Archive of SID

مقالهٔ پژوهشی

تلقیح اسپرم از راه بینی و زیرجلدی برای تولید آنتی اسپرم آنتی بادی و ایجاد ناباروری در خرگوش ماده

دکترمحمدرضا طراوتی[۱]، فهیمه صادق خلیلی[۲]، مجتبی سنکیان[۳]، دکترمه‌زاد مهرزاد صدقیانی[۴]

چکیده

پیش‌زمینه و هدف : کنترل موالید، یکی از مشکلات مهم در سطح جهان می‌باشد. تاکنون تلاش‌های زیادی جهت پیشگیری از بارداری در هر دو جنس مذکر و مؤنث به‌عمل آمده است. گزارش‌های چندی وجود دارد که آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی یکی از علل نازائی در بین خانم‌ها می‌باشد. هدف از این تحقیق پیدا کردن روش مناسب تلقیح اسپرم جهت تولید آنتی‌بادی در ترشحات واژن خرگوش‌های ماده و تأثیر مقدار آنتی‌بادی تولید شده در ایجاد ناباروری و پیداکردن آنتی ژن مناسب در اسپرماتوزوئیدها جهت تهیه واکسن مناسب ضدبارداری می‌باشد.

مواد و روش کار: در این بررسی، اسپرم از خرگوش‌های نر بالغ، تهیه شد. ۱۶ خرگوش ماده بالغ، به‌دوگروه تقسیم شدند. در گروه اول اسپرم از طریق بینی و در گروه دوم از طریق زیرجلدی تزریق گردید. بعد از تکرار ایمونیزاسیون تیترآنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در سرم و در ترشحات واژن در هر دو گروه با روش‌های الیزا (ELISA) ، الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریلامیدژل (SDS-PAGE) و وسترن بلاتینگ (Western blotting) تعیین گردید.

یافته‌ها : در این بررسی ، دو عدد از خرگوش‌های گروه اول نازا و همه خرگوش‌های گروه دوم باردار شدند. بعد از انجام تست الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریلامیدژل و وسترن بلاتینگ جهت تائید نتایج الیزا و هم‌چنین جهت تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های اسپرماتوزوئید مشخص شد که بیشترین پروتئینی که باعث افزایش آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی شده است، پروتئینی با وزن مولکولی ۴۶ هزار دالتون است .

بحث و نتیجه‌گیری : نتایج نشان می‌دهدکه تلقیح اسپرم از طریق بینی در مقایسه با روش زیرجلدی با توجه به ساختمان فیزیولوژیک و آناتومیک مخاط بینی بهتر و بیشتر ، سیستم ایمنی را در ساخت آنتی‌بادی در مخاط واژن تحریک می‌کند. نتایج الکتروفورز نشان می‌دهد با خالص کردن پروتئین با وزن مولکولی ۴۶ هزار دالتون و تلقیح آن به حیوان احتمال دارد این پروتئین را به‌جای خود اسپرماتوزوئید با عوارض و محدودیت‌های کمتر به‌عنوان آنتی‌ژن، در پیشگیری از حاملگی استفاده کردکه این مورد ، نیاز به بررسی عوارض مربوطه دارد .

گل‌واژگان : ناباروری ، آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی ، الیزا

مجلهٔ پزشکی ارومیه، سال چهاردهم، شمارهٔ دوم، ص ۸۶ - ۷۹، تابستان ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه : ارومیه ، دانشگاه علوم‌پزشکی ارومیه - گروه ایمونولوژی ، دکترمحمدرضا طراوتی

۱ - استادیار گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۲ - مربی ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۳ - مربی ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

۴ - استادیار زنان و زایمان دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

