

فصل سوم

لقاح: فعال شدن تکوین جنین

در طی گامتوژن سلولهای تناسلی به اسپرم و تخم تمایز پیدا می کنند که بطور استاندارد برای نقشهایی که در تولید نسل بعد بر عهده دارند تطابق پیدا کرده اند. لقاح فرایندی است که در آن اسپرم و تخم با هم متحد شده و زیگوت را بوجود می آورند و زیگوت سلولی است که منشاء تمام سلولهای جنین و حیوان بالغ خواهد بود. لقاح دو نتیجه مهم دارد. اولین نتیجه آن این است که تعداد کروموزومها به حالت دیپلوئید بر می گردد و این موقعی اتفاق می افتد که ژنوم مادری و پدری با هم ترکیب می شوند. دومین نتیجه لقاح فعال شدن تکوین است. این فعال شدن زنجیره ای از تغییرات متابولیک و مورفولوژیک را راه اندازی می کند که در نهایت منجر به تقسیم زیگوت و تبدیل آن به یک موجود پرسلولی می گردد.

در حال حاضر بیشتر دانش ما از لقاح و فعال شدن تکوین حاصل بیش از یک قرن مطالعه است که روی بی مهرگان دریازی بویژه توتیای دریایی انجام گرفته است. توتیای دریایی در تحقیقاتی که روی لقاح و فعال شدن انجام می گیرد دارای اهمیت بسیاری است چرا که از یک طرف تعداد بسیار زیادی گامت تولید می کند و از طرف دیگر لقاح در آن خارجی است. اگرچه لقاح در پستانداران بصورت داخلی اتفاق می افتد لیکن اکنون آنها از لحاظ تعداد مطالعاتی که بر روی فرآیند لقاح آنها صورت می گیرد در ردیف توتیای دریایی قرار می گیرند. تحقیقات اولیه ای که بر روی لقاح پستانداران انجام می گرفت با مشکل روبرو می شد زیرا اسپرم خارج شده از فرد نر قادر نیست در شرایط *in vitro* تخم را لقاح دهد. در نهایت مشخص شده که اسپرم برای اینکه بتواند قابلیت لقاح تخم را پیدا کند بایستی فرآیند ظرفیت پذیری را پشت سر بگذارد و این مرحله ای از رسیدگی است که در داخل دستگاه تناسلی ماده اتفاق می افتد. اگر اسپرمها از دستگاه تناسلی ماده گرفته شوند و یا در مایعی از دستگاه تناسلی ماده خوابانده شوند مشاهده می شود که آنها فرآیند ظرفیت پذیری را پشت سر گذاشته و قادر به لقاح تخم خواهند بود. این کشف منجر به توسعه تکنیکهایی شد که طی آنها فرآیند لقاح در پستانداران در شرایط *in vitro* مورد مطالعه قرار می گرفت. اکثر اطلاعات ما در مورد لقاح در پستانداران از مطالعاتی ناشی می شود که در شرایط *in vitro* بر روی اسپرم و تخمهای موش، هامستر، خرگوش و خوک صورت گرفته است. بدلیل سهم عمده ای که در تحقیقات داشته اند ما در این فصل اساساً فرآیند لقاح را در توتیای دریایی و پستانداران مورد بحث قرار خواهیم داد. اگرچه وقایع کلی لقاح در بسیاری از موجودات مختلف بهم شبیه می باشد لیکن لقاح فرآیند متنوعی است که بسته به طریقه زندگی و عادات گونه های مختلف سازگاریهای خاصی پیدا می کند ولی ما در اینجا قصد بیان این سازگاریها را نداریم.

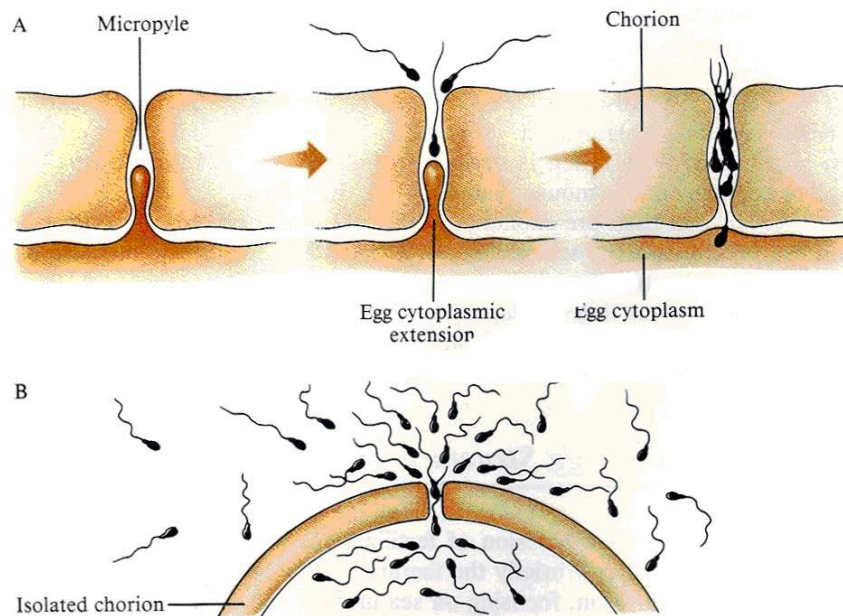
1-3) ساختمان اسپرم و تخم

قبل از شروع بحث لقاح ما به انتهای گامتوژنز برمی گردیم تا بطور مختصر ویژگیهای اسپرم و تخم که در لقاح اهمیت دارند مرور کنیم و برای اینکار روی توتیا و پستانداران متمرکز می شویم.

چون اسپرم غالباً برای رسیدن به تخم مسافت طولانی را طی می کند معمولاً دارای اندازه کوچک و ظاهری آئرودینامیک است که توسط دمی که در انتهای آن قرار دارد بجلو رانده می شود. سر اسپرم محتوی هسته و آکروزوم است. در توتیای دریایی آکروزوم ساختاری پیازی شکل بوده که در ناحیه قدامی سر اسپرم قرار می گیرد در حالیکه در پستانداران آکروزوم کلاهک نازکی را بر روی هسته اسپرم تشکیل داده و کل ناحیه قدامی سر اسپرم را می پوشاند. آکروزومها اندامکهای غشاءداری هستند که حاوی آنزیمهای هیدرولیتیک و سایر پروتئینها می باشند. قبل از لقاح آکروزوم دچار آگروسیتوز می گردد که در اینجا به این آگروسیتوز اصطلاحاً واکنش آکروزومی می گویند. در جریان این عمل آکروزوم محتویات خود را به بیرون از اسپرم می ریزد. محتویات آزاد شده آکروزوم به اسپرم در نفوذ به پوششهای خارج سلولی تخم کمک می کنند.

تخم به ظاهری آئرودینامیک و قابلیت تحرک برای پیمودن مسافتهای طولانی نیاز ندارد. در عوض آن حاوی ذخایری از ترکیبات هسته ای و سیتوپلاسمی است که برای ساخت جنین مورد استفاده قرار می گیرند. تخم همچنین قابلیت فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی برای پذیرش اسپرم را دارا می باشد. پوشش خارج سلولی، غشاء پلاسمایی و سیتوپلاسم محیطی یا کورتکس تخم هر یک نقشهای مهمی در جریان لقاح بازی می کنند. تخم توتیای دریایی حاوی یک پوشش خارج سلولی یا گلیکوکالیکس متشکل از دو لایه غیرسلولی است. یک لایه خارجی یا پوشش ژله ای که حاوی چندین پپتید کوچک و پلی ساکاریدهای اسیدی بزرگ می باشد. یک لایه داخلی یا پاکت زرده ای متشکل از شبکه ای از رشته های گلیکوپروتئینی. تخم های پستانداران دارای یک پوشش خارجی است که از لایه های سلولی و غیرسلولی تشکیل می شود. برای مثال، در موش تاج شعاعی یک لایه سلولی است که از سلولهای فولیکولی منشاء گرفته و مانع سختی در مقابل نفوذ اسپرم می باشد. در زیر تاج شعاعی منطقه شفاف قرار دارد که شبکه ضخیمی از مولکولهای گلیکوپروتئینی است. منطقه شفاف تخم پستانداران معادل پوشش ژله ای و پاکت زرده ای تخم توتیای دریایی می باشد.

لایه های خارج سلولی اضافی (کوریون و پوسته های تخم) که در اطراف تخم بعضی از موجودات ایجاد می شود بوسیله سلولهای فولیکولی یا سایر سلولهای سوماتیک موجود در دستگاه تناسلی ماده تولید می شوند. در این موجودات اسپرم معمولاً نمی تواند از این لایه ها عبور کند و بنابراین بایستی از طریق منفذی بنام میکروپیل به تخم دسترسی پیدا کند (شکل 1-3). میکروپیل کانال باریکی در کوریون یا پوسته تخم است که از طریق آن اسپرم به تخم رسیده و با آن لقاح پیدا می کند.



شکل 3-1 A، لقاح تخم ماهی استورژنون بوسیله یک اسپرم که وارد میکروپیل شده و با برجستگی کوچکی از سیتوپلاسم تخم جوش خورده است. اگرچه چند اسپرم وارد میکروپیل میشوند ولی فضای باریک میکروپیل فقط به یکی از آنها اجازه می‌دهد که به برجستگی سیتوپلاسمی تخم جوش بخورد. B، جذب اسپرم به ناحیه میکروپیل کوریون جدا شده تخم ماهی.

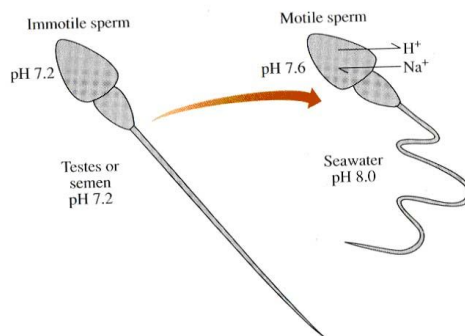
غشاء پلاسمایی تخم در زیر گلیکوکالیکس قرار دارد. در بسیاری از تخم‌ها غشاء پلاسمایی بشکل میکروویلیهای ریزی چین می‌خورد. در زیر غشاء پلاسمایی تخم، کورتکس یا ناحیه قشری سیتوپلاسم قرار دارد که دارای ساختاری سازمان یافته بوده و معمولاً نسبت به سیتوپلاسم داخلی از چگالی بیشتری برخوردار است. این بخش از سیتوپلاسم از نظر اندامکهای سیتوپلاسمی، شبکه‌های اسکلت سلولی و شبکه اندوپلاسمیک غنی می‌باشد. بزرگترین فراوانترین ضمایم بخش قشری در توتیای دریایی و پستانداران گرانولهای قشری می‌باشند. این گرانولها وزیکولهای غشاءداری هستند که دارای ساختار داخلی بی‌نظیری می‌باشند. این گرانولها حاوی آنزیمهای لیز کننده پروتئینی، موکوپولی‌ساکاریدها و پروتئینهای ساختمانی می‌باشند. در تخم توتیای دریایی 15000 گرانول قشری وجود دارد در حالیکه در تخم موش حدود 4000 عدد از این گرانولها شمارش شده است. همچنانکه خواهیم دید در طی لقاح گرانولهای قشری دچار آگروسیتوز می‌شوند و در نتیجه آن سبب ایجاد تغییرات شدیدی در غشاء پلاسمایی تخم می‌شوند.

3-2 آماده شدن برای لقاح: وقایعی که قبل از اتحاد اسپرم - تخم اتفاق می‌افتد

اسپرم بایستی یکسری تغییرات آماده‌سازی را پشت سر گذراند تا بتواند بطور موفقیت‌آمیزی تخم را لقاح دهد. اولاً اسپرم با استفاده از منابع انرژی محدودی که در اختیار دارد بایستی مسافت نسبتاً طولانی را طی کند تا به محل لقاح برسد. زمان فعال شدن قابلیت تحرک اسپرم نیز باید دقیق باشد و این عمل نبایستی در بیضه‌ها و یا مایع منی اتفاق بیفتد. ثانیاً حرکت اسپرم بایستی بطرف محل لقاح هدایت شده باشد. ثالثاً، هنگامیکه اسپرم به محل لقاح رسید بایستی قادر باشد از لایه‌های خارج سلولی تخم بگذرد تا بتواند با تخم ترکیب شود.

