Archive of SID

مقایسه شدت بروز پروتئین CD46 در غشای داخلی اکروزوم اسپرم در دوگروه نرمال و استنواسپرمی*

دکتر محمدحسن نصر اصفهانی، دکتر عباس رضایی، حمید بهرامیان، محمود هاشمی‌تبار

چکیده مقاله

مقدمه. پروتئین MCP (CD46) یکی از پروتئینهای تنظیم کننده سیستم کمپلمان است که بر روی غشاء اغلب سلولهای بدن انسان به جزء اریتروسیت‌ها وجود داشته و در اسپرمها نیز بر روی غشاء داخلی آکروزوم بروز پیدا می‌نماید. هدف این تحقیق، بررسی و مقایسه شدت بروز این پروتئین بر روی غشاء داخلی آکروزوم اسپرمهای دو گروه نرمال و آستنواسپرمی می‌باشد.

روشها. در این تحقیق اسپرمهای ۶ فرد نرمال و ۱۷ فرد آستنواسپرمی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از محلول سازی غشاء اسپرم‌های دو گروه با دیترجنتهای محلول ساز، هسته‌ها و سایر ارگانلهای سلولی از محلول غشایی حاصله، با سانتریفوژ جداسازی شدند. غشاءهای محلول شده از هر نمونه به صورت دوبل از ژل SDS - PAGE عبور داده شده پروتئین‌های تفکیک شده در نیمی از هر ژل با استفاده از تکنیک Western blot به کاغذ نیتروسلولز منتقل و با استفاده از یک آنتی‌بادی مونوکلونال و یک آنتی‌بادی کونژوگه HRP به کاغذ مذکور رنگ‌آمیزی گردید. نیمه دیگر ژل SDS - PAGE با نیترات نقره رنگ‌آمیزی و با استفاده از موقعیت باند رنگ شده در تکنیک Western blot و مقایسه با سایز مارکر، موقعیت وزنی پروتئین CD46 در غشاء داخلی آکروزوم تعیین شد.

نتایج. پس از Score بندی کاغذهای رنگ شده در هر دو گروه نرمال و آستنواسپرمی و انجام آزمون Mann - Whitney، اختلافی از لحاظ شدت بروز پروتئین بر روی غشاء داخلی آکروزوم اسپرمها مشاهده نشد. گروه آستنواسپرمی تنها در پارامتر حرکت با گروه نرمواسپرمی اختلاف دارد، لذا آزمون Spearman جهت بررسی ارتباط بین شدت بروز پروتئین MCP و حرکت اسپرمها انجام گرفت. با انجام این آزمون مشخص شد که بین حرکت و شدت بروز پروتئین MCP یک رابطه مستقیم و معنی‌داری ($r=0/59$, $P<0/01$) برقرار است. ضمناً وزن مولکولی پروتئین MCP در این تحقیق ۳۶ تا ۴۵ و میانگین ۴۲ کیلو دالتون تعیین گردید.

بحث. از لحاظ مشخصه وزنی آنچه که در این تحقیق بدست آمد با آنچه که سایرین در این خصوص گزارش نموده‌اند همخوانی دارد. وجود ارتباط بین شدت بروز پروتئین CD46 و حرکت اسپرمها بیانگر ارتباط احتمالی عوامل بروز پروتئین بر روی غشاء داخلی آکروزوم اسپرم بر حرکت اسپرم می‌باشد.

● *واژه‌های کلیدی: استنواسپرمی، مارکرهای سلولی، CD46، اسپرم.*

مقدمه

سیستم کمپلمان بخشی از دستگاه ایمنی بدن انسان است که اگر از طریق مسیر کلاسیک و یا از طریق مسیر آلترناتیو تحریک گردد قادر است یک سری واکنشهای زنجیره‌ای را ایجاد نماید که نهایتاً با تشکیل کمپلکس حمله کننده به غشاء سبب از بین رفتن عامل تحریک گردد (۱). جهت حفظ عناصر خودی از عناصر بیگانه و تحریک کننده سیستم، پروتئینهایی به عنوان تنظیم کننده فعالیت سیستم وجود دارند که مانع از بین رفتن سلولها و تحلیل پروتئینهای سیستم کمپلمان می‌گردند (۲). پروتئین MCP یکی از این پروتئینهای تنظیم کننده است که نقش کوفاکتوری برای فاکتور I داشته و مانع از تشکیل C5 و C3 کن ورتاز می‌شود (۴و۳). این پروتئین بر روی غشاء اغلب سلولهای بدن انسان به جز اریتروسیتها بروز پیدا می‌کند (۶-۴)، و بر روی اسپرم نیز این ملکول بر روی غشاء داخلی آکروزوم گزارش شده است (۷، ۸).