افزایش جمعیت در جهان، معضلات اقتصادی و فرهنگی بسیاری را پدید آورده است و کنترل آن با استفاده از روش‌های پیشگیری معمول در کشورهای در حال توسعه چندان موفقیت‌آمیز نبوده است زیرا مشکلات تجویز، مسائل اقتصادی و مهم‌تر از همه، عوارض جانبی روش‌های معمول یکی از موانع مهم می‌باشد. امروزه استفاده از روش‌های ایمونولوژیک در تهیه واکسن‌های ضد حاملگی، مانند: تهیه آنتی ایدیو تایپ مونوکلونال آنتی بادی بر علیه هورمون لوتینیزینگ هورمون رلیزینگ هورمون[1] تولید آنتی بادی بر علیه هورمون گونادوتروپین جفت انسان[2] مطالعات بسیاری را به خود اختصاص داده است اما با توجه به عوارض جانبی و غیرقابل کنترل بودن آن در حال حاضر، با موفقیت چندانی همراه نبوده است. لذا به‌نظر می‌رسد ابداع روش‌های جدید و موثر پیشگیری از حاملگی ضروری باشد (۱ و ۲).

امروزه واکسیناسیون بیشتر از راه خوراکی، زیرجلدی یا داخل جلدی انجام می‌شود. از این رو، علاوه بر تهیه واکسن، ابداع روش‌های جدید واکسیناسیون نیز، از اهمیت خاصی برخوردار است. شواهدی در دست است که به سبب آناتومی و فیزیولوژی مخاطات بینی، تلقیح واکسن‌ها از این طریق سیستم ایمنی به ویژه سیستم مخاطی را بهتر و بیشتر تحریک می‌کند (۳ و ۴). به‌خصوص درمواقعی که نیاز به افزایش سنتز آنتی‌بادی در مخاطات واژن باشد، این روش می‌تواند از تلقیح آنتی‌ژن از راه بینی نیز مؤثر باشد (۵ و ۶ و ۷).

از طرفی مطالعات تحقیقاتی روی سیستم‌های حیوانی و انسانی، ثابت کرده است که آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم، هم در جنس مذکر و هم در جنس مؤنث، می‌توانند باعث ناباروری گردند. به احتمال این آنتی بادی‌ها در اثر اتصال به آنتی‌ژن‌هایی که در باروری، عملکرد خاصی دارند و یا اینکه به سبب بی‌حرکت کردن اسپرم در مخاطات واژن موجب ناباروری می‌گردند (۸ و ۹ و ۱۰) و کاهش این آنتی‌بادی‌ها در مواردی که علت ناباروری ایمونولوژیک باشد، می‌تواند به باروری شخص منجر شود. با وجود این گزارشاتی نیز مبنی بر عدم تاثیر این آنتی‌بادی‌ها در باروری نیز وجود دارد (۸). به احتمال دلیل این امر این است که بر علیه آنتی ژنهای مختلف اسپرم، کلاس‌ها و زیر کلاس‌های مختلف آنتی‌بادی ساخته می‌شود، و به‌نظر می‌رسد با تغییر روش‌های تلقیح آنتی‌ژن و یا تغییر زمان‌های تلقیح که موجب تغییر کلاس و زیرکلاس آنتی‌بادی می‌شود، بتوان تاثیر این آنتی بادی‌های مداخله کننده در باروری را، افزایش داد. تحقیقات نشان می‌دهد، تزریق آنتی‌ژن ۸۰ کیلودالتون اسپرم انسان به رت‌های ماده، موجب ناباروری رت‌های مورد آزمایش می‌شوند (۱۱).

در بافت‌های لنفاوی وابسته به مخاط[3] جذب آنتی‌ژن از طریق سلول‌های اپتیلیال جاذب[4] و سلول‌های اندوتلیال تخصص یافته‌ای به‌نام سلول M انجام می‌شود (۳ و ۴). این سلول‌ها را در سطح فولیکول‌های پلاک پی‌ریز، روده بزرگ، رکتوم و حتی بافت‌های لنفاوی نازوفارنکس و لوزه‌ها می‌توان یافت. در انسان لوزه‌ها و بافت لنفاوی مربوطه که مجموعاً به آنها حلقه والدیر اطلاق می‌گردد، اصلی‌ترین ناحیه القای پاسخ در ناروفارنکس است (۱۸). ایمن سازی از مخاطات به ذره‌ای بودن آنتی‌ژن، اتصال اختصاصی به سلول‌های M، قابلیت تکثیر آنتی‌ژن، استفاده از اجوانت‌هایی نظیر لیپوزوم یا قطعه B توکسین کلرا و یا انتروتوکسین حساس به حرارت اشریشیا کلی و راه ورودی آنتی‌ژن بستگی دارد (۳ و ۴ و ۱۲).

