اندازه‌گیری و مقایسه غلظت پروتئین CD59 در پلاسمای منی مردان بارور و نابارور

محمود هاشمی‌تبار .M.Sc[☆]، عباس رضایی .Ph.D[★]، محمدحسین نصراصفهانی .Ph.D[★]
حمید بهرامیان .M.Sc[★]، فرزاد عریضی .M.Sc[★]

☆ دانشگاه علوم پزشکی اهواز، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح و جنین‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

★ گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

★ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

آدرس مکاتبه: اصفهان، صندوق پستی ۱۷۶-۸۱۷۴۴، دانشگاه علوم‌پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

هدف: اندازه‌گیری غلظت CD59 در پلاسمای منی افراد نرمال و مقایسه آن با گروههای استنواسپرمی، الیگواسپرمی و آزواسپرمی

مواد وروشها: مطابق استانداردهای WHO تعداد ۵۷ بیمار به گروههای طبیعی، استنواسپرمی، الیگواسپرمی و آزواسپرمی به ترتیب با تعداد ۸، ۲۱، ۱۶ و ۱۲ نفر تقسیم شدند. پس از جداکردن اسپرمها، برای اندازه‌گیری CD59 در پلاسمای منی از روش ساندویچ‌الایزا با تهیه دو آنتی‌بادی مونوکلونال یکی به عنوان تله ساز و دیگری آشکار ساز (Detection) و پروتئین CD59 در بین آن دو استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت CD59 در گروه طبیعی، استنواسپرمی، الیگواستنواسپرمی و آزواسپرمی به ترتیب (۲۲/۹۶±۹/۲۶)، (۲۰/۳۲±۷/۴۳)، (۲۸/۱۴±۶/۵۹)، (۳۳/۵۳±۴/۲۶) است. آزمون همبستگی پیرسون یک رابطهٔ خطی معکوس با ضریب ۵۸/۰- و P=0.000 بین غلظت CD59 و دانسیتهٔ اسپرم را نشان داد.

نتیجه‌گیری: مطالعات زمینه‌ای تا این تاریخ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در غلظت CD59 در پلاسمای منی گروههای مختلف طبیعی و غیرطبیعی گزارش نکرده است. در مطالعه حاضر در بین گروه الیگواسپرمی و آزواسپرمی با گروه طبیعی تفاوت معنی دار مشاهده شد. یک همبستگی منفی بین غلظت پروتئین و دانسیتهٔ اسپرم و همبستگی مثبت بین غلظت پروتئین و درصد زنده بودن اسپرم مشاهده شد.

کل واژگان: CD59، پروتئینهای تنظیم کننده کمپلمان، پلاسمای منی، روش ساندویچ الایزا

مقدمه

سیستم کمپلمان اولین سد دفاعی بدن علیه عوامل مهاجم و یک واسطه مهم واکنشهای التهابی است که از طریق مسیر کلاسیک و آلترناتیو فعال می‌شود. محصول نهایی آن C5b-9 یا کمپلکس حمله کننده به غشای MAC[1] است. این سیستم پس از شناسایی سلولها و میکروارگانیسمهای مهاجم، غشای سلول هدف را تخریب کرده و آن را از بین می‌برد (۱، ۲، ۳).

این سیستم با وجود تمام مزایایی که در راه دفاع از بدن ایفا می‌کند، در پاتوژنز بسیاری از بیماریهای اتوایمنی (۴، ۵) مانند گلومرولونفریت (۶)، انفارکتوسهای میوکارد (۷) و اختلالات بافت اسکلتال (۸) نقش دارند. همچنان که عده‌ای از محققین بر این باورند که این سیستم در پاتوژنز آسیبهای وارد به اسپرم به صورت الیگوزوسپرمی و آزواسپرمی (۹، ۱۰)، کاهش نقش فرآیند لقاح (۱۱) یا سقطهای متعدد (۱۲، ۱۳) نقش دارد.

