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

اسپرم پستانداران سلول تمایز یافته‌ای است که می‌توان سطح آن را از نظر شکل و نوع عملکرد، به مناطق مختلفی تقسیم‌بندی کرد. اسپرم انسان به سه قسمت مجزای سر، گردن و دم تقسیم می‌شود. سر اسپرم به طور عمده حاوی مواد ژنتیکی اسپرم و کیسهٔ آکروزومی[1] می‌باشد. در گردن اسپرم تعداد زیادی میتوکندری وجود دارد که تأمین کنندهٔ انرژی تحرک دم اسپرم است. دم اسپرم نیز با ساختار تاژکی خود عامل اصلی تحرک اسپرم می‌باشد(۱).

سطح سلول‌های تمایز یافته مانند اسپرم، توانایی انجام عملکردهای منحصر به فردی را دارد که ایفای هر یک از این اعمال، وابسته به حضور و نحوهٔ قرارگیری مولکول‌های ویژهٔ سطحی این سلولها می‌باشد. نوع ترکیب مولکولی در سطح بسیاری از سلول‌ها از جمله اسپرم مورد مطالعه قرار گرفته و واژهٔ آنتی‌ژن تمایزی برای مولکول‌های ایمونوژن مختص به بافت‌های مختلف، ابداع گردیده است(۲). با توجه به دخالت آنتی‌ژن‌های سطحی سلول در عملکردهای اختصاصی یک بافت، شناسایی این نوع آنتی‌ژن‌ها در مطالعه فعالیت انواع سلول‌ها، بسیار حایز اهمیت است. تفاوت در محل قرارگیری یک آنتی‌ژن خاص نیز می‌تواند شاخص مهم دیگری در فعالیت‌های خاص سطح سلول‌ها باشد. جذابیت زیادی که در این نوع تحقیقات وجود دارد، مطالعات انتوژنی[2] یعنی مطالعه تکاملی دو یا چند گونه متفاوت در مقایسه با یکدیگر و مطالعات فیلوژنی[3] یعنی مطالعه تکاملی یک گونه خاص به خودی خود می‌باشد که براساس نتایج تحقیقات می‌توان پروتئین خاصی را به عنوان یک پروتئین مختص به یک گونه و یا مشترک بین چند گونه، شناسایی کرد و نیز می‌توان عملکرد منحصر به فرد یا مشترک آن در گونه‌های مختلف را مطالعه و به نتایج جالب توجهی رسید(۳). با این تفاسیر، به دلیل آنکه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم اهمیت بسیار زیادی در لقاح اسپرم- تخمک و نیز سایر عملکردهای اسپرم دارند، مطالعه آنها راه‌گشای بسیاری از ناشناخته‌ها در فرآیند لقاح خواهد بود. همچنین می‌توان علت بسیاری از ناباروری‌های ناشی از نقص‌های مولکولی را ردیابی و درمان نمود. به همین دلیل در حال حاضر، تحقیقات زیادی روی واکسن‌های جلوگیری از بارداری[4]، در حال انجام است. برای مثال چند آنتی‌ژن اسپرمی از جمله،FA-1 و SP-10 کاندید استفاده در اینگونه واکسن‌ها هستند که می‌توان افراد را به صورت فعال یا غیرفعال با آنها ایمونیزه کرد و با توجه به عملکرد آنتی‌ژنها مزبور، در یکی از مراحل عملکردی اسپرم مانع از انجام علمکرد آن شد (٤).

با توجه به نکات فوق، ضرورت مطالعه روی آنتی‌ژن‌های اسپرم بسیار واضح است. این مطالعات از سال ۱۹٦٥ میلادی شروع و هم‌اکنون طیف وسیعی از محققین روی این موضوع متمرکز هستند. یکی از ابزارهای بسیار کارآمد برای شناسایی بسیاری از آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌بادی منوکلونال است که با توجه به کاربردهای بسیار زیاد آن در مطالعات ایمونوشیمی، هیستوشیمی، سیتوشیمی و ...، بسیار مورد توجه می‌باشد(۳).

تا کنون آنتی‌ژن‌های زیادی در سطح اسپرم مورد شناسائی قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال پروتئین P34H با وزن مولکولی *kDa* ۳٤ که در اتصال و نفوذ اسپرم به تخمک نقش دارد(٦و٥). پروتئین HE4 با وزن مولکولی *kDa*۱۰ که دارای خاصیت آنتی‌پروتئازی است (۸و۷). پروتئین‌های HSP-70[5] و HSP-70.2 که در باروری و عملکردهای اسپرم مؤثراند(۹) و بسیاری پروتئین‌های دیگر که شناخته شده و یا مطالعه بر روی آنها ادامه دارد. در مطالعه حاضر نیز از آنتی‌بادی

1- Acrosome envelope
2- Ontogeny
3- Phylogeny
4- Contraceptive vaccines
5- Human Sperm Protein-70

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

منوکلونال برای شناسایی یکی از آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم انسان استفاده شده است.