به دلیل عدم معرفی اسپرمها در زمان جنینی به سیستم ایمنی بدن، اسپرمها برای این سیستم بیگانه محسوب و در صورت عدم وجود پروتئینهای تنظیم کننده این سیستم قادر به از بین بردن اسپرمها خواهد بود(۹).

با توجه به وجود CD46 بر روی غشاء داخلی آکروزوم، و در معرض قرار گرفتن آن پس از انجام واکنش آکروزومی در بخشهای فوقانی سیستم تناسلی زن و در نزدیکی تخمک، نقش حفاظتی این پروتئین در آن نواحی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در بخشهای تحتانی این سیستم، دو پروتئین دیگر تنظیم کننده (CD55, CD59) این نقش حفاظتی را بر عهده دارند (۱۱، ۱۰).

علاوه بر نقش حفاظتی پروتئین CD46 بعد از واکنش آکروزومی، نقش دیگری که توسط این پروتئین ایفاد می‌شود، شرکت در واکنش بین اسپرم و تخمک و به عبارت دیگر، فرآیند لقاح می‌باشد. استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه ملکول CD46 موجود بر روی غشاء داخلی آکروزوم اسپرم منجر به کاهش درصد لقاح شده است (۱۲، ۱۳).

در عین حال به دلیل موقعیت قرارگیری این پروتئین بر روی غشاء داخلی آکروزوم اسپرم، از آن به عنوان یک مارکر جهت تشخیص واکنش آکروزومی استفاده می‌شود (۱۴، ۱۵).

* این طرح با شماره ۷۷۰۷۴ در دفتر هماهنگی امور پژوهش ثبت شده و هزینهٔ آن از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان پرداخت گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

افراد آستنواسپرمی (Asthenospermia) گروهی از افراد نابارور هستند که اسپرمهای آنان در پارامتر حرکت با اسپرمهای گروه نرمال اختلاف دارند (۱۶). سؤالی مطرح است و آن این که آیا پروتئین CD46 در حرکت اسپرم تأثیری دارد؟ با توجه به گزارشهای متناقض موجود در نقش احتمالی شکل محلولی پروتئین CD46 در حرکت اسپرم (۱۷و۱۸)، این تحقیق جهت بررسی ارتباط بین حرکت اسپرم و شدت بروز این پروتئین طراحی گردید.

روشها

از ۲۳ فرد مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مایع منی تهیه و پارامترهای اسپرمی آنها از جمله تعیین تعداد، حرکت، مرفولوژی و میزان حیات اسپرمها ثبت گردید سپس براساس استانداردهای W.H.O (۱۶) شش نفر از ۲۳ نفر مذکور در گروه نرمال و ۱۷ نفر دیگر در گروه آستنواسپرمی قرار گرفتند.

مایع منی تمام افراد در این مطالعه به مدت ۱۵ دقیقه و ۲۰۰۰ دور در دقیقه (2000 rpm) سانتریفوژ گردید و پس از خارج نمودن پلاسمای منی، اسپرمهای باقیمانده ۲ بار با محلول فسفات بافر (PBS) یک مولار شستشو داده شد. غلظت اسپرم به ۲۰ میلیون در هر میلی‌متر تنظیم و سپس یک میلی‌لیتر از هر نمونه برداشته و مجدداً سانتریفوژ شدند. پس از دور ریزی سوپ رویی، به پلاک حاصله ۲۰۰ میلی‌لیتر دیترجنت محلول‌ساز به مدت ۱۵ تا ۱۸ ساعت اضافه شد. پس از آن محلول حاصله در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و نهایتاً سوپ حاصله به عنوان محلولی که دارای ملکول MCP است، مورد استفاده قرار گرفت.

