# فصل چهارم

# لقاح: فعال شدن رشد و نمو

در طی گامتوژنز سلولهای تناسلی به اسپرم و تخم تمایز پیدا می‌کنند که بطور استادانه‌ای برای نقشهایی که در تولید نسل بعد بعهده دارند تطابق پیدا کرده‌اند. لقاح فرایندی است که در آن اسپرم و تخم با هم متحد شده و زیگوت را بوجود می‌آورند و زیگوت سلولی است که سر منشاء تمام سلولهای جنین و حیوان بالغ خواهد بود. لقاح دو نتیجهٔ مهم دارد. اولین نتیجهٔ آن این است که تعداد کروموزومها به حالت دیپلوئید بر می‌گردد و این موقعی اتفاق می‌افتد که ژنوم مادری و پدری با هم ترکیب می‌شوند. دومین نتیجهٔ لقاح فعال شدن رشد و نمو است. فعال شدن زنجیره‌ای از تغییرات متابولیک و مورفولوژیک را راه‌اندازی می‌کند که در نهایت منجر به تقسیم زیگوت و تبدیل آن به یک موجود پرسلولی می‌گردد.

در حال حاضر بیشتر دانش ما از لقاح و فعال شدن حاصل بیش از یک قرن مطالعه است که روی بی‌مهره‌گان دریازی بویژه توتیای دریایی انجام گرفته است. توتیای دریایی در تحقیقاتی که روی لقاح و فعال شدن انجام می‌گیرد دارای اهمیت بسیاری است چراکه از یک طرف تعداد بسیار زیادی گامت تولید می‌کند و از طرف دیگر لقاح در آن خارجی است. اگرچه لقاح در پستانداران بصورت داخلی اتفاق می‌افتد لیکن اکنون آنها از لحاظ تعداد مطالعاتی که بر روی فرآیند لقاح آنها صورت می‌گیرد در ردیف توتیای دریایی قرار می‌گیرند. تحقیقات اولیه‌ای که بر روی لقاح پستانداران انجام می‌گرفت با مشکل روبرو می‌شد 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 ظرفیت‌پذیری را پشت سر بگذارد و این مرحله‌ای از رسیدگی است که در داخل دستگاه تناسلی ماده اتفاق می‌افتد. اگر اسپرمها از دستگاه تناسلی ماده گرفته شوند و یا در مایعی از دستگاه تناسلی ماده خوابانده شوند مشاهده می‌شود که آنها فرآیند ظرفیت پذیری را پشت سر گذاشته و قادر به لقاح تخم خواهند بود. این کشف منجر به توسعهٔ تکنیکهایی شد که طی آنها فرآیند لقاح در پستانداران در شرایط *in vitro* مورد مطالعه قرار می‌گرفت. اکثر اطلاعات ما در مورد لقاح در پستانداران از مطالعاتی ناشی می‌شود که در شرایط *in vitro* بر روی اسپرم و تخمهای موش، هامستر، خرگوش و خوک صورت گرفته است. بدلیل سهم عمده‌ای که در تحقیقات داشته‌اند 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 می‌باشد لیکن لقاح فرآیند متنوعی است که بسته به طریقهٔ زندگی و عادات گونه‌های مختلف سازگاریهای خاصی پیدا می‌کند ولی ما در اینجا قصد بیان این سازگاریها را نداریم.

## ۱-۴) ساختمان اسپرم و تخم

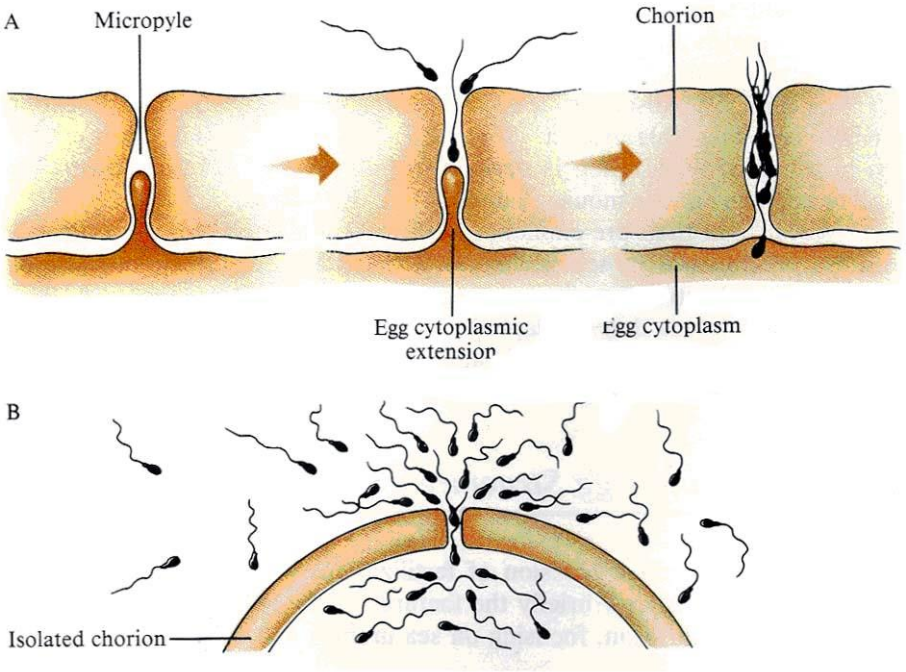
قبل از شروع بحث لقاح ما به انتهای گامتوژنز برمی‌گردیم تا بطور مختصر ویژگیهای اسپرم و تخم که در لقاح اهمیت دارند مرور کنیم و برای اینکار روی توتیا و پستانداران متمرکز می‌شویم.

چون اسپرم غالباً برای رسیدن به تخم مسافت طولانی را طی می‌کند معمولاً دارای اندازهٔ 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 ناحیهٔ قدامی سر اسپرم قرار می‌گیرد در حالیکه در پستانداران آکروزوم کلاهک نازکی را بر روی هستهٔ اسپرم تشکیل داده و کل ناحیهٔ قدامی سر اسپرم را می‌پوشاند. آکروزومها اندامکهای غشاءداری هستند که حاوی آنزیمهای هیدرولیتیک و سایر پروتئینها می‌باشند. قبل از لقاح آکروزوم دچار اگزوسیتوز می‌گردد که در اینجا به این اگزوسیتوز اصطلاحاً واکنش آکروزومی می‌گویند. در جریان این عمل آکروزوم محتویات خود را به بیرون از اسپرم می‌ریزد. محتویات آزاد شدهٔ آکروزوم به اسپرم در نفوذ به پوششهای خارج سلولی تخم کمک می‌کنند. اسپرم توتیای دریایی همچنین دارای یک فرورفتگی تخصص‌یافته در غشاء هسته می‌باشد که بنام **گودال قدامی هسته‌ای** (anterior nuclear fossa) خوانده می‌شود و در بین هسته و آکروزوم قرار می‌گیرد. این گودال حاوی آکتین گویچه‌ای (G-اکتین) است که در جریان تشکیل زائدهٔ آکروزومی پلی‌مریزه شده و بشکل اکتین رشته‌ای (F-اکتین) درمی‌آید. زائدهٔ آکروزومی یک ساختار نخ مانند متشکل از میکروفیلامنت‌ها است که در هنگام لقاح از نوک قدامی سر اسپرم به طرف سطح تخم امتداد می‌یابد. یک غشاء پلاسمایی اسپرم را احاطه کرده و غشاء حاوی تعدادی از پروتئینها است که برای لقاح اهمیت دارند.

تخم به ظاهری آئرودینامیک و قابلیت تحرک برای پیمودن مسافتهای طولانی نیاز ندارد. در عوض آن حاوی ذخایری از ترکیبات هسته‌ای و سیتوپلاسمی است که برای ساخت جنین مورد استفاده قرار می‌گیرند. تخم همچنین قابلیت فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی برای پذیرش اسپرم را دارا می‌باشد. پوشش خارج سلولی، غشاء پلاسمایی و سیتوپلاسم محیطی یا کورتکس تخم هر یک نقشهای مهمی در جریان لقاح بازی می‌کنند. تخم توتیای دریایی حاوی یک پوشش خارج سلولی یا گلیکوکالیکس متشکل از دو لایهٔ غیرسلولی است. یک لایهٔ خارجی یا پوشش ژله‌ای که حاوی چندین پپتید کوچک و پلی‌ساکاریدهای اسیدی بزرگ می‌باشد. یک لایهٔ داخلی یا پاکت زرده‌ای متشکل از شبکه‌ای از رشته‌های گلیکوپروتئینی. تخم‌های پستانداران دارای یک پوشش خارجی است که از لایه‌های سلولی و غیرسلولی تشکیل می‌شود. برای مثال، در موش تاج شعاعی یک لایهٔ سلولی است که از سلولهای فولیکولی منشاء گرفته و مانع سختی در مقابل نفوذ اسپرم می‌باشد. در زیر تاج شعاعی منطقهٔ شفاف قرار دارد که شبکهٔ ضخیمی از مولکولهای گلیکوپروتئینی است. منطقهٔ شفاف تخم پستانداران معادل پوشش ژله‌ای و پاکت زرده‌ای تخم توتیای دریایی می‌باشد.

لایه‌های خارج سلولی اضافی (کوریون و پوسته‌های تخم) که در اطراف تخم بعضی از موجودات ایجاد می‌شود بوسیلهٔ سلولهای فولیکولی یا سایر سلولهای سوماتیک موجود در دستگاه تناسلی ماده تولید می‌شوند. در این موجودات اسپرم معمولاً نمی‌تواند از این لایه‌ها عبور کند و بنابراین بایستی از طریق منفذی بنام **میکروپیل** به تخم

دسترسی پیدا کند (شکل ۱-۴). میکروپیل کانال باریکی در کوریون یا پوستهٔ تخم است که از طریق آن اسپرم به تخم رسیده و با آن لقاح پیدا می‌کند.




