

DEZINTEGRACE LIDSKÝCH SPERMIIÍ A CHARAKTERIZACE JEJICH ANTIGENŮ

ANDREA BRÁZDOVÁ^a, JARMILA ZÍDKOVÁ^a,
JAN CIBULKA^b, MAGDALÉNA VALIŠOVÁ^a,
VOJTĚCH ŠKOP^a a ZDENA ULČOVÁ-
GALLOVÁ^b

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice,

^b Gynekologickoporodnická klinika LF UK a FN Plzeň,
326 00 Plzeň – Lochotín
jarmila.zidkova@vscht.cz

Došlo 9.3.11, přijato 31.3.11.

Klíčová slova: neplodnost, protilátky proti spermiiím, imu-
noblots

Úvod

Neplodnost je již v dnešní době definována jako civilizační nemoc. Bezprostředních příčin je mnoho, např. zhoršující se stav životního prostředí, rychlé životní tempo, stres. Z lékařského hlediska se na neplodnost nahlíží jako na neschopnost početí potomka během jednoho roku nechráněného pohlavního styku s běžnou frekvencí. Porucha může být na straně ženy, muže, anebo obou partnerů. V případě ženy je neplodnost důsledkem chromosomálních defektů, poruch podmíněných anatomicky (srůsty, endometrióza) nebo hormonálně. Jako nejčastější příčiny ženské neplodnosti jsou uváděny nepřítomnost ovulace, nedostatečná funkce žlutého tělíska, syndrom polycystických vaječníků, zvýšená hladina prolaktinu. Také intenzivní chemoterapie ovlivní plodnost. U muže může být plodnost omezena v důsledku poranění varlat nebo díky vrozeným dispozicím^{1–3}.

Příčina neplodnosti bývá také imunologického charakteru. U ženy dochází ke změně buněčné imunity proti spermiiím a následně rejekci spermatu, u muže k porušení hematotestikulární bariéry a vytvoření autoprotilátek (antisperm antibodies, ASA). ASA spermie aglutinují, znemožňují jejich pohyb, brání splnutí spermie a vajíčka, zvyšují riziko potratu^{1,4}. Imunitní systém ovlivňuje i průběh těhotenství. Neznámým příčinám, tzv. idiopatickým⁵, dominuje imunitní systém.

Chceme-li studovat antigeny spermiií, je nezbytné připravit vhodný proteinový extrakt spermiií, čehož je možné dosáhnout mechanickou a chemickou cestou lyze. V rámci naší experimentální práce byla mechanickým

způsobem sonikace, při které dochází ke kavitaci. Během kavitace vznikají v kapalině působením ultrazvukových vln oblasti zředění a stlačení. V místech zředění se nacházejí dutiny. Při zániku dutin je uvolněna tlaková vlna, která je považována za destrukční prvek. Chemické metody zastupovalo působení povrchově aktivních látek, pro naši studii jsme vybrali deoxycholát sodný (DOC), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát (CHAPS), Triton X-100 a X-114. Dále byla zahrnuta lyze pomocí chloridu benzalkonia, účinné látky spermicidních prostředků, jedná se o bezvodou směs alkybenzylmethylamonových chloridů s alkylovými řetězci C₈–C₁₈ (cit.⁶). Poslední zvolenou látkou byla močovina jakožto chaotropní činidlo⁷ a lyze navozením hypotonického prostředí.

