

EWA MARIA KRATZ¹, MAŁGORZATA PUPEK¹, ANNA CHEŁMOŃSKA-SOYT²,
IWONA KĄTNIK-PRASTOWSKA¹

Formy molekularne immunoglobuliny A w plazmie nasienia ludzkiego

The Molecular Forms of Immunoglobulin A in Human Seminal Plasma

¹ Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii AM we Wrocławiu

² Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Wydzielnicza immunoglobulina A (sIgA) stanowi pierwszą linię immunologicznej obrony na powierzchniach błon śluzowych dróg moczowo-płciowych przeciw patogenom oraz wydzielanym przez nie toksynom. W plazmie nasienia ludzkiego, obok sIgA i IgA, jest obecna także wolna cząstka wydzielnicza (SC). W wydzielinach dróg moczowo-płciowych obserwuje się wyraźną przewagę ilościową podklasy IgA2, która jest bardziej odporna od IgA1 na działanie wielu proteaz bakteryjnych, co powoduje wzmocnienie właściwości obronnych przeciwciał IgA.

Cel pracy. Celem pracy było określenie zależności między wartościami stężeń IgA, sIgA oraz IgA1 w plazmach nasienia ludzkiego, pochodzących od mężczyzn żyjących w bezpotomnych związkach, analizowanych w wyodrębnionych grupach na podstawie standardowego badania nasienia. Postanowiono sprawdzić, czy w badanych grupach plazm nasienia jest obecna wolna komponenta wydzielnicza oraz czy jej występowanie jest związane z wynikami standardowej oceny nasienia.

Materiał i metody. Ejakulatory (98 prób) pochodziły od mężczyzn w wieku 20–45 lat pozostających w bezpotomnych związkach. Po upłynięciu ejakulatów wykonano standardowe badanie nasienia, na podstawie którego wyodrębniono następujące grupy: normozoospermiczną (N), astenozoospermiczną (A), azoospermiczną (Az), oligozoospermiczną (O), teratozoospermiczną (T), astenoteratozoospermiczną (AT), oligoteratozoospermiczną (OT) oraz oligoastenoteratozoospermiczną (OAT). Stężenia różnych form molekularnych IgA oznaczono stosując immunoenzymatyczną metodę fazy stałej (ELISA), wiążąc z fazą stałą przeciwciała monoklonalne rozpoznające formę monomeryczną IgA, wydzielniczą IgA oraz podklasę IgA1. Rozkład pasm odpowiadających formom molekularnym sIgA sprawdzono w immunoblotingu, stosując swoiste przeciwciała monoklonalne anty-ludzka SC (IgA).

Wyniki. Wykazano, że wartości stężeń IgA, sIgA i IgA1 oraz procentowe udziały poszczególnych form molekularnych immunoglobuliny A, a także obecność wolnej cząstki wydzielniczej w plazmach nasienia ludzkiego są niezależne od wyników standardowej oceny nasienia. Dodatkowo stwierdzono, że w plazmie nasienia ludzkiego, obok natywnej formy sIgA, są obecne produkty jej degradacji, których skład pod względem ilościowym i jakościowym wydaje się związany z parametrami charakteryzującymi plemniki. Wyraźnie mniejszą ilość produktów degradacji sIgA obserwowano w plazmie nasienia mężczyzn z udowodnioną płodnością w porównaniu do liczby pasm występujących u pacjentów żyjących w bezpotomnych związkach.

Wnioski. Analiza stężeń form molekularnych IgA oraz identyfikacja frakcji sIgA reagujących ze swoistym przeciwciałem monoklonalnym mogą być wstępnymi oznaczeniami mającymi na celu ukierunkowanie dalszej diagnostyki męskiej niepłodności (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 4, 541–547).

Słowa kluczowe: immunoglobulina A, cząstka wydzielnicza SC, niepłodność męska.

Abstract

Background. The secretory immunoglobulin A (sIgA) is known to participate in the first line of immunological defense of genitourinary tract mucous membrane surface. In human seminal plasma apart from secretory IgA and IgA, the free secretory component (SC) has been found. In genitourinary tract secretions dominate the IgA2 subclass, which is more resistant than IgA1 to degradation by bacteria proteases, which render the properties of IgA.

Objectives. The purpose of the study was to determine the correlations between IgA, sIgA and IgA1 concentrations in human seminal plasmas of men living in infertile couples, which were investigated in groups separated on the basis of standard semen analysis. The seminal plasma free secretory component was characterized in relation to the results of standard semen analysis.

Material and Methods. Ejaculates (98 samples) were collected from 20–45 years old men living in infertile couples. After liquefaction of ejaculate, the standard semen analysis was done, which made possible to define the following groups: normozoospermic (N), asthenozoospermic (A), azoospermic (Az), oligozoospermic (O), theratozoospermic (T), asthenotheratozoospermic (AT), oligotheratozoospermic (OT) and oligoasthenotheratozoospermic (OAT). The concentrations of various molecular forms of IgA, were determined by the immunoenzymatic solid phase method (ELISA), using microtiter plate coated with the monoclonal antibodies specific either to: monomer of IgA or secretory IgA or IgA1 subclass. The pattern of molecular forms of sIgA was checked in immunoblotting using monoclonal antibodies with specificity to anti-human SC (IgA).