**شکل ۱-٤)** A، لقاح تخم ماهی استورژئون بوسیلهٔ 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 ناحیهٔ میکروپیل کوریون جدا شدهٔ 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 ناحیهٔ 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 شبکهٔ اندوپلاسمیک غنی می‌باشد. بزرگترین و فراوانترین ضمائم 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 کنندهٔ پروتئینی، موکوپلی‌ساکاریدها و پروتئینهای ساختمانی می‌باشند. در تخم توتیای دریایی ۱۵۰۰۰ گرانول قشری وجود دارد در حالیکه در تخم موش حدود ۴۰۰۰ عدد از این گرانولها شمارش شده است. همچنانکه خواهیم دید در طی لقاح گرانولهای قشری دچار اگزوسیتوز می‌شوند و در نتیجهٔ آن سبب ایجاد تغییرات شدیدی در غشاء پلاسمایی تخم می‌شوند.

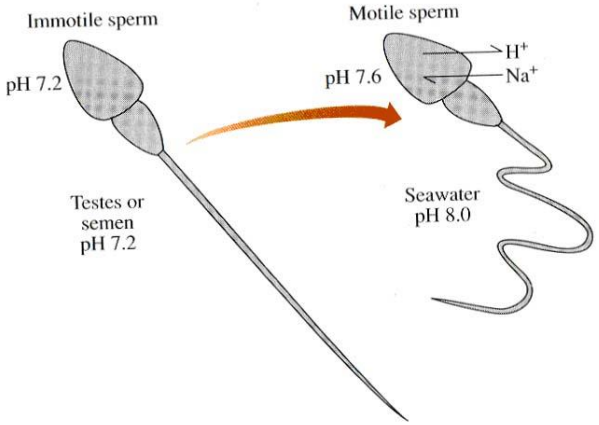
## ۲-۴) آماده شدن برای لقاح: وقایعی که قبل از اتحاد اسپرم- تخم اتفاق می‌افتد

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 قدرت تحرک اسپرم

اسپرم برای مدت زمان مدیدی که در داخل بیضه و مایع منی قرار دارد بی‌تحرک است اما هنگامیکه در مجاورت تخم قرار می‌گیرد فوراً قدرت تحرک پیدا می‌کند. همانطور که در شکل ۲-۴ نشان داده شده است فعال شدن اسپرم توتیای دریایی بوسیلهٔ 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 ۷/۲ 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 ۸) دارد وارد می‌شود عمل معاوضهٔ همزمان $H^+$ داخلی با $Na^+$ خارجی شروع می‌شود. و این کار بسرعت pH داخل سلولی را بالا برده و به حدود ۷/۶ می‌رساند. در این pH تنفس سلولی فعال شده و اسپرم با کمک حرکات شلاقی تاژک خود شروع به حرکت می‌کند. اهمیت تغییر pH در کنترل تحرک اسپرم بوسیلهٔ آزمایشی که در آن اسپرم در آب دریای فاقد $Na^+$ قرار داده شد مشخص گردیده است. در این شرایط عمل معاوضهٔ $H^+/Na^+$ 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 دریای 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 **اسپراکت** (speract) که یک پپتید فعال کنندهٔ اسپرم می‌باشد در کنترل قابلیت تحرک اسپرم نقش دارد. اسپراکت پپتیدی مرکب از ۱۰ اسید آمینه است که سبب افزایش pH داخل سلولی می‌گردد. تغییر pH از طریق فعال کردن داینئین تحرک اسپرم را کنترل می‌کند. داینئین یک ATPآز است که به سطح میکروتوبولهای آکسونم تاژک متصل می‌شود. فعالیت داینئین به pH داخل سلولی بسیار حساس است. در pH اسیدی داینئین غیرفعال است و هیچ ATPای تولید نمی‌شود و اسپرم بدون تحرک باقی می‌ماند. موقعیکه pH داخل سلولی بالا می‌رود و به ۷/۶ می‌رسد داینئین فعال شده و اسپرم شروع به حرکت و شنا کردن می‌کند.



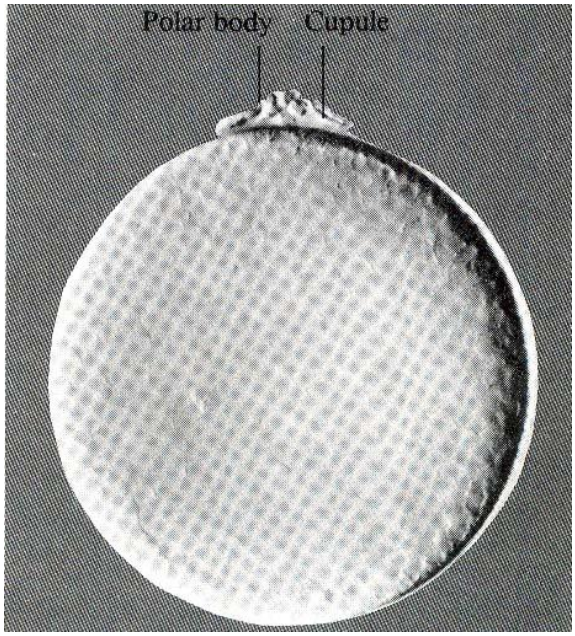

**شکل ۲-٤)** نقش pH داخل سلولی در فعال شدن حرکت اسپرم توتیای دریایی. pH نشان داده شده در کنار سر اسپرم منعکس کنندهٔ pH داخل سلولی است.

در مقایسه با توتیای دریایی، در بارهٔ فعال شدن قدرت تحرک اسپرم پستانداران شناخت کمی وجود دارد. همچنانکه در فصل ۲ بحث شد فرآیند رسیدگی اسپرم در اپیدیدیم، کسب ویژگی تحرک را تسهیل می‌کند. گمان می‌رود که با انزال به داخل دستگاه تناسلی ماده اسپرم شروع به حرکت می‌نماید. اسپرم هنگامیکه وارد دستگاه تناسلی ماده شد بتدریج قدرت تحرک بیشتری کسب می‌کند. در پستانداران کسب تدریجی قدرت تحرک می‌تواند مناسب باشد زیراکه انقباضات دستگاه تناسلی ماده به هدایت اسپرم به محل لقاح کمک می‌کند. سرانجام موقعیکه اسپرم به مجاورت تخم رسید یک افزایشی در قدرت تحرک آن بوجود می‌آید و علت آن کسب ویژگی ظرفیت‌پذیری است که ما بعداً آنرا در هنگام بررسی نفوذ اسپرم بداخل پوششهای تخم مورد بحث قرار خواهیم داد.

## 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 بوسیلهٔ آن اسپرم بطرف تخم جذب می‌شود. **کموتاکسی** (chemotaxis) بصورت حرکت یک سلول بطرف یک منبع مادهٔ شیمیایی که از سلول دیگر ترشح می‌شود تعریف می‌گردد. جذب کموتاکسیک 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 زیراکه آن بوسیلهٔ تخم به آب دریا آزاد می‌گردد. قرار دادن فوکوسراتن در یک لولهٔ موئینه و نزدیک کردن آن به سوسپانسیون اسپرم سبب می‌شود که بعد از مدت کوتاهی ابری از اسپرم بطرف نوک لولهٔ موئینهٔ حاوی فوکوسراتن جذب شوند. کموتاکسی اسپرمی می‌تواند در پستانداران نیز اتفاق بیفتد. تخم‌های حشرات و ماهیان در داخل یک پوشش خارج سلولی مقاوم به آب بنام کوریون که در طی اووژنز 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 اسپرمی 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 ۱-۴ A). 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 ناحیهٔ میکروپیل تجمع یافته و بداخل میکروپیل خالی از تخم وارد می‌شوند (رجوع به شکل ۱-۴B). اگر ناحیهٔ 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. کموتاکسی اسپرمی همچنین در تخم‌های ژله‌ماهی نیز اتفاق می‌افتد. ماده‌ای که اسپرم را جذب می‌کند پروتئینی است که در ناحیهٔ **کوپول** (cupule) قرار دارد و کوپول یک ساختمان خارج سلولی تخصص یافته است که قطب حیوانی تخم ژله‌ماهی را

احاطه می‌کند (شکل ۳-۴). این پروتئین باعث می‌شود که اسپرم مجاور رفتار شنای خود را تغییر داده و تخم را در این ناحیه لقاح دهد.




**شکل ۳-٤)** تخم لقاح نیافتهٔ یک ژله‌ماهی که کوپول محتوی پروتئین جذب‌کنندهٔ 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. **رساکت** (resact) یا پپتید فعال کنندهٔ تنفس اسپرمی پپتیدی است که از ۱۴ اسید آمینه تشکیل می‌گردد و از پوشش ژله‌ای تخم توتیا استخراج شده است. هنگامیکه مقدار اندکی رساکت بداخل سوسپانسیونی از اسپرم اضافه شود مشاهده خواهد شد که اسپرمها رفتار شنای خود را تغییر داده و پس از چند ثانیه در ناحیه‌ای که رساکت بداخل سوسپانسیون اضافه شده تجمع پیدا می‌کنند. این آزمایشات نشان می‌دهد که رساکت یک مادهٔ جاذب اسپرمی است.

## 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 گونهٔ خودش برهم‌کنش نماید. تخم توتیای دریایی و پستانداران بوسیلهٔ 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.

