اندازه و مقایسه غلظت پروتئین CD46 در پلاسمای منی افراد بارور و نابارور

محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.☆*، عباس رضایی Ph.D.☆، حمید بهرامیان Ph.D.☆
محمود هاشمی‌تبار Ph.D.☆، فرزاد عریضی M.Sc.☆
☆ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان
*اصفهان، کدپستی ۸۱۵۸۸، مرکز باروری و ناباروری اصفهان

چکیده

* **هدف:** پروتئین Membrane Cofactor Protein (CD46) (MCP) یکی از پروتئینهای تنظیم کننده سیستم کمپلمان است. اندازه‌گیری مقدار غلظت این پروتئین در مایع منی و همچنین بررسی ارتباط بین غلظت پروتئین و برخی از پارامترهای مربوط به اسپرم در افراد بارور و بعضی از گروههای نابارور از اهداف این تحقیق می‌باشد.

* **مواد و روشها:** مایع منی ۸ فرد بارور، ۲۲ فرد آستنواسپرمی، ۲۲ فرد اولیگوآستنواسپرمی و ۱۱ فرد آزواسپرمی انتخاب و پس از انجام آزمایشات روتین، اسپرمها و پلاسمای منی آنها جداگردید. با استفاده از تکنیک Sandwich ELISA با به‌کارگیری از دو آنتی بادی مونوکلونال و یک آنتی بادی پلی کلونال کونژوگه به Horse Rabish Peroxidase (HRP) مقدار غلظت پروتئین در پلاسمای منی چهار گروه فوق اندازه‌گیری شد.

* **یافته‌ها:** میانگین پروتئین CD46 در گروه نرمال ۷۱۰، گروه آستنواسپرمی ۴۵۳، گروه اولیگوآستنواسپرمی ۵۸۲ و در گروه آزواسپرمی ۶۳۹ نانوگرم به ازای هر ml به دست آمد. آزمون T-TEST اختلاف معنی داری را بین گروه نرمال و گروه آستنواسپرمی از لحاظ میانگین غلظت نشان داد (P= 0.002). آزمون Pearson یک ارتباط مستقیم و معنی دار را بین غلظت CD46 و حرکت اسپرمها در دو گروه بارور و آستنواسپرمی (r=۰/۵۲۷، P= 0.005) مشخص نمود. بر اساس تفکیک گروهها از لحاظ تعداد اسپرم، T-TEST یک اختلاف معنی داری بین گروهی که بین ۲۰ تا ۲۰۰ میلیون اسپرم در هر ml از مایع منی (نرمال) و گروهی که بیش از ۲۰۰ میلیون به ازای هر ml (هایپر) از مایع منی داشتند را نشان داد (P= 0.014). آزمون Pearson نیز این ارتباط معنی دار ولی معکوسی بین مقدار غلظت پروتئین و تعداد اسپرم را مشخص نمود (r=-۰/۳۷، P= 0.003).

* **نتیجه‌گیری:** در مطالعه حاضر بین مقدار غلظت CD46 گروه نرمال و آستنواسپرمی و همچنین گروه نرمال و گروه هایپراسپرمی تفاوت معنی داری مشخص شد که بیانگر کاهش مقدار غلظت پروتئین در پلاسمای منی افراد آستنواسپرمی و هایپراسپرمی می‌باشد. این دو یافته بیانگر این نکته است که پروتئین CD46 در مکانیسم حرکت اسپرمها دخالت داشته و ممکن است توسط اسپرمها از مایع منی برداشت گردد. در ضمن، یک ارتباط مستقیم و معنی داری بین درصد حیات اسپرمها و غلظت پروتئین به دست آمد. بنابراین احتمال می‌رود کاهش مقدار غلظت پروتئین CD46 در مایع منی علتی برای وجود آستنواسپرمی و یا الیگواسپرمی باشد.

گل واژگان: پروتئین CD46، مایع منی، افراد بارور و نابارور

نشریه پزشکی یاخته، سال سوم، زمستان ۸۰، شمارهٔ ۱۲، صفحات ۱۹۵-۱۸۹ تاریخ وصول: ۸۰/۸/۲۲، تاریخ پذیرش: ۸۰/۱۰/۱۷

مقدمه

سیستم کمپلمان اولین سد دفاعی بدن علیه عوامل مهاجم و یک واسطه مهم واکنشهای التهابی است که از طریق مسیر کلاسیک والترناتیو فعال می‌شود. پس از تحریک، محصول نهایی این سیستم C5b-9 یا مجموعه حمله کننده به غشاء نام داشته که قادر است عوامل تحریک را شناسایی و سبب حذف آنها از بدن گردد (۱، ۲).

سیستم کمپلمان اگر چه خود بخشی از سیستم ایمنی بدن محسوب می‌گردد اما در پاتوژنز بعضی از بیماریهای خود ایمنی (۳، ۴) از قبیل گلومرنفریت (۵)، انفارکتوسهای میوکارد (٦) و اختلالات بافت اسکتال (۷) نیز نقش دارد. در خصوص ارتباط این سیستم با بعضی از بیماریهای دستگاه تناسلی، عده‌ای از محققین معتقدند که کاهش تعداد اسپرم (الیگواسپرمی) یا فقدان اسپرم در مایع منی (آزواسپرمی) (۸، ۹) و همچنین کاهش شانس فرآیند لقاح (۱۰) یا سقطهای متعدد (۱۱، ۱۲) ممکن است در نتیجه دخالت این سیستم حادث گردد.