Experimentální část

Metody dezintegrace spermiií

Vzorky ejakulátu byly získány od čtyř dobrovolných dárců masturbací po 3–5 dnech sexuální abstinence. Dárci byli vybráni na základě výsledku spermigramu (normospermigram podle manuálu světové zdravotnické organizace, WHO 1999). Lyze byla prováděna vždy ze 4 ml suspenze ejakulátu. Každý ml suspenze byl samostatně centrifugován při 600x g, 4 °C, 10 minut. Seminální plazma ve formě supernatantu byla odstraněna a peleta tvořená spermiiemi byla následně třikrát promyta 0,5 ml PBS s inhibitory proteas (Protease inhibitor cocktail, Sigma, USA) 1:100. Dezintegrace každé pelety byla provedena 50 µl lyzovacích roztoků s danou účinnou látkou 4 h na ledu za stálého kývání. Účinné látky představoval 1% DOC (Sigma, USA), 1% Triton X-114 (Sigma, USA) a X-100 (Sigma, USA), 13M CHAPS (Sigma, USA), 6M močovina (Sigma, USA), 3M chlorid benzalkonia (Sigma, USA) a destilovaná voda. Po proběhnutí lyze byla suspenze 10 min centrifugována 4300x g při teplotě 4 °C. Lyze za použití destilované vody probíhala přes noc při teplotě 4 °C na ledu za stálého kývání. Kratší doba dezintegrace využitím hypotonického prostředí neposkytovala vhodný proteinový podíl. Výsledný supernatant představoval proteinový extrakt spermiií. V tomto kroku se provedlo smísení čtyř lyzátů ze vzorku čtyř vybraných dárců. Ve směsném vzorku byla měřena koncentrace bílkovin pomocí BCATM Protein Assay Reagent A (cit.⁸) (BCA, Pierce, USA) užitím hovězího sérového albuminu (BSA) jako standardu.

Testovaná séra

45 krevních sér žen s prokázanou poruchou plodnosti bylo využito k imunodetekci. Séra byla vybrána dle výše titru spermaglutinujících protilátek (Fridbergův test, též TAT)⁹ a třídy protilátek (nepřímý MAR test)¹⁰. Jako negativní kontrola bylo užitó krevní sérum osmileté dívky. Alikvoty byly uchovány při teplotě –20 °C.

Jednorozměrná polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS (1D SDS-PAGE) následovaná imunoblotem

SDS-PAGE byla provedena při pokojové teplotě v Mini Protein Cell Bio-Rad dle modifikace Harlow a Lane (1988). Alikvot smíšeného lyzátu byl separován na 10% polyakrylamidovém gelu (30% akrylamidový mix, 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% persíran amonný – APS, TEMED – Serva, Německo) a 5% akrylamidovém zaostřovacím gelu pH 6,8. Vzorek byl nanesen v koncentraci 25 µg proteinů. Před nanesením byl smíchán v poměru 1:1 s tzv. vzorkovacím pufrem neredukujícím (protein loading buffer non-reducing, PLB-N; 0,5M Tris-HCl pH 6,8; glycerol, 10% SDS; 0,1% bromofenolová modř) nebo redukujícím (protein loading buffer reducing, PLB-R; 0,5M Tris-HCl pH 6,8; glycerol, 10% SDS; 0,1% bromofenolová modř, 5% β-merkapt ethanol). Směs byla 3 min vařena a aplikována do jamek v gelu. Jako proteinový standard byl použit širokospektrý molekulový marker (SDS-PAGE standard, broad rang, Bio-Rad, USA). Separované proteiny v gelu byly detegovány stříbrem užitím kitu Silver™ Plus Stain Kit (Sigma, USA).