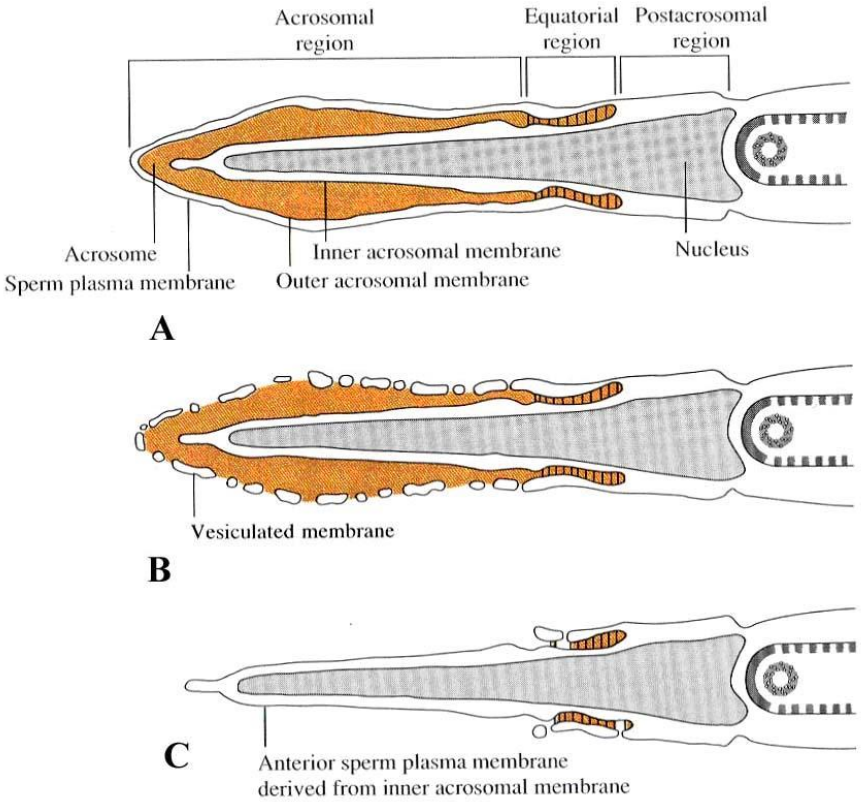
## نفوذ اسپرم در پستانداران

اسپرم پستانداران قبل از اینکه بتواند واکنش آکروزومی را پشت سر گذارد و تخم را لقاح دهد به یک دورهٔ رسیدگی یا ظرفیت‌پذیری در دستگاه تناسلی ماده نیاز دارد. طول دورهٔ ظرفیت پذیری از کمتر از یک ساعت در موش تا ۶-۵ ساعت در انسان فرق می‌کند. بسته به گونهٔ پستاندار، ظرفیت‌پذیری در رحم یا لولهٔ اویدکت و یا در هر دو اتفاق

می‌افتد. ظرفیت‌پذیری اسپرم مشتمل بر یکسری تغییرات است که در غشاء پلاسمایی اسپرم بوجود می‌آید که از جملهٔ این تغییرات می‌توان به برداشته شدن برخی ترکیبات سطحی اسپرم و نوترتیبی 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 تودهٔ تخمکی و تاج شعاعی و رسیدن به منطقهٔ 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 ۴-۴). در جریان اگزوسیتوز آنزیمهای موجود در آکروزوم از جمله هیالورونیداز (آنزیمی که موکوپلی‌ساکارید 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 تودهٔ تخمکی و تاج شعاعی را سست کرده و بدین طریق به رسیدن اسپرم به منطقهٔ شفاف کمک می‌کنند. اسپرم پستانداران با توجه به سطح تخم بطور مماس وارد منطقهٔ شفاف می‌شود (شکل ۵-۴) و در پشت سر خود منطقهٔ روشنی را بجا می‌گذارد که قطر آن حدوداً برابر قطر سر اسپرم می‌باشد. مکانیسمی که اسپرم پستانداران برای نفوذ به منطقهٔ 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.

ناحیهٔ 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 ناحیهٔ 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 منطقهٔ شفاف انجام گیرد. ناحیهٔ شفاف تخم موش حاوی سه گلیکوپروتئین بنامهای ZP-1، ZP-2 و ZP-3 است. گلیکوپروتئین ZP-3 یک گیرندهٔ اسپرمی است و اسپرم بواسطهٔ آنها به ناحیهٔ شفاف متصل میشود. قابلیت ZP-3 برای اتصال به اسپرم ناشی از زنجیره‌های قندی آن است. هنگامیکه این قندها بوسیلهٔ هضم آنزیمی از ZP-3 حذف می‌شوند اتصال اسپرم به ناحیهٔ شفاف بلوکه می‌شود. ZP-2 مسئول حفظ و نگهداری اتصال اسپرم به تخم می‌باشد ولی عمل ZP-1 در حال حاضر شناخته نشده است.




**شکل ٤-٤)** نمایی شماتیک از واکنش آکروزومی در اسپرم هامستر. A، سر اسپرم قبل از واکنش آکروزومی که یک غشاء دست نخوردهٔ آکروزومی را نشان می‌دهد. B، سر اسپرم در طی واکنش آکروزومی که وزیکوله‌شدن غشاء خارجی آکروروم را که منجر به آزاد شدن محتویات آکروزوم می‌گردد نشان می‌دهد. C، سر اسپرم بعد از واکنش آکروزومی که نشان می‌دهد غشاء پلاسمایی ناحیهٔ قدامی اسپرم از غشاء داخلی آکروزوم مشتق می‌شود.

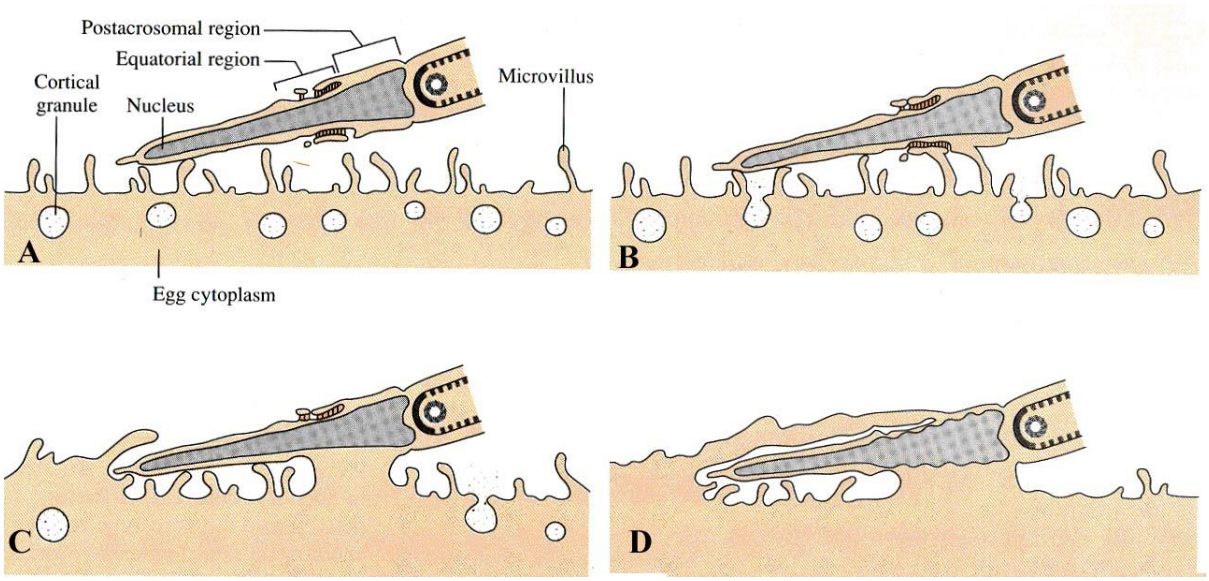
ورود یون کلسیم بداخل اسپرم برای شروع واکنش آکروزومی در پستانداران ضروری است. این موضوع را با تیمار کردن تخم‌ها با یونوفور A23187 (مولکولی که به غشاء پلاسمایی تخم وارد شده و کلسیم را به داخل سیتوپلاسم منتقل می‌کند) یا ZP-3 خالص شده می‌توان نشان داد. از اینرو گیرندهٔ اسپرمی ممکن است در ایجاد واکنش آکروزومی دخالت داشته باشد در حالیکه عمل ZP-3 بعنوان یک گیرندهٔ اسپرمی با میانجی زنجیره‌های قندی آن انجام می‌گیرد. قابلیت ZP-3 برای شروع واکنش آکروزومی ناشی از بخش پروتئینی آن می‌باشد.

## نفوذ اسپرم در توتیای دریایی

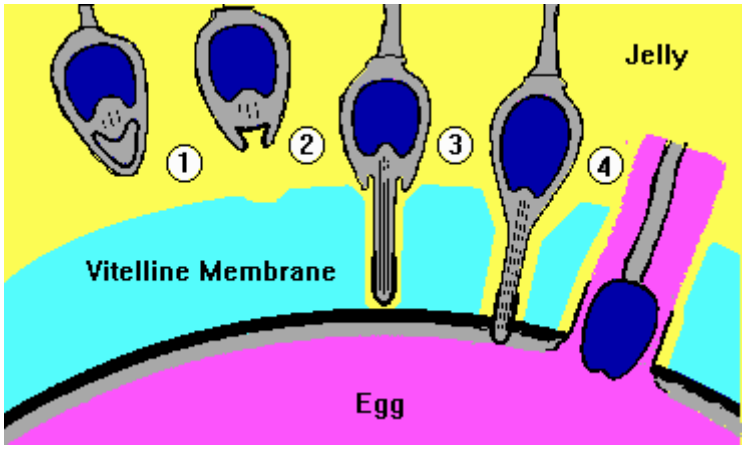
اسپرم توتیای دریایی و دیگر بی‌مهره‌گان دریایی برای شروع واکنش آکروزومی نیازی به گذراندن پروسهٔ ظرفیت‌پذیری ندارد. در توتیا موقعیکه اسپرم با پوشش ژله‌ای تخم تماس برقرار می‌کند دو واقعه شروع می‌شود (شکل ۶-۴). اول، واکنش آکروزومی باعث می‌شود که غشاء آکروزوم و غشاء پلاسمایی اسپرم بهم ملحق شوند. دوم، یک برآمدگی باریک بنام زائدهٔ آکروزومی از سر اسپرم خارج شده و بطرف پاکت زرده‌ای کشیده می‌شود.

نقش پوشش ژله‌ای در تحریک واکنش آکروزومی با آزمایشی نشان داده شده است. در این آزمایش پوشش ژله‌ای اطراف تخم از آن جدا شده و سپس این پوشش در مجاورت اسپرمها قرار داده شد. در این آزمایش

مشخص شد که حتی در نبود تخم واکنش آکروزومی می‌تواند در صورت وجود ترکیبات ژله‌ای تخم در جوار آن اتفاق بیفتد. هنگامیکه اسپرم با پوشش ژله‌ای تماس برقرار می‌کند دچار زنجیره‌ای از تغییرات یونی می‌گردد. اول اینکه، یون کلسیم خارجی با یون پتاسیم داخلی معاوضه می‌گردد. بنظر می‌رسد یک مولکول قندی سولفاته بزرگ در پوشش ژله‌ای مسئول شروع فرآیند معاوضهٔ مذکور و متعاقباً الحاق غشاء آکروزوم و غشاء پلاسمایی اسپرم می‌باشد. اتصال این قند سولفاته به گیرندهٔ گلیکوپروتئین موجود در غشاء پلاسمایی اسپرم باعث افزایش غلظت cAMP سیتوپلاسم به میزان ۴۰۰ برابر می‌شود. همچنانکه بعداً بحث خواهیم کرد تحریک cAMP اولین مرحله از زنجیره واکنشهایی است که کروماتین اسپرم را در طی لقاح دوباره سازماندهی می‌کند. شواهد موجود نشان میدهد که تجمع کلسیم در اسپرم توتیای دریایی فرآیند الحاق غشاء آکروزوم و غشاء پلاسمایی اسپرم را کنترل می‌کند.