جهت حفظ عناصر بیگانه تحریک کننده سیستم، پروتئینهایی در بدن وجود دارند که به عنوان تنظیم کننده فعالیت سیستم کمپلمان عمل کرده و مانع از بین رفتن سلولها و تحلیل پروتئینهای سیستم می‌گردد (۱۳). پروتئین MCP یکی از پروتئینهای تنظیم کننده است که نقش کوفاکتوری برای فاکتور I داشته و مانع از تشکیل C5، C3 کن ورتاز می‌شود (۱۴، ۱۵).

CD46 بر روی غشاء تمام سلولهای انسانی به جز اریتروسیتهای خون وجود داشته (۱۵، ۱٦) و علاوه بر آن، به صورت محلول هم در اغلب مایعات بیولوژیک بدن از قبیل پلاسمای خون، اشک، شیر، بزاق و مخصوصاً پلاسمای منی (۱۷، ۱۸، ۱۹) نیز یافت می‌شود.

با توجه به اثرات مدولاتوری CD46 در تنظیم فعالیت کمپلمان، به نظر می‌رسد که یک اختلال ژنتیکی و یا اکتسابی در افزایش و یا کاهش بیان این پروتئین می‌تواند باعث بروز اختلال در فعالیت سیستم کمپلمان گردد. این موضوع در بروز بعضی از سرطانها به اثبات رسیده است (۱۹).

در گذشته عده‌ای از محققین اقدام به اندازه‌گیری مقدار پروتئین CD46 در مایع منی و همچنین بررسی ارتباط آن با بعضی از اختلالات سیستم تناسلی مرد نموده‌اند (۱۷، ۲۰، ۲۱). غلظتهای گزارش شده در این خصوص اختلاف زیادی را نشان داده و از لحاظ ارتباط بین پروتئین CD46 و بعضی از اختلاف سیستم تناسلی هم یک عدم ارتباط گزارش شده است (۱۷، ۲۰). لذا هدف تحقیق حاضر اندازه‌گیری دقیق مقدار غلظت پروتئین CD46 در مایع منی افراد نرمال و بعضی از افراد نابارور و همچنین بررسی ارتباط بین غلظت این پروتئین و بعضی از اختلالات اسپرمی می‌باشد.

مواد و روشها

از بیماران مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان تعداد ٦۳ فرد انتخاب گردید. تستهای روتین آزمایشگاهی از قبیل شمارش اسپرمها، درصد حرکت پیشرونده رو به جلو، درصد حیات (به روش ائوزین - نگروزین) صورت گرفت. (جهت دقت کار کلیه تستهای فوق توسط دو نفر به صورت مجزا انجام می‌گرفت. در صورتی که اختلاف بین یافته‌های دو نفر کمتر از ده درصد بود میانگین آنها ثبت و در غیر این صورت تست مربوطه مجدداً تکرار می‌گردید.) بر این اساس ۸ نفر در گروه نرمال (تعداد بیشتر از ۲۰ میلیون در هر ml و حرکت پیشرونده رو به جلو بیشتر از ۵۰ درصد)، ۲۲ نفر در گروه آستنواسپرمی (تعداد بیشتر از ۲۰ میلیون در هر ml و حرکت پیشرونده رو به جلو کمتر از ۵۰ درصد)، ۲۲ نفر در گروه اولیگوآستنواسپرمی (تعداد کمتر از ۲۰ میلیون در هر ml و حرکت رو به جلو کمتر از ۵۰ درصد) و ۱۱ نفر در گروه آزواسپرمی (بدون اسپرم) قرار گرفتند.

جهت جداسازی اسپرمها و پلاسمای منی، تمام نمونه‌ها در ۲۰۰۰rPm به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شده و پس از جمع آوری مایع رویی (پلاسمای سمن) جهت حذف ذرات، مجدداً در ۱۴۰۰۰rPm به مدت ده دقیقه در دمای ۴° سانتیگراد سانتریفوژ صورت گرفت. نهایتاً مایع منی در ۷۰°- سانتیگراد نگهداری شد (۲۲).

جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین CD46 از تکنیک Sandwich ELISA به ترتیب ذیل استفاده شد (۲۳).

۱. ظرف میکروپلیت (E 4.3) ۹٦ خانه (NUNC) توسط آنتی بادی مونوکلونال Mouse Anti Human CD46 (Pharmingen Co.U.S.A) به عنوان آنتی بادی تله انداز با غلظت ۲μg/ml در بافر (۰/۰۵M pH=۷/۲)به صورت Over night در درجه حرارت ۴° سانتیگراد کت شد.

۲. مکانهای خالی ظرف، توسط یک درصد در PBS به مدت دو ساعت و در دمای ۳۷° سانتیگراد بلوک گردید.

