

İNFERTİL ERKEK HASTA SERUMU İLE REAKSİYONA GİREN SPERM ANTİJENLERİNİN WESTERN IMMUNOBLOTTING YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

IDENTIFICATION OF SPERM ANTIGENS REACTING WITH SERA FROM
INFERTILE MALES BY WESTERN IMMUNOBLOTTING METHOD

Işık TAŞDEMİR*, Murat TAŞDEMİR**, Jun FUKUDA***
Hideya KODOMA***, Toshinobu TANAKA***

Özet: Antisperm antikorları ile reaksiyona giren spermatozoal antijenlerin belirlenmesi için antisperm antikorlu içeren 15 infertil erkek hasta serumu Western Immunoblotting Yöntemi ile incelenmiştir. 77 kDa, 68 kDa, 65 kDa, 61 kDa, 58 kDa, 48 kDa, 38 kDa, 25 kDa moleküler ağırlığındaki spermatozoal polipeptidlere IgG bağlanması gösterilmiştir. Antisperm antikorlu içeren infertil erkek hasta serumlarının % 80'i 77 kDa moleküler ağırlığındaki spermatozoal polipeptid ile reaksiyona girerken, serumların % 46.7'si 68 kDa, % 33.3' 65 kDa, % 26.7'si 58 kDa ağırlığındaki spermatozoal polipeptidlerle reaksiyona girmiştir. Bu sonuçlar 77 kDa, 68 kDa ve 65 kDa spermatozoal polipeptidlerin immünolojik erkek infertilitesinde önemli rol oynadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Antisperm antikorları, Western immunoblotting, Spermatozoal polipeptidler.*

Summary: In order to identify the sperm antigens reacting with antisperm antibodies, 15 sera from infertile males were analysed by Western immunoblotting. Seventyseven kDa, 68 Da, 65 kDa, 61 kDa, 58.48 kDa, 38 kDa, 25 kDa spermatozoal polypeptides were capable of binding IgG. Eighty percent of sera with antisperm antibodies from infertile males reacted with 77 kDa spermatozoal polypeptide, whereas 46.7%, 33.3% and 26.7% of sera reacted with 68 kDa, 65 kDa, and 58 kDa spermatozoal polypeptides respectively. These results showed that the 77 kDa, 68 kDa, and 65 kDa spermatozoal polypeptides may play an important role in immunologic male infertility.

Key words: *Anti-sperm antibodies, Western immunoblotting, Spermatozoal polypeptides.*

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

** SSK Tepecik Doğum ve Kadın Hastalıkları Hastanesi, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Departmanı, İzmir.

*** Akita Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Akita-Japonya.

G İ R İ Ő

İmmünolojik infertilite kadın ve erkek fertilitésinin nedenlerinden biridir. Erkeklerde saptanan antisperm antikorları sperm yüzeyine bağlanarak zayıf postkoital teste, in vitro servikal mukusa sperm penetrasyonunun engellenmesine, zonasız hamster yumurtalarına sperm bağlanmasının azalmasına ve in vitro fertilizasyon başarısında azalmaya neden olur (1-3). Yüksek düzey antisperm antikorları sperm motilitesini de olumsuz etkiler (4). Daha önceki çalışmamızda sperm immobilize edici antikorların akrozom reaksiyonunu inhibe ederek fertilizasyonu engellediğini gösterdik (5).

Bu çalışmanın amacı antisperm antikorları içeren infertil erkek hasta serumları ile reaksiyona giren spermatozoal antijenlerin Western Immunoblotting yöntemi ile gösterilmesidir. Spermatozoal antijenler sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonrası elektroforetik olarak nitro sellüloz membranlara transfer edilmiş ve peroksidaz konjuge antiantikorlar ile spermatozoal antijenlere bağlanan IgG antikorları gösterilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Serum

Akita Üniversitesi Fertilité Kliniğine başvuran infertil erkek hastalardan elde edilen serumlar içinden, sperm immobilize edici antikorları içeren ve İndirekt Immunobead Bağlanma Testi ile IgG bağlanması gösteren 15 tanesi seçilmiştir. Sperm immobilize edici antikorları içermeyen kontrol serumlar 4 fertil erkek donörden sağlanmıştır.

