پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید بهشتی
سال ۲۵، شماره ۱، صفحات ۴۳ - ۵۴ (بهار ۱۳۸۰)

Original Article

شناسائی پروتئین‌های مشترک بین ترشحات اپی‌تلیوم اپی‌دیدیم و سطح اسپرماتوزوئید

دکتر محمدرضا صادقی*،دکتر محمدمهدی آخوندی*،دکتر مهین زهرائی**
*پژوهشکده ابن‌سینا، جهاد دانشگاهی
**دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه بیوشیمی

خلاصه

پس از خروج اسپرم از بیضه ها ، به منظور انجام صحیح فرایند لقاح با تخمک ، اسپرم نیازمند یکسری تغییرات تکاملی است. به این تغییرات بلوغ اسپرم گفته میشود که در اپیدیدیم رخ میدهد. اپی تلیوم اپیدیدیم محیط مناسب برای بلوغ اسپرم را فراهم می آورد. در طی این فرایند در اجزاء لیپیدی و پروتئینی غشای پلاسمایی اسپرم تغییراتی نظیر ورود ، حذف و یا دوباره سازی ممکن است رخ دهد. ارزیابی هر یک از این تغییرات نقش مهمی در فهم عملکرد اپیدیدیمی دارد.

قسمتهایی از Caput , Corpus اپیدیدیم موش انتخاب شده ، پس از انجام فرایندهای مکانیکی و آنزیمی بافت همبند مربوطه زدوده شده و لایه ای با قطر کمتر از یک میلی متر حاصل آمد. اجزای اپیدیدیمی به محیط RPMI-1640 که با آندروژن و FCS تکمیل میشد، کشت داده شد. سنتز و ترشح پروتئین توسط فلوروگرافی و SDS-PAGE ارزیابی شد. با تزریق مکرر اسپرماتوزاهای زنده موش به یک خرگوش، آنتی سرم ضد پروتئین سطحی اسپرم موش تهیه شد. آنتی سرم به وسیله روشهای الیزا و ایمونوفلورسانس چک میشد. پروتئین های اساسی در ترشحات اپیدریمی و سطح اسپرم به وسیله Western blotting مورد ارزیابی قرار گرفت.

کشت سلولهای اپی تلیال اپیدیدیم ، ۲۰ باند مجزای پروتئینی را نشان داده که ضخیم ترین آن در فاصله ۲۰۰KD-۲ بود . سرم ایمیون با باندهای پروتئینی ۲۰ ، ۲۴ ، ۵۴ و ۵۸ کیلودالتونی پس از western blotting واکنش داد.

سلولهای اپی تلیال اپیدیدیم پروتئینها و گلیکوپروتئین هایی ترشح میکنند که برخی از آنها به سطح اسپرم چسبیده و احتمالا نقش مهمی در تداخل اسپرم – اوویست بازی میکنند. ما چهار پروتئین با وزنهای مولکولی ۲۰، ۲۴، ۵۴، ۵۸ کیلودالتون را شناسایی کردیم که بوسیله اپی تلیوم اپیدیدیم ترشح شده و به سطح اسپرم میچسبند. تحقیقات آتی به خالص سازی پروتئین ها و ارزیابی نقش آنها درفرایند لقاح و توانایی بارورسازی اسپرم با استفاده از تکنیک IVF معطوف خواهد شد.

واژگان کلیدی: اپیدیدیم ، اسپرم، موش ، بلوغ اسپرم، پروتئین های ترشحی ، گلیکوپروتئینهای ترشحی

مقدمه

اسپرماتوزوئید پس از خروج از بیضه دچار تغییرات متوالی در قابلیت‌ها و عملکرد خود می‌گردد و این تغییر همراه با تغییراتی در سطح غشاء و یا تغییر در آرایش مولکول‌های لیپیدی و پروتئینی در سطح غشاء سلول می‌باشد.(۲۰و۸) تغییرات سطح اسپرم شامل تغییر در ترکیب و محتوای غشا و یا تغییر در آرایش مولکولهای لیپیدی و پروتئینی در سطح غشاء سلول می‌باشد. (۱۴ و ۱۲)

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

از آنجا که در انتهای مسیر اسپرماتوژنز تولید پروتئین جدید توسط اسپرم متوقف می‌گردد، در نتیجه تولید پروتئین‌های جدید توسط اسپرم نمی‌تواند به عنوان منبعی برای تغییرات در سطح غشاء اسپرم و در نتیجه عملکرد اسپرم مطرح باشد. بنابراین غالب تغییراتی که در سطح اسپرم ایجاد می‌گردد، نتیجه میانکنش اسپرم با محیطی است که در آن قرار دارد. در این محیطها اسپرم در تماس با مایعات و انواع جدیدی از سلولها قرار دارد که در نتیجه ممکن است بسیاری از مولکولها از سطح آن حذف، بدان افزوده یا دچار تغییرات فاحشی در ترکیب خود گردند.(۱۹) پروتئین‌های غشاء اسپرم جزء مهمی از غشاء و به عنوان شاخص‌های آنتی‌ژن خاص آن گونه در سطح اسپرم مطرح می‌باشند. (۱٦) تغییر، حذف یا افزایش این پروتئین‌ها باعث تغییر در عملکرد و قابلیت‌های اسپرم می‌گردد.

مجرای اپی‌دیدیم یکی از محیطهائی است که بیشترین تغییر در پروتئین‌های غشاء اسپرم را باعث می‌شود. زیرا اسپرم پس از خروج از بیضه و قبل از انزال بیشترین زمان را در اپی‌دیدیم می‌گذراند. اسپرم اکثر تغییرات لازم برای قدرت باروری و تحرک را طی عبور از اپی‌دیدیم کسب می‌کند. مجموعه این تغییرات را بلوغ اپی‌دیدیمی اسپرم می‌نامند.(۱۷)