فعال شدن اسپرم

اسپرم در توتیای دریایی برای مدت زمان مدیدی که در داخل بیضه و مایع منی قرار دارد بی‌حرکت است اما هنگامیکه در مجاورت تخم قرار می‌گیرد فوراً قدرت تحرک پیدا می‌کند. همانطور که در شکل 2-3 نشان داده شده است فعال شدن اسپرم توتیای دریایی بوسیله pH کنترل می‌شود. وجود مقدار بالایی CO_2 در مایع منی سبب می‌شود که pH داخل سلولی در هنگامیکه در بیضه قرار دارد در حدود 7/2 نگهداری شود. در این حالت فرآیند تنفس سلولی و تحرک اتفاق نمی‌افتد. هنگامیکه اسپرم به آب دریا که مقدار CO_2 کم و pH بالایی (حدود 8) دارد وارد می‌شود عمل معاوضه همزمان H^+ داخلی با Na^+ خارجی شروع می‌شود. و این کار با سرعت pH داخل سلولی را بالا برده و به حدود 7/6 می‌رساند. در این pH تنفس سلولی فعال شده و اسپرم با کمک حرکات شلاقی تاژک خود شروع به حرکت می‌کند. اهمیت تغییر pH کنترل تحرک اسپرم بوسیله آزمایشی که در آن اسپرم در آب دریایی فاقد Na^+ قرار داده شد مشخص گردیده است. در این شرایط عمل معاوضه H^+/Na^+ صورت نمی‌گیرد و از اینرو pH داخل سلولی در حدی که از تنفس سلولی ممانعت بعمل می‌آورد باقی می‌ماند و اسپرم بی‌تحرک خواهد ماند. اما اگر Na^+ یا NH_4OH (که سبب بالا رفتن pH داخل سلولی می‌شود) به آب دریایی فاقد سدیم اضافه شود ملاحظه خواهد شد که اسپرم‌های بی‌تحرک سریعاً قدرت تحرک خود را بدست می‌آورند. پوشش ژله‌ای نیز با توجه به دارا بودن اسپرکت (speract) که یک پپتید فعال کننده اسپرم می‌باشد در کنترل قابلیت تحرک اسپرم نقش دارد. اسپرکت پپتیدی مرکب از 10 اسید آمینه است که سبب افزایش pH داخل سلولی می‌گردد. تغییر pH از طریق فعال کردن داینین تحرک اسپرم را کنترل می‌کند. داینین یک ATP‌آز است که به سطح میکروتوبولهای آکسونم تاژک متصل می‌شود. فعالیت داینین به pH داخل سلولی بسیار حساس است. در pH اسیدی داینین غیرفعال است و هیچ ATP‌ای تولید نمی‌شود و اسپرم بدون تحرک باقی می‌ماند. موقعیکه pH داخل سلولی بالا می‌رود و به 7/6 می‌رسد داینین فعال شده و اسپرم شروع به حرکت و شنا کردن می‌کند.

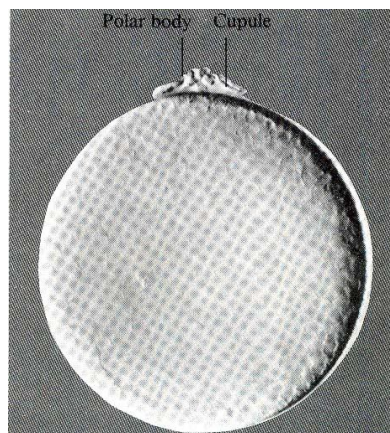


شکل 2-3 نقش pH داخل سلولی در فعال شدن حرکت اسپرم توتیای دریایی. pH نشان داده شده در کنار سر اسپرم منعکس کننده pH داخل سلولی است.

جذب اسپرم بطرف تخم

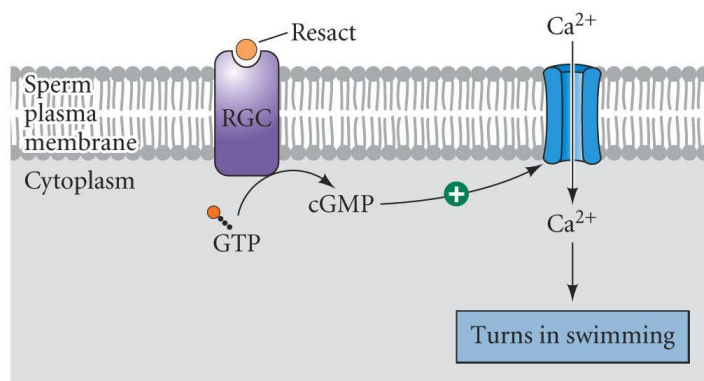
برای یافتن تخم تنها کسب قدرت تحرک اسپرم کافی نیست بویژه هنگامیکه اسپرم به درون یک اقیانوس بزرگ، استخر آب یا حتی دستگاه تناسلی ماده ریخته می‌شود. در موجوداتی که دارای لقاح خارجی می‌باشند مکانیسم‌هایی تکامل پیدا

کرده که بوسیله آن اسپرم بطرف تخم جذب می‌شود. **کمو تاکسی (chemotaxis)** بصورت حرکت یک سلول بطرف یک منبع ماده شیمیایی که از سلول دیگر ترشح می‌شود تعریف می‌گردد. جذب کمو تاکسیک اسپرم بطرف تخم در گیاهان پدیده‌ای عام است. در جلبک دریایی *Fucus erratus* تعداد زیادی اسپرم و تخم بداخل اقیانوس رها می‌شوند. اسپرمها بطرف یک مولکول هیدروکربنی موسوم به فوکوسراتن (fucoserraten) که توسط تخم ترشح می‌شود جذب می‌گردند. فوکوسراتن را می‌توان برای اهداف آزمایشگاهی جمع‌آوری کرد زیرا که آن بوسیله تخم به آب دریا آزاد می‌گردد. قرار دادن فوکوسراتن در یک لوله موئینه و نزدیک کردن آن به سوسپانسیون اسپرم سبب می‌شود که بعد از مدت کوتاهی ابری از اسپرم بطرف نوک لوله موئینه حاوی فوکوسراتن جذب شوند. کمو تاکسی اسپرم می‌تواند در پستانداران نیز اتفاق بیفتد. تخم‌های حشرات و ماهیان در داخل یک پوشش خارج سلولی مقاوم به آب بنام کوریون که در طی اووژن ایجاد می‌گردد احاطه می‌شوند. اسپرم فقط می‌تواند از طریق میکروپیل وارد کوریون گردد. در تخم ماهیها، موادی که در اطراف منفذ میکروپیل قرار دارند بعنوان جاذب اسپرم عمل می‌کنند. این مواد باعث می‌شوند که اسپرم بطور سریع در مجاورت میکروپیل حرکت کند. سرانجام اسپرم فعال شده از طریق منفذ میکروپیل بداخل کوریون نفوذ کرده و با برآمدگی کوچکی از سیتوپلاسم که از سطح تخم بداخل میکروپیل امتداد پیدا می‌کند تماس برقرار می‌نماید (رجوع به شکل 3-1A). برای اینکه نقش میکروپیل را در جذب اسپرمها نشان دهند در یک آزمایش اسپرمها به محیط حاوی کوریون جدا شده از تخمهای آزاد اضافه شده است. در این شرایط ملاحظه شده که با وجود نبود تخم، اسپرمها در ناحیه میکروپیل تجمع یافته و بداخل میکروپیل خالی از تخم وارد می‌شوند (رجوع به شکل 3-1B). اگر ناحیه میکروپیل از کوریون جدا شود باز هم می‌بینیم که اسپرمها بطرف این ناحیه جلب می‌شوند و تمایلی به حرکت بطرف سایر بخشهای کوریون از خود نشان نمی‌دهند. از اینرو موادی که اسپرم را جذب می‌کند بایستی در نزدیکی میکروپیل قرار داشته باشند. کمو تاکسی اسپرمی همچنین در تخمهای ژله‌ماهی نیز اتفاق می‌افتد. ماده‌ای که اسپرم را جذب می‌کند پروتئینی است که در ناحیه **کوپول (cupule)** قرار دارد و کوپول یک ساختمان خارج سلولی تخصص یافته است که قطب حیوانی تخم ژله‌ماهی را احاطه می‌کند (شکل 3-3). این پروتئین باعث می‌شود که اسپرم مجاور رفتار شای خود را تغییر داده و تخم را در این ناحیه لقاح دهد.



شکل 3-3) تخم لقاح نیافته یک ژله‌ماهی که کوپول محتوی پروتئین جذب‌کننده اسپرم و جسم قطبی قطب حیوانی را نشان می‌دهد.

برای سالیان متمادی این بحث وجود داشت که آیا در توتیای دریایی نیز کموتاکسی اسپرمی وجود دارد یا خیر ولی اکنون مشخص شده که مواد جاذب اسپرمی در پوشش ژله‌ای تخم این خارپوست وجود دارد. ریسکت (resact) پپتیدی است که از 14 اسید آمینه تشکیل می‌گردد و از پوشش ژله‌ای تخم توتیا استخراج شده است. هنگامیکه مقدار اندکی ریسکت بداخل سوسپانسیونی از اسپرم اضافه شود مشاهده خواهد شد که اسپرمها رفتار شای خود را تغییر داده و پس از چند ثانیه در ناحیه‌ای که ریسکت بداخل سوسپانسیون اضافه شده تجمع پیدا می‌کنند. این آزمایشات نشان می‌دهد که ریسکت یک ماده جاذب اسپرمی است. اسپرم در سمت بیرونی غشاء سلولی خود دارای گیرنده‌ای است که سبب جذب ریسکت می‌شود. هنگامیکه ریسکت به این گیرنده‌ها متصل شده در سمت سیتوپلاسمی غشاء آنزیم گوانیلیل سیکلاز فعال می‌شود و موجب تولید cGMP می‌گردد. این ترکیب باعث باز کانال‌های کلسیمی شده و در نتیجه یون کلسیم از آب دریا به اسپرم وارد می‌گردد (شکل 3-4).



شکل 3-4) جذب شیمیایی اسپرم توتیای دریایی: ریسکت ترشح شده از پوشش ژله‌ای تخمک به گیرنده خود در سطح اسپرم متصل و موجب فعال شدن گیرنده گوانیلیل سیکلاز (RGC) شده و cGMP در درون سلول شکل می‌گیرد. این ترکیب موجب باز شدن کانالهای کلسیمی غشاء و ورود این یون بداخل اسپرم می‌گردد. این یون حرکت اسپرم را فعال کرده و اسپرم در شیب ریسکت بسمت تخمک شنا می‌کند.

ریسکت همچنین بعنوان پپتید فعال کننده اسپرم عمل می‌کند. این پپتید باعث افزایش سرعت تنفس سلولی در میتوکندری می‌شود. افزایش cGMP و یون کلسیم و همچنین تولید ATP در میتوکندریها و در نهایت افزایش فعالیت ATP آزی داینئین موجب حرکت اسپرم در جهت شیب غلظتی از ریسکت شده تا اینکه سرانجام به تخمک برسد. در پستانداران بررسی و شناسایی مولکولهایی که ممکن است اسپرم را فعال کنند و آن را قادر سازند تا به سمت تخمک شنا کند مشکل است. در این گروه در جریان آمیزش چند صد میلیون اسپرم (در انسان بین 200 تا 600 میلیون) وارد مجرای تناسلی ماده می‌شود و در نهایت بین 200 تا 800 اسپرم به اطراف تخمک می‌رسند. در حقیقت مجرای تولید مثلی فرد ماده در پستانداران یک مجرای غیر فعال بر سر راه عبور اسپرم نیست بلکه مجموعه‌ای از بافتهای با عملکرد بسیار تخصصی است که فعالانه عبور و بلوغ هر دو سلول جنسی را کنترل می‌کنند. در نتیجه این نقش فعال است که اسپرم قادر است در ناحیه آمپول به تخمک برسد و آنرا تلقیح نماید. در حقیقت حرکت خود اسپرم (بواسطه حرکات تاژک)

نقش کمی در رسیدن اسپرم به محل لقاح در ناحیه آمپول دارد. در انسان و چندین گونه دیگر از پستانداران مشخص شده که 30 دقیقه پس از تخلیه اسپرم‌ها در واژن آن‌ها در لوله‌های رحمی مشاهده می‌شوند. به قول Storey این زمان آن قدر کوتاه است که اگر اسپرمی قهرمان دو المپیک نیز باشد نمی‌توان با چنین سرعتی و صرفاً با اتکا به قدرت تاژک خودش به آنجا برسد. لذا بنظر می‌رسد که اسپرم بیشتر بدلیل فعالیت عضلات رحمی است که در لوله‌های رحمی حرکت می‌کند.

نتایجی که از تحقیقات اخیر در باره حرکت اسپرم بدست آمده موید این است که: (1) انقباضات عضلات رحمی برای رسیدن اسپرم به لوله‌های رحمی لازم است، (2) وقتی اسپرم به نزدیکی تخمک رسید دارای فعالیت مضاعف می‌شود و این فعالیت مضاعف ناشی از یک سری علائم نظیر شیب حرارتی بین نواحی مختلف لوله رحمی (ناحیه آمپول 2 درجه گرمتر است)، و یا علامد صادر شده از سلولهای تاج شعاعی اطراف تخمک است، (3) اسپرم حین حرکت از واژن بسمت ناحیه آمپول لوله‌های رحمی بالغ می‌شود و ظرفیت لقاح پیدا می‌کند.