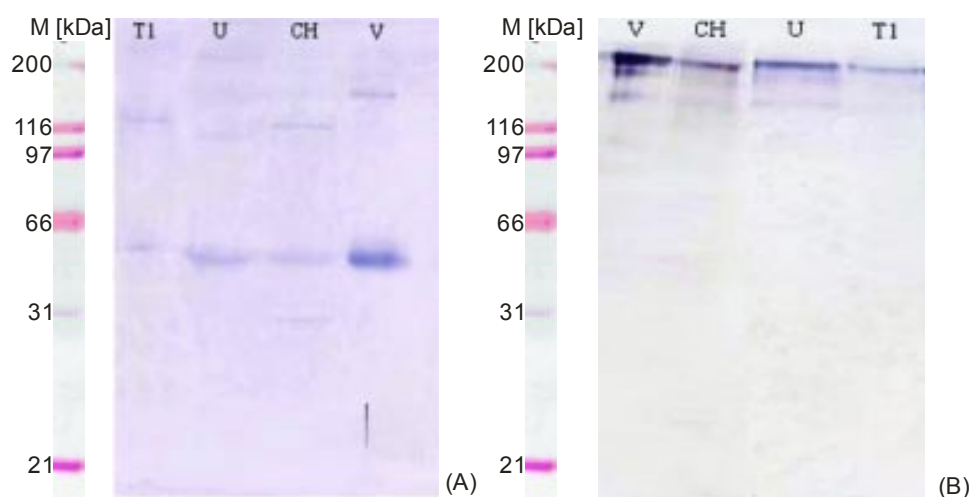
Aparatura Mini Trans-Blot Cell Bio-Rad (Mini Protean III system, Bio-Rad, USA) byla použita pro Western blot. Přenos proteinů byl proveden pomocí stejnosměrného elektrického proudu (elektroblot) na 0,45 µm pórovou nitrocelulosovou membránu (NC, Serva, Německo) při 100 V, teplotě 4 °C, 45 min, užitím Towbinova pufru (Tris-glycinový pufr, 48 mM Tris, 39 mM glycin, 10% methanol, pH 9,2). Membrána byla saturována 2 h blokovacím roztokem – 10% odtučněné sušené mléko (Laktino, Promil, ČR) v TBS-Tw (Tris buffered saline tween; 0,02M Tris, 14M NaCl, 4,5M MgCl₂, 0,1% Tween 20, pH 8,0) při

laboratorní teplotě. Poté byla membrána inkubována s krevními séry pacientek přes noc při teplotě 4 °C. Séra byla ředěna 1:1000 v 5% odtučněném sušeném mléku v TBS-Tw. Membrána byla třikrát promyta TBS-Tw a inkubována s konjugátem Goat AntiHuman IgG-AP (Promega, USA) ředěným 1:15 000 v 5% odtučněném sušeném mléku v TBS-Tw 2 h při laboratorní teplotě. Nitrocelulosová membrána byla třikrát promyta TBS-Tw. Imunokomplex byl detegován pomocí aktivity konjugovaného enzymu užitím chromogenního substrátu (IMMUNO NBT/BCIP, Liquid substrate plus, MP Biomedicals, USA). Po zvolení nejvhodnějšího způsobu dezintegrace spermií byl postup opakován s obměnou, kdy byla membrána krájena na 3mm proužky a každý odděleně saturován a inkubován s krevním sérem pacientky. Navazující postup se shodoval s postupem pro celou membránu. Na základě metody lineární regrese byla pomocí molekulového standardu určena molekulová hmotnost nalezených antigenů.

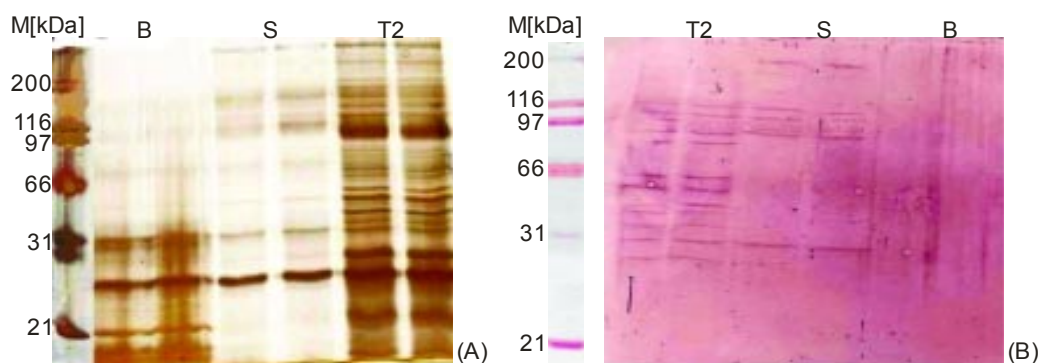
Výsledky a diskuse

Čtyři vzorky spermatu byly využity k přípravě proteinového extraktu spermií. Koncentrace bílkovin v lyzátech dosáhla rozsahu 0,4–3 mg ml⁻¹. Smíšený vzorek proteinového extraktu spermií byl separován metodou SDS-PAGE v redukujícím (obr. 1A, 2) i neredukujícím (obr. 1B) prostředí. V obou případech následoval imunoblot (obr. 1–3).