اپی دیدیم بویژه بخش‌های ابتدایی آن، محیط لازم برای روند بلوغ اسپرم را فراهم می‌سازد. محیط داخلی مجرای اپی‌دیدیم نتیجه عملکرد سلول‌های اپی‌تلیال آن می‌باشد. فعالیت این سلول‌ها تحت کنترل آندوژن‌ها و سایر فاکتورهای حاصل از بیضه می‌باشد (۱۸)عمده فعالیت این سلول‌ها در تنظیم محیط داخل مجرا شامل جذب آب و الکترولیتها، ترشح H^+ و بی‌کربنات، سنتز و ترشح مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم، انتقال مواد از خون به داخل مجرا و نهایتاً سنتز و ترشح پروتئین‌ها و گلیکو پروتئین‌ها بداخل مجرا می‌باشد .(۲٤) پروتئین‌های ترشحی اپی‌دیدیم دارای نقش‌های متعددی، شامل اتصال به سطح اسپرم، فعالیت آنزیمی برای تغییر لیپیدها و پروتئین‌های سطح اسپرم و یا دخالت در حفظ هموستاز و تنظیم محیط داخلی مجرای اپی‌دیدیم می‌باشد.(۱۱) بسیاری از پروتئین‌های ترشحی که به سطح اسپرم متصل می‌گردند، پس از انزال در دستگاه تناسلی ماده، در سطح اسپرم باقی مانده و نقش ویژه‌ای را در میانکش، اتصال و ادغام غشاء اسپرم و تخمک بازی می‌کنند. در برخی گونه‌های پستانداران آنتی‌بادی اختصاصی این پروتئین‌ها با اتصال به سطح اسپرم باعث مهار قدرت باروری اسپرم می‌گردند . (۱۷)

بنابراین شناسائی این پروتئین‌ها و بررسی خصوصیات آنها اهمیت ویژه‌ای در شناخت نقش اپی‌دیدیم، در بلوغ اسپرم و روشن شدن مکانیسم مولکولی بلوغ اسپرم در اپی‌دیدیم دارد. علاوه بر این شناخت مولکولهای سطح اسپرم منجر به درک بهتر از مکانیسم مولکولی لقاح گردیده و در صورت شناسایی پروتئینی با منشاء اپی‌دیدیم در سطح اسپرم که دارای نقش ضروری برای انجام لقاح باشد، کاندید مناسبی برای استفاده از آن به عنوان عامل کنترل باروری در جنس نر (Male Contraceptive) خواهد بود. بدین دلیل در این مطالعه ابتدا به شناسائی تمامی پروتئین‌های ترشحی اپی‌تلیال بخش ابتدائی اپی‌دیدیم در موش پرداخته، سپس از این میان، پروتئین‌هائی را که به سطح اسپرم متصل می‌گردند مورد شناسائی و بررسی بیشتر قرار خواهیم داد.

مواد و روشها

کشت اپی‌تلیال اپی‌دیدیم:

محیط کشت (Gibco BRL Life Technologies, USA) RPMI-1640 به عنوان محیط پایه، ترکیبات

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

افزودنی مطابق مطالعات قبلی بدان افزوده و آماده گردید. کشت اپی‌تلیال بخش ابتدای اپی‌دیدیم (Caput, Corpus) موش نیز مطابق روش Akhondi انجام گرفت .(۱)

پس از کشت، در طی ۳-۲ روز بعد قطعات شروع به اتصال به کف پلیت و ایجاد پوشش تک لایه‌ای از سلولهای اپی‌تلیال را می‌کنند. برای حفظ فعالیت طبیعی سلول‌ها در محیط کشت قبل از اتصال هر ۴۸ ساعت یکبار، ۵۰٪ محیط روئی تعویض و پس از اتصال و ایجاد پوشش تک‌لایه‌ای می‌توان حدود ۹۰٪ محیط کشت حاوی قطعات متصل نشده و سلول‌های مرده شناور را تعویض نمود.

بررسی فعالیت سنتزی و ترشحی سلول‌های اپی‌تلیال با استفاده از [^{35}S (Met, Cys)]

به محیط کشت RPMI-1640 فاقد اسیدهای آمینه‌گوددار (Sigma chemical co, USA) ، مطابق مرحله قبل مواد مورد نیاز افزوده و آماده می‌گردد. پس از آماده سازی و کشت سلول‌ها در محیط معمولی و اتصال کامل سلولها ، به هرچاهک پلیت ۲ میلی‌لیتر محیط کشت فاقد اسیدهای آمینه Cys و Met اضافه می‌شود. پلیت را ۸-۶ ساعت در انکوباتور قرارداده تا در طی سنتز پروتئین ، تمامی اسیدهای آمینه غیر نشاندار مصرف شود و سلول‌ها از منبع اسیدهای آمینه فوق محروم گردند. سپس محیط فوق را با ۲ میلی‌لیتر محیط تازه حاوی FCS تجدید کرده و به هر چاهک 10 mCi از مخلوط Cys(۳۵) و Met (۳۵) نشاندار اضافه می‌گردد.
(REDIVUE PRO-MIX [35S] Cell Labeling Mix, Amersham, UK)

پلیتها را برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور C° ۳۷ و(CO_2 ۵٪) قرار داده سپس محیط کشت روئی را برداشته و با دور RPM۵۰۰۰ برای ۲۰ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ می‌گردد. محلول روئی فاقد سلول و ذرات معلق برای الکتروفورز و فلورو گرافی در C ۲۰۰- ذخیره می‌شود. علاوه بر آن مقداری از سلول‌های کف پلیت را شستشو و جدا کرده و در C ۲۰۰ ذخیره می‌کنیم.

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید و فلورگرافی

SDS-PAGE تحت شرایط احیاء کننده براساس روش Laemmli بر روی نمونه نشاندار انجام گرفت. نمونه محیط کشت به نسبت ۱:۱ با بافر نمونه (۲x) مخلوط کرده برای ۳-۲ دقیقه در دمای C ۱۰۰° (آب در حال جوش) قرار داده می‌شود. همین مراحل برای سلول‌های نشاندار جدار شده از کف پلیت انجام می‌شود. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌های ژل قرار داده و الکتروفورز با شدت جریان ثابت ۲۰mA برای مدت ۵ ساعت تا رسیدن رنگ مارکر پیشتاز به انتهای ژل انجام می‌گیرد. ژل را باکوماسی بلو R-250 رنگ‌آمیزی و رنگ اضافی حذف می‌شود. ژل را برای مدت یک ساعت در محلول فلوروگرافی (۲۲PPO٪ در اسید استیک گلاسیال) قرار داده، سپس برای جلوگیری از تخریب ژل طی خشک کردن برای ۱ تا ۲ ساعت، ژل در محلول گلیسرول ۵٪ قرار داده می‌شود. ژل توسط Gel Slab Drier (LKB, Pharmacia, Sweeden) طی مدت ۴ ساعت خشک می‌گردد. ژل خشک شده سریعاً داخل کاست رادیولوژی همراه صفحات تقویت کننده در مجاورت فیلم حساس به اشعه (Hyperfilm, Amersham, UK) قرار گرفته و پس از ۴-۳ هفته نگهداری در C ۲۰۰- و ظهور فیلم مذکور، محل باندهای نشاندار مشخص می‌گردد و در مقایسه با مارکرهای وزن مولکولی، وزن مولکولی پروتئین‌های ترشحی تعیین می‌شود.