CD59 یا پروتکتین یک گلیکوپروتئین به وزن ۲۱-۱۸ کیلو دالتون است که به شکل چسبیده به غشای سلولی در بافتهای مختلف بدن (۱۴، ۱۵) و به صورت محلول sCD59 در مایعات بدن مانند مایع منی (۱۶)، شیر، اشک، بزاق (۱۷)، ادرار (۱۸) و غیره وجود دارد. در شکل چسبیده مولکول گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI-anchor)[2] با لنگرانداختن به گروههای فسفات سطح غشای سلولی اتصال پیدا می‌کند؛ این پروتئین به طور متوسط به تعداد ۲۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ در سطح غشای اریتروسیتها بیان می‌شود (۱۷). CD59 یک پروتئین تنظیم کننده کمپلمان (CCP)[3] است که با ممانعت از اضافه شدن C8 و C9 به کمپلکس نهایی C5b-9 از تشکیل MAC جلوگیری می‌کند (۱۹، ۲۰). از این مکانیسم سلولهای طبیعی (۲۱)، سلولهای سرطانی (۲۲) و بعضی از ویروسها مانند HIV (۲۳) استفاده می‌کنند و خود را از اثرهای تخریبی سیستم کمپلمان حفظ می‌نمایند. اما اینکه چرا در بعضی از مکانها محافظت از کمپلمان با شکست روبرو می‌شود؛ نیاز به بحث فراوان دارد. با توجه به اثرهای مدولاتوری CD59 در تنظیم فعالیت کمپلمان به نظر می‌رسد که یک اختلال ژنتیکی یا اکتسابی در افزایش یا کاهش بیان پروتئین CD59 می‌تواند باعث بروز اختلال در فعالیت سیستم کمپلمان شود. این موضوع در بیماریهایی چون PNH[4] با عدم بیان پروتئین CD59 و DAF[5] (۲۴، ۲۵) یا در بیماریهای گلومرولونفریت با افزایش بیان CD59 اثبات شده است (۲۶).

در تحقیق حاضر با توجه به نقش CD59 در مهار سیستم کمپلمان و اینکه کاهش یا افزایش بیان این پروتئین منجر به اختلال در عملکرد سیستم کمپلمان می‌شود، غلظت آن در مایع منی گروههای مختلف طبیعی، استنواسپرمی، الیگواسپرمی و آزواسپرمی اندازه‌گیری شد و ارتباط غلظت آن با پارامترهای مؤثر در سلامت اسپرم مانند حرکت، درصد زنده بودن و دانسیتهٔ اسپرمها ارزیابی شد.

مواد و روشها

از بیماران مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان ۵۷ بیمار انتخاب و پس از شمارش تعداد اسپرمها به وسیلهٔ لام هموسیتومتر و اندازه‌گیری حرکت پیش روندهٔ رو به جلوی اسپرمها توسط دو نفر و انجام تست زنده بودن اسپرم (رنگ‌آمیزی ائوزن، نگروزین) مطابق استانداردهای WHO (۲۷) به گروههای زیر تقسیم شدند:

۱- ۸ نفر نرمواسپرمی با حرکت پیش رونده رو به جلو بیشتر از ۵۰ درصد و دانسیتهٔ بیشتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر

۲- ۲۱ نفراستنو اسپرمی با حرکت پیش رونده رو به جلو کمتر از ۵۰ درصد و دانسیتهٔ طبیعی

۳- ۱۶ نفرالیگواستنواسپرمی با حرکت پیش رونده رو به جلو کمتر از ۵۰ درصد و دانسیتهٔ کمتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر

۴- ۱۲ نمونه آزواسپرمی بدون اسپرم.

برای جداکردن پلاسمای منی، نمونه‌ها در دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و لایه رویی پلاسمای منی پس از قسمت‌بندی در °۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری CD59 در مایع منی به روش ساندویچ الایزا انجام شد:

۱- ظرف میکروپلیت ۹۶ خانه از شرکت NUNC توسط آنتی‌بادی منوکلونال mouse anti CD59 (mem43) از شرکت serotec به عنوان آنتی‌بادی تله انداز ۶ با غلظت ۲ µg/ml در بافر نمکی فسفات (pH=7.2, 0.015M) به مدت یک شب در درجه حرارت ۴° سانتی گراد کت شد.

