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 (۲،۳،٤). تعداد پروتئینهایی که درهرگونه 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 ترشحی راتشکیل می دهند (۵). درقوچ تنها دو عدد آنها بیش از ۵۲٪ پروتئینهای ترشحی اپی دیدیم را تشکیل می دهند (٦).

ازطرف دیگر یکی از مهمترین تغییراتی که همراه با حرکت و بلوغ اسپرم درطول 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 درطول اپی دیدیم متناسب با تغییر در الگوی ترشح پروتئینهای ترشحی اپی دیدیم می باشد (۸،۷،۳). بخشی از پروتئینهای ترشحی 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 (۱۰،۹) 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 گرادیان 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 درغشاء و یا عملکردهای اسپرم می گردد (۱۱،۹،۷،۵). 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 (۳۵،۱۱،۵).

بلوغ اسپرم در اپی دیدیم همراه با توسعهٔ چند عملکرد زنده ماندن، تحرک، قدرت شناسائی واتصال به تخمک می باشد (۲،۳،۱۲). نسبت دادن توسعهٔ هریک از این عملکردها به یک یا چند پروتئین ترشحی 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 درساختمان آن ایجاد گردد (۱۲). ولی بوسیلهٔ 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 (۱۳و۹).

هدف از تحقیق اخیر شناسایی چنین پروتئینهائی در سطح اسپرم با منشاء سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم است که در فرآیند لقاح نقش داشته باشند. یافتن چنین پروتئینهائی در ترشحات اپی دیدیم منجر به درک بیشتر از فیزیولوژی و عملکرد این اندام و نیز آگاهی از وقایع مولکولی ظرفیت پذیری[1]، افزایش تحرک[2] و واکنش اکروزومی[3] 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 (۱٤و۱۵).

1- Capacitation
2- Hyperactivation
3- Acrosome reaction

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روشها

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

تهیه آنتی سرم بر علیه پروتئینهای ترشحی اپی تلیال اپی دیدیم

از آنجا که تخلیص بیش از ۱۰ پروتئین ترشحی اپی تلیال اپی دیدیم باخصوصیات فیزیکوشیمیائی مختلف از محیط کشت حاوی پروتئینهای FCS[1] (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 شانهٔ دارای چاهکهای بزرگتر، حجم زیادی از محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشحی 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 درگلوتارآلدئید 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 عرض۵ 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 افزودن۵ml مایع سنتیلاسیون، به ۱۰۰ µ l 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 کنارهٔ ژل نتایج حاصل تائید می گردد.

برای جدا کردن باندهای حاوی پروتئینهای نشاندار، گلوتارآلدئید و اسید استیک ژل با شستشوی مکرر کاملاً حذف می شود. سپس باندهای مشخص شده با دقت جدا و باحذف 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 نربا سن ٤-۳ ماه با وزن حدود ۲kg از نژاد NZW (انستیتوپاستور ایران) تهیه گردید. ایمونیزاسیون و خونگیری از حیوانات مطابق ماخذ شماره ۱٦ انجام گرفت.

سنجش تیتر آنتی سرم پروتئینهای ترشحی

برای سنجش تیترآنتی سرم پروتئینهای ترشحی از محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشحی غیر نشاندار به عنوان آنتی ژنهای هدف در روش الایزا(ELISA)[2] استفاده گردید. برای این منظور ۱۰۰ µl از محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشحی به چاهکهای پلیت ۹٦ خانه الایزا اضافه کرده و پلیت برای مدت ۱۲ ساعت (در طول شب) در دمای ٤ ° C انکوبه می گردد. پس از تخلیه، برای اشباع جایگاههای فعال کف پلیت، مقدار ۱۰۰µl محلول BSA[3](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 ۱۰۰µl از رقتهای سریال $\frac{1}{40}$ تا $\frac{1}{2560}$ هر آنتی سرم به چاهکهای یک ردیف اضافه کرده وچاهک انتهای هر ردیف به عنوان بلانک فقط حاوی PBS می باشد. در یک ردیف نیز رقتهای سریال سرم خرگوش قبل از ایمونیزاسیون به

