

نقش پروتئینهای سطح اسپرم با منشاء اپی دیدیم بر فرآیند لقاح

محمدرضا صادقی (Ph.D.)^۱، محمد مهدی آخوندی (Ph.D.)^۲، مهین زهرائی (Ph.D.)^۳

۱- استادیار گروه غدد تولید مثل، پژوهشکده ابن سینا

۲- استادیار گروه ژنتیک، بیوتکنولوژی و جنین شناسی، پژوهشکده ابن سینا

۳- استاد گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

در طی عبور اسپرم از اپی دیدیم، جایگاهی که در آن توانائی اسپرم برای لقاح تخمکها توسعه می یابد، چندین شاخص آنتی ژنی جدید در سطح اسپرم ظاهر می گردد. تعدادی از آنها پروتئینها و گلیکوپروتئینهایی با منشاء اپی دیدیم می باشند. هدف از مطالعه اخیر بررسی نقش پروتئینهای ترشعی اپی دیدیم بر روی قدرت باروری اسپرم می باشد. سلولهای اپی تلیال بخش ابتدای اپی دیدیم rat در محیط RPMI حاوی فاکتورهای رشد و آندروژنها کشت داده شد. برای شناسائی پروتئینهای ترشعی اپی دیدیم، نشاندار کردن این پروتئینها توسط (Cys, Met) - [³⁵S] انجام شد. محیط کشت نشاندار حاصل، پس از جمع آوری تحت SDS - PAGE قرار گرفت، برای ۸ پروتئین ترشعی اپی دیدیم نیز در خرگوش آنتی سرم تهیه گردید. ایمونوژن مورد استفاده نوار باریکی از ژل پلی اکریل آمید لیوفیلیزه شده حاصل از الکتروفورز بر روی حجم زیادی نمونه حاوی پروتئین کاملاً خالص بود. انکوباسیون اسپرم سالم rat با این آنتی سرمها نشان دهنده وجود پروتئینهای ترشعی اپی دیدیم در سطح اسپرم بود. اثر این آنتی سرمها بر روی لقاح خارج رحمی نیز مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم در محیط کشت حدود ۲۰-۳۰ پروتئین ترشح می کنند، آنتی سرم با تیترا بالا برای ۸ عدد از این پروتئینها تولید گردید. سه آنتی سرم (پروتئینهای ۲۰ و ۲۴ و ۷۲ کیلودالتون) با سطح اسپرم rat واکنش نشان دادند، و از این میان فقط آنتی سرم پروتئین ۲۰ kD باعث کاهش میزان لقاح گردید (۲۸٪ در مقابل ۸۹٪ برای گروه کنترل). بنابراین روند بلوغ اسپرم در اپی دیدیم با ترشح تعدادی از پروتئینها توسط سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم همراه می باشد. تعدادی از این پروتئینها به غشاء پلاسمائی اسپرم متصل می گردند، از این میان پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰ kD دارای نقش اساسی در قدرت باروری اسپرم می باشد.

کل واژگان: پروتئین ترشعی، اپی دیدیم، rat، لقاح خارج رحمی، بلوغ اسپرم

آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده ابن سینا، ص- پ ۱۷۷-۱۹۸۳۵

مقدمه

از میان فعالیت‌های متعدد متابولیک و سنتتیک سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم، سنتز و ترشح پروتئین یکی از مهمترین و شناخته شده ترین آنها می باشد (۱). طی ۱۵-۱۰ سال گذشته مطالعات زیادی معطوف این ترشحات پروتئینی و نقش آنها در بلوغ اسپرم گردیده است (۴، ۳، ۲). تعداد پروتئینهایی که در هرگونه توسط نواحی مختلف اپی دیدیم ترشح می شود به ۲۰۰-۱۵۰ عدد می رسد. اغلب این پروتئینها دارای مقادیر بسیار ناچیز بوده که شناسائی و سنجش آنها با استفاده از تکنیکهای معمول بسیار مشکل می باشد. بطوریکه کمتر از ۱۰ عدد از این پروتئینها بیش از ۹۰٪ پروتئینهای ترشحاتی را تشکیل می دهند (۵). در قوچ تنها دو عدد آنها بیش از ۵۲٪ پروتئینهای ترشحاتی اپی دیدیم را تشکیل می دهند (۶).

از طرف دیگر یکی از مهمترین تغییراتی که همراه با حرکت و بلوغ اسپرم در طول اپی دیدیم مشاهده می شود تغییر در پروتئینها و گلیکوپروتئینهای سطح اسپرم و به طور کلی شاخصهای آنتی ژنی سطح اسپرم می باشد. تغییر در پروتئینهای سطح اسپرم در طول اپی دیدیم متناسب با تغییر در الگوی ترشح پروتئینهای ترشحاتی اپی دیدیم می باشد (۳، ۷، ۸). بخشی از پروتئینهای ترشحاتی درمجرای اپی دیدیم به سطح اسپرم متصل گردیده و به طور مستقیم یا غیر مستقیم باعث القاء تغییراتی در غشاء پلاسمائی و یا درون اسپرم می گردند (۹، ۱۰). القاء چنین تغییراتی به احتمال زیاد وابسته به قدرت اتصال پروتئینهای مذکور با سطح اسپرم می باشد. برای بسیاری از این پروتئینها اتصال ناشی از گرایان غلظت آنها در طول اپی دیدیم است. با کاهش غلظت آنها یا تغییر در قدرت یونی محتویات درون مجرا، پروتئینهای مذکور مجدداً از سطح اسپرم جدا می گردند. غالباً اتصال اختصاصی یک پروتئین به سطح اسپرم است که باعث ایجاد تغییر در غشاء و یا

عملکردهای اسپرم می گردد (۵، ۷، ۹، ۱۱). کاربرد روشهای ایمونوشیمیائی نیز مؤید وجود آنتی ژنهای مشترک بین سطح اسپرم بالغ (درانتهای اپی دیدیم) و ترشحات پروتئینی سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم می باشد (۵، ۱۱، ۳۵).

