جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

بررسی توانایی اسپرم در تحریک سیستم ایمنی و تحقیق و پژوهش درباره آنتی‌بادی ضد اسپرم (ASA)[1] نخستین بار در سال ۱۸۹۹ توسط Landsteiner و همکاران شرح داده شد. بر اساس یافته‌های وی اگر اسپرم یک گونه به گونه‌ای دیگر تزریق گردد، می‌تواند برای آن گونه، آنتی‌ژنیک باشد(۱). به دنبال آن، محققین دریافتند که هرگاه اسپرم هرگونه در معرض سیستم ایمنی همانگونه نیز قرارگیرد، دارای قدرت آنتی‌ژنیک خواهد بود(۲). به طور کلی سد خونی- بیضه ممکن است توسط مکانیسم‌های مختلف، آسیب دیده و باعث در معرض قرار گرفتن آنتی‌ژن‌های اسپرم برای سیستم ایمنی شده و نهایتا سبب شروع پاسخ ایمنی و تشکیل ASA گردد(۳). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که حدود ۲۶-۶٪ علت ناباروری مربوط به تشکیل آنتی‌بادی ضداسپرم در مردان و زنان می‌باشد (۱۰-۱). بنابراین طراحی روشی جهت تشخیص و اندازه‌گیری ASA از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. مشکل اساسی روش‌های تشخیص و اندازه‌گیریASA، طراحی روشی است که دارای حداقل خطا و حداقل نتایج کاذب باشد. روش‌های عمده تشخیصی که امروزه جهت تعیین کیفی و کمی ASA به کار می‌روند سه دسته‌اند: اولین روش‌های تشخیص ASA در سرم و سایر مایعات بیولوژیک، تست‌های غیرمستقیم براساس آگلوتیناسیون و فلوکولاسیون[2] مانند روش GAT[3]، روش F.D (TSAT)[4]، روش TAT[5]،روش MAR[6]،روش IBT[7] بودند. در بین این دسته، روشی که امروزه کاربرد فراوانی درآزمایشگاه‌ها و مراکز درمان نابارروی دارد، تست MAR و یا اصلاح شده آن، SpermMar می‌باشد. روش‌های تشخیصی که براساس آگلوتیناسیون و فلوکولاسیون بنا شده‌اند محدودیت‌های فراوانی دارند و به نظر نمی‌رسد که از حساسیت، اعتماد و ویژگی بالایی برخوردار باشند. از جمله اینکه نیاز به اسپرم زنده و متحرک با غلظت و تحرک مناسب دارند. نمونه سرم نیز باید از نظر کمپلمان، غیرفعال گردد. عمدهٔ این روش‌ها کیفی بوده و در آنها خطای چشمی وجود دارد. همچنین نیاز به داشتن یک منبع استاندارد از اسپرم‌های زنده همراه با سرم‌های کنترل مثبت و منفی، استاندارد کردن این تست‌ها را مشکل می‌سازد(۴،۱۱،۱۶). دسته دوم روش‌های براساس بی‌حرکت‌سازی اسپرم (SIT)[8] و سمیت سلولی بواسطه کمپلمان(CT)[9] می‌باشد. این روش‌ها نیز کیفی بوده و از حساسیت و اعتماد بالایی برخوردار نیستند و نیاز به نمونه اسپرم تازه با غلظت و تحرک مناسب دارند. همچنین آنتی‌بادی‌هایی که باعث اختلال در تحرک اسپرم نمی‌شوند، با روش SIT قابل تشخیص نمی‌باشند. لذا ممکن است نتایج منفی کاذب رخ دهد، مانند آنتی‌بادی‌های متصل به سر اسپرم که در میانکنش اسپرم- تخمک[10] دخالت داشته و در روند باروری مؤثر می‌باشند. روش CT نیز به برخی از آنتی‌بادی‌های ضداسپرم غیرحساس بوده و نیز رده آنتی‌بادی را مشخص نمی‌کند. همچنین این دو روش نمی‌توانند جهت تعیین ASA در پلاسمای سمینال به کار روند زیرا پلاسمای سمینال حاوی مهارکننده‌های کمپلمان می‌باشد(۴،۱۱،۱۴،۱۷). آنچه از بررسی روش‌های اندازه‌گیری بر مبنای آگلوتیناسیون و فلوکولاسیون، بی‌حرکت‌سازی و سمیت سلولی بواسطه کمپلمان مسلم می‌باشد، این است که اولاً هیچ کدام اطلاعات کمی درباره میزان ASA در اختیار قرار نمی‌دهند، ثانیاً در تمامی روش‌های غیرمستقیم، عدم

1- Antisperm Antibody
2- Flocculation & Agglutination
3- Gel Agglutination Test
4- Franklin & Dukes or Tube Slide Agglutination Test
5- Tray Agglutination Test
6- Mixed Agglutination Reaction or Mixed Antiglobulin Reaction
7- Immuno Bead Test
8- Sperm Immunobilization Test
9- Cytotoxic Test
10- Sperm- Oocyle Interaction