۲- مکانهای خالی ظرف توسط یک درصد سرم آلبومین گاوی یا ۱۰ درصد شیربدون چربی به مدت دو ساعت و در °۳۷ سانتی‌گراد بلوک شدند.

۳- نمونه‌های آنتی ژنی به ۳ گروه کنترل مثبت (استاندارد)، کنترل منفی و نمونه آزمایشی (sample) تقسیم شدند. نمونه استاندارد در بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی اصفهان با غلظت ۳۵-۴۵ µg/ml و با استفاده از ستون سفاروز (فارماسیا) تهیه شد. نمونه‌های آزمایش از پلاسمای منی بیماران انتخاب شد و برای حذف مواد زاید در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس لایه رویی با نسبت ۱/۲۰ در PBS رقیق شد. برای نمونه کنترل منفی از Radit-anticomplemnt (بیوژن) استفاده شد. نمونه‌های آنتی ژنی به مدت دو ساعت و در شرایط °۳۷ سانتی‌گراد به ظرف حاوی آنتی‌بادی تله انداز اضافه شدند.

۴- آنتی بادی منوکلونال MAC(HRF20) از شرکت فارمیژن با غلظت ۲ µg/ml در PBS به عنوان آنتی‌بادی آشکارساز به مدت دو ساعت در شرایط °۳۷ سانتی گراد به ظرف حاوی آنتی‌بادی تله انداز و آنتی ژن اضافه شد.

۵- آنتی بادی goat anti-mouse HRP-conjogated از شرکت سیگما با غلظت ۲µg/ml در PBS به مدت دو ساعت در شرایط °۳۷ سانتی گراد به ظرف حاوی کمپلکس فوق اضافه شد.

1. Membrane Attack Complex
2. Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
3. Complement Control Protein
4. Paroxysmal Nactoral Hemoglobinuria
5. Decay Accelerating Factor
6. Capture

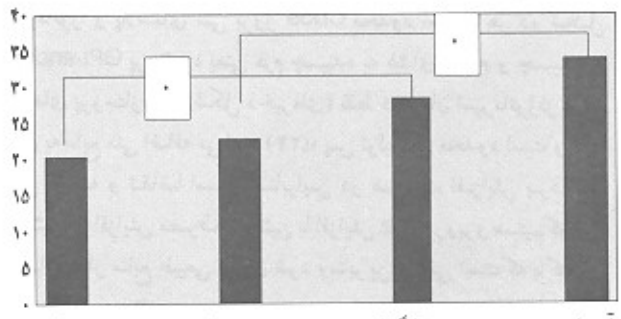
۶ـ بعد از هر مرحله از مراحل اول تا پنجم ۳ بار شستشو در 0.05 درصد PBS/tween هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

۷ـ سوبسترای OPD[1] از شرکت سیگما به اندازهٔ یک قرص ۲۰ میلی‌گرمی در ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سیترات (pH=5, 0.05M) استفاده و بلافاصله قبل از مصرف ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه شد. همانند مراحل ۶-۱ در این مرحله نیز ۱۰۰ µl/W محلول رنگی حداکثر به مدت ۱۵ دقیقه به‌کار گرفته شد. از اسید سولفوریک ۲/۵ مولار به میزان ۵ µl/W برای واکنش رنگی[2] استفاده و سپس با دستگاه ELISA Reader جذب نوری OD[3] هر یک از خانه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. در روشهای اندازه‌گیری CD59 کمپلکس HRP[4] یا با آنتی‌بادی آشکار ساز همراه است (۲۸) یا جنس آنتی بادیهای تله ساز مختلف انتخاب می‌شود و کمپلکس HRP با آنتی بادی نوع سومی علیه آنتی‌بادی آشکار ساز مثلاً خرگوش همراه می‌شود (۲۹). در مطالعه حاضر کمپلکس HRP با آنتی‌بادی goat anti-mouse همراه شد. آنتی بادی آشکار ساز و تله ساز هر دو از موش انتخاب شدند؛ بنابراین دائماً مقداری جذب نوری حتی در غیاب آنتی ژن یا در نمونه کنترل منفی وجود داشت که پس از کم کردن مقدار جذب نوری خانه‌هایی که فقط حاوی آنتی بادی تله‌ساز بودند، عدد به‌دست آمده (cut off) به عنوان OD نهایی برای محاسبهٔ غلظت CD59 و رسم منحنی نیمه لگاریتمی استفاده شد.