بلوغ اسپرم در اپی دیدیم همراه با توسعه چند عملکرد زنده ماندن، تحرک، قدرت شناسائی و اتصال به تخمک می باشد (۱۲، ۳، ۲). نسبت دادن توسعه هریک از این عملکردها به یک یا چند پروتئین ترشحاتی سلولهای اپی تلیال مشکل است. زیرا عملکردهای فوق زمانی در اسپرم ظاهر می گردد که طیف وسیعی از تغییرات به طور متوالی و یاهمزمان طی عبور اسپرم از اپی دیدیم در ساختمان آن ایجاد گردد (۱۲). ولی بوسیله کاربرد تست مهار توسط آنتی بادی، با اتصال آنتی بادی اختصاصی به هر یک از پروتئینهای سطح اسپرم و در نتیجه مهار عملکرد آنها تغییرات ایجاد شده در زنده ماندن، تحرک، قدرت شناسائی، اتصال و لقاح تخمک، به طور غیر مستقیم معرف نقش پروتئینهای مذکور در بلوغ اسپرم و فرآیند لقاح خواهد بود (۱۳ و ۹).

هدف از تحقیق اخیر شناسایی چنین پروتئینهایی در سطح اسپرم با منشاء سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم است که در فرآیند لقاح نقش داشته باشند. یافتن چنین پروتئینهایی در ترشحات اپی دیدیم منجر به درک بیشتر از فیزیولوژی و عملکرد این اندام و نیز آگاهی از وقایع مولکولی ظرفیت پذیری^۱، افزایش تحرک^۲ و واکنش اکروزومی^۳ اسپرم گردیده و در نهایت امکان استفاده از آنها در شناسائی و درمان ناباروری مردان با علل ناشناخته خواهد بود. چنین پروتئینهای احتمالاً دارای کاربرد بالقوه ای در مهار کوتاه مدت و قابل برگشت باروری در مردان و در نتیجه کنترل جمعیت خواهند داشت (۱۴ و ۱۵).

1- Capacitation

2- Hyperactivation

3- Acrosome reaction

مواد و روشها

کشت سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم rat و بررسی فعالیت سنتزی وترشعی سلولها در محیط *in vitro* و جمع آوری محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشعی نشاندار مطابق ماخذ شماره ۳۵ انجام گرفت.

تهیه آنتی سرم بر علیه پروتئینهای ترشعی اپی تلیال اپی دیدیم

از آنجا که تخلیص بیش از ۱۰ پروتئین ترشعی اپی تلیال اپی دیدیم با خصوصیات فیزیکیوشیمیایی مختلف از محیط کشت حاوی پروتئینهای FCS (سرم جنین گوساله) کاری مشکل بوده و در صورت تخلیص فراکسیونهای حاصل حاوی بیش از یک پروتئین خواهد بود. برای بدست آوردن هر پروتئین به طور کاملاً خالص، از روش Preparative Electrophoresis با کاربرد ژل با ضخامت بیشتر و شانه دارای چاهکهای بزرگتر، حجم زیادی از محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشعی نشاندار تحت الکتروفورز قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی ژل توسط رنگ کوماسی بلو و حذف جزیی رنگ اضافی زمینه، برای جلوگیری از خروج پروتئینها از ژل، طی یکساعت انکوباسیون ژل در گلو تار آلدئید ۲٪ پروتئینها به طریق کووالان به یکدیگر و احتمالاً به ژل متصل می شوند. سپس رنگ زدائی تا حذف کامل رنگ زمینه ژل ادامه می یابد. برای تشخیص باندهای حاوی پروتئین نشاندار، نوار باریکی از کناره ژل را بریده و به قطعاتی با عرض ۵ میلی متر تقسیم می شود. برای محلول نمودن ژل و خروج پروتئین نشاندار از آن، قطعات ژل برای مدت یکساعت در آب اکسیژنه ۱۵٪ در بن ماری جوش قرار گرفته، پس از حل شدن ژل با افزودن ۵ml مایع سنتیلاسیون، به ۱۰۰ μl محلول حاصل شمارش تابش β برای تمامی قطعات تعیین می شود. با مقایسه میزان شمارش تابش β، باندهای حاوی پروتئین نشاندار

مشخص و با تکرار اندازه گیری بر روی نوار دیگری از کناره ژل نتایج حاصل تأیید می گردد. برای جدا کردن باندهای حاوی پروتئینهای نشاندار، گلو تار آلدئید و اسید استیک ژل با شستشوی مکرر کاملاً حذف می شود. سپس باندهای مشخص شده با دقت جدا و با حذف کامل آب، قطعات ژل تبدیل به پودر می شود. (ترجیحاً توسط روش لیوفیلیزاسیون). پس از تهیه میزان کافی از هر ایمونوژن برای تمامی تزریقات و ایمونیزاسیون کامل هر حیوان، تعداد ۱۰ خرگوش نر با سن ۳-۴ ماه با وزن حدود ۲kg از نژاد NZW (انستیتو پاستور ایران) تهیه گردید. ایمونیزاسیون و خونگیری از حیوانات مطابق ماخذ شماره ۱۶ انجام گرفت.