در سال ۱۹۹۵ گالی‌جان و همکارانش دریافتند تزریق

1- (LHRH) University of Medical Sciences.
2- (HCG)
3- MALT
4- AEC

www.SID.ir

Archive of SID

آدنوویروس بروز دهنده گلیکوپروتئین B ویروس هرپس سیمپلکس به بینی موش، در خلاف تزریق صفاقی برای مدت طولانی، موش را در برابر HSV-2 ایمن می‌سازد و پاسخ ایمنی مخاطی مناسبی را ، ایجاد می‌کند. این نوع تزریق، علاوه بر این که در مایع واژن نیز، مقدار زیادی IgG, IgA ضد گلیکوپروتئین B ویروس هرپس سیمپلکس ایجاد می‌کند، در صورتی که تجویز از راه واژن تنها به تولید مقدار ناچیز IgG می‌انجامد (۵). در سوی دیگر، تحقیقات انجام شده توسط کوته[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۶ نشان می‌دهد ، تیترآنتی‌بادی ترشحی مخاطی واژن در دوران آزادسازی تخمک، افزایش قابل توجهی داشته و در دوران قاعدگی با تغییراتی همراه است (۱۳).

اکثر تحقیقات فوق حاکی از این امر است که در صورت تزریق آنتی ژن به بینی و تکرار آن حتی بدون استفاه از اجوانت نیز، می‌توان پاسخ هومورال مناسبی در مخاطات تناسلی، گوارشی و سرم ایجاد کرد. و بدین ترتیب از عوارض ناشی از استفاه اجوانت نیز می‌توان جلوگیری کرد (۱۴).

مواد و روش

در این طرح، ۱۶ خرگوش ماده بالغ که قبلاً حداقل یک مورد سابقه بارداری داشته‌اند، انتخاب شدند. در طی این مرحله، ابتدا آنتی‌ژن تهیه گردید و به دو روش به خرگوش‌های مورد آزمایش تزریق شد. بعد از یک هفته از خرگوش‌ها، نمونه ترشح واژن و سرم گرفته شد و نمونه‌ها با تست‌های SDS-PAGE و الیزا مورد بررسی قرار گرفت .

تهیه آنتی‌ژن: آنتی‌ژن مورد استفاده در این طرح، اسپرم خرگوش نر می‌باشد. مقداری اسپرم از خرگوش‌های نر بالغ، بعد از جفت‌گیری با خرگوش ماده و مقداری نیز بعد از استنشاق طولانی محلول کلروفرم و بیهوش کردن حیوان از لوله‌های اپیدیدیم با روش جراحی تهیه شد. تعداد اسپرماتوزوئید در هر میلی‌متر مکعب اسپرم با استفاده از پی‌پت ملانژور قرمز و لام نئوبار شمارش شد و مقدار کل پروتئین اسپرم در هر میلی متر اسپرم با استفاده از روش برادفورد[2] مشخص شد (۱۵).

تلقیح به بینی خرگوش‌ها: هشت خرگوش (گروه یک) ماده بالغ با وزن ۲/۵ - ۲ کیلوگرم انتخاب شد و چهار روز متوالی به هر خرگوش ۲۵۰ میکروگرم آنتی‌ژن رقیق شده تلقیح گردید و سپس چهار روز به آنها استراحت داده شد. مجدداً چهار روز متوالی تلقیح انجام گرفت. هفت روز پس از آخرین تلقیح، نمونه‌گیری از ترشحات واژن و خونگیری از قلب خرگوش‌ها بعد از استنشاق اثر به‌عمل آمد.

