

بررسی خصوصیات آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم انسان توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56

سید احمد رضا محمودی (M.Sc.)^۱، رؤیا قدس (M.Sc.)^۱، امیرحسین زرنانی (Ph.D.)^۲، مهناز حیدری (M.Sc.)^۳، علی احمد بیات (B.Sc.)^۴، ابراهیم ترک‌آبادی (M.Sc.)^۵، محمدمهدی آخوندی (Ph.D.)^۶، کاظم پریور (Ph.D.)^۶، محمود جدی تهرانی (Ph.D.)^۶، محمدرضا صادقی (Ph.D.)^۶.

- ۱- مربی، گروه آنتی‌بادی منوکلونال، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده ابن‌سینا جهاددانشگاهی، تهران، ایران.
- ۲- استادیار، گروه آنتی‌بادی منوکلونال، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده ابن‌سینا جهاددانشگاهی، تهران، ایران.
- ۳- مربی، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل و نازایی، پژوهشکده ابن‌سینا جهاددانشگاهی، تهران، ایران.
- ۴- کارشناس، گروه آنتی‌بادی منوکلونال، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده ابن‌سینا جهاددانشگاهی، تهران، ایران.
- ۵- استادیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل و نازایی، پژوهشکده ابن‌سینا جهاددانشگاهی، تهران، ایران.
- ۶- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

مقدمه: با وجود پیشرفت و گسترش تحقیقات در زمینه تولید مثل و ناباروری و به ویژه فرآیند لقاح، در حال حاضر تعداد اندکی از آنتی‌ژن‌های مؤثر در فرآیند لقاح در سطح اسپرم و تخمک، شناسایی شده است. مطالعه این مولکول‌ها و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، بیوفیزیکی و فیزیولوژیکی آنها، درک هرچه بهتر فرآیند لقاح را تسهیل می‌کند. گذشته از آن، علت اصلی درصد بالایی از ناباروری‌های با علت نامشخص که ناشی از وجود نقایص مولکولی آنتی‌ژن‌های دخیل در عمل لقاح می‌باشند، لذا هدف این مطالعه تعیین خصوصیات آنتی‌ژن مورد شناسایی توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56 می‌باشد.

مواد و روشها: سلول‌های هیبریدومای مولد آنتی‌بادی منوکلونال HS56 علیه آنتی‌ژن سطحی اسپرم انسان به صفاق موش‌های نر بالغ ۶-۸ هفته تزریق شدند تا مقادیر زیاد آنتی‌بادی از مایع آسیت، به دست آید. آنتی‌بادی مذکور توسط ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G، تخلیص و ایزوتیپ این آنتی‌بادی توسط آزمون الیزا تعیین گردید. آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم انسان توسط لیتوم دی‌دوسالیسیلات (LIS) استخراج و الکتروفورز SDS-PAGE روی این آنتی‌ژن‌ها انجام گرفت. به منظور تعیین وزن مولکولی و برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنتی‌ژن مورد نظر، وسترن بلاتینگ انجام شد و محل قرارگیری این آنتی‌ژن در سطح اسپرم انسان به کمک آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم بررسی شده و در نهایت تأثیر یا عدم تأثیر این آنتی‌ژن در واکنش آکروزومی مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل داده‌ها بر اساس مقایسه داده‌های زوج شده و آزمون Wilcoxon Signed Ranks Test انجام و سطح معنی‌داری، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: با تکنیک SDS-PAGE الگوی الکتروفوریک آنتی‌ژن‌های استخراج شده با نمک LIS، مشاهده شد و با آزمون الیزا مشخص شد که آنتی‌ژن مورد شناسایی توسط آنتی‌بادی منوکلونال HS56، در مجموعه آنتی‌ژنی استخراج شده از سطح اسپرم با استفاده از LIS، وجود دارد. ایزوتیپ آنتی‌بادی منوکلونال HS56 از نوع IgG1 تعیین شد. پس از انجام وسترن بلاتینگ، مشخص شد که وزن مولکولی آنتی‌ژن مورد نظر حدود $56 \pm 2 kDa$ است و در ساختار مولکول پروتئین مورد نظر، باند دی‌سولفیدی وجود دارد. آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نشان داد که محل قرارگیری این آنتی‌ژن در ناحیه آکروزومی و گردن اسپرم می‌باشد. با مجاور نمودن آنتی‌بادی منوکلونال با اسپرم و القاء واکنش آکروزومی، مشخص شد که بلوک کردن این اپی‌توپ با آنتی‌بادی منوکلونال HS56، تأثیری در واکنش آکروزومی ندارد ($P=0/11$).