Results. The investigations have shown that the concentrations of IgA, sIgA and IgA1 subclass, and the percentage of the relative participation of IgA molecular forms, as well as the free secretory component present in human seminal plasma, were not dependent on the results of standard semen analysis. Additionally, the authors have found, that in human seminal plasma besides native form of sIgA, the products of sIgA degradation were present and their quantitative and qualitative composition seem to be correlated with sperm parameters. The lower number of sIgA degradation products in seminal plasma of man with documented fertility was observed in comparison with the pattern of patients living in infertile couples.

Conclusions. Analysis of the concentrations of the molecular IgA forms and the identification of immunopatterns of sIgA recognized with specific monoclonal antibody, may serve as preliminary stage for further diagnostics of male infertility (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 4, 541–547).

Key words: immunoglobulin A, secretory component SC, male infertility.

Z immunologicznego punktu widzenia plazma nasienia spełnia podwójną rolę: chroni męskie komórki rozrodcze przed zakażeniem oraz hamuje odpowiedź immunologiczną przeciwko plemnikom (jako auto- i alloantygenom) w męskim i żeńskim narządzie rozrodczym, tym samym zapewniając optymalne warunki do zapłodnienia. Działanie immunosupresyjne plazmy nasienia jest możliwe dzięki wzajemnemu oddziaływaniu obecnych w nasieniu czynników aktywnych biologicznie, takich, jak: cytokiny, prostaglandyny, różne hormony białkowe oraz inne peptydy, enzymy, a także steroidy. Dodatkowo plemniki i leukocyty plazmy nasienia wytwarzają reaktywne cząsteczki tlenu, co daje początek reakcjom biologicznym, takim, jak reakcja akrosomalna i hiperaktywacja plemników [1].

W ludzkiej fizjologicznej plazmie nasienia są obecne immunoglobuliny dwóch głównych klas: IgG i IgA, których stężenie jest wielokrotnie niższe niż w osoczu krwi. Stężenia IgA oznaczone przez Fowlera i Mariano [2] w plazmach nasienia mężczyzn płodnych ($4,9 \pm 2,2$ mg/l) i bezpłodnych ($10,5 \pm 12,2$ mg/l) są znacznie niższe w porównaniu do średnich wartości stężeń IgA w płynach pochodzących z gruczołu krokowego zdrowych mężczyzn (39 ± 42 mg/l). Stężenie IgG w fizjologicznej plazmie nasienia wynosi $27,4 \pm 17,9$ mg/l i wzrasta przy braku plemników w ejakulacie oraz w stanach zapalnych w obrębie męskich narządów rozrodczych. Immunoglobulinę M wykryto w 13% plazm nasienia ($0,9 \pm 0,1$ mg/l) pochodzących od mężczyzn płodnych, u mężczyzn bezpłodnych natomiast wykrywalność IgM wzrasta do 21%, a w grupie pacjentów z azoospermią nawet do 100% [2, 3].

W surowicy krwi IgA występuje głównie w formie monomeru (7S), a w znacznej części płynów wydzielniczych, takich, jak: łzy, pot, siara, mleko, wydzieliny gruczołów przewodu pokarmo-

wego, dróg oddechowych i moczowo-płciowych, jest przede wszystkim obecna dimeryczna forma IgA (11S) z przyłączoną komponentą wydzielniczą. Dimeryczna cząsteczka IgA oraz łańcuch J są produktami komórek plazmatycznych otaczających gruczoły śluzowe, a komponenta wydzielnicza (SC) o masie cząsteczkowej 83 kDa (będąca fragmentem receptora pIgR) jest dołączana podczas transportu immunoglobuliny przez komórki nabłonkowe [4, 5].

Wydzielnicza IgA (sIgA) jest głównym elementem obrony błon śluzowych przed drobnoustrojami, a błony te są potencjalnie największymi wrotami zakażenia. Cząsteczka wydzielnicza SC może występować w wydzielinach nie tylko jako składnik wydzielniczej immunoglobuliny A, ale również w postaci wolnej [6]. Najważniejszą rolę cząsteczki wydzielniczej SC jest transport polimerycznej IgA przez nabłonek do wydzielin błon śluzowo-surowiczych, a także ochrona tych immunoglobulin przed proteolityczną degradacją. Wolna SC, obecna w wydzielinach, ogranicza ponadto przyleganie do komórek nabłonkowych gospodarza szczepów *Escherichia coli* [7] oraz ich toksycznych produktów [8], przez co zapobiega chorobotwórczemu działaniu drobnoustrojów.

W ludzkiej surowicy krwi występują obydwie podklasy IgA: immunoglobulina A1 (IgA1; 75–93% całkowitej zawartości IgA) oraz immunoglobulina A2 (IgA2). Zwiększone stężenie IgA1, w porównaniu do stężenia IgA2, jest obserwowane w wydzielinach (59–74% całkowitego stężenia IgA) w górnych drogach oddechowych i w odcinkach bliższych przewodu pokarmowego, odwrotna proporcja natomiast występuje w wydzielinach wewnętrznych i drogach moczowo-płciowych [4].

