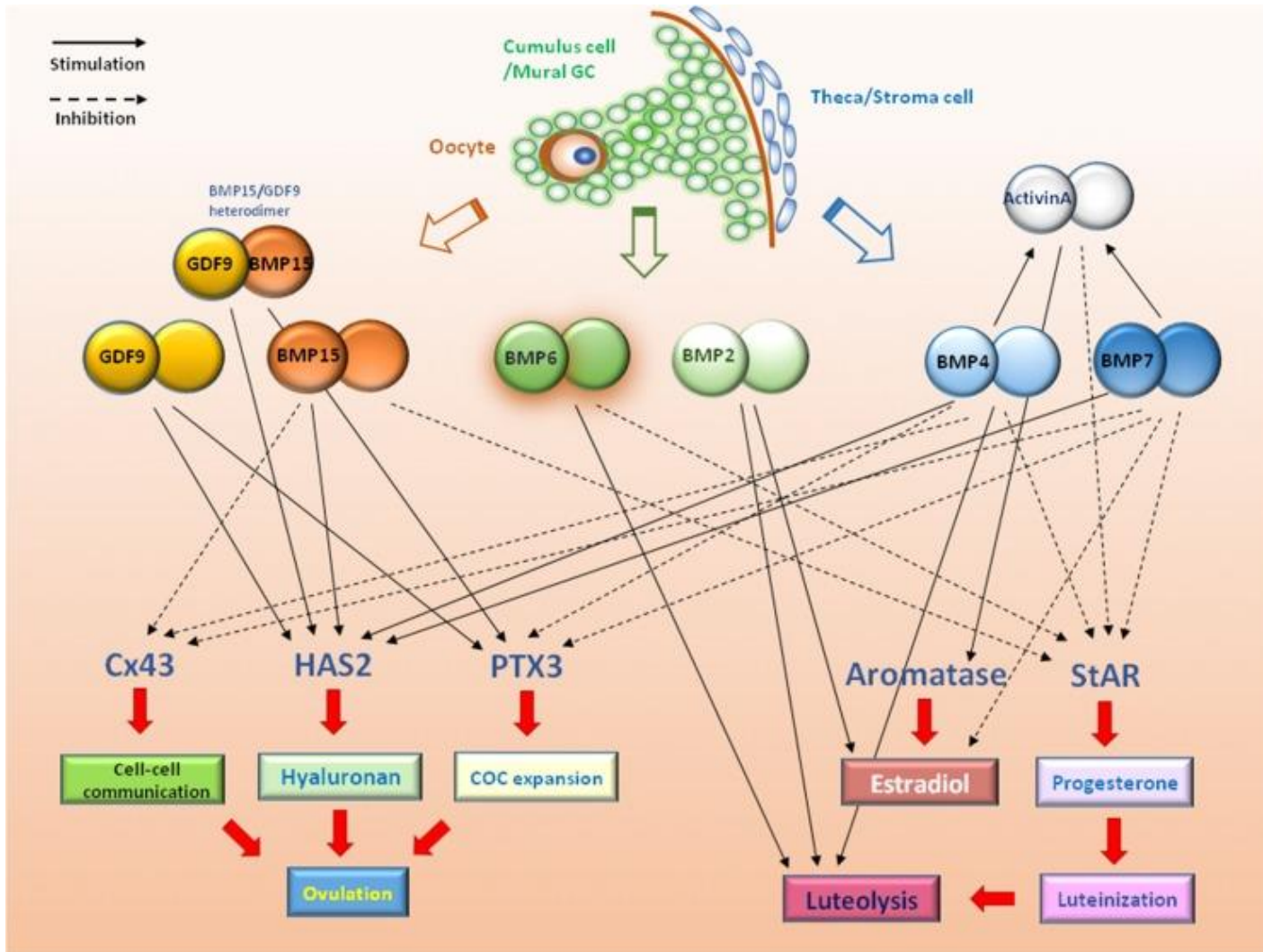


Пик ЛГ активирует комплекс паракринных и аутокринных регуляторов, в том числе активирует сеть EGF