تولید آنتی سرم بر علیه پروتئین‌های سطح اسپرم

تولید آنتی‌سرم بر علیه اسپرم در یک خرگوش نژاد NZW (انستیتوپاستور ایران) توسط چهار تزریق متوالی اسپرم‌های زنده شسته شده موش تحریک

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

گردید. اسپرم زنده شسته شده در ۱ میلی‌لیتر PBS استریل با ۱ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند (Sigma chemical Co, USA) مخلوط و در ۱۰ نقطه پشت حیوان به صورت زیر جلدی تزریق گردید. تزریقات بعدی همان تعداد اسپرم با فاصله سه هفته به صورتIP تزریق گردید. قبل از هر تزریق سنجش تیتر آنتی‌بادی انجام می‌گرفت. در صورت افزایش تیتر آنتی‌بادی، پس از آخرین تزریق، خونگیری نهائی انجام می‌شد. در بررسی تیتر آنتی‌بادی و پروتئین‌های ترشحی که به سطح اسپرم متصل می‌گردند، روش‌های مختلف ایمونوشیمی مورد استفاده قرار گرفت.

روش الایزا: بررسی تیتر آنتی‌بادی بروش الایزا با استفاده از اسپرم‌های زنده ناحیه Cauda اپی‌دیدیم موش به عنوان آنتی‌ژن‌های هدف، مطابق روش Boue و همکاران انجام گرفت. (٤)پس از تعیین تیتر مناسب آنتی‌سرم، برای بررسی پروتئین‌های مشترک بین سطح اسپرم و محیط کشت روئی سلول‌ها (پروتئین‌های ترشحی)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط غیرنشاندار به چاهک‌های پلیت افزوده و در طول شب در ٤° C انکوبه می‌گردد. پس از انجام مراحل الایزا، شدت رنگ، معرف اتصال پروتئین‌های ترشحی سلول‌های اپیتلیال به سطح اسپرم می‌باشد.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرم‌ها: رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس بر روی اسپرم‌های زنده ناحیه Cauda اپی‌دیدیم موش مطابق روش Boue و همکاران انجام گرفت. (٤)پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از بزرگنمائی مناسب میکروسکوپ فلورسنت اسپرمهای رنگ گرفته مشاهده گردید.

روش ایمونوبلاتینگ پروتئین‌ها: پس از انجام SDS-PAGE بر روی نمونه محیط کشت غیرنشاندار، پروتئین‌های جدا شده از طریق الکتروبلاتینگ مطابق روش Towbin به غشاء نیتروسلولز (NC) منتقل گردید. انتقال باولتاژ ثابت ۱۲V در طول شب انجام گرفت. برای اطمینان از انتقال پروتئین‌ها، غشاء NC با پونسوکرنگ رنگ‌آمیزی و پس از مشاهده باندها، رنگ فوق کاملا حذف گردید. جایگاه‌های فعال غشاء با BSA۳٪ یا (Tween – Tris Buffersalin) TTBS اشباع می‌گردد. غشاء با رقت مناسب از آنتی‌سرم خرگوش برای ۲ ساعت در حرارت محیط یا در طول شب در ٤° C انکوبه می‌گردد. شستشوی غشاء با PBS (محلول ۵٪ Tween 20 ٪ در PBS) انجام شده و غشاء با رقت ۲۰۰۰ :۱ آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP، برای یکساعت انکوبه می‌گردد. در پایان غشاء را با TPBS شستشو داده و محل باندها با استفاده از سوبسترای HRP مشخص می‌گردد [محلول۱/۵ mM DAB (۳ دی آمینوبنزیدین) در بافر فسفات M ۵٪ (ph = ۷/٤) در حضور H_2O_2 ۰/۰۳]. برای افزایش شدت رنگ و تیرگی باندها، کلرید نیکل با غلظت ۵ mM به مخلوط اضافه می‌شود برای کاهش رنگ زمینه غشاء NC ، سرم بز به میزان۱٪ به محلول کونژوگه HRP اضافه می‌گردد.

نتایج

کشت سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم

۲٤ ساعت پس از کشت ، تمامی قطعات لوله که طولی کمتر از ۱ میلی‌متر دارند، معکوس گردیده و کروی شکل می‌گردند. (تصویر b-۱ و a-۱) در طی روزهای بعد این قطعات سریعاً به کف پلیت متصل گردیده و سلول‌های اپی‌تلیال از اطراف لوله گسترش می‌یابند. هرچه طول قطعه لوله بیشتر باشد معکوس شدن آن به علت عدم خروج اسپرم‌های درون لوله مشکل‌تر بوده و مدت زمان بیشتری طول می‌کشد تا متصل گردد. قطعاتی از اپی‌دیدیم با طولی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

بیش از ۳ میلی‌متر کمتر متصل گردیده، این قطعات در طی روزهای ۵-٤ از کشت به هنگام تعویض محیط کشت، برداشته و حذف می‌گردند.(شکل ۱،صفحه ۵۳)

شکل سلول‌های اپی‌تلیال، که پس از اتصال در اطراف قطعه لوله گسترش می‌یابند کاملا مشخص است، سلول‌هائی کشیده و دوکی شکل (شکل d-۱ و c-۱). در مواردی که تعویض محیط کشت طولانی شود یا شرایط محیط کشت بهینه نباشد، درون این سلول‌ها واکوئل‌های زیادی تشکیل می‌شود. با گذشت زمان از کشت لوله‌ها، رشد سلول‌های فیبروبلاست غالب می‌گردد، که شکل آنها کاملا از سلول‌های اپی‌تلیال متمایز است. در مورد موش حداکثر مدت زمانی که سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم عملکرد طبیعی خود را در محیط کشت حفظ می‌کنند ۱۵ روز است. ولی ما غالب مطالعات خود و جمع‌آوری محیط کشت را در طی هفته اول کشت انجام دادیم.