نمونه‌گیری از تشرح واژن و خون خرگوش‌ها: نمونه‌های ترشح واژن، ۷ روز پس از آخرین تزریق با استفاده از بافر فسفات نمکی[3] با pH ۷/۲ گرفته شد . برای این کار ، از سمپلر ۲۵۰ میکرولیتری که به سر آن ۵ سانتی متر از سر سوند ادرار متصل شده بود، استفاده شد. ۲۵۰ میکرولیتر از بافر چندین بار وارد واژن خرگوش شد و بار آخر بافر به لوله آزمایش منتقل گردید (این عمل دوبار انجام شد) و نمونه‌ها بلافاصله بعد از جمع آوری در لوله‌های اپندورف در ۴۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. سپس هر خرگوش ماده ، به مدت بیست روز با یک خرگوش نر بالغ ، کراس داده شدند .

تزریق زیرجلدی : برای این منظور ، هشت خرگوش ماده بالغ (گروه دوم) انتخاب شد و به هر یک ۲۵۰ میکروگرم آنتی‌ژن به ترتیب در روزهای ۰ ، ۷ ، ۱۴ ، ۲۱ و ۲۸ به روش زیرجلدی تزریق گردید. از این ۸ خرگوش قبل و بعد از تزریق نمونه ترشح واژن و سرم تهیه شد. نمونه‌هائی‌که قبل از تزریق اسپرم گرفته شدند به‌عنوان نمونه خرگوش نرمال به عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. سپس هر یک از خرگوش‌های ماده به مدت

---

1. Kutteh
2. Bradford
3. (PBS)

www.SID.ir

Archive of SID

بیست روز با یک خرگوش نر ، کراس داده شدند.

بررسی وجود آنتی‌بادی ضد اسپرم در نمونه‌های ترشح واژن و سرم از طریق تست الیزای غیرمستقیم: بررسی وجود آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در نمونه‌های ترشح واژن و سرم با روش الیزای غیرمستقیم غیررقابتی انجام شد (۱۹). آنتی‌ژن با غلظت‌های متفاوت تهیه شد و مقدار آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی به‌صورت کیفی تعیین گردید. جهت انجام این تست، از آنتی بادی‌های ضد ایمونوگلوبولین‌های خرگوش وصل شده به آنزیم[1] شرکت داکو[2] دانمارک استفاده شد. در شروع تست از روش چک بورداليزا[3] جهت تعیین مقدار مناسب آنتی‌ژن (اسپرم) و رقت مناسب سرم و ترشح واژن استفاده شد (۱۹). در این آزمایش به‌علت عدم وجود IgA خرگوش، امکان رسم منحنی استاندارد وجود نداشت لذا اندازه‌گیری غلظت آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی با روش کمی امکان‌پذیر نشد و نتایج به صورت کیفی و شدت جذب نوری که نسبت مستقیم با مقدار آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی دارد، مقایسه گردید.

انجام تست SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ : جهت تأئید نتایج الیزا و نیز به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئینی که در اسپرم با آنتی‌بادی واکنش نشان می‌دهد و یا باعث نازائی می‌شود از تست SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ که توسط لاملی[4] و همکاران وی شرح داده شده، استفاده شد (۱۶).

روش وسترن بلاتینگ : در این روش، پروتئین‌ها تحت جریان الکتریسیته از ژل به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند (۱۸). بعد از اتمام بلاتینگ کاغذ نیتروسلولز با سرم خرگوش هایی که نازا شده بودند ، (بارقت ۱/۲۰) به‌مدت یک ساعت مجاور شد و سپس کاغذ با بافر شستشو ، سه بار شسته شد و سپس آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین خرگوش کونژوگه به HRP با رقت ۱/۲۰۰ روی کاغذ ریخته و کاغذ به مدت ۳ ساعت در دمای آزمایشگاه روی دستگاه روتاتور گذاشته شد و مانند روش قبلی کاغذ شسته شد ، سپس ترامتیل دی‌آمینوبنزیدین[5] تهیه و بلافاصله روی کاغذ ریخته شد و بعد از ظاهر شدن باندها رنگ با آب مقطر شسته و کاغذ در دمای آزمایشگاه خشک شد.