Spermatozoa

Üç fertil donörden elde edilen seminal örnekler (Sperm sayısı $\geq 50 \times 10^6$ ve $\geq \% 70$) bir araya toplanarak 2 defa Fosfat tompon çözeltisi (PBS) ile yıkanır ve sperm konsantrasyonu 3×10^8 /ml olacak şekilde ayarlanır. Buzda sonike edilen süspansiyonun $300 \times g$ 'de 5 dakika (dk) santrifügasyonu sonrasında elde edilen süpernatana eşit volüm $\% 5$ Trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 15 dk buzda bekletilir. $10000 \times g$ 'de 10 dk santrifügasyon ile elde edilen çökelti $800 \mu l$ Tris-HCl ($\% 2$ SDS, $\% 10$ gliserol, $\% 5$ merkaptotanol, $\% 0.001$ bromofenol mavisini içeren, pH 6.8) tamponda süspanse edildikten sonra $15000 \times g$ 'de 15 dk santrifüje edilir ve süpernatant $95^\circ C$ 'da dk ısıtılır.

Gel Elektroforez ve Immunoblotting

Tek boyutlu SDS-PAGE $\% 10$ 'luk jeller kullanılarak Laemmli'nin metoduna göre yapılmıştır (6). Elektroforez sonrasında Towbin'in tanımladığı Western Immunoblotting Yöntemi uygulanmıştır (7). Por çapı $0.45 \mu m$ olan nitrosellüloz membrana (Millipore Co. Ltd, Tokyo, Japan) elektrotransfer edilen sperm antijenleri Tris Tampon ile hazırlanan $\% 5$ yağsız süt tozu çözeltisi (pH 7.5) ile 1 saat bloke edilmiştir. Onaltı saat boyunca 15 ASA içeren ve 4 kontrol serum (1/50) ile inkübe edilmiştir. Nitrosellüloz stripler 5 defa

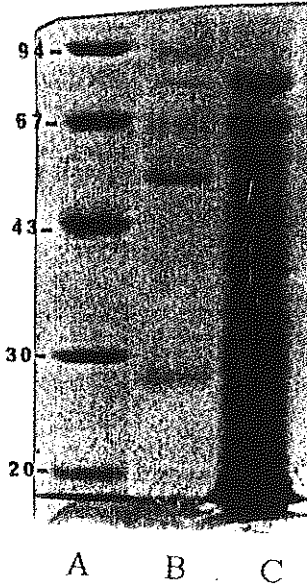
5 dk Tween 20 ile yıkanarak fazla antikorlar uzaklaştırılmış ve 2 saat peroksidaz konjuge keçi anti-human IgG (Sigma Chemical Co. Ltd., St Louis, USA) (1/500) ile inkübe edilmiştir. Stripler 5 defa daha Tween 20 ile yıkandıktan sonra 3.3 Diaminobenzidin tetrahidroklorür ile enzim reaksiyonuna tabii tutulmuştur.

B U L G U L A R

Şekil 1'de spermatozoal proteinlerin SDS-PAGE sonrası Coomassie mavisi ile boyanmasıyla elde edilen polipeptid profili görülmektedir.

İnfertil erkek serumlarının bağlandığı spermatozoal polipeptidler Western Immunoblotting yöntemi ile incelenmiştir. Şekil 2'de IgG bağlanmasının örnek analizi görülmektedir.

Bu çalışmada 77 kDa, 68 kDa, 65 kDa, 61 kDa, 58 kDa, 48 kDa, 38 kDa ve 25 kDa moleküler ağırlığında 8 değişik spermatozoal polipeptide IgG bağlanması gösterilmiştir. Kontrol serumları ile bu spermatozoal polipeptidlerden hiçbirine bağlanma tespit edilmemiştir. Tablo 1'de 15 serum örneğinin 8 spermatozoal polipeptide bağlanma paterni görülmektedir.