سنجش تیترا آنتی سرم پروتئینهای ترشعی

برای سنجش تیترا آنتی سرم پروتئینهای ترشعی از محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشعی غیر نشاندار به عنوان آنتی ژنهای هدف در روش الایزا (ELISA) ^۲ استفاده گردید. برای این منظور ۱۰۰ μl از محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشعی به چاهکهای پلیت ۹۶ خانه الایزا اضافه کرده و پلیت برای مدت ۱۲ ساعت (در طول شب) در دمای ۴ °C انکوبه می گردد. پس از تخلیه، برای اشباع جایگاههای فعال کف پلیت، مقدار ۱۰۰ μl محلول BSA^۳ (آلبومین سرم گاو) ۵٪ به هر چاهک افزوده و پس از یکساعت انکوباسیون چاهکها سه بار بوسیله ۳۰۰ μl TPBS (محلول ۰/۰۵٪ Tween در PBS) شستشو می گردد. در مرحله بعد ۱۰۰ μl از رقتهای سریال $\frac{1}{40}$ تا $\frac{1}{2560}$ هر آنتی سرم به چاهکهای یک ردیف اضافه کرده و چاهک انتهای هر ردیف به عنوان بلانک فقط حاوی PBS می باشد. در یک ردیف نیز رقتهای سریال سرم خرگوش قبل از ایمونیزاسیون به

2- Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay

3- Bovine Serum Albumin

1- Fetal Calf Serum

مجرا خارج شده و در محیط کشت متحرک می گردند. اسپرمها پس از جداسازی از قطعات بافت، بایستی چندین بار با PBS شستشو داده شود تا پروتئینهای با اتصال سست در سطح اسپرم و محتویات مجرای اپی دیدیم در ناحیه Cauda کاملاً شسته شود. پس از شستشو با افزودن PBS و شمارش میکروسکوپی غلظت در حد 10^7 اسپرم در میلی لیتر تنظیم می گردد. به هر چاهک پلیت $100 \mu l$ از مخلوط فوق حاوی 10^5 اسپرم اضافه می شود. طی ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای $4^\circ C$ ، با اتصال اسپرمها کف و جدار پلیت از اسپرم پوشیده می شود. سایر مراحل الیزا مطابق سنجش تیتراآنتی سرمها انجام می شود. پس از گسترش رنگ چاهکها، آنتی سرمهائی که پروتئین آنها در سطح اسپرم باشد. شدت رنگ حاصل بیش از رنگ زمینه و چاهکهای سرم کنترل منفی می باشد.

از آنجا که هدف، سنجش میانکنش آنتی سرم با پروتئینهای سطح اسپرم می باشد، بایستی طی مراحل الیزا شرایط و محلولها به گونه ای انتخاب شود که مانع تخریب اسپرم و آزاد شدن محتویات درون سلول گردد.

بررسی اثر پروتئینهای ترشحاتی اپی دیدیم بر روی میزان لقاح

از هشت آنتی سرم تولید شده بر علیه پروتئینهای ترشحاتی اپی تلیال اپی دیدیم در این بخش به بررسی اثر سه آنتی سرم 20 و 24 و 72 کیلودالتون خواهیم پرداخت زیرا آنتی سرمهای فوق با سطح اسپرم واکنش رنگی مثبت داده که دلیل بر وجود آنها در سطح اسپرم می باشد. لقاح خارج رحمی (IVF) در rat در محیط mKRB انجام شد (۱۷). برای تهیه سوسپانسیون اسپرم بخش ابتدای ناحیه cauda به طور استریل برداشت و در محیط گرم mKRB قرار داده می شود. طی یک ساعت در انکوباتور CO_2 اسپرمهای متحرک از اپی دیدیم خارج و

عنوان کنترل منفی اضافه می گردد. پس از یکساعت انکوباسیون در دمای $37^\circ C$ و شستشو مطابق مرحله قبل، به تمامی چاهکها $100 \mu l$ از رقت $1:2000$ آنتی بادی کونژوگه (HRP-Conjugated Coat Anti-Rabbit-IgG (DAKO A/S) اضافه کرده و پلیت برای یکساعت در دمای $37^\circ C$ انکوبه می گردد. در پایان این مرحله، شستشوی کامل چاهکها از کونژوگه اضافی، مانع از گسترش رنگ زمینه بویژه در چاهکهای بلانک می گردد. برای مشاهده میزان اتصال آنتی بادی کونژوگه به هر چاهک $100 \mu l$ سوبسترای (HRP (TMB, 0.42 mM) در بافر سیترات-استات 0.1 M با $pH = 4.9$ حاوی $0.05\% H_2O_2$) اضافه می گردد. طی $10-15$ دقیقه رنگ آبی چاهکها ظاهر می گردد. با افزودن $50 \mu l$ HCl (۱ نرمال)، جذب نوری چاهکها سریعاً توسط دستگاه ELISA Reader در طول موج 450 nm قرائت می گردد. با مقایسه میزان جذب نوری چاهکهای هر ردیف، بهترین رقت آنتی سرم به عنوان تیترا تعیین می گردد. در تمامی مراحل ایمونیزاسیون برای تعیین میزان تحریک سیستم ایمنی حیوان و تولید آنتی بادی از این روش استفاده می گردد.

بررسی وجود پروتئینهای ترشحاتی اپی دیدیم در سطح اسپرم

پس از تولید آنتی سرم برای ۸ پروتئین ترشحاتی اپی تلیال اپی دیدیم، برای بررسی وجود هر یک از آنها در سطح اسپرم بالغ از روش الیزا استفاده گردید. واکنش هر آنتی سرم با آنتی ژنهای سطح اسپرم معرف وجود پروتئین آن و یا پروتئینی با شاخصهای آنتی ژنی یکسان در سطح اسپرم است. برای این منظور اسپرم کامل rat به عنوان آنتی ژنهای هدف در کف چاهکهای پلیت متصل گردید.

ناحیه cauda اپی دیدیم rat پس از برش و برداشت در لوله حاوی محیط کشت گرم قرار داده شد. طی یک ساعت انکوباسیون در دمای $37^\circ C$ اسپرمها از درون

مسدود حاوی محیط کشت ایجاد نموده و جنینها را در داخل آن قرار می‌دهیم. وجود دم اسپرم در فضای previtelline و یا مشاهده PN نشانه لقاح تخمک می‌باشد. در مواردی که مشاهده PN به راحتی امکان پذیر نباشد با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی (Locomid) و یا رنگهای فلورسانس واکنش دهنده با DNA (اتیدیوم بروماید)^۱ هسته جنین و تخمکها را رنگ آمیزی کرده و بوسیله میکروسکوپ فلورسانس مشاهده می‌شود. جلوگیری از پاره شدن جنین در زیر لامل بسیار مهم است، زیرا هسته فاقد غشاء بوده و باعث پراکنده شدن کروموزومهای فلورسانس در داخل و خارج سلول شده، در نتیجه تشخیص جنین از تخمک لقاح نیافته بسیار مشکل خواهد بود.