مواد و روشها

الف) حیوانات مورد استفاده: رت‌های نر بالغ (نژاد ویستار) با سن ۱۰-۸ هفته و موش‌های نر(نژاد Balb/c) با سن ۸-۶ هفته بودند که از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها و رت‌ها در شرایط مناسب از نظر بهداشت، دما، رطوبت و روشنایی (سیکل ۱۲ ساعته تاریکی-روشنایی) بدون محدودیت غذائی نگهداری شدند. تمام روش‌های تجربی مورد استفاده در این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکدهٔ ابن‌سینا مورد بررسی و تصویب قرار گرفت.

ب) مواد و دستگاه‌ها: لیتیوم دی‌یدوسالیسیلات (LIS)، Tris، Pristane، HSA[1]، رنگ بیسمارک براون، یونوفور کلسیم A23187، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، گلوتارآلدئید و Goat Anti-Mouse Isotype (Sigma,USA)، اسید کلریدریک، استن، رنگ رزبنگال، اتانول(Merck, Germany)، کاغذ PVDF[2] (Roche, Germany)، فنیل متان سولفونیل فلورایید (Fluka, USA)(PMSF)، کیسه دیالیز(Biogene, Iran)، ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G (Pharmacia, Sweden)، محیط کشت BWW[3]، (Gibco, USA)، رنگ تریپان‌بلو (CARLO ERBA Italy)، آنتی‌بادی منوکلونال ضد اسپرم انسان HS56، کنژوگه‌های آنزیمی و فلورسانس HRP-Sheep Anti-Mouse Ig، FITC-Sheep Anti-Mouse Ig (مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال)، دستگاه Shandon Cytospin 4 (Shandon, Uk)، تانک الکتروفورز، تانک بلاتینگ (اختریان، ایران).

ج) تولید و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال: به منظور تولید آنتی‌بادی منوکلونال در مقادیر زیاد، از روش القاء آسیت استفاده شد. بدین صورت که به ۵ موش نر Balb/c با سن ۸-۶ هفته، ۵۰۰μl Pristane به صورت درون صفاقی تزریق شد. ده روز پس از تزریق Pristane، به تعداد 5×10^6 سلول هیبریدومای مولد آنتی‌بادی منوکلونال HS56، به صورت درون صفاقی به هر یک از موش‌های فوق تزریق گردید. پس از آن موش‌ها به صورت روزانه و چندین بار در هر روز، بررسی شدند و هنگامی که شکم موش متورم و در نتیجه قدرت و میزان حرکت حیوان بسیار محدود شد، آسیت از حفرهٔ صفاقی موشها خارج گردید. سپس ۳/۲ ml آسیت حاصل، به نسبت ۱:۳ با PBS، رقیق و با توجه به نوع ایزوتیپ آنتی‌بادی منوکلونال، برای تخلیص آنتی‌بادی از ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G، عبور داده شد. برای شستشوی ستون، از بافر PBS، ۰/۱۵M، pH=۷/۲ و به عنوان بافر جدا کننده از بافر Gly-HCl، ۰/۲M، pH =۲/۵، استفاده شد. محلول‌های خروجی از ستون به حجم‌های ۳-۲ ml جمع‌آوری و تعیین غلظت شدند و بخش‌های حاوی آنتی‌بادی با هم مخلوط و در برابر PBS، دیالیز گردیدند. به منظور تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی منوکلونال، تست الایزا به صورت زیر طراحی شد. لایه اول: آنتی‌ایزوتیپ‌های Goat Anti-Mouse Isotype، لایه دوم: سوپرناتانت حاصل از کشت سلول‌های هیبریدومای مولد آنتی‌بادی منوکلونال HS56 و لایه سوم: کنژوگه HRP-Sheep Anti-Mouse ریخته شد. هدف از تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی منوکلونال، طراحی روش مناسبی به منظور تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال از مایع آسیتی بود که پس از این مرحله انجام گرفت.