بررسی فعالیت سنتزی و ترشحی اپی‌تلیال اپی‌دیدیم در محیط کشت (شکل ۲، صفحه ۵۳)

فعالیت سنتزی و ترشحی سلول‌ها از طریق SDS-PAGE و فلوروگرافی بر روی محیط کشت روئی سلول‌ها انجام گرفت ولی از آنجا برای حفظ عملکرد نرمال سلول‌ها به محیط کشت FCS اضافه می‌گردند. در رنگ‌آمیزی کوماسی بلو، باندهای حاصل از پروتئین‌های FCS شدیداً پررنگ می‌گردد ولی به علت مقدار کم پروتئین‌های ترشحی باندهای حاصل رنگ نگرفته و یا بسیار کمرنگ هستند که بوسیله باندهای FCS پوشیده می‌شوند. (تصویر a-۲) امکان تغلیظ نمونه‌ها قبل از انجام الکتروفورز هم وجود ندارد، زیرا پروتئین‌های FCS هم تغلیظ شده و در طی تغلیظ نیز ممکن است برخی از پروتئین‌های ترشحی از دست بروند. از رنگ‌آمیزی نقره هم نمی‌توان استفاده کرد زیرا دوباره پروتئین‌های FCS مزاحم هستند. استفاده از اسیدهای آمینه گوگردار نشاندار در محیط کشت و انجام فلوروگرافی بر روی محیط کشت این مشکل را حل نمود (تصویر b-۲)

بررسی باندهای حاصل از سلول‌های اپی‌تلیال (شکل۳ ، صفحه ۵۳) و باندهای محیط کشت روئی سلولها نشان می‌دهد که تعداد باندها در محیط کشت روئی سلولها کمتر از خود سلولها است و این معرف پروتئین‌های ترشحی می‌باشد. این در حالیست که درون سلول مجموع پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های ساختمانی وجود دارد. مقایسه باندهای حاصل از پروتئین‌های ترشحی طی روزهای مختلف تا هفته دوم از کشت تفاوت محسوسی را نشان نمی‌دهند. (شکل۲). محدوده وزن مولکولی پروتئین‌های ترشحی و پروتئین‌های حاصل از سلول‌های اپی‌تلیال از حدود ۲۰ تا ۲۰۰ کیلودالتون می‌باشد. تمامی پروتئین‌های ترشحی در پروتئین‌های داخل سلول دیده می‌شوند و شدت رنگ آنها در سلول‌های اپی تلیال از پروتئین‌های ساختمانی بیشتر می‌باشد که معرف سنتز فعال پروتئین‌های ترشحی در مقایسه با پروتئین‌های ساختمانی در سلول‌های اپی‌تلیال است.

بررسی آنتی‌سرم برعلیه پروتئین‌های سطح اسپرم

در بررسی میزان تحریک سیستم ایمنی خرگوش توسط پروتیئن‌های غشاء اسپرم و شناسائی پروتئین‌های مشترک بین غشاء اسپرم و پروتئین‌های ترشحی اپی‌دیدیم و نهایتاً شناخت پروتئین‌های ترشحی اپی‌دیدیم که به سطح اسپرم متصل می‌گردند از روش‌های مختلفی استفاده گردید.

روش الایزا: در بررسی سرم خرگوش قبل از تزریق اسپرم و قبل از هر بوستر تیتر افزاینده آنتی‌بادی مشاهده گردید. انجام الایزا بر روی سرم

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

حاصل از خونگیری نهائی نشان داد که رقت ۱:۱۰۰۰ تیتر مناسبی برای انجام آزمایشات بعدی شامل ایمونوفلور سانس و ایمونوبلاتینگ می‌باشد.

انجام الایزا بر روی نمونه محیط کشت روئی سلولها با استفاده از رقت ۱۰۰۰: ۱آنتی سرم فوق نشان داد که تعدادی از پروتئین‌های موجود در این محیط کشت با پروتئین‌های سطح اسپرم مشترک بوده و توسط آنتی‌سرم فوق شناسائی می‌گردد که ماهیت این پروتئین‌ها بایستی توسط روش ایمونوبلاتینگ بررسی شود.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرم‌ها:

رنگ‌آمیزی فاورسانس اسپرم‌های زنده موش با تیتر۱۰۰۰ :۱ آنتی سرم خرگوش باعث رنگ یکنواختی در تمامی سطح اسپرم می‌گردد که شدت رنگ در ناحیه خلفی سر اسپرم بیشتر از سایر نواحی سر اسپرم می‌باشد. (شکل٤ ، صفحه ۵۳) سایر نواحی سطح اسپرم دارای رنگ یکنواختی است که معرف تولید آنتی‌بادی برعلیه تمامی پروتئین‌های سطح اسپرم بوده و یا اینکه یک یا چند پروتئین سیستم ایمنی خرگوش را بیشتر از سایرین تحریک کرده‌اند و این پروتئین‌ها در تمامی سطح اسپرم قرار دارند. بررسی و تأیید مطلب فوق نیاز به جداسازی غشاء اسپرم و تخلیص پروتئین‌های آن دارد. پس از انجام SDS-PAGE و Western Blotting بر روی این پروتئین‌ها با استفاده از آنتی سرم فوق می توان آندسته از آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم را شناسائی کرد که بیشترین اثر تحریک کنندگی بر سیستم ایمنی خرگوش را دارند. در بررسی میکروسکوپی شدت رنگ حاصل از اسپرم‌های نواحی مختلف اپی دیدیم (Caput,Corpus, Cauda) اختلاف چندانی مشاهده نگردید . با توجه به تزریق اسپرمهای ناحیه Caudal اپی‌دیدیم برای تهیه آنتی‌سرم، بایستی با استفاده از روش‌های کمی شدت رنگ اسپرم‌های نواحی مختلف اپی‌هر ناحیه را بررسی کرد. (شکل ۵ ، صفحه ۵۳)

ایمونوبلاتینگ: برای شناسائی پروتئین‌های ترشحی سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم که به سطح اسپرم متصل می‌شوند، ایمونوبلاتینگ با رقت ۱۰۰۰ :۱ آنتی‌سرم خرگوش انجام شد. تصویر ۵ مشخص کننده محل این باندهای پروتئینی می‌باشد. ٤ پروتئین با وزن مولکولی ۲۰ و ۲٤ و ٥٤ و ۵۸ کیلودالتون از ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدم به سطح اسپرم متصل می گردند. پهنای باند حاصل از پروتئین ۲٤KD بیشتر از سایر پروتئین‌ها می‌باشد. نتایج فوق ماهیت دقیق هریک از این پروتئین‌ها، جایگاه ترشح آنها در طول اپی‌دیدم و ترشح احتمالی آنها توسط سایر اندامها را مشخص نمی‌کند. برای این موارد احتیاج به داشتن آنتی‌سرم اختصاصی برای هر کدام داریم. با مشخص شدن وزن مولکولی این پروتئین‌ها توسط این تحقیق امکان انجام موارد فوق براحتی میسر می‌باشد.