نتایج حاصل از این بخش با استفاده از تست آماری فیشر^۲ مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

کشت موفق سلولهای اپی‌تلیال اپی‌دیدیم rat و بررسی فعالیت سنتزی آنها با استفاده از روش فلوروگرافی انجام گرفت. جمع آوری محیط کشت پس از اتصال و پوشش تمامی کف پلیت توسط سلولهای اپی‌تلیال در پایان هفته اول کشت انجام و پس از حذف سلولها و زوائد سلولی شناور در $C^{\circ} 20$ - ذخیره گردید. تمامی کشتهای پس از یک هفته جمع آوری محیط کشت، در پایان هفته دوم حذف می‌گردید. با انجام کشتهای متوالی طی یک دوره زمانی از هر یک از محیطهای کشت حاوی پروتئینهای نشاندار و غیر نشاندار بیش از 100 ml جمع آوری گردید.

در محیط کشت شناور می‌گردند. با برداشت اسپرمهای متحرک و انتقال به محیط لقاح تازه، طی ۳-۲ ساعت انکوباسیون مجدد در انکوباتور CO_2 ظرفیت پذیری اسپرمها در محیط لقاح حاوی BSA کامل می‌گردد.

برای تهیه تخمک، تعداد مورد نیاز rat ماده با سن حدود ۲ ماه از نژاد Wistar (انستیتو پاستور ایران) تهیه گردید. برای انطباق با شرایط جدید (۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی و شروع روشنایی ۶ صبح، دمای $C^{\circ} 20-25$ ، رطوبت (۷۵-۵۰ درصد)) حداقل ۲ هفته در حیوانخانه نگهداری می‌شوند. تحریک تخمک گذاری بوسیله تزریق گنادوتروپینها انجام گرفت. برای این منظور بوسه هر حیوان $20 IU$ PMSG (Folligon, Invert, Holland) در ساعت ۸/۰۰ AM به صورت IP تزریق گردید. ۵۸-۵۶ ساعت بعد، بین ساعت ۴-۲ PM، $20 IU$ hCG (Organon, Holland) به صورت IP تزریق شده و ۱۸-۱۶ ساعت بعد در ساعت ۸-۱۰ AM با کشتن حیوانات، بخش ابتدای لوله های فالوپ حاوی تخمکهای آزاده شده به صورت استریل برداشت و به قطرات حاوی $400 \mu l$ محیط لقاح منتقل می‌شود. با پاره کردن لوله های فالوپ تخمکها بداخل محیط لقاح آزاد می‌شوند. توده کومولوس حاوی ۲۰-۱۵ تخمک به قطرات حاوی محیط تازه منتقل شده و به ازاء هر تخمک $10^4 \times 5$ اسپرم ظرفیت یافته به قطرات اضافه می‌شود. طی ۵-۴ ساعت عمل لقاح تخمکها کامل می‌گردد، با انتقال تخمکها به قطرات جدید ۱۸-۱۶ ساعت پس از افزودن اسپرمها، پیش هسته های پدري و مادري (PN) و پس از ۲۴ ساعت جنین دو سلولی قابل مشاهده خواهد بود.

چون در rat مشاهده PN با استفاده از استرئومیکروسکوپ مشکل می‌باشد، بایستی با استفاده از بزرگنمایی بالا در زیر میکروسکوپ، پیش هسته ها را مشاهده نمود. برای جلوگیری از پاره شدن جنین یا اووسیت در زیر لامل، ابتدا بوسیله پارافین یک حلقه

1- Ethidium bromide

2- Fischer's Exact Test

واکنش میدهند. وجود پروتئینهای ۲۰ و ۲۴ کیلودالتون در سطح اسپرم طی تکرارهای متوالی تأیید گردید. ولی آنتی سرم پروتئین ۷۲ kD در طی ۵ تکرار متوالی، دوبار واکنش رنگی مثبت بود. ولی در ۳ بار دیگر واکنش رنگی مشابه کنترل منفی مشاهده گردید. برای ۵ آنتی سرم دیگر شامل ۳۴ و ۴۴ و ۵۲ و ۹۸ و ۱۳۵ کیلودالتون طی تکرارهای متوالی اتصال به سطح اسپرم و واکنش رنگی مشابه و در حد سرم کنترل منفی بود.

بررسی اثر پروتئینهای ترشحات اپی دیدیم بر روی میزان لقاح

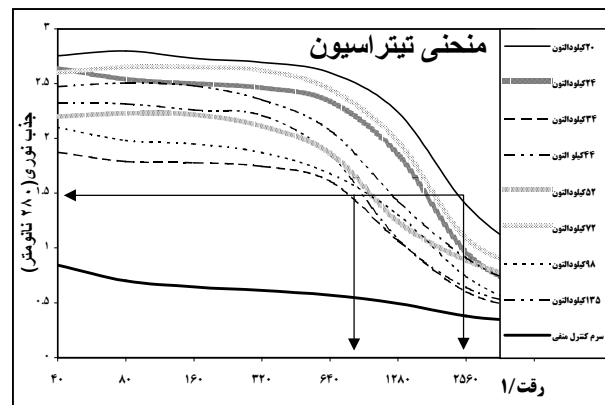
فرآیند لقاح در پستانداران روندی فوق العاده پیچیده و همراه با دخالت و اتصال بین طیف وسیعی از شاخصهای آنتی ژنی پروتئینی و گلیکوپروتئینی و گلیکولیپیدی در سطح اسپرم و تخمک هر گونه می باشد (۱۸). در صورت عدم وجود یک شاخص آنتی ژنی خاص در سطح اسپرم یا تخمک بعید به نظر می رسد که افزودن آنتی سرم آن به محیط لقاح در مقایسه با گروههای کنترل باعث کاهش معنی داری در میزان لقاح در محیط *in vitro* گردد. در صورت مشاهده کاهش احتمالی در میزان لقاح، این کاهش بایستی ناشی از اتصال غیر اختصاصی آنتی سرم با پروتئینها و گلیکوپروتئینهای اصلی در سطح گامتها و در نتیجه مهار عملکرد آنها باشد. بدین دلیل در این تحقیق، تنها اثر آنتی سرمهایی که در روش الایزا با سطح اسپرم واکنش نشان دادند، شامل آنتی سرمهای ۲۰ و ۲۴ و ۷۲ کیلودالتون مورد بررسی قرار گرفت. برای هر آنتی سرم بررسی در چهار گروه مختلف انجام و نتایج هر گروه حداقل ۳ بار تکرار گردید. شکل ۲ نتایج حاصل از این گروهها و تکرارها برای سه آنتی سرم فوق را نشان می دهد.