۳. نمونه‌های آنتی ژنی به سه گروه نمونه کنترل مثبت (استاندارد)، کنترل منفی و نمونه آزمایش تقسیم شدند. نمونه استاندارد در بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی اصفهان با غلظت ۴μg/ml و با استفاده از ستون سپروز 6HR (شرکت فارماسیا) تهیه شد. نمونه‌های آزمایش از پلاسمای منی بیماران انتخاب گردید که به نسبت ۱/۲۰ در PBS رقیق شده بودند.

برای نمونه کنترل منفی از Rabit-Anticomplment (شرکت بیوژن) استفاده شد.

تمام نمونه‌های آنتی ژنی به مدت دو ساعت و در دمای ۳۷° سانتیگراد به ظرفهای حاوی آنتی بادی تله انداز اضافه شدند.

۴. آنتی بادی مونوکلونال Mouse Anti Human CD46 (J4-48) (Serotec Co UK) با غلظت ۲ μg/ml در PBS به عنوان آنتی بادی آشکار ساز به مدت دو ساعت در شرایط ۳۷° سانتیگراد به ظرف حاوی آنتی بادی تله انداز و آنتی ژن اضافه شد.

۵. آنتی بادی Goat Anti Mouse HRP labeled (Sigma Co) با غلظت ۲μg/ml در PBS به مدت دو ساعت و در دمای ۳۷° سانتیگراد به ظروف حاوی کمپلکس فوق اضافه شد.

٦. بعد از هر مرحله از مراحل اول تا پنجم، سه بار شستشو در PBS/Tween 0/05% هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

۷. سوبسترای OPD (Sigma Co) به صورت یک قرص ۲۰ mg در ۵۰ ml بافر فسفات سیترات (pH=5, 0.05M) استفاده شد.

بلافاصله قبل از مصرف ۲۰ µl آب اکسیژنه به آن اضافه شد. پس از آن از محلول فوق ۱۰۰ µl به هر خانه از میکروپلیت جهت ایجاد واکنش رنگی حداکثر به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. از اسید سولفوریک ۲/۵ مولار به میزان ۵۰ µl/well جهت توقف واکنش رنگی استفاده و سپس جذب نوری (OD) هر یک از خانه‌ها در طول موج ۴۴۰ nm با استفاده از دستگاه ELISA Reader قرائت گردید.

در روشهای اندازه‌گیری CD46 کمپلکس HRP یا به آنتی بادی آشکار ساز توأم است (۱۸) و یا جنس آنتی بادیهای تله ساز و آشکار ساز مختلف انتخاب می‌شود و کمپلکس HRP به آنتی بادی نوع سومی علیه آنتی بادی آشکار ساز مثلاً خرگوش توأم می‌شود (۲۴). در مطالعه حاضر کمپلکس HRP به آنتی بادی Anti Mouse Goat توأم بود چون آنتی بادیهای آشکار ساز و تله انداز هر دو از نوع Mouse بودند، لذا دائماً مقداری جذب نوری (OD) حتی در غیاب آنتی ژن و یا در نمونه کنترل منفی وجود داشت که پس از کم کردن مقدار جذب نوری خانه‌هایی که فقط حاوی آنتی بادی تله ساز بودند، عدد به دست آمده (Cut Off) به عنوان جذب نوری نهایی برای محاسبه غلظت CD46 و رسم منحنی نیمه لگاریتمی مورد استفاده قرار گرفت.

برای آنالیز اطلاعات حاصل از Version برنامه نرم‌افزاری SPSS استفاده شد. جهت مقایسه میانگینهای مختلف از آزمون T-TEST، و از آزمون Pearson Correlation جهت مقایسه متغیرهای مستقل کمی استفاده شد.

یافته‌ها

جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین CD46 از تکنیک Sandwich ELISA استفاده شد. در این تحقیق چهار گروه بارور و نابارور مورد آزمایش قرار گرفتند که عبارتند از گروه نرمال، گروه آستنواسپرمی، گروه الیگوآستنو و نهایتاً گروه آزواسپرمی.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میانگین غلظت پروتئین CD46 در این چهار گروه عبارت بود از: گروه نرمال ۷۱۰/۰۶۶، گروه آستنواسپرمی ۴۵۳/۹۷۱، گروه آستنواسپرمی ۵۸۲/۶۷۲ و گروه آزواسپرمی ۶۳۹/۶۹ نانوگرم به ازای هر ml (جدول ۱). پس از مقایسه میانگین غلظت سه گروه آخر با گروه نرمال مشخص شد که گروه آستنواسپرمی در مقایسه با گروه نرمال دارای اختلاف معنی داری بوده (P= 0.002) سایر گروهها اختلافی با گروه نرمال نشان ندادند.