1- Fetal Calf Serum

2- Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
3- Bovine Serum Albumin

Archive of SID
www.SID.ir

عنوان کنترل منفی اضافه می گردد. پس از یکساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ ° C و شستشو مطابق مرحله قبل، به تمامی چاهکها ۱۰۰μl از رقت ۱:۲۰۰۰ آنتی بادی کونژوگه(HRP-Conjugated Coat Anti-Rabbit-IgG DAKO A/S) اضافه کرده وپلیت برای یکساعت در دمای ۳۷°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 ۱۰۰μl سوبسترای HRP(TMB, ۰/٤۲ mM) در بافر سیترات-استات ۰/۱M با pH= ٤/۹ حاوی ۰/۰۰۵٪ H_2O_2) اضافه می گردد. طی ۱۵-۱۰ دقیقه رنگ آبی چاهکها ظاهر می گردد. با افزودن ۵۰ μl HCl (۱ نرمال)، جذب نوری چاهکها سریعاً توسط دستگاه ELISA Reader در طول موج ٤۵۰nm قرائت می گردد. با مقایسه میزان جذب نوری چاهکهای هر ردیف، بهترین رقت آنتی سرم به عنوان تیتر 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 ترشحی اپی دیدیم در سطح اسپرم

پس از تولید آنتی سرم برای ۸ پروتئین ترشحی اپی تلیال اپی دیدیم، برای بررسی وجود هر یک از آنها در سطح اسپرم بالغ از روش الایزا 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 ۳۷° C اسپرمها از درون 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 ۱۰^{6} اسپرم در میلی لیتر تنظیم می گردد. به هر چاهک پلیت ۱۰۰μl از مخلوط فوق حاوی ۱۰^{5} اسپرم اضافه می شود. طی ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای ٤ $^{\circ}$ C ، با اتصال اسپرمها کف و جدار پلیت از اسپرم پوشیده می شود. سایر مراحل الایزا مطابق سنجش تیترآنتی 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 الایزا شرایط و محلولها به گونه ای انتخاب شود که مانع تخریب اسپرم و آزاد شدن محتویات درون سلول گردد.

بررسی اثر پروتئینهای ترشحی اپی دیدیم بر روی میزان لقاح

از هشت آنتی سرم تولید شده بر علیه پروتئینهای ترشحی اپی تلیال اپی دیدیم در این بخش به بررسی اثر سه آنتی سرم ۲۰و۲٤و۷۲ 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)[1] 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 درانکوباتورCO_2 اسپرمهای متحرک ازاپی دیدیم خارج و

1- *In Vitro* Fertilization

Archive of SID
www.SID.ir

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 می گردد.

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 (۱٤ ساعت روشنائی، ۱۰ ساعت تاریکی و شروع روشنائی ٦ صبح ، دمای $25^{\circ}C$-۲۰ ، رطوبت (۷۵-۵۰ درصد)) حداقل ۲ هفته در حیوانخانه نگهداری می شوند. تحریک تخمک گذاری بوسیله تزریق گنادوتروپینها انجام گرفت. برای این منظور به هر حیوان ۲۰ IU PMSG (Folligon,Invert,Holland) در ساعت ۸/۰۰ AM به صورت IP تزریق گردید. ۵۸-۵٦ ساعت بعد، بین ساعت ٤-۲ PM ، ۲۰IU hCG (Organon,Holland) به صورت IP تزریق شده و ۱۸-۱٦ ساعت بعد در ساعت ۱۰AM-۸ با کشتن حیوانات ، بخش ابتدای لوله های فالوپ حاوی تخمکهای آزاده شده به صورت استریل برداشت و به قطرات حاوی ٤۰۰μl محیط لقاح منتقل می شود. با پاره کردن لوله های فالوپ تخمکها بداخل محیط لقاح آزاد می شوند. تودهٔ کومولوس حاوی ۲۰-۱۵ تخمک به قطرات حاوی محیط تازه منتقل شده و به ازاء هر تخمک 5×10^4 اسپرم ظرفیت یافته به قطرات اضافه می شود. طی ٥-٤ ساعت عمل لقاح تخمکها کامل می گردد، با انتقال تخمکها به قطرات جدید ۱۸-۱٦ ساعت پس از افزودن اسپرمها، پیش هسته های پدری و مادری (PN) و پس از ۲٤ ساعت جنین دو سلولی قابل مشاهده خواهد بود.