Celem niniejszej pracy było określenie zależności między wartościami stężeń IgA, sIgA oraz

IgA1 w plazmach nasienia ludzkiego, pochodzących od mężczyzn żyjących w bezpotomnych związkach, analizowanych w grupach wyodrębnionych na podstawie standardowego badania nasienia. W immunoblotingu z użyciem przeciwciał monoklonalnych swoistych wobec komponenty wydzielniczej SC (IgA) wykazano obecność wolnej komponenty wydzielniczej we wszystkich grupach plazm nasienia, niezależnie od wyników standardowej oceny nasienia. Dodatkowo określono immunoelektroforetyczny rozkład frakcji wydzielniczej IgA w ludzkiej plazmie nasienia i na tej podstawie dokonano porównania obrazów uzyskanych pasm między grupą normozoospermiczną a grupami o nieprawidłowych parametrach nasienia.

Materiał i metody

Ejakulatory (98 prób) pochodziły od mężczyzn w wieku 20–45 lat pozostających w bezpotomnych związkach. Materiał zebrano w Pracowni Preparatyki i Oceny Nasienia we Wrocławiu. Przed badaniem laboratoryjnym pacjenci byli zobowiązani do wstrzemięźliwości seksualnej przez 3–7 dni. Nasienie uzyskane w wyniku masturbacji zbierano do sterylnych pojemników. Ejakulatory inkubowano w temperaturze 37°C przez 30–60 min w celu upłynnienia, a następnie wykonano standardowe badanie nasienia według zaleceń WHO z 1992 r. [9]. Plazmę nasienia otrzymano przez odwirowanie ejakulatu przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy 3500 × g. Uzyskaną plazmę nasienia podzielono na mniejsze porcje i zamrożono w temperaturze –70°C. Na podstawie standardowego badania nasienia, uzyskany materiał podzielono na grupy, zgodnie z kryteriami WHO [9]: normozoospermiczną (N; n = 16; ejakulat prawidłowy: ≥ 50% plemników w ruchu prawidłowym postępowym w badaniu wykonanym w ciągu godziny po ejakulacji, ≥ 20 mln plemników w mililitrze), astenozoospermiczną (A; n = 4; w ejakulacie < 50% plemników w ruchu prawidłowym postępowym), azoospermiczną (Az; n = 2; brak plemników w ejakulacie), oligozoospermiczną (O; n = 2; liczba plemników < 20 × 10⁶/ml), teratozoospermiczną (T; n = 32; < 30% plemników o prawidłowej morfologii) oraz grupy o mieszanych nieprawidłowościach: astenoteratozoospermiczną (AT; n = 4); oligoteratozoospermiczną (OT; n = 12); oligoastenoteratozoospermiczną (OAT; n = 28). Do analizy immunoelektroforetycznej połączono jednakowe objętości plazm nasienia w obrębie wybranych grup, wyodrębnionych na podstawie standardowego badania nasienia, tworząc pule plazm nasienia, odpowiednio w grupach: N, n = 11; A, n = 4; T, n = 26; AT, n = 3; OT, n = 10; OAT, n = 17.

W plazmie nasienia stężenie immunoglobuliny A, wydzielniczej IgA oraz IgA1 oznaczono testem immunoenzymatycznym ELISA, wiążąc z fazą stałą mikropłytki (Maxisorb: Nalge Nunc International, USA) swoiste przeciwciała monoklonalne, odpowiednio: anty-ludzka IgA (Sigma, St. Louis, MO, USA), swoista wobec łańcucha ciężkiego α (1:5000 w PBS; pH 7,3); anty-ludzka komponenta wydzielnicza IgA (Sigma, St. Louis, MO, USA), swoista wobec cząsteczki wydzielniczej SC (1 : 20000 w PBS; pH 7,3); anty-ludzka IgA1 (Chemicon International Inc.), swoiste wobec regionu Fc IgA1 (1 : 500 w Tris-HCl; pH 7,5). Krzywe standardowe wykreślono na podstawie użytych w teście preparatów: ludzkiej IgA (Sigma, St. Louis, MO, USA) i ludzkiej sIgA (Sigma, St. Louis, MO, USA), izolowanych z siary oraz ludzkiej IgA1 (Chemicon International Inc.) pochodzącej z surowicy szpiczakowej, odpowiednio w zakresach wartości stężeń: 0,025–0,25 mg/l dla IgA i sIgA oraz 0,0625–0,5 mg/l dla IgA1. W następnym etapie testu ELISA użyto króliczych przeciwciał poliklonalnych anty-ludzka IgA (Dakopatts, Glostrup, Denmark; 1 : 100000 dla IgA i sIgA oraz 1 : 5000 dla IgA1) i kozich przeciwciał poliklonalnych anty-królicza IgG-HRP (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1 : 10000 dla IgA i sIgA oraz 1 : 5000 dla IgA1). Uzyskane wartości absorbancji odczytano na aparacie Stat Fax-2100, przy λ = 492 nm, stosując filtr referencyjny przy λ = 630 nm.