نتایج

مقادیر جذب نوری در نمونه‌های سرم و ترشحات واژن (که نسبت مستقیم با مقدار آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی دارد) در هر دو گروه خرگوش اندازه‌گیری شد و نتایج با آزمون آماری T جفت شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌عمل آمده نشان داد میانگین جذب نوری در نمونه‌های سرم در هر دو گروه ۱ و ۲ به ترتیب ۱/۱۳ و ۰/۶۹ و در ترشحات واژن به ترتیب ۲/۲۷ و ۱/۰۸ می‌باشد که حاکی از مقادیر بالای آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در ترشحات واژن حیوانات گروه یک می‌باشد. در مقایسه جذب نوری و آزمون آماری T جفت شده ، نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین مقدار آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در سرم p value=۰/۰۰۱ و در ترشحات واژن p value=۰/۰۰۲ وجود دارد. سه راس از خرگوش‌های گروه یک که مقادیر بالایی از آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در ترشحات واژن داشتند که دو راس از آن‌ها بعد از چندین بار کراس دادن با خرگوش‌های نر باردار نشدند. در گروه دوم همه خرگوش‌ها بعد از ۲۰ روز کراس دادن با خرگوش‌های نر باردار شدند .

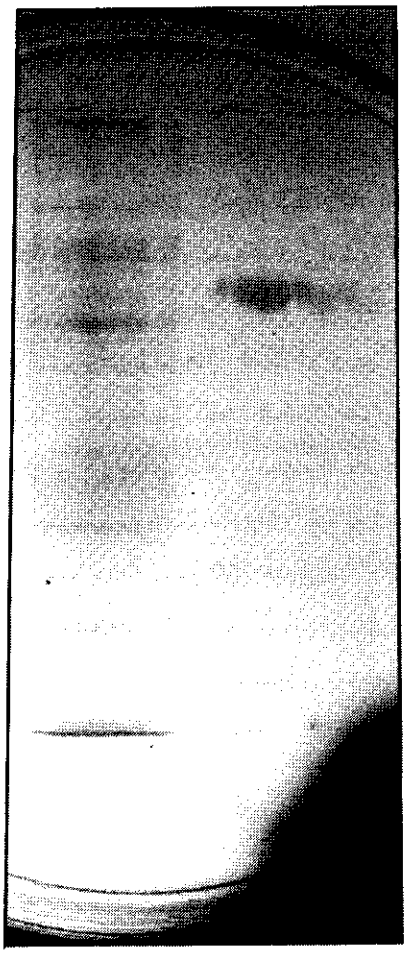
جهت تایید نتایج تست‌های الیزا و تعیین آنتی‌ژنی که بیشترین دخالت را دارد ، تست SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم خرگوش‌های نازا با تیتر آنتی‌بادی بالا انجام شد و مشخص گردید که پروتئینی در حدود ۴۶ کیلودالتون ،

---

1. Anti-rabbit Ig HRP conjugated
2. Dako
3. Checkeboard ELISA
4. Laemmli
5. TMB

www.SID.ir

Archive of SID



الکتروفورز اسپرم خرگوش با روش SDS-PAGE

ایمونوبلاتینگ ژل Immunoblotting

شکل شماره ۱

بیشترین مقدار پروتئینی است که بر علیه آن آنتی بادی در سرم ساخته می‌شود (شکل ۱) ،که آنتی ژن‌های اسپرم به طور اختصاصی در تست الیزا با آن واکنش نشان می‌دهند .