Epidermal growth factor (EGF)-like growth factors in the human follicular fluid. Luteinizing (LH) induces the expression of *Areg* in the preovulatory follicle, and AREG (amphiregulin) acts in an autocrine and paracrine manner to mediate LH effects throughout the follicle, including the promotion of oocyte meiotic resumption and cumulus expansion. *Areg* expression is also upregulated in granulosa cells by prostaglandin E2 (PGE2);^{79,81} at a time preceding ovulation, AREG can also induce the expression of its mRNA in cumulus cells by the PGE2-PGE2 receptor subtype (PTGER2) pathway.⁸¹ AREG protein is present in abundant levels in the human follicular fluid⁸⁵ (A.M. Zamah et al, unpublished data). EGF and transforming growth factor alpha (TGF- α) protein levels are very low or undetectable in the fluid and higher in serum, indicating that the presence of these factors in the follicular fluid is likely serum derived. Whether epiregulin (EREG) and betacellulin (BTC) are also present in the fluid remains to be determined.

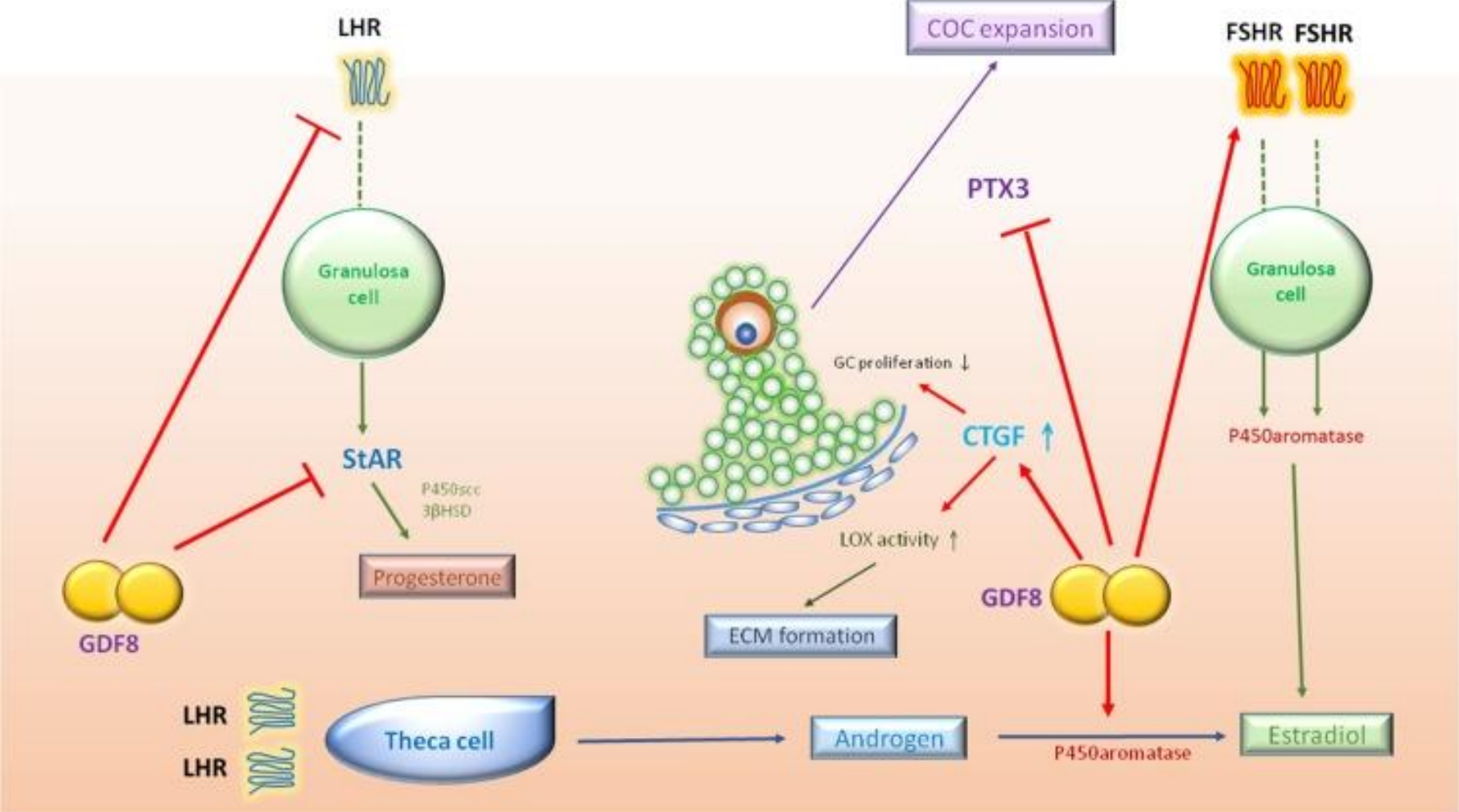
Schematic diagram summarizing functional roles of BMPs and GDF9 in the human ovary.