جدول ۱: توزیع فراوانی و میانگین غلظت پروتئین CD46 در افراد مورد آزمایش در گروههای مختلف بارور و نابارور

نام گروه	تعداد افراد	درصد فراوانی	CD46 غلظت ± S.D بر حسب ng/ml
نرمال	۸	۱۲/۷	۷۱۰/۰۶۶ ± ۱۲/۹۹۲
آستنو اسپرمی *	۲۲	۳۴/۹	۴۵۲/۹۷۱ ± ۱۶۸/۴۶۵
الیگو آستنو اسپرمی	۲۲	۳۴/۹	۵۸۲/۶۷۲ ± ۱۷۲/۳۶۱
آزو اسپرمی	۱۱	۱۷/۵	۶۳۹/۶۹ ± ۱۶۹/۲۴

* گروه ستاره دار دارای اختلاف معنی‌دار با گروه نرمال است P< 0.05

یکی از اهداف این تحقیق مقایسه میزان غلظت CD46 با حرکت پیشرونده رو به جلو اسپرمها در نظر گرفته شده بود.

جهت بررسی ارتباط بین حرکت پیشرونده رو به جلو اسپرمها و مقدار غلظت پروتئین در بین دو گروه نرمال و آستنواسپرمی همچنین کل نمونه‌ها از آزمون ارتباط Pearson استفاده شد. با استفاده از این آزمون مشخص شد که بین مقدار غلظت پروتئین و حرکت پیشرونده رو به جلو در بین گروه نرمال و آستنواسپرمی یک ارتباط معنی دار با ضریب همبستگی بالا و مستقیم (r= ۰/۵۹ و P= 0.001) وجود دارد.

در گروه آزواسپرمی، اسپرمی وجود نداشته و بنابراین هیچ حرکتی هم وجود ندارد. لذا پس از حذف گروه آزو از مقایسه، بررسی ارتباط بین غلظت پروتئین و حرکت اسپرمها در گروههای دارای اسپرم صورت گرفت. ضریب همبستگی این مقایسه معنی دار و مستقیم بود (r= ۰/۳۵۸ و P= 0.012). تعیین درصد حیات اسپرمهای گروههای مختلف و ارتباط آن با غلظت پروتئین CD46 نیز بررسی شد و میانگین درصد حیات در بین گروههای مختلف عبارت بود از:

گروه نرمال ۳۷/ ۷۰، گروه آستنواسپرمی ۵۷/۴۱ و گروه الیگوآستنواسپرمی ۵۱/۲۴ (جدول ۲).

جدول ۲: توزیع فراوانی و میانگین درصد حیات اسپرمها در گروه نرمال و دو گروه از افراد نابارور

نام گروه	تعداد	درصد فراوانی	درصد حیات ± S.D
نرمال	۱۶	۱۲/۷	۷۰/۲۷ ± ۱۲/۹۴
آستنو اسپرمی *	۰/۲۲	۳۴/۹	۵۷/۴۱ ± ۲۸/۸۶
الیگو آستنو اسپرمی	۲۲	۳۴/۹	۵۱/۲۴ ± ۲۸/۶۵

پس از انجام آزمون T-TEST، اختلاف معنی داری از لحاظ میانگین درصد حیات بین گروهها مشاهده نشد. همچنانکه در سطور قبل اشاره شد مقدار غلظت پروتئین CD46 در گروه آستنواسپرمی در مقایسه با گروه نرمال کاهش چشمگیری دارد، لذا مقایسه‌ای از لحاظ ارتباط بین غلظت پروتئین و درصد حیات اسپرمها در گروه نرمال و آستنواسپرمی انجام گرفت. با انجام آزمون ارتباط Pearson، مشخص شد که بین درصد حیات اسپرمها و غلظت پروتئین CD46 یک ضریب همبستگی معنی دار و مستقیمی (r= ۰/۵۲۷ و P= 0.005) برقرار است.

بررسی ارتباط بین غلظت پروتئین و درصد حیات اسپرمها در کل گروههای دارای اسپرم نیز صورت گرفت. در این بررسی نیز ضریب همبستگی معنی دار و مستقیم (r= ۰/۳۲۷ و P= 0.025) به دست آمد.

تعداد اسپرم در بین گروههای مختلف و همچنین در یک گروه از یک فرد به فرد دیگر متفاوت است، لذا افراد مورد مطالعه از لحاظ تعداد اسپرم به چهار گروه تقسیم شده و غلظت پروتئین CD46 مجدداً برای هر گروه محاسبه شد که عبارت است از: گروه آزواسپرمی (بدون اسپرم) ۶۳۹/۶۹، گروه اولیگواسپرمی (تعداد کمتر از ۲۰ میلیون اسپرم در هر ml) ۵۷۹/۳۹، گروه نرمال (تعداد اسپرم بین ۲۰ تا ۲۰۰ میلیون در هر ml) ۵۴۷/۴ و گروه هایپر (تعداد بیش از ۲۰۰ میلیون در هر ml) ۳۰۰/۸۵ نانوگرم به ازای هر ml از مایع منی (جدول ۳).