نتیجه‌گیری: براساس بررسی‌های انجام شده، هرچند آنتی‌ژن HS56 در ناحیه آکروزومی و سراسپرم قرار دارد ولی نقش اساسی در فرآیند واکنش آکروزومی دارا نمی‌باشد. بررسی بیشتر این آنتی‌ژن بوسیله تخلیص و بررسی ساختار مولکولی آن و نیز نقش آن در اتصال اسپرم و تخمک، ارزش این آنتی‌بادی را مشخص خواهد نمود.

کل واژگان: اسپرم، آنتی‌ژن سطحی اسپرم، آنتی‌بادی منوکلونال، واکنش آکروزومی، و باروری.

آدرس مکاتبه: دکتر محمدرضا صادقی، گروه آنتی‌بادی منوکلونال، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشکده ابن‌سینا، اوین، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۸۳۵، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: sadeghi@avesina.ac.ir

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 کیسه آکروزومی^۱ می‌باشد. در گردن اسپرم تعداد زیادی میتوکندری وجود دارد که تأمین کننده انرژی تحرک دم اسپرم است. دم اسپرم نیز با ساختار تاژی 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 نحوه قرارگیری مولکول‌های ویژه سطحی این سلولها می‌باشد. نوع ترکیب مولکولی در سطح بسیاری از سلولها از جمله اسپرم مورد مطالعه قرار گرفته و واژه آنتی ژن تمایزی برای مولکول‌های ایمونوژن مختص به بافت‌های مختلف، ابداع گردیده است (۲). با توجه به دخالت آنتی ژن‌های سطحی سلول در عملکردهای اختصاصی یک بافت، شناسایی این نوع آنتی ژن‌ها در مطالعه فعالیت انواع سلولها، بسیار حایز اهمیت است. تفاوت در محل قرارگیری یک آنتی ژن خاص نیز می‌تواند شاخص مهم دیگری در فعالیت‌های خاص سطح سلولها باشد. جذابیت زیادی که در این نوع تحقیقات وجود دارد، مطالعات انتوزنی^۲ یعنی مطالعه تکاملی دو یا چند گونه متفاوت در مقایسه با یکدیگر و مطالعات فیلوژنی^۳ 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 آنتی ژن‌های 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 واکنش‌های جلوگیری از بارداری^۴، در حال انجام است. برای مثال چند آنتی ژن اسپرمی از جمله، FA-1 و SP-10 کاندید استفاده در اینگونه واکنش‌ها هستند که می‌توان افراد را به صورت فعال یا غیرفعال با آنها ایمونیزه کرد و با توجه به عملکرد آنتی ژن‌ها مزبور، در یکی از مراحل عملکردی اسپرم مانع از انجام عملکرد آن شد (۴).

با توجه به نکات فوق، ضرورت مطالعه روی آنتی ژن‌های اسپرم بسیار واضح است. این مطالعات از سال ۱۹۶۵ میلادی شروع و هم‌اکنون طیف وسیعی از محققین روی این موضوع متمرکز هستند. یکی از ابزارهای بسیار کارآمد برای شناسایی بسیاری از آنتی ژن‌ها، آنتی بادی منوکلونال است که با توجه به کاربردهای بسیار زیاد آن در مطالعات ایمونوشیمی، هیستوشیمی، سیتوشیمی و ... بسیار مورد توجه می‌باشد (۳).

تا کنون آنتی ژن‌های زیادی در سطح اسپرم مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال پروتئین P34H با وزن مولکولی ۳۴ kDa که در اتصال و نفوذ اسپرم به تخمک نقش دارد (۵ و ۶). پروتئین HE4 با وزن مولکولی ۱۰ kDa که دارای خاصیت آنتی پروتئازی است (۷ و ۸). پروتئین‌های HSP-70^۵ 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 آنتی بادی

1- Acrosome envelope

2- Ontogeny

3- Phylogeny

4- Contraceptive vaccines

5- Human Sperm Protein-70

منوکلونال برای شناسایی یکی از آنتی ژن های سطحی اسپرم انسان استفاده شده است.