اسپرمهای تازه انزال یافته پستانداران تا زمانی که مدتی را در مجاری تناسلی ماده سپری نکنند قادر به انجام واکنش آکروزومی نخواهند بود. مجموعه تغییرات فیزیولوژیکی که باعث می‌شود اسپرم ظرفیت لقاح با تخمک را پیدا کند تحت عنوان **ظرفیت پذیری (capacitation)** نامیده می‌شود. هنوز حوادث مولکولی که حین ظرفیت‌پذیری اتفاق می‌افتد بطور کامل شناسایی نشده‌اند اما 5 سری از تغییرات حائز اهمیت عبارتند از (شکل 5-3):

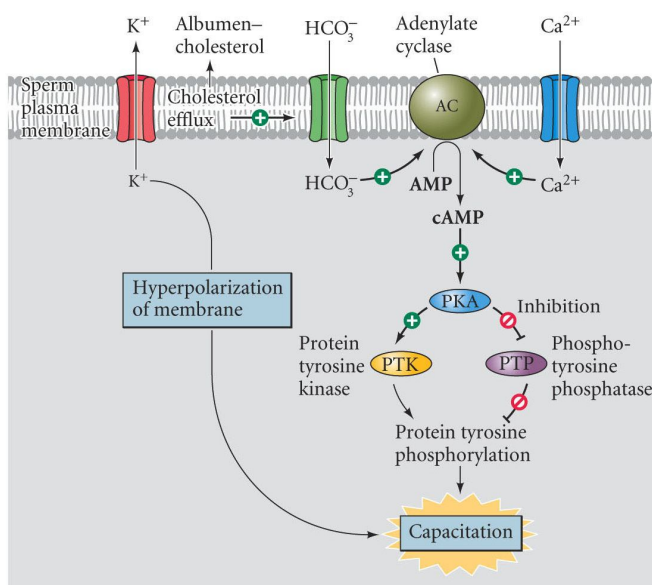
1. غشاء سلولی اسپرم با حذف کلسترول توسط پروتئینهای آلبومین موجود در مجرای تناسلی ماده تغییر می‌کند. خروج کلسترول از غشاء سبب می‌شود که گیرنده‌های پروتئینی غشاء که ابتدا بصورت پراکنده وجود دارند در غشاء قسمت قدامی سر اسپرم جمع شوند.

2. پروتئین‌ها و کربوهیدراتهای خاصی که احتمالاً نقش مهاری در اتصال اسپرم به منطقه شفاف دارند حین ظرفیت‌پذیری از سطح اسپرم ناپدید می‌شوند.

3. یون‌های پتاسیم اسپرم را ترک گفته و سبب منفی تر شدن پتانسیل غشاء اسپرم می‌شوند و این به کانالهای کلسیمی اجازه باز شدن می‌دهد. یون کلسیم و بی‌کربنات وارده برای تولید AMP حلقوی و ادغام غشاءها برای پاره شدن کلاهک آکروزومی لازم است.

5. بعضی از پروتئینهای دخیل در تشکیل گیرنده‌های سلولی فسفوریله می‌شوند.

5. سطح بیرونی غشاء خارجی کلاهک آکروزومی تغییر کرده و در تماس با غشاء پلاسمائی سر اسپرم قرار می‌گیرد بطوریکه آماده ادغام با آن می‌گردد.



شکل 3-5) مدلی فرضی برای ظرفیت پذیری اسپرم پستانداران. خروج پتاسیم موجب تغییر در پتانسیل غشاء می‌شود. حذف کلسترول توسط آلبومین محرک کانالهای یونی است و یونهای کلسیم و بی کربنات را قادر می‌سازد تا وارد اسپرم شوند. این یونها سبب تسهیل فعالیت آدنیلات سیکلاز و در نتیجه تولید AMP حلقوی می‌شود. افزایش AMP حلقوی باعث فعال شدن پروتئین کیناز A و به تبع آن فعالیت پروتئین تیروزین کینازها می‌شود و اینها ترکیباتی هستند که برای ظرفیت پذیری لازمند.

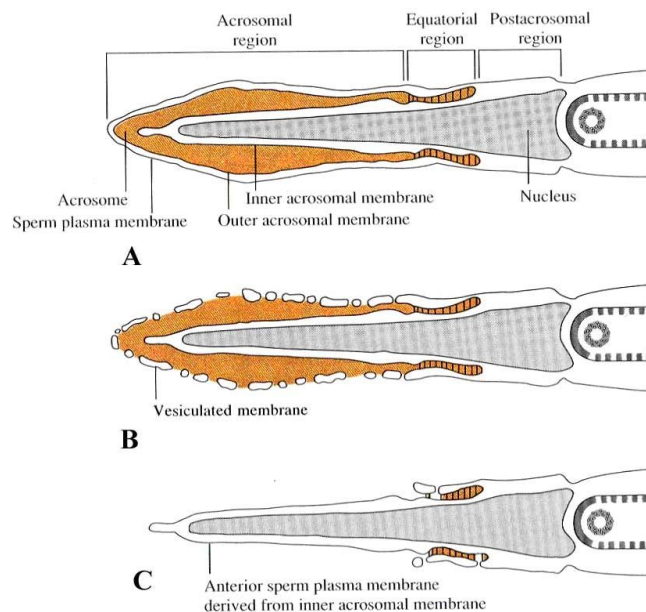
نفوذ اسپرم بداخل پوشش‌های سطحی تخم

قبل از اینکه اسپرم بتواند با تخم متحد شود بایستی از پوشش‌های سطحی تخم عبور کند. پوشش‌های سطحی از تخم محافظت می‌کند و این اطمینان را بوجود می‌آورد که اسپرم اختصاصاً با تخم گونه خودش برهم کنش نماید. تخم توتیای دریایی و پستانداران بوسیله کوریون احاطه نمی‌شود اما آنها نیز واجد یکسری پوشش‌های سطحی هستند که اسپرم قبل از اینکه بتواند به غشاء پلاسمایی تخم برسد ناگزیر باید از آنها عبور کند.

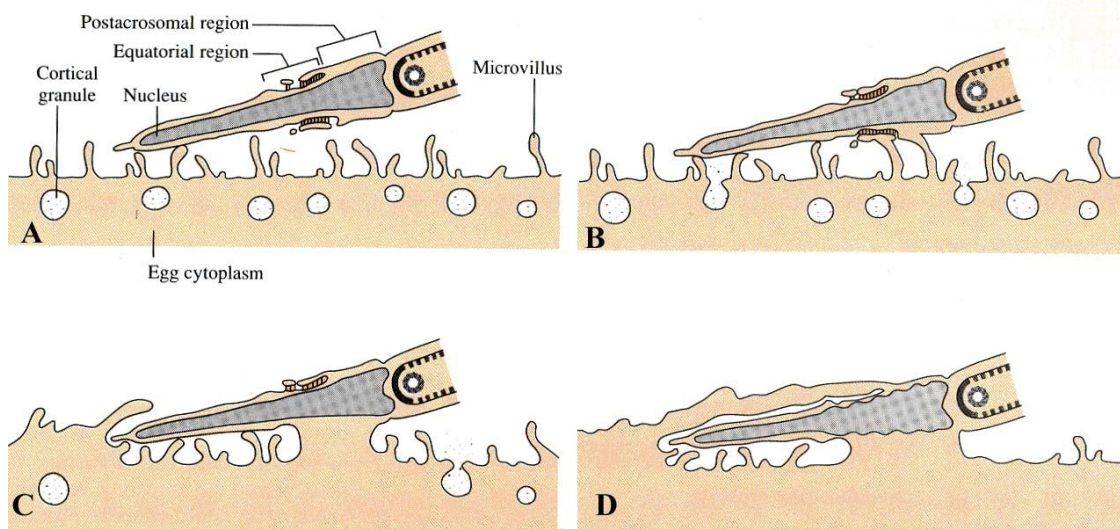
نفوذ اسپرم در پستانداران

اسپرم پستانداران قبل از اینکه بتواند واکنش آکروزومی را پشت سر گذارد و تخم را لقاح دهد به یک دوره رسیدگی یا ظرفیت‌پذیری در دستگاه تناسلی ماده نیاز دارد. طول دوره ظرفیت‌پذیری از کمتر از یک ساعت در موش تا 5-6 ساعت در انسان فرق می‌کند. بسته به گونه پستاندار، ظرفیت‌پذیری در رحم یا لوله اویدکت و یا در هر دو اتفاق می‌افتد. ظرفیت‌پذیری اسپرم مشتمل بر یکسری تغییرات است که در غشاء پلاسمایی اسپرم بوجود می‌آید که از جمله این تغییرات می‌توان به برداشته شدن برخی ترکیبات سطحی اسپرم و نوتریبی مواد داخل غشایی اشاره کرد. اما مکانیسم عمل این تغییرات ناشناخته مانده است. اسپرمهایی که فرآیند ظرفیت‌پذیری را طی می‌کنند نسبت به اسپرمهایی که این پدیده هنوز در آنها اتفاق نیفتاده است فعالیت تنفسی و تحرک بیشتری از خود نشان می‌دهند و این عوامل احتمالاً به نفوذ اسپرم به پوشش‌های سطحی تخم کمک می‌کند.

هنگامیکه اسپرم فرآیند ظرفیت‌پذیری را طی می‌کند می‌تواند واکنش آکروزومی را انجام دهد. واکنش آکروزومی در پستانداران همزمان با عبور اسپرم از توده تخمکی و تاج شعاعی و رسیدن به منطقه شفاف شروع می‌شود. در طی واکنش آکروزومی بخش خارجی غشاء آکروزوم به غشاء پلاسمایی ملحق شده، وزیکوله شده و متعاقباً ناپدید می‌گردد. بر خلاف آن، ناحیه‌ای از غشاء آکروزوم که در مجاورت هسته قرار می‌گیرد (غشاء داخلی آکروزوم) دست نخورده باقی مانده و جهت آن معکوس شده و بخشی از غشاء پلاسمایی اسپرم می‌گردد (شکل 6-3). در جریان اگزوسیتوز آنزیمهای موجود در آکروزوم از جمله هیالورونیداز (آنزیمی که موکوپلی ساکارید سطح سلولی بنام اسید هیالورونیک را هیدرولیز می‌کند) و آنزیم نفوذ کننده به تاج شعاعی به نواحی اطراف اسپرم ریخته می‌شوند. این آنزیم‌ها ارتباطات بین سلولهای توده تخمکی و تاج شعاعی را سست کرده و بدین طریق به رسیدن اسپرم به منطقه شفاف کمک می‌کنند. اسپرم پستانداران با توجه به سطح تخم بطور مماس وارد منطقه شفاف می‌شود (شکل 7-3) و در پشت سر خود منطقه روشنی را بجا می‌گذارد که قطر آن حدوداً برابر قطر سر اسپرم می‌باشد. مکانیسمی که اسپرم پستانداران برای نفوذ به منطقه شفاف استفاده می‌کند موضوعی است که هنوز مورد بحث و جدل است. بعضی از محققین فکر می‌کنند که اسپرم منحصراً با کمک حرکات شلاقی دم خود بداخل این ناحیه نفوذ می‌کند در صورتیکه دیگران معتقدند که اسپرم راه خود را در این منطقه با کمک آکروزین (پروتئازی که پس از معکوس شدن غشاء داخلی آکروزوم روی غشاء قرار می‌گیرد) باز می‌نماید (شکل 8-3).

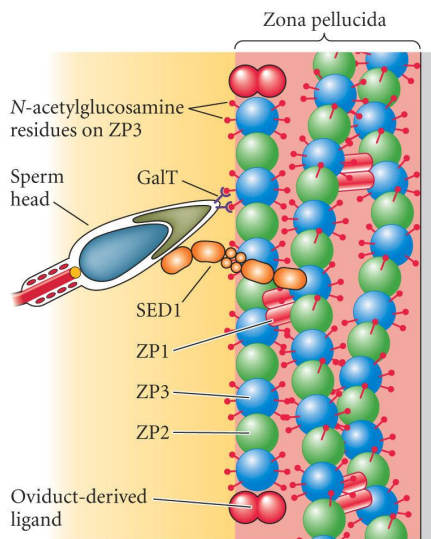


شکل 6-3) نمایی شماتیک از واکنش آکروزومی در اسپرم هامستر. A، سر اسپرم قبل از واکنش آکروزومی که یک غشاء دست نخورده آکروزومی را نشان می‌دهد. B، سر اسپرم در طی واکنش آکروزومی که وزیکوله شدن غشاء خارجی آکروزوم را که منجر به آزاد شدن محتویات آکروزوم می‌گردد نشان می‌دهد. C، سر اسپرم بعد از واکنش آکروزومی که نشان می‌دهد غشاء پلاسمایی ناحیه قدامی اسپرم از غشاء داخلی آکروزوم مشتق می‌شود.