جدول ۳: توزیع فراوانی و میانگین غلظت پروتئین CD46 در افراد مورد آزمایش براساس تعداد اسپرم

نام گروه	تعداد اسپرم برحسب میلیون	تعداد افراد	درصد فراوانی	S.D ± غلظت CD46 بر حسب ng/ml
یک = آزو	۰	۱۱	۱۷/۵	۶۲۹/۶۹ ± ۱۶۹/۲۲
دو = الیگو	<۲۰	۲۱	۳۳/۹	۵۷۶/۲۹ ± ۱۷۰/۷۷
سه = نرمال	بین ۲۰ تا ۲۰۰	۱۱	۱۷/۵	۶۲۹/۶۹ ± ۱۶۹/۲۲
چهار = هایپر *	>۲۰۰	۲۱	۳۳/۹	۵۷۶/۲۹ ± ۱۷۰/۷۷

* گروه ستاره دار دارای اختلاف معنی‌دار با گروه نرمال است $P< 0.05$

پس از انجام آزمون t-TEST برای میانگین غلظت پروتئین در چهار گروه فوق مشخص شد که فقط گروه هایپر با گروه نرمال از لحاظ میانگین غلظت با یکدیگر اختلاف معنی دار ($P= 0.014$) داشته و دو گروه دیگر از این لحاظ اختلافی را بروز ندادند.

با انجام آزمون Pearson جهت بررسی ارتباط بین تعداد اسپرم و غلظت پروتئین، مشخص شد که بین این دو متغیر ضریب همبستگی معنی دار و معکوسی ($r= -0/37$ و $P= 0.003$) برقرار است.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر آن است که غلظت پروتئین MCP در مایع منی گروههای مختلف با روش ساندویچ الایزا در صورتی که فقط دو نوع آنتی بادی غیر کونژوگه علیه CD46 وجود داشته باشد نیز قابل اندازه گیری است.

در بررسیهای صورت گرفته، مشخص شد که چهار گروه تاکنون اقدام به اندازه گیری غلظت پروتئین MCP در مایع منی نموده‌اند که اگر چه جملگی از تکنیک ELISA استفاده نموده‌اند اما در روش و مواد مصرفی با یکدیگر اختلاف داشته‌اند.

Hara و همکارانش برای اولین بار مبادرت به اندازه گیری این پروتئین در مایع منی نمودند. این گروه با به کارگیری تکنیک ELISA، غلظت پروتئین CD46 را حدود ۶۰۰-۱۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر مایع منی افراد نرمال گزارش نموده‌اند (۱۷).

Seya مقدار غلظت پروتئین CD46 را ۷۰۰-۲۵۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر مایع منی اعلام نمود. این گروه در گزارش تفکیکی بین گروه نرمال و سایر گروههای نابارور از لحاظ مقدار تفاوت قائل نشده و مقدار فوق را به صورت کلی بیان نمود (۱۹).

محققان اقدام به اندازه گیری این پروتئین در مایعات مختلف بدن انسان من‌الجمله مایع منی نمودند. این گروه مقدار غلظت پروتئین MCP را حدود هفت برابر آنچه که در سال ۱۹۹۳ گزارش کرده بود یعنی ۴۵۷۲ نانوگرم در هر میلی‌لیتر مایع منی اعلام کردند (۲۰). علت اختلاف فاحش بین این دو مقدار متفاوت از یک پروتئین در مایع منی و به وسیله یک تکنیک مشخص، توسط Seya گزارش نشده است.

Roony و همکارانش مقدار غلظت پروتئین MCP را در مایع منی ۱۰ فرد نرمال اندازه گیری نمودند. مقدار غلظت پروتئین CD46 در گزارش این گروه، ۶۸۲ نانوگرم در هر میلی‌لیتر از مایع منی اعلام شد (۲۴).

درگزارش حاضر میانگین مقدار غلظت پروتئین MCP در مایع منی افراد نرمال ۷۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر به دست آمد که با سه گزارش از چهار گزارش قبلی هماهنگی دارد.

Seya با دو گروه متفاوت در طی دو بار آزمایش غلظت پروتئین را در بین گروههای بارور و نابارور مقایسه نمود در آزمایش اول از هشت فرد بارور و نابارور استفاده شد که افراد بارور در آن هم تفکیک نشده بودند. در آزمایش دوم از هشت فرد نرمال و هشت فرد نابارور (اولیگواسپرمی، آستنواسپرمی و آزواسپرمی) استفاده شده بود که مقدار آن در آزمایش دوم برای هشت فرد نابارور ۵۱۲۵ نانوگرم در هر میلی‌لیتر به دست آمده بود که بیشتر از مقدار آن در افراد نرمال (۴۵۷۲ نانوگرم) بود. در هر بار آزمایش، بین گروه بارور و نابارور اختلافی مشاهده نشده بود (۱۹، ۲۰).

در مقایسه نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت CD46 در گزارش حاضر مشخص شد که گروه آستنواسپرمی با گروه نرمال از لحاظ مقدار پروتئین MCP اختلاف چشمگیری دارند ($P= 0.002$). شاید علت اصلی اختلاف بین آنچه در این تحقیق به دست آمده با آنچه که گروه Seya در طی دوبار گزارش خود ذکر کرده بود، در تعداد افراد مورد مطالعه باشد. در این تحقیق از مایع منی هشت فرد نرمال و بیشت و دو فرد آستنواسپرمی استفاده شده و مقایسه برای آنها صورت گرفته است در صورتی که گروه Seya در یک بار بر روی هشت فرد و در بار دوم بر روی شانزده فرد بارور و نابارور مطالعه را انجام داده است.