یافته‌ها

اندازه‌گیری CD59 با استفاده از روش ساندویچ الایزا انجام شد. در این روش دو آنتی بادی منوکلونال یکی به عنوان تله ساز و دیگری به عنوان آشکارساز و پروتئین CD59 در آن دو استفاده شد. نتایج غلظت CD59 در گروههای مختلف اسپرمی همراه با نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه در نمودار ۱ نشان داده شده است.

آنالیز واریانس یک‌طرفه دو سطح تفاوت را یکی در بین گروه آزواسپرمی با نرمواسپرمی و دیگری در بین گروه الیگواسپرمی با استنواسپرمی نشان می‌دهد ($P<0.05$).

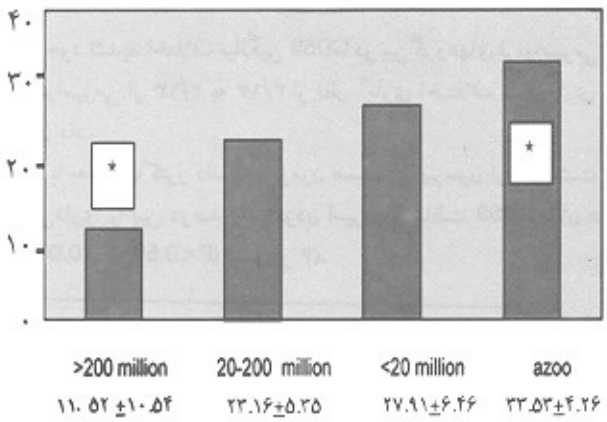


۳۳.۵۳±۴.۲۸ ۲۸.۱۴±۶.۱۴ ۲۲.۹۶±۹.۲۶ ۲۰.۳۲±۷.۴۳

نمودار ۱: مقایسه غلظت CD59 بین گروههای طبیعی، استنو، الیگواستنو و آزواسپرمی

اعداد پائین نمودار: Mean±SD *: $P<0.05$

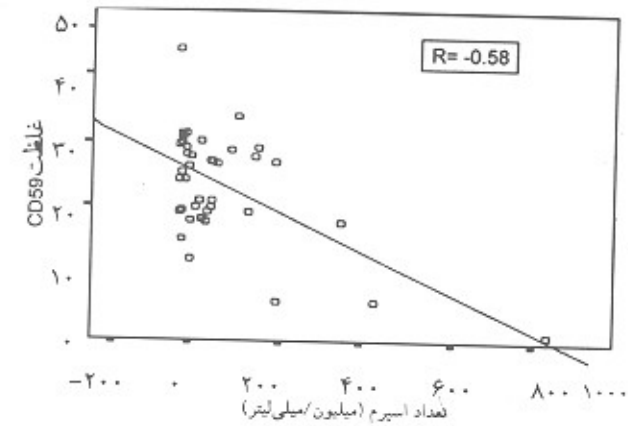
تفاوت گروه آزواسپرمی با گروه طبیعی ما را بر آن داشت که شاید فاکتور تعداد اسپرم یا دانسیته، عامل اصلی تفاوت غلظت CD59 باشد. بنابراین گروههای مختلف اسپرمی از نظر تعداد اسپرم به ۴ دسته تقسیم شدند. آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری را در بین گروههای مختلف اسپرمی از نظر تعداد نشان داد ($P<0.05$) (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه غلظت CD59 در گروههای با شمارش اسپرمی مختلف

اعداد پائین نمودار: Mean±SD *: $P<0.05$

گروه با دانسیته صفر بیشترین غلظت CD59 و گروه با دانسیتهٔ بیش از ۲۰۰ میلیون در هر میلی‌لیتر با کمترین غلظت تفاوت معنی‌دار را با دیگر گروهها نشان داد. نتایج آزمون همبستگی پیرسون نیز ارتباط معنی‌دار و معکوسی را بین دانسیته اسپرم و غلظت CD59 نشان داد ($r= -0.58$, $P=0.000$)؛ بدین معنی که با کاهش دانسیته اسپرم غلظت CD59 افزایش می‌یابد و بر عکس (نمودار ۳).