آنتی سرم پروتئین ۲۰ kD در مقایسه با گروههای کنترل (M+S) و (M) باعث کاهش معنی داری در میزان لقاح می گردد. در انکوباسیون اسپرمها با آنتی سرم فوق (M+(A)) میزان لقاح بیشتر از افزودن مستقیم

تهیه آنتی سرم بر علیه پروتئینهای ترشحات اپی تلیال اپی دیدیم

از میان تعداد ۱۰ پروتئین ترشحات اپی تلیال اپی دیدیم که به خرگوشها تزریق گردید. برای دو پروتئین ۳۲ و ۵۸ کیلودالتون به علت عفونت محل تزریق آنتی سرم تولید نشد. با تزریق مجدد باقیمانده دوایمونوزن در دو خرگوش جدید نیز آنتی سرم تولید نگردید، که احتمالاً بایستی ناشی از عدم حذف کامل گلو تار آلدئید و اسیداستیک موجود در ژل باشد. برای ۸ پروتئین دیگر پس ۳ تزریق متوالی ایمونوزنها و در صورت باقی ماندن ایمونوزن، تزریق چهارم (۲۰، ۲۴، ۴۴، ۷۲ کیلودالتون) تیترا فزاینده آنتی سرم مشاهده گردید. بطوریکه تیترا آنتی سرمهای حاصل از رقت $\frac{1}{1280}$ تا بیش از $\frac{1}{2560}$ متفاوت بود. شکل ۱- منحنی تیتراسیون آنتی سرمهای فوق را نشان میدهد.

شکل ۱: منحنی تیتراسیون آنتی سرمهای تولید شده برای پروتئینهای ترشحات اپی تلیال اپی دیدیم، فلشهای روی منحنی بالاترین و پایین ترین رقت اپتیمم را نشان می دهد.



بررسی وجود پروتئینهای ترشحات اپی دیدیم در سطح اسپرم

بررسی میانکنش ۸ آنتی سرم فوق با سطح اسپرم rat به روش الایزا نشان داد که آنتی سرمهای تولید شده برای پروتئینهای ۲۰ و ۲۴ و ۷۲ کیلودالتون با سطح اسپرم

آنتی معنی دار نیست ($p > 0/05$). در مطالعه فوق از رقت $\frac{1}{250}$ آنتی سرمها و سرم خرگوش استفاده گردید.

بحث

بلوغ کامل اسپرم در دستگاه تناسلی نر شامل وقایع مولکولی پیچیده و دقیقی است که در نهایت اسپرم را قادر به عبور از مجاری تناسلی ماده، رسیدن به جایگاه تخمک، ظرفیت پذیری، اتصال به زونا پلوسیدا، انجام واکنش آکروزومی، عبور از زونا، اتصال باغشاء پلاسمائی تخمک، ادغام دوگامت و در نهایت ایجاد جنین می سازد. بلوغ اسپرم از محل تولید آن در بیضه شروع شده و طی عبور اسپرم از مجاری تناسلی نر و حتی پس از تخلیه در دستگاه تناسلی ماده تارسیدن به تخمک ادامه می یابد (۲،۳،۱۹). اپی دیدیم به عنوان بخشی از مجاری تناسلی نر با طول بیش از چند متر آن، بواسطه عملکرد جذبی و ترشحات سلولهای اپی تلیال داخل مجرا، محیط لازم برای بلوغ اسپرم را فراهم می سازد (۲۰). بلوغ اسپرم در این اندام شامل وقایع مولکولی گسترده ای است که تمامی آنها برای عملکرد نهائی اسپرم یعنی فرآیند لقاح ضروری می باشند. یکی از این روندهای بلوغی ظهور آنتی ژنهای پروتئینی و گلیکوپروتئینی و گلیکولیپیدی در سطح اسپرم می باشد (۲۱). از آنجا که فرآیند لقاح بواسطه حضور و عملکرد و اتصال بین مولکولهای پروتئینی، گلیکوپروتئینی و گلیکولیپیدی سطح اسپرم و تخمک می باشد. در نتیجه برخی از این شاخصهای آنتی ژنی با منشاء اپی دیدیم برای انجام موفقیت آمیز مراحل نهائی لقاح یعنی اتصال اسپرم به زونا پلوسیدا و غشاء تخمک ضروری می باشند. مهار یا حذف عملکرد هریک از این مولکولها بایستی منجر به اختلال در فرآیند لقاح گردد (۲۴،۲۳،۲۲).