W warunkach nieredukujących zdenaturowano (5 min, 100°C) odpowiednie objętości: badanych plazm nasienia, zawierających 250 ng IgA; 2 μg standardu sIgA (ICN Biomedicals, Inc., USA) oraz 10 μg ludzkiej haptoglobiny (Hp) typu 2–1, wypreparowanej w Katedrze Chemii i Immunochemii AM we Wrocławiu [10]. Następnie przeprowadzono elektroforezę SDS-PAGE w systemie nieciągłym według Laemmliego [11], w buforze Tris/glicyna, pH 8,6, stosując gradient żelu rozdzielającego o gęstości 4–16%. Następnie wykonano immunobloting pozwalający na wykrycie odpowiednich form molekularnych w reakcji: mysie przeciwciała monoklonalne – anty-ludzka komponenta wydzielnicza (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1 : 1000) oraz kozie przeciwciała poliklonalne anty-mysia IgG-HRP (Sigma, St. Louis, MO, USA; 1 : 2000). Do oszacowania mas cząsteczkowych rozdzielonych form molekularnych sIgA, jako standardów użyto mas niezredukowanej ludzkiej Hp typu 2–1, która tworzy polimery o ściśle określonych masach, m.in.: 107, 162, 217, 274, 311 kDa [12] oraz następujące preparaty handlowe: bydlęcą albuminę (67 kDa), owoalbuminę (45 kDa) i chymotrypsynogen (25 kDa) (Protein Molecular Weight Standards, Kit MS II: Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany).

Analizę statystyczną wykonano stosując program statystyczny STATISTICA 6.0. W celu określenia różnic istotnych statystycznie zastosowano test Manna-Whitneya, korelacje natomiast analizowano według testu Spearmana. Za istotne statystycznie przyjęto różnice, dla których współczynnik istotności $p < 0,05$.

Wyniki

W tabeli 1 podano wartości stężeń IgA, sIgA i IgA1 w grupach plazm nasienia wyodrębnionych na podstawie standardowego badania nasienia: normozoospermicznej (N), astenozoospermicznej (A), azoospermicznej (Az), oligozoospermicznej (O), teratozoospermicznej (T), astenoteratozoospermicznej (AT), oligoteratozoospermicznej (OT) oraz oligoastenoteratozoospermicznej (OAT). W grupie normozoospermicznej, średnie wartości stężeń IgA, sIgA oraz IgA1 wynosiły odpowiednio: $3,2 \pm 2,1$ mg/l; $29,6 \pm 36,4$ mg/l; $12,8 \pm 18,2$ mg/l. Średnie wartości stężeń IgA, sIgA i IgA1 kształtują się na podobnym poziomie w grupach o nieprawidłowych parametrach nasienia, a obserwowane różnice w wartościach średnich nie były istotne statystycznie (tab. 1). Z danych w tabeli 1 wynika, że procentowy udział zarówno sIgA, jak i IgA1 w sumarycznej wartości stężeń IgA oraz sIgA (IgA + sIgA) wynosił dla sIgA średnio około 85%, a dla IgA1 około 40%.

Analiza statystyczna z zastosowaniem testu korelacji według Spearmana wykazała, że istnieje wysoka korelacja między stężeniem IgA a stężeniem sIgA ($r = 0,68$; $p = 0,005$) oraz między stężeniem IgA1 a stężeniami: IgA ($r = 0,55$; $p = 0,0000$) oraz sIgA ($r = 0,63$; $p = 0,0000$).

Na rycinie 1 przedstawiono uzyskany w immunoblotingu obraz frakcji molekularnych immunoglobuliny A obecnej w plazmie nasienia w wybranych grupach, zróżnicowanych pod względem wyników standardowego badania nasienia. Główne pasmo, odpowiadające natywnej cząsteczce sIgA (masa cząsteczkowa około 390 kDa), było obecne we wszystkich badanych grupach plazm nasienia z wyjątkiem grupy astenoteratozoospermicznej (ryc. 1A; ścieżka AT). W plazmach nasienia zauważono obecność 4–5 dodatkowych pasm o mniejszej immunoreaktywności i masach cząsteczkowych < 390 kDa, różniących się o około 20–30 kDa. Pasma te były obecne w śladowych ilościach w fizjologicznej plazmie nasienia, pochodzącej od mężczyzny o udowodnionej płodności i w preparacie sIgA. We wszystkich obrazach immunoelektroforetycznych plazm nasienia zaobserwowano obecność pasma o masie około 80 kDa, odpowiadającej masie wolnej cząsteczki wy-