شکل 3-7) نمایی شماتیک از مراحل ورود مماسی اسپرم بداخل تخم هامستر.

منطقه شفاف یک نقش مهم در جلوگیری از لقاح بین گونه‌ای در پستانداران بازی می‌کند. برای مثال، اگر اسپرمی که فرآیند ظرفیت‌پذیری را طی کرده در مجاورت تخم سایر گونه‌ها قرار می‌گیرد لقاح اتفاق نمی‌افتد مگر اینکه منطقه شفاف تخم از روی آن برداشته شده باشد. این آزمایش پیشنهاد می‌کند که اتصال اسپرم-تخم ممکن است با میانجی‌گری گیرنده‌های اسپرمی خاص گونه‌ای موجود در منطقه شفاف انجام گیرد. منطقه شفاف تخم موش حاوی سه گلیکوپروتئین بنامهای ZP1، ZP2 و ZP3 است (شکل 3-8). قبل از اتصال قوی و خاص -گونه‌ای اسپرم و تخمک یک اتصال اولیه ایجاد می‌شود. به این ترتیب که یک پروتئین 250 کیلودالتونی اسپرم به پروتئینی که بوسیله لوله رحمی بر سطح تخمک ترشح شده (این ترکیب مربوط به خود تخمک نیست) متصل می‌شود. سپس اسپرم از طریق پروتئین دومی که بنام SED1 شناخته می‌شود به مجموعه گلیکوپروتئینی منطقه شفاف می‌چسبد. این پروتئین بر روی ناحیه‌ای از غشاء که مستقیماً آکروزوم را می‌پوشاند قرار گرفته و صرفاً به منطقه شفاف تخمک لقاح نیافته (و نه لقاح یافته) متصل می‌شود. در مرحله نهایی پروتئین سومی از غشاء اسپرم که نوعی گالاکتوزیل ترنسفراز است و واحدهای N-استیل گلوکز آمین را شناسایی می‌کند به بخش کربوهیدراتی ZP3 (گلیکوپروتئین اصلی گیرنده اسپرمی) اتصال برقرار می‌کند. قابلیت ZP3 برای اتصال به اسپرم ناشی از زنجیره‌های قندی آن است. ایجاد این اتصال است که سبب القاء واکنش آکروزومی (پاره شدن کلاهک آکروزومی سر اسپرم) می‌گردد، بدین ترتیب که این اتصال پروتئین‌های G خاصی را غشاء اسپرم فعال می‌کند و این پروتئین‌ها سبب باز شدن کانالهای کلسیمی غشاء شده و اگرزوسیتوز کلاهک آکروزومی با واسطه یون کلسیم رخ می‌دهد. در حالیکه عمل ZP3 بعنوان یک گیرنده اسپرمی با میانجی زنجیره‌های قندی آن انجام می‌گیرد. قابلیت ZP-3 برای شروع واکنش آکروزومی ناشی از بخش پروتئینی آن می‌باشد.

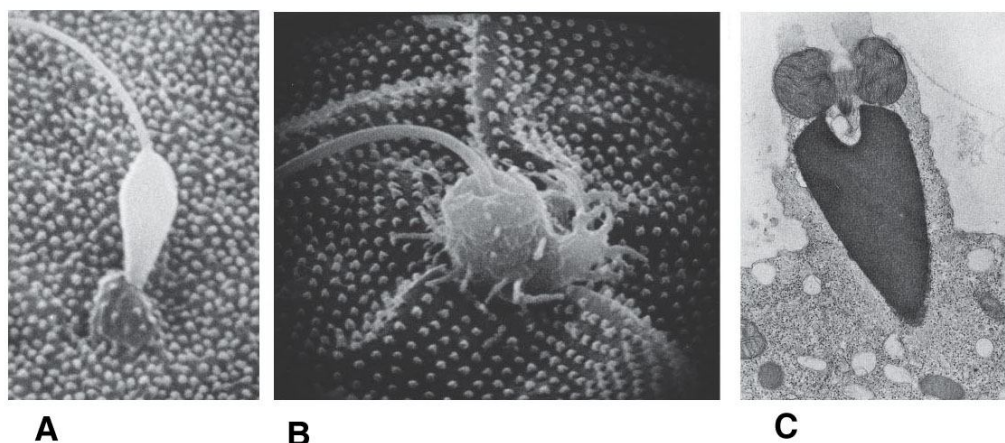


شکل 3-8) اتصال اسپرم به گلیکوپروتئین‌های منطقه شفاف تخمک.

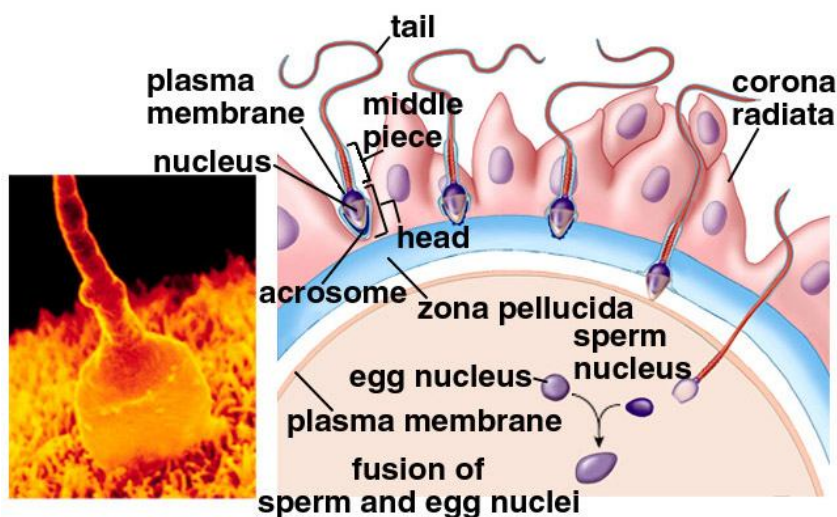
3-3) اتحاد اسپرم و تخم

به محض اینکه اسپرم بداخل لایه‌های خارج سلولی تخم نفوذ کرد غشاء پلاسمایی آن با غشاء پلاسمایی تخم ملحق می‌شود. در پستانداران فرآیند لقاح در ناحیه استوایی سر اسپرم بلافاصله پشت ناحیه‌ای از غشاء که از آکروزوم منشاء می‌گیرد آغاز می‌گردد. فرآیند لقاح باعث می‌شود که غشاء تخم و غشاء اسپرم در امتداد هم قرار گرفته و یک پل سیتوپلاسمی را تشکیل دهند. این پل بتدریج وسیع شده و سرانجام به هسته اسپرم امکان می‌دهد به سیتوپلاسم تخم وارد شود. معمولاً کل اسپرم از جمله هسته، سانتریولها، میتوکندریها و حتی آکسونم تاژک به سیتوپلاسم تخم وارد می‌شوند. غشاء پلاسمایی اولیه اسپرم نیز حفظ می‌شود و بخشی از غشاء پلاسمایی تخم می‌گردد.

بعد از اینکه اسپرم به تخم ملحق شد یک برآمدگی از سیتوپلاسم تخم بنام **مخروط لقاح** (fertilization cone) در اطراف سر اسپرم در حال دخول شکل می‌گیرد. مخروط لقاح سرانجام کل اسپرم را می‌بلعد (شکل 3-9). میکروفیلانتهایی که در مخروط لقاح وجود دارند مسئول کشیده شدن اسپرم بداخل تخم می‌باشند. این موضوع بوسیله آزمایشاتی که در آن از سیتوکالازین B (یک مهار کننده تشکیل فیلامنت) استفاده گردیده نشان داده شده است. اگر تخم‌ها در هنگام لقاح با سیتوکالازین B تیمار شوند فرآیند تشکیل مخروط لقاح و بداخل کشیده شدن اسپرم مهار می‌شود. شکل 3-10 چگونگی وقایع نفوذ اسپرم و اتحاد اسپرم و تخم را در پستانداران بطور خلاصه نشان داده است. در اولین مرحله اسپرم به تخم نزدیک می‌شود. سپس واکنش آکروزومی بوسیله تماس با منطقه شفاف تخم القاء شده و اسپرم با کمک فعالیت آنزیمهای آکروزومی و حرکات دم خود به غشاء پلاسمایی تخمک تماس برقرار می‌کند و غشاء پلاسمایی در غشاء تخمک ادغام می‌شود. با کمک مخروط لقاح هسته اسپرم به درون سیتوپلاسم تخم کشیده می‌شود و سرانجام در کنار هسته تخمک قرار می‌گیرد.



شکل 9-3) چگونگی تشکیل مخروط لقاح در جریان برخورد اسپرم با تخمک



شکل 10-3) مراحل نفوذ اسپرم به تخمک

3-4) پاسخ به لقاح: وقایعی که بدنبال اتحاد اسپرم-تخم اتفاق می افتد

طی لقاح، در زیگوت یکسری وقایع شروع می شود که بنام برنامه فعال شدن (activation program) نامیده می شود. برنامه فعال شدن خود به پاسخهای ابتدایی (early responses) و پاسخهای انتهایی (late responses) تقسیم می شود. پاسخهای ابتدایی در طول چند دقیقه بعد از لقاح اتفاق می افتد در حالیکه پاسخهای انتهایی بعد از کامل شدن پاسخهای اولیه بوقوع می پیوندد. در ابتدا ما پاسخهای ابتدایی لقاح را مورد بررسی قرار می دهیم که عملشان در نهایت جلوگیری از پلی اسپرمی است. سپس در مورد پاسخهای انتهایی بحث خواهد شد که مستقیماً به تشکیل جنین منجر خواهند شد.

جلوگیری از پلی اسپرمی

اگرچه تعداد زیادی اسپرم می توانند بداخل پوششهای خارج سلولی نفوذ کنند ولی معمولاً فقط یکی از آنها موفق به لقاح تخم می شود. اتحاد اسپرم با تخم یک رویداد اساسی در رشد و نمو است که باعث می شود اطلاعات ژنتیکی مادری و

پدری بطور مساوی با هم ترکیب و دوباره شرایط دیپلوئیدی بر سلول حاکم گردد. اگر بطور غیرطبیعی بیش از یک اسپرم وارد تخم شود به این حالت پلی اسپرمی گفته می شود. ورود چندین اسپرم بداخل تخم می تواند به پلی پلوئیدی، بروز اختلالات در جدایی کروموزومها طی تقسیم سلولی و سرانجام مرگ جنین بیانجامد. بنابراین تعجب انگیز نخواهد بود که موجودات زنده دارای مکانیسمهای بسیار دقیقی برای جلوگیری از پلی اسپرمی باشند.

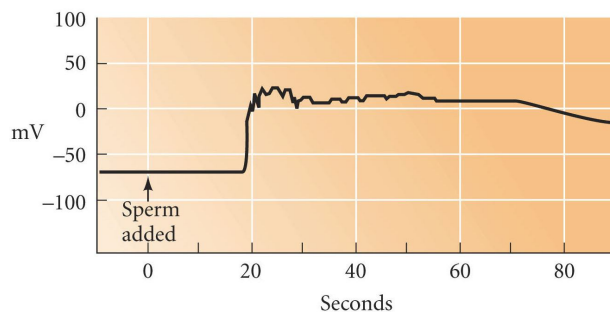
سه استراتژی متفاوت برای جلوگیری از پلی اسپرمی شناسایی شده است. اولین استراتژی محدود کردن تعداد اسپرمهایی است که به تخم می رسند. ما نشان دادیم که در تخم ماهیها اینکار از طریق محدود کردن راههای ورودی صورت می گیرد بدین طریق که اسپرمها فقط می توانند از طریق میکروپیل به تخم برسند. اگر کوریون برداشته شود اسپرمهای زیادی وارد تخم شده و جنین پلی اسپرمی می میرد. دومین استراتژی تعداد اسپرمهایی است که می توانند بداخل پوشش های خارج سلولی تخم نفوذ کرده و با غشاء پلاسمایی تخم ملحق شوند. در توتیای دریایی و پستانداران این استراتژی تکامل فوق العاده ای پیدا نموده است. در پستانداران تعداد اسپرمهایی که به محل لقاح میرسند بواسطه لزوم مهاجرت از دستگاه تناسلی ماده به حداقل می رسند ولی علاوه بر آن یک عامل ضد پلی اسپرمی دیگر (منطقه شفاف) نیز وجود دارد. سومین استراتژی در شرایطی وارد عمل می شود که تعداد زیادی اسپرم وارد تخم می شوند و هدف آن محدود کردن تعداد هسته های اسپرم است که می توانند با هسته تخم ترکیب شوند. این استراتژی در حیوانات با پلی اسپرمی فیزیولوژیکی (physiological polyspermy) که در آنها معمولاً چند اسپرم وارد تخم می شوند اتفاق می افتد. برای مثال در سمندر حدود 20 اسپرم وارد تخم می شوند. اگرچه هسته هر اسپرم به یک پرونوکلئوس نر تبدیل و یک استر اسپرمی ایجاد می کند ولی فقط یکی از پرونوکلئوس های نر با پرونوکلئوس ماده ترکیب و هسته زیگوت را بوجود می آورد. سایر پرونوکلئوس های نر قبل از اولین تسهیم در سیتوپلاسم تخم تحلیل می روند.