د) استخراج آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم: نمک LIS ترکیبی کائوتروپ است که باعث تضعیف پیوندهای هیدروفوبی می‌شود و می‌تواند پروتئین و گلیکوپروتئین‌های غشایی

1- Human Serum Albumin
2- Polyvinylidene difluoride
3- Biggers- Whitten- Whittingham

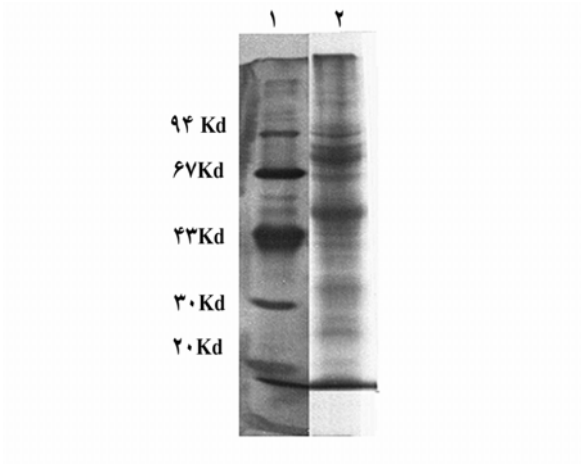
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اسپرم را جدا کند. برای انجام کار، ابتدا اسپرم‌های اضافی از آنالیز اسپرم افراد طبیعی (با توجه به معیارهای WHO) (۱۰) مراجعه کننده به مرکز تخصصی ابن‌سینا (درمان ناباروری و سقط مکرر)، جمع آوری و سه مرتبه به وسیلهٔ بافر PBS شستشوداده شد (هر مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه و با نیروی g ۶۰۰ سانتریفوژ انجام شد). به منظور استخراج آنتی‌ژن‌ها از سطح اسپرم، ۲ml از رسوب اسپرمی فوق با ۵ml از محلول ۰/۳ M نمک LIS، در بافر Tris-HCl، ۱۰mM، pH=۷/٤، حاوی PMSF ۲ mM، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ $°C$ با قدرت g ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و در برابر بافر Tris-HCl دیالیز گردید(۱۱). پس از استخراج، برای مشاهدهٔ نتیجه استخراج و تنوع آنتی‌ژن‌های استخراجی SDS-PAGE روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰٪ انجام شد(۱۲).

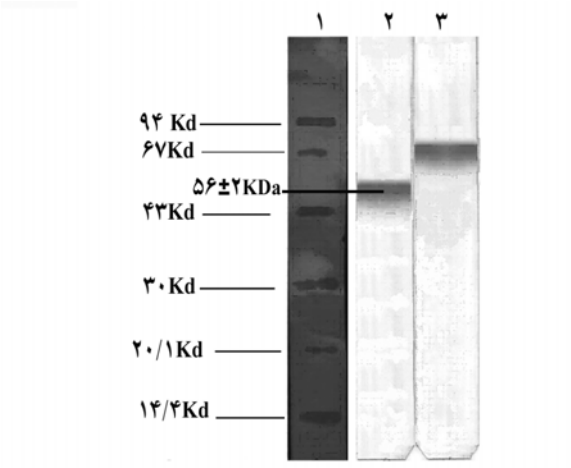
هـ) تعیین محل قرارگیری آنتی‌ژن مورد نظر روی اسپرم انسان: ابتدا اسپرم‌های حاصل از افراد طبیعی، در محیط BWW، Swim up شدند. سپس اسپرم‌های زنده و کاملاً متحرک حاصل از این تکنیک با PBS تا غلظت ۱×۱۰^{٦} $sperm/ml$ رقیق شدند. از ۱۰۰μl مخلوط اسپرمی توسط دستگاه Cytospin، روی لام، اسمیر مناسب تهیه شد. لام‌ها در استون (Ice cold) فیکس شدند. سپس لام‌ها ۳ بار با بافر TBS، ۰/۱ M، pH=۷/٤ شستشو و لایه دوم آنتی‌بادی منوکلونال با غلظت ۱۰$\mu g/ml$ و لایه سوم کونژوگه FITC-Sheep Anti- Mouse Ig اضافه گردید. پس از اتمام کار، لام‌ها با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر و بوسیلهٔ میکروسکوپ فلورسانس دارای فیلتر مخصوص FITC مشاهده گردیدند(۱۳).

و) بررسی واکنش آنتی‌بادی منو کلونال HS56 با آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک LIS: به منظور بررسی جداسازی آنتی‌ژن مربوط به آنتی‌بادی منوکلونال HS56 به کمک نمک LIS از اسپرم، تست الایزایی طراحی شد. لایه اول: آنتی‌ژن‌های استخراجی به روش LIS با غلظت ۱۰ $\mu g/ml$، لایهٔ دوم: آنتی‌بادی منوکلونال HS56 با غلظت ۱۰ $\mu g/ml$ و لایه سوم: کونژوگه HRP-Sheep Anti-Mouse Ig.