چون در rat مشاهده PN با استفاده از استرئومیکروسکوپ مشکل می باشد، بایستی با استفاده از بزرگنمائی 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 مسدود حاوی محیط کشت ایجاد نموده و جنینها را در داخل آن قرار می دهیم. وجود دم اسپرم در فضای previtilline و یا مشاهده PN نشانه لقاح تخمک می باشد. 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)[1] هسته جنین و تخمکها را رنگ آمیزی کرده و بوسیله میکروسکوپ فلورسانس مشاهده می شود. 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[2] مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

کشت موفق سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم 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 اپی تلیال در پایان هفته اول کشت انجام و پس از حذف سلولها و زوائد سلولی شناور در $-20^{\circ}C$ ذخیره گردید. تمامی کشتها پس از یک هفته جمع آوری محیط کشت، درپایان هفته دوم حذف می گردید. با انجام کشتهای متوالی طی یک دوره زمانی از هر یک از محیطهای کشت حاوی پروتئینهای نشاندار و غیر نشاندار بیش از ۱۰۰ml جمع آوری گردید.

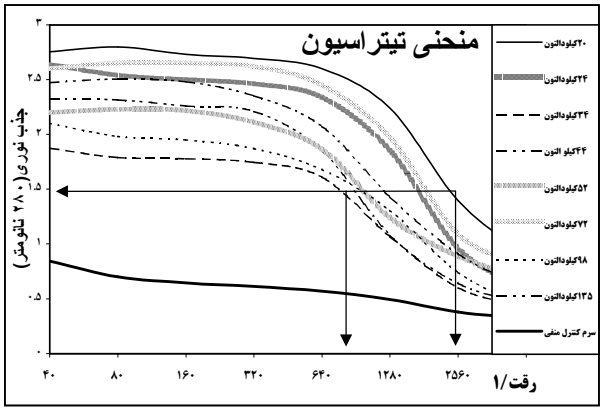
1- Ethidium bromide
2- Fischer's Exact Test

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه آنتی سرم بر علیه پروتئینهای ترشحی اپی تلیال اپی دیدیم

از میان تعداد ۱۰ پروتئین ترشحی 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 دوایمونوژن در دو خرگوش جدید نیز آنتی سرم تولید نگردید، که احتمالاً بایستی ناشی از عدم حذف کامل گلوتارآلدئید و اسیداستیک موجود در ژل باشد. برای ۸ پروتئین دیگر پس ۳ تزریق متوالی ایمونوژنها و در صورت باقی ماندن ایمونوژن، تزریق چهارم (۲۰، ۲۴، ۴۴، ۷۲ کیلودالتون) تیترافزایندهٔ آنتی سرم مشاهده گردید. بطوریکه تیترآنتی 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 ترشحی اپی تلیال اپی دیدیم، فلشهای روی منحنی بالاترین و پایین ترین رقت اپتیمم را نشان می دهد.