بحث

در بررسی پروتئین‌های ترشحی به روش فلوروگرافی همانطور که در تصویر b-۲ مشاهده می‌شود در حدود ۲۰ باند مشخص می‌باشد که تعدادی از آنها دارای مقادیر ناچیز بوده و باند بسیار کمرنگی را ایجاد می‌کنند، در صورتی که در رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو هیچگونه باندی ظاهر نمی‌شود. در رنگ آمیزی نقره نیز به علت شدت رنگ حاصل از پروتئین‌های FCS، باندهای کمرنگ پروتئین‌های ترشحی را می‌پوشانند. بر روی فیلم حدود ۱۵ باند دارای وضوح نسبتاً خوبی است. باندهای حاصل از نظر وزن مولکولی تقریباً مشابه تحقیقاتی است که در محیط in vivo بر روی موش انجام شده است (۲٤ و ۲۳). ذکر این نکته ضروری است که روش‌های اتورادیوگرافی و فلوروگرافی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

روش‌های نیمه کمی هستند چرا که شدت رنگ هر باند به دو عامل وابسته است، یکی مدت زمان قرار گرفتن ژل در معرض فیلم حساس و دیگری محتوی اسیدهای آمینه نشان‌دار (در اینجا Met و Cys) در ساختمان اول پلی‌پپتیدها و پروتئین‌های ترشحی. ممکن است میزان ترشح یک پروتئین ناچیز باشد ولی به علت محتوی زیاد اسیدهای آمینه فوق، باند بسیار پر رنگ و متراکمی را ایجاد کند. چنین پروتئین‌هایی را در ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم شناسائی کرده‌اند که تحت عنوان پروتئین‌های ترشحی غنی از Cys(CRISP) نامیده شده و شامل CRISP 1-3 می‌باشند و غالباً توسط نواحی corpus و cauda اپی‌دیدیم ترشح می‌شوند (۹).

غالب سلول‌های کف پلیت را سلول‌های اپی‌تلیال داخل مجرا تشکیل می‌دهند ولی سلول‌های دیگری از جمله فیبروبلاست‌ها هم وجود دارند و با توجه به فعالیت ترشحی این سلول‌ها، امکان دارد برخی از باندها حاصل پروتئین‌های ترشحی فیبروبلاستها باشند. در این کشتها هر چه از زمان کشت بگذرد درصد سلول‌های اپی‌تلیال کاهش می‌یابد. در یک کشت خوب،۵ روز پس از شروع کشت و اتصال سلول‌ها به کف پلیت، ۸۰٪ سلول‌های کف پلیت را سلول‌های اپی‌تلیال تشکیل می‌دهند ولی ۳هفته پس از کشت این درصد به ٪۴۰ کاهش یافته، در عوض میزان سلول‌های فیبروبلاست غالب می‌گردد(۱).

امکان جداسازی و کشت تک لایه‌ای سلول‌های اپی‌تلیال به طور خالص و منفرد وجود دارد، ولی مطالعات نشان می‌دهد که در غیاب سلول‌های فیبروبلاست، مرفولوژی سلول‌های اپی‌تلیال و سایر ویژگی‌های ساختمانی آنها حفظ می‌گردد ولی طی ۲-۱ روز پس از کشت حتی در حضور آندروژن‌ها، فعالیت ترشحی خود را از دست می‌دهند. اما زمانی که سلول‌های اپی‌تلیال در حضور فیبروبلاست‌ها و آندروژن‌ها کشت داده شوند فعالیت ترشحی طبیعی آنها حفظ می‌گردد. از طرف دیگر حذف آندروژن‌ها حتی در حضور فیبروبلاستها باعث اختلال در عملکرد سلولها شده، سلول‌های اپی‌تلیال مرفولوژی و عملکرد خود را از دست می‌دهند.(۵) چنین تصور می‌شود که فیبروبلاستهای اپی‌دیدیم در حضور آندورژن‌ها، فاکتورهائی را ترشح می‌کنند که به طریق پاراکرین بر روی سلول‌های اپی‌تلیال مجاور اثر گذاشته و منجر به عملکرد ترشحی طبیعی این سلول‌ها می‌گردند. به همین دلیل به جای استفاده از سلول‌های اپی‌تلیال منفرد، از قطعات لوله فاقد بافت همبند و چربی اضافی با طولی در حد ۱ میلی‌متر و کمتر استفاده کردیم.

هرگاه تمامی این پروتئین‌ها توسط سلول‌های اپی‌تلیال ترشح شوند، تمامی آنها به غشاء اسپرم متصل نمی‌شوند زیرا روندهای بلوغ اسپرم در اپی‌دیدیم تنها شامل اتصال یا جدا شدن یک سری پروتئین از غشاء اسپرم نمی‌باشد بلکه در محیط داخلی مجرای اپی‌دیدیم تعداد زیادی آنزیم‌های گلیکوزیداز و گلیکوزیل ترانسفراز وجود دارد که باعث تغییر واحدهای قندی گلیکو پروتئین‌های سطح اسپرم می‌گردند.(۶) همچنین تخریب تعداد زیادی از اسپرم‌های در حال عبور، باعث آزاد شدن آنزیم‌های هیدرولتیک اکروزومی شده که عدم مهار آنها باعث آسیب به سایر اسپرم‌ها و سلول‌های اپی‌تلیال می‌گردد. بسیاری از این آنزیم‌ها بوسیله ترشحات اپی‌تلیال اپی دیدیم مهار می‌گردند. (۱) تخریب اسپرم‌های درون مجرا باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌گردد، زیرا در اسپرم سالم نیز مقادیر زیادی از این رادیکالها تولید می‌شود که سریعاً توسط آنزیم‌های موجود در اسپرم حذف می‌شوند. سلول‌های اپی‌تلیال نیز آنزیم‌هائی را مانند GGT, GRD, SOD, GXP ترشح می‌کنند که

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

باعث غیرفعال شدن این رادیکال‌ها می‌کردند. (۲۲،۱۱)

روند آزاد شدن پروتئین‌های ترشحی در سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم، وزیکول سمینال و پروستات به صورت مروکرین (Merocrine) است یعنی مواد به صورت وزیکول‌های محدود به غشاء آزاد می‌گردند. (۲۱)پس هرگاه این وزیکولها به غشاء اسپرم‌های در حال عبور از اپی‌دیدیم ملحق شوند، پروتئین‌های مذکور جزئی از غشاء اسپرم شده و غالباً به عنوان یک پروتئین غشائی (Integral) در سرتاسر غشاء دولایه‌ای اسپرم ادامه می‌یابند. (۱۳)