Jestliže byl vzorek před separací metodou SDS-PAGE inkubován ve vzorkovacím pufru neredukujícím, pak nedošlo k dostatečnému rozdělení proteinů. Vzorky lyzované roztokem chloridu benzalkonia (bezvodá směs alkylbenzyl dimethylamonných chloridů s alkylovými řetězci C₈–C₁₈), Tritonem X-100 a získané lyzí pomocí ultra-



Obr. 1. Imunodetekce proteinového extraktu spermií v redukujících (A) a neredukujících podmínkách (B) užitím krevního séra pacientky s poruchou plodnosti. M: molekulový standard pro SDS-PAGE, TI: lyze Tritonem X-114, U: močovinou, CH: CHAPS, V: destilovanou vodou



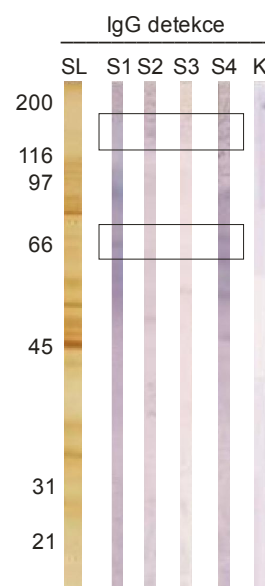
Obr. 2. Jednorozměrná polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS (A) a imunodetekce (B) proteinového extraktu spermií získaného lyzí. M: molekulový standard, B: lyze spermií pomocí chloridu benzalkonia, S: lyze sonikací, T2: lyze Tritonem X-100

zvuku (sonikace) byly inkubovány pouze v prostředí redukujícím a následně děleny pomocí SDS-PAGE (obr. 2A). Separaci následovala imunodetekce (obr. 2B).

Při porovnání metod dezintegrace lidských spermií na základě SDS-elektroforézy a imunoblotu byl zvolen Triton X-100 jako nejvhodnější účinná látka lyze. Nalezené molekulové hmotnosti (M_r) dosahují širokého rozpětí od 31 do 200 kDa (obr. 3). Jako nejčastější byly určeny molekulové hmotnosti 68 a 123 kDa. Antigen o velikosti 68 kDa byl rozpoznán 93 % použitých sér, antigen o velikosti 123 kDa 84 %. Minoritně byly zastoupeny i další, sérum S1 dále interaguje s antigeny molekulové hmotnosti 50, 86 a 90 kDa, sérum S2 s 36 kDa, sérum S3 s 50 kDa a sérum S10 s 43, 50, 64 a 86 kDa. Nebyla prokázána interakce IgG protilátek osmileté dívky (negativní kontrola) s antigeny spermií.

Vzhledem k stále vyrovnanějšímu poměru ženského a mužského faktoru neplodnosti, nesmíme ženu vyjmat z partnerského celku¹. Pokud zmiňujeme ženu s poruchou plodnosti, jedná se jen o vstupní parametr naší studie. Séra žen byla podrobena spermaglutinačním testům⁹ na minimálně dvou různých vzorcích spermií zdravých dárců s parametry normospermiogramu¹⁰. Pozitivní séra způsobovala aglutinaci (shlukování) spermií, snižovala jejich pohyblivost nebo měla na spermie účinek toxický. Pomocí nepřímého MAR testu byla specifikována třída antispermatozoidálních protilátek¹¹. MAR test (mixed antibody reaction) je reakce, kdy se na spermie naváží polystyrenové částice s protilátkami proti lidským imunoglobulinům. Pozitivní výsledek je nežádoucí. Pro potřeby detekce a s ohledem na plánované použití konjugátu (Goat Anti-Human IgG-AP) byla vybrána séra s vysokým titrem protilátek třídy IgG.