مواد و روشها

الف) حیوانات مورد استفاده: رت های نر بالغ (نژاد ویستار) با سن ۸-۱۰ هفته و موش های نر (نژاد Balb/c) با سن ۸-۱۰ هفته بودند که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش ها و رت ها در شرایط مناسب از نظر بهداشت، دما، رطوبت و روشنایی (سیکل ۱۲ ساعته تاریکی-روشنایی) بدون محدودیت غذایی نگهداری شدند. تمام روش های تجربی مورد استفاده در این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده ابن سینا مورد بررسی و تصویب قرار گرفت.

ب) مواد و دستگاه ها: لیتیم دی سد سالیسیلات (LIS)، Tris، Pristane، HSA^۱، رنگ بیسمارک براون، یونفور کلسیم A23187، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، گلو تار آلدئید و Goat Anti-Mouse Isotype (Sigma, USA)، اسید کلریدریک، استن، رنگ رزبنگال، اتانول (Merck, Germany)، کاغذ PVDF^۲ (Roche, Germany)، فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) (Fluka, USA)، کیسه دیالیز (Biogene, Iran)، ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G (Pharmacia, Sweden)، محیط کشت BWW^۳، (Gibco, USA)، رنگ تریپان بلو (CARLO ERBA, Italy)، آنتی بادی منوکلونال ضد اسپرم انسان HS56، کنژوگه های آنزیمی و فلورسانس FITC-Sheep Anti-Mouse Ig، HRP-Sheep Anti-Mouse Ig (مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال)، دستگاه Shandon Cytospin 4 (Shandon, UK)، تانک الکتروفورز، تانک بلاتینگ (اختریان، ایران).

ج) تولید و تخلیص آنتی بادی منوکلونال: به منظور تولید آنتی بادی منوکلونال در مقادیر زیاد، از روش القاء آسیت استفاده شد. بدین صورت که به ۵ موش نر Balb/c با سن ۸-۱۰ هفته، $500 \mu l$ Pristane به صورت درون صفاقی تزریق شد. ده روز پس از تزریق Pristane، به تعداد $10^6 \times 5$ سلول هیبریدومای مولد آنتی بادی منوکلونال HS56، به صورت درون صفاقی به هر یک از موش های فوق تزریق گردید. پس از آن موش ها 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 حفره صفاقی موشها خارج گردید. سپس $3/2 ml$ آسیت حاصل، به نسبت ۱:۳ با PBS، رقیق و با توجه به نوع ایزوتیپ آنتی بادی منوکلونال، برای تخلیص آنتی بادی از ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین G، عبور داده شد. برای شستشوی ستون، از بافر PBS، $0.15 M$ ، $pH=7.2$ و به عنوان بافر جدا کننده از بافر Gly-HCl، $0.2 M$ ، $pH=2.5$ ، استفاده شد. محلول های خروجی از ستون به حجم های ۲-۳ ml جمع آوری و تعیین غلظت شدند و بخش های حاوی آنتی بادی با هم مخلوط و در برابر PBS، دیالیز گردیدند. به منظور تعیین ایزوتیپ آنتی بادی منوکلونال، تست الایزا به صورت زیر طراحی شد. لایه اول: آنتی ایزوتیپ های Goat Anti-Mouse Isotype، لایه دوم: سوپرناتانت حاصل از کشت سلول های هیبریدومای مولد آنتی بادی منوکلونال HS56 و لایه سوم: کنژوگه HRP-Sheep Anti-Mouse ریخته شد. هدف از تعیین ایزوتیپ آنتی بادی منوکلونال، طراحی روش مناسبی به منظور تخلیص آنتی بادی منوکلونال از مایع آسیتی بود که پس از این مرحله انجام گرفت.