در ضمن در مطالعه حاضر، بیماران از لحاظ پارامترهای اسپرمی تفکیک و تعداد هر کدام مشخص شده است در صورتی که در هر دو بار انجام مطالعه توسط گروه Seya چنین تفکیکی گزارش نشده بود.

Jiang و Pillis با به خدمت گرفتن از یک برنامه نرم‌افزاری کامپیوتری و با استفاده از اسپرمهای متحرکی که به روش Swim-Up به دست آورده بودند، اعلام کردند که CD55، CD59، CD46 که هر سه از CRPs هستند، احتمالاً در فانکشنهای بیولوژیک اسپرم و از جمله حرکت اسپرم نقش داشته و CD46 در این بین از احتمال بیشتری برخوردار است (۲۵).

نتیجه تحقیق حاضر با یافته Jiang و Pillis تطابق داشته و احتمال نقش داشتن پروتئین MCP در حرکت اسپرم را تقویت می‌نماید. چراکه گروه آستنواسپرمی، تنها گروهی از افراد نابارور است که فقط در پارامتر حرکت با گروه نرمال اختلاف دارد. وقتی آزمون Pearson جهت بررسی ارتباط بین غلظت پروتئین و حرکت پیشرونده رو به جلو بین گروه نرمال و آستنو صورت گرفت. یک ارتباط مستقیم و با ضریب همبستگی کاملاً معنی داری بین آن دو برقرار شد ($r= 0/59$ و $P= 0.001$). با توجه به مطالب فوق، این احتمال وجود دارد که هرگاه غلظت پروتئین CD46 در مایع منی کاهش یا افزایش پیدا کند، حرکت اسپرمهای آن هم کاهش و یا افزایش پیدا نماید.

از آنجایی که آزمون Pearson برای بررسی ارتباط بین غلظت پروتئین و حرکت در کل گروههای مورد آزمایش نیز صورت گرفت، مشخص شد که اگر چه یک ارتباط معنی داری بین آنها برقرار است اما

ضریب همبستگی آن بالا نیست (۰/۳۲۸ =r و 0.001 =P)، لذا به نظر می‌رسد که فاکتور دیگری نیز در این ارتباط دخیل است. با بررسی گروههای مورد آزمایش مشخص شد که فاکتور تعداد اسپرم یکی از عوامل اختلاف بین گروههاست. بر این اساس گروههای مورد آزمایش به چهار گروه تقسیم و پس از محاسبه میانگین غلظت پروتئین MCP در بین آنها، آزمون t-TEST برای بررسی وجود اختلاف غلظت پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. با این آزمون اختلاف معنی داری بین گروه نرمال از لحاظ تعداد و گروه هایپر به دست آمد (0.014 =P). در خصوص گروه آزو و اولیگواسپرمی اگر چه اختلافی به دست نیامد اما در مقایسه با گروه نرمال، مقدار غلظت پروتئین در بین آنها بیشتر بود. آزمون Pearson نیز یک ارتباط معنی دار منتها معکوس بین غلظت پروتئین و تعداد اسپرم را مشخص نمود (۰/۳۷- =r و 0.003 =P). بنابراین شاید بتوان گفت که هر چه تعداد اسپرم افزایش پیدا کند غلظت پروتئین کاهش می‌یابد و بالعکس.

Roony و همکارانش با انجام آزمایشی اعلام کردند که هر گاه پروستازومهای مایع منی دارای مولکول MCP را با اریتروسیتهای خون که فاقد این مولکول هستند مجاورت دهیم، مولکول MCP از پروستازوم به اریتروسیتها منتقل می‌گردند. با اینکه مولکول MCP فاقد دم GPI است و قاعدتاً نباید چنین اتفاقی صورت بگیرد (۲۴). مکانیسم این انتقال تاکنون شناخته نشده است.

کاهش مقدار غلظت MCP یا به دلیل کاهش تولید و یا به علت برداشت بیش از حد آن اتفاق خواهد افتاد. بر اساس یافته Atkinson احتمال برداشت بیشتر مولکول MCP و در نتیجه کاهش مقدار آن در مایع منی قویتر می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه دو منشاء برای شکل محلولی MCP وجود دارد (۲۴)، احتمال می‌رود که هر چه تعداد اسپرم بیشتر باشد مقدار MCP برداشته شده از منشاء بیضوی آن نیز بیشتر باشد و بنابراین شکل محلولی آن در مایع کاهش می‌یابد و این مطلب نیز می‌تواند دلیلی برای کاهش سطح CD46 محلولی در بیماران هایپراسپرمی یا دلیل دیگری برای ارتباط معکوس بین غلظت CD46 و تعداد اسپرم باشد. با توجه به اثبات عدم حضور مولکول MCP بر روی غشاء سطحی اسپرم (۲۶، ۲۷) و احتمال برداشت این مولکول از مایع منی شاید بتوان گفت که اسپرمها پروتئین CD46 را از خارج (مایع منی) برداشته و به نحوی به مصرف داخلی خود می‌رسانند. البته لازم به ذکر است که در این خصوص نیاز به تحقیقات بیشتری جهت روشن شدن مطلب فوق مورد نیاز است.