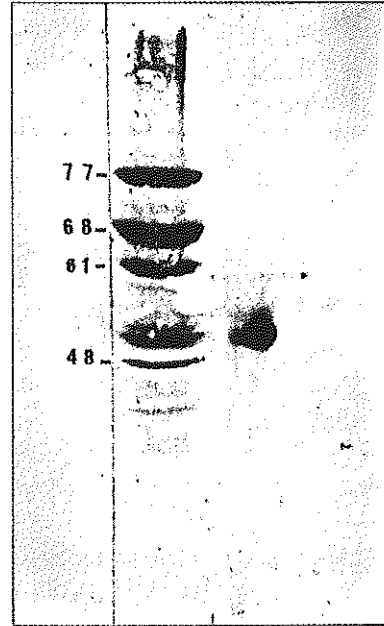


Şekil 1

SDS-PAGE sonrası Coomassie mavisi ile boyanmış normal sperm.

A- Moleküler ağırlık standartı.

B- İnsan IgG fraksiyonu. C- Normal sperm.



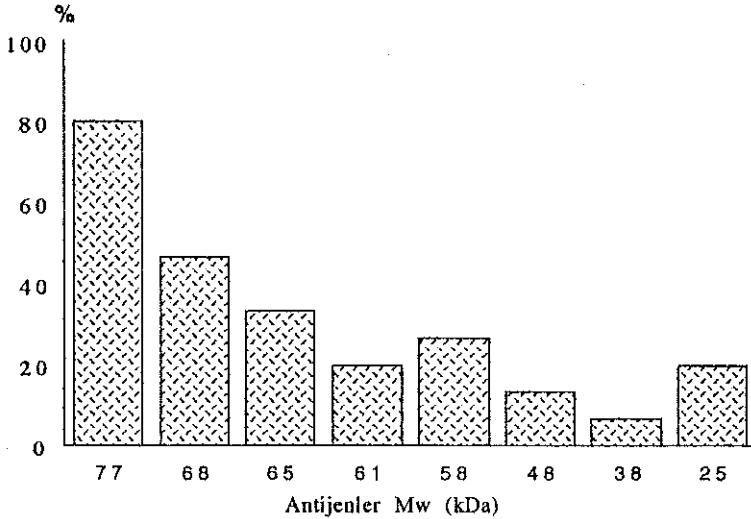
Şekil 2

ASA içeren serumda IgG antikorlarının spermatozoal polipeptidlere bağlanma paterni.

Tablo 1
İnfertil Erkek Hasta Serum Örneklerinin
Spermatozol Poliipeptidlere Bağlanma Paterni

Antijenler Mw (kDa)	Serum No														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
77	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	+
68	+	+	+	+					+	+			+		
65	+					+			+	+	+				
61			+				+							+	
58				+			+			+			+		+
48			+										+		
38								+							
25					+			+							+

Şekil 3'de 8 spermatozoal poliipeptidden her biri ile reaksiyona giren serum yüzdeleri görülmektedir. SIA içeren infertil erkek serumlarının % 80'i 77 kDa moleküler ağırlığındaki spermatozoal poliipeptid ile reaksiyona girerken, serumların % 46.7'si 68 kDa, % 33.3'ü 65 kDa, % 26.7'si 58 kDa ağırlığındaki spermatozoal poliipeptidler ile reaksiyona girmiştir. Serumların % 20'si 61 kDa ve 25 kDa ağırlığındaki spermatozoal poliipeptidler ile reaksiyona girerken, 2 serum (% 13.3) 48 kD, 1 serumda (% 6.7) 38 kD ağırlığındaki spermatozoal poliipeptidlere bağlanma göstermiştir.



Şekil 3
Spermatozoal antijenlerle reaksiyona giren infertil erkek hasta serum yüzdeleri.

T A R T I Ş M A

Bu çalışmada sperm immobilize edici antikorların bağlandığı spermatozoal antijenleri Western Immunoblotting Yöntemi ile belirledik.