د) استخراج آنتی ژن های سطح اسپرم: نمک LIS ترکیبی کائوتروپ است که باعث تضعیف پیوندهای هیدروفوبی می شود و می تواند پروتئین و گلیکوپروتئین های غشایی

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

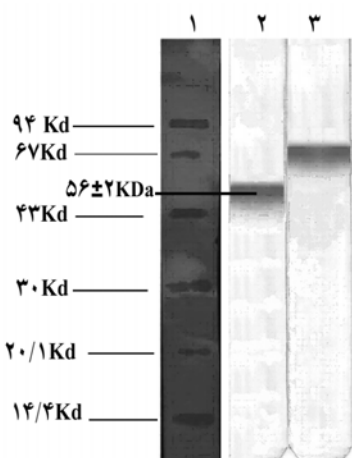
اسپرمی توسط دستگاه Cytospin، روی لام، اسمیر مناسب تهیه شد. لام‌ها در استون (Ice cold) فیکس شدند. سپس لام‌ها ۳ بار با بافر TBS، $0.1 M$ ، $pH=7.4$ شستشو و لایه دوم آنتی بادی منوکلونال با غلظت $10 \mu g/ml$ و لایه سوم کونژوگه FITC-Sheep Anti-Mouse Ig اضافه گردید. پس از اتمام کار، لام‌ها با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر و بوسیله میکروسکوپ فلورسانس دارای فیلتر مخصوص FITC مشاهده گردیدند (۱۳).

(و) بررسی واکنش آنتی بادی منوکلونال HS56 با آنتی ژن‌های استخراج شده به کمک LIS: به منظور بررسی جداسازی آنتی ژن مربوط به آنتی بادی منوکلونال HS56 به کمک نمک LIS از اسپرم، تست الیازی طراحی شد. لایه اول: آنتی ژن‌های استخراجی به روش LIS با غلظت $10 \mu g/ml$ ، لایه دوم: آنتی بادی منوکلونال HS56 با غلظت $10 \mu g/ml$ و لایه سوم: کونژوگه HRP-Sheep Anti-Mouse Ig

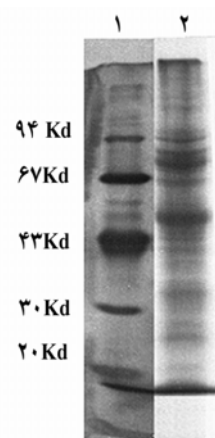
(ز) بررسی وزن مولکولی و خصوصیات بیوشیمیایی آنتی ژن مورد شناسائی توسط آنتی بادی منوکلونال HS56: برای تعیین وزن مولکولی آنتی ژن، از تکنیک وسترن بلات (۱۴) استفاده شد. بدین منظور

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 ابن سینا (درمان ناباروری و سقط مکرر)، جمع آوری و سه مرتبه به وسیله بافر PBS شستشوداده شد (هر مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه و با نیروی $600 g$ سانتریفوژ انجام شد). به منظور استخراج آنتی ژن‌ها از سطح اسپرم، $2 ml$ از رسوب اسپرمی فوق با $5 ml$ از محلول $0.3 M$ نمک LIS، در بافر Tris-HCl، $10 mM$ ، $pH=7.4$ حاوی $2 mM$ PMSF، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $4^{\circ}C$ با قدرت $15000 g$ سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و در برابر بافر Tris-HCl دیالیز گردید (۱۱). پس از استخراج، برای مشاهده نتیجه استخراج و تنوع آنتی ژن‌های استخراجی SDS-PAGE روی ژل پلی آکرلامید ۱۰٪ انجام شد (۱۲).

(ه) تعیین محل قرارگیری آنتی ژن مورد نظر روی اسپرم انسان: ابتدا اسپرم‌های حاصل از افراد طبیعی، در محیط Swim up، BWW شدند. سپس اسپرم‌های زنده و کاملاً متحرک حاصل از این تکنیک با PBS تا غلظت $10^6 sperm/ml$ رقیق شدند. از $100 \mu l$ مخلوط