حال می‌توان گفت که چراغلظت پروتئین CD46 در بین دو گروه نرمال و اولیگوآستنواسپرمی اختلافی را نشان نداد. گروه اولیگوآستنواسپرمی در دو فاکتور تعداد و حرکت با گروه نرمال اختلاف دارد. بنابراین تعداد کم اسپرم باعث افزایش سطح CD46 در مایع منی می‌شود و این افزایش، کاهش غلظت CD46 ناشی از آستنو بودن را احتمالاً جبران نموده، لذا تفاوتی بین گروه نرمال و اولیگوآستنواسپرمی از لحاظ مقدار غلظت پروتئین دیده نمی‌شود.

یکی دیگر از اهدافی که تحقیق حاضر به دنبال بررسی آن بود، وجود یا عدم ارتباط بین درصد حیات اسپرمها و مقدار غلظت پروتئین CD46 بود. در مقایسه میانگین درصد حیات اسپرمها در سه گروه نرمال، آستنواسپرمی و اولیگوآستنواسپرمی تفاوت معنی داری به دست نیامد. ولی بررسی ارتباط بین غلظت پروتئین CD46 و درصد حیات اسپرمها، مشخص نمود که ضریب همبستگی معنی دار و مستقیمی بین این دو فاکتور برقرار است (۰/۳۲۵ =r و 0.025 =P). گروههای فوق از لحاظ تعداد و غلظت پروتئین با یکدیگر اختلاف دارند، لذا سؤالی مطرح است و آن اینکه، در شرایط یکسان از لحاظ تعداد، آیا این ارتباط مجدداً برقرار است؟ گروه نرمال و آستنواسپرمی دو گروهی هستند که از لحاظ تعداد اسپرم با یکدیگر اختلافی ندارند. بنابراین بررسی ارتباط بین دو فاکتور غلظت پروتئین و درصد حیات اسپرمها در دو گروه فوق تکرار گردید و مشخص شد که ارتباط نسبتاً قوی بین درصد حیات اسپرمها و غلظت پروتئین بر قرار است (۰/۵۲۷ =r و P= 0.005). این ارتباط گویای این نکته است که در شرایط یکسان هر چه غلظت پروتئین CD46 افزایش یابد، درصد حیات اسپرمها هم بالا می‌رود و برعکس. بر اساس تئوری Burent، سیستم ایمنی در زمان جنینی شکل می‌گیرد و در این زمان هر عاملی که به این سیستم معرفی نگردد، بیگانه تلقی می‌شود (۲۸). اسپرمها به دلیل عدم وجود تا زمان بلوغ، برای سیستم ایمنی بدن بیگانه تلقی می‌گردند. به صورت طبیعی عوامل زیادی مانع از هجوم سیستم ایمنی به اسپرمها می‌گردند که وجود CPRs یکی از آنها به شمار می‌رود. ولی هر گاه یک یا چند عامل از عوامل محافظتی اسپرم دچار نقص گردد می‌تواند مورد هجوم سیستم ایمنی و مخصوصاً کمپلمان قرار گرفته و از بین برود (۲۹، ۳۰). در تحقیق حاضر یکی از CPRs در مایع منی مورد ارزیابی قرار گرفته و در طی آن مشخص شد که رابطه‌ای مستقیم بین غلظت پروتئین CD46 و میزان حیات اسپرمها وجود دارد. این یافته مطلب فوق را که CPRs در حفاظت از اسپرم در مقابل اثرات تخریبی کمپلمان نقش دارند را تایید می‌نماید.

نتایج به دست آمده که برای اولین بار در این مقاله ارائه شده حاکی از ارتباط مستقیم و معنی دار بین حرکت و درصد حیات اسپرمها با غلظت CD46 و یک رابطه معکوس بین این پروتئین و تعداد اسپرم است. احتمال می‌رود که کمبود این پروتئین می‌تواند علتی برای آستنو بودن و یا کاهش حیات اسپرمها به شمار رود. ارتباط معکوس CD46 با تعداد اسپرم بیانگر آن است در صورتی که تعداد تولید اسپرم از حد طبیعی باشد می‌تواند خود زمینه‌ای برای ایجاد آستنواسپرمی و کاهش درصد حیات اسپرمها گردد.

در پایان لازم می‌دانیم تاکید نمائیم که در این خصوص تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