آنتی سرم به محیط لقاح (M+A) بود (۳۵٪ در مقابل ۲۸٪). علت احتمالی آن شستشوی اسپرمها پس از انکوباسیون با آنتی سرم و جداسدن برخی از آنتی بادیها از سطح اسپرم می باشد. برای دو آنتی سرم پروتئینهای ۷۲ و ۲۴ کیلودالتون نتایج کلی حاصل از سه تکرار اختلاف معنی داری در میزان لقاح در مقایسه با گروههای کنترل نشان نمی دهد. ولی در بعضی از تکرارهای دو آنتی سرم فوق، اختلاف مشاهده شده با گروههای کنترل معنی دار بود ($p < 0/05$) (تکرار اول آنتی سرم پروتئین ۷۲kD و تکرار دوم آنتی سرم پروتئین ۲۴kD) اختلافات فوق هر چند معنی دار است، ولی میزان P value بسیار نزدیک به ۰/۰۵ می باشد در صورتی که برای تمامی تکرارهای آنتی سرم پروتئین ۲۰kD که باعث مهار لقاح می شود مقدار P value کمتر از ۰/۰۰۱ می باشد. به احتمال زیاد اختلاف فوق بایستی ناشی از تغییر عوامل محیطی شامل دما، ترکیب و pH محیط لقاح و یا عدم ظرفیت پذیری اسپرمها باشد زیرا اسپرم rat به شرایط محیطی فوق العاده حساس است. نتیجه کلی از سه تکرار نشان دهنده عدم اثر آنتی سرمهای فوق بر روی میزان لقاح در rat است. برای آنتی سرمهای فوق دو گروه کنترل استفاده گردید، در گروه کنترلی که فقط حاوی محیط لقاح بود (M)، میزان لقاح بیشتر از گروه کنترل محیط لقاح حاوی سرم خرگوش غیر ایمن (M+S) بود، ولی این اختلاف معنی دار نبود ($p > 0/05$) در بررسی برای یافتن تیترا مناسب آنتی سرمها و سرم خرگوش غیر ایمن برای افزودن به محیط لقاح، افزودن سرم خرگوش غیر ایمن با رقت کمتر از $\frac{1}{100}$ باعث کاهش معنی داری در میزان لقاح در مقایسه با گروه کنترل (محیط لقاح بدون هیچ افزودنی، M) می گردد. ولی در رقتهای بالاتر، هر چند کاهش ناچیزی مشاهده می شود ولی این اختلاف از نظر

از میان ۲۰۰-۱۵۰ پروتئینی که تصور می‌رود توسط اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم پستانداران ترشح شود (۵)، ما تنها قادر به تشخیص و شناسائی ۳۰-۲۰ عدد آنها توسط روش فلوروگرافی بودیم. از این میان حدود ۱۰ پروتئین دارای مقادیری بودند که باند متراکم و پرنرنگی را در فلوروگرام ایجاد کنند (۳۵). برای تولید آنتی‌سرم اختصاصی بر علیه هریک از این پروتئینها، روش مطلوب تخلیص هریک از این پروتئینها به صورت یک فراکسیون کاملاً خالص در حد میلی‌گرم و تزریق پروتئین خالص به حیوان است (۲۵). ولی به علت افزودن FCS به محیط کشت سلولها و مقادیر کم پروتئینهای ترشحي، بخش عمده آنها طی روشهای کروماتوگرافی از دست رفته و به علت تعداد زیاد پروتئینهای محیط کشت، فراکسیون نهائی کاملاً خالص نمی‌باشد. از طرف دیگر به علت عدم سمیت ژل پلی‌اکریل‌آمید برای حیوان، قدرت جداسازی بسیار عالی روش SDS - PAGE و امکان انجام جداسازی بر روی حجم زیاد نمونه محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشحي نشاندار (Preparative Electrophoresis)، جداسازی پروتئینها بدین روش انجام شد (۲۶). هرچند مقادیر پروتئینهای ترشحي ناچیز است ولی به علت حجم زیادی از محیط کشت که تحت الکتروفورز قرار می‌گیرد، باندهای قابل رویتي راپس از رنگ آمیزی ژل با کوماسی‌بلو ایجاد می‌کنند. برای اطمینان و تائید ترشحي بودن پروتئین باندهای تعیین شده، میزان شمارش تابش β باندهای پروتئینی تعیین و درمقایسه با الگوی فلوروگرام، ۱۰ پروتئین مورد نظر انتخاب گردید. از آنجا که تولید آنتی‌سرم برای یک ایمونوژن به عوامل زیادی وابسته بوده و یک پدیده صددرصد نمی‌باشد. برای دو پروتئین ۵۸.۳۲ کیلودالتون آنتی‌سرمی تولید نگردید. از ۸ آنتی‌سرم تولید شده تنها ۳ آنتی‌سرم با سطح اسپرم واکنش رنگی دادند. بدین ترتیب ۵ پروتئین دیگر، درسطح اسپرم نبوده، ولی دارای عملکردهای دیگری در روند بلوغ اسپرم می‌باشد. اثبات وجود دو

پروتئین ۲۰.۲۴ کیلودالتون درسطح اسپرم ممکن است این فکر را ایجاد کند که این دو پروتئین در مقایسه با ۵ یا ۶ پروتئین دیگر نقش مهمتر و ضروری تری در بلوغ اسپرم و فرآیند لقاح دارند. ولی این ایده واقعیت ندارد. بطوریکه بسیاری از مطالعات نیز موید این مطلب است. آنزیم GGT (گاماگلوتامیل ترانسپپتیداز) توسط اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم ترشح شده و نقش اصلی آن حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و محافظت اسپرم در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. آنزیم فوق درسطح اسپرم وجود ندارد ولی به میزان زیاد در مجرای اپی‌دیدیم یافت می‌شود. اختلال در ژن و یا عدم بیان آن منجر به ناباروری جنس نر می‌گردد (۲۷). برخلاف آن آکروزین (۲۸) و گالاکتوزیل ترانسفراز (۲۹) دو پروتئین موجود در سطح اسپرم بوده و نقش مهمی در عملکرد اسپرم دارند. اختلال در بیان دو ژن فوق اختلالی در باروری جنسی نر ایجاد نخواهد کرد. نتایج حاصل از این مطالعه نیز موید تحقیقات فوق است. آنتی‌سرم پروتئین ۲۴kD با سطح اسپرم واکنش داده، که معرف وجود آن در سطح اسپرم بالغ انتهای اپی‌دیدیم می‌باشد. افزودن آنتی‌سرم اختصاصی آن به محیط لقاح و یا انکوباسیون اسپرم با آنتی‌سرم باعث اتصال پروتئین با آنتی‌بادیهای اختصاصی خود شده و احتمالاً عملکرد آن مهار می‌گردد. ولی نتایج حاصل از لقاح خارج رحمی اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نمی‌دهد. این نتیجه گیری ممکن است این سوال را برانگیزد پس چرا تنها اثر آنتی‌سرمهای واکنش دهنده با سطح اسپرم مورد بررسی قرار گرفت؟