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

یکسان بودن نتایج حاصل از این روش‌ها به دلیل عدم استفاده از تنوع آنتی‌ژنیک (عدم استفاده از نمونه‌های تعداد زیادی از اشخاص به عنوان منبع آنتی‌ژنی) وجود دارد و بررسی چشمی نتایج در این روشها به صورت ماکروسکوپی یا میکروسکوپی باعث افزایش خطا می‌گردد. همچنین این روش‌ها به اسپرم متحرک و زنده با غلظت و تحرک مناسب نیاز دارد و استفاده از مایع منی کامل حاوی اسپرم غیرزنده و یا دارای تحرک کم احتمال نتایج مثبت و منفی کاذب را افزایش می‌دهند. دسته سوم، روش‌هایی هستند که براساس استفاده از آنتی‌ایمونوگلوبولین نشاندار مانند روش ایمونوفلورسانس (IFT)[1] یا رادیوایمونواسی(RIA)[2] و یا الایزا (ELISA)[3] بنا شده‌اند. این روش‌ها روی سوسپانسیون اسپرم‌های زنده به عنوان تست‌های مستقیم و یا روی پلاسمای سمینال و سرم به صورت غیرمستقیم انجام می‌گیرد. روش RIA اگرچه دارای حساسیت بالایی است، میزان اسپرم‌های پوشیده شده با آنتی‌بادی و محل اتصال اختصاصی آنتی‌بادی را مشخص نمی‌کند. از محدودیت‌های دیگر این روش گران بودن آن و عوارض ناشی از کاربرد مواد رادیواکتیو می‌باشد. همچنین به اسپرم اهدائی متحرک نیاز داشته و به دلیل در معرض قرار دادن آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم در اثر مواد تثبیت کننده منتهی به نتایج مثبت کاذب می‌گردد (۴،۱۱،۱۲،۱۴،۱۷،۱۸). در روش IFT نیز استفاده از مواد تثبیت کننده، شاخص‌های آنتی‌ژنی غشای اسپرم را تغییر داده و آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم را در معرض قرار می‌دهد. بنابراین ممکن است سبب ایجاد نتایج مثبت کاذب گردد. همچنین مانند سایر روش‌ها، نیازمند نمونه تازه بوده و نیز وقت‌گیر و گران قیمت می‌باشد(۱۱،۱۲،۱۸،۱۹). روش فلوسیتومتری نیز به خاطر توانایی آن در اندازه‌گیری کمی آنتی‌بادی‌های موجود در سطح اسپرم، از دورنمای روشنی برخوردار است. مزیت عمده استفاده از روش فلوسیتومتری (FC) کمی‌بودن آن و تعیین رده ایمونوگلوبولین است. از آنجائی که از اسپرم‌های غیرمتحرک باید برای این کار استفاده شود ممکن است بعد از بی‌حرکت کردن و تثبیت آن نتایج مثبت کاذب ایجاد گردد. علاوه بر این طولانی‌بودن زمان تست و گران‌بودن آن استفاده از این روش را محدود کرده است(۴،۱۸).

از مزایای روش الایزا استفاده از مخلوط متنوع آنتی‌ژنی از اشخاص مختلف است زیرا استفاده از مایع سمینال یک فرد که سبب تغییر از نمونه‌ای به نمونه دیگر می‌گردد و با تأثیر عمده در اندازه‌گیری، سبب نتایج منفی کاذب می‌گردد، وجود ندارد. همچنین روش الایزا یک روش کمی بوده، رده آنتی‌بادی را مشخص می‌کند. در این روش به نمونهٔ مایع منی تازه با اسپرم‌های متحرک و زنده نیاز نمی‌باشد (۱۰،۱۲،۱۵،۱۷،۱۸،۲۰). بررسی مطالعات نشان می‌دهند که بین روش‌های تشخیص ASA، روش الایزا، درصورتیکه از آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم با حداقل آلودگی به آنتی‌ژن‌های غیراسپرمی و آنتی‌ژن‌های داخل سلولی، استفاده گردد، روشی بسیار حساس و قابل اعتماد بوده و بهتر از سایر روش‌های تشخیص و اندازه‌گیریASA می‌باشد. لیتیوم دی یدوسالیسیلات (LIS)[4] و SDS از جمله دترجنت‌هائی هستند که جهت استخراج آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۵،۲۱،۲۲).

هدف از مطالعه حاضر طراحی یک روش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده از سطح اسپرم به وسیله سه روش مختلف سونیکاسیون، استفاده از دترجنت SDS و روش استفاده از دترجنت LIS و مقایسه هر یک از این روش‌ها و کیت‌های الایزای تجاری مشابه(از شرکت‌های IBL و Bioserv، آلمان) با

1- Immuno Flourescence Test
2- Radio Immunoassay
3- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
4- Lithium Iodo Sylicylate

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

روش روتین مورد استفاده در مراکز درمان ناباروری(SpermMar) به عنوان تست روتین می‌باشد، بدین ترتیب مزایا و معایب روش الایزای طراحی شده جهت اندازه‌گیری ASA در مقایسه با سایر روش‌ها مشخص خواهد گردید.

مواد و روشها

تهیه اسپرم: مایع سمینال از افرادی که به علل مختلف ناباروری به آزمایشگاه نور تهران مراجعه کردند، جمع‌آوری و در حرارت ۲۰- ℃ ذخیره گردید تا حجم نهایی آن به ۱۰۰*ml* برسد. نمونه‌های مایع سمینال با لوکوسیت بیشتر از یک میلیون در میلی‌لیتر و یا نمونه‌های حاوی باکتری فراوان و یا مشکوک به عفونت حذف گردید. سپس تمامی ۱۰۰*ml* مایع سمینال ذوب و به نسبت ۱:۱ با بافر PBS[1] (۰/۱۵*M*) مخلوط و سه مرتبه شسته شد به طوری که در هر دفعه استخراج حدود ۲*ml* رسوب اسپرم به دست آمد.

تهیه آنتی‌ژن به روش سونیکاسیون: جهت تهیه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم به روش سونیکاسیون ۲*ml* رسوب به دست آمده طی شستشوی مایع سمینال، به نسبت ۱:۱۰ در محیط هیپواسمتیک (۷/۳۵g سیترات سدیم و ۱۳/۵۱g فروکتوز در ۱ لیتر آب مقطر) مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۳۷ ℃ قرار گرفت و پس از طی مدت ۲ ساعت، داخل بشر حاوی یخ منتقل شده و بعد از اضافه کردن ۱*ml*محلول PMSF[2] با غلظت ۲۰*mM*، محلول حاصل با سرعت ۱۲۰۰ *U/min* و به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ ℃ هموژنایز گردید. جهت اجتناب از گرم شدن نمونه طی هموژنایزاسیون، بهتر است ظرف نمونه در داخل بشر حاوی یخ خردشده، قرارگیرد. سپس مخلوط حاصل توسط دستگاه سونیکاسیون به مدت ۲ دقیقه با قدرت ۱۰*KH* در حرارت ۴ ℃ سونیکه گردید. جهت اجتناب از افزایش دمای نمونه، ظرف نمونه در بشر حاوی یخ خرد شده، قرار داده شد. سپس نمونه‌ها با قدرت ۴۰۰۰*g* به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۴ ℃ سانتریفوژ و محلول رویی آن جدا گردید. محلول رویی با قدرت ۱۰۰۰۰ *g* به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۴ ℃ سانتریفوژ و مجدداً محلول رویی جدا شد. محلول رویی با قدرت ۱۰۰۰۰۰*g* به مدت ۲ ساعت در حرارت ۴ ℃ تحت اولتراسانتریفوژ قرارگرفت. در این مرحله، محلول رویی دور ریخته شد و رسوب این مرحله که حاوی غشای پلاسمایی سلول‌های اسپرم بود در مقدار مورد نیاز بافر PBS (۰/۱۵*M*) حل گردید(۲۷-۲۳،۱۵).