چنین پروتئین‌هائی در طی مراحل آماده سازی و شستشوی اسپرم برای تزریق به خرگوش و نیز در طی ظرفیت پذیری اسپرم (Capacitation) از آن جدا نمی‌شوند، در صورتی که اگر پروتئینی از طریق نیروهای مولکولی ضعیف به سطح اسپرم متصل گردیده باشد در طی شستشو و آماده سازی از آن جدا شده و در بدن خرگوش برعلیه آن آنتی سرمی ایجاد نخواهد گردید. در پروتئین‌های ترشحی ٤ باند با وزن مولکولی ۲۰ و ۲٤ و ٥٤ و ٥٨ کیلودالتون توسط آنتی‌سرم بر علیه آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم شناسائی می‌گردد. با این نتیجه نمی‌توان عنوان کرد که در موش تنها همین چهار پروتئین ترشحی به غشاء اسپرم متصل می‌شوند زیرا احتمال دارد تعداد بیشتری از پروتئین‌ها وارد غشاء شوند ولی وضعیت قرار گرفتن آنها به گونه‌ای باشد که شاخص‌های آنتی‌ژنی آنها از سیستم ایمنی مخفی بماند و قادر به تحریک سیستم ایمنی خرگوش نباشند. زیرا همانطور که می‌دانیم آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم هرگونه برای سیستم ایمنی آنگونه در جنس نر و ماده ناشناخته است، هرگاه این آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم هرگونه برای سیستم ایمنی آنگونه در جنس نر و ماده ناشناخته است، هرگاه این آنتی‌ژن‌ها در معرض سیستم ایمنی قرار گیرد، برعلیه آنها آنتی‌بادی ایجاد شده و با اتصال به غشاء اسپرم باعث جلوگیری از عملکرد طبیعی اسپرم در اتصال با تخمک و لقاح آن می‌شود، به گونه‌ای حدود ۱۰٪ از علل ناباروری زوجین ناشی اتواسپرم آنتی‌آبادی (ASA) در زن و مرد می‌باشد. (۱٦) برای به حداقل رساندن شناسائی آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم توسط سلول‌های ایمنی هرگونه، یک پوشش گلیکوکالیکس با تعداد زیادی واحدهای قندی در سطح اسپرم ایجاد می‌شود که باعث پوشاندن شاخص‌های آنتی‌ژنی سطح اسپرم و حداقل رساندن تحریک سیستم ایمنی در دستگاه تناسلی نر و ماده می‌گردد.(۱۳) یکی از گلیکوپروتئین‌های ایجاد کننده این پوشش گلیکوکالیکس، CD52 است که به میزان زیاد توسط سلول‌های اپی‌تلیال بخش انتهای اپی‌دیدیم (Cauda) در موش و انسان بیان می‌شود.(۲۸) پس امکان دارد تعداد پروتئین بیشتری به غشاء اسپرم متصل شوند ولی در بدن خرگوش بر علیه آنها آنتی‌بادی تولید نگردد. برای مثال یکی از گلیکوپروتئین‌های شناخته شده غشاء اسپرم موش که توسط بخش ابتدای اپی‌دیدیم ترشح می‌شود گلیکوپروتئین D/E است که با عناوین AGE یا DE/AGE نیز ذکر شده است این پروتئین با وزن مولکولی ۳۲ KD به طور محکم به غشاء اسپرم متصل می‌گردد و در روند لقاح اسپرم ـ تخمک نقش مهمی دارد. به طوری که افزودن آنتی‌بادی علیه آن به محیط لقاح باعث کاهش معنی‌داری در میزان لقاح تخمک می‌گردد.(۱۰) با این حال پروتئین مذکور در ٤ پروتئین شناسائی شده وجود ندارد.

در ارتباط با ماهیت احتمالی این پروتئین‌ها، پروتئینی با وزن مولکولی ۲۰KD اولین بار از ناحیه Cauda اپی‌دیدیم خرگوش تحت عنوان BE-20 جدا گردید و ژن کد کننده آن نیز مشخص شد . (۲۷)آنتی‌بادی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

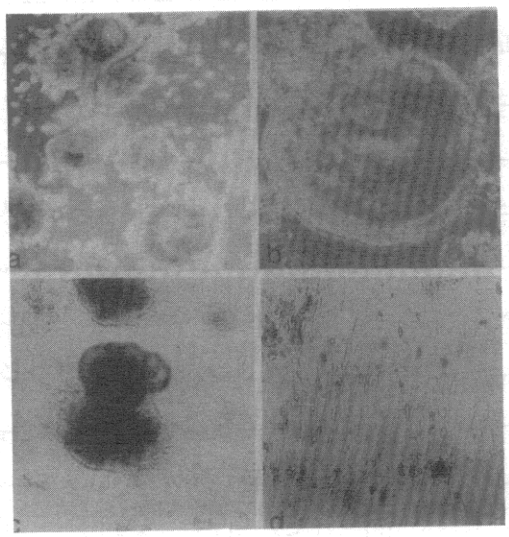
ضد آن قادر به مهار اتصال اسپرم خرگوش به تخمک فاقد زونای هامستر می‌گردد(۲۶) علاوه بر این در انسان نیز یک سیالوگلیکوپروتئین با همین وزن مولکولی و با منشاء اپی‌دیدیم شناسائی گردیده که به ناحیه سر و قطعه میانی اسپرم متصل می‌شود و در طی ظرفیت پذیری اسپرم نیز از آن جدا نمی‌گردد. این گلیکوپروتئین برای نفوذ اسپرم در تخمک فاقد زونای هامستر ضروری می‌باشد .(۸) چنین پروتئینی در موش و سایر جوندگان گزارش نشده است. در رابطه با پروتئین دارای وزن مولکولی ۲٤ K ، اولین بار پروتئین مشابه‌ای در ناحیه Caput اپی‌دیدیم موش شناسائی شد که ترشح آن تحت کنترل آندروژن‌ها بوده و به سطح اسپرم متصل می‌گردید .(۱۵) مطالعات اخیر نشان داد که این پروتئین دارای فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) است و عمل آن حذف رادیکال‌های آزاد بواسطه گلوتاتیون می‌باشد. (۲۵) وجود آنزیم فوق در اپی‌دیدیم اکثر گونه‌های جوندگان و پستانداران گزارش شده است. در مورد دو پروتئین دیگر با وزن مولکولی ٥٤ و ٥٨ کیلودالتون گزارش اختصاصی وجود ندارد البته پروتئینی تحت عنوان PH20 یا Spma 1 با وزن مولکولی تقریبی ۷٤ کیلودالتون در سطح اسپرم شناسائی شده است. آنتی‌بادی ضد آن با پپتیدهای دیگری با وزن مولکولی ٥٦،٦٧،۷۰ کیلودالتون در اپی‌دیدیم واکنش می‌دهد که معرف تغییرات ساختمانی آن در طول عبور اسپرم از اپی‌دیدیم می‌باشد. پروتئین فوق دارای فعالیت هیالورونیدازی است و در بخش خلفی سر اسپرم قرار دارد و فعالیت آن در طول اپی‌دیدیم افزایش می‌یابد. توزیع پروتئین بر سطح اسپرم در ناحیه Caput اپی‌دیدیم صورت می‌گیرد ولی این پروتئین ابتداء در سطح اسپرماتید ظاهر می‌گردد که معرف تولیدآن توسط بیضه است. (۷)