بررسی وجود پروتئینهای ترشحی اپی دیدیم درسطح اسپرم

بررسی میانکنش ۸ آنتی سرم فوق با سطح اسپرم rat به روش الایزا نشان داد که آنتی سرمهای تولید شده برای پروتئینهای ۲۰و۲۴و۷۲ کیلودالتون با سطح اسپرم واکنش میدهند. وجود پروتنیهای ۲۰ و ۲۴ کیلودالتون در سطح اسپرم طی تکرارهای متوالی تأیید گردید. ولی آنتی سرم پروتئین kD ۷۲ 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 ۳۴و۴۴و۵۲و۹۸و۱۳۵ کیلودالتون طی تکرارهای متوالی اتصال به سطح اسپرم و واکنش رنگی مشابه و در حد سرم کنترل منفی بود.

بررسی اثر پروتئینهای ترشحی 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 سرمهائی که در روش الایزا با سطح اسپرم واکنش نشان دادند، شامل آنتی سرمهای ۲۰و۲۴و۷۲ 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 kD۲۰ 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 ((A) +M) میزان لقاح بیشتر از افزودن مستقیم

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی سرم بـه محیـط لقـاح (M+A) بـود (۳۵٪ در مقـابل ۲۸٪). علـت احتمـالی آن شستشـوی اسـپرمها پـس از انکوباسـیون بـا آنتـی سـرم و جداشـدن برخـی از آنتی بادیها از سطح اسپرم می باشد. برای دو آنتی سرم پروتئینهای ۲٤و۷۲ کیلودالتون نتایج کلـی حـاصل از سـه تکرار اختلاف معنی داری در مـیزان لقـاح در مقایسـه بـا گروهـهای کنـترل نشـان نمـی دهـد. ولـی دربعضـی از تکرارهای دو آنتی سرم فوق، اختـلاف مشـاهده شـده بـا گروههای کنترل معنـی دار بـود ($p < ۰/۰۵$) (تکـرار اول آنتـی سـرم پروتئیـن ۷۲kD و تکـرار دوم آنتـی سـرم پروتئین ۲٤kD) اختلافات فوق هر چنـد معنـی دار اسـت، ولی مـیزان P value بسـیار نزدیـک بـه ۰/۰۵ مـی باشـد درصورتی که برای تمامی تکرارهای آنتی سرم پروتئیـن ۲۰kD که باعث مهار لقاح می شود مقدار P value کمتر از ۰/۰۰۱ می باشد. به احتمال زیـاد اختـلاف فـوق بایسـتی ناشی از تغییر عوامل محیطـی شـامل دمـا, ترکیـب و pH محیط لقاح و یاعدم ظرفیت پذیـری اسـپرمها باشـد زیـرا اسپرم rat به شرایط محیطی فوق العـاده حسـاس اسـت. نتیجـه کلـی از سـه تکـرار نشـان دهنـده عـدم اثـر آنتی سرمهای فوق برروی میزان لقاح در rat است. بـرای آنتی سرمهای فوق دوگـروه کنـترل اسـتفاده گردیـد، در گروه کنترلی که فقط حاوی محیط لقـاح بـود (M)، مـیزان لقـاح بیشـتر از گـروه کنـترل محیـط لقـاح حـاوی سـرم خـرگـوش غـیر ایمـن (M+S) بـود، ولـی ایـن اختـلاف معنی‌دار نبود ($p > ۰/۰۵$) در بررسـی بـرای یـافتن تیـتر مناسب آنتی سرمها و سـرم خـرگـوش غـیر ایمـن بـرای افزودن به محیط لقاح ، افزودن سرم خرگوش غـیر ایمـن با رقت کمتر از $\frac{1}{100}$ باعث کاهش معنـی داری در مـیزان لقاح در مقایسه با گروه کنـترل (محیـط لقـاح بـدون هیـچ افزودنی ، M) می گردد. ولی در رقتهای بالاتر، هـرچنـد کاهش ناچیزی مشاهده می شود ولی این اختلاف از نظـر آماری معنی دار نیسـت ($p > ۰/۰۵$). در مطالعـه فـوق از رقت $\frac{1}{250}$ آنتی سرمها و سرم خرگوش استفاده گردید.