تهیه آنتی‌ژن با استفاده از دترجنت SDS: جهت تهیه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم با استفاده از دترجنت SDS در یک لوله آزمایش، بر روی ۱*ml* رسوب اسپرم، ۲/۵*ml* محلول SDS (٪۰/۵ *W/V*) اضافه شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب‌جوش قرار داده شد. در پایان ۱۰ دقیقه، لوله خارج و سرد گردید. سپس مخلوط حاصل با قدرت ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت۲۵ ℃ سانتریفوژ شد. محلول رویی این مرحله جدا شده و در مقابل PBS (۰/۱۵*M*) دیالیز گردید(۲۸).

تهیه آنتی‌ژن با استفاده از دترجنت LIS: جهت تهیه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم با استفاده از دترجنت LIS بر روی ۱*ml* رسوب اسپرم، ۲/۵*ml* محلول LIS (۰/۳ *M*) در بافرTris-HCl (pH=۷/۴، ۱۰ *mM*) اضافه و به کمک پیپت پاستور کاملاً مخلوط گردید. پس از قرار دادن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه مخلوط حاصل با قدرت ۱۵۰۰۰*g* به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ ℃ سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی برداشت و به رسوب حاصل دوباره ۲/۵*ml* محلول LIS اضافه و مجدداً سانتریفوژ گردید. مجموع محلول رویی هر دو مرحله، جمع‌آوری و در مقابل بافر Tris-HCl (pH =۷/۴، ۱۰*mM*) دیالیز گردید(۲۹،۱۵).

1- Phosphate Buffered Solution
2- Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

تست الایزا: جهت انجام تست الایزا در این مطالعه، روش الایزای غیرمستقیم متشکل از سه لایه طراحی شد. *لایه اول: اتصال آنتی‌ژن به کف پلیت الایزا*[1]. از آنتی‌ژن تهیه شده طی روش‌های مختلف، سه محلول آنتی‌ژن با غلظت اپتی‌مم ٤ *μg/ml* و به حجم مورد نیاز در بافر مناسب تهیه گردید (برای روش سونیکاسیون و دترجنت SDS از بافر PBS، pH=٧/٤، ٠/١٥*M* و برای روش دترجنت LIS از بافر Tris ، pH=٧/٤، ١٠*m*M). از هر محلول آنتی‌ژنی تهیه شده به مقدار ١٠٠ *μl* در هر چاهک ریخته شد و به مدت ٢ ساعت در انکوباتور ٣٧ *°C* قرار گرفت. محتوای پلیت در پایان زمان انکوباسیون تخلیه و سپس داخل چاهک‌ها سه مرتبه با بافر شستشو[2](PBS حاوی توئین ٠/٠٥٪)، شسته شد. سپس ١٥٠ *μl* از بافر بلاک‌کننده[3] (PBS حاوی توئین ٢/٥٪) به هر چاهک اضافه گردید و ٤٥ دقیقه در انکوباتور ٣٧ *°C* قرار گرفت و سپس مانند مرحله قبل داخل چاهک‌ها، سه مرتبه شستشو داده شد. *لایه دوم: اضافه‌کردن آنتی‌بادی اولیه*[4]. از سرم بیماران (استاندارد یا کنترل) رقت $\frac{1}{100}$ در بافر رقیق کننده[5] (PBS حاوی توئین ٠/٥٪) تهیه و مقدار ١٠٠ *μl* به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ١ ساعت در انکوباتور ٣٧ *°C* قرار گرفت. سپس مانند مراحل قبل چاهک‌ها، سه مرتبه شسته شد. *لایه سوم: افزودنی آنتی‌بادی کونژوگه*[6] به عنوان *آنتی‌بادی ثانویه*[7]. از کونژوگه HRP[8] رقت اپتی‌مم $\frac{1}{1500}$ در بافر رقیق‌کننده، به حجم مورد نیاز تهیه، مقدار ١٠٠ *μl* به هر چاهک اضافه کرده و به مدت ١ ساعت در انکوباتور ٣٧ *°C* قرار داده شد. شستشوی چاهک‌ها مطابق قبل به تعداد پنج مرتبه انجام شد. سپس مقدار ١٠٠ *μl* از سوبسترای آماده TMB[9] به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ١٠ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از طی این زمان مقدار ٥٠ *μl* اسید سولفوریک ١ نرمال به هر چاهک اضافه گردید و به کمک دستگاه الایزا ریدر جذب نوری چاهکها در طول موج ٤٥٠ *nm* قرائت شد.

امروزه روش الایزا به علت مزایای آن نسبت به سایر روش‌ها، یک روش رایج در اندازه‌گیری ASA در اغلب کشورها می‌باشد و شرکت‌های تجاری متعددی، کیت تشخیصی آن را تولید و به بازار عرضه کرده‌اند. برای بررسی کارآیی روش طراحی شده در این تحقیق علاوه بر مقایسه این روش با روش رایج SpermMar test، دو کیت تجاری رایج از شرکتهای IBL و Bioserv آلمان تهیه گردید و نتایج حاصل از این دو کیت نیز در کنار روش طراحی شده با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک دترجنت LIS بر روی نمونه‌های سرم یکسان با تست استانداردSpermMar مورد مقایسه قرار گرفت. روش کار مطابق بروشور موجود در کیتها بوده و از آنجایی که اساس روش الایزا در این دو کیت مثل روش توضیح داده شده، می‌باشد از تکرار آن خودداری می‌گردد.

