

مقایسه ایمنی زایی اسپرم در روش‌های مختلف ایمن سازی در موش

دکتر ابوالقاسم عجمی^{۱*}، دکتر امیر اسماعیل نژاد مقدم^۲، دکتر حسن معتمد^۳، دکتر افشین خوشبخت^۴

چکیده

مقدمه: با توجه به اینکه وجود ایمنی بر علیه اسپرم به صورت طبیعی در نازایی‌های ایمنولوژیکی دخالت داشته و هم چنین در مطالعات روش‌های پیشگیری از حاملگی از طریق تحریک سیستم ایمنی (Immunocontraception) از اسپرم و آنتی ژن‌های آن برای ایجاد ایمنی و پیشگیری از حاملگی استفاده می‌شود، اطلاع از تأثیر راه ورود اسپرم، در ایمنی زایی آن حایز اهمیت می‌باشد. **روش بررسی:** در یک مطالعه تجربی اسپرم کامل موش به همراه آدجونت کامل فروند از طریق عضلاتی (IM) و زیر پوستی (SC) و اسپرم کامل به همراه زنجیره بتای سم ویبریوکلا (Cholera Toxin Subunit-β) به عنوان آدجونت از طریق خوراکی (Oral)، مقعدی (IR) و واژینال (Ivag)، بینی (IN) و داخل صفاتی (IP) به گروه‌های ۱۵ تایی موش سوری تجویز گردید. به گروه‌های شاهد هر کدام از روش‌های بالا فقط آدجونت مربوط به آن گروه به همراه حجم مساوی آنتی ژن، بافر فسفات نمکی (PBS) تجویز گردید. تجویز در روزهای صفر، ۷ و ۱۴ و ۲۸ صورت گرفت و بعد از گذشت ۲۶ روز (بعد از آخرین تجویز) سرم و ترشحات مخاطی واژن از موش‌های گروه‌های آزمایش و شاهد تهیه گردید. برای بررسی میزان آنتی بادی تولید شده از روش ایمنولوژیکی فلوروسانس غیرمستقیم استفاده شد، رقت آنتی بادی در سرم و ترشحات با استفاده از آنتی بادی کونژوگه با FITC (Fluorescein Isotiocyanate) نوع پلی والان تعیین گردید. آزمون‌های آماری Fisher exact test, Mann whitney test جهت آنالیز آماری داده‌ها استفاده شد.

نتایج: گروه داخل صفاتی (IP) به دلیل تلفات زیاد از مطالعه خارج گردید و مقایسه آماری بین نتایج سایر گروه‌های مورد و شاهد نشان می‌دهد که وجود آنتی بادی در سرم موش‌های روش IN, SC, IM به ترتیب با $p=0.01$ ، $p=0.01$ و $p=0.04$ با یکدیگر اختلاف معنی دار داشته است و در مورد وجود آنتی بادی در ترشحات رحم به جز در یک مورد از گروه آزمایش IM و یک مورد از گروه آزمایش SC بقیه منفی بوده است. **نتیجه‌گیری:** براساس یافته‌های تحقیقی می‌توان نتیجه گرفت که اسپرم کامل از طریق IN, SC, IM می‌تواند باعث تولید آنتی بادی شود و سایر روش‌ها برای ایجاد ایمنی بر علیه اسپرم کامل مؤثر نبوده است.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، ایمن سازی، آنتی ژن، ایمنولوژی فلوروسانس، موش

مقدمه

اسپرم، سلولی است که در زمانی که مکانیزم‌های تولرانس مرکزی فعال می‌باشند در بدن تولید نمی‌شود و تولید آن بعد از بلوغ جنسی صورت می‌گیرد، محل تولید این سلول که در داخل بیضه می‌باشد به عنوان یک بافت بدون حضور سیستم ایمنی (Previliedge Site) قلمداد می‌شود^(۱) لذا

*- نویسنده مسئول: دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی ساری

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مازندران

تلفن: ۰۱۵۱ ۳۴۴۱۰۳۱ FAX: ۰۱۵۱ ۳۴۴۷۱۰۶

Email: Ajami_ghasem@hotmail.com

۲- دانشیار گروه آتاتومی و جنین‌شناسی

۳ و ۴- پزشک عمومی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۴/۳/۱۶

از طرق مختلف وارد بدن موش گردید و میزان ایمنی زایی آن مورد مطالعه قرار گرفت تا بهترین روش ایمن سازی بر علیه اسپرم مشخص شود.