بحث

بلوغ کامل اسپرم در دستگاه تناسلی نر شـامل وقـایع مولکولی پیچیده و دقیقـی اسـت کـه درنـهایت اسـپرم را قادر به عبور از مجاری تناسلی ماده، رسیدن بـه جایگـاه تخمک، ظرفیت پذیری، اتصـال بـه زونـا پلوسـیدا، انجـام واکنـش آکروزومـی، عبـور از زونـا، اتصـال باغشـاء پلاسمائی تخمک، ادغام دوگامت و درنهایت ایجـاد جنیـن می سازد. بلوغ اسپرم از محل تولید آن در بیضه شـروع شده و طی عبور اسپرم از مجاری تناسلی نر وحتی پـس از تخلیه در دسـتگاه تناسـلی مـاده تارسـیدن بـه تخمـک ادامه می یـابد(۲,۳,۱۹). اپی دیدیـم بـه عنـوان بخشـی از مجاری تناسلی نربا طول بیش از چنـد مـتر آن، بواسـطه عملکرد جذبی و ترشحی سلولهای اپی تلیال داخل مجـرا، محیط لازم برای بلـوغ اسـپرم را فراهـم مـی سـازد(۲۰). بلـوغ اسـپرم درایـن انـدام شـامل وقـایع مولکولـی گسترده ای اسـت کـه تمـامی آنـها بـرای عملکـرد نـهائی اسپرم یعنی فرآیند لقاح ضروری می باشند. یکـی از ایـن روندهـای بلوغـی ظـهور آنتـی ژنـهای پروتئینـی و گلیکـوپروتئینـی و گلیکولیپیـدی در سـطح اسـپرم می باشد(۲۱). از آنجا که فرآیند لقاح بواسـطه حضـور و عملکـرد و اتصـال بیـن مولکولـهای پروتئینـی، گلیکـوپروتئینـی و گلیکولیپیـدی سـطح اسـپرم و تخمـک می باشد. درنتیجه برخی از این شاخصهای آنتی ژنی بـا منشاء اپی دیدیم برای انجام موفقیت آمیز مراحـل نـهائی لقاح یعنی اتصال اسپرم به زوناپلوسـیدا و غشـاء تخمـک ضروری می باشند. مهار یا حذف عملکـرد هریـک ازایـن مولکولـها بایسـتی منجـر بـه اختـلال در فرآینـد لقـاح گردد(۲٤.۲۳.۲۲).