نمودار ۳: پراکندگی غلظت CD59 بین گروههای اسپرمی با دانسیته مختلف

این یافته‌ها ما را بر آن داشت تا تأثیر فاکتور حرکت را با غلظت CD59 با حذف متغیر دانسیته بررسی کنیم (جدول ۱).

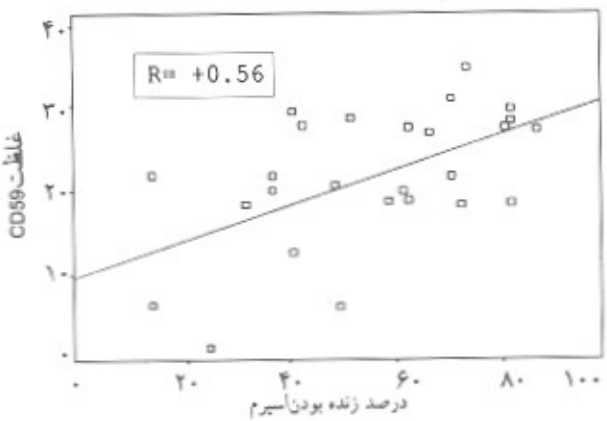
1. Optical Path Difference
2. Stopper
3. Optical Density
4. Horse Radish Peroxidase

جدول ۵: غلظت CD59 بین گروه نرمواسپرمی و استنواسپرمی با تفکیک گروههای مختلف شمارش اسپرمی

گروه	بیش‌از ۲۰۰میلیون اسپرم(CD59)	کمتر از ۲۰۰میلیون‌اسپرم(CD59)
نرمواسپرمی	۲۲/۹ (۷ مورد)	۲۵/۵۸ (۵ مورد)
استنواسپرمی	۲۰/۳۲ (۲۱ مورد)	۲۲/۴۵ (۱۷ مورد)

با وجود تشدید اختلاف میانگین CD59 در بین گروههای نرمواسپرمی و استنواسپرمی از ۲/۶۳ به ۳/۱۳ از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

با حذف فاکتور دانسیته، آزمون همبستگی پیرسون ارتباط مثبت و معنی‌داری را بین درصد زنده بودن اسپرمهاو غلظت CD59 نشان داد ($P<0.56$, $P<0.003$) (نمودار ۴).



نمودار ۴: پراکندگی غلظت CD59 با درصد زنده بودن اسپرم

بحث

این تحقیق بیانگر آن است که غلظت CD59 در مایع منی گروههای مختلف با روش ساندویچ الایزا حتی در صورتی که فقط دو نوع آنتی‌بادی غیر کونژوگه علیه CD59 وجود داشته باشد نیز قابل اندازه گیری است.

برای اولین بار Atkinsos و Rooney نشان دادند که سمینال پلاسما حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای از وزیکولهای خارج سلولی به نام پروستازوم است. CD59 دارای یک محل اختصاصی (GPI-anchor) است که باعث می‌شود این پروتئین به گروههای فسفات سطح غشای پروستازوم یا غشای اسپرم متصل شود (۳۰).

Rooney و همکاران با جدا کردن پروستازومها در دور ۲۰۰۰۰۰g نشان دادند که تیمار کردن سلولها در محیط کشت با پروستازومها سبب برداشت این پروتئین می‌شود (۲۹). در این تحقیق نیز یک همبستگی خطی معکوس بین تعداد اسپرماتوزا و غلظت پروتئین از پلاسمای منی است. گروههای فسفات غشای خارجی اسپرمها با ایفای یک نقش حاملی[1] و یا باند شدن با محلهای اختصاصی مولکول GPI روی CD59 سبب برداشت پروتئین از پلاسمای منی می‌شوند. بنابراین در این مطالعه گروه آزواسپرمی بیشترین و گروه با بیش از ۲۰۰ میلیون در میلی‌لیتر اسپرم کمترین غلظت CD59 را نشان داد. این برداشت پروتئینی را می‌توان با یک مکانیسم فسفولیپازی توجیه کرد.