**شکل ٥-٤)** نمایی شماتیک از مراحل ورود مماسی اسپرم بداخل تخم هامستر.

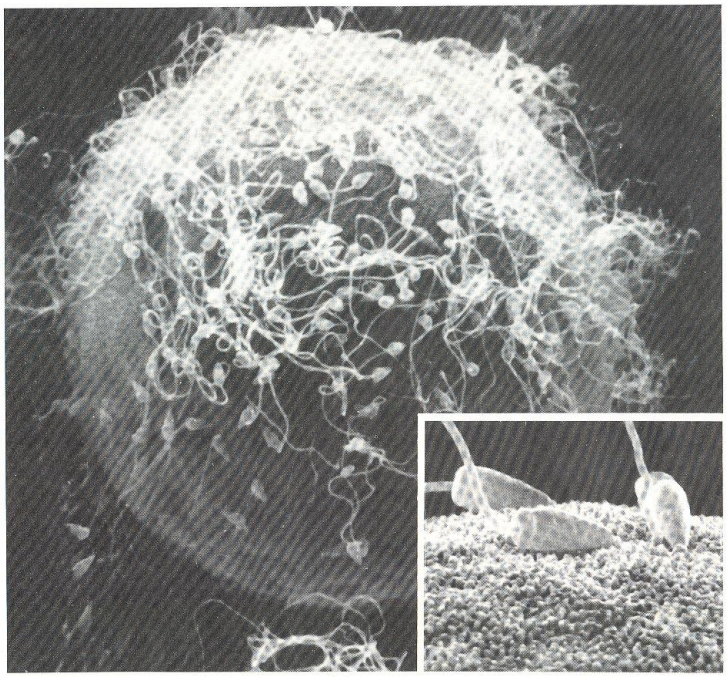



**شکل ٦-٤)** واکنش آکروزومی و تشکیل زائدهٔ آکروزومی توتیای دریایی. (۱) واکنش آکروزومی، (۲) تشکیل زائدهٔ آکروزومی، (۳) اتصال زائدهٔ آکروزومی به غشاء تخم، (٤) ورود اسپرم بداخل تخم.

در همان حین که زائدهٔ آکروزومی از ناحیهٔ قدامی سر اسپرم بطرف سطح تخم پیشروی می‌کند آن بوسیلهٔ پروتئینهایی که در اصل با طرف داخلی غشاء آکروزومی معکوس شده مرتبطند پوشیده می‌شود. یکی از این پروتئینها بایندین (bindin) است که اتصال خاص -گونه‌ای زائدهٔ آکروزومی را با پاکت زرده‌ای ارتقاء می‌بخشد. لقاح در

توتیای دریایی معمولاً بصورت خاص -گونه‌ای اتفاق می‌افتد. اما اگر ابتدا پاکت زرده‌ای از روی تخم برداشته شود تشکیل هیبریدهای بین‌گونه‌ای نیز اتفاق می‌افتد. بنظر می‌رسد جفت شدن بایندین با گیرندهٔ اسپرمی موجود در پاکت زرده‌ای تخم مسئول لقاح خاص-گونه‌ای (species specificity) است. اگر گیرنده‌های اسپرمی را بطور خالص شده تهیه کنیم می‌بینیم که هر یک از آنها به اسپرم گونهٔ خود متصل می‌شوند ولی به اسپرم سایر گونه‌ها نمی‌چسبند. مولکولهایی شبیه بایندین در اسپرم پستانداران یافت نشده است.

بعد از اینکه زائدهٔ آکروزومی به پاکت زرده‌ای متصل شد باقیماندهٔ اسپرم نیز به این لایه چسبیده و در آن نفوذ می‌کند (شکل ۷-۴). نفوذ اسپرم بداخل پاکت زرده‌ای با آزاد شدن یک پروتئاز شبه‌تریپسین اختصاصی از آکروزوم کامل می‌شود. یکی از نقشهای این پروتئاز هضم پاکت زرده‌ای است.



**شکل ۷-٤)** الکترومیکروگراف نگاره که سر اسپرم را در حال اتصال به پاکت زرده‌ای تخم توتیای دریایی نشان می‌دهد. شکل پایین نمایی دقیقتر از پاکت زرده‌ای و اسپرمهای متصل به آنرا نمایان می‌کند.

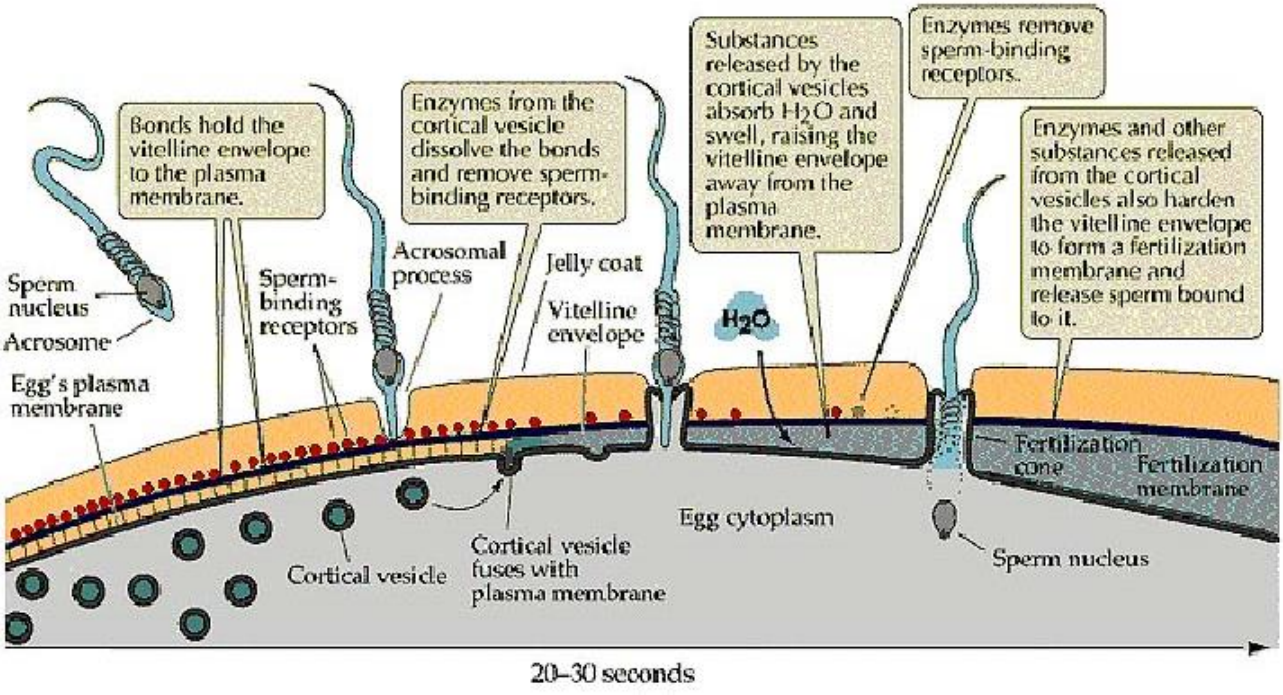
## خلاصهٔ مکانیسمهای نفوذ اسپرم

اسپرم قبل و طی نفوذ بداخل گلیکوکالیکس تخم با مولکولهای فعال کننده و گیرنده برهم‌کنش می‌کند. در توتیای دریایی فعال‌کننده‌ها پپتیدهای کوچک و قندهای سولفاته‌ای هستند که در پوشش ژله‌ای قرار دارند در حالیکه گیرنده‌ها گلیکوپروتئینهایی هستند که در پاکت زرده‌ای وجود دارند. در پستانداران عامل فعال کننده و گیرنده یک مولکول واحد بنام گلیکوپروتئین ZP-3 است. مولکولهای فعال کننده و گیرنده سبب شروع یکسری تغییرات یونی در اسپرم می‌شوند که این تغییرات مسئول واکنش آکروزومی و نفوذ خاص-گونه‌ای اسپرم بداخل پوششهای خارج سلولی تخم می‌باشد.

## ۳-۴) 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 توتیای دریایی فرآیند الحاق این دو غشاء در نوک زائدهٔ آکروزومی شروع می‌شود (شکل ۶-۴)، در صورتیکه در پستانداران که فاقد زائدهٔ آکروزومی می‌باشند فرآیند لقاح در ناحیهٔ استوایی سر اسپرم بلافاصله پشت ناحیه‌ای از غشاء که از آکروزوم منشاء می‌گیرد آغاز می‌گردد. در هر دو حالت 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 هستهٔ اسپرم امکان می‌دهد به سیتوپلاسم تخم وارد شود.

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد که بایندین ممکن است دارای نقش دوگانه در لقاح باشد. اولین نقش آن این است که اتصال اسپرم به تخم را تسهیل می‌کند و دومین نقش آن دخالت در الحاق دو سلول به یکدیگر است. معمولاً کل اسپرم از جمله هسته، سانتریولها، میتوکندریها و حتی آکسونم تاژک به سیتوپلاسم تخم وارد می‌شوند. غشاء پلاسمایی اولیهٔ اسپرم نیز حفظ می‌شود و بخشی از غشاء پلاسمایی تخم می‌گردد.