در اینجا ما دومین استراتژی جلوگیری از پلی اسپرمی یعنی "جلوگیری از ورود چندین اسپرم به سطح تخم" را با جزئیات بیشتر مورد بررسی قرار خواهیم داد. تخم توتیای دریایی و بسیاری از بی مهرگان دریایی دیگر دو سد متوالی را برای ممانعت از پلی اسپرمی بنمایش می گذارند که عبارتند از یک سد موقتی یا سد سریع ضد پلی اسپرمی که طی سه ثانیه بعد از تماس اسپرم اتفاق می افتد و دیگری سد دائمی یا سد آهسته ضد پلی اسپرمی که حدوداً یک دقیقه بعد از لقاح بوقوع می پیوندد.

سد سریع ضد پلی اسپرمی

این سد بواسطه دپولاریزه شدن الکتریکی غشاء پلاسمایی تخم که بنام پتانسیل لقاح (fertilization potential) خوانده می شود ایجاد می گردد. پتانسیل لقاح طی چند ثانیه بعد از تماس اولین اسپرم با سطح تخم اتفاق می افتد و بطور موقت ولتاژ دو سوی غشاء را از 70- میلی ولت به حدود 10+ میلی ولت تغییر می دهد (شکل 11-3). دپولاریزاسیون ابتدایی از ورود یون کلسیم بداخل سلول ناشی می شود و ولتاژ مثبت بوسیله افزایش آهسته موقتی نفوذپذیری غشاء تخم به یون سدیم حفظ می شود. آزمایشات زیر تایید می کند که پتانسیل لقاح از ورود اسپرم زیادی بداخل تخم ممانعت بعمل

می‌آورد. اول اینکه، وقتی پتانسیل غشاء بطور آزمایشی با وارد کردن یک جریان مثبت به تخم لقاح نیافته به سطح قابل مقایسه با پتانسیل لقاح افزایش می‌یابد این حالت مانع از لقاح می‌گردد. دوم اینکه، وقتی پتانسیل غشاء تخم لقاح یافته با پایین آوردن غلظت یون سدیم خارج سلولی در سطح منفی نگهداشته می‌شود ملاحظه می‌گردد که چندین اسپرم می‌توانند وارد تخم شوند.



شکل 11-3) پتانسیل تخمک توتیای دریایی قبل و بعد از تماس اولین اسپرم به غشاء تخمک.

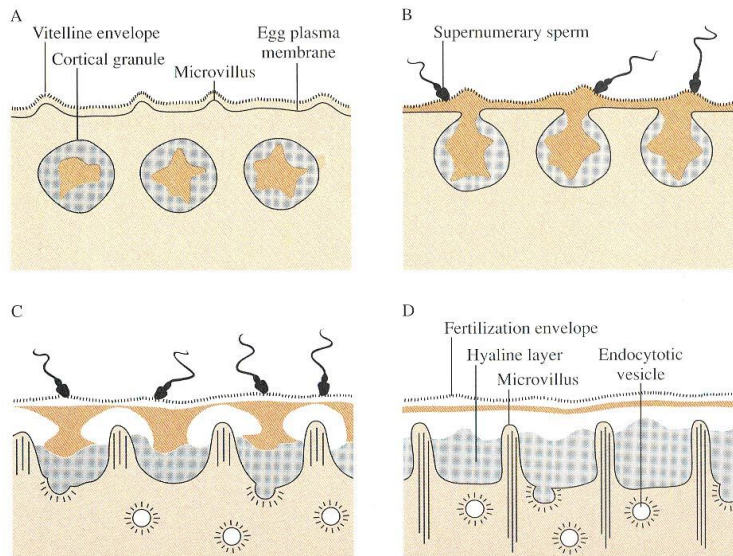
چگونه پتانسیل لقاح از ورود اسپرمهای اضافی بداخل تخم جلوگیری می‌کند؟ دو مدل برای توضیح این پدیده ارائه شده است. اول: غشاء پلاسمایی تخم ممکن است حاوی یک گیرنده اسپرمی باشد که فقط در شرایطی که پتانسیل غشاء منفی است می‌تواند با اسپرم برهم کنش کند. دوم: اسپرم در حال لقاح ممکن است یک پروتئین حساس به ولتاژ به غشاء پلاسمایی تخم وارد کند که فرآیند الحاق اسپرم-تخم را ارتقاء ببخشد. این فرضیه‌ها بوسیله آزمایشاتی روی گونه های توتیای دریایی تست گردیده است. این آزمایشات از این عقیده حمایت می‌کند که اسپرم احتمالاً یک پروتئین با بار مثبت به داخل غشاء پلاسمایی تخم وارد می‌کند که موجب تسریع و ارتقاء فرایند الحاق اسپرم-تخم و ایجاد پتانسیل لقاح می‌شود. به محض اینکه غشاء تخم بار مثبت پیدا کرد وارد شدن یک پروتئین دیگر بداخل غشاء توسط سایر اسپرمها غیر ممکن خواهد شد. بر خلاف توتیای دریایی، در پستانداران سد الکتریکی ضد پلی اسپرمی وجود ندارد، در عوض سد پلی اسپرمی در این جانوران شامل تغییرات ساختمانی است که در منطقه شفاف بوقوع می‌پیوندد.

سد آهسته ضد پلی اسپرمی

سد سریع ضد پلی اسپرمی یک پاسخ موقتی برای ممانعت از ورود چند اسپرم به تخم می‌باشد. سرانجام، پتانسیل لقاح به حالت منفی خود بر می‌گردد و از اینرو بایستی از سایر امکانات استفاده شود تا از ورود تعداد بیشماری اسپرم که در سطح تخم تجمع پیدا کرده‌اند و آماده ورود به آن هستند ممانعت بعمل آید. اینکار بوسیله سد آهسته ضد پلی اسپرمی به انجام می‌رسد.

سد آهسته ضد پلی اسپرمی بواسطه واکنش قشری (cortical reaction) ایجاد می‌شود. اصطلاح واکنش قشری اولین بار برای تغییراتی بکار برده شد که در خصوصیات نوری سطح تخم اتفاق می‌افتد. این تغییرات بصورت موجی که بنام موج لقاح (fertilization wave) مشهور است اطراف سطح تخم را جاروب می‌کند. ما اکنون می‌دانیم که این تغییر موجی ناشی از اگزوسیتوز گرانولهای قشری است که در هنگام لقاح اتفاق می‌افتد و در اثر الحاق غشاء آنها با غشاء

پلاسمایی محتویات این گرانولها بداخل فضای دور زرده‌ای (perivitelline space) آزاد می‌گردد. فضای دور زرده‌ای ناحیه‌ای است که بین غشاء پلاسمایی تخم و پاکت زرده‌ای قرار می‌گیرد. واکنش قشری دقیقاً در نقطه اتحاد اسپرم-تخم شروع شده و در مدت کمتر از یک دقیقه در تمام اطراف سطح تخم گسترش می‌یابد. چگونگی اگزوسیتوز گرانولهای قشری در شکل 12-3 نشان داده شده است.

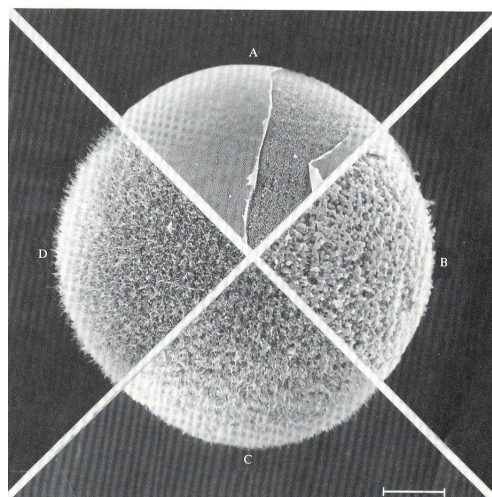


شکل 12-3) دی‌گرامی از واکنش قشری و بلند شدن پاکت زرده‌ای در تخم توتیای دریایی. A، تخم لقاح نیافته با دانه‌های قشری دست نخورده، پاکت زرده‌ای نازک و غشاء پلاسمایی با میکروویلی‌های کوچک. B، اگزوسیتوز گرانولهای قشری و آغاز بلند شدن غشاء لقاح در یک تخم بتازگی لقاح پیدا کرده. C، کامل شدن اگزوسیتوز دانه‌های قشری که بلند شدن غشاء لقاح را با اسپرمهای چسبیده اضافی نشان می‌دهد. D، یک زیگوت لقاح یافته که غشاء لقاح بلند شده و میکروویلی‌های طولیل شده و لایه شفاف را نشان می‌دهد. غشاء پلاسمایی در حال بازسازی شدن توسط اندوسیتوز است.

در حالیکه سد سریع ضد پلی‌اسپرمی یک رویداد الکتریکی است، سد آهسته یک فرآیند مکانیکی است. همچنانکه گرانولهای قشری دچار اگزوسیتوز می‌شوند محتویات آنها که شامل پروتئینهای هیدراته و موکوپلی‌ساکاریدها است فضای دور زرده‌ای را پر کرده و سبب می‌شوند که غشاء دور زرده‌ای از سطح تخم بلند شود (شکل 12-3C). در نتیجه از این به بعد به پاکت زرده‌ای بلند شده پاکت لقاح (fertilization envelope) گفته می‌شود. واکنش قشری از ایجاد پلی‌اسپرمی به سه طریق جلوگیری می‌کند. اول: بلند شدن پاکت لقاح فاصله بین غشاء پلاسمایی تخم و اسپرمهای اضافی را که به پاکت زرده‌ای چسبیده‌اند زیاد می‌کند (شکل 12-3B). دوم: گرانولهای قشری پراکسید هیدروژن و پراکسیداز آزاد می‌کنند و این دو گلیکوپروتئینهای موجود در پاکت زرده‌ای را بهم متصل کرده و آنرا به یک لایه سختی تبدیل می‌کنند که نسبت به پروتئینهای اسپرمی مقاوم است (شکل 12-3B). سوم: گرانولهای قشری پروتئینهای آزاد می‌کنند که گیرنده‌های گلیکوپروتئینی اسپرمی موجود بر روی پاکت زرده‌ای را تجزیه و نابود می‌کنند و سبب می‌گردند که اسپرمهای چسبیده اضافی از پاکت زرده‌ای جدا شده و اسپرمهای دیگر نیز نتوانند به آن متصل شوند.

مساحت سطح تخم در طی واکنش قشری شدیداً افزایش می‌یابد زیرا غشاء گرانولهای قشری به غشاء پلاسمایی تخم ملحق می‌شوند (رجوع به شکل 12-3B-C). غشاء اضافی با چین خوردن غشاء پلاسمایی تخم و تشکیل هزاران میکروویلی در اطراف تخم جا داده می‌شود (شکل 12-3). این غشاء اضافی بعداً توسط اندوسیتوز از سطح تخم برداشته

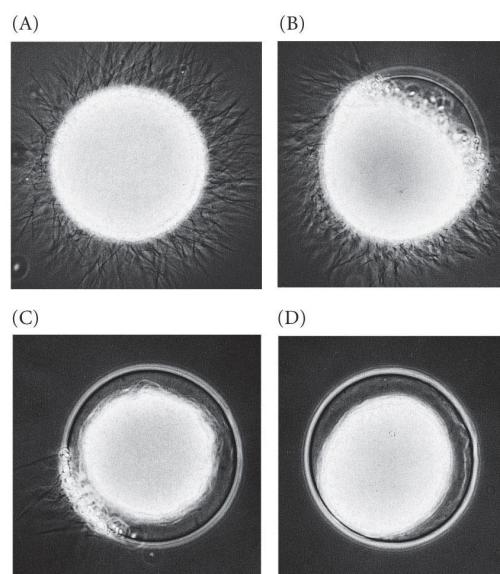
می‌شود. مقداری از محتویات گرانولهای قشری در لایه دور زرده‌ای باقی مانده و بصورت لایه شفاف (hyaline layer) پلی‌مریزه می‌شوند (شکل 12D-3). لایه شفاف سبب نگهداشته شدن بلاستومرها در کنار هم شده و همچنین در تغییرات شکل زایی جنین در حال نمو شرکت می‌کند.