References

1. Liszewski MK, Atkinson JP: Membrane cofactor protein (MCP or CD46) Isoform in protection againts

the classical pathway of compelement. J Immunol 1996; 156: 4415-4421
2. Gerard C, Gerard NP: C5a anaphylatoxin and is seven transmembrane segment receptor. Annu Rev Immunol 1994; 12: 775-808
3. Wuerzner R, Dierich MP: Complement in human diesease. Immunol Today 1997; 18: 460-463
4. Savvas C, Makriedes: Therapeutic inhibition of the complement system. Pharmacol Rev 1998; 50: 59-88
5. Quigg RA, Kozono Y, Berthiamne D, Lim A, Salant DJ, Weinfeld A, Griffin P, Kremmer E, Holers VM: Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with crry-Ig, a sólube murine complement inhibitor. J Immunol 1998; 160: 4553-4560
6. Morgan BP, Hinchliffe SJ, Rushmere NK, Hanna SM: Human recombinant soluble decay accelerating factor inhibitis complement activation *in vitro* and *in vivo*. J Immunol 1992; 146: 1736-1743
7. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Korzik L, Ma M, Hechtman HB, Canoll MC: Reperfusion injury of ischemic akeletal muscle is mediated by nalural antibody and complement. J EXP Med 1996; 183: 2343-1348
8. Osmond DG, Lu L, Chaudhury P: Activation of human complement by IgG antisperm antibody and the demonstration of C3 and C5b-9 mediated injury to human sperm. J Immunol 1991; 146: 611-620
9. Bozas SE, Kirszbaum L, Sparrow RL, Walker ID: Several vascular complement inhibitors are present on human sperm. Biol Reprod 1993; 48: 503-511
10. Anderson DJ, Abbotl AF, Jacj RM: The role of complement compotent C3b and is receptors in sperm-oocyte intraction. Proc Natl Acad Sci-USA 1998; 90: 10051-10055
11. Toylor CT, Johnson PM: omplement binding proteins strongly expressed by human preimplantation blastovysts and camulus as gametes. Mole Hum Reprod 1996; 2: 52-59
12. Nerlinsky Y: Isolation of CDNA libraries from individual human preimplantation embryos. Mole Hum Reprod 1998; 4: 571-575
13. Charles A: Immune Biology, The Immune system in health and disease. Fourth Edition, Elsevier science Ltd/ Garland Publishing, 1999, p 339
14. Wang G, Liszewski MK, Chan AC, Atkinson JP: Membrane cofactor protein (MCP, CD46): Isoform-Specific Tyrosine phosphorylation. J Immunol 2000; 164: 1939-1944
15. Seya T, Hirano A, Matsumoto M, Nomura M, Ueda S: Human membrane cofactor protein (MCP, CD46) multiple isoform and function. Int J Biochem Cell 1999; 31(11): 1255-1261
16. Hiurcade D, Holers VM, Atkinson JP: The regulators of complement activation (RCA) gen clasters. Adv-Immunol 1989; 45: 381-386
17. Hara T, Kuriyama S, Kiyohara H, Nagasa Y, Matsumoto M, Seya T: Soluble forms of membrane cofactor protein (MCP) are present in plasma, tears and seminal fluid in normal subjects. Clin EXP Immunol 1992; 89: 490-497
18. Mcloughlin PJ, Holland SJ, Taylor CT, Olah K, Lewis Jones DI, Hara T, Seya T, Johnson P: Souble CD46 (Membrane Cofactor Preotein, MCP) in human reproductive tract fluids. J Reprod Immunol 1996; 31: 209-215
19. Seya T, Hara T, Iwata K, Kuriyama S, Hasegawa T, Nagase Y, Miyagewa S, Matsumoto M, Hatanaka M, Atkinson JP: Purification and functional properties of soluble forms of membrane cofactor protein (CD46) of complement: Identification of forms increaser in cancer patient´s sera. Int Immunol 1995; 7: 727-733
20. Seya T, Hara T, Matsumoto M, Kiyohara M, Nakanishi I, Kinouchi T, Okabe M, Shimizu A, Akedo H: Membrane cofactor protein (CD46, MCP) are present in plasma and on spermatozoa in normal and sterile subjects. Eur J Immunol 1993; 23: 1322-1327
21. Kitamura M, Namiki M, MatsumiyaK, Tanaka K, Matsumoto M, Hara T, Kiyohara H, Okabe M, Okuyama A, Seya T: Membrane cofactor protein (MCP, CD46) in seminal plasma in a prostasome-bound with complement regulatory activity and measles virus neutralizing activity. Immunology 1996; 84: 626-630
22. WHO: WHO labratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3ed, Cambridge university press, 1992, p 7
23. Clong J: Corrent protocols In Immunology, Blackwell scientific publications, 1989, pp 342-378
24. Rooney IA, Heuser JE, Atkinson JP: GPI anchored coplement regulatory proteins in seminal plasma. J Clin Invest 1996; 97(7): 1675-1686
25. Jiang M, Pillis S: Complement regulatory proteins on the sperm surface: relevance to sperm motility. Am J Reprod Immunol 1998; 39(4): 243-249
26. Cervoni F, Oglesby TJ, Adams EM, Milesifluez TC, Nickells M, Fenichel P, Atkinson JP, Hsi BL: Identification and characterization of membrane

cofactor protein of human spermatoloza. J Immunol 1992; 148: 1431-1435
27. Simpson KL, Holmes CH: Differential expression of complement regulatory proteinds decay-accelerating (CD55), membrane cofactor protein (MCP, CD46) and CD59 during human spermatogenesis. Immunol 1994; 81: 452-458
28. Burent FM: The clonal selection theory of acquired Immunity. Cambridge: L Cambridge university press, 1959
29. Savass CM: Therapeutic inhibition of the complement system. Pharmacol Rev 1998; 80(1): 59-64
30. Charles AJ, Paul T, Mark W, Donald CL: J IMMUNO BIOLOGY the immune system In Health and Disease. 4ed, Elsevier science Ltd/ Garland publishing, 1999, p 339