**شکل ۸-٤)** خلاصه‌ای از وقایع نفوذ اسپرم و الحاق اسپرم-تخم در توتیای دریایی.

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 ۸-۴). میکروفیلامنتهایی که در مخروط لقاح وجود دارند مسئول کشیده شدن اسپرم بداخل تخم می‌باشند. این موضوع بوسیلهٔ آزمایشاتی که در آن از سیتوکالازینB (یک مهار کنندهٔ تشکیل فیلامنت) استفاده گردیده نشان داده شده است. اگر تخم‌ها در هنگام لقاح با سیتوکالازینB تیمار شوند فرآیند تشکیل مخروط لقاح و بداخل کشیده شدن اسپرم مهار می‌شود. شکل ۸-۴ چگونگی وقایع نفوذ اسپرم و اتحاد اسپرم و تخم را در توتیای دریایی بطور خلاصه

نشان داده است. در اولین مرحله اسپرم به تخم نزدیک می‌شود. سپس واکنش آکروزومی بوسیلهٔ تماس با پوشش ژله‌ای تخم القاء شده و یک زائدهٔ آکروزومی ایجاد می‌شود که بطرف سطح تخم کشیده می‌شود. متعاقباً نوک زائدهٔ آکروزومی با غشاء پلاسمایی تخم متحد می‌شود. سرانجام هستهٔ اسپرم از طریق مخروط لقاح وارد سیتوپلاسم تخم می‌گردد.

## ۴-۴) پاسخ به لقاح: وقایعی که بدنبال اتحاد اسپرم-تخم اتفاق می‌افتد

طی لقاح، در زیگوت یکسری وقایع شروع می‌شود که بنام **برنامهٔ فعال شدن** (activation program) نامیده می‌شود. برنامهٔ فعال شدن خود به **پاسخهای ابتدایی** (early responses) و **پاسخهای انتهایی** (late responses) تقسیم می‌شود. پاسخهای ابتدایی در طول چند دقیقه بعد از لقاح اتفاق می‌افتد در حالیکه پاسخهای انتهایی بعد از کامل شدن پاسخهای اولیه بوقوع می‌پیوندد. در ابتدا ما پاسخهای ابتدایی لقاح را مورد بررسی قرار می‌دهیم که عملشان در نهایت جلوگیری از پلی‌اسپرمی است. سپس در مورد پاسخهای انتهایی بحث خواهد شد که مستقیماً به تشکیل جنین منجر خواهند شد.

### جلوگیری از پلی‌اسپرمی

اگرچه تعداد زیادی اسپرم می‌توانند بداخل پوششهای خارج سلولی نفوذ کنند ولی معمولاً فقط یکی از آنها موفق به لقاح تخم می‌شود. 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 پلی‌اسپرمی گفته می شود. ورود چندین اسپرم بداخل تخم می‌تواند به پلی‌پلوئیدی، بروز اختلالات در جدایی کروموزومها طی تقسیم سلولی و سرانجام مرگ جنین بیانجامد. بنابراین تعجب‌انگیز نخواهد بود که موجودات زنده دارای مکانیسمهای بسیار دقیقی برای جلوگیری از پلی‌اسپرمی باشند.

سه استراتژی متفاوت برای جلوگیری از پلی‌اسپرمی شناسایی شده است. اولین استراتژی محدود کردن تعداد اسپرمهایی است که به تخم می‌رسند. ما نشان دادیم که در تخم ماهیها اینکار از طریق محدود کردن راههای ورودی صورت می‌گیرد بدین طریق که اسپرمها فقط می‌توانند از طریق میکروپیل به تخم برسند. اگر کوریون برداشته شود اسپرمهای زیادی وارد تخم شده و جنین پلی‌اسپرمی می‌میرد. دومین استراتژی تعداد اسپرمهایی است که می‌توانند بداخل پوشش‌های خارج سلولی تخم نفوذ کرده و با غشاء پلاسمایی تخم ملحق شوند. در توتیای دریایی و پستانداران این استراتژی تکامل فوق‌العاده‌ای پیدا نموده است. در پستانداران تعداد اسپرمهایی که به محل لقاح میرسند بواسطهٔ لزوم مهاجرت از دستگاه تناسلی ماده به حداقل می‌رسند ولی علاوه بر آن یک عامل ضد پلی‌اسپرمی دیگر (منطقهٔ شفاف) نیز وجود دارد. سومین استراتژی در شرایطی وارد عمل می‌شود که تعداد زیادی اسپرم وارد تخم می‌شوند و هدف آن محدود کردن تعداد هسته‌های اسپرم است که می‌توانند با هستهٔ تخم ترکیب شوند. این استراتژی در حیوانات با **پلی‌اسپرمی فیزیولوژیکی** (physiological polyspermy) که در آنها معمولاً چند اسپرم وارد تخم می‌شوند اتفاق می‌افتد. برای مثال در سمندر حدود ۲۰ اسپرم وارد تخم می‌شوند. اگرچه هستهٔ هر اسپرم به یک پرونوکلئوس نر تبدیل و یک استر اسپرمی ایجاد می‌کند ولی فقط یکی از پرونوکلئوس‌های نر با پرونوکلئوس ماده

ترکیب و هستهٔ زیگوت را بوجود می‌آورد. سایر پرونوکلئوس‌های نر قبل از اولین تسهیم در سیتوپلاسم تخم تحلیل می‌روند.

در اینجا ما دومین استراتژی جلوگیری از پلی‌اسپرمی یعنی "جلوگیری از ورود چندین اسپرم به سطح تخم" را با جزئیات بیشتر مورد بررسی قرار خواهیم داد. تخم توتیای دریایی و بسیاری از بی‌مهرگان دریازی دیگر دو سد متوالی را برای ممانعت از پلی‌اسپرمی بنمایش می‌گذارند که عبارتند از یک سد موقتی یا **سد سریع ضد پلی‌اسپرمی** که طی سه ثانیه بعد از تماس اسپرم اتفاق می‌افتد و دیگری سد دائمی یا **سد آهستهٔ ضد پلی‌اسپرمی** که حدوداً یک دقیقه بعد از لقاح بوقوع می‌پیوندد.

### سد سریع ضد پلی‌اسپرمی

این سد بواسطهٔ دپولاریزه شدن الکتریکی غشاء پلاسمایی تخم که بنام **پتانسیل لقاح** (fertilization potential) خوانده می‌شود ایجاد می‌گردد. پتانسیل لقاح طی چند ثانیه بعد از تماس اولین اسپرم با سطح تخم اتفاق می‌افتد و بطور موقت ولتاژ دو سوی غشاء را از ۷۰- میلی ولت به حدود ۱۰+ میلی ولت تغییر می‌دهد. دپولاریزاسیون ابتدایی از ورود یون کلسیم بداخل سلول ناشی می‌شود و ولتاژ مثبت بوسیلهٔ افزایش آهستهٔ موقتی نفوذپذیری غشاء تخم به یون سدیم حفظ می‌شود. آزمایشات زیر تایید می‌کند 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.

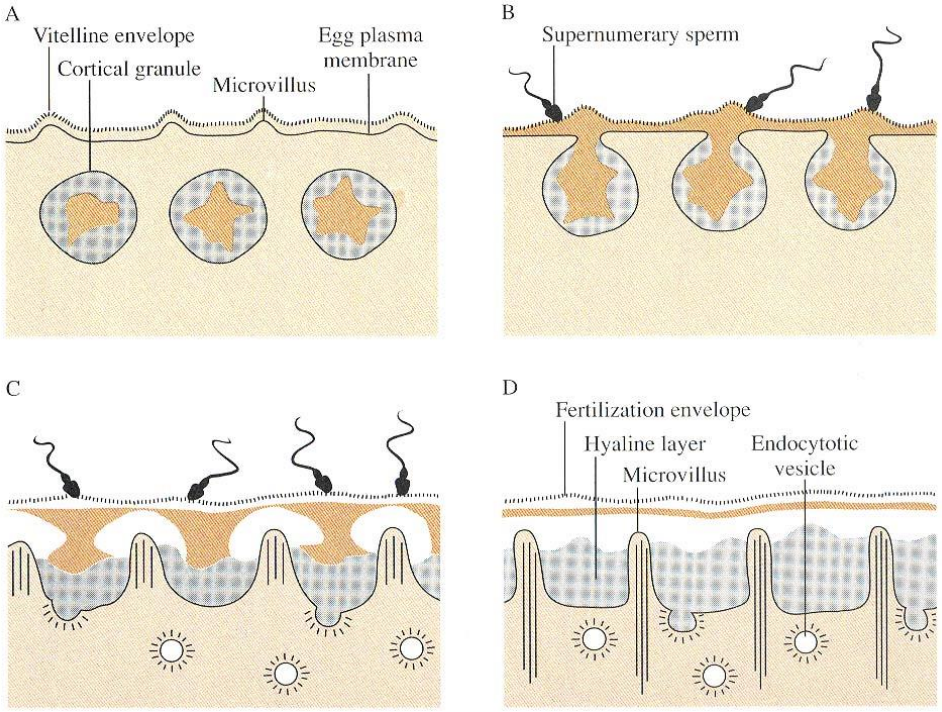
چگونه پتانسیل لقاح از ورود اسپرمهای اضافی بداخل تخم جلوگیری می‌کند؟ دو مدل برای توضیح این پدیده ارائه شده است. اول: غشاء پلاسمایی تخم ممکن است حاوی یک گیرندهٔ اسپرمی باشد که فقط در شرایطی که پتانسیل غشاء منفی است می‌تواند با اسپرم برهم کنش کند. دوم: اسپرم در حال لقاح ممکن است یک پروتئین حساس به ولتاژ به غشاء پلاسمایی تخم وارد کند که فرآیند الحاق اسپرم-تخم را ارتقاء ببخشد. این فرضیه‌ها بوسیلهٔ 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 منطقهٔ شفاف بوقوع می‌پیوندد.

### سد آهستهٔ ضد پلی اسپرمی

سد سریع ضد پلی‌اسپرمی 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 آمادهٔ ورود به آن هستند ممانعت بعمل آید. اینکار بوسیلهٔ سد آهستهٔ ضد پلی‌اسپرمی به انجام می‌رسد.

سد آهستهٔ ضد پلی‌اسپرمی بواسطهٔ **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 نقطهٔ 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 ۹-۴ نشان داده شده است.