Naše práce reprezentuje jednu z etap výzkumu imunitních vlastností lidské spermie a jejího vztahu k imunitnímu systému ženského pohlavního traktu. Zdrojem protilátek byly v našem případě séra pacientek s poruchou plodnosti. Tento poměrně frekventovaný pojem je v literatuře vysvětlován různě. Velmi často je definován právě použitím negativních kontrol, např. dětských sér,



Obr. 3. Imunodetekce antigenů spermií separovaných jednorozměrnou polyakrylamidovou elektroforézou v přítomnosti SDS. M: molekulový standard proteinů, SL: barvený proteinový extrakt spermií, S1 – S4: screening sér interagujících s antigeny spermií, K: negativní kontrola

kde se nepředpokládá přítomnost protilátek proti spermii. Nedávné práce ukazují na možnost zkřížené reaktivity protilátek alternativní etiologie reagujících se spermii. Mnozí autoři upozornili na možnost zkřížené imunoreakce antigenů spermií s protilátkami vyvolanými např. mikrobiálními antigeny nebo dokonce jen zánětlivými procesy^{12–16}. Naše negativní kontrola však evidentně takový druh předchozí stimulace nevykazovala.

I přes pokrok molekulární genetiky a proteomiky považujeme přípravu proteinového extraktu spermií pomocí lyzovacích metod za přínosný postup. Vzhledem k posttranslačním modifikacím možných antigenních struktur na povrchu spermie, si lze jen těžko představit charakterizaci

antigenů spermií bez základních lyzovacích postupů¹⁷. U každého lyzovacího postupu je dobré mít na paměti charakter lyzovacích látek a možnost ztráty jednotlivých konformačních epitopů, ne-li celých antigenů přítomných v nativním stavu. Zvážíme-li všechna výše uvedená fakta, jeví se jako nevhodnější neionogenní tenzid, kterým byl v naší studii Triton X, obzvláště pokud bychom chtěli získat membránové proteiny¹⁸. Na základě škály separovaných proteinů metodou SDS-elektroforézy a odezvy na imunoblotu byl vybrán Triton X 100. Nicméně, tato studie je brána spíše jako úvodní, nejen z hlediska výtěžnosti potenciálních antigenů, ale i z hlediska metodologického. Jak bylo již zmíněno, nelze zcela přesně předvídat zachování přítomnosti všech jednotlivých epitopů buněčných antigenů a jejich imunogenicity v procesu lyze, a proto musíme o to větší pozornost věnovat výběru detekčního systému^{9,11}.

V kontrastu naší studie s jinými^{19,20}, jež se také zabývaly charakterizací antigenů spermií, jsme našli podobné molekulové hmotnosti detegované pomocí IgG protilátek. Nicméně jsme detegovali i antigeny o vyšší molekulové hmotnosti, např. 123 kDa. Je možné, že právě tento antigen pochází z vnitřního prostředí spermie, a proto není ve shodě se zmíněnými výsledky z literatury. Zda se jedná o identické proteiny, membránové nebo plazmatické, bude možno rozhodnout až na základě probíhajících experimentů hmotnostní spektrometrie. Chceme-li porozumět mechanismu imunologicky podmíněné neplodnosti, je třeba studovat antigeny spermií podrobně²¹. Výsledky naší studie by mohly přispět k úspěšné léčbě a zlepšení diagnostiky neplodnosti.

Závěr

Dnešní doba přináší stále vyšší riziko neplodnosti. Světová zdravotnická organizace ji definuje již jako nemoc. Je-li neplodnost ženy imunologicky podmíněna, je třeba najít antigeny spermií, na které reaguje imunitní systém tvorbou protilátek a brání tak úspěšnému početí. Pro získání proteinové frakce spermií byly použity chemické i fyzikální způsoby dezintegrace. Chemické metody byly zastoupeny lyzí buněk v hypotonickém prostředí (destilovaná voda) a použitím povrchově aktivních látek (DOC, CHAPS, Triton X-100 a X-114), močoviny a chloridu benzalkonia, který je součástí spermicidních látek. Fyzikální metodou byla sonikace. Jako nejúčinnější metoda se jeví dezintegrace Tritonem X-100. Za použití Tritonu X-100 bylo dosaženo nejlepšího rozdělení proteinů metodou SDS-PAGE a následná imunodetekce na nitrocelulose membráně byla nejvýraznější. Vzorek před dělením proteinů bylo vhodněji inkubovat ve vzorkovacím pufru redukujícím. Nejčastěji byly detegovány antigeny spermií o molekulové hmotnosti 68 a 123 kDa. Podrobnější charakterizace a případná izolace antigenů bude předmětem našeho dalšího studia.