دیترجنت بکار گرفته شده در این تحقیق با استفاده از روش Hara با اندکی تغییر به صورت ذیل در محللو فسفات بافر تهیه گردید (۱۷، ۱۸): یک درصد محلول Igpal، ۱۰ میلی مول EDTA، ۱ میلی مول PMSF (کلیه مواد فوق از شرکت سیگما – آمریکا تهیه شده بودند).

لازم به ذکر است که در ابتدا PMSF در استون حل شده و سپس مقدار لازم به فسفات بافر اضافه شد. همچنین حلال Igpal و EDTA محلول فسفات بافر می‌باشد.

برای تعیین مشخصات وزنی پروتئین‌های موجود و همچنین انتقال پروتئینهای آن به کاغذ نیتروسلولز برای انجام تکنیک Western blot، سوپ حاصله به صورت دوبل از ژل SDS-PAGE عبور داده شد. نیمی از ژل جهت رنگ‌آمیزی نیترات نقره و نیم دیگر آن جهت انجام تکنیک Western blot استفاده شد.

جهت رنگ‌آمیزی کاغذ نیتروسلولز که از طریق تکنیک Western blot، پروتئینها به آن انتقال یافته بود، از یک آنتی‌بادی مونوکلونال (سروتک – انگلستان) و یک آنتی‌بادی کونژوگه به HRP علیه Mouse (سیگما – آمریکا) هر کدام به مقدار ۲g/ml و نهایتاً جهت آشکارسازی HRP از محلول DAB به مقدار ۱mg/ml استفاده شد.

لازم به ذکر است که در طی ۹ بار انجام آزمایش برای ۲۳ فرد مذکور، در هر بار یکی از نمونه‌هایی که در اولین آزمایش بیشترین شدت رنگ را از خود بروز داده بود، به عنوان کنترل مثبت مجدداً تکرار می‌شد. در صورتی که در آزمایشات بعدی از نمونه شدت رنگ زیاد و مشابه حالت اول را نمایش می‌داد، آزمایش صحیح و در غیر این صورت آزمایش تکرار می‌گردید.

براساس شدت رنگ حاصله بر روی کاغذ نیترو سلولز، کاغذهای فوق به چهار گروه (Score) تقسیم شدند. جهت مقایسه شدت رنگهای بدست آمده در دو گروه نرمال و آستنواسپرمی از آزمون نان پارامتریک Mann - Whitney و جهت بررسی ارتباط بین شدت بروز پروتئین CD46 و حرکت اسپرمها از آزمون Spearman استفاده شد.

نتایج

در رنگ‌آمیزی نیترات نقره نیمی از ژل SDS - PAGE، در هر ستون حداکثر چهار باند واضح مشخص شد.

براساس شدت رنگ‌های حاصل از تکنیک Western blot، کاغذهای نیتروسلولز در چهار گروه (Score) قرار گرفتند:

گروه (Score) صفر: هیچ واکنش رنگی در این گروه مشاهده نشد.

گروه (Score) یک: واکنش نسبتاً ضعیفی در این گروه مشاهده شد.

گروه (Score) دو: این گروه واکنش رنگی پر رنگتر از گروه قبل را از خود بروز دادند.

گروه (Score) سه: این گروه واکنش رنگی کاملاً پر رنگ و واضحی را از خود نشان دادند.

براساس گروه‌بندی فوق افراد نرمال و آستنواسپرمی به صورت ذیل تفکیک شدند.

گروه نرمال: سه نفر در گروه سه، دو نفر در گروه دو و یک نفر در گروه یک.

گروه آستنواسپرمی: هشت نفر در گروه سه، سه نفر در گروه یک و دو نفر در گروه صفر.

با انجام آزمون نان پارامتریک Mann - Whitney، در بین دو گروه نرمال و آستنواسپرمی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

جهت بررسی ارتباط بین شدت بروز پروتئین CD46 در غشاء داخلی آکروزوم اسپرم و حرکت اسپرمها در بین دو گروه نرمال و آستنواسپرمی از آزمون Spearman استفاده شد. این آزمون بین دو متغیر شدت بروز پروتئین (اصطلاحاً در این تحقیق Western نامگذاری شد) و حرکت اسپرمها ضریب همبستگی $p<0/01$ و $r=0/59$ را نشان داد. نمودار پراکندگی این آزمون در شکل ۱ نمایش داده شده است. همچنانکه مشخص است یک ارتباط مستقیم بین مقدار بروز پروتئین در اسپرم و حرکت آن برقرار است.