Archive of SID
www.SID.ir

از میان ۲۰۰-۱۵۰ پروتئینی که تصور می رود توسط اپی تلیوم اپی دیدیم 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 پررنگی را در فلوروگرام ایجاد کنند(۳۵). برای تولید آنتی سرم اختصاصی برعلیه هریک از این پروتئینها، روش مطلوب تخلیص هریک از این پروتئینها به صورت یک فراکسیون کاملاً خالص درحد میلی گرم و تزریق پروتئین خالص به حیوان است(۲۵). ولی به علت افزودن FCS به محیط کشت سلولها و مقادیر کم پروتئینهای ترشحی، بخش عمده آنها طی روشهای کروماتوگرافی از دست رفته و به علت تعداد زیاد پروتئینهای محیط کشت، فراکسیون نهائی کاملاً خالص نمی باشد. ازطرف دیگر به علت عدم سمیت ژل پلی اکریل آمید برای حیوان، قدرت جداسازی بسیار عالی روش SDS - PAGE و امکان انجام جداسازی برروی حجم زیاد نمونه محیط کشت حاوی پروتئینهای ترشحی نشاندار(Preparative Electrophoresis)، جداسازی پروتئینها بدین روش انجام شد(۲۶). هرچند مقادیر پروتئینهای ترشحی ناچیزاست ولی به علت حجم زیادی از محیط کشت که تحت الکتروفورز قرار می گیرد، باندهای قابل روئیتی راپس از رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو ایجاد می کنند. برای اطمینان و تائید ترشحی بودن پروتئین باندهای تعیین شده، میزان شمارش تابش β باندهای پروتئینی تعیین ودرمقایسه با الگوی فلوروگرام، ۱۰ پروتئین مورد نظر انتخاب گردید. از آنجا که تولید آنتی سرم برای یک ایمونوژن به عوامل زیادی وابسته بوده و یک پدیده صددرصد نمی باشد. برای دو پروتئین ۵۸.۳۲ کیلودالتون آنتی سرمی تولید نگردید. از ۸ آنتی سرم تولید شده تنها ۳ آنتی سرم با سطح اسپرم واکنش رنگی دادند. بدین ترتیب ۵ پروتئین دیگر، درسطح اسپرم نبوده، ولی دارای عملکردهای دیگری در روند بلوغ اسپرم می باشد. اثبات وجود دو پروتئین ۲۰،۲٤ کیلودالتون درسطح اسپرم ممکن است این فکر را ایجاد کند که این دو پروتئین در مقایسه با ۵ یا ٦ 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 اپی تلیوم اپی دیدیم ترشح شده و نقش اصلی آن حذف گونه های فعال اکسیژن (ROS) و محافظت اسپرم دربرابر رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد. آنزیم فوق درسطح اسپرم وجود ندارد ولی به میزان زیاد در مجرای اپی دیدیم یافت می شود. اختلال در ژن و یا عدم بیان آن منجر به ناباروری جنس نر می گردد(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. آنتی سرم پروتئین ۲٤kD با سطح اسپرم واکنش داده، که معرف وجود آن در سطح اسپرم بالغ انتهای اپی دیدیم می باشد. افزودن آنتی سرم اختصاصی آن به محیط لقاح و یا انکوباسیون اسپرم با آنتی سرم باعث اتصال پروتئین با آنتی بادیهای اختصاصی خود شده واحتمالاً عملکردآن مهار می گردد. ولی نتایج حاصل از لقاح خارج رحمی اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان نمی دهد. این نتیجه گیری ممکن است این سوال را برانگیزد پس چرا تنها اثر آنتی سرمهای واکنش دهنده با سطح اسپرم مورد بررسی قرارگرفت؟

عدم وجود پروتئینهای فوق درسطح اسپرم، معرف عملکرد آنها درطول اپی دیدیم برای فراهم آوردن محیط لازم برای بلوغ اسپرم می باشد(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

Archive of SID
www.SID.ir

با دقت کمتر، هم کشتی سلولهای اپی تلیال اپی دیدیم با اسپرمهای نابالغ بیضه و یا اسپرمهای ابتدای اپی‌دیدیم درحضور و عدم حضور آنتی سرم هریک از پروتئینهای مذکور می باشد. دراین مطالعه اسپرمی که از انتهای اپی‌دیدیم 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 دریکی از مراحل نقش دارد. با انجام هریک از این مراحل ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی، اتصال به زوناپلوسیدا به طور جداگانه درمحیط *in vitro* درحضور یا غیاب آنتی سرم ویژه آن، نقش پروتئین مذکور مشخص تر خواهد گردید. علاوه براین، بررسی اثر آنتی سرم فوق برروی سطح اسپرم ومیزان لقاح درسایر پستانداران اطلاعات مفیدی از احتمال اشتراک پروتئین مذکور بین انواع پستانداران در اختیار قرار خواهد داد. زیرا پروتئینهایی با وزن مولکولی۲۰kD و خاصیت اتصال به سطح اسپرم و تاثیر برروی فرآیند لقاح، در سایر پستانداران شناسائی گردیده که شاید با این پروتئین یکسان باشند. درخرگوش پروتئین BE-20 توسط اپی تلیوم اپی دیدیم ترشح(۳۰) و آنتی بادی اختصاصی آن باعث کاهش میزان لقاح می گردد (۳۱). پروتئینهای R_2 , R_1 , EP20 نیز با همین وزن مولکولی در خرگوش شناسائی شده است(۳۲). نکته دیگر اینکه، نبایستی پروتئین مشابه آن درسایر 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 درابتدا بیشتر از ۲۰kD باشد. نمونه آن پروتئین REP38 با وزن مولکولی۳۸kD در ترشحات اپی‌تلیال اپی دیدیم خرگوش می‌باشد(۳۳).