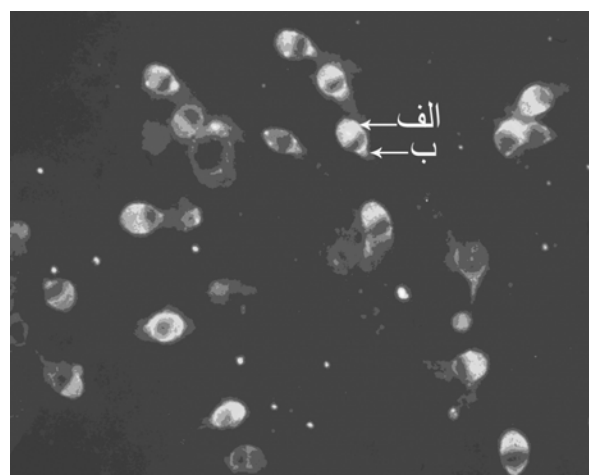


شکل ۲- الگوی وسترن بلائینگ آنتی ژن‌های استخراج شده از سطح اسپرم انسان و مجاورت آنها با آنتی بادی منوکلونال HS56. ۱: مارکرهای وزن مولکولی. ۲: آنتی ژن‌ها در حالت غیر احیاء. ۳: آنتی ژن‌ها در حالت احیاء با 2ME.



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

متحرک در سه لوله تقسیم شدند. اسپرم‌های هر سه لوله مراحل ظرفیت‌پذیری^۱ را در محیط BWW و به مدت ۳ ساعت پشت سر گذاشتند. در مرحله بعد به لوله تست، آنتی بادی منوکلونال HS56 به غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ و به لوله دیگر ایمونوگلوبولین موش غیرایمن با غلظت $20 \mu\text{g/ml}$ اضافه گردید و به لوله کنترل مثبت نیز هیچ ماده‌ای اضافه نشد. این مرحله به مدت یک ساعت در انکوباتور 37°C سپری گردید. پس از آن، مرحله 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، رنگ آمیزی سه گانه روی اسپرم‌ها انجام گرفت. به این صورت که ابتدا اسپرم‌های هر لوله با بافر PBS، سه مرتبه شسته شدند. سپس سوسپانسیون اسپرمی هر لوله، به نسبت مساوی (۱:۱) با رنگ تریپان بلو ۲٪ در دمای 37°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 گلو تار آلدئید ۲/۵٪ (در بافر فسفات 0.1M ، $\text{pH}=7.4$) در دمای 4°C انکوبه شدند. پس از سه بار شستشوی اسپرم‌ها با بافر PBS به رسوب هر لوله $500 \mu\text{l}$ 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 ۸٪ (در آب مقطر) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 37°C ریخته و نگهداری شد. سپس لام‌های رنگ شده، با آب مقطر دیونیزه شستشو شدند. در مرحله بعد لامها با رنگ رزبنگال ۸٪ (تهیه شده در بافر Tris-HCl، 0.1M ، $\text{pH}=7.4$) در دمای اتاق به مدت ۴۰ دقیقه رنگ آمیزی شد. سپس لام‌ها با آب



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

SDS-PAGE بر روی آنتی ژن‌های استخراجی توسط نمک LIS به دو روش احیاء و غیر احیاء انجام شد. برای شناسایی آنتی ژن، از آنتی بادی منوکلونال HS56 با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ و کونژوگه HRP-Sheep Anti-Mouse Ig استفاده شد. در نهایت با توجه به مارکرهای وزن مولکولی، منحنی R_f رسم و حدود وزن مولکولی آنتی ژن مورد شناسایی توسط آنتی بادی منوکلونال HS56، تعیین گردید.

(ج) بررسی وجود اپی توپ مورد شناسایی توسط آنتی بادی منوکلونال HS56 در اسپرم رت و موش: به این منظور ابتدا اسپرم رت و موش بالغ (۸-۱۰ هفته‌ای) از ناحیه اپی دیدیم استخراج و تست الایزای طراحی شد. به تعداد $1 \times 10^6 \text{ sperm/well}$ به عنوان لایه اول، آنتی بادی منوکلونال HS56 با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ به عنوان لایه دوم و کونژوگه HRP-Sheep Anti-Mouse Ig به عنوان لایه سوم ریخته شد.