تست SpermMar: جهت تست SpermMar ابتدا در یک لوله آزمایش یک حجم مایع سمینال تازه با ٥ حجم محیط Ham's F-10 مخلوط و با قدرت ٣٠٠ *g* به مدت ١٠ دقیقه در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ گردید. پس از حذف محلول رویی، روی رسوب باقی مانده دوباره مرحله فوق انجام گرفت. بر روی رسوب حاصل از مرحله قبل به آرامی حدود ٢*ml* محیط Ham's F-10 اضافه شده و به مدت ١ ساعت با زاویه ٤٥ درجه در انکوباتور ٣٧ *°C* قرار گرفت. پس از پایان انکوباسیون، محلول رویی حاوی اسپرم‌های متحرک، با پیپت پاستور و به دقت برداشته شد و به مدت ١٠ دقیقه با قدرت

1- Coating
2- Washing Buffer
3- Blocking Buffer
4- Primary Antibodies
5- Diluent Buffer
6- Conjugated antibody
7- Secondary Antibody
8- Horse Radish Peroxidase
9- Tetra Methyl Benzidine

۵۰۰*g* و در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی حذف و به رسوب حاصل آنقدر محیط Ham's F-10 اضافه شد تا شمارش سلولی در حدود ۳۰-۲۰ میلیون سلول متحرک اسپرم در هر میلی‌لیتر گردد. جهت انجام تست SpermMar غیرمستقیم، سرم‌ها باید از نظر کمپلمان غیرفعال گردند؛ لذا حدود ۱۰۰ *µl* از سرم‌های مورد آزمایش در یک میکروتیوب ریخته و به مدت ٤٥ دقیقه در بن‌ماری ٥٦°C قرار داده شد. سپس با استفاده از محیط Ham's F-10 از سرم‌ها رقت $\frac{1}{16}$ تهیه گردید (۵ *µl* سرم+ ۷۵ *µl* محیط Ham's F-10)، سپس ۵۰ *µl* از سرم رقیق شده با ۵۰ *µl* اسپرم متحرک مخلوط و به مدت ٦٠ دقیقه در انکوباتور ۳۷ ℃ قرار داده شد. پس از طی این مدت بر روی یک لام در سه نقطه نزدیک هم محلول‌های زیر قرار داده شدند. نقطه ۱: ۱۰ *µl* مخلوط سرم و اسپرم‌های متحرک. نقطه ۲: ۱۰ *µl* ذرات لاتکس موجود در کیت. نقطه ۳: ۱۰ *µl* آنتی‌سرم موجود در کیت. بلافاصله به کمک کناره لامل نقطه ۱ و ۲ را به آرامی مخلوط کرده، سپس نقطه ۳ (آنتی‌سرم) با مجموعه نمونه و لاتکس (مجموعه نقاط ۱ و ۲) مخلوط می‌گردد. مخلوط حاصل را با لامل پوشانده، پس از ۳-۲ دقیقه در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠X مورد ارزیابی قرار گرفت و درصد اسپرم‌های متحرک متصل به ذرات لاتکس شمارش شد. نمونه‌های منفی پس از ۱۰ دقیقه در محیط مرطوب دوباره مورد ارزیابی قرار گرفت تا نتیجه نهایی مشخص گردد(۳۰).

جهت بررسی همبستگی بین روش‌های مختلف استخراج آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم با تست SpermMar از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید.

نتایج

به منظور تهیه آنتی‌ژن مورد نیاز جهت طراحی روش الایزا به کمک سه روش مختلف استخراج آنتی‌ژنی، در هر دوره حدود ۱۰۰*ml* مایع سمینال شسته شده و در پایان شستشو، حدود ۲*ml* رسوب اسپرم به دست آمد که تعداد سلول‌های اسپرم آن حدود $۵-۱۰\times۱۰^{۹}$ اسپرم در هر میلی‌لیتر بود. میزان پروتئین از این مقدار اسپرم پس از مرحله تهیه آنتی‌ژن به یکی از سه روش مختلف به روش برادفورد، ۵۰۰-۱۰۰ *µg/ml* پروتئین به دست آمد که تفاوت زیادی در میزان پروتئین بدست آمده طی روش سونیکاسیون، استفاده از دترجنت SDS و LIS وجود نداشت. سپس میزان اپتی‌مم کونژوگه، آنتی‌سرم و آنتی‌ژن با سه روش مختلف استخراجی به عنوان لایه اول در تکنیک الایزا، تعیین گردید و پس از تعیین میزان Cut-off سرم‌های منفی، با احتساب$\overline{X}$ +2SD و منحنی ROC [1] محدوده مثبت و منفی بودن سرم‌ها از نظر ASA مشخص و میزان حساسیت، ویژگی، کارآیی و اعتبار هر روش طراحی شده تعیین گردید (جدول شماره ۱). سپس میزان Cut-off کیت‌های الایزای تجاری تعیین و منحنی استاندارد آنها رسم گردید. با توجه به نمودارمنحنی استاندارد، میزان Cut-off برای کیت ASA شرکت IBL برابر ۰/۷۲۹ و برای کیت شرکت Bioserv برابر ۰/٥٤ به دست آمد و سپس با استفاده از چند سرم مثبت و منفی، روش‌های الایزای طراحی شده طی سه روش مختلف استخراجی و کیت‌های تجاری الایزا، با تست روتین مورد استفاده در مراکز درمان ناباروری (SpermMar test) مقایسه گردید. همچنین نمودار شمارهٔ ۱، میزان همبستگی بین جذب‌های نوری الایزاهای طراحی شده و کیت‌های تجاری اندازه‌گیری ASA به روش فوق را با میزان درصدهای حاصل از تست SpermMar جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضداسپرم، نشان می‌دهند.