آزمون Spearman جهت بررسی ارتباط بین مقدار بروز پروتئین

www.SID.ir

Archive of SID

MCP در غشاء داخلی اکروزوم اسپرم و میزان حیات اسپرم و تعداد اسپرم نیز صورت گرفت. با انجام این آزمون هیچ رابطه‌ای بین مقدار بروز پروتئین و میزان حیات و همچنین تعداد اسپرم مشاهده نشد.

با انجام مقایسه رنگهای حاصل از تکنیک Western blot با سایز مارکر، وزن مولکولی پروتئین CD46 بین ۳۶ تا ۴۵ و به طور متوسط ۴۲ کیلو دالتون بدست آمد.

بحث

بدلیل اهمیت خاص پروتئین CD46 در دستگاه تناسلی مرد و زن از لحاظ حفظ بقاء اسپرمها و همچنین فرآیند لقاح، تحقیق حاضر پی‌ریزی و اجرا گردید. در طی بررسی‌های تاریخچه‌ای به عمل آمده هیچ گونه گزارشی دال بر مقایسه میزان شدت بروز پروتئین MCP بر روی غشاء داخلی اکروزوم در دو گروه نرمال و آستنواسپرمی و همچنین بررسی ارتباط شدت بروز این پروتئین و پارامترهای حرکت، میزان حیات و تعداد اسپرم بدست نیامد.

پس از گروه‌بندی و انجام مقایسه شدت بروز پروتئین MCP بر روی غشاء داخلی اکروزوم اسپرم در بین دو گروه نرمال و آستنواسپرمی با آزمون Mann - Whitney اختلاف معنی‌داری بدست نیامد.

زمانی که آزمون Spearman جهت بررسی وجود ارتباط بین مقدار بروز مولکول MCP بر روی غشاء داخلی اکروزوم و حرکت اسپرم صورت گرفت، ارتباطی کاملاً واضح و مستقیم بین دو متغیر فوق بدست آمد بدین معنی که هر چه مقدار بروز پروتئین MCP بیشتر باشد حرکت اسپرم هم بیشتر خواهد بود.

Jiang و همکارش (۱۹۹۸) با بکارگیری یک برنامه نرم‌افزاری کامپیوتری و با استفاده از اسپرمهایی که به روش Swimup تهیه شده بودند احتمال نقش داشتن پروتئین‌های تنظیم کننده و مخصوصاً CD46 را در حرکت اسپرمها گزارش نمودند (۱۷). Mclaughlin و همکارانش (۱۹۹۶) مقدار پروتئین CD46 را در مایع منی افراد نرمال و چند گروه نابارور اندازه‌گیری نموده و اعلام کردند اختلافی بین آنها بدست نیاوردند(۱۸، ۱۹). آنچه که در تحقیق حاضر بدست آمده با گزارش Jiang تطابق داشته و تائیدی بر آن است. Simpson و همکارانش (۱۹۹۴) ثابت کردند که مولکول MCP در طی مرحله اسپرماتوژنز بر روی غشاء داخلی اکروزوم اسپرم بروز پیدا می‌کند (۲۰). از تلفیق یافته تحقیق حاضر با گزارش Simpson، شاید نتیجه‌گیری ذیل دور از ذهن نباشد که عامل یا عوامل ساختاری متعددی ممکن است در حرکت اسپرم نقش داشته باشند که بروز مقدار پروتئین MCP بر روی غشاء داخلی اکروزوم اسپرم در طی مرحله اسپرماتوژنز شاید یکی از آنها بوده یا با آن عوامل ارتباط دراد.