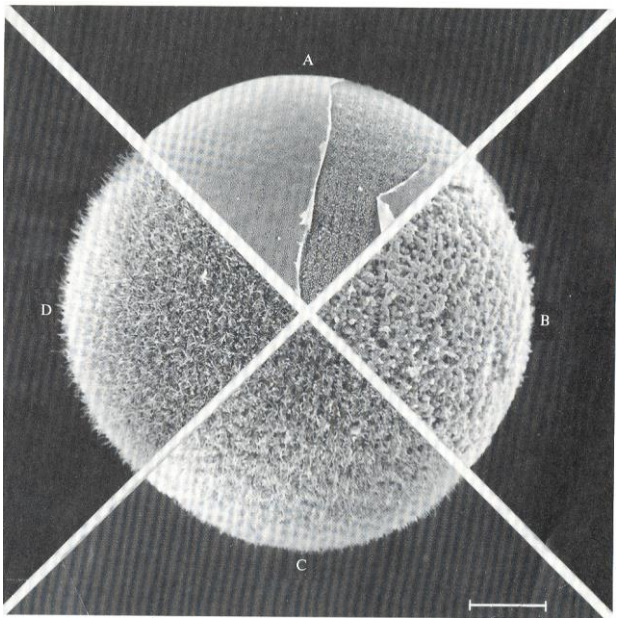



**شکل ۹-٤)** دیاگرامی از واکنش قشری و بلندشدن پاکت زرده‌ای در تخم توتیای دریایی. A، تخم لقاح نیافته با دانه‌های قشری دست تخورده، پاکت زرده‌ای نازک و غشاء پلاسمایی با میکروویلی‌های کوچک. B، اگزوسیتوز گرانولهای قشری و آغاز بلند شدن غشاء لقاح در یک تخم بتازگی لقاح پیدا کرده. C، کامل شدن اگزوسیتوز دانه‌های قشری که بلند شدن غشاء لقاح را با اسپرمهای چسبیدهٔ اضافی نشان می‌دهد. D، یک زیگوت لقاح یافته که غشاء لقاح بلند شده و میکروویلی‌های طویل شده و لایهٔ 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 می شوند که غشاء دور زرده‌ای از سطح تخم بلند شود (شکل ۹C-۴). 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 فاصلهٔ بین

غشاء پلاسمایی تخم و اسپرمهای اضافی را که به پاکت زرده‌ای چسبیده‌اند زیاد می‌کند (شکل ۹B-۴). 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 لایهٔ سختی تبدیل می‌کنند که نسبت به پروتئازهای اسپرمی مقاوم است (شکل ۹B-۴). سوم: گرانولهای قشری پروتئازهایی آزاد می‌کنند که گیرنده‌های گلیکوپروتئینی اسپرمی موجود بر روی پاکت زرده‌ای را تجزیه و نابود می‌کنند و سبب می‌گردند که اسپرمهای چسبیدهٔ 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 ۹B-C-۴). غشاء اضافی با چین‌خوردن غشاء پلاسمایی تخم و تشکیل هزاران میکروویلی در اطراف تخم جا داده می‌شود (شکل ۱۰-۴). این غشاء اضافی بعداً توسط اندوسیتوز از سطح تخم برداشته می‌شود. مقداری از محتویات گرانولهای قشری در لایهٔ دور زرده‌ای باقی مانده و بصورت لایهٔ شفاف (hyaline layer) پلی‌مریزه می‌شوند (شکل ۹D-۴). لایهٔ شفاف سبب نگهداشته شدن بلاستومرها در کنار هم شده و همچنین در تغییرات شکل زایی جنین در حال نمو شرکت می‌کند.




**شکل ۱۰-٤)** یک تصویر ترکیبی با میکروسکوپ الکترونی نگاره 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 میکرویلی‌های 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 دهندهٔ لایهٔ 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 آهستهٔ 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 منطقهٔ شفاف سخت شده و نسبت به نفوذ اسپرم خاصیت دافعه پیدا کرده و گیرنده‌های اسپرمی آن غیرفعال می‌گردند. به این تغییرات منطقهٔ 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 ZP-3 دیگر بعنوان گیرندهٔ اسپرمی عمل نمی‌کند و نمی‌تواند واکنش آکروزومی را القاء نماید. اما ZP-3 بوسیلهٔ پروتئاز غیرفعال نمی‌شود، در عوض احتمالاً در نتیجهٔ هیدرولیز گروههای قندی آن توسط گلیکوزیدازهای آزاد شده از گرانولهای قشری تغییر شکل می‌دهد. مکانیسم سخت شدن منطقهٔ شفاف ناشناخته است اما بنظر نمی‌رسد که اتصالات متقابل گلیگوپروتئینها در ایجاد آن دخالت داشته باشند.

## کنترل واکنش قشری

تخم‌های لقاح نیافتهٔ توتیای دریایی حاوی ذخیره‌ای از یون کلسیم محبوس شده در شبکهٔ اندوپلاسمیک واقع در ناحیهٔ 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 منشاء می‌گیرد در حالیکه افزایش بارز کلسیم در مرحلهٔ 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 زنندهٔ کلسیم) بداخل تخم توتیای دریایی تزریق می‌شود تخم‌ها بعد از لقاح قادر به انجام واکنش قشری نخواهند بود. سوم، اگر ناحیهٔ 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 ناحیهٔ 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 نشانهٔ 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 بوسیلهٔ 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 هستهٔ 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 ۱۰ تا ۲۰ دقیقه بعد از اتصال اسپرم کامل می‌شود. قبل از اینکه هستهٔ اسپرم قادر به تشکیل سین‌کاریون باشد لازم است اسپرم یک دورهٔ رسیدگی را در سیتوپلاسم تخم طی کند و آن شامل معکوس شدن سریع مراحلی است که طی اسپرمیوژنز سبب تغییر طرح هستهٔ 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 هستهٔ هاپلوئید تخم تجدید سازمان می‌یابد و اکنون بعنوان پیش‌هسته یا **پرونوکلئوس ماده** (female pronucleus) شناخته می‌شود. به محض اینکه هستهٔ اسپرم وارد تخم شد و دورهٔ رسیدگی خود را شروع می‌کند بعنوان **پرونوکلئوس نر** (male pronucleus) خوانده می‌شود. وقایعی که طی آن هستهٔ 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.

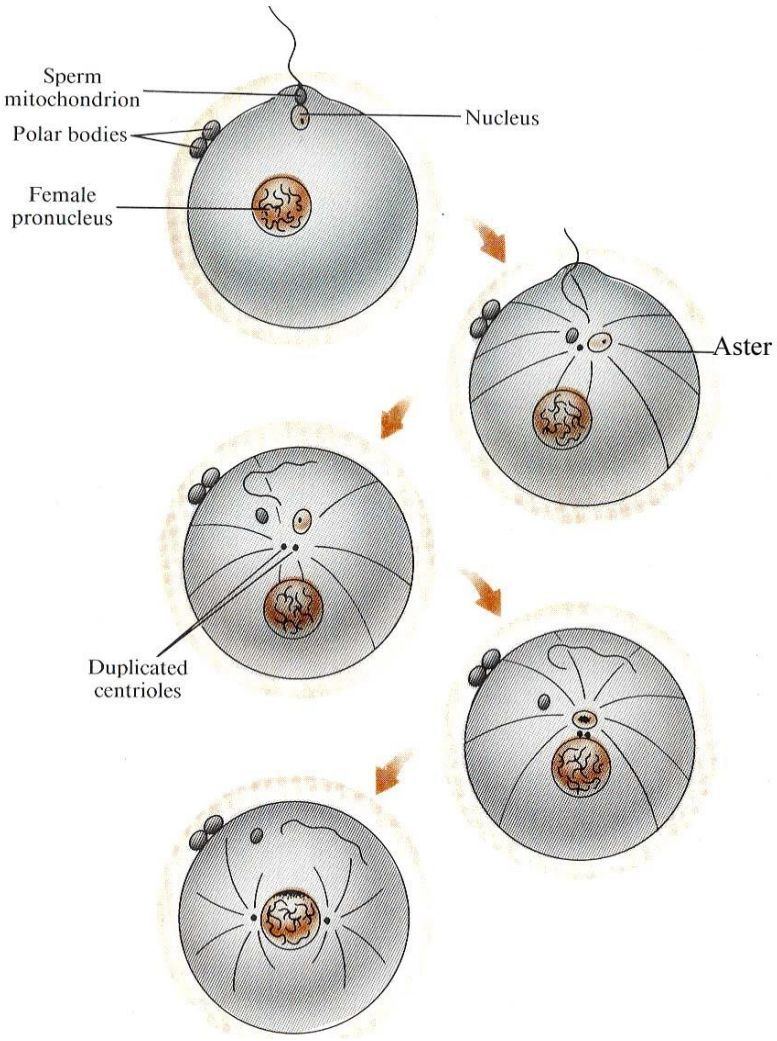
در توتیا هستهٔ اسپرم ابتدا بداخل مخروط لقاح وارد می‌شود. بزودی پس از ورود به سیتوپلاسم تخم هستهٔ اسپرم متورم شده و پاکت هسته‌ای آن قطعه قطعه شده و بشکل وزیکولهایی در اطراف کروماتین اسپرم که در حال از دست دادن تراکم خود می‌باشد قرار می‌گیرد. این وزیکولها نهایتاً در داخل اندامکهای غشایی سیتوپلاسم تخم از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

فرآیند کاهش تراکم کروماتین از ناحیهٔ محیطی هستهٔ اسپرم شروع شده و بطرف مرکز هسته پیشروی می‌کند. این فرآیند با از دست رفتن هیستون H1 اسپرم و جایگزینی آن با گونهٔ جدیدی از هیستون H1 که از سیتوپلاسم تخم منشاء می‌گیرد بانجام می‌رسد. همچنانکه در بخش ۳-۴ توصیف شد، هنگامیکه اسپرم با پوشش ژله‌ای 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 ناحیهٔ مرکزی تخم قرار دارد در حالیکه پرونوکلئوس نر در ناحیهٔ 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 سانتریولهای زوج اسپرم بطرف خارج امتداد می‌یابند. این سانتریولها به همراه هستهٔ اسپرم وارد تخم شده و بعنوان بخشی از **مرکز سازمان‌دهندهٔ میکروتوبولی** (MTOC) برای تشکیل آستر اسپرمی عمل می‌کند. میکروتوبولهای آستری بطرف ناحیهٔ قشری تخم و در مجاورت غشاء پرونوکلئوس نر امتداد می‌یابند. حرکات پرونوکلئوس نر و ماده بعد از لقاح در شکل ۱۱-۴ 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 نتیجهٔ ادامهٔ 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 کنندهٔ 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 بوسیلهٔ **همجواری** (approximation) بوجود می‌آید. همجواری 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 صفحهٔ متافازی با هم ترکیب می‌شوند. پستانداران و توتیای دریایی از نظر حرکات پرونوکلئوسها در تخم و استفادهٔ 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 ۱۱-٤)** دیاگرام حرکات پرونوکلئوسها در طی لقاح توتیای دریایی.