مقایسه میزان همبستگی الایزای طراحی شده با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده به روش سونیکاسیون و تست SpermMar نشان می‌دهد که همبستگی ضعیفی

1- Relative Operability Curve

جدول ۱- پارامترهای روش‌های الایزای طراحی شده با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده به روش سونیکاسیون، استفاده از دترجنت SDS و LIS و نیز دو کیت تجاری الایزا (Kit- 1 از شرکت IBL و kit-2 از شرکت Bioserv) در مقایسه با تست SpermMar جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضداسپرم و تعیین موارد مثبت (حقیقی و کاذب) و منفی (حقیقی و کاذب) در هر روش

روش الایزای / پارامترها	روش استخراج سونیکاسیون	روش استخراج با دترجنت SDS	روش استخراج با دترجنت LIS	درصد SpermMar	کیت شرکت IBL	کیت شرکت Bioserv
جذب نوری (OD) میانگین سرم‌های منفی	۱/۰۴۳	۰/۹۸۲	۰/۵۶۹	*	*	*
جذب نوری Cut-off	۱/۳۰۹	۱/۱۵۸	۰/۹۴۸	٪۳۰	۰/۷۲۹	۰/۵۴
جذب نوری کنترل منفی	۱/۵۱۲	۰/۳۶	۰/۳۸۵	*	*	*
حساسیت روش طراحی شده	٪۳۱	٪۸۱	٪۸۷/۵	*	*	*
ویژگی روش طراحی شده	٪۱۰۰	٪۶۶/۶	٪۱۰۰	*	*	*
کارآیی روش طراحی شده	٪۶۱	٪۷۵	٪۹۲/۸	*	*	*
تعداد سرم مورد استفاده	۲۸	۲۸	۲۸	۲۸	۲۶	۲۶
تعداد موارد مثبت حقیقی	۵	۱۳	۱۴	۱۶	۷	۴
تعداد موارد مثبت کاذب	۰	۴	۰	**	۱	۱
تعداد موارد منفی حقیقی	۱۲	۸	۱۲	۱۲	۹	۹
تعداد موارد منفی کاذب	۱۱	۳	۲	**	۹	۱۲

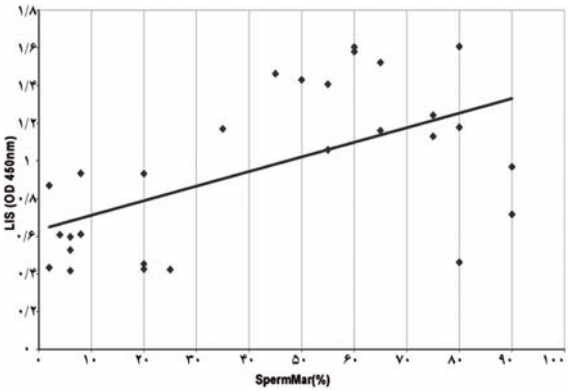
* این کیت‌ها به صورت آماده استفاده گردیده است. بنابراین نیاز به تعیین پارامترهای مذکور نمی‌باشد.

** در این مطالعه از کیت SpermMar به عنوان استاندارد استفاده شده است. بنابراین نتایج آن همگی حقیقی می‌باشند.

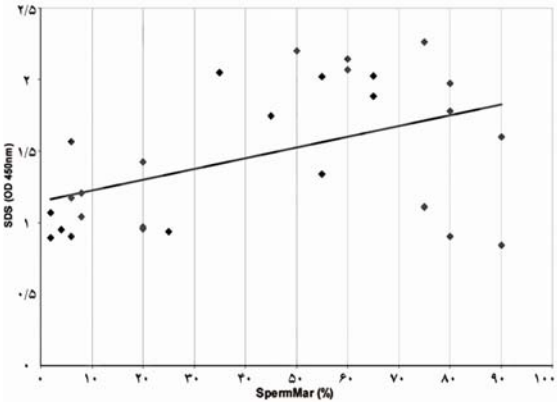
بین این دو روش وجود دارد (P =۰/۰۴۸ ، r=۰/۳۷۵)، محاسبه حساسیت، ویژگی و کارآیی این روش نیز نشان می‌دهد که حساسیت آن بسیار کم بوده (۳۱٪) و از کارآیی مناسبی برخوردار نیست (۶۱٪). البته این روش ویژگی مناسبی را نشان می‌دهد (۱۰۰٪) که احتمالاً کاذب بوده و به دلیل بالا بودن جذب نوری میزان Cut-off می‌باشد که به طور کاذب و به خاطر جذب غیر اختصاصی بالا رفته است.

بررسی همبستگی بین روش الایزای طراحی شده با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک دترجنت SDS و نتایج درصدهای حاصل از تست SpermMar یز نسبت به همبستگی بین روش سونیکاسیون و SpermMar، همبستگی بهتری دارد (r= /۴۷۲، p=۰/۰۱۱)؛ اما همبستگی بین الایزای طراحی شده با استفاده آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک دترجنت LIS و نتایج درصدهای حاصل از تست SpermMar بهتر از دو روش دیگر است (P=۰/۰۰۱ , r=۰/۵۷۲). بررسی میزان حساسیت، ویژگی و کارآیی الایزای طراحی شده به کمک دترجنت LIS و SDS نیز نشان می‌دهد که حساسیت روش استفاده از دترجنت LIS بیشتر از روش استفاده از دترجنت SDS می‌باشد (۸۷/۵٪ در مقابل ۸۱٪). همچنین روش استفاده از دترجنت LIS ویژگی بیشتری از روش استفاده از دترجنت SDS داشته (۱۰۰٪ در مقابل ۶۶/۶٪)، از کارآیی بسیار بالایی برخوردار است (۹۲/۸٪ در مقابل ۷۵٪).

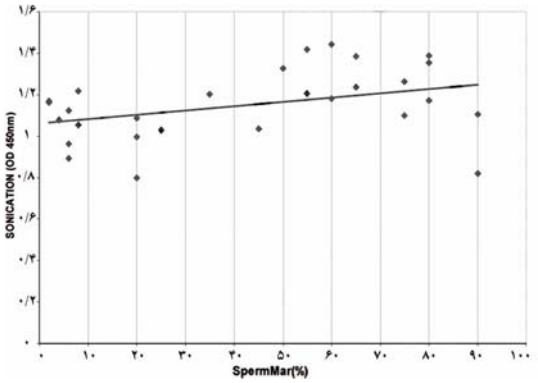
مقایسه کیت الایزای تجاری متعلق به شرکت IBL با روش SpermMar نشان می‌دهد که از بین ۱۶ سرم