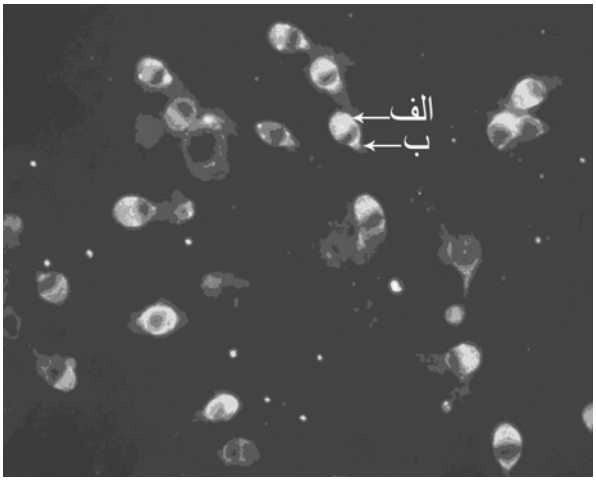
ز) بررسی وزن مولکولی و خصوصیات بیوشیمیایی آنتی‌ژن مورد شناسائی توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56: برای تعیین وزن مولکولی آنتی‌ژن، از تکنیک وسترن بلات(١٤) استفاده شد. بدین منظور



شکل ۱- الگوی SDS-PAGE آنتی‌ژنهای استخراج‌شده با نمک LIS. ۱: مارکرهای وزن مولکولی. ۲: آنتی‌ژنهای استخراج شده با نمک LIS.



شکل ۲- الگوی وسترن بلاتینگ آنتی‌ژنهای استخراج شده از سطح اسپرم انسان و مجاورت آنها با آنتی‌بادی منوکلونال HS56. ۱: مارکرهای وزن مولکولی. ۲: آنتی‌ژنها در حالت غیر احیاء. ۳: آنتی‌ژنها در حالت احیاء با 2ME.



شکل ۳- عکس مربوط به رنگامیزی ایمونوفلورسانس اسپرم انسان با آنتی‌بادی منوکلونال HS56 و کنژوگه FITC. الف: آکروزوم، ب: گردن.

SDS-PAGE بر روی آنتی‌ژن‌های استخراجی توسط نمک LIS به دو روش احیاء و غیر احیاء انجام شد. برای شناسایی آنتی‌ژن، از آنتی‌بادی منوکلونال HS56 با غلظت $\mu g/ml$ ۱۰و کونژوگهٔ HRP-Sheep Anti-Mouse Ig استفاده شد. در نهایت با توجه به مارکرهای وزن مولکولی، منحنی R_f رسم و حدود وزن مولکولی آنتی‌ژن مورد شناسایی توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56، تعیین گردید.

ح) بررسی وجود اپی‌توپ مورد شناسایی توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56 در اسپرم رت و موش: به این منظور ابتدا اسپرم رت و موش بالغ (۱۰-۸ هفته‌ای) از ناحیهٔ اپی‌دیدیم استخراج و تست الایزای طراحی شد. به تعداد 1×10^6 *sperm/well* به عنوان لایه اول، آنتی‌بادی منوکلونال HS56 با غلظت$10\mu g/ml$ به عنوان لایه دوم و کونژوگهٔ HRP-Sheep Anti-Mouse Ig به عنوان لایهٔ سوم ریخته شد.

ط) بررسی نقش اپی‌توپ اختصاصی آنتی‌بادی منوکلونال HS56 در واکنش آکروزومی: به منظور بررسی نقش اپی‌توپ مورد مطالعه در واکنش آکروزومی، ابتدا اسپرم‌های متحرک و سالم حاصل از افراد طبیعی به روش Swim up جدا شد. سپس اسپرم‌های زنده و متحرک در سه لوله تقسیم شدند. اسپرم‌های هر سه لوله مراحل ظرفیت‌پذیری[1] را در محیط BWW و به مدت ۳ ساعت پشت‌سر گذاشتند. در مرحله بعد به لوله تست، آنتی‌بادی منوکلونال HS56 به غلظت$\mu g/ml$ ۲۰ و به لولهٔ دیگر ایمونوگلوبولین موش غیرایمن با غلظت $20\mu g/ml$ اضافه گردید و به لولهٔ کنترل مثبت نیز هیچ ماده‌ای اضافه نشد. این مرحله به مدت یک ساعت در انکوباتور $37^\circ C$ سپری گردید. پس از آن، مرحلهٔ القاء واکنش آکروزومی با استفاده از کلسیم یونوفور A23187 با غلظت$10mM$ در DMSO، در هر سه لوله به مدت یک ساعت انجام گرفت. به منظور تعیین درصد اسپرم‌هایی که واکنش آکروزومی انجام داده‌اند، رنگ‌آمیزی سه گانه روی اسپرم‌ها انجام گرفت. به این صورت که ابتدا اسپرم‌های هر لوله با بافرPBS، سه مرتبه شسته شدند. سپس سوسپانسیون اسپرمی هر لوله، به نسبت مساوی (۱:۱) با رنگ تریپان بلو ۲٪، در دمای$37^\circ C$، به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از آن سه بار شستشو با بافر PBS انجام گرفت. به منظور فیکس کردن، اسپرم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در گلوتار آلدئید ۲/۵٪ (در بافر فسفات $0/1\ M$، pH=۷/٤) در دمای$4^\circ C$ انکوبه شدند. پس از سه بار شستشوی اسپرم‌ها با بافرPBS به رسوب هر لوله $500\mu l$ آب مقطر دیونیزه اضافه شد و رسوب اسپرمی مجدداً به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از آن یک قطره از هر سوسپانسیون اسپرمی برداشته و روی لام قرار گرفت تا در مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق خشک شوند. سپس روی هر لام رنگ بیسمارک براون ۰/۸٪ (در آب مقطر) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای$37^\circ C$ ریخته و نگهداری شد. سپس لام‌های رنگ شده، با آب مقطر دیونیزه شستشو شدند. در مرحله بعد لامها با رنگ رزبنگال ۰/۸٪ (تهیه شده در بافر Tris-HCl، $0/1M$، pH=۷/٤) در دمای اتاق به مدت ٤۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سپس لام‌ها با آب