عدم وجود پروتئینهای فوق درسطح اسپرم، معرف عملکرد آنها درطول اپی‌دیدیم برای فراهم آوردن محیط لازم برای بلوغ اسپرم می‌باشد (همانند GGT). هرگاه هدف بررسی عملکرد آنها باشد، بایستی با مهار بیان ژن آنها در محیط *in vivo* و عدم ترشح پروتئینها مذکور اثر تک تک آنها مورد بررسی قرارگیرد و یاروش ساده، ولی

پروتئین REP38 با وزن مولکولی ۲۸kD در ترشحات اپی تلپال اپی دیدیم خرگوش می باشد (۳۳).

تعیین دقیق ماهیت فیزیکوشیمیایی پروتئین فوق نیازمند تخلیص آن توسط روش HPLC و یا کروماتوگرافی ایمونوآفینیتی به صورت یک فراکسیون کاملاً خالص می باشد. عملکرد دقیق آن نیز نیازمند بررسی آنتی سرم آن بر روی تک تک روندهای موثر در لقاح به صورت منفرد می باشد. بررسی اثر آنتی سرم فوق بر روی اسپرم و مراحل لقاح در سایر پستانداران باعث شناسایی پروتئینهای مشترک و جلوگیری از کارهای اضافی انجام شده خواهد گردید. امروزه با پیشرفت تکنیکهای بیولوژی مولکولی و شناسایی ژنهای بیان شده در اپی دیدیم، مشخص گردیده که بسیاری از پروتئینهای شناسایی شده با نام و وزن مولکولی متفاوت در گونه های مختلف پستانداران و حتی در نواحی مختلف اپی دیدیم یک گونه، تماماً محصول یک ژن منفرد می باشند و اختلافات موجود ناشی از تغییرات پروتئین در طول اپی دیدیم و نمونه برداری از نقاط متفاوت ویاناشی از اشکالات تکنیکی می باشد (۳۴، ۳۲، ۴).

در نهایت اینکه، در شناسایی پروتئینهای مشترک بین سطح اسپرم و ترشحات اپی تلپال اپی دیدیم rat، چهار پروتئین ۵۴.۲۴.۲۰ و ۵۸ کیلودالتون شناسایی گردید (۳۵) که سه پروتئین ۲۰.۲۴.۵۸ کیلودالتون آن جزء ۱۰ پروتئین برداشت شده از ژل پلی آکریل آمید بودند ولی متأسفانه برای پروتئین ۵۸kD آنتی سرمی تهیه نگردید. با توجه به اتصال آنتی سرم پروتئینهای ۲۰، ۲۴ کیلودالتون با سطح اسپرم، دو پروتئین ۵۸.۵۴ کیلودالتون نیز بایستی از ترشحات اپی دیدیم تخلیص و باتولید آنتی سرم برای هر کدام، نقش و عملکرد آنها مورد بررسی قرارگیرد. از آنجا که بیان ژن در اپی دیدیم اکثر پستانداران دارای الگوی مشابه ای می باشد یافتن چنین پروتئینهایی با نقش اساسی در قدرت باروری حیوانات آزمایشگاهی، منجر به تحقیقات

با دقت کمتر، هم کشتی سلولهای اپی تلپال اپی دیدیم با اسپرمهای نابالغ بیضه و یا اسپرمهای ابتدای اپی دیدیم در حضور و عدم حضور آنتی سرم هریک از پروتئینهای مذکور می باشد. در این مطالعه اسپرمی که از انتهای اپی دیدیم برداشت می شود تمامی مراحل بلوغ خود را در مجاورت این فاکتورها در محیط *in vivo* (اپی دیدیم حیوان) طی کرده است و افزودن آنتی سرم آنها موجب برگشت مراحل بلوغ اسپرم نخواهد گردید.

یافته های ما در مورد کاهش میزان لقاح توسط آنتی سرم پروتئین ۲۰kD نیز کلی و خام است. زیرا مجاورت اسپرم و تخمک و انجام عمل لقاح شامل مراحل پیچیده و متعددی است که پروتئین فوق در یکی از مراحل نقش دارد. با انجام هریک از این مراحل ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی، اتصال به زوناپلوسیدا به طور جداگانه در محیط *in vitro* در حضور یا غیاب آنتی سرم ویژه آن، نقش پروتئین مذکور مشخص تر خواهد گردید. علاوه بر این، بررسی اثر آنتی سرم فوق بر روی سطح اسپرم و میزان لقاح در سایر پستانداران اطلاعات مفیدی از احتمال اشتراک پروتئین مذکور بین انواع پستانداران در اختیار قرار خواهد داد. زیرا پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۰kD و خاصیت اتصال به سطح اسپرم و تاثیر بر روی فرآیند لقاح، در سایر پستانداران شناسایی گردیده که شاید با این پروتئین یکسان باشند. در خرگوش پروتئین BE-20 توسط اپی تلپوم اپی دیدیم ترشح (۳۰) و آنتی بادی اختصاصی آن باعث کاهش میزان لقاح می گردد (۳۱). پروتئینهای EP20، R1، R2 نیز با همین وزن مولکولی در خرگوش شناسایی شده است (۳۲). نکته دیگر اینکه، نبایستی پروتئین مشابه آن در سایر پستانداران حتماً دارای وزن مولکولی برابر با هم باشد. زیرا هر پروتئین پس از ترشح دچار تغییرات پروتئولیتیک زیادی می گردد و ممکن است وزن مولکولی آن در ابتدا بیشتر از ۲۰kD باشد. نمونه آن

مصرفی و غیر مصرفی این تحقیق و نیز پرسنل بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بویژه جناب آقای بهاروند و سرکار خانم افشاریان، بخاطر همکاری و مساعدت فراوان ایشان در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

جهت‌داری برای یافتن پروتئینهای مشابه در انسان و آگاهی از نقش آنها در قدرت باروری و نهایتاً کاربرد آنها در درمان موارد ناباروری مردان با علت ناشناخته خواهد گردید.