Tabela 1. Stężenia IgA, sIgA oraz IgA1 w plazmie nasienia ludzkiego

Table 1. The IgA, sIgA and IgA1 concentrations in human seminal plasma

| Grupy plazm nasienia (Seminal plasma groups) | * IgA (mg/l) | sIgA (mg/l) | ** IgA1 (mg/l) |
|--|-------------------------------------|---|--|
| Normozoospermia (Normozoospermic) | $3,2 \pm 2,1$ n = 16 | $29,6 \pm 36,4$ n = 16 ▲ $85,9 \pm 6,1$ | $12,8 \pm 18,2$ n = 15 ♣ $38,1 \pm 16,8$ |
| Astenozoospermia (Asthenozoospermic) | $2,3 \pm 1,2$ n = 4 | $20,2 \pm 12,2$ n = 4 ▲ $89,1 \pm 3,8$ | $10,2 \pm 2,7$ n = 4 ♣ $53,1 \pm 18,3$ |
| Azoospermia (Azoospermic) | $2,9 \pm 0,3$ n = 2 2,6 i 3,1 | $77,9 \pm 93,6$ n = 2 11,7 i 144 ▲ $89,8 \pm 11,5$ | $53,3 \pm 66,2$ n = 2 6,5 i 100,1 ♣ $56,8 \pm 16,1$ |
| Oligozoospermia (Oligozoospermic) | $1,3 \pm 0,8$ n = 2 | $9,0 \pm 2,1$ n = 2 ▲ $86,5 \pm 9,1$ | $9,2 \pm 3$ n = 2 ♣ $61,3 \pm 1,8$ |
| Teratozoospermia (Theratozoospermic) | $4,2 \pm 3,4$ n = 31 | $26,9 \pm 14,7$ n = 31 ▲ $86 \pm 5,7$ | $13,6 \pm 16,1$ n = 29 ♣ $40 \pm 16,5$ |
| Astenoteratozoospermia (Asthenotheratozoospermic) | $3,2 \pm 1,5$ n = 4 | $17,5 \pm 16,6$ n = 4 ▲ $79 \pm 14,7$ | $10,4 \pm 4,5$ n = 4 ♣ $52,6 \pm 39,3$ |
| Oligoteratozoospermia (Oligotheratozoospermic) | $2,8 \pm 2,4$ n = 12 | $19,1 \pm 14,2$ n = 12 ▲ $85,6 \pm 5,7$ | $12,2 \pm 12,6$ n = 11 ♣ $38,8 \pm 21,6$ |
| Oligoastenoteratozoospermia (Oligoasthenotheratozoospermic) | $7,1 \pm 11,4$ n = 27 | $30,7 \pm 39,5$ n = 27 ▲ $82 \pm 11,5$ | $13,4 \pm 15,9$ n = 25 ♣ $37,3 \pm 19,7$ |

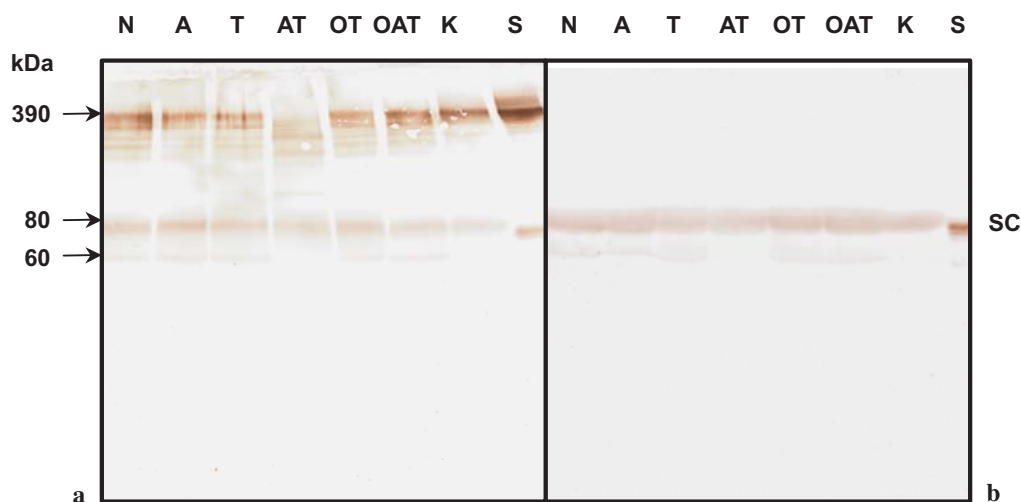
Grupy plazm nasienia wyodrębniono na podstawie standardowego badania nasienia zgodnie z kryteriami WHO [9]. Korelacje według Spearmana między wartościami stężeń: * IgA i sIgA ($r = 0,68$; $p = 0,005$), a także ** IgA1 i IgA ($r = 0,55$; $p = 0,0000$) oraz IgA1 i sIgA ($r = 0,63$; $p = 0,0000$). ▲ Procentowa zawartość sIgA w (IgA + sIgA). ♣ Procentowa zawartość IgA1 w (IgA + sIgA).

The seminal plasma groups were distinguished on the basis of standard semen analysis, according to the WHO criteria [9]. The Spearman's correlations between the following estimations: * IgA and sIgA ($r = 0,68$; $p = 0,005$); ** IgA1 and IgA ($r = 0,55$; $p = 0,0000$); IgA1 and sIgA ($r = 0,63$; $p = 0,0000$). ▲ Percentage participation of sIgA in (IgA + sIgA). ♣ Percentage participation of IgA1 in (IgA + sIgA).

dzielniczej oraz pasma o masie około 60 kDa, które nie było widoczne w grupie AT oraz w fizjologicznej plazmie nasienia (ryc. 1A i 1B).