1- Capacitation

مقطر دیونیزه شستشو و با ۱۰ مرتبه فرو بردن هر لام در اتانول ۹۰٪، عمل دهیدراتاسیون انجام گرفت. پس از آماده شدن لام‌ها، با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر، حداقل ۱۲۰۰ اسپرم در هر لام به صورت تصادفی مشاهده و شمارش شد. اسپرم‌هایی با رنگ صورتی در جلوی سر اسپرم به عنوان واکنش آکروزومی منفی و اسپرم‌های فاقد این بخش به عنوان اسپرم‌هایی با واکنش آکروزومی مثبت شناسایی شدند. اسپرم‌های مرده نیز به دلیل جذب رنگ تریپان بلو، به رنگ آبی پررنگ درآمدند (۱٤). پس از شمارش نمونه‌ها، به منظور آنالیز و مقایسه داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS(ver.10.0) و تست آماری ناپارامتری Wilcoxon Signed Ranks Test استفاده و سطح معنی‌داری، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

۱) تولید و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال: به منظور تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال به طریقه تولید آسیت، از تزریق سلول‌های هیبریدوما به ۵ سر موشBalb/c، ۳موش تولید آسیت کرده و ۲ موش تومور جامد تولید کردند. آنتی‌بادی موجود در آسیت، از طریق کروماتوگرافی جذبی (ستون پروتئین G) تخلیص گردید. از ۳/۲*ml* آسیت، ۷/۵۳*mg* آنتی‌بادی منوکلونال به‌دست آمد. یعنی در هر میلی‌لیتر آسیت، ۲/۳۵ *mg* آنتی‌بادی تولید شده بود. تعیین زیرکلاس آنتی‌بادی منوکلونال با استفاده از آزمون الایزا نشان داد که زیرکلاس آنتی‌بادی مذکور از زیرکلاس IgG1 می‌باشد.

۲) تعیین محل قرارگیری آنتی‌ژن در سطح اسپرم انسان: براساس نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرم انسان با آنتی‌بادی منوکلونال HS56 و کنژوگه FITC همانطور که در شکل ۳ آمده است کاملاً مشخص است که ناحیهٔ آکروزومی و گردن اسپرم توسط آنتی‌بادی منوکلونال شناسایی و در نتیجه رنگ فلورسانس از خود نشان می‌دهند. بنابراین آنتی‌ژن مورد نظر در این دو ناحیه واقع شده است.

۳) استخراج آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم انسان با کمک نمک LIS: در روش الایزای انجام شده با آنتی‌ژن‌های حاصل از نمک LIS، میزان جذب نوری (OD) ایجاد شده حدود ۱/۳ بود و در مقایسه با چاهک‌های کنترل منفی (با جذب نوری ۰/۱۸) مشخص شد که آنتی‌ژن مورد شناسایی توسط آنتی‌بادی منوکلونالHS56، توسط LIS از سطح اسپرم جدا می‌شود. پس از آن با استفاده از تکنیک SDS-PAGE، الگوی حرکت الکتروفورزی پروتئین‌های استخراج شده مشخص گردید که در شکل ۱ نشان داده شده است.