Rooney غلظت CD59 را بین ۱۰ فرد طبیعی و ۱۰ فرد وازکتومی اندازه گیری کرد و نشان داد که میانگین غلظت CD59 در گروه طبیعی ۲۶/۸ µg/ml و در افراد وازکتومی ۱۴/۷ µg/ml است (۲۹). وی چنین نتیجه گیری کرد که بر خلاف اعتقاد سنتی اشتقاق پروستازومها از پروستات، CD59 و پروستازومها که منبع ذخیره کننده پروتئینهای تنظیم کننده کمپلمان هستند، از مکانهایی پایین‌تر یا بالاتر از محل انسداد مجرا یعنی از پروستات و بیضه هر دو مشتق می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. بدین ترتیب که افزایش معنی‌دار غلظت پروتئین در گروه آزواسپرمی نسبت به گروه طبیعی احتمالاً بیان کننده این واقعیت است که اهمیت مجاری نزدیک به بیضه بیش از مجاری نزدیک به پروستات است.

Rooney همچنین نشان داد که در لایهٔ رویی فاقد پروستازومها (NPF)[2] شکل محلول sCD59 وجود دارد. یعنی با وجود حذف پروستازومها در دور ۲۰۰۰۰۰g، مقداری CD59 در این لایه آشکار شده است که محلهای اختصاصی GPI این پروتئینها با یکدیگر باند شده و میسل می‌دهند و لذا بدون چسبندگی با پروستازومها یا سطح غشای سلولی به صورت آزاد در مایع منی وجود دارد.

Zhang و همکارانش نشان دادند که در شکل محلول sCD59 می‌توان با حذف محل اختصاصی مولکول (GPI) قدرت چسبندگی به غشای سلول را از پروتئین گرفت. اما این پروتئین با وجود داشتن محل فعال مهارکنندگی در ساختمان خود این خاصیت را در محیط *in vitro* کمتر از نوع GPI-anchor نشان می‌دهد. در مورد خاصیت مهارکنندگی شکل محلول sCD59 در محیط *in vitro* هنوز تحقیق چندانی صورت نگرفته است. آنها چنین نتیجه گرفته‌اند که ضروری است پروتئین CD59 در محل ضایعه باند شود تا قدرت مهارکنندگی خود را نشان دهد (۲۱).

Brasovenu و همکاران نشان دادند که سلولهای ملانوما ذاتاً شکل محلول sCD59 را به داخل محیط کشت، آزاد می‌سازند و بدین ترتیب می‌توانند خود را از اثرهای تخریبی کمپلمان حفظ کنند (۲۲). در مورد اسپرماتوزا و پلاسمای منی بروز CD59 محدود است . هر دو شکل GPI-anchor پروتئین، یعنی فرم چسبیده به غشای اسپرم و چسبیده به دانه‌های پروستازومی (شکل ذخیره‌ای) فقط در زمان اسپرماتورژنز یا در انزال به مایع منی اضافه می‌شود (۲۲)؛ پس تولید آن محدود است و تابع اصل عرضه و تقاضا است . بنابراین در صورت افزایش برداشت پروتئین یا افزایش مصرف پروتئین با افزایش تقاضا روبرو هستیم که این تقاضا باید از منابع طبیعی جبران شود وبنابراین منطقی است که با کاهش منابع طبیعی پروتئین روبرو شویم.

بهترین مدل افزایش برداشت مربوط به گروه هیپراسپرمی است. CD59 به دلیل GPI-anchor بودن به راحتی از سطح پروستازومها

1. Carrier
2. Non-Prostasomal Fraction

کنده شده و روی غشای اسپرمها می‌نشیند. بنابراین افزایش تعداد اسپرمها به معنی افزایش تعداد حاملها باعث کاهش شدید منابع ذخیره‌ای CD59 می‌شود. در این مطالعه نیز ارتباط معنی‌دار و معکوس بین غلظت پروتئین و تعداد اسپرمها به دست آمد.