شکل 13-3) یک تصویر ترکیبی با میکروسکوپ الکترونی تکاره از سطح تخم توتیای دریایی در مراحل مختلف قبل و بعد از لقاح. A، قبل از لقاح، بخش از غشاء در اثر پاره شدن پاکت هسته‌ای دیده می‌شود، در این مرحله غشاء پلاسمایی توسط میکروویلی‌های ریزی چین می‌خورد. B، یک دقیقه بعد از لقاح، سطح تخم بدلیل خارج شدن محتویات دانه‌های قشری بشکل دانه‌دار دیده می‌شود. C، پنج دقیقه بعد از لقاح، متعاقب برداشته مواد تشکیل دهنده لایه شفاف. در این مرحله غشاء پلاسمایی دارای میکروویلی‌های بلندی است. D، سیزده دقیقه بعد از لقاح، وجود میکروویلی‌های بلند، سطح غشاء کرکی شکل نموده است.

سد آهسته پلی‌اسپرمی موجود در توتیای دریایی دارای همتایی در پستانداران و سایر موجوداتی است که تخم آنها حاوی گرانولهای قشری است. گرانولهای قشری در تخم موش حاوی آنزیمهای هیدرولیتیک است که در طی واکنش قشری بداخل فضای دور زرده‌ای آزاد می‌شوند. متعاقباً منطقه شفاف سخت شده و نسبت به نفوذ اسپرم خاصیت دافعه پیدا کرده و گیرنده‌های اسپرمی آن غیرفعال می‌گردند. به این تغییرات منطقه شفاف واکنش زونا (zona reaction) گفته می‌شود. واکنش زونا ممکن است یک تغییر شیمیایی در ZP3 را بدنبال داشته باشد. بعد از الحاق اسپرم-تخم ZP3 دیگر بعنوان گیرنده اسپرمی عمل نمی‌کند و نمی‌تواند واکنش آکروزومی را القاء نماید. اما ZP3 بوسیله پروتئاز غیرفعال نمی‌شود، در عوض احتمالاً در نتیجه هیدرولیز گروههای قندی آن توسط گلیکوزیدازهای آزاد شده از گرانولهای قشری تغییر شکل می‌دهد. مکانیسم سخت شدن منطقه شفاف ناشناخته است اما بنظر نمی‌رسد که اتصالات متقابل گلیکوپروتئینها در ایجاد آن دخالت داشته باشند.

خلاصه اینکه ایجاد غشاء لقاح که در نتیجه اگزوسیتوز وزیکولهای قشری (واکنش قشری) صورت می‌گیرد سبب ایجاد یک سد دائمی در اطراف تخم لقاح یافته شده و این سد سبب دفع و حذف اسپرم‌های دیگر از اطراف تخم می‌گردد (شکل 14-3).



شکل 14-3) شکل گیری غشاء لقاح و حذف اسپرم‌های اضافی. برای تصویر برداری از این حالت در توتیای دریایی، اسپرم‌ها به تخمک اضافه شد. سپس سوسپانسیون برای جلوگیری از پیشرفت واکنش در فرمالدئید تثبیت شد. (A) 10 ثانیه بعد از اضافه نمودن، اسپرم‌ها تخمک را احاطه کرده اند. (B) 25 ثانیه بعد از اضافه نمودن، تشکیل غشاء لقاح از نقطه ورود اسپرم شروع می‌شود. (C) در 35 ثانیه این غشاء تقریباً در سراسر تخمک تشکیل شده و در D این پوشش کامل شده است.

کنترل واکنش قشری

تخم‌های لقاح نیافته توتیای دریایی حاوی ذخیره‌ای از یون کلسیم محبوس شده در شبکه اندوپلاسمیک واقع در ناحیه قشری سیتوپلاسم هستند. در طی الحاق اسپرم-تخم کلسیم حبس شده در این اندامک آزاد شده و در نتیجه میزان کلسیم آزاد داخل سلولی به مقدار زیادی افزایش می‌یابد. این افزایش بارز در کلسیم سیتوپلاسمی نباید با جریان نسبتاً اندک کلسیم که باعث شروع پتانسیل لقاح می‌شود اشتباه گردد. این جریان نسبتاً اندک کلسیم از خارج تخم منشأ می‌گیرد در حالیکه افزایش بارز کلسیم در مرحله واکنش قشری نتیجه‌ای از تغییراتی است که در محل قرارگیری کلسیم داخل سلولی بوجود می‌آید.

نقش مهم کلسیم در تحریک واکنش قشری با آزمایشات متعددی نشان داده شده است. اول، تخم‌های توتیای دریایی که با یونوفور A23187 تیمار می‌شوند یا کلسیم بداخل آنها تزریق می‌شود حتی در فقدان لقاح دچار واکنش قشری می‌شوند. دوم، هنگامیکه EGTA (یک چنگ زننده کلسیم) بداخل تخم توتیای دریایی تزریق می‌شود تخم‌ها بعد از لقاح قادر به انجام واکنش قشری نخواهند بود. سوم، اگر ناحیه قشری تخم‌ها را جدا و سپس آنها را به یک لام شیشه‌ای طوری بچسبانیم که گرانولهای قشری آنها رو به بالا قرار گیرند و بعد یون کلسیم به آنها اضافه کنیم می‌بینیم که در این شرایط غشاء گرانولهای قشری به غشاء پلاسمایی تخم ملحق می‌شود. چهارم، این امکان وجود دارد که میزان کلسیم داخل سلولی را بطور مستقیم با تزریق آکورین (aequorin) اندازه‌گیری نماییم. آکورین یک پروتئین نورزا است که از ژله ماهی بدست می‌آید و برای تولید نور شدیداً به کلسیم وابسته است. وقتی سطح یون کلسیم آزاد بالا باشد آکورین نورزایی می‌کند اما وقتی سطح این یون پایین است هیچ نوری توسط این پروتئین تولید نمی‌شود. اولین آزمایشات تزریق

آکورین بر روی تخم‌های توتیای دریایی و ماهی مداکا (medaka) که دارای تخم‌های بزرگ و روشن است انجام گرفت. در مداکا الحاق اسپرم-تخم و واکنش قشری در یک ناحیه قابل پیش‌بینی سطح تخم اتفاق می‌افتد (ناحیه‌ای که بلافاصله زیر میکروپیل قرار دارد). هنگامیکه تخم‌هایی که قبلاً آکورین به آنها تزریق شده لقاح پیدا می‌کنند اولین نشانه نورزایی دقیقاً در محل لقاح ظاهر می‌شود و سپس این نور بصورت موجی تمام سطح تخم را در بر می‌گیرد. سرعت انتشار نور با سرعت اگزوسیتوز گرانولهای قشری برابر است و این پیشنهاد می‌کند که ارتباطی بین این دو فرآیند وجود دارد. از اینرو همزمان با واکنش قشری آزاد شدن یون کلسیم داخل سلولی یا موج کلسیمی (calcium wave) نیز اتفاق می‌افتد.

بطور خلاصه، لقاح شامل زنجیره‌ای از الحاق غشاءها است که هر یک از آنها بوسیله افزایش بارزی در کلسیم بانجام می‌رسد. اولین الحاق طی واکنش آکروزومی بین غشاء پلاسمایی اسپرم و غشاء آکروزوم اتفاق می‌افتد. این الحاق با ورود یون کلسیم بداخل اسپرم به انجام می‌رسد. اتحاد اسپرم-تخم با افزایش بارزی در یون کلسیم همراه است که این افزایش از ذخایر داخل سلولی تامین می‌شود. این افزایش خود باعث وقوع عمل الحاق سوم می‌شود و آن الحاق غشاء گرانول قشری با غشاء پلاسمایی تخم می‌باشد. در صفحات بعدی در همین فصل خواهیم دید که بالا رفتن کلسیم آزاد در تخم همچنین سبب تحریک وقایعی می‌شود که منجر به شروع رشد و نمو جنینی می‌گردند.

اتحاد هسته‌های اسپرم و تخم

اتحاد اسپرم و تخم تنها آغاز لقاح است. این فرآیند در سیتوپلاسم تخم و موقعی که هسته‌های اسپرم و تخم با هم ترکیب شده و هسته دیپلوئید زیگوت یا سین‌کاریون (synkaryon) را تشکیل می‌دهند کامل می‌شود. سین‌کاریون بلافاصله بعد از لقاح تشکیل نمی‌شود و این مثالی از پاسخ انتهایی به لقاح است که بین 10 تا 20 دقیقه بعد از اتصال اسپرم کامل می‌شود. قبل از اینکه هسته اسپرم قادر به تشکیل سین‌کاریون باشد لازم است اسپرم یک دوره رسیدگی را در سیتوپلاسم تخم طی کند و آن شامل معکوس شدن سریع مراحل است که طی اسپرمیوژن سبب تغییر طرح هسته اسپرم شده است.

همچنانکه قبلاً ذکر شد تخم‌های توتیای دریایی در زمان لقاح هر دو تقسیم خود را کامل کرده و بصورت اووتید متوقف شده‌اند. بعد از تقسیم میوز نهایی هسته هاپلوئید تخم تجدید سازمان می‌یابد و اکنون بعنوان پیش‌هسته یا پرونوکلئوس ماده (female pronucleus) شناخته می‌شود. به محض اینکه هسته اسپرم وارد تخم شد و دوره رسیدگی خود را شروع می‌کند بعنوان پرونوکلئوس نر (male pronucleus) خوانده می‌شود. وقایعی که طی آن هسته اسپرم اولیه به پرونوکلئوس نر تبدیل می‌شود بسیار پیچیده است و در بین گونه‌های مختلف فرق می‌کند. این تبدیل شامل سه مرحله می‌باشد: شکسته شدن پاکت هسته‌ای، کاسته شدن از تراکم و فشردگی کروماتین و تشکیل پاکت هسته‌ای پرونوکلئوس نر. ما در این قسمت جزئیات این مراحل را در تخم توتیای دریایی مورد بحث قرار خواهیم داد.

در توتیا هسته اسپرم ابتدا بداخل مخروط لقاح وارد می‌شود. بزودی پس از ورود به سیتوپلاسم تخم هسته اسپرم متورم شده و پاکت هسته‌ای آن قطعه قطعه شده و بشکل وزیکولهایی در اطراف کروماتین اسپرم که در حال از دست دادن تراکم خود می‌باشد قرار می‌گیرد. این وزیکولها نهایتاً در داخل اندامکهای غشایی سیتوپلاسم تخم از نظر محو

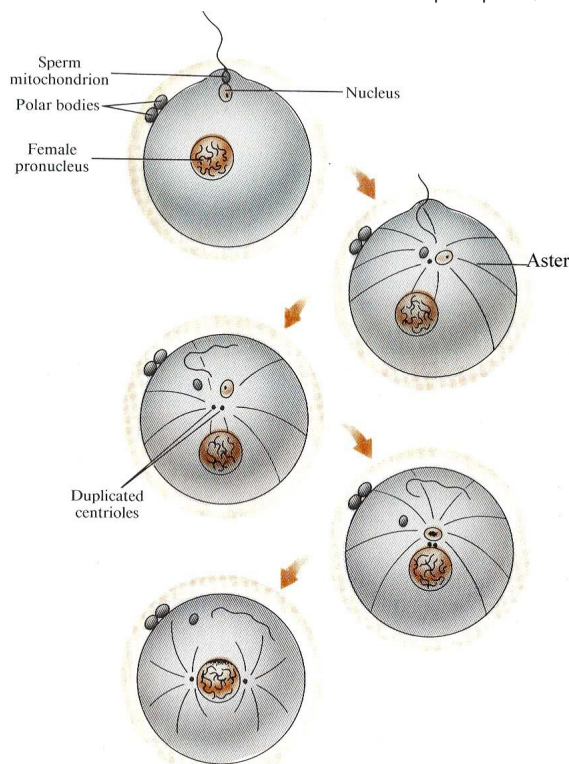
می‌شوند. در بخش‌هایی از ناحیه خلفی پاکت هسته‌ای اسپرم عمل وزیکوله و پراکنده شدن اتفاق نمی‌افتد. این بخش‌ها دست نخورده باقی مانده و بعداً داخل پاکت هسته‌ای جدیدی که در اطراف پرونوکلئوس نر ایجاد می‌شود قرار می‌گیرند. اهمیت این بخش باقیمانده پاکت هسته‌ای هنوز شناخته نشده است.