۴) تعیین وزن مولکولی و شناسایی برخی از خصوصیات آنتی‌ژن مورد شناسائی توسط آنتی‌بادی مونوکلونال: آنتی‌ژن‌های استخراج شده به کمک LIS، به دو صورت احیاء و غیر احیاء، الکتروفورز شدند. همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود، مارکرهای وزن مولکولی ۹٤ *kDa* و ٦۷*kDa*، ٤۳*kDa*، ۳۰*kDa*، ۲۰/۱*kDa*، ۱٤/٤*kDa* به عنوان استانداردهای وزن مولکولی بکار رفته‌اند که پس از رسم منحنی R_f برای این مارکرهای وزن مولکولی و مقایسه میزان حرکت باند مربوط به آنتی‌ژن در حالت غیر احیاء، حدود وزن مولکولی ۲*kDa*±٥٦، محاسبه گردید.

۵) بررسی وجود اپی‌توپ مشابه در اسپرم رت و موش: با توجه به انجام روش الایزا روی اسپرم موش و رت و مقایسه نتایج با روش الایزا روی اسپرم انسان، مشخص گردید که چنین اپی‌توپی در اسپرم رت و موش وجود ندارد و میزان رنگ حاصل از آنتی‌بادی نزدیک به چاهک‌های بلانک و کنترل منفی بود.

۶) بررسی نقش اپی‌توپ اختصاصی آنتی‌بادی منوکلونال HS56 در واکنش آکروزومی: با مقایسه نتایج ناشی از ۳ نوع تست C.I[1] (کنترل مثبت شامل مراحل ظرفیت‌پذیری اسپرم وافزودن یونوفور) CMI[2] (مراحل ظرفیت‌پذیری اسپرم، افزودن آنتی‌بادی منوکلونال و یونوفور) و

1- Capacitation- Inonophore
2 - Capacitation- Monoclonal Antibody- Ionophore

جدول۱- درصد واکنش آکروزومی مثبت و میانگین مربوط به سه نمونه بررسی شده برای هر یک از تستها

تست / نمونه- میانگین	C.I	CMI	CPI
نمونه ۱	٪۳۲	٪۲۰	٪۳٤
نمونه ۲	٪۳۳	٪۱٦	٪۳۳
نمونه ۳	٪۳۵	٪۱۷	٪۳٦
میانگین و انحراف معیار M±SD	٪۳۳/۳۳±٪۱/۵	٪۱۷/٦٦±٪۲/۰	٪۳٤/۳۳±٪۱/۵

CPI[1] (شامل مراحل ظرفیت‌پذیری و افزودن ایمنوگلوبولین غیر اختصاصی موشی و یونوفور)، مشخص شد که اثر آنتی‌بادی منوکلونال HS56 بر اسپرم انسان، تفاوت معنی‌داری را در انجام واکنش آکروزومی در مقایسه با نمونه کنترل مثبت ایجاد نکرده است. حضور ایمونوگلوبولین‌های موشی نیز تفاوت معنی‌داری را در انجام واکنش آکروزومی در مقایسه با نمونه کنترل مثبت ایجاد نکرده است.

بحث

با توجه به پوشیده شدن سطح اسپرم انسان از آنتی‌ژن‌های متنوع و اینکه هر یک از آنها عملکرد و نقش خاصی در اعمال اختصاصی اسپرم به عهده دارند، شناسایی این آنتی‌ژن‌ها به منظور درک هرچه بهتر فرآیند لقاح و نیز کمک به بیماران نابارور دارای نقایص مولکولی در ساختار اسپرم و سرانجام مطالعات انتوژنی و فیلوژنی، مفید خواهد بود. از جمله ابزارهای بسیار کارآمد در چنین مطالعاتی، آنتی‌بادی‌های منوکلونال هستند که به کمک آنها می‌توان هر یک از مولکول‌های سطح سلول را به طور کاملاً مجزا بررسی کرد(۳).

با توجه به کارآیی بسیار بالای آنتی‌بادی منوکلونال در مطالعات سلولی و مولکولی، از جمله توانایی استفاده از آن در آزمایشات متنوعی از جمله ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی تخلیص آنتی‌ژن‌ها، کروماتوگرافی، ایمونوبلاتینگ و سایر تکنیک‌های ایمونوشیمی، در مطالعه حاضر نیز از آنتی‌بادی منوکلونال استفاده گردید.