(ط) بررسی نقش اپی توپ اختصاصی آنتی بادی منوکلونال HS56 در واکنش آکروزومی: به منظور بررسی نقش اپی توپ مورد مطالعه در واکنش آکروزومی، ابتدا اسپرم‌های متحرک و سالم حاصل از افراد طبیعی به روش Swim up جدا شد. سپس اسپرم‌های زنده و

1- Capacitation

۳) استخراج آنتی ژن های سطح اسپرم انسان با کمک نمک LIS: در روش الایزای انجام شده با آنتی ژن های حاصل از نمک LIS، میزان جذب نوری (OD) ایجاد شده حدود ۱/۳ بود و در مقایسه با چاهک های کنترل منفی (با جذب نوری ۰/۱۸) مشخص شد که آنتی ژن مورد شناسایی توسط آنتی بادی منوکلونال HS56، توسط LIS از سطح اسپرم جدا می شود. پس از آن با استفاده از تکنیک SDS-PAGE، الگوی حرکت الکتروفورزی پروتئین های استخراج شده مشخص گردید که در شکل ۱ نشان داده شده است.

۴) تعیین وزن مولکولی و شناسایی برخی از خصوصیات آنتی ژن های مورد شناسایی توسط آنتی بادی منوکلونال: آنتی ژن های استخراج شده به کمک LIS، به دو صورت احیاء و غیر احیاء، الکتروفورز شدند. همانطور که در شکل ۲ دیده می شود، مارک های وزن مولکولی ۹۴ kDa و ۷۷kDa، ۴۳kDa، ۳۰kDa، ۲۰/۱۸kDa، ۱۴/۴kDa به عنوان استانداردهای وزن مولکولی بکار رفته اند که پس از رسم منحنی R_f برای این مارک های وزن مولکولی و مقایسه میزان حرکت باند مربوط به آنتی ژن در حالت غیر احیاء، حدود وزن مولکولی ۵۶±۲kDa محاسبه گردید.

۵) بررسی وجود اپی توپ 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 اپی توپی در اسپرم رت و موش وجود ندارد و میزان رنگ حاصل از آنتی بادی نزدیک به چاهک های بلانک و کنترل منفی بود.

۶) بررسی نقش اپی توپ اختصاصی آنتی بادی منوکلونال HS56 در واکنش آکروزومی: با مقایسه نتایج ناشی از ۳ نوع تست C.I^۱ (کنترل مثبت شامل مراحل ظرفیت پذیری اسپرم و افزودن یونوفور) CMI^۲ (مراحل ظرفیت پذیری اسپرم، افزودن آنتی بادی منوکلونال و یونوفور) و

مقطر دیونیزه شستشو و با ۱۰ مرتبه فرو بردن هر لام در اتانول ۹۰٪، عمل دهیدراتاسیون انجام گرفت. پس از آماده شدن لام ها، با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر، حداقل ۱۲۰۰ اسپرم در هر لام به صورت تصادفی مشاهده و شمارش شد. اسپرم هایی با رنگ صورتی در جلوی سر اسپرم به عنوان واکنش آکروزومی منفی و اسپرم های فاقد این بخش به عنوان اسپرم هایی با واکنش آکروزومی مثبت شناسایی شدند. اسپرم های مرده نیز به دلیل جذب رنگ تریپان بلو، به رنگ آبی پررنگ درآمدند (۱۴). پس از شمارش نمونه ها، به منظور آنالیز و مقایسه داده ها، از نرم افزار SPSS(ver.10.0) و تست آماری ناپارامتری Wilcoxon Signed Ranks Test استفاده و سطح معنی داری، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

۱) تولید و تخلیص آنتی بادی منوکلونال: به منظور تولید انبوه آنتی بادی منوکلونال به طریقه تولید آسیت، از تزریق سلول های هیبریدوما به ۵ سر موش Balb/c، ۳ موش تولید آسیت کرده و ۲ موش تومور جامد تولید کردند. آنتی بادی موجود در آسیت، از طریق کروماتوگرافی جذبی (ستون پروتئین G) تخلیص گردید. از ۲/۲ml آسیت، ۷/۵۳mg آنتی بادی منوکلونال به دست آمد. یعنی در هر میلی لیتر آسیت، ۲/۳۵ mg آنتی بادی تولید شده بود. تعیین زیرکلاس آنتی بادی منوکلونال با استفاده از آزمون الایزا نشان داد که زیرکلاس آنتی بادی مذکور از زیرکلاس IgG1 می باشد. ۲) تعیین محل قرارگیری آنتی ژن در سطح اسپرم انسان: براساس نتایج رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرم انسان با آنتی بادی منوکلونال HS56 و کنژوگه FITC همانطور که در شکل ۳ آمده است کاملاً مشخص است که ناحیه آکروزومی و گردن اسپرم توسط آنتی بادی منوکلونال شناسایی و در نتیجه رنگ فلورسانس از خود نشان می دهند. بنابراین آنتی ژن مورد نظر در این دو ناحیه واقع شده است.