BMP, bone morphogenetic protein;
 COC, cumulus–oophorus complex;
 Cx43, connexin 43;
 GC, granulosa cell;
 HAS2, hyaluronan synthase type 2;
 PTX3, pentraxin 3;
 StAR, steroidogenic acute regulatory protein.

The potential physiological roles **of intra-ovarian BMPs** in regulating human ovarian functions, including steroidogenesis, activin production, cumulus–oophorus complex formation and expansion, cell–cell communication, ovulation and luteolysis are shown.

Schematic diagram summarizing potential roles of GDF8 in a human growing follicle.



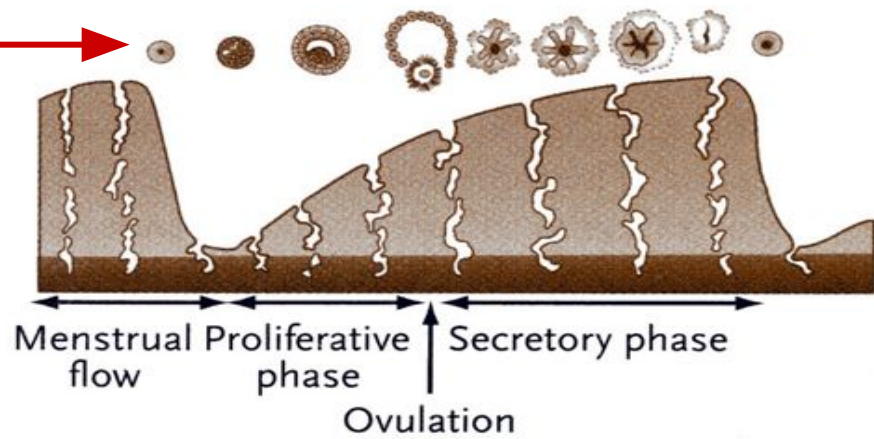