در این مطالعه ابتدا روش‌های مختلف برای استخراج آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم بکار گرفته شد SDS، Triton-X100 و LIS از جمله موادی بودند که به این منظور به کار رفتند SDS .چون یک مادهٔ دناتوره کننده است و نیز با دیالیز کردن به طور کامل از محلول خارج نمی‌شود، برای ادامهٔ کار استفاده نشد. به علاوه SDS و Triton-X100 هر دو در طول موج مربوط به سنجش غلظت با تکنیک برادفورد، جذب دارند و باعث ایجاد اشتباه در تعیین غلظت پروتئین می‌شوند. Triton-X100 نیز که یک دترژنت با وزن مولکولی ۲۵۰/۳۸*g/mol* است در محلول به صورت پلیمر درآمده و وزن مولکولی بالایی پیدا می‌کند که در نتیجه نمی‌توان با دیالیز آن را از محلول خارج کرد و باید روش‌های دیگری برای خارج کردن آن بکار برد. بدین دلیل از این میان LIS برای ادامه مطالعه حاضر انتخاب شد.

با القاء آسیت، آنتی‌بادی به مقدار زیاد حاصل و برای آزمایشات بعدی از جمله ایمونوبلاتینگ و تعیین وزن مولکولی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنتی‌ژن، مورد استفاده قرار گرفت. وزن مولکولی آنتی‌ژن حدود

1- Capacitation- Polyclonal Antibody- Ionophore

۵۶±۲*kDa* به‌دست آمد. با انجام الکتروفورز به دو صورت احیاء و غیراحیاء و با توجه به نتیجه وسترن بلاتینگ، چنین به نظر می‌رسد که:

۱) اپی‌توپ مورد شناسایی توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56، یک اپی‌توپ خطی است؛ زیرا با وجود مجاورت با SDS موجود درSDS-PAGE، باز هم توسط آنتی‌بادی منوکلونال شناسایی می‌شود. ۲) اپی‌توپ مورد نظر دارای پیوند دی‌سولفید در ساختار خود نیست؛ زیرا در حالت احیاء نیز توسط آنتی‌بادی منوکلونال شناسایی شده است. ۳) آنتی‌ژن مورد نظر دارای پیوند دی‌سولفید در ساختار خود می‌باشد؛ زیرا که آنتی‌ژن پس از احیاء شدن توسط 2ME، بازتر شده و حرکت الکتروفورتیکی کندتری پیدا کرده و در حالت احیاء بالاتر از حالت غیر احیاء ایستاده است. ٤) با توجه به تک باندی بودن بلات در حالت احیاء و غیر احیاء چنین بر می‌آید که احتمالاً این آنتی‌ژن یک مونومر باشد و یا آنکه یک اولیگومر اما با زیر واحدهای دارای وزن مولکولی یکسان باشد که در نتیجه در هر دو حالت احیاء و غیر احیاء، یک باند بدست آمده است.

در تحقیقی که توسط Rajeev و همکارانش انجام شد، آنتی‌ژنی با وزن ۵۷ *kDa* در سطح اسپرم انسان شناسایی شد که در ناحیهٔ سر اسپرم بدون واکنش آکروزومی، قرار دارد و بلوکه‌کردن آن با آنتی‌بادی منوکلونال مانع لقاح اسپرم انسان و تخمک بدون زونای هامستر شده است(۱۵). با ادامه تحقیقات روی آنتی‌ژن شناسایی شده توسط این گروه و نیز ادامه تحقیقات روی آنتی‌ژن با وزن مولکولی حدود ۵٦*kDa* شناسایی شده توسط تحقیقات به عمل آمده در پژوهشکده ابن‌سینا، تشابه یا عدم تشابه این دو آنتی‌ژن را می‌توان بدست آورد.

با انجام تست ایمنوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از کنژوگهٔ FITC، مشخص شد که محل قرارگیری آنتی‌ژن مورد مطالعه، ناحیهٔ آکروزومی و گردن اسپرم انسان می‌باشد. همانطور که در بالا نیز ذکر شد، آنتی‌ژن ۵۷ کیلودالتونی شناسائی شده توسط Rajeev و همکارانش، نیز در ناحیهٔ آکروزومی اسپرم، قرار داشته است(۱۵). در مطالعهٔ Yoshiki و همکارانش نیز، با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال HSA-5، وجود آنتی‌ژنی در ناحیهٔ آکروزومی و استوای اسپرم، گزارش شده است(۱٦). وجود اپی‌توپ شبیه یا یکسان با اپی‌توپ موجود در سطح اسپرم انسان که توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56 شناسایی شود، در اسپرم رت و موش مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً پس از انجام تست الایزا، مشخص گردید که چنین اپی‌توپی در سطح اسپرم رت و موش وجود ندارد و ظاهراً این اپی‌توپ در میان اسپرم‌های انسان، موش و رت، منحصر به اسپرم انسان می‌باشد. در مطالعهٔ انجام شده توسطIsahakia و همکارش، واکنش متقاطع چندین آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده علیه اسپرم انسان، با اسپرم گونه‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که یکی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال با نام MAL، ناحیهٔ آکروزومی اسپرم انسان، میمون، گاو، سگ، خرگوش، رت و موش را می‌شناسد اما آنتی‌بادی منوکلونال دیگری به نامMAb، فقط ناحیهٔ دم اسپرم انسان را می‌شناسد یا آنتی‌بادی منوکلونال MA5 نیز فقط ناحیهٔ استوایی اسپرم انسان را شناسایی کرده است(۱۷).