1- Capacitation- Inonophore

2 - Capacitation- Monoclonal Antibody- Ionophore

جدول ۱- درصد واکنش آکروزومی مثبت و میانگین مربوط به سه نمونه بررسی شده برای هر یک از تستها

CPI	CMI	C.I	تست نمونه - میانگین
٪۳۴	٪۲۰	٪۳۲	نمونه ۱
٪۳۳	٪۱۶	٪۳۳	نمونه ۲
٪۳۶	٪۱۷	٪۳۵	نمونه ۳
٪۳۴/۳۳±٪۱/۵	٪۱۷/۱۶±٪۲/۰	٪۳۳/۳۳±٪۱/۵	میانگین و انحراف معیار M±SD

از آن در آزمایشات متنوعی از جمله ایمونوسیتوشیمی، ایمونوهیستوشیمی تخلیص آنتی ژن‌ها، کروماتوگرافی، ایمونوبلاتینگ و سایر تکنیک‌های ایمونوشیمی، در مطالعه حاضر نیز از آنتی بادی منوکلونال استفاده گردید.

در این مطالعه ابتدا روش‌های مختلف برای استخراج آنتی ژن‌های سطح اسپرم بکار گرفته شد SDS، Triton-X100 و LIS از جمله موادی بودند که به این منظور به کار رفتند SDS. چون یک ماده دنا توره کننده است و نیز با دیالیز کردن به طور کامل از محلول خارج نمی‌شود، برای ادامه کار استفاده نشد. به علاوه SDS و Triton-X100 هر دو در طول موج مربوط به سنجش غلظت با تکنیک برادفورده، جذب دارند و باعث ایجاد اشتباه در تعیین غلظت پروتئین می‌شوند. Triton-X100 نیز که یک دترژنت با وزن مولکولی ۲۵۰/۳۸g/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، آنتی بادی به مقدار زیاد حاصل و برای آزمایشات بعدی از جمله ایمونوبلاتینگ و تعیین وزن مولکولی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنتی ژن، مورد استفاده قرار گرفت. وزن مولکولی آنتی ژن حدود

CPI^۱ (شامل مراحل ظرفیت پذیری و افزودن ایمونوگلوبولین غیر اختصاصی موشی و یونوفور)، مشخص شد که اثر آنتی بادی منوکلونال HS56 بر اسپرم انسان، تفاوت معنی داری را در انجام واکنش آکروزومی در مقایسه با نمونه کنترل مثبت ایجاد نکرده است. حضور ایمونوگلوبولین‌های موشی نیز تفاوت معنی داری را در انجام واکنش آکروزومی در مقایسه با نمونه کنترل مثبت ایجاد نکرده است.

بحث

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

با توجه به کارایی بسیار بالای آنتی بادی منوکلونال در مطالعات سلولی و مولکولی، از جمله توانایی استفاده

1- Capacitation- Polyclonal Antibody- Ionophore

صورت احیاء و غیراحیاء و با توجه به نتیجه وسترن بلاتینگ، چنین به نظر می رسد که:

۱) اپی توپ مورد شناسایی توسط آنتی بادی منوکلونال HS56، یک اپی توپ خطی است؛ زیرا با وجود مجاورت با SDS موجود در SDS-PAGE، باز هم توسط آنتی بادی منوکلونال شناسایی می شود. ۲) اپی توپ مورد نظر دارای پیوند دی سولفید در ساختار خود نیست؛ زیرا در حالت احیاء نیز توسط آنتی بادی منوکلونال شناسایی شده است. ۳) آنتی ژن مورد نظر دارای پیوند دی سولفید در ساختار خود می باشد؛ زیرا که آنتی ژن 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. ۴) با توجه به تک باندی بودن بلات در حالت احیاء و غیر احیاء چنین بر می آید که احتمالاً این آنتی ژن 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، آنتی ژنی با وزن $57 kDa$ در سطح اسپرم انسان شناسایی شد که در ناحیه سر اسپرم بدون واکنش آکروزومی، قرار دارد و بلوک کردن آن با آنتی بادی منوکلونال مانع لقاح اسپرم انسان و تخمک بدون زونای هامستر شده است (۱۵). با ادامه تحقیقات روی آنتی ژن شناسایی شده توسط این گروه و نیز ادامه تحقیقات روی آنتی ژن با وزن مولکولی حدود $56 kDa$ شناسایی شده توسط تحقیقات به عمل آمده در پژوهشکده ابن سینا، تشابه یا عدم تشابه این دو آنتی ژن را می توان بدست آورد.