تغییری که طی تشکیل پرونوکلئوس نر 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 ۶/۸ به ۷/۳ 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 معاوضهٔ $Na^+/H^+$ می‌گردد و در نتیجه پرونوکلئوس نر و ماده تشکیل نمی‌شود. این آزمایش پیشنهاد می‌کند که فرآیند مهاجرت پرونوکلئوسها بطور طبیعی بوسیلهٔ 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.

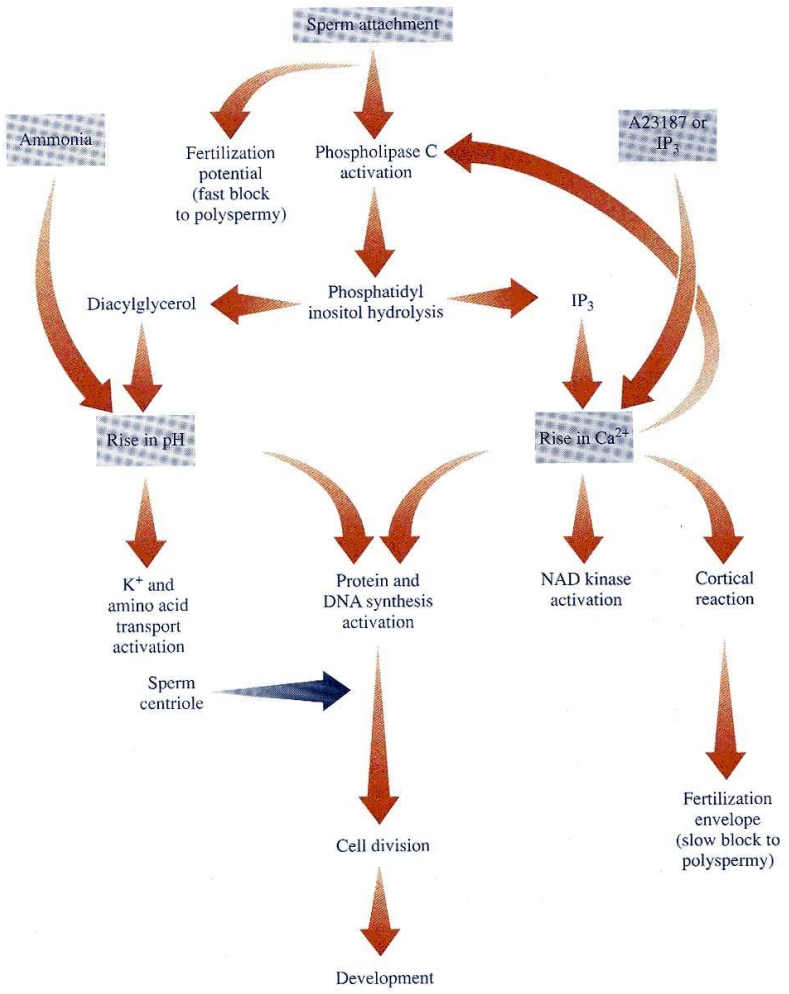
## ۴-۵) شروع رشد و نمو

همانطور که قبلاً نیز ذکر شد اتحاد اسپرم و تخم سبب شروع یکسری از وقایع مولکولی می‌گردد که مجموعاً بنام برنامهٔ فعال شدن شناخته می‌شود. بعضی از این وقایع از جمله پاسخهای انتهایی به لقاح (رجوع به شکل ۱۳-۴) 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 می‌باشد. در این بخش ما وقایع تنظیم کنندهٔ کلیدی را که در طی برنامهٔ فعال شدن در توتیای دریایی اتفاق می‌افتد مورد بررسی قرار می‌دهیم. 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 برنامهٔ فعال شدن اتفاق می‌افتد چیست؟ آیا این برنامه نمایش دهندهٔ یک سری خطی از وقایع است یا معرف چندین مسیر موازی است؟ اگر مسیرهای موازی وجود دارد آنها از چه نقطه‌ای از هم منشعب می‌شوند؟ برای مثال، چون ایجاد پتانسیل لقاح یکی از اولین اتفاقات است این سوال مطرح می‌شود که آیا ایجاد این پتانسیل سبب تحریک وقایع بعدی می‌گردد یا خیر؟ پتانسیل لقاح را می‌توان بطور مصنوعی با وارد نمودن یک جریان مثبت به تخم لقاح نیافته ایجاد نمود لیکن این پتانسیل نمی‌تواند سبب بالا رفتن غلظت یون کلسیم و یا القاء شروع سایر وقایع برنامهٔ فعال شدن شود. نتایج مذکور نشان می‌دهد 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 برنامهٔ فعال شدن دخالت ندارد. بر خلاف پتانسیل لقاح بالا رفتن یون کلسیم سبب راه اندازی وقایع بعدی برنامهٔ فعال شدن می‌گردد. 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 می‌شود. با استفاده از چنین آزمایشاتی ارتباط بین وقایع مختلف در برنامهٔ فعال شدن در حال تحقیق می‌باشد. نتایج مقدماتی این مطالعات در شکل ۱۲-۴ خلاصه شده است.

شکل ۱۲-۴ نشان می‌دهد که واکنش قشری و فعال شدن DNAکیناز فقط به بالا رفتن یون کلسیم وابسته‌اند اما سایر وقایع برنامهٔ فعال شدن بوسیلهٔ ترکیبی از اثرات یون کلسیم و pH القاء می‌شود. نقش pH در فعال شدن سنتز پروتئین با آزمایشاتی که در آن تخم‌های لقاح نیافتهٔ توتیای دریایی با آمونیاک تیمار شدند نشان داده شد. هنگامی که آمونیاک به سیتوپلاسم وارد می‌شود با یون $H^+$کمپلکسی را تشکیل می‌دهد ($NH3 + H^+ \rightarrow NH4$) که نتیجهٔ آن بالا رفتن pH داخل سلولی می‌باشد. این تغییر منجر به تحریک سنتز DNA و پروتئین می‌شود. دو آزمایش دیگر انجام شده و در آنها نقش pH در برنامهٔ فعال شدن را نشان می‌دهد. اول: چون تغییر pH به فرآیند معاوضهٔ $Na^+/H^+$ وابسته است اگر $Na^+$ از محیط خارج سلولی برداشته شود این تغییر pH اتفاق نمی‌افتد. دوم: با قرار دادن تخم در آمیلورید (یک مهار کنندهٔ فرآیند معاوضهٔ $Na^+/H^+$) نیز می‌توان 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 می‌گردد. 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 می‌کند که بالا رفتن pH یکی دیگر از مراحل تنظیم کنندهٔ مهم در برنامهٔ فعال شدن توتیای دریایی است.

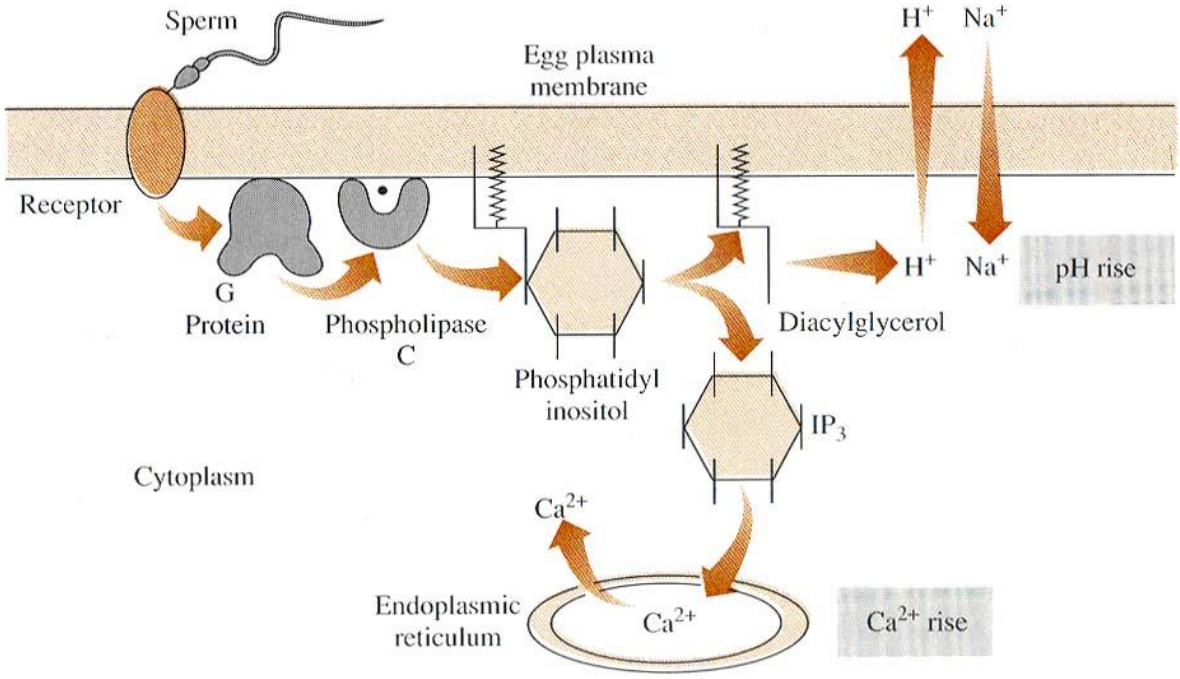



**شکل ۱۲-٤)** ارتباط بین وقایع برنامهٔ فعال شدن در توتیای دریایی.

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 آبشاری از واکنشها است که در اثر شکسته شدن یک لیپید غشایی بنام فسفاتیدیل اینوزیتول بوقوع می‌پیوندد. این آبشار در سلولهای سوماتیک کشف شده بطوریکه با اتصال یک هورمون پلی‌پپتیدی 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 ۱۳-۴ نشان داده شده است. وقایع آغازین این آبشار 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 بنوبهٔ خود سبب فعال شدن آنزیم فسفولیپازC 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 کنندهٔ G-پروتئینی بداخل غشاء تخم تزریق می‌کند. فسفولیپازC سبب هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول به دی‌اسیل گلیسرول و IP3 می‌شود. دی‌اسیل گلیسرول در غشاء تخم باقی مانده و در آنجا مسئولیت معاوضهٔ $Na^+/H^+$ را به عهده می‌گیرد و موجب بالا رفتن pH می‌شود. بر عکس IP3 از غشاء جدا و بداخل سیتوپلاسم انتشار می‌یابد و در آنجا به شبکهٔ اندوپلاسمیک متصل و فرآیند آزادسازی یون کلسیم بداخل سیتوپلاسم را موجب می‌شود. نقش IP3