به منظور بررسی تأثیر و دخالت اپی‌توپ مورد نظر در انجام واکنش آکروزومی اسپرم، تست مورد نظر طراحی شد. با توجه به نتایج این تست چنین برمی‌آید که با اینکه این آنتی‌ژن در ناحیهٔ آکروزومی واقع است اما بلوکه کردن اپی‌توپ مورد مطالعه با آنتی‌بادی منوکلونال HS56 تأثیر معنی‌داری در واکنش آکروزومی ندارد (P=۰/۱۱). البته این نظر را نمی‌توان در مورد کل آنتی‌ژن مصداق داد. زیرا ممکن است که عملکرد کلی آنتی‌ژن در واکنش آکروزومی دخیل باشد اما اپی‌توپ مذکور دراین فرآیند دخالتی نداشته باشد.

البته این موضوع را می‌توان با تولید نتی‌بادی‌پلی‌کلونال علیه این آنتی‌ژن و بلوکه کردن کل آنتی‌ژن با آنتی‌بادی پلی‌کلونال، مورد بررسی قرارداد. به علاوه می‌توان تحقیق را بر روی دخالت این اپی‌توپ یا کل آنتی‌ژن در دیگر عملکردهای اسپرم از جمله اتصال به زوناپلوسیدا یا لقاح با تخمک و نیز نقش آنها در مراحل ظرفیت‌پذیری یا حرکت اسپرم، ادامه داد و در صورت امکان آن را به عنوان یک کاندیدا برای تولید واکسن‌های جلوگیری بارداری در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

از زحمات آقایان اصغر طالبیان، دکتر سادات هاشمی و خانم‌ها جمیله قاسمی و دکترپونه دوکوهکی قدردانی می‌گردد. در ضمن از سرکار خانم پروانه احمدی که زحمت تایپ این مقاله را متحمل شدند، تشکر می‌شود.

References

1- Pinon R.Biology of human reproduction. University Science Book. 2002;pp:147-149.
2- Boyse E.A., Old L.J. Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. Ann. Rev. Genet.1969;(3)269-290.
3- Myles D.G., Primakaff P., Bellve A.R. Surface domains of the Guina Pig sperm defined with monoclonal antibodies. Cell.1981;23(2)432-439
4- Naz R.K. Application of sperm antigens in immunocontraception. Front Biosci.1996;1:87-95.
5- Boue F., Sullivan R. Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epidydimal sperm antigen. Biol Reprod.1996;(54)1018-1024.
6- Boue F., Berabe B., De Lamirande. E., Gagnon C., Sullivan R. Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. Biol Reprod.1994;(51)577-587.
7- Holland M.K., Nixon B. The specificity of epidydimal secretory proteins. J. Reprod. Fertil. (Supplement).1998;(53)197-201.
8- Kirchhoff C. Gene expression in the epidydimis. Intern Rev Cyto.1999;(188)133-202.
9- Bohring C., Krause E., Haberman B., Kvaus 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.
10- Johnson MH., Everitt B.J. Essential Reproduction. 5th Edition, Section 4: Testicular function in the adult.2000;pp:53-68.
11- Alexander N.J., Bearwood D. An immunosorption assay for antibodies to spermatozoa: Comparison with agglutination and immobilization tests. Fertil Steril.1984;41(2)270-276.
12- Shapiro A.L., Vinuela E., Maizel J.B. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-Polyacrilamide gels. Biochem Biophys Res Commun.1967;(28) 815-820.
13- Risopatron J., Pena P., Miska W., Sanchez R. Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: Comparison of cytochemical and fluorescence techniques. Andrologia.2001;(33): 63-67.
14- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet. Proceduve and some applications. Proc Nat Acad Sci. USA.1979;76(9): 4350-4354.
15- Rajeev S.K., Reddy K.V. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. Hum Reprod.2004;19(2)234-242.
16- Yoshiki T., Herr J.C., Lee C.G. Purification and characterization of a sperm antigen recognized by HSA-5 monoclonal antibody. J Reprod Immun.1995;(29)209-222.
17- Isahakia M., Alexander N.J. Interspecies Crossreactivity of monoclonal antibodies directed against human sperm antigens. Bio Reprod.1984; (30):1015-1026.