مدل مناسب افزایش مصرف را باید به گروه استنواسپرمی استناد داد. در این مطالعه به دلیل همبستگی شدید سطح غلظت پروتئین با دانسیته اسپرم رابطه معنی‌داری بین غلظت پروتئین و حرکت رو به جلوی اسپرم به دست نیامد. اما با حذف فاکتور دانسیته اسپرم اختلاف غلظت CD59 بین گروه طبیعی و استنو بیشتر شد، اگر چه این اختلاف باز هم معنی‌دار نشد. اما افزایش اختلاف میانگین غلظت CD59 پس از حذف فاکتور دانسیته به معنی مصرف بیشتر گروه استنواسپرمی از منابع ذخیره پروستازومی است. به اعتقاد ما گروه استنواسپرمی در مقایسه با گروه طبیعی برای خنثی کردن اثرهای تخریبی سیستم کمپلمان در سطح غشای سلولی شدیداً به پروتئینهای تنظیم کننده کمپلمان نیاز دارد. بنابراین افزایش مصرف پروتئین در سطح غشای اسپرم باعث کاهش منابع ذخیره آن در مایع منی می‌شود که به هر حال نیاز به بررسی بیشتر دارد.

نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش غلظت پروتئین CD59 با کاهش درصد زنده بودن اسپرمها ارتباط معنی‌دار و مستقیم دارد. به اعتقاد ما عواملی مانند افزایش برداشت در گروه هیپراسپرمی و افزایش مصرف در گروه استنواسپرمی که باعث کاهش منابع ذخیره‌ای CD59 می‌شوند، در افزایش مرگ و میر اسپرمها نیز نقش دارند. بنابراین با توجه به محدود بودن غلظت CD59، نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که مقدار این پروتئین شدیداً به غلظت اسپرم وابسته است. در گروههای هیپراسپرمی و استنواسپرمی سلامت اسپرمها به دلیل تقلیل منابع ذخیره‌ای CD59 در نتیجه افزایش حملات تخریبی بر سیستم کمپلمان اثر می‌گذارد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۶۲۸۹ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که در مرکز باروری و ناباروری اصفهان و بخش ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد. نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر خود را از همکارانی که به نحوی ما را در این تحقیق یاری کردند، ابراز می‌دارند.

References

1. Liszewski MK, Atkinson JP: Membrane cofactor protein (MCP; CD46): Isoforms differ in protection againts the classical pathway of complement. J Immunol 1996; 156: 4415-4421

2. Gerard C, Gerard NP: C5a anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. Annu Rev Immunol 1994; 12: 775-808

3. Muller-Eberhard HJ: Molecular organization and function of the complement system. Annu Rev Biochem 1998; 57: 321-347

4. Wuerzner R, Dierich MP: Complement in human disease. Immunol Today 1997; 18: 460-463

5. Savvas C, Makrides: Therapeutic inhibition of the complement system. Pharmacol Rev 1998; 50: 59-88

6. Quigg RJ, Kozono Y, Bertiaume D, Lim A, Salant DJ, Weinfeld A, Griffin P, Kremmer E, Holers VM: Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with crry-Ig, a soluble murine complement inhibitor. J Immunol 1998; 160; 4553-4560

7. Moran P, Beasley H, Gorrell A, Martin E, Gribling P, Fuchs H, Gillett, Burton LE, Caras IW: Human recombinant soluble dacey acceleration factor inhibits complement activation in vitro and in vivo. J Immunol 1992; 149: 1763-1743

8. Weiser MR, Williams JP, Moore FD Jr, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, Carroll MC: Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibudy and complement. J Exp Med 1996; 183: 2343-2348

9. Osmond J, D´Cruz GG, Hass JR, Wang B, Debault LE: Activation of human complement by IgG antisperm antibady and the demonstration of C3 and C5b-9 Mediated injury to human sperm. J Immunol 1991; 146: 611-620

10. Bozas SE, Kirszbaum L, Sparrow RL, Walker ID: Several vascular complement inhibitors are present on human sperm. Biol Reprod 1993; 48: 503-511

11. Anderson DJ, Abbott AF, Jack RM: The role of component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10051-10055

12. Taylor CT, Johnson PM: Complement-binding proteins strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as gametes. Mol Hum Reprod 1996; 2: 52-59