تعیین دقیق ماهیت فیزیکوشیمیائی پروتئین فوق نیازمند تخلیص آن توسط روش HPLC ویا کروماتوگرافی ایمونوافینیتی به صورت یک فراکسیون کاملاً خالص می باشد. عملکرد دقیق آن نیز نیازمند بررسی آنتی سرم آن برروی تک تک روندهای موثر در لقاح به صورت منفرد می باشد. بررسی اثر آنتی سرم فوق برروی اسپرم و مراحل لقاح در سایر پستانداران باعث شناسائی پروتئینهای مشترک و جلوگیری از کارهای اضافی انجام شده خواهد گردید. امروزه با پیشرفت تکنیکهای بیولوژی مولکولی و شناسائی ژنهای بیان شده در اپی دیدیم، مشخص گردیده که بسیاری از پروتئینهای شناسائی شده با نام و وزن مولکولی متفاوت درگونه 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 درطول اپی دیدیم و نمونه برداری از نقاط متفاوت ویاناشی از اشکالات تکنیکی می باشد(۳۴.۳۲.٤).

درنهایت اینکه، در شناسائی پروتئینهای مشترک بین سطح اسپرم و ترشحات اپی تلیال اپی دیدیم rat , چهار پروتئین ۵٤.۲٤.۲۰و۵۸ کیلودالتون شناسائی گردید(۳۵) که سه پروتئین ۵۸.۲٤.۲۰ کیلودالتون آن جزء ۱۰ پروتئین برداشت شده از ژل پلی آکریل آمید بودند ولی متاسفانه برای پروتئین ۵۸kD آنتی سرمی تهیه نگردید. با توجه به اتصال آنتی سرم پروتئینهای ۲۰ , ۲٤ کیلودالتون با سطح اسپرم، دو پروتئین ۵۸.۵٤ کیلو دالتون نیز بایستی از ترشحات اپی دیدیم تخلیص و باتولید آنتی سرم برای هرکدام، نقش و عملکرد آنها مورد بررسی قرارگیرد. از آنجا که بیان ژن در اپی‌دیدیم اکثر پستانداران دارای الگوی مشابه ای می باشد یافتن چنین پروتئینهایی با نقش اساسی در قدرت باروری حیوانات آزمایشگاهی، منجر به تحقیقات

Archive of SID
www.SID.ir

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 هزینهٔ مواد 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.

References

1- 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.
2- Moore HDM. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. J Androl. 1998, 30: 233-239.
3- Moore HDM. The influence of the epididymis on human and animal sperm maturation and storage. Hum Reprod. 1996, 11:103-110.
4- Orgebin-Crist MC. The epididymis across 24 centuries. J Reprod Fertil. 1998, 53:285-292.
5- 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
6- 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.
7- Jones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. J Reprod Fertil. 1998, 53:73-84.
8- Fornes M, Burgos MH. Epididymal glycoprotein involved in rat sperm association. Mol Reprod Dev. 1994, 38:43-47.
9- Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. J Reprod Fertil. 1998, 53:119-136.
10- Hegde UC. Epididymal sperm maturation proteins. J Bioch Biophy. 1996, 33:103-110.
11- 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.
12- Cooper TG. Epididymis and sperm function. J Androl. 1996, 1:57-59.
13- 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.
14- Beagley K, Wu ZL. Pomering M, et al. Jones RC., Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. J Reprod Fertil. 1998, 53:235-245.
15- 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.
16- 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.
17- 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.
18- Wassarman PM, Litscher ES. Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. Curr Top Dev Biol. 1995, 30:1-19.
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

www.SID.ir

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) .

www.SID.ir