آنزیم فوکوزیداز نیز توسط محلول غلیظ NaCl از سطح اسپرم جدا شده و دو باند ۵۰ و ٥٤ کیلودالتون ایجاد می‌کند ولی آنتی‌بادی ضد آن با اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتید واکنش می‌دهد که معرف منشأ بیضوی آن است.(۳) با توجه به نتایج حاصل از این مرحله برای تعیین بیشتر ماهیت هریک از این پروتئین‌ها، در ادامه بایستی چهار پروتئین فوق را به طور کاملاً خالص از ترشحات اپی‌دیدیم جدا گردد. از یکطرف با تولید آنتی‌سرم اختصاصی برعلیه هر کدام ، محل پروتئین مذکور در سطح اسپرم و تغییراتی را که در طی بلوغ اسپرم و فرآیند لقاح بر روی آنها صورت می‌گیرد و نهایتاً نقش هریک در فرآیند لقاح به طور دقیق مورد ارزیابی قرار گیرد. از طرف دیگر چون پروتئین مذکور به طور کاملاً خالص در دسترس است بایستی به بررسی ساختمان آن (توالی اسیدهای آمینه و واحدهای قندی) و نهایتا ژن کد کننده و سایر خواص فیزیکوشیمیایی آن پرداخت. در صورت تعیین تمامی موارد فوق می‌توان هر یک از آنها را به عنوان کاندیدی برای مهار فرآیند لقاح در محیط in vitro و in Vivo مورد بررسی قرار داد و یا بتوان از این پروتئینها و یا آنتی‌بادی اختصاصی آنها برای تشخیص و درمان ناشناخته ناباروری مردان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی:

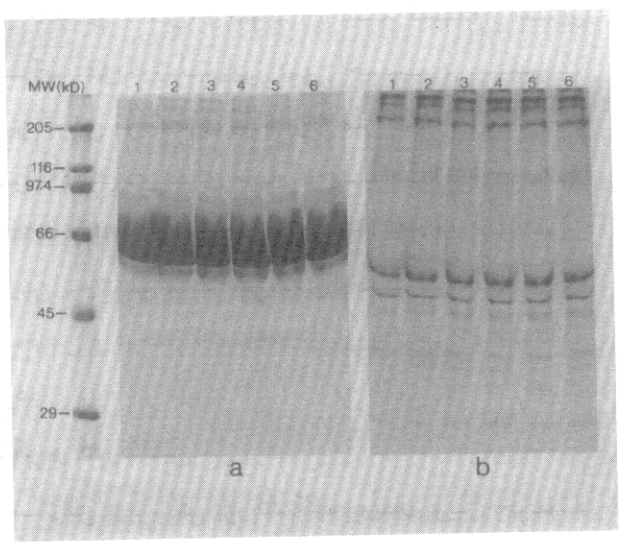
از مسؤلین و پرسنل پژوهشکده رویان بویژه حوزه معاونت پژوهشی و بخش تحقیقات بواسطه همکاری‌های صمیمانه و بی‌شائبه در اجرای این پروژه و تأمین اعتبار مالی آن و همچنین از معاونت پژوهشی دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی بواسطه تأمین بخشی از اعتبارات این پروژه کمال تشکر و قدردانی را بر خود فرض می‌دانیم.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]



شکل۱: کشت اپی‌تلیال اپی‌دیدیم موش

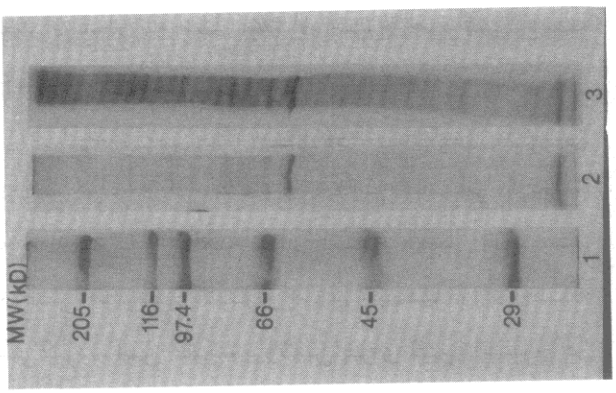
a: قطعات کوتاه ابتدای اپی‌دیدیم در طول شب در محیط کشت معکوس گردیده و کره‌هائی را تشکیل می‌دهند.
b: یک کره حاصل از معکوس شدن لوله اپی‌دیدیم با بزرگنمایی بالا که سلولهای اپی تلیال در سطح کره مشخص است.
c: پس از اتصال قطعات لوله به کف پلیت، سلول‌های اپی‌تلیال از اطراف آنها گسترش می‌یابند.
d: در پایان هفته اول کشت، تمامی کف پلیت توسط سلول‌های اپی‌تلیال پوشیده می‌شود. سلول‌ها دارای مرفولوژی کشیده و دوکی شکل می‌باشند.



شکل۲: SDS- PAGE و فلوروگرافی محیط کشت روئی سلول‌های اپی‌تلیال

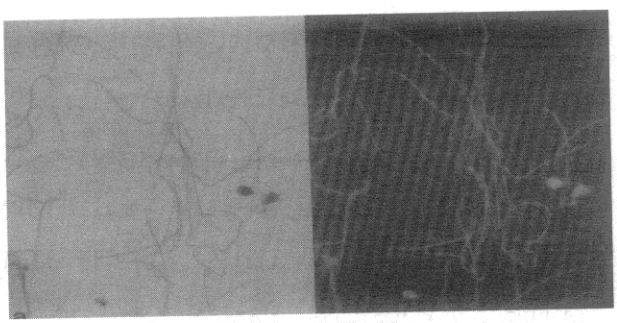
a- ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی‌بلو R250-
b- فیلم حاصل از فلوروگرافی همان ژل برای مشخص شدن پروتئین‌های ترشحی

فعالیت ترشحی سلول‌های اپی‌تلیال پس از اتصال به کف پلیت تا هفته دوم کشت مورد مقایسه قرار گرفته است و کاهش محسوسی در فعالیت ترشحی آنها در محیط In vitro مشاهده نمی‌شود ۱- روز چهارم ۲ - روز شش ۳ - روز هشتم ٤ - روز دهم ٥ - روز دوازدهم ٦ - روز چهاردهم