Omówienie

W pracy wykazano, że wartości stężeń IgA, sIgA, IgA1 i procentowe udziały poszczególnych form molekularnych immunoglobuliny A: IgA (15%), sIgA (85%) oraz IgA1 (40 %) w sumarycznej wartości stę-



Ryc. 1. Obrazy form molekularnych sIgA obecnej w plazmie nasienia ludzkiego.

Elektroforezę SDS-PAGE wykonano w gradiencie stężenia żelu poliakryloamidowego 4–16%, w warunkach nieredukujących (a) i redukujących (b), a następnie przeprowadzono immunoblotting z użyciem mysich przeciwciał monoklonalnych anty-ludzka SC (IgA). Grupy plazm nasienia wyodrębniono na podstawie standardowego badania nasienia: N – normozoospermia, A – astenozoospermia, T – teratozoospermia, AT – astenoteratozoospermia, OT – oligoteratozoospermia, OAT – oligoastenoteratozoospermia oraz fizjologiczna plazma nasienia (K) i preparat sIgA z siary (S). SC – wolna cząstka wydzielnicza

Fig. 1. The pattern of sIgA molecular forms in human seminal plasma.

The SDS-PAGE electrophoresis was carried out at gradient 4–16 % of polyacrylamide gel, in reducing (a) and not reducing (b) conditions, and next for immunoblotting, mouse anti-human SC (IgA) monoclonal antibodies was used. On the basis of standard semen analysis, the following seminal plasma groups were distinguished: N – normozoospermic, A – asthenozoospermic, T – theratozoospermic, AT – asthenotheratozoospermic, OT – oligotheratozoospermic, OAT – oligoasthenotheratozoospermic and physiological seminal plasma (K), and human colostrum sIgA preparation (S). SC – free secretory component

żeń IgA i sIgA, są niezależne od wskaźników charakteryzujących plemniki (tab. 1). Zaobserwowano także, że w plazmie nasienia ludzkiego, obok natywnej formy sIgA, są obecne produkty jej degradacji oraz wolna cząstka wydzielnicza (ryc. 1). Skład i ilość produktów degradacji sIgA wydaje się towarzyszyć nieprawidłowej budowie i zmniejszonej liczbie plemników w ejakulacji. Wyraźnie mniejszą ilość produktów degradacji sIgA obserwowano w plazmie nasienia mężczyzny z udowodnioną płodnością w porównaniu do liczby pasm występujących u pacjentów bezpotomnych (ryc. 1A).

Fowler i Mariano [2] oraz Sullivan i Quinlivan [3] wykazali, że stężenia IgA i wydzielniczej IgA, były znacznie wyższe u bezpłodnych pacjentów z azoospermią, oligozoospermią oraz z obecnymi w ejakulacji aglutynującymi plemnikami w porównaniu z grupą płodnych mężczyzn. W naszych badaniach obecne w plazmie nasienia monomeryczna IgA, wydzielnicza IgA oraz IgA1 wykazywały szeroki zakres wartości stężeń w indywidualnych próbach, odpowiednio: 0,7–53,4 mg/l, 3,6–213,6 mg/l, 1,9–100,1 mg/l. Jednak tylko około 11% prób wśród oznaczeń IgA, 3% w sIgA, oraz 4% w IgA1 charakteryzowało się bardzo dużymi wartościami stężeń w porównaniu do odpow-

wiedniej średniej wartości stężenia w grupie normozoospermicznej powiększonej o podwójną wartość odchylenia standardowego SD (tab. 1).

Nieliczne badania przeprowadzone u zwierząt doświadczalnych wskazują, że immunologiczny układ wydzielniczy towarzyszący błonom śluzowym narządu rozrodczego męskiego podlega regulacji hormonalnej [13]. Wykazano, że kastracja zmniejsza lub zupełnie hamuje ekspresję pIgR zarówno w gruczole krokowym, jak i w pęcherzykach nasiennych. Natomiast 5 α -dehydrotestosteron (DTH) podawany kastrowanym szczurom zwiększał stężenie wydzielanej przez gruczoł krokowy IgA oraz przywracał ekspresję pIgR [14]. Podobne działanie wykazywał podawany estradiol. Nie jest wykluczone, że obserwowane duże wahania w poziomach stężeń IgA jak i sIgA w grupach mężczyzn objętych badaniem były skutkiem zaburzonej syntezy męskich hormonów płciowych. Jednocześnie wahania stężeń IgA mogą być związane ze zwiększoną syntezą autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom plemników. Wielokrotnie bowiem potwierdzano obecność miejscowo syntetyzowanych przeciwciał antyplemnikowych w klasie IgA [15]. Duże wartości stężeń IgA oraz sIgA w plazmie nasienia wskazują na potrze-

bę dalszej analizy, np. przeciwpłemnikowej IgA, mediatorów odpowiedzi immunologicznej, profilu hormonalnego u badanych pacjentów.