در بررسی ارتباط بین میزان بروز پروتئین CD46 بر روی غشاء داخلی اکروزوم اسپرم و میزان حیات اسپرمها، ارتباطی مشاهده نشد. در سال ۱۹۹۹ دو گروه متفاوت، یکی به سرپرستی Clark و دیگری به سرپرستی Mead در گزارش خود به این نکته اشاره کردند که MCP موجود بر روی غشاء داخلی اکروزوم اسپرم در بخشهای فوقانی دستگاه تناسلی زن، پس از انجام واکنش اکروزومی در معرض قرار گرفته و به عنوان یک عامل مهم در تنظیم فعالیت کمپلمان در این نواحی وارد عمل می‌شود (۱۱و۱۰). یافته بدست آمده در این تحقیق تائیدی بر گزارش Clark و Mead است چرا که در مجاری تناسلی مرد و همچنین بلافاصله پس از انزال، مولکول MCP موجود بر روی غشاء داخلی اکروزوم هنوز در معرض کمپلمان قرار نگرفته و بنابراین نمی‌تواند از این جهت در بقاء یا اضمحلال اسپرمها نقش داشته باشند. اسپرمها تا زمانی که در مجاری تناسلی مرد و یا در بخشهای تحتانی دستگاه تناسلی زن قرار دارند از شکل محلول CD46 و یا سایر اشکال CRPs که بر روی غشاء سطحی اسپرم حضور دارند جهت تنظیم فعالیت کمپلمان و در نتیجه تلاش برای بقاء استفاده می‌کنند (۱۱و۱۰) و در بخشهای فوقانی دستگاه تناسلی زن از MCP موجود بر روی غشاء داخلی که در آن نواحی به دلیل انجام واکنش اکروزومی در معرض قرار گرفته است بدین منظور استفاده می‌نمایند. اسپرمهایی که به بخشهای فوقانی دستگاه تناسلی زن می‌رسند زنده بوده و از حرکت برخوردارند، در این نواحی است که فقدان یا کمبود مقدار مولکول MCP بر روی غشاء داخلی اکروزوم می‌تواند سبب تخریب و مرگ اسپرمها گردد.

یکی دیگر از یافته‌های تحقیق حاضر، مقدار وزن مولکولی پروتئین CD46 می‌باشد که بین ۴۵ تا ۳۶ کیلو دالتون و به طور متوسط حدود ۴۲ کیلو دالتون تعیین گردید. Fenichel و همکارانش (۱۹۸۹) برای اولین بار وزن مولکولی پروتئین MCP را بر روی اسپرمهایی که واکنش اکروزومی انجام داده بودند حدود ۵۰-۴۵ کیلو دالتون گزارش نمودند (۲۱). Cervoni و همکارانش (۱۹۹۲) وزن مولکولی این پروتئین را بر روی اسپرمهایی که واکنش اکروزومی انجام داده بودند را فقط ۴۵ کیلو دالتون گزارش نمودند (۸). Christiansen (۱۹۹۶) وزن مولکولی ۳۵ کیلو دالتون را برای مولکول MCP موجود بر روی اسپرم گزارش نمودند (۲۲). از لحاظ وزن مولکولی آنچه که در این تحقیق بدست آمده با گزارشات Christiansen و Cervoni و Fenichel مطابقت داشته و تائیدی بر گزارشات آنان می‌باشد.

اگر چه در این تحقیق بین شدت بروز پروتئین CD46 و حرکت اسپرم ضریب همبستگی چشمگیری بدست آمده اما جهت هر گونه اظهارنظر قطعی و یا روشهای درمانی نیاز به تحقیقات بیشتر در این خصوص می‌باشد.

قدردانی و تشکر

از کلیه پرسنل و مخصوصاً پرسنل آزمایشگاه مرکز باروری و ناباروری اصفهان و همچنین کلیه اعضاء گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی می‌نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

مراجع

1- Abbas.AK. Cellular and Molecolar Immunology. Third Edition, W.B. Saunders Company, 1997;317

2- Charles. A, Janeway. Immuno Biology, the Immune system In Health and Disease. Fourth Edition, Elsevier scince Ltd / Garland publishing, 1999;339.

3- Wang. G,Nonaka-M, He-C, Okada-N,Nakashima-I, Okada-H; Membrane Cofactor Protein (MCP; CD46): Isoform Specific tyrosine phosphorylation. j. immunol, 2000, 164; 1839-46

4- Seya. T, Hirano - A, Matsumoto-M, Nomura-M, Ueda-S; Human membrane cofactor protein (MCP; CD46) multiple Isoforms and function. Int. J. Biochem. Cell Biol, 1999, Nov. 31(11): 1255-60.

5- Taylor.C.T, and Johnson.P.M. Complement - binding proteins are strongly expressed by human pre implantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes. Mol. Hum. Repord, 1996,2;25.