تقدیر و تشکر

از مسئولین جهاد دانشگاهی، واحد علوم پزشکی ایران به جهت تأمین بخش عمده‌ای از هزینه مواد

References

- Brooks DE. Secretion of proteins and glycoproteins by the rat epididymis: regional differences, androgen-dependence and effects of protease inhibitors, procaine and tunicamycin. *Biol Reprod.* 1981, 25:1099-1117.
- Moore HDM. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *J Androl.* 1998, 30: 233-239.
- Moore HDM. The influence of the epididymis on human and animal sperm maturation and storage. *Hum Reprod.* 1996, 11:103-110.
- Orgebin-Crist MC. The epididymis across 24 centuries. *J Reprod Fertil.* 1998, 53:285-292.
- Dacheux J, Druart X, Fouchecourt S, et al. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *J Reprod Fertil.* 1998, 53:99-107
- Druart X, Gatti JL, Dacheux F, et al. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis of ram epididymal secreted proteins. *Cell Mol Biol.* 1994, 40:91-93.
- Jones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil.* 1998, 53:73-84.
- Fornes M, Burgos MH. Epididymal glycoprotein involved in rat sperm association. *Mol Reprod Dev.* 1994, 38:43-47.
- Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1998, 53:119-136.
- Hegde UC. Epididymal sperm maturation proteins. *J Bioch Biophys.* 1996, 33:103-110.
- Iusem ND, Pineiro L, Blaquier J, et al. Identification of a major secretory glycoprotein from rat epididymis: Interaction with spermatozoa. *Biol Reprod.* 1989, 40:307-316.
- Cooper TG. Epididymis and sperm function. *J Androl.* 1996, 1:57-59.
- Frank B, Bruno B, deLmirande E, et al. Human Sperm-Zona Pellucida Interaction Is Inhibited by an Antiserum against a Hamster Sperm Protein. *Biol Reprod.* 1994, 51:577-587.
- Beagley K, Wu ZL, Pomeroy M, et al. Jones RC., Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. *J Reprod Fertil.* 1998, 53:235-245.
- Perez-Martinez S, Conesa D, Cuasnicu P. Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J Reprod Immunol.* 1995, 29:31-45.
- Amero S.A, James T. C, Elgin SCR. Production of antibodies using proteins in gel bands. In: Walker JM(ed)The protein protocols handbook. Totowa, New Jersey. Hum Press. 1996, 717-720.
- Miyoshi K, Kono T, Niwa K. Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod.* 1997, 56:180-185.
- Wassarman PM, Litscher ES. Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 1995, 30:1-19.
- Myles D, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20

- and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod.* 1997, 56:320-327.
- 20- Bedford J. The status and the state of the human epididymis. *Hum Reprod.* 1994, 9: 2187-2199.
- 21- Weaver F, Dino J, Germain B, et al. G. Biochemical characterization and epididymal localization of the maturation-dependent ram sperm surface antigen ESA152. *Mol Reprod Dev.* 1993, 35:293-301.
- 22- Boue F, Duquenne C, Lassalle B, et al. FLB1, a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recognition process. *Biol Reprod.* 1995, 52:267-278.
- 23- Boue F, Blais J, Sullivan R. Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1996, 54:1009-1017.
- 24- Focarelli R, Giuffrida A, Capparelli S, et al. Specific localization in the equatorial region of gp20, a 20 kDa sialylglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during epididymal transit which is necessary to penetrate zona-free hamster eggs. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4: 119-125.
- 25- Bailey G. Raising of polyclonal antisera. In: Walker, J(ed) *The protein protocols handbook.* Totowa, New Jersey Hum Press. 1996, 695-698.
- 26- Walker JM. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker, JM(ed). *The protein protocols handbook.* Totowa, New Jersey Hum Press. 1996, 55-62.
- 27- Harding C, Williams P, Wagner E, et al. Mice with genetic gamma-glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans and infertility. *J Biol Chem.* 1997, 272:12560-12567.
- 28- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, et al. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem.* 1994, 269:31845-31849.
- 29- Lu Q, Shur B. Sperm from B1, 4-galactosyl transferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Dev.* 1997, 124: 4121-4131.
- 30- Xu W, Wang L, Miao S, et al. Identification of a rabbit epididymal protein gene. *Arch Androl.* 1996, 37:135-141.
- 31- Xu W, Miao S, Zhang M, et al. Expression of the BE-20 epididymal protein gene: in situ hybridization. *Arch Androl.* 1997, 38:1-6.
- 32- Holland M, Nixon B. The specificity of epididymal secretory proteins. *J Reprod Fertil.* 1998, 53:197-210.
- 33- Nixon B, Hardy C, Clarke H, et al. REP38: a rabbit epididymal secretory protein present on spermatozoa. *The Epididymis Cellular Molecular Aspects Boden.* 1998, 20.
- 34- Kirchhoff C. Gene expression in the epididymis. *Int Rev Cytol.* 1999, 188:133-202.
- ۳۵- صادقی محمد رضا، آخوندی محمد مهدی، زهرائی مهین، شناسائی پروتئینهای مشترک بین ترشحات سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم و سطح اسپرماتوزوئید، پژوهش در پزشکی مجله علمی پژوهشی، دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی (در دست چاپ).