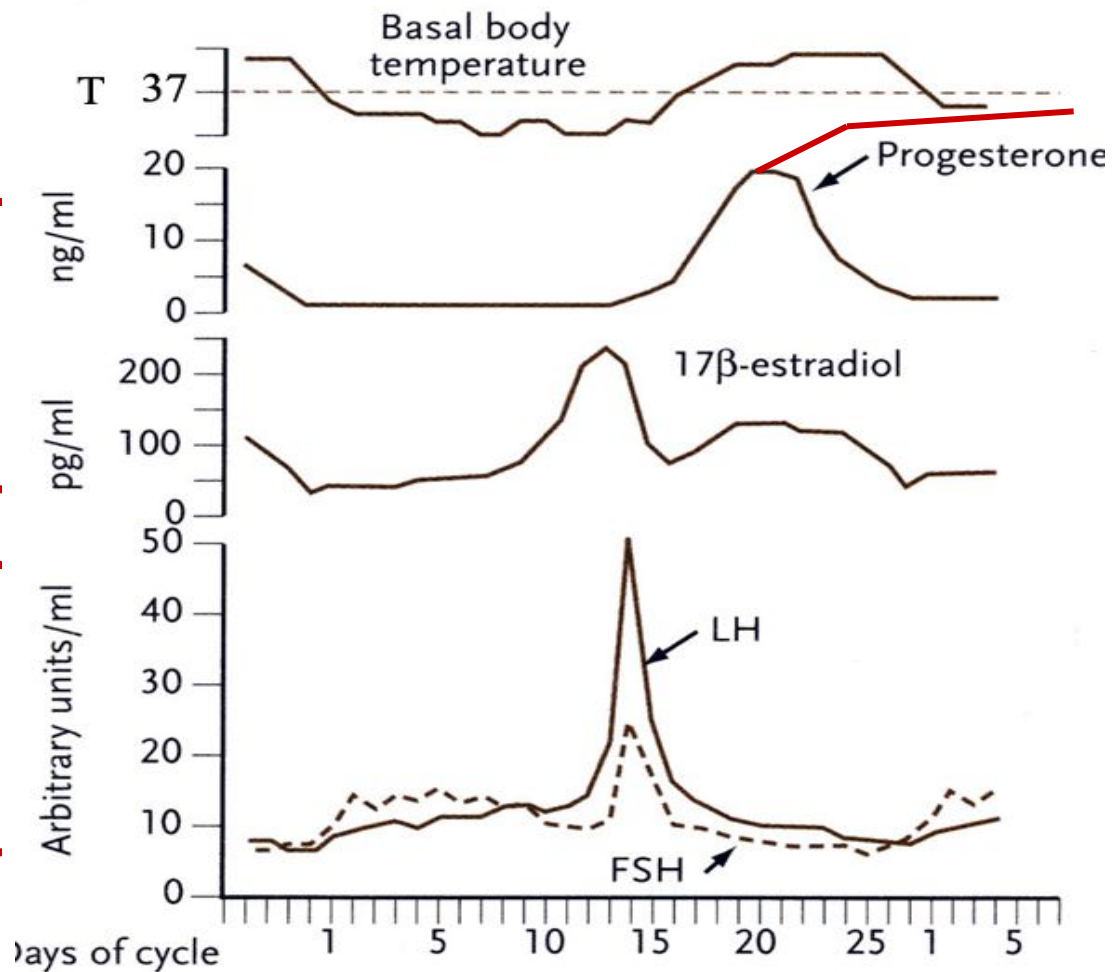
In this follicular microenvironment, the locally produced GDF8 may promote aromatase/estradiol and FSHR expression, suppress StAR/progesterone and LHR expression and down-regulate PTX3 expression. In addition, GDF8 induces the expression of CTGF, which contributes to the suppression of GC proliferation and the increase in LOX activity. 3βHSD, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; CTGF, connective tissue growth factor; ECM, extracellular matrix; LOX, lysyl oxidase; P450_{scc}, P450 side-chain cleavage enzyme; PTX3, pentraxin 3; FSHR, FSH receptor; LHR, LH receptor.