13. Verlinsky Y, Morozov G, verlinsky O, Koukharenko V, Rechitsky S, Goltsman E, Ivakhnenko Z, Gindilis V, Strom CM, Kuliev A: Isolation of cDNA libraries from individual human preimplantation embryos. Mol Hum Reprod 1998; 4: 571-575

14. Meri S, Waldmann H, Lachmann PJ: Distridution on of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. Lab Invest 1991; 65(5): 532-537

15. Nose M, Katoh M, Okada N, Kuogoku M, Okada H: Tissue distribution of HRF20, a novel factor preventing

the membrane attack of homologus complement, and its predominant expression on endothelial cells in vivo. Immunology 1990; 70: 145-151
16. Rooney IA, Davies A, Morgan BP: Membrane attack complex (MAc) mediated damage to spermatozoa: protection of the cells by presence on their membranes of MAC inhibitory proteins. Immunology 1992; 75: 499-503
17. Meri S, Mattila P, Renkonen R: Regulation of CD59 expression on the human endothelial cell line EA. Eur J Immunol 1993; 23: 2511-2516
18. Davies A, Simmons DL, Hale G, Harrison RA, Tighe H, Lachmann PJ, Waldmann H: CD59, an Ly-6 protein expresed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex of homologous cells. J Exp Med 1989; 170: 637-654
19. Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ: Human protectin (CD59): An 18000-20000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. Immunology 1990; 71: 1-9
20. Rollins SA, Zhao JI, Ninomiya H, Sims PJ: Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. J Immunol 1991; 146: 2345-2351
21. Hui-fen Zhang, Jinghua YU, Ednan B, Morrison L, Sheria L: Targeting of funectional antibody-CD59 fusion proteins to a cell surface. J Clin Invest 1999; 103(1): 55-61
22. Brasoveanu LI, Fonsatti E, Visintin A, Pavlovic M, Cattarossi I, Colizzi F, Gasparollo A, Coral S, Horejsi V, Altomont M, Maio M: Melanoma cells constitutively release an anchor-positivie soluble from of protectin (sCD59) that retains functional from activities in homolegous complement-mediated cytotoxity. J Clin Invest 1997; 100(5): 1248-1255
23. Rooney IA, Atkinson JP: Role virion-associated glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) protein CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-drived and primary isolated of HIV-1. J Exp Med 1995; 182(2): 501-509
24. Okada N, Harada R, Fujita T, Okada H: Monoclonal antibodies capable of causing hemolysis of neuraminidase-treated human erythrocytes by homologous complement. J Immunol 1989; 143: 2262-2266
25. Rother RP: Expression of recombinant transmembrane CD59 in paroxysmal Nocturnal Hemogolobinuria B cells confers ressistance to humane complement. Blood 1994; 84(8): 2604-2611
26. Nangaku M, Meek RL, Pippin J, Gordon KL, Morgon BP, Johnson RJ, Cowser WG: Transfected CD59 protects mesangial cells from injury induced by antibody and complement. Kidney Int 1996; 50: 257-299
27. World Health organization WHO laboratory manual for the examination of semen and sperm-cervical mucus intraction. Third edition, Cambridge University press 1992
28. Mclaughline PJ, Moiland SJ, Taylor CT, Olah KC, Lewis DL, Jones DL, Hara T, Seya T, Johnson PM: Soluble CD46 (membrane cofactor protecnic, MCP) in human reproductive tract fluids. J Reprod Immunol 1996; 31: 209-219
29. Rooney IA, Heuser JE, Atkinson JP: GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma. J Clin Invest 1996; 97(7): 1675-1686
30. Rooney IA, Atkinson JP, Krull ES, Schonfeld G, Plakoski K, Saffitz JE, Morgan BP: Physiological relevance of membrane attack complex inhibitory protein CD59 in human seminal plasma: CD59 is present on extracellular organelles (prostasome), bind cell membranes, and inhibits complement mediated lysis. J Exp Med 1993; 177: 1409-1413
31. Simpsone, CH. Holmes: Differential expression of complement reguletory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. Immunulogy 1994; 81: 452-461
32. 54- Masahide Tone High Level Transcription of the complement Regulatory protein CD59 Reguires an Enhancer Located in Intron 1. J Biol Chem 1999 27(2): 710-716