با انجام تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از کنژوگه FITC، مشخص شد که محل قرارگیری آنتی ژن مورد مطالعه، ناحیه آکروزومی و گردن اسپرم انسان

می باشد. همانطور که در بالا نیز ذکر شد، آنتی ژن ۵۷ کیلو دالتونی شناسایی شده توسط Rajeev و همکارانش، نیز در ناحیه آکروزومی اسپرم، قرار داشته است (۱۵). در مطالعه Yoshiki و همکارانش نیز، با استفاده از آنتی بادی منوکلونال HSA-5، وجود آنتی ژنی در ناحیه آکروزومی و استوای اسپرم، گزارش شده است (۱۶). وجود اپی توپ شبیه یا یکسان با اپی توپ موجود در سطح اسپرم انسان که توسط آنتی بادی منوکلونال HS56 شناسایی شود، در اسپرم رت و موش مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً پس از انجام تست الایزا، مشخص گردید که چنین اپی توپی در سطح اسپرم رت و موش وجود ندارد و ظاهراً این اپی توپ در میان اسپرم های انسان، موش و رت، منحصر به اسپرم انسان می باشد. در مطالعه انجام شده توسط Isahakia و همکارش، واکنش متقاطع چندین آنتی بادی منوکلونال تولید شده علیه اسپرم انسان، با اسپرم گونه های دیگر مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که یکی از آنتی بادی های منوکلونال با نام MAL، ناحیه آکروزومی اسپرم انسان، میمون، گاو، سگ، خرگوش، رت و موش را می شناسد اما آنتی بادی منوکلونال دیگری به نام MAb، فقط ناحیه دم اسپرم انسان را می شناسد یا آنتی بادی منوکلونال MA5 نیز فقط ناحیه استوایی اسپرم انسان را شناسایی کرده است (۱۷).

به منظور بررسی تأثیر و دخالت اپی توپ مورد نظر در انجام واکنش آکروزومی اسپرم، تست مورد نظر طراحی شد. با توجه به نتایج این تست چنین برمی آید که با اینکه این آنتی ژن در ناحیه آکروزومی واقع است اما بلوک کردن اپی توپ مورد مطالعه با آنتی بادی منوکلونال HS56 تأثیر معنی داری در واکنش آکروزومی ندارد ($P=0/11$). البته این نظر را نمی توان در مورد کل آنتی ژن مصداق داد. زیرا ممکن است که عملکرد کلی آنتی ژن در واکنش آکروزومی دخیل باشد اما اپی توپ مذکور در این فرآیند دخالتی نداشته باشد.

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.

البته این موضوع را می‌توان با تولید ننتی بادی پلی کلونال علیه این آنتی ژن و بلوکه کردن کل آنتی ژن با آنتی بادی پلی کلونال، مورد بررسی قرارداد. به علاوه می‌توان تحقیق را بر روی دخالت این اپی توپ یا کل آنتی ژن در دیگر عملکردهای اسپرم از جمله اتصال به زوناپلوسیدیا یا لقاح با تخمک و نیز نقش آنها در مراحل ظرفیت پذیری یا حرکت اسپرم، ادامه داد و در صورت امکان آن را به عنوان یک کاندیدا برای تولید واکسن‌های جلوگیری

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 Guinea 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 epididymal 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 epididymal secretory proteins. J. Reprod. Fertil. (Supplement). 1998;(53)197-201.
- 8- Kirchhoff C. Gene expression in the epididymis. 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. Procedure 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.