Уровень стероидных гормонов яичника

Уровень гормонов гипофиза

Яичник

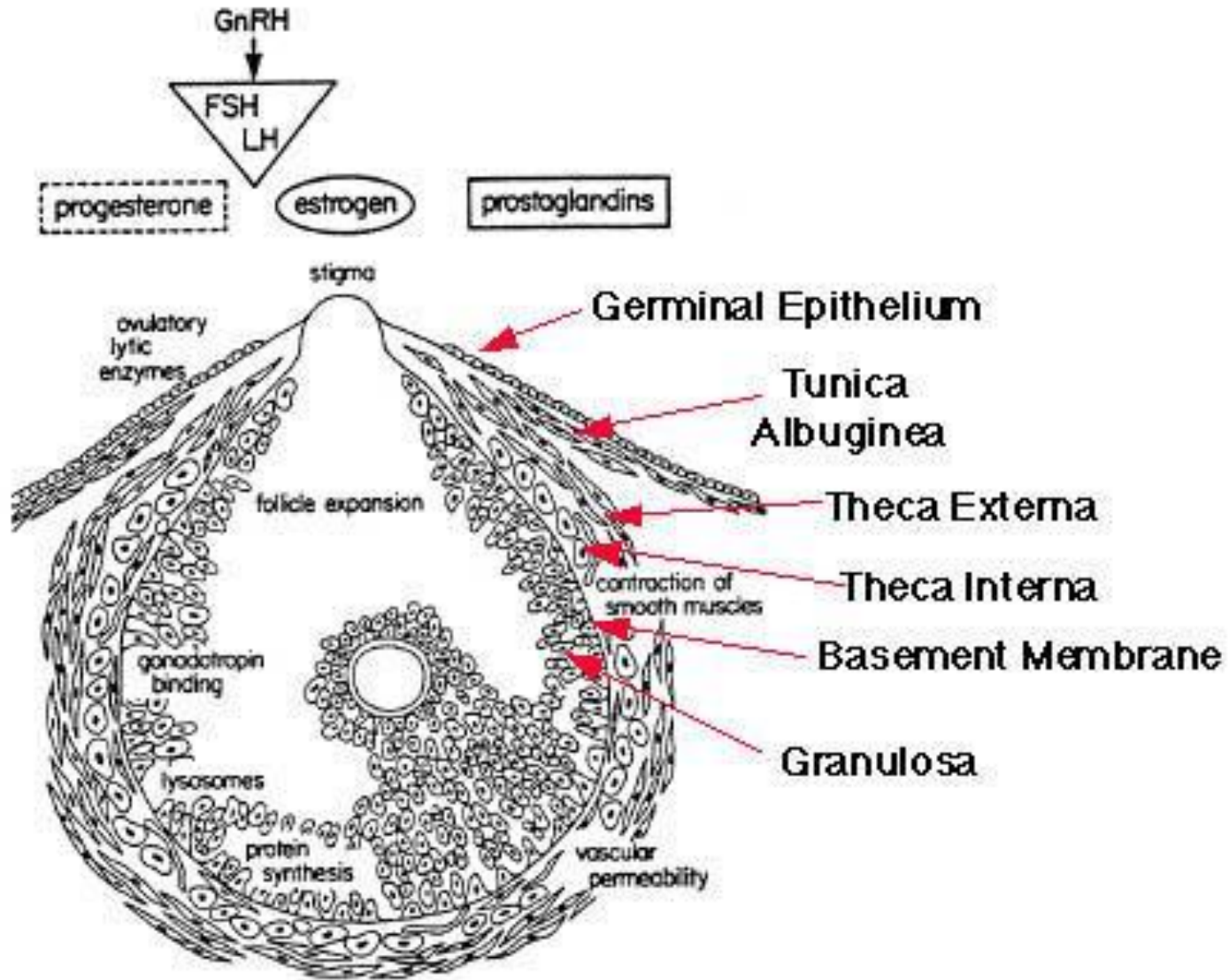
Маточный эндометрий



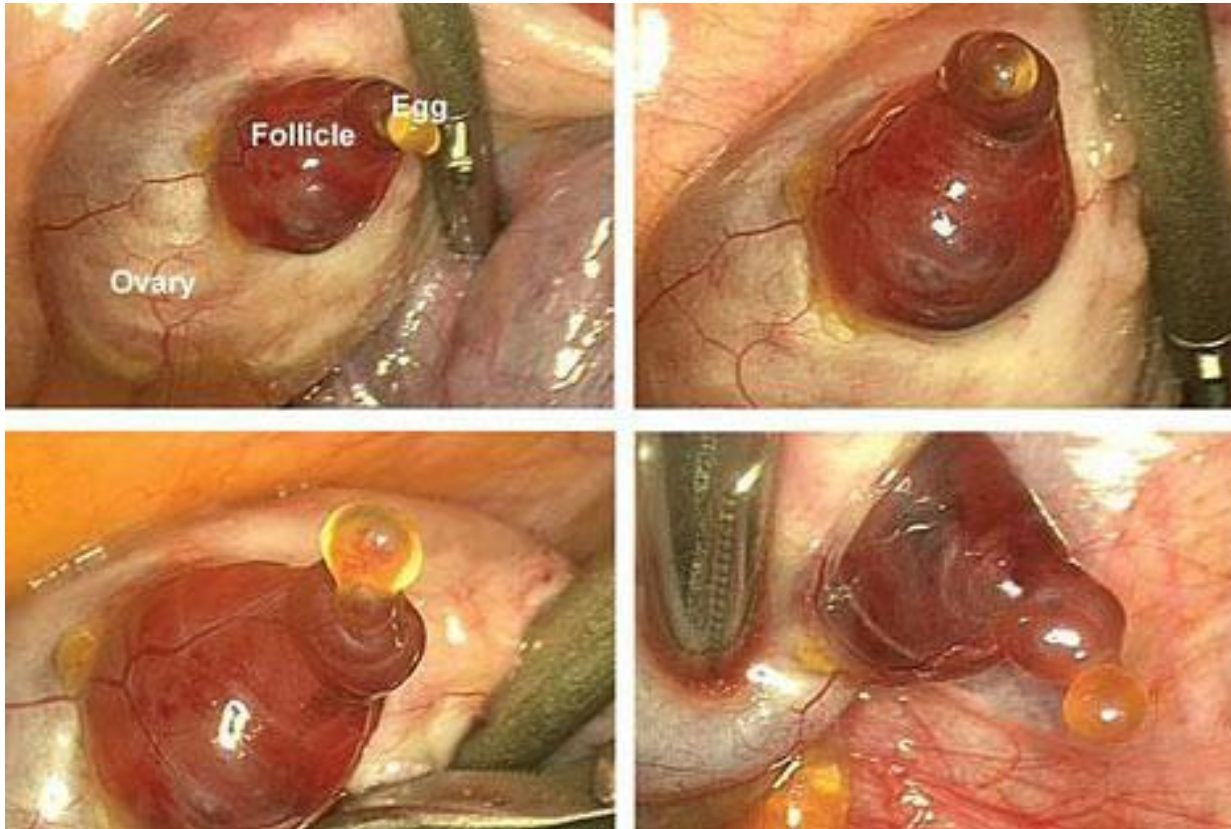
Овуляция: последовательность событий



Овуляторный фолликул

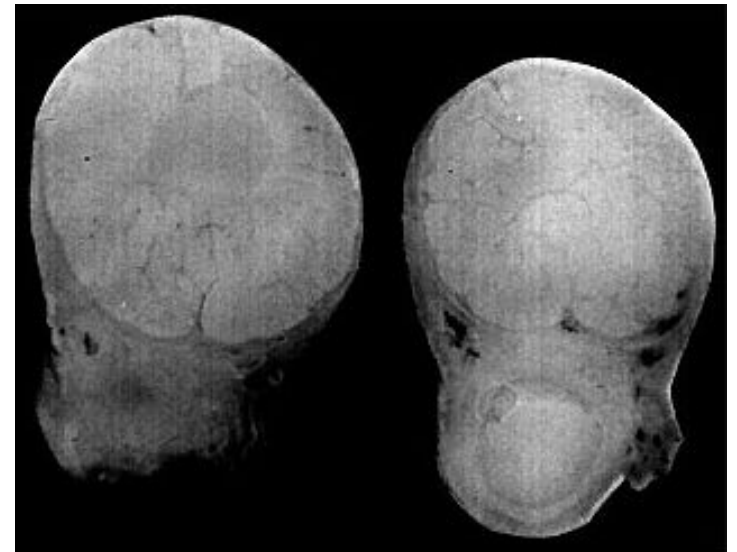
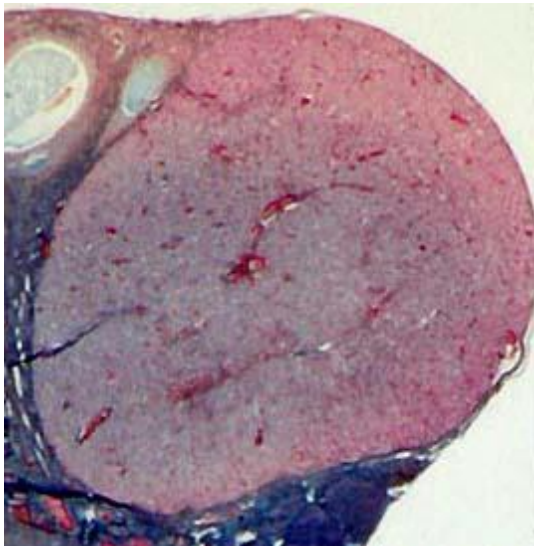
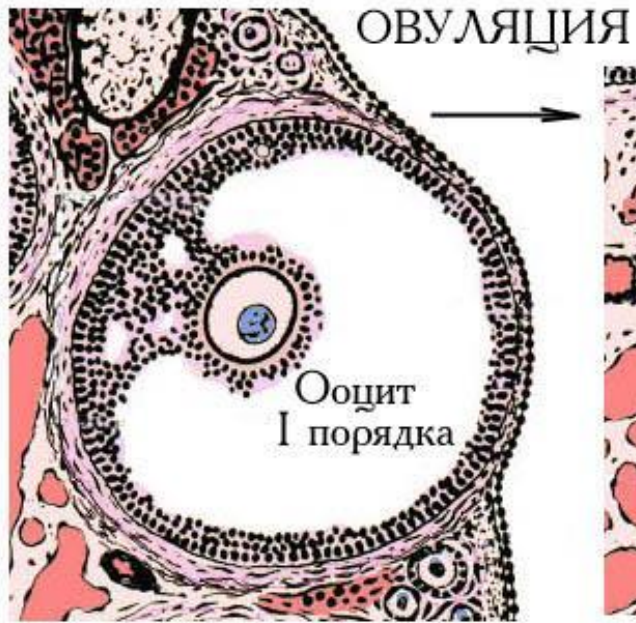


Несмотря на самое современное эндоскопическое оборудование, до сих пор овуляцию ученые наблюдали только у животных



Гинекологу Жаку Доннезу (Jacques Donnez) из Католического университета Лувьян (Catholic University of Louvain) в Брюсселе повезло увидеть процесс овуляции прямо во время операции по гистерэктомии. И не только увидеть, но и снять при помощи камеры, записывающей операцию. Яйцеклетка, попавшая в кадр, принадлежала 45-летней бельгийке.

Кстати, по словам автора, ценные кадры, которые он получил, позволяют теперь с уверенностью утверждать, что яйцеклетка покидает фолликул не мгновенно, а за 15 минут. Это опровергает теории о взрывной, внезапной овуляции



Морфология ооцита человека (клиническая практика ВРТ)