فرآیند کاهش تراکم کروماتین از ناحیه محیطی هسته اسپرم شروع شده و بطرف مرکز هسته پیشروی می‌کند. این فرآیند با از دست رفتن هیستون H1 اسپرم و جایگزینی آن با گونه جدیدی از هیستون H1 که از سیتوپلاسم تخم منشاء می‌گیرد بانجام می‌رسد. همچنانکه در بخش 2-3 توصیف شد، هنگامیکه اسپرم با پوشش تخم تماس برقرار می‌کند میزان cAMP آن به میزان زیادی افزایش پیدا می‌کند. تولید cAMP، فسفوکیناز وابسته به cAMP را فعال می‌کند و فسفوکیناز آنزیمی است که فسفوریلاسیون هیستون H1 اسپرمی را شروع می‌کند. این عمل همچنانکه اسپرم بداخل گلیکوکالیکس تخم وارد می‌شود ادامه پیدا کرده و اتصال هیستون H1 اسپرمی را به کروماتین سست می‌کند. گونه‌های جدید هیستون H1 ممکن است سازمان فضایی کروماتین را تغییر داده و این تغییر برای تشکیل پرونوکلئوس نر لازم است. همچنانکه فرآیند کاهش تراکم کروماتین کامل می‌شود وزیکولهای غشایی در اطراف کروماتین اسپرم تجمع پیدا کرده و سپس بهم متصل شده و در نهایت پاکت هسته‌ای پرونوکلئوس نر را بوجود می‌آورند.

در هنگام کامل شدن میوز پرونوکلئوس ماده در ناحیه مرکزی تخم قرار دارد در حالیکه پرونوکلئوس نر در ناحیه قشری تخم و نزدیک به محل ورود اسپرم تشکیل می‌شود. قبل از الحاق پرونوکلئوس‌ها آنها بایستی مسافت قابل ملاحظه‌ای را در سیتوپلاسم طی کنند تا بهم برسند. در توتیای دریایی این حرکت با میانجی‌گری آستر اسپرمی (sperm aster) بانجام می‌رسد که کمپلکسی از میکروتوبولهای بلند است که از سانتیوبولهای زوج اسپرم بطرف خارج امتداد می‌یابند. این سانتیوبولها به همراه هسته اسپرم وارد تخم شده و بعنوان بخشی از مرکز سازمان‌دهنده میکروتوبولی (MTOC) برای تشکیل آستر اسپرمی عمل می‌کند. میکروتوبولهای آستری بطرف ناحیه قشری تخم و در مجاورت غشاء پرونوکلئوس نر امتداد می‌یابند. حرکات پرونوکلئوس نر و ماده بعد از لقاح در شکل 3-15 خلاصه شده است. طی مهاجرت پرونوکلئوس نر میکروتوبولهای آستر اسپرمی طویل شده و چنین بنظر می‌رسد که پرونوکلئوس نر را بطرف مرکز تخم هل می‌دهند. سرانجام میکروتوبولهای آستری با پرونوکلئوس ماده تماس پیدا کرده و ظاهراً پرونوکلئوس ماده را بطور ناگهانی بطرف پرونوکلئوس نر می‌کشند. در نتیجه ادامه فعالیت آستر اسپرمی دو پرونوکلئوس تغییر مکان داده و در مرکز تخم (جایی که آنها با هم ترکیب شده و سین‌کاریون را تشکیل می‌دهند) قرار می‌گیرند. اگر در این مرحله به تخم کلشی‌سین یا سایر عوامل دپلی‌مریزه کننده میکروتوبولی تجویز شود ملاحظه خواهد شد که فرآیند مهاجرت پرونوکلئوس‌ها و اتحاد آنها مهار می‌گردد.

در بعضی از تخم‌های جانوران سین‌کاریون با الحاق پرونوکلئوس‌ها ایجاد نمی‌شود. برای مثال در پستانداران سین‌کاریون بوسیله همجاری (approximation) بوجود می‌آید. همجاری حالتی است که در آن پرونوکلئوس‌ها بطرف هم حرکت می‌کنند و در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند ولی با هم ترکیب نمی‌شوند. در اینجا پرونوکلئوس‌ها تا اولین تقسیم میتوزی تسهیم در کنار هم باقی می‌مانند. در موقع اولین تقسیم میتوزی پاکتهای هسته‌ای شکسته شده و کروموزومهای

مادری و پدری در صفحه متافازی با هم ترکیب می‌شوند. پستانداران و توتیای دریایی از نظر حرکات پرونوکلئوسها در تخم و استفاده آنها از MTOC اسپرم یا تخم برای تشکیل آستر با هم فرق می‌کنند. در زیگوت موش، آستر از تعداد زیادی MTOC که در اصل از سیتوپلاسم تخم منشاء می‌گیرند بوجود می‌آید.



شکل 3-15) دیاگرام حرکات پرونوکلئوسها در طی لقاح توتیای دریایی.

تغییری که طی تشکیل پرونوکلئوس در سیتوپلاسم تخم توتیای دریایی اتفاق می‌افتد توسط سیگنالهای یونی کنترل می‌شود. حدود یک دقیقه بعد از لقاح مقدار زیادی یون سدیم وارد تخم می‌شود. بر خلاف اولین هجوم یون سدیم که مسئول ایجاد پتانسیل لقاح است این هجوم سدیم بداخل تخم با خروج یون H^+ همراه است، بعبارتی این جابجایی از نظر الکتریکی بی‌اثر است. خروج H^+ (یا اسید لقاح) pH سیتوپلاسم تخم را از 6/8 به 7/3 بالا می‌برد. نقش افزایش pH در مهاجرت پرونوکلئوسها بطور تجربی با لقاح دادن تخمها در آب فاقد سدیم نشان داده شده است. این شرایط مانع از معاوضه Na^+/H^+ می‌گردد و در نتیجه پرونوکلئوس در ماده تشکیل نمی‌شود. این آزمایش پیشنهاد می‌کند که فرآیند مهاجرت پرونوکلئوسها بطور طبیعی بوسیله بالا رفتن pH داخل سلولی شروع می‌شود. در بخش بعدی فصل حاضر خواهیم دید که بالا رفتن pH در تخم توتیای دریایی همچنین اثرات مهمی روی شروع رشد و نمو جنینی دارد.

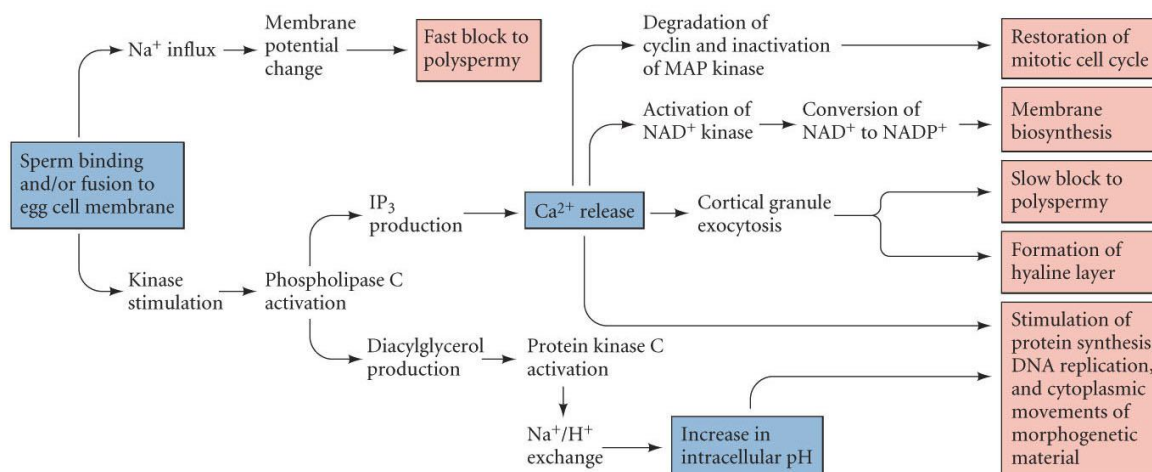
3-5) شروع تکوین جنین

همانطور که قبلاً نیز ذکر شد اتحاد اسپرم و تخم سبب شروع یکسری از وقایع مولکولی می‌گردد که مجموعاً بنام برنامه فعال شدن شناخته می‌شود. بعضی از این وقایع از جمله پاسنهای انتهایی به لقاح (رجوع به شکل 3-14) بطور مستقیم با

تشکیل جنین ارتباط دارد. این پاسخهای انتهایی شامل تغییرات متابولیک از جمله فعال شدن انتقال یون پتاسیم و اسید آمینه، افزایشی در نرخ سنتز پروتئین و شروع همانند سازی DNA به همراه وقایع تنظیم کننده مثل تولید اینوزیتول تری فسفات (IP3) و دی اسیل گلیسرول، آزاد شدن کلسیم سیتوپلاسمی و افزایش pH می باشد. در این بخش ما وقایع تنظیم کننده کلیدی را که در طی برنامه فعال شدن در توتیای دریایی اتفاق می افتد مورد بررسی قرار می دهیم. توصیف سایر پاسخهای انتهایی به لقاح، مثل فعال شدن سنتز DNA، RNA و پروتئین و تقسیم سلولی در فصول بعدی خواهد آمد.

تحقیقاتی که روی چگونگی فعال شدن رشد و نمو توتیا انجام گرفته سعی در پاسخ به سوالات زیر را داشته است. ارتباط بین هر یک از این وقایع که در طی برنامه فعال شدن اتفاق می افتد چیست؟ آیا این برنامه نمایش دهنده یک سری خطی از وقایع است یا معرف چندین مسیر موازی است؟ اگر مسیرهای موازی وجود دارد آنها از چه نقطه ای از هم منشعب می شوند؟ برای مثال، چون ایجاد پتانسیل لقاح یکی از اولین اتفاقات است این سوال مطرح می شود که آیا ایجاد این پتانسیل سبب تحریک وقایع بعدی می گردد یا خیر؟ پتانسیل لقاح را می توان بطور مصنوعی با وارد نمودن یک جریان مثبت به تخم لقاح نیافته ایجاد نمود لیکن این پتانسیل نمی تواند سبب بالا رفتن غلظت یون کلسیم و یا القاء شروع سایر وقایع برنامه فعال شدن شود. نتایج مذکور نشان می دهد که پتانسیل لقاح برای بالا رفتن یون کلسیم و واکنش قشری کافی نیست. بنابراین پتانسیل لقاح بخشی از یک مسیر موازی است که بعد از لقاح خاتمه یافته و بطور مستقیم در برنامه فعال شدن دخالت ندارد. بر خلاف پتانسیل لقاح بالا رفتن یون کلسیم سبب راه اندازی وقایع بعدی برنامه فعال شدن می گردد. تحریک آزاد شدن یون کلسیم توسط یونوفور A23187 واکنش قشری را ایجاد و سبب فعال شدن ناقص سنتز DNA و پروتئین در تخم لقاح نیافته می شود. با استفاده از چنین آزمایشاتی ارتباط بین وقایع مختلف در برنامه فعال شدن در حال تحقیق می باشد. نتایج مقدماتی این مطالعات در شکل 3-16 خلاصه شده است.