در بالا رفتن غلظت یون کلسیم سیتوپلاسم با آزمایشات زیر تایید می‌شود. اول: نشان داده شده که افزایش موقتی در IP3 یکی از اولین وقایعی است که طی برنامهٔ فعال شدن اتفاق می‌افتد. دوم: تخم‌ها را می‌توان با تزریق IP3 فعال نمود. بعلاوه، پیشنهاد شده که IP3 بخشی از یک چرخهٔ فیدبک در برنامهٔ فعال شدن تخم است. بر طبق این عقیده کلسیمی که توسط IP3 آزاد می‌شود از نقطهٔ الحاق اسپرم-تخم به سایر بخشهای مجاور غشاء منتشر می‌شود و فعال شدن فسفولیپازC را تحریک می‌کند بطوریکه هرچه IP3 بیشتری تولید شود کلسیم بیشتری نیز آزاد می‌گردد (اشکال ۱۲-۴ و ۱۳-۴). گمان می‌رود این چرخهٔ 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 شکسته‌شدن 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 برنامهٔ فعال شدن شروع به شکل گرفتن می‌نمایند (شکل ۱۲-۴).




**شکل ۱۳-٤)** مسیر شکسته‌شدن فسفاتیدیل اینوزیتول و نقش آن در فعال شدن یون کلسیم و بالارفتن pH در تخم لقاح یافتهٔ تویتیای دریایی.

آیا وقایعی که برنامهٔ فعال شدن تخم توتیای دریایی را کنترل می‌کند در سایر موجودات نیز وجود دارند؟ موقعیکه IP3 و آکورین بداخل تخم ماهی مداکا تزریق می‌شود یک موج کلسیمی در آن ایجاد می‌شود که مشابه حالتی است که متعاقب لقاح اتفاق می‌افتد. بنظر می‌رسد که برنامهٔ 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 کنندهٔ 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 مرحلهٔ متفاوتی متوقف می‌شود و در زمان لقاح از لحاظ متابولیکی کاملاً غیرفعال است. برعکس تخم دوزیستان در متافاز دومین تقسیم میوز متوقف می‌شود و از لحاظ متابولیکی بسیار فعال است. در دوزیستان لقاح موجب افزایش متوسطی در سنتز پروتئین می‌گردد ولی در توتیای دریایی لقاح سبب می‌شود که سنتز پروتئین بین ۲۰ تا ۴۰ برابر افزایش پیدا کند. اما بنظر می‌رسد این تغییرات نتیجهٔ سازگاری است تا نتیجهٔ فعال شدن. واضح است که بایستی تحقیقات بیشتری روی موجودات مختلف انجام شود تا اینکه در نهایت بتوان یک تصویر کلی از برنامهٔ فعال شدن تخم ارائه داد.

## ۶-۴) 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 بوسیلهٔ ابزارهای فیزیکی یا شیمیایی است. چون عامل همگانی و اصلی شروع برنامهٔ 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 بوسیلهٔ یونوفور 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 سانتریول و آستر اسپرمی هستند. اصطلاح **روش مضاعف** (double method) نوعی القاء بکرزایی مصنوعی در توتیای دریایی است که شامل تیمار نمودن اولیهٔ تخم با اسید بوتیریک (فعال کنندهٔ ریزش یون کلسیم) و متعاقباً اضافه نمودن آب هیپرتونیک دریا (القاء کنندهٔ 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 کنندهٔ ریزش کلسیم) منجر به فعال شدن ناقص تخم می‌گردد ولی استفاده از سوزن آغشته به خون منجر به ایجاد جنین‌هایی می شود که تا مرحلهٔ لاروی رشد می‌کنند. دلیل این موضوع این است که MTOC سلولهای خونی پاره شدهٔ 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 آشفتگی فیزیکی تخم می باشد. 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 برنامهٔ فعال

شدن تخم می‌گردند. بعضی از سمندرهای بکرزا از یک روش غیرطبیعی برای فعال کردن تخم استفاده می‌کنند بدین ترتیب که سمندر ماده با یک سمندر نر از یک گونهٔ دیگر جفت گیری می‌کند. در اینجا اسپرم ناهمگون به تخم وارد و تخم گونهٔ بکرزا را فعال می‌کند ولی اطلاعات ژنتیکی هستهٔ 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 پیش‌هستهٔ نر حالت دیپلوئید کروموزومها را مجدداً برقرار نمایند. این مشکل معمولاً با تحمیل یک دور اضافی سنتز DNA و همانندسازی کروموزوم بوسیلهٔ میتوز یا میوز در طی مراحل اولیهٔ 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.

## ۷-۴) خلاصهٔ فصل

اسپرم و تخم در مرحلهٔ لقاح با هم متحد می‌شوند تا تعداد دیپلوئید کروموزومها را بازسازی و رشد و نمو جنین را آغاز کنند. گامتها دارای ویژگیهای ریخت‌شناسی منحصر به خود می‌باشند که در پیشبرد لقاح موثر است. اسپرم یک سلول آئرودینامیک و متحرک است که اطلاعات ژنتیکی پدری را به تخم منتقل می‌کند در حالیکه تخم سلولی بزرگ و حاوی ذخایری از مواد است که برای حمایت از رشد و نمو جنین ضروری بوده و بوسیلهٔ پوششهای تخصص‌یافته‌ای احاطه می‌شود که تعداد اسپرمهایی را که در لقاح شرکت می‌کنند کنترل می‌نمایند. بخش اعظم دانش ما در بارهٔ لقاح حاصل مطالعاتی است که روی توتیای دریایی و پستانداران صورت گرفته است. قبل از لقاح اسپرم قدرت تحرک پیدا کرده و بطرف تخم شنا کرده و از غشاءهای تخم عبور می‌کند. در توتیا رها شدن اسپرم به آب دریا سبب بالا رفتن pH سیتوپلاسم و در نتیجه کسب قدرت تحرک بوسیلهٔ اسپرم می‌شود. در پستانداران اسپرم پس از قرار گرفتن در داخل دستگاه تناسلی ماده قدرت تحرک خود را بدست می‌آورد ولی برای عبور از پوشش‌های اطراف تخم بایستی فرآیند ظرفیت‌پذیری را نیز پشت سر بگذراند. واکنش آکروزومی با هجوم کلسیم خارج سلولی در هنگام تماس اسپرم با پوشش تخم صورت می‌گیرد. اگزوسیتوز آکروزوم سبب بیرون ریختن آنزیمهای هیدرولیتیک شده و این آنزیمها پوششهای تخم را هیدرولیز و عبور اسپرم از میان آنها را تسهیل می‌کنند. اسپرم پستانداران بداخل منطقهٔ شفاف نفوذ کرده و در حالت مماس با تخم متحد می‌شود. اسپرم توتیای بداخل پوشش ژله‌ای و پاکت زرده‌ای نفوذ کرده و بحالت عمودی با تخم متحد می‌شود. یک زائدهٔ آکروزومی از نوک قدامی اسپرم توتیا خارج شده و بعد از تماس با غشاء پلاسمایی تخم با آن ترکیب می‌شود. در ناحیهٔ الحاق اسپرم-تخم یک مخروط لقاح تشکیل و در نهایت اسپرم بداخل تخم بلعیده می‌شود.

موقعیکه هستهٔ اسپرم وارد تخم شد سازمان‌بندی آن دچار تغییر شده و این امکان برای آن فراهم می‌شود تا با هستهٔ تخم ترکیب شود. درهم‌آمیختگی اسپرم-تخم برنامهٔ فعال‌شدن تخم را شروع می‌نماید. وقایع اولیهٔ این برنامه از پلی‌اسپرمی جلوگیری می‌کند. در توتیای دریایی دو سد پلی‌اسپرمی وجود دارد: یکی سد سریع که ناشی از دپولاریزه شدن غشاء پلاسمائی است و دیگری سد آهسته که ناشی از اگزوسیتوز گرانولهای قشری و بلند شدن پاکت لقاح می‌باشد. اگزوسیتوز گرانولهای قشری بوسیلهٔ موجی از کلسیم سیتوپلاسمی که در نقطهٔ ورود اسپرم ایجاد می‌گردد

شروع می‌شود. سایر وقایع فعال شدن تخم شامل افزایش pH و تغییرات متابولیکی در نهایت منجر به تقسیم سلولی می‌گردد. این وقایع بوسیلهٔ تغییراتی در غشاء پلاسمایی تخم شروع می‌شود. این تغییرات شامل تجزیهٔ فسفاتیدیل اینوزیتول به دی‌اسیل‌گلیسرول و IP3 است که به ترتیب سبب افزایش pH و فعال شدن یون کلسیم داخل سلولی می‌شود. افزایش یون کلسیم و pH بطور متقابل سبب پیشبرد مراحل برنامهٔ فعال شدن می‌گردد. در بعضی موارد فعال شدن تخم می‌تواند در فقدان اسپرم و توسط یک محرکی که سبب شروع موج کلسیمی می‌گردد اتفاق بیافتد. این حالت منجر به بکرزایی می‌گردد و بکرزایی یعنی تولید یک جانور بدون شرکت ژنوم پدری.