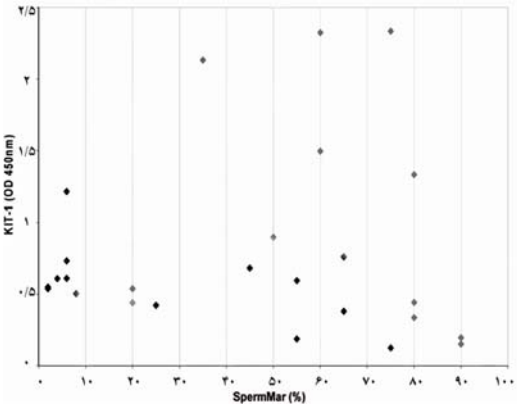
(P- value=۰/۰۰۱، ۰/۵۷۲= پیرسون)



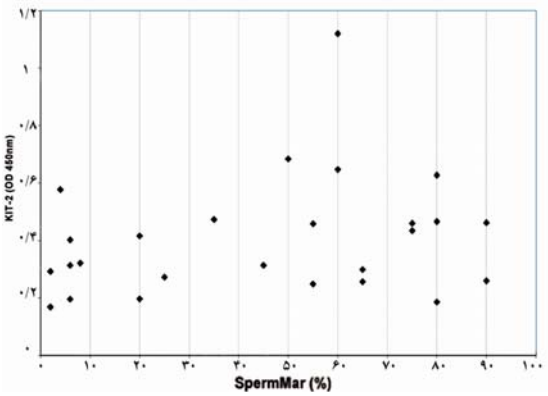
(P- value =۰/۰۱۱، ۰/۴۷۲= پیرسون)



(P- value=۰/۰۴۸، ۰/۳۷۵= پیرسون)



(P- value=۰/۸۴۵)



(P- value=۰/۲۱۶)

نمودار ۱- تعیین میزان همبستگی بین روش الایزای طراحی شده با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک سونیکاسیون، استفاده از دترجنت SDS و دترجنت LIS و نیز دو کیت تجاری الایزا (kit-1 از شرکت IBL و kit-2 از شرکت Bioserv) با نتایج درصدهای حاصل از تست SpermMar جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد اسپرم

ASA مثبت توسط SpermMar، ۹ مورد جواب منفی کاذب نشان می‌دهد و از بین ۱۰ مورد سرم ASA منفی، ۱ مورد جواب مثبت کاذب می‌دهد و براساس نمودار همبستگی، همبستگی بین این روش با SpermMar معنی‌دار نیست (P=۰/۸٤٥). همچنین مقایسه بین روش الایزای تجاری شرکت Bioserv با روش SpermMar نشان می‌دهد که این روش از بین ١٦ سرم ASA مثبت توسط SpermMar، ۱۲ مورد جواب منفی کاذب می‌دهد و از بین ۱۰ مورد سرم ASA منفی، ۱ مورد جواب مثبت کاذب دارد و براساس نمودار همبستگی، همبستگی بین این روش با SpermMar معنی‌دار نیست(P=۰/۲۱٦).

بحث

ناباروری از جمله مشکلات عمده است که در حدود ۱۵٪ زوجهای جوان بر طبق آمار ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی، گرفتار آن هستند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که وجود آنتی‌بادی ضداسپرم (ASA)، یکی از عوامل اصلی ناباروری است و بنابراین تعیین میزان آنتی‌بادی ضداسپرم نقش مهمی در تشخیص علت ناباروری و روند درمان ایفا می‌کند. از بین روش‌های مختلف تعیین میزان ASA، روش الایزا که اولین بار توسط Engvall و Permanm در سال ۱۹۷۱ مطرح گردید(٣٤)، از کارآیی بهتری نسبت به سایر روش‌های تعیین میزان ASA برخوردار است و مطالعات انجام شده توسط Alexander و همکاران (۱۹۸٤) نشان می‌دهد که روش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک دترجنت LIS می‌تواند حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش جهت تعیین کمی و کیفی ASA باشد(١٥).

همانطوریکه نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند روش استخراج آنتی‌ژنی به کمک سونیکاسیون قادر به تفکیک مناسب بین سرم‌های مثبت و منفی نیست. همانطوری‌که جذب‌های نوری و میزان Cut-off سرمهای ASA منفی با این روش نشان می‌دهد، جذب‌های نوری سرمهای منفی بسیار بالا است که علت آن احتمالاً ایجاد واکنش‌های کاذب بین سرم‌های منفی و آنتی‌ژنهای این روش و در نتیجه افزایش جذب نوری آنها و عدم امکان تفکیک جذب نوری بین سرم‌های منفی و مثبت می‌باشد. توضیح اینکه احتمالاً روش سونیکاسیون، روشی است که در آن آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم‌ها و سلول‌های غیر اسپرمی بیشتر در معرض محیط خارجی قرار می‌گیرند، بنابراین در نمونه پروتئینی ناخالصی که به عنوان لایه اول به کف پلیت الایزا متصل می‌شود، میزان فراوانی از آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم و غیراسپرمی وجود خواهد داشت. از آنجایی که سرم‌های افراد طبیعی با بسیاری از آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم و غیراسپرمی به دلیل تشابهات آنتی‌ژن، واکنش نشان می‌دهند، بدیهی خواهد بود که در طی این روش جذب نوری غیراختصاصی برای سرم‌های منفی مشاهده گردد. بنابراین با توجه به اشکالات فراوان ذکر شده در روش استخراجی سونیکاسیون پیشنهاد می‌گردد که از این روش جهت تهیه آنتی‌ژن‌های مورد نیاز برای طراحی روش الایزا استفاده نشود. روش SDS تفکیک بهتری نسبت به روش سونیکاسیون بین سرم‌های ASA مثبت و ASA منفی نشان می‌دهد، ولی با این وجود جذب نوری Cut-off مناسبی ارائه نمی‌دهد، چرا که با توجه به محدوده قابل اعتماد برای دستگاه الایزا بر طبق توصیه طراحان آن (OD < ۲) بهتر است که میزان جذب نوری Cut-off کمتر از عدد ۱باشد تا بتوان از محدوده جذب نوری بیشتری برای کنترل کردن جذب نوری سرم‌های ASA مثبت بهره گرفت و تیتر بالاتری از ASA را شناسایی کرد. این روش نیز میزان زیادی از آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم را علاوه بر آنتی‌ژن‌های سطحی، در معرض قرار می‌دهد، چرا که در این تکنیک، جوشاندن اسپرمها باعث لیز شدن آنها می‌گردد.