İnfertil erkek hastalardan elde edilen ve sperm immobilizan antikorlar içeren serumlar 77 kDa, 68 kDa ve 65 kDa gibi yüksek moleküler ağırlıklı polipeptidlere yüksek oranda bağlanma göstermişlerdir. Bu bulgulara dayanarak 77 kDa, 68 kDa ve 65 kDa moleküler ağırlığındaki polipeptidlere karşı oluşan antikorların infertilitede önemli rol oynadığını söyleyebiliriz. Poulsen 77 kDa ağırlığındaki spermatozoal antijenin infertilitede önemli rol oynadığını gösterirken (8), bizim de çalışmamızın desteklediği gibi 68 kDa, 65 kDa, 58 kDa, 61 kDa ve 25 kDa moleküler ağırlığındaki polipeptidlerin antisperm antikorlarının en çok bağlandığı dolayısı ile infertilitede rol oynayan antijenler olduğu belirtilmiştir (8, 9, 10).

Erkeklerde serumda sperm immobilize edici antikorların varlığı bozulmuş sperm morfolojisi ile ilişkilidir. Erkek üreme sistemine rete testis veya epididimisten giren antisperm antikorları epididimiste matürasyon öncesinde sperm hücrenin plazma membranına bağlanarak sperm morfolojisi ve fonksiyonunu bozar (11). Bunun yanında antisperm antikorlarının servikal mukus penetrasyonunu engellediği (1), sperm-yumurta membran füzyonunu (12) veya sperm zona pellusidaya bağlanmasına engel olarak fertilizasyonu engellediği gösterilmiştir (13). Daha önceki çalışmamızda gösterdiğimiz gibi sperm immobilize edici antikorlar akrozom reaksiyonunu inhibe ederek fertilizasyonu engeller (5).

Antisperm antikorlarını belirleyebilen klinik testler yanında bu antikorların bağlandığı antijenlerin belirlenmesi immünojenik kaynaklı infertilitenin tanısını güçlendirir ve bu antijenlerin karakterize edilmesi antisperm antikorlarının infertilitedeki rolünün aydınlatılmasında önem taşır.

KAYNAKLAR

1. Alexander NJ: Antibodies to human spermatozoa impede sperm penetration of cervical mucus or hamster eggs. *Fertil Steril*, 1984, 41: 433-439.
2. Menge AC, Medley NE, Mangione CM, Dietrich JW: The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm-cervical mucus interactions and subsequent fertility. *Fertil Steril*, 1982, 38: 439.
3. Clark GN, Lopata A, McBain JC, Jonston WIH: Effect of antisperm antibodies in males on human in vitro fertilization (IVF). *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1985, 8: 62.
4. Mathur S, Barber M, Carlton M, Zeigler J, Williamson HO: Motion characteristics of spermatozoa from men with cytotoxic antisperm antibodies. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1986, 12: 87.
5. Taşdemir I, Taşdemir M, Fukuda J, Kodama H, Matsui T, Tanaka T: Effect of sperm immobilization antibodies on the spontaneous and Ca-Ionophore (A23187) induced acrosome reaction. *Int J Fertil (in press)*.
6. Laemmli UK: Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, 227: 680-685.

SPERM ANTİJENLERİ

7. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 76: 4350-4354.
8. Poulsen F: The nature of of an iso-antigen of the human sperm membrane. *J Reprod Immunol*, 1983, 5: 49-54.
9. Parslow JM, Poulton TA, Hay FC: Characterization of sperm antigens reacting with human sperm antibodies. *Clin Exp Immunol*, 1987, 689: 179-187.
10. Taşdemir I, Taşdemir M, Fukuda J, Kodama H, Sekine K, Tanaka T: Identification of sperm antigens reacting with antisperm antibodies in sera from infertile male and female patients. *Jpn J Fertil Steril*, 1994, 39: 101-105.
11. Menge AC, Beitner O: Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril*, 1989, 51: 46.
12. Sailing PM, Irons G, Waibel R: Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biol Reprod*, 1985, 33: 515-520.
13. Primakoff P, Hyatt H, Myles DG: A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol*, 1985, 101: 2239-2244.