6- Christiansen-D, Loveland-B,Kyriakou-P, Lanteri-M, Escoffier-C, Gerlier-D, Interaction of CD46 with measles virus. Accessory role of CD46 short Consensus repeat IV. J. Gen. Virol, 2000, 81 (4):911-7.

7- Anderson. D. J, Michaelson -J. S, Johnson-P. M; Trophoblast / leukocyte common - antigen is expressed by human testicular germ cells and appears on the surface of acrosome - reacted sperm. Biol. Repord. 1989,41; 285-93.

8- Cervoni. F, Oglesby-T.J, Adams-E.M, Milesifluet-C, Nickells-M, Fenichel-P, Atkinson-J.P, His-B.L, Identification and characterization of membrane cofactor proteln of human spermatozoa. J. Immunol, 1992, 148; 1431-7.

9- Burnet. F.M, The clonal selection theory of acquired Immunity. Cambridge: Combridge university press, 1959.

10- Clark.D.A, Hard science versus phenomenology in reproductive immunology. Crit. Rev. Immunol, 1999,19 (5-6): 509-39.

11- Mead-R, Hinchliffe-S.J, Morgan-B.P, Molecular cloning expression and characterization of the analogue of human MCP (C046). Immunology, 1999, Sep, 98(1): 137-43.

12- Kitamura. M, Matsumiya-K, Yamanaka-M, takahara-S, hara-T, matsumoto-M, Namiki-M, Okuyama-A, Seya-T; Possible association of infertility with sperm. specific abnormality of CD46. J. Reprod. Immunol, 1997, Apr; 33 (1): 83-8.

13- Tsuiimura. A, Shida-K, Kitamuora-M, Takeda-J, Tanaka-H, Nomura-M, Matsumoto-M, Matsumiya-K, Okuyama-A, Nishimune-Y, Okabe-M, Seya-t, Molecular cloning of a murine homologue of MCP (CD46) preferential expression in testicular germ cells. Biochem. J, 1998, Feb 15; 330 (pt.1): 163-8.

14- Carver-ward. J.A, Hollanders-J.M, Jaroudi-K.A, Einspenner-M, Al-Sedairy-S.T, Sheth K.V; Progesteron does not potentiate the acrosome reaction in human spermatozoa., flow cytometric analysis using CD46 antibody. Hum. Repord, 1996, 11 (1): 121-6.

15- Bronson.R.A, Peresleni-T, Golightly-M; Progestron promotes the acrosome reaction in capacitated human spermatozoa as Judged by flow cytometry and CD46 staining. Mol. Hum. Reprod, 1999,Jun; (5): 507-12.

16- W.H.O, W.H.O labratory manual for the examination fo human semen and sperm and sperm-cervical mucus interaction. 3rd Ed, Cambridge university press, 1992;7.

17- Jiang-H and pillai-S, Complement regulatory proteins on the sperm surface relevanceto sperm Motility. Am.J.Reprod. Immunol, 1998, Apr; 39(4):243, (Abs).

18- Mclaughlin-P.J, Holland-S.J, Taylor-C.T, Olah-K. S, Lewis - Jones-D.I, Hara-T, Seya-T, Johnson-P.M, Soluble Cd46 (membrane cofactor protein, MCP) in human reproductive tract fluids. J. Reprod. Immunol, 1996, 31:209-219.

19- Hara-T, Suzuky-Y, Nakasava-T, Nishimura-H, Nagasawa-S, Nishiguchi-M, Matsumoto-M, Hatanaka-M, Kitamura-M, Seya-T; Post-translational modification and intracellular localization of a splice product of CD46 cloned from human testis. role of the intracellular domains n O-glycosylation. Immunology, 1998,93:546-55.

20- Simpson.K.L, Holmes-C.H; Differntial expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55)., membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. Immunology, 1994, 81; 452-61.

21- Fenichel-P, His-B.L, Farahifar-D, Donzeau-M, Barrier-Delpech-D, Yehy-C.J; Evaluation of human sperm acrosome reacting using a monoclonal Antibody, G824, and fluorescence activated cell sorter. J. Reprod. Fertil, 1989, 87;699-709.

22- Christiansen. D, Milland-J, Thorley-B.R, Mckenzie-I.F, Mottram-P.L, Purcell-L.J, Loveland-B.E, Engineering of recombinant soluble CD46: an inhibitor of complement activation. Immonology, 1996, 87; 348-54.

www.SID.ir