بنابراین به نظر می‌رسد که روش بهتر استخراج آنتی‌ژنی، روشی است که بتواند با حداقل آسیب به سلول‌های اسپرم آنتی‌ژن‌های سطحی آن را در دسترس قرار دهد. یعنی از روش‌ها و دترجنت‌هایی استفاده گردد که حداقل آسیب به سلول‌های اسپرم را باعث گردد و بهتر است از جوشاندن و سونیکاسیون طی تهیه آنتی‌ژن اجتناب گردد، روش استفاده از دترجنت LIS، روشی است که بهتر، ما را به اهداف مذکور می‌رساند مطالعات انجام گرفته، نشان می‌دهد که LIS ترکیبی است که آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم را با حداقل آسیب به سلول‌های اسپرم، از آن جدا می‌کند(۱۵) و در این روش جوشاندن و یا سونیکاسیون اعمال نشده است. بنابراین استخراج آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم به کمک دترجنت LIS می‌تواند روش مناسبی جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضداسپرم در تکنیک الایزا باشد. پژوهش حاضر نیز این فرضیه را ثابت می‌کند. به کمک دترجنت LIS، تفکیک بین سرم‌های ASA مثبت و سرم‌های ASA منفی بهتر از دو روش دیگر بوده و جذب نوری زمینه نیز کمتر است؛ به طوریکه حساسیت این روش را بالاتر برده و جواب‌های بهتری به دست می‌آید. همانطوریکه جدول جذب‌های نوری Cut-off نشان می‌دهد، این میزان به کمک دترجنت SDS کمتر از روش سونیکاسیون می‌باشد. بنابراین استفاده از دترجنت SDS کمتر از روش سونیکاسیون، آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم و غیراسپرمی را در معرض قرار می‌دهد. میزان جذب نوری Cut-off به کمک دترجنت LIS کمتر از دو روش فوق می‌باشد، پس می‌توان نتیجه گرفت که این روش، کمتر از دو روش دیگر آلودگی به آنتی‌ژن‌های داخلی اسپرم و غیر اسپرمی را نشان می‌دهد. بررسی نتایج نیز نشان می‌دهد که جواب‌های کاذب الایزای طراحی شده با استفاده از روش دترجنت SDS بیشتر از الایزای طراحی شده به کمک دترجنت LIS است. جواب‌های کاذب در الایزای طراحی شده با استفاده از روش دترجنت LIS دارای حداقل جواب‌های کاذب می‌باشد. بنابراین هرچند که استفاده از دترجنت SDS نسبت به روش سونیکاسیون بهتر است اما در درجه دوم اهمیت پس از روش دترجنت LIS قرار دارد.

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که استفاده از دترجنت LIS جهت تهیه آنتی ژن، حداقل آسیب به سلول‌های اسپرم را بهمراه داشته و قادر به شناسایی سرم‌های ASA مثبت بیشتری نسبت به روش‌های استخراجی دیگر است. مطالعات Alexander و همکاران (۱۹۸٤) نیز این گفته را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که دترجنت LIS به عنوان یک دترجنت کائوتروپ[1] با استخراج انتخابی گلیکوپروتئین‌های غشایی سلول‌ها حداقل آسیب را به سلول وارد کرده و محصول پروتئینی بیشتری نیز می‌دهد(۱۵). بنابراین می‌توان گفت استفاده از آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک دترجنت LIS در روش الایزا، بهتر از سایر روش‌های روتین جهت تعیین میزان ASA می‌باشد. این روش بدلیل استفاده از مخلوط متنوع آنتی‌ژنیک از اشخاص مختلف از کارآیی بالایی برخوردار است و عامل تک بعدی استفاده از مایع سمینال انفرادی که سبب تغییر نمونه‌ای به نمونه دیگر می‌شود و باعث نتایج منفی کاذب در سایر روش‌های تعیین میزان ASA می‌گردد، را نداشته را نداشته و از طرف دیگر ضرورت استفاده از نمونه مایع سمینال تازه با اسپرم‌های دارای غلظت و تحرک مناسب منتفی است و پلیت‌های دارای منبع آنتی‌ژنی را نیز می‌توان چندین ماه ذخیره و نگهداری نمود. این روش حساسیت و کارآیی بالایی داشته و در مقایسه با سایر روش‌ها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد(۱۷، ۱۵).

روش الایزا می‌تواند علاوه بر کیفی بودن، به صورت کمی بکار رود. یعنی تعداد زیادی نمونه بیماران، مورد ارزیابی قرار گرفته و واحدهای جذب نوری قرائت شده در مقابل استاندارد، به صورت عددی گزارش شوند.