شکل۳: SDS-PAGE و فلوروگرافی سلول‌های اپی‌تلیال اپی‌دیدیم

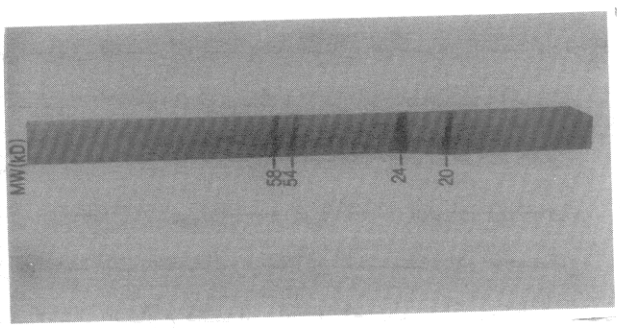
۱ - مارکرهای وزن مولکولی ۲ - ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی‌بلو R-250 ۳ - فیلم حاصل از فلوروگرافی همان ژل برای مشخص شدن پروتئین‌های ساخته شده توسط سلول‌های اپی‌تلیال پس از افزودن اسیدها آمینه نشاندار



شکل ۴ : رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس اسپرم‌های ناحیه cauda اپی‌دیدیم موش

a- تصویر میکروسکوپ نوری b - تصویر میکروسکوپ فلورسانس.

در رنگ آمیزی فلورسانس اسپرم موش با آنتی سرم حاصل از خرگوش، ناحیه خلفی سر اسپرم و تمامی نواحی دم اسپرم شدت رنگ بیشتری را نشان می‌دهند.



شکل۵: Western Blotting پروتئین‌های ترشحی اپی‌تلیال اپی‌دیدیم

ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های ترشحی سلول‌های اپی‌تلیال با استفاده از آنتی‌سرم خرگوش ایمن شده با اسپرم موش .چهار پروتئین با وزن مولکولی تقریبی ۲۰ و ۲٤ و ٥٤ و ٥٨ کیلودالتون توسط اپی‌تلیوم اپی‌دیدم ترشح شده و در سطح اسپرم نیز وجود دارند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

References:

1. Akhondi MA. The in vitro culture of epididymal epithelium from the rat and human. In : The role of the human and rat epididymis during sperm maturation and storage. Ph.D. thesis, University of Sheffield, UK, 1996; p:45.
2. Akhondi MA, Chapple C, Moore HDM. Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures. Hum Reprod 1997; 12(13): 514-522.
3. Aviles M, Abascal I, Martinez-Menarguez JA, et al. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of anovel plasma membrane-associated, neutral pH optimum L-Fucosidase from rat testisand epididymal spermatozoa. Biochem J 1996; 318:821-831.
4. Boue F., Duquenne C., Lassalle B et al. FLBl a human protein of epididymal origin that is involved in the sperm-oocyte recogintion process. Biol Reprod 1995; 52: 267-278.
5. Carballada R, Saling PM. Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperture and fibroblasts. J Reprod Fertil, 1997; 110:171-181.
6. Castellon EA, Huidobro CC. Androgen regulation of glycosidase secretion in epithelial cell cultures from human epididymis. Hum Reprod 1999; 14 (6): 1522-1527.
7. Deng X, Czymmek K, Martin-Deleon PA. Biochemical maturation of Spaml (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides. Mol Reprod Dev, 1999; 59: 196-206.
8. Focarelli R, Giuffrida A, Capparelli S et al. Spicific localization in the equatorial region of gp20, a20 kDa sialylglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during eqididymal transit which necessary to penetrate zona-free hamester eggs. Mol Hum Reprod, 1998; 4 (2): 119-125.
9. Haendler B, Habenicht UF, Schwidetzky U, et al. Differential androgen regulation of the murine genes for Cystein-Rich-Secretory-Proteins (CRISP). Eur J Biochem 1997; 250: 440-446.
10. Hall JC, Tubbs CE. Purification and characterization of protein D/E a putative sperm-binding protein involved in fertilization. Prepar Biochem Biotechno 1997;27(4):239-251.
11. Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D et al. The epididymis an protector of maturing Fertil Dev, 1995;7:731-745.
12. James PS, Wolfe CA, Ladhe S et al. Lipid diffusion in the plasma membrane ofram and boar spermatozoa during maturation in the epididymis measured by fluorescence recovery after photobleaching. Mol Reprod Dev, 1999; 52:207-215.
13. Kirchhoff C. Hale G. Cell-to-Cell transfer of glycosylphosphatidyli-nositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. Mol Hum Reprod, 1996;2(3): 177-184.
14. Ladha S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon.J Membrane Biol, 1998; 165: 1-10.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]

15. Lefrancois AM, Jimenez C, Dufaure JP. Developmental expression and androgen regulation of 24 kDa secretory proteins by the murine epididymis . Int J Androl, 1993; 16:147-154.

16. Matson PL. Spermantibodies, of formation and significance, in : Gametes-Thespermatozoa. Cambridge Reviews in Human Reproduction. Crudzinskas & Yovich, 1995:238-249.

17. Moore HDM. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. Andrologia 1998; 30 (4-5) : 233-9.

18. Moore HDM, Akhondi MA; In Vitro maturation of mammilian spermatozoa. Rev Reprod 1996; 1:54-60.

19. Myles DG, Koppel DE, Cowan AE, et al. Rearrangement of sperm surface antigens prior to fertilization. Ann New York Acad Scien, 1987; 513:262-273.

20. Nolan JP. Hammerstedt RH. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammilian sperm. FASEB J, 1997; 11:670-682.

21. Rigaudiere N, Ghyselinck NB, Faure J, et al. Regulation of the epididymal glutathione peroxidase-like protein in the mouse: dependence upon androgens and testicular factors, Mol Cell Endocrin, 1992; 89:67-77.

22. Tramer F, Rocco F, Micali F et al. Antioxidants systems in rat epididymal spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 753-758.

23. Turner TT, Avery EA, Sawchuk TJ. Assessment of protein synthesis and secretion by rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. Int J Andro, 1994; 17:205-213.

24. Turner TT, Miller DW, Avery EA. Protein synthesis and secretion by the rat caput epididymis in vivo, Influence of the luminal microenvironmt. Biol Reprodl 995; 52: 1012-1019.

25. Vernet P.Faure J, Duraure JP, et al. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factor and attachment to Spermatozoa GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. Mol Reprod Dev 1997; 47:87-98.

26. Xu WD, Miao SY, Zhang ML, et al. Expression of the BE-20 epididymal protein gene: In situ hybridization. Arch Androl, 1997; 38:1-6.

27. Xu WD, Wang LF, Miao Sy et al. Identification of a rabbit epididymal protein gene. Arch Androl 1996; 37: 135-141.

28. Yeung CH, Cooper TG, Nieschiag E. Human epididymal secreted protein CD52 on ejaculated spermatozoa: correlations with semen characteristics and effect of its antibody. Mol Hum Reprod 1997;3 (12): 1045-1051.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-19]