بحث

در این بررسی ، نشان داده شد که ایمن کردن حیوان از طریق بینی، باعث ایجاد آنتی اسپرم آنتی بادی در ترشحات واژن و در

www.SID.ir

Archive of SID

سرم حیوان می‌شود. با این که مقدار آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در سه راس خرگوش افزایش داشته است ، اما فقط دو راس آن‌ها نازا شدند که این نتیجه نشان می‌دهد علاوه بر آنتی‌بادی فاکتورهای دیگری نیز در ایجاد نازائی دخالت دارند .

نتایج تست الیزا نشان می‌دهد که ، غلظت آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در ترشحات واژن خرگوش‌هایی‌که از طریق بینی ، ایمن شده‌اند خیلی بیشتر از غلظت آن در حیواناتی است که آنتی‌ژن از طریق زیرجلدی تزریق شده بود. نتایج به‌عمل آمده نشان می‌دهد با این که در تلقیح اسپرم از طریق بینی از اجوانت استفاده نشده است با این‌همه، تلقیح آنتی‌ژن از طریق بینی، باعث ایجاد پاسخ ایمنی فعال در ترشحات واژن شده است. با این که از هشت خرگوش که همه به‌طور یکسان از طریق بینی ایمن (واکسینه) شده بودند اما تیتر آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در سرم و ترشحات واژن آن‌ها یکسان نمی‌باشد با این که در سرم و ترشحات واژن همه این خرگوش‌ها، آنتی اسپرم آنتی بادی در مقایسه با گروه‌های کنترل وجود دارد، اما همه آنها نازا نشده‌اند. این مسئله نشان می‌دهد احتمالاً تنها وجود آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی چه در سرم و چه در ترشحات واژن علت اصلی نازائی نمی‌باشد و شاید فاکتورهای دیگری نیز دخالت دارند. همچنین علت عدم افزایش تیتر آنتی بادی در نمونه‌های خرگوش‌هایی‌که بارور می‌باشند، مشخص نشد و نیاز به بررسی بیشتر دارد .

تحقیقات انجام شده توسط هوردس[1] و همکاران او که در مجله واکسن[2] به چاپ رسیده (٦) نشان می‌دهد، تزریق آنتی‌ژن از طریق i.n با استفاده از اجوانت، پاسخ ایمنی قوی‌تری را می‌دهد. وی آنتی‌ژن را زیر بیهوشی از طریق بینی، تلقیح کرده بود. در این تحقیق، آنتی‌ژن بدون بیهوشی تلقیح شده است که احتمال می‌رود در تلقیح آنتی‌ژن از طریق i.n موقعی که حیوان بیهوش است مقداری از آنتی‌ژن، ممکن است وارد دستگاه گوارشی و مجاری تنفسی شده که می‌تواند در افزایش پاسخ ایمنی نقش داشته باشد. لذا جهت اطمینان از برخورد مستقیم آنتی‌ژن با مخاط بینی آنتی‌ژن با دوزهای کم و بدون بیهوشی تلقیح شد. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ نه تنها نتایج تست‌های الیزا را تأئید می‌کند بلکه نشان می‌دهد پروتئینی که بر علیه آن بیشترین مقدار آنتی‌بادی تولید شده است، پروتئینی است با وزن مولکولی ۴۶ کیلو دالتون، که این پروتئین باعث افزایش تیتر آنتی‌بادی در سرم و در ترشحات واژن شده است .