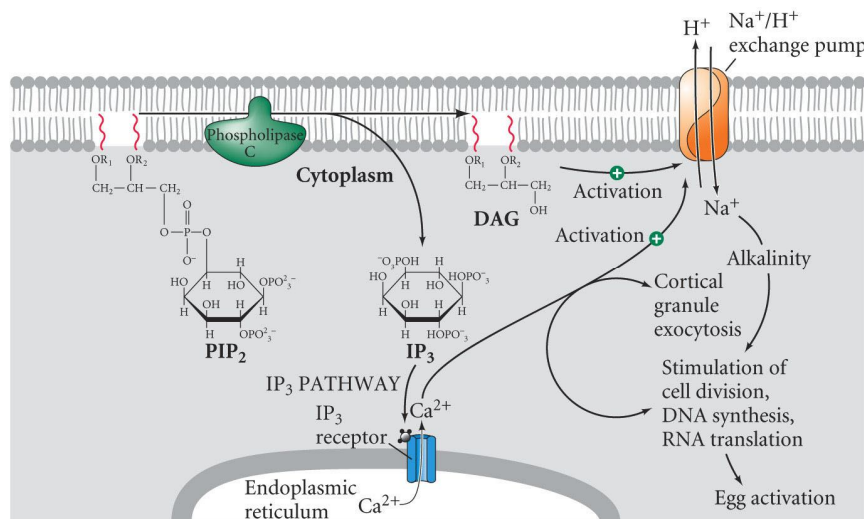
شکل 3-16 نشان می دهد که واکنش قشری و فعال شدن DNA کیناز فقط به بالا رفتن یون کلسیم وابسته اند اما سایر وقایع برنامه فعال شدن بوسیله ترکیبی از اثرات یون کلسیم و pH القاء می شود. نقش pH در فعال شدن سنتز پروتئین با آزمایشاتی که در آن تخم های لقاح نیافته توتیای دریایی با آمونیاک تیمار شدند نشان داده شد. هنگامی که آمونیاک به سیتوپلاسم وارد می شود با یون H^+ کمپلکسی را تشکیل می دهد ($NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$) که نتیجه آن بالا رفتن pH داخل سلولی می باشد. این تغییر منجر به تحریک سنتز DNA و پروتئین می شود. دو آزمایش دیگر انجام شده و در آنها نقش pH در برنامه فعال شدن را نشان می دهد. اول: چون تغییر pH به فرآیند معاوضه Na^+/H^+ وابسته است اگر Na^+ از محیط خارج سلولی برداشته شود این تغییر pH اتفاق نمی افتد. دوم: با قرار دادن تخم در آمیلورید (یک مهار کننده فرآیند معاوضه Na^+/H^+) نیز می توان از تغییر pH جلوگیری کرد. عاری کردن محیط خارج سلولی از Na^+ و یا تجویز آمیلورید قبل از بالا رفتن طبیعی pH سبب بلوکه شدن رشد و نمو می گردد. اما اگر این تیمارها بعد از بالا رفتن pH صورت گیرد تخم قادر به رشد و نمو و پشت سر گذراندن چندین تقسیم سلولی خواهد بود. این آزمایشات تایید می کند که بالا رفتن pH یکی دیگر از مراحل تنظیم کننده مهم در برنامه فعال شدن توتیای دریایی است.



شکل (3-16) ارتباط بین وقایع برنامه فعال شدن در توتیای دریایی.

چگونه اتحاد اسپرم و تخم هم سبب تغییر Ca^{2+} و هم pH می‌شود؟ مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند که هر دوی این تغییرات نتیجه‌ای از آبخاری از واکنشها است که در اثر شکسته شدن یک لیپید غشایی بنام فسفاتیدیل اینوزیتول بوجود می‌پوندد. این آبخار در سلولهای سوماتیک کشف شده بطوریکه با اتصال یک هورمون پلی‌پتیدی به سلول یکسری پیامهای داخل سلولی ایجاد می‌گردد. مسیر فرضی که طی اتصال اسپرم منجر به بالا رفتن pH و غلظت یون کلسیم می‌شود در شکل 3-17 نشان داده شده است. وقایع آغازین این آبخار در غشاء پلاسمایی تخم اتفاق می‌افتد. اتصال اسپرم یک پروتئینی را که در طرف داخلی غشاء پلاسمایی تخم قرار دارد و بنام پروتئین اتصال یابنده به GTP (G-پروتئین) معروف است فعال می‌کند. این پروتئین بنوبه خود سبب فعال شدن آنزیم فسفولیپاز C که در طرف داخلی غشاء پلاسمایی وجود دارد می‌گردد. این موضوع دقیقاً مشخص نیست که آیا اسپرم به یک گیرنده در غشاء پلاسمایی تخم متصل شده و آن G-پروتئین را فعال می‌کند یا اینکه اسپرم در هنگام الحاق با تخم یک فعال کننده G-پروتئینی بداخل غشاء تخم تزریق می‌کند. فسفولیپاز C سبب هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول به دی‌اسیل گلیسرول و IP_3 می‌شود. دی‌اسیل گلیسرول در غشاء تخم باقی مانده و در آنجا مسئولیت معاوضه Na^+/H^+ را به عهده می‌گیرد و موجب بالا رفتن pH می‌شود. بر عکس IP_3 از غشاء جدا و بداخل سیتوپلاسم انتشار می‌یابد و در آنجا به شبکه اندوپلاسمیک متصل و فرآیند آزادسازی یون کلسیم بداخل سیتوپلاسم را موجب می‌شود. نقش IP_3 در بالا رفتن غلظت یون کلسیم سیتوپلاسم با آزمایشات زیر تایید می‌شود. اول: نشان داده شده که افزایش موقتی در IP_3 یکی از اولین وقایعی است که طی برنامه فعال شدن اتفاق می‌افتد. دوم: تخم‌ها را می‌توان با تزریق IP_3 فعال نمود. بعلاوه، پیشنهاد شده که IP_3 بخشی از یک چرخه فیدبک در برنامه فعال شدن تخم است. بر طبق این عقیده کلسیمی که توسط IP_3 آزاد می‌شود از نقطه الحاق اسپرم-تخم به سایر بخشهای مجاور غشاء منتشر می‌شود و فعال شدن فسفولیپاز C را تحریک می‌کند بطوریکه هرچه IP_3 بیشتری تولید شود کلسیم بیشتری نیز آزاد می‌گردد (اشکال 3-16 و 3-17). گمان می‌رود این چرخه فیدبک مسئول گسترش موج کلسیمی به سایر نقاط تخم است.

بطور خلاصه الحاق تخم و اسپرم ظاهراً از طریق مسیر شکسته شدن فسفاتیدیل اینوزیتول فرآیند بالا رفتن غلظت یون کلسیم و pH را تنظیم می‌کند. یکی از محصولات این شکسته شدن IP3 است که بالا رفتن غلظت یون کلسیم را تنظیم می‌کند در حالیکه محصول دیگر (دی‌اسیل گلیسرول) افزایش pH را کنترل می‌کند. شکسته شدن فسفاتیدیل اینوزیتول معرف یکی از نقاط انشعاب مهم است که در آنجا مسیرهای موازی در برنامه فعال شدن شروع به شکل گرفتن می‌نمایند (شکل 3-16).



شکل 3-17 مسیر شکسته شدن فسفاتیدیل اینوزیتول و نقش آن در فعال شدن یون کلسیم و بالا رفتن pH در تخم لقاح یافته توتیای دریایی.

آیا وقایعی که برنامه فعال شدن تخم توتیای دریایی را کنترل می‌کند در سایر موجودات نیز وجود دارند؟ موقعی که IP3 و آکورین بداخل تخم ماهی مدام تزریق می‌شود یک موج کلسیمی در آن ایجاد می‌شود که مشابه حالتی است که متعاقب لقاح اتفاق می‌افتد. بنظر می‌رسد که برنامه فعال شدن در بیشتر تخم‌ها (اگر نه تماماً) شامل بالا رفتن کلسیم داخل سلولی است. اما تصور می‌شود که در منبع این کلسیم تفاوت‌هایی وجود دارد. در توتیای دریایی و مهره‌داران یون کلسیم از اندامک‌های سیتوپلاسمی آزاد می‌گردد در صورتیکه در نرم‌تنان و کرم‌های حلقوی از خارج تخم منشاء می‌گیرد. اگرچه بنظر می‌رسد یون کلسیم در تمام موجودات یک تحریک کننده تخم بحساب می‌آید ولی وقایعی که بدنبال بالا رفتن کلسیم در تخم رخ می‌دهد در موجودات مختلف فرق می‌کند. این اختلافات ممکن است ناشی از تفاوت‌هایی باشد که در زمان وقایع میتوزی دیده می‌شود برای مثال، تخم توتیای دریایی نسبت به سایر تخم‌ها در مرحله متفاوتی متوقف می‌شود و در زمان لقاح از لحاظ متابولیسمی کاملاً غیرفعال است. برعکس تخم دوزیستان در متافاز دومین تقسیم میوز متوقف می‌شود و از لحاظ متابولیسمی بسیار فعال است. در دوزیستان لقاح موجب افزایش متوسطی در سنتز پروتئین می‌گردد ولی در توتیای دریایی لقاح سبب می‌شود که سنتز پروتئین بین 20 تا 40 برابر افزایش پیدا کند. اما بنظر می‌رسد این تغییرات نتیجه سازگاری است تا نتیجه فعال شدن. واضح است که بایستی تحقیقات بیشتری روی موجودات مختلف انجام شود تا اینکه در نهایت بتوان یک تصویر کلی از برنامه فعال شدن تخم ارائه داد.

6-3) بکرزایی

بکرزایی (partenogenesis) فرآیندی است که در آن تخم در فقدان ژنوم پدری فعال شده و شروع به رشد و نمو می‌کند. بکرزایی ممکن است بطور طبیعی یا مصنوعی اتفاق بیافتد. **بکرزایی مصنوعی** شامل فعال شدن تخم بوسیله ابزارهای فیزیکی یا شیمیایی است. چون عامل همگانی و اصلی شروع برنامه فعال شدن تخم‌ها افزایش یون کلسیم تخم می‌باشد از اینرو تیمارهایی که سبب ایجاد چنین پاسخی شود می‌تواند بکرزایی را القاء نماید. برای مثال توضیح دادیم که چگونه تخم توتیای دریایی و سایر تخم‌ها را می‌توان بوسیله یونفور A23187 فعال نمود. اما این امر فقط به فعال شدن ناقص تخم می‌انجامد بطوریکه فرآیند سنتز DNA و پروتئین تا سطح طبیعی تحریک نمی‌شود و تقسیم سلولی نیز در تخم‌های فعال شده با A23187 اتفاق نمی‌افتد چراکه آنها فاقد سانتیول و آستر اسپرمی هستند. اصطلاح **روش مضاعف (double method)** نوعی القاء بکرزایی مصنوعی در توتیای دریایی است که شامل تیمار نمودن اولیه تخم با اسید بوتیریک (فعال کننده ریزش یون کلسیم) و متعاقباً اضافه نمودن آب هیپرتونیک دریا (القاء کننده آستر تخم و تقسیم سلولی) می‌باشد. این روش می‌تواند به رشد و نمو کامل جنین منجر و تشکیل لارو بیانجامد. به همین ترتیب اگرچه سوراخ نمودن تخم قورباغه با یک سوزن تمیز (القاء کننده ریزش کلسیم) منجر به فعال شدن ناقص تخم می‌گردد ولی استفاده از سوزن آغشته به خون منجر به ایجاد جنین‌هایی می‌شود که تا مرحله لاروی رشد می‌کنند. دلیل این موضوع این است که MTOC سلولهای خونی پاره شده موجود بر روی سوزن فرآیند فعال شدن را کامل می‌کند.

بعضی از جانوران از جمله کرمهای پهن، روتیفرها، حشرات، دوزیستان و خزندگان با روش بکرزایی طبیعی تولید مثل می‌کنند. بکرزایی طبیعی عبارت از رشد و نمو طبیعی یک حیوان بدون شرکت ژنوم پدری است. حیواناتی که بدین طریق تولید مثل می‌کنند بایستی بر دو مشکل مهم که معمولاً توسط اسپرم حل می‌شود چیره شوند. اول: فرآیند فعال شدن آنها بایستی توسط عاملی غیر از اسپرم راه‌اندازی شود. روشی که برای اینکار استفاده می‌شود در بین موجودات متفاوت است اما معمولاً شامل آشفته‌گی فیزیکی تخم می‌باشد. برای مثال، در زنبورهای بکرزا فعال شدن تخم با کمک یک تحریک مکانیکی که تخم در حین عبور از دستگاه تناسلی ماده دریافت می‌کند شروع می‌شود. در سوسکهای بکرزا باکتریهای همزیستی که در دستگاه تناسلی ماده زیست می‌کنند کار تحریک تخم را انجام می‌دهند بدین صورت که در حین عبور تخم این باکتریها بداخل تخم نفوذ کرده و موجب شروع برنامه فعال شدن تخم می‌گردند. بعضی از سمندرهایی بکرزا از یک روش غیرطبیعی برای فعال کردن تخم استفاده می‌کنند بدین ترتیب که سمندر ماده با یک سمندر نر از یک گونه دیگر جفت‌گیری می‌کند. در اینجا اسپرم ناهمگون به تخم وارد و تخم گونه بکرزا را فعال می‌کند ولی اطلاعات ژنتیکی هسته اسپرم در تشکیل جنین شرکت نمی‌کند و اسپرم متعاقباً در سیتوپلاسم تخم تحلیل می‌رود. دوم: موجودات بکرزا بایستی ابزاری داشته باشند تا بتوانند در فقدان پیش‌هسته نر حالت دیپلوئید کروموزومها را مجدداً برقرار نمایند. این مشکل معمولاً با تحمیل یک دور اضافی سنتز DNA و همانندسازی کروموزوم بوسیله میتوز یا میوز در طی مراحل اولیه تسهیم زیگوت حل می‌شود. روش بکرزایی طبیعی در پستانداران تاکنون شناخته نشده است زیرا بر خلاف اکثر حیوانات دیگر در این گروه از مهره‌داران شرکت اطلاعات ژنتیکی هر دو جنس نر و ماده برای رشد و نمو جنین ضروری است.