1- Chaotrope

بنابراین ضرورت دارد در مراحل بعدی این پژوهش روش طراحی شده الایزا به کمک دترجنت LIS در تهیه کیت تشخیصی به صورت کمی درآید که جهت این کار از استانداردهای اولیه آنتی‌بادی ضد اسپرم(ASA) تهیه شده از موسسه بین المللی استانداردها و کنترل موارد بیولوژیک (NIBSC)[1] استفاده خواهد شد. ابتدا از این استانداردهای اولیه، استانداردهای ثانویه تهیه می گردد، به عبارت دیگر بر اساس این استانداردهای اولیه، از نمونه های سرم بیماران نابارور دارای ASA، استانداردهای ثانویه تهیه می‌شود. سپس مراحل کمی‌کردن کیت با استفاده از این استانداردها انجام می‌گردد. در مرحله بعد با اندازه گیری میزان ASA در دو گروه از افراد یعنی افراد سالم فاقد ASA و افراد دارای ASA، میزان کمی ASA تعیین و با تعیین میزان $\overline{X}$ +2SD در گروه افراد سالم و بارور محدوده طبیعی تغییرات غلظت ASA مشخص می‌گردد و در نهایت براساس نتایج حاصل، میزان حساسیت و ویژگی روش کمی طراحی شده، تعیین می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج طرح پژوهشی تخصیص یافته از سوی مرکز ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور به کد ۳۱۵۸/ت/م‌م، می‌باشد که در پژوهشکده ابن‌سینا انجام گرفته وبدینوسیله نویسندگان، مراتب تشکر و قدردانی را از مسئولین محترم آن مرکز اعلام می‌دارند. همچنین از مسئولین محترم مرکز درمانی شهید جعفری وابسته به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی و آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور به پاس مساعدت در تهیه نمونه‌های مورد آزمایش تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1-Landsteiner K., Zur kenntnis der spezifisch auf Blutkor-Perchen wirkende sera. Zentralbl Bakeriol.1899;25:546.
2-Lit.S. Sperm immunology. Infertility and fertility Control. Obstet Gynecol.1974;44:607-23.
3-Rumke P., Hellinga G. Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. Am J Clin Pathol. 1959; 32:357.
4-Mazumdar S., Levine A. S. AntiSperm anti-bodies: etiology, Pathogenesis, diagnosis, and treatment. Fertil Steril.1998;70(5):799-810.
5-Haas G.G., Jr., Cines D.B., Schreiber A.D. Immunologic infertility: identification of patients with antisperm antibodies. N Engl J Med.1980; 303:722-70.
6-Tsuji Y., Clausen H., Nudelman E., Kaizu T., Hakomori S.I., Isojima S. Human sperm carbo-hydrate antigen defined by an antisperm human monoclonal antibody drived from an infertile woman bearing antisperm antibodies in her serum. J Exp Med.1988;168:343-356.
7- Check J.H., Ardelson H.G., Bollendorf A. Effect of antisperm antibodies on computerized semen analysis. Arch Androl.1991;27:61-63
8-Pattinson H.A., Mortimer D. Prevalence of sperm surface antibodies in the male partners of infertile couples as determined by immunobead screening. Fertil Steril.1987;48:466-9.
9-Witkin S.S. Sperm– reactive antibodies as measured by enzyme linked immunosorbent assay. In: Mathur S., Fredricks C.M., (Editors). Perspectives in immunoreproduction: conception and contraception. Washington, Hemisphere Publishing Company.1988.
10-Heidenreich A., Bonfig R., Wilbert D.M., Strohmaier W.L., Engelmann U.H. Risk factor for antisperm antibodies in infertile men. Am J Reprod Immunol.1994;31:69-76.
11-Gilbert B.R., Witkin S.S., Goldstein M. Immunology of male infertility. AUA Update. 1990.
12-Bates C.A., Antisperm antibodies and male subfertility. Br J Urol.1997;80:691-7.
13-Dondero F., Gandini L., Lombardo F., Sala-cone P., Caponecchia L., Lenzi A. Antisperm

1- National Institute for Biological Standards and Control

antibody detection 1: methods and standard protocol. Am J Repod Immunol.1997;38:218-223.
14- Mandelbaum S.L., Diamon M.P., Decherney A.H., The impact of antisperm antibodies on human infertility. J Urol.1987;138:1-8.
15- Alexander N.J., Bearwood D. An immuno-sorption assay for antibodies to spermatozoa comparison with agglutination and immuno-bilization tests. Fertil Steril.1984;41 (2):270-76.
16- Alexander J.S., Galle P.C., Hass G.Gjr. Detection and titration of calss specific antisperm antibodies in serum using and enzyme-linked immunosorvent assay. Obster Gynecol. 1988; 71(5):681.
17- Windt M.L., Bouic P.J.D., Lombard C.J., Menkveld R., Kruger T.F. Antisperm antibody tests: Traditional methods compared to ELISA. Arch Androl.1989;23:139-145.
18-Francavilla F., Romano R., Santucci R., Verghetta G La., Abrizio P.D., Francavilla S. Naturally occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and implication for treatment. Front Biosci.1999;4:25.
19-Dondero F., Lombardo F., Gandini L., Lenzi A. Antisperm antibody detection: method and standard protocol. Androl.1999;31:305-308.
20- Lynch D.M., Howe S.E. Comparison of a direct and indirect ELISA for quantitating anti-sperm antibody in semen. J Androl.1987:8: 215-220.
21- Rumke P. The presence of sperm antibodies in the serum of two patients with oligospermia. Vox Sang.4.1954;135-40.
22- Wilson L. Sperm agglutinins in human semen and blood. Proc Soc Exp Biol Med.1954;85: 652-55.
23-Bohring C., Krause E., Habermann B., Krause W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies and their possible role in immunological infertility disease. Mol Hum Reprod.2001;7(2):113-118.
24-Benet-Rubnat J.M., Martinez P.,Lepp W.A.,Egozcue J. Detection of induced antisperm anti-bodies by an improved Enzyme-linked immuno-sorbent assay. Int J Fertil.1991;36(1): 48-56.
25- Saji F., Ohashi K., Kato M., Negro T., Tanizawa O. Clinical evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit for anti-sperm antibodies. Fertil Steril.1988;50:644-47.
26- Bohring C., Krause W. The characterization of human spermatozoa membrane proteins-surface antigens and immunological infertility. Electro-Phoresis.1999;20:1-5.
27- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo BG., Zaneveld L.J.D. Develp-ment of an assay to asess the functional intergrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.J Reprod Fertil.1984; 70:29-228.
28- Iborra A., Morte C., Fuentes P., Garcia-Framis V., Andolz P., Martinez P. Human sperm coating antigen from seminal plasma origin. Am J Reprod. Immunol.1996;36:118-125.
29- Baukloh V., Mettler L. Enzyme-linked Immu-nosorbent assay for sperm antibody detection and antigen analysis. J Immunol Methods.1983;56: 193-199.
30- Lenzi A., Gandini L., Lombardo F., Rago R., Paoli D., Dondero F. Antisperm antibodies detec-tion 2. Clinical, Biological and statistical correla-tion between methods. Am J Reprod Immunol. 1997;38:224-230.
31- Kurpisz M., Dobratz B., Alexander N.J. Sperm antigen and reactivity of antisperm monoclonal antibodies in ELISA. Androl.1993;25:175-79.
32-Reilly B.D., Goldberg E.H. Evaluation of a solid phase celluar enzyme immunoassay for detection of the serologically defined male antigen. J Immunol Methods.1991;142:121-126.
33-Crowther J.R. ELISA (theory and practice), 42. Mothod in molecular biology. Walker J.M (Series Editor).1995.
34- Engvall E., Perlmann P. Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971;8:871-875.