نتایج سایر محققین نشان می‌دهد تلقیح آنتی‌ژن از طریق بینی i.n به همراه اجوانت‌ها مثل توکسین وبا و یا لیپوزوم می‌تواند پاسخ ایمنی سیستمیک شدیدتری در مقایسه با آنتی‌ژن بدون اجوانت نماید. بعد از پیداکردن پروتئین ۴۶ کیلو دالتون در اسپرم به نظر می‌رسد با خالص سازی پروتیئن و تلقیح آن به همراه اجوانت از طریق i.n می‌توان پاسخ ایمنی سیستمیک و مخاطی قوی‌تری در حیوان ایجادکرد. همچنین نتایج نشان داد، تنها وجود آنتی اسپرم آنتی بادی در سرم و در ترشحات واژن، جهت ایجاد نازائی کافی نمی‌باشد، بلکه غلظت آنتی بادی، تاثیر کلیدی در نازائی دارد. زیرا در سایر حیواناتی‌که از طریق زیرجلدی تزریق شده بودند، مقایسه نتایج دانسیته اپتیک[3] و الیزا با حیواناتی که از طریق بینی تلقیح شده بودند، مقدار آنتی اسپرم آنتی بادی با غلظت کمتر وجود داشته است، اما همه حیوانات باردار شده‌اند.

---

1. *Hordness*
2. *Vaccine*
3. *(OD)*

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Park M K, Wakabayashi K: preparation of a monoclonal antibody to common amino acid sequence of LHRH and its application. J Endocrinol Japonica, 1986, 33, 20(2): 257-272.
2. Fraser HM, Baker IG: changes in the ovaries of rats after Immunization against luteinizing hormone releasing hormone. J Endocrinol, 1978, 77: 85-93.
3. Walker RJ: New Strategies for using mucosal vaccination to Achieve more effective Immunization. J Vaccine, 1994, 12(5): 387-399.
4. Czerkinsky C & Holmgren J: The Mucosal Immune System and prospects for anti-infections and anti-inflammatory vaccines. J Immunologist, 1995, 3(3): 97-103.
5. Gallichan WS: Specific secretory Immune responses in female genital tract following intranansal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of HSV. J Vaccine, 1995, 13(16): 1589-95.
6. Hordnes K, et al: Nasal immunization with group B Strep can induce high levels of specific IgA antibodies in cervicovaginal secretion of mice. J Vaccine, 1997, 15(11): 1244-1251.
7. Wichell JM, et al: Mucosal immune reponse to an HIV C4/V3 peptide following nasal or intestinal immunization of rabbits. J AIDS research and human retroviruses, 1997, 13(10): 881-889.
8. Pryor, J P: Characterization of anti-sperm antibodies and their coding CDNA sequences by Epstein-Barr Virus transformed B cell lines from lymphocytes of infertile women possessing anti=sperm antibodies. J Reprod Immunol, 1996, 32(2): 171-91.
9. Ohi DA & Naz RK: Infertility due to antisperm Antibodies. J Urol, 1995, 46(4): 591-602.
10. Howe, SE, Grider SL, Lynch DM, Fink LM: Antisperm antibody binding to human acrosin. J Fertil Steril, 1991, 55(6): 1176-82.
11. Bandivdekar A H, Gopalkrishnan K, et al: Antifertility effects in rats actively immunized with 80 KD a human semen glycoprotein. Indian J Exp Biol, 1992, 30(11): 1017-23.
12. Kraehenbuhl JP & Neura. M: Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surface. J Physiol Rev, 1992, 12(4): 853-879.
13. Kutteh W H: Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretion around the time of

www.SID.ir

Archive of SID

ovulation. J Vaccine, 1996, (104): 538-542.

14. Aggerbeck H: Intranasal booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. J Vaccine, 1997, 15(3): 307-316.
15. Bradford M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. J Anal Biochem, 1978, (72): 248-254.
16. Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. J Nature, 1970, (227): 680-685.
17. Reisner A H, Names P and Bucholtz C: The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamid gel. J Anal Biochem, 1975, (64): 509-516.
18. Jurs M, Peters H, Timmis K N and Bitter-Suermann, D: Immunoblotting with monoclonal antibodies: A highly specific system for deterction and identification of bacterial outer membrane proteins. Ed. Habermehl, K. O, in rapid methods and automation in microbiology and immunology, Berlin Heidelberg New York Tokyo, Springer-Verlag, 1984, 94-102.

www.SID.ir