W badanych plazmach nasienia oznaczono uprzednio stężenie dodatniego białka ostrej fazy, α_1 -kwaśnej glikoproteiny [16]. Wykazano brak korelacji między wartościami stężeń IgA oraz sIgA a stężeniem α_1 -kwaśnej glikoproteiny i jej glikoform. Nie stwierdzono również korelacji między stężeniami laktoferyny a stężeniami IgA oraz sIgA. Wartości stężeń laktoferyny ($1,13 \pm 0,42$ mg/ml) nie różniły się istotnie statystycznie między grupą normozoospermiczną a plazmami nasienia o nieprawidłowych wynikach standardowej oceny nasienia (dane niepublikowane). Wydaje się więc, że wzrost stężeń immunoglobulin w analizowanych plazmach nasienia nie jest bezpośrednio związany z występowaniem przewlekłego stanu zapalnego w obrębie męskich narządów rozrodczych.

W badaniach wykazano, że w plazmie nasienia ludzkiego przeważa ilościowo podklasa IgA2 (około 60%). Odmierna dystrybucja podklas IgA1 i IgA2 w płynach ustrojowych jest związana z różnicami w ich budowie oraz wiąże się ze spełnianą przez nie funkcją w ustroju. Podstawowa różnica strukturalna między IgA1 i IgA2 występuje w regionie zawiasowym, który w IgA2 jest krótszy o 13 aminokwasów, ma odmienną sekwencję aminokwasową oraz nie zawiera O-glikanów. IgA1 lepiej niż IgA2 wiąże się z receptorem asjaloglikoprotein na hepatocytach, IgA2 natomiast jest lepszym inhibitorem komórek NK (natural killer) [17], a także lepiej wiąże się z fimbriami bakterii *Escherichia coli* niezależnie od przeciwciał [18]. Proteazy IgA1 rozszczepiają połączenia prolinowo-serynowe i prolinowo-treoninowe regionu zawiasowego IgA1 i sIgA1, przez co oddzielają region Fab od regionu Fc, obniżając tym samym właściwości obronne IgA [19], zdolności aglutynacyjne oraz możliwość wiązania receptorów obecnych na powierzchni komórek bakteryjnych [20]. IgA2 dzięki różnicom strukturalnym jest bardziej odporna na działanie wielu proteaz bakteryjnych, oddziałujących swoiście na region zawiasowy IgA1 [17]. Wyższy poziom ekspresji IgA2 w wydzielinach, w porównaniu do IgA1, można uznać za mechanizm przeciwstawiania się wirulencji potencjalnie chorobotwórczych bakterii, kolonizujących błony śluzowe i wytwarzających proteazy trawiące IgA1 [21]. Wykazano, że kwasy lipoteichojowe bakterii Gram-dodatnich oraz lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych aktywują limfocyty B w kierunku syntezy IgA2 [22]. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że obserwowany w kilku przypadkach wzrost zawartości IgA1 w plazmie nasienia ma związek z obniżeniem ochrony męskich gamet przed działaniem bakterii chorobotwórczych.

Immunoelktroforogramy przedstawione na rycinie 1A i 1B pozwalają na stwierdzenie obecności w plazmach nasienia ludzkiego zarówno sIgA o masie około 390 kDa, jak i wolnej komponenty wydzielniczej (SC) o masie około 80 kDa. Masa cząsteczkowa wolnej komponenty wydzielniczej obecnej w plazmie nasienia nie różniła się w poszczególnych analizowanych grupach plazm nasienia, zauważono natomiast różnice w jej intensywności, które wskazują na możliwe różnice ilościowe. Dodatkowo były obecne pasma, o masach cząsteczkowych niższych od masy natywnej sIgA, reaktywne z przeciwciałami monoklonalnymi antyludzka SC (IgA), które są prawdopodobnie produktami degradacji natywnej sIgA. W prawie wszystkich badanych grupach, z wyjątkiem astenoteratozoospermicznej i plazmy nasienia pochodzącej od mężczyzny o udowodnionej płodności, jest także widoczne pasmo o masie cząsteczkowej około 60 kDa, którego obecność może być spowodowana degradacją wolnej komponenty wydzielniczej (około 80 kDa). Olivares et al. [23] zaobserwowali obecność w ejakulacie dwóch produktów degradacji o masach cząsteczkowych 66 kDa i 45 kDa. W naszych badaniach liczba dodatkowych pasm okazała się wyraźnie większa w plazmach patologicznych, pochodzących od mężczyzn podejrzanych o bezpłodność niż w fizjologicznej plazmie nasienia. Pojawianie się w zwiększonej ilości produktów degradacji sIgA, obserwowane w patologicznych plazmach nasienia, może oznaczać osłabienie obrony plemników przed zakażeniami wywołanymi przez wewnętrzne patogeny bakteryjne i wirusy oraz ograniczenie roli wolnej cząstki SC w zapobieganiu chorobotwórczemu działaniu drobnoustrojów, polegającemu na zmniejszeniu przylegania do komórek nabłonkowych gospodarza zarówno szczepów bakteryjnych, jak i ich toksycznych produktów [8]. Obniżona zdolność sIgA do aktywacji dopełniacza oraz opsonizacji bakterii do fagocytozy mogą ograniczać miejscową reakcję zapalną [20]. Enzymatyczna degradacja i inaktywacja sIgA przez niektóre proteazy IgA może sprzyjać „wymykaniu się” ludzkich plemników miejscowej immunologicznej odpowiedzi humoralnej w żeńskich drogach rozrodczych i w ten sposób „pomaga” plemnikom przejść przez szyjkę macicy. Inkubacja różnych frakcji nasienia z sIgA dowodzi, że aktywność proteazy IgA jest związana z pełnym ejakulatem lub z plemnikami, a nie z plazmą nasienia [23].