Tato práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/2011) a podpořena projekty VZ MŠMT 0021620812, VZ MŠMT 604613730.

LITERATURA

1. Ulčová-Gallová Z.: *Neplodnost - Útok imunity*. Grada, Praha 2006.
2. Doherty C., Clark M.: *Léčba neplodnosti*. Computer Press, Brno 2006.
3. Řežábek K.: *Léčba neplodnosti*. Grada, Praha 2008.
4. Davajan V., Nakamura R., Saga M.: *Biol. Reprod.* 6, 43 (1972).
5. <http://www.fertilizace.cz/lecba-neplodnosti.html>, staženo 19. říjen 2010.
6. http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_a-c/Benzalkonium%20chloride.pdf, staženo 12. září 2009.
7. Kodíček M.: *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. VŠCHT Praha, Praha, (2004).
8. Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Partner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goetze N., Olson B., Klenk D.: *Anal. Biochem.* 150, 76 (1985).
9. Friberg J.: *Acta Gynecol. Scand., Suppl.* 36, 21 (1974).
10. W.H.O. laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. University Press, Cambridge 1992.
11. Ulčová-Gallová Z., Krauz V.: *Biol. Immunol. Reprod.* 11, 41 (1985).
12. Dimitrova D., Kulaydjiev S., Mendizova A., Piryova E., Nakov L.: *Fertil. Steril.* 84, 1533 (2005).
13. Sarkar S.: *J. Reprod. Med.* 13, 93 (1974).
14. Blum M., Pery J., Blum I.: *Adv. Contracept.* 5, 41 (1989).
15. Eggert-Kruse W., Rohr G., Probst S., Rusu R., Hund M., Demirakca T., Aufenanger J., Runnebaum B., Petzoldt D.: *Andrologia* 30, 61 (1998).
16. Ulčová-Gallová Z., Hort T.: *Česk. Gynkol.* 57, 418 (1992).
17. Nixon B., Aitken R.J., v knize: *Immune Infertility* (Krause W. K. H., Naz R.J., ed.) kap. 1. Proteomics of Human Spermatozoa, Springer-Verlag, Berlin 2009.
18. Giroux-Widemann V., Jouannet P., Pignot-Paintrand I., Feneux D.: *Mol. Reprod. Dev.* 29, 157 (1991).
19. Bohring C., Krause W.: *Electrophoresis* 20, 971 (1999).
20. Bohring C., Krause E., Habermann B., Krause W.: *Mol. Hum. Reprod.* 7, 113 (2001).
21. Sedláčková T., Zídková, J., Brázdová A., Melčová M., Škop V., Cibulka J., Ulčová-Gallová Z.: *Chem. Listy* 104, 3 (2010).

A. Brázdová^a, J. Zídková^a, J. Cibulka^b, M. Vališová^a, V. Škop^a, and Z. Ulčová-Gallová^b (^a *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b *Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital, Plzeň*): **Disintegration of Human Sperm and Characterization of Its Antigens**

For treatment of female immunological infertility and of sensitivity to sperm it is necessary to characterize particular sperm antigens recognized by antibodies. For disintegration of sperm, sonication and chemical or related methods (detergents, benzalkonium chloride, urea, hypotonic shock) were used. The characterization was performed by SDS-electrophoresis followed by immunoblotting using IgG antibodies from 45 sera of infertile females. The serum of an eight-year-old girl was used as a negative control.

The use of Triton X-100 seems to be the best way for preparation of sperm protein extract. The interactions of serum IgG antibodies with 68 and 123 kDa sperm proteins were shown to be the most frequently recognized.