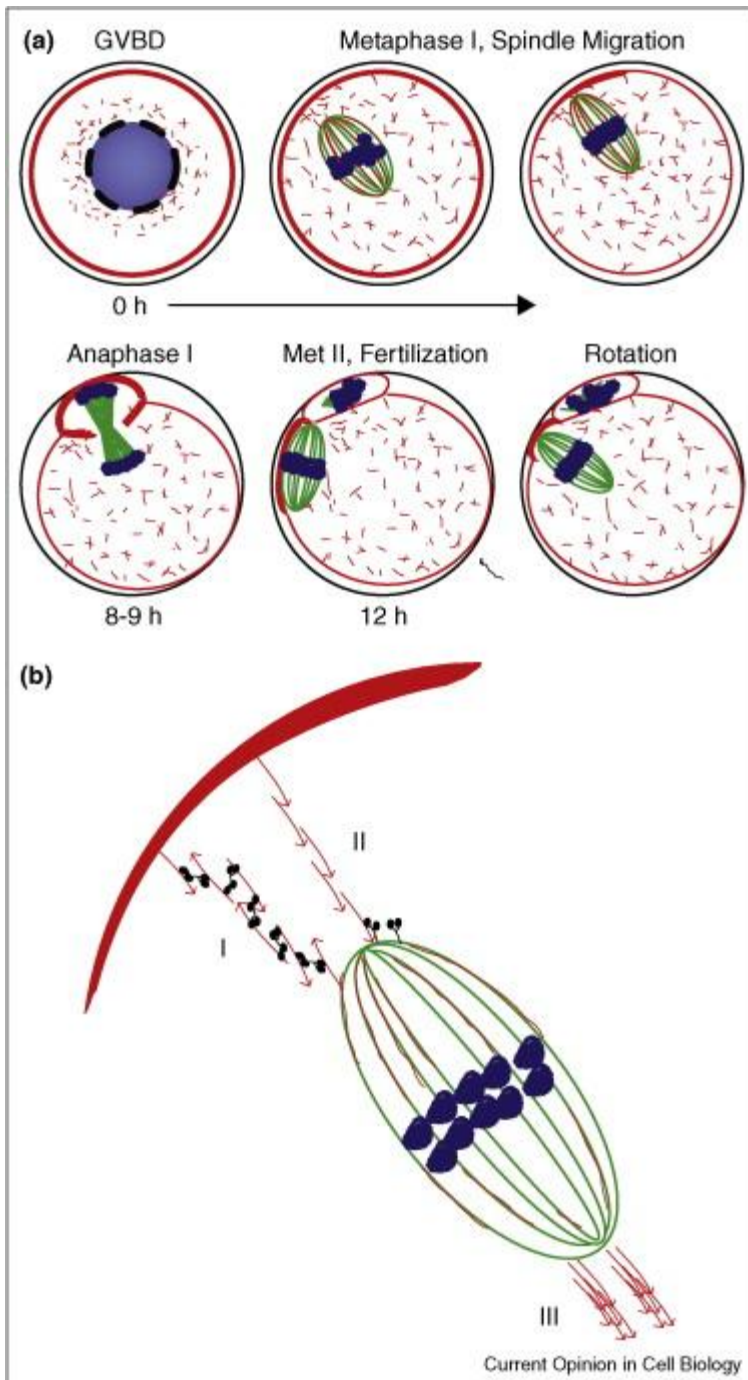
Ооцит с зародышевым пузырьком (germinal vesicle):
диплотена-диакинез
профазы мейоза ($2n4c$)



Ооцит с разрушившейся оболочкой ядра (зародышевого пузырька):
Метафаза 1-го
деления созревания
($2n4c$)



Зрелый ооцит с выделившимся первым редуционным тельцем:
диплотена-диакинез
профазы мейоза
Ооцит - $n2c$
Редуционное тельце – $n2c$



Веретено 1 и 2 деления мейоза (ооцит мыши)

(a) *Веретено первого деления мейоза формируется близко к центру ооцита и мигрирует к на периферию в кортикальную область (в ту часть, которая ближе к веретену). Веретено 2-го деления мейоза располагается в кортикальной зоне параллельно поверхности ооцита и поворачивается только после оплодотворения*

(b) *Схема предположительного механизма транслокации веретена в кортикальную область (актин-зависимый процесс)*

(I) Contraction of anti-parallel actin filaments connecting the cortex to the spindle by bipolar myosin II mini thick filaments, (II)

cargo-like transport of the spindle along actin filaments with barbed ends oriented toward the cortex, with myosin II localized at the spindle pole

(III) actin polymerization-driven motility from the rear.

Actin – red, microtubules – green, chromosomes – blue, myosin II – black. Outer circle = zona pellucida.

Формирование миозин-ассоциированных везикул в цитоплазме GVBD ооцита

сделать слайд!

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797517/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797517/figure/F6/>