Przedstawione badania wskazują, że kompleksowa analiza stężeń różnych form molekularnych IgA oraz określenie roli produktów ich degradacji mogą stanowić wstępne, pomocnicze oznaczenia mające na celu ukierunkowanie dalszej diagnostyki męskiej niepłodności.

Piśmiennicwo

- [1] **Sanocka D, Jędrzejczak P, Szumala-Kakol A, Frączek M, Kurpisz M:** Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *J Androl* 2003, 24, 448–455.
- [2] **Fowler JE Jr, Mariano M:** Immunoglobulin in seminal fluid of fertile, infertile, vasectomy and vasectomy reversal patients. *J Urol* 1983, 129, 869–872.
- [3] **Sullivan H, Quinlivan WL:** Immunoglobulins in the semen of men with azoospermia, oligospermia, or self-agglutination of spermatozoa. *Fertil Steril* 1980, 34, 465–468.
- [4] **Kutteh WH, Hatch KD, Blackwell RE, Mestecky J:** Secretory immune system of the female reproductive tract: I. Immunoglobulin and secretory component-containing cells. *Obstet Gynecol* 1988, 71, 56–60.
- [5] **Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P:** Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand J Immunol* 2000, 52, 240–248.
- [6] **Norderhaug IN, Johansen FE, Schjerven H, Brandtzaeg P:** Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev Immunol* 1999, 19, 481–508.
- [7] **Giugliano LG, Ribeiro ST, Vainstein MH, Ulhoa CJ:** Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1995, 42, 3–9.
- [8] **Dallas SD, Rolfe RD:** Binding of *Clostridium difficile* toxin A to human milk secretory component. *J Med Microbiol* 1998, 47, 879–888.
- [9] **WHO (World Health Organization):** Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical interactions. Cambridge University Press 1992.
- [10] **Katnik I, Jadach J:** Immunoaffinity purification of human haptoglobin using monoclonal antibodies. *Arch Immunol Ther Exp* 1993, 41, 303–308.
- [11] **Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [12] **Hooper DC, Peacock AC:** Determination of the subunit composition of haptoglobin 2–1 polymers using quantitative densitometry of polyacrylamide gels. *J Biol Chem* 1976, 251, 5845–5851.
- [13] **Hampl R, Pohanka M, Hill M, Starka, L:** The content of four immunomodulatory steroids and major androgens in human semen. *J Steroid Biochem Molec Biol* 2003, 84, 307–316.
- [14] **Stern JE, Gardner S, Quirk D, Wira ChR:** Secretory immune system of the male reproductive tract: effects of dihydrotestosterone and estradiol on IgA and secretory component levels. *J Reprod Immunol* 1992, 22, 73–85.
- [15] **Auer J, Senechal H, Desvaux FX, Albert M, De Almeida M:** Isolation and characterisation of two sperm membrane proteins recognised by sperm-associated antibodies in infertile men. *Mol Reprod Dev* 2000, 57, 393–405.
- [16] **Kratz E, Poland DCW, van Dijk W, Katnik-Prastowska I:** Alterations of branching and differential expression of sialic acid on alpha-1-acid glycoprotein in human seminal plasma. *Clin Chim Acta* 2003, 331, 87–95.
- [17] **Rifai A, Fadden K, Morrison SL, Chintalacharuvu KR:** The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J Exp Med* 2000, 191, 2171–2181.
- [18] **Wold AE, Mestecky J, Tomana M, Kobata A, Ohbayashi H, Endo T, Eden CS:** Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun* 1990, 58, 3073–3077.
- [19] **Spooner RK, Russell WC, Thirkell D:** Characterisation of the immunoglobulin A protease of *Ureaplasma urealyticum*. *Infect Immunol* 1992, 60, 2544–2546.
- [20] **Brandtzaeg P:** Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS* 1995, 103, 1–19.
- [21] **Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV:** Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* 1996, 104, 321–338.
- [22] **Tarkowski A, Lue C, Moldoveanu Z, Kiyono H, McGhee JR, Mestecky J:** Immunization of humans with polysaccharide vaccines induces systemic, predominantly polymeric IgA2-subclass antibody responses. *J Immunol* 1990, 144, 3770–3778.
- [23] **Olivares S, Villanueva-Diaz C, Hernandez C, Arredondo JL, Vellido-Ortega F:** Identification and partial characterization of an immunoglobulin A protease associated with human sperm. *Biol Reprod* 1993, 49, 162–165.

Adres do korespondencji:

Iwona Katnik-Prastowska
Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii AM
ul. Bujwida 44a
50-345 Wrocław
e-mail: iwona@immchem.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.12.2003 r.
Po recenzji: 30.01.2004 r.
Zaakceptowano do druku: 10.02.2004 r.

Received: 10.12.2003
Revised: 30.01.2004
Accepted: 10.02.2004