روش بررسی

در یک مطالعه تجربی از موش های سوری آلبینو ماده، ۱۲-۱۰ هفته و وزن تقریبی ۴۰-۳۰ گرم استفاده گردید. موش ها به ۷ گروه ۱۵ تایی مورد و ۷ گروه ۱۵ تایی شاهد تقسیم گردیدند. جهت تهیه آنتی ژن (اسپرم) از موش های نر سوری استفاده گردید. اسپرم ها از ناحیه اپیدیدیم موش ها بعد از قطع نخاع گردنی به وسیله برش Transvers ناحیه تحتانی شکم در شرایط استریل استخراج گردید و سپس با بافر فسفات نمکی (PBS) شستشو داده شد (۵ بار در ۳۲۰g سانتیفریژ و هر بار ۵ دقیقه). تعداد اسپرم در محلول نهایی به $4/2 - 3/8$ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر رسانده شد. ایمن سازی در روزهای صفر، ۷، ۱۴ و ۲۸ انجام گردید. برای این منظور در گروه عضلانی (IM) و زیر پوستی (SC) ۵۰ میکرولیتر از اسپرم تهیه شده ($4/2 - 3/8$ میلیون در میلی لیتر) و ۵۰ میکرولیتر از آدجونت کامل فروند برای اولین تزریق و در تزریقات بعدی ۵۰ میکرولیتر از محلول اسپرم و ۵۰ میکرولیتر از آدجونت ناقص فروند استفاده گردید. در گروه های داخل بینی (IN)، دهانی (Oral)، داخل مقعدی (IR) و داخل واژیتال (Ivag) مقدار ۳۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم و ۲ میکروگرم از زنجیره بتای سم ویبریوکلا (CTS- β) ساخت شرکت سیگما به عنوان آدجونت در داخل بینی، دهان، مقعد و واژن وارد گردید. در روش داخلی صفاتی (IP) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم و ۵ میکروگرم از (CTS- β) در داخل پریتونیم تزریق گردید. برای گروه های کنترل حجم مساوی از آدجونت مورد استفاده در هر گروه به همراه PBS (همه حجم محلول حاوی اسپرم) به همان طریقی که اسپرم و آدجونت تجویز گردیده بود، تزریق شد. سایر شرایط از قبیل شرایط نگهداری و روزهای تزریق عیناً

مولکول های تشکیل دهنده آن می توانند به عنوان آنتی ژن خودی (Autoantigen)، آلوآنتی ژن (Alloantigen) و ایزوآنتی ژن (Isoantigen) عمل کنند^(۲). وجود ایمنی بر علیه اسپرم (آنتی اسپرم آنتی بادی) به صورت طبیعی، در نازایی های ایمونولوژیک هر دو جنس نر و ماده دخالت دارد^(۳). هم چنین در مطالعات روش های پیش گیری از حاملگی از طریق تحریک سیستم ایمنی از اسپرم و آنتی ژن های آن استفاده می شود^(۴). در مطالعات مختلف در حیوانات، آنتی ژن های مختلف اسپرم، آدجونت ها و راه های مختلف ایمن سازی مورد آزمایش قرار گرفته است و نتایج متفاوتی گزارش شده است. تزریق اسپرم کامل (Whole Sperm) به possum ها (صارغ) = نوعی پستاندار کیسه دار) به روش SC همراه با آدجونت کامل فروند موجب ناباروری شد^(۵). مطالعه میزان آنتی بادی ضد اسپرم در ترشحات رحم و لوله رحمی در جنس ماده و ترشحات پروستات و اپیدیدیم جنس نر با روش ELISA نشان داد که تیتراژ آنتی اسپرم آنتی بادی (ASA) در حیوانات ماده مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی داری افزایش یافته ولی در حیوانات نر این افزایش معنی دار نبوده است^(۵). در مطالعه دیگری موش هایی که با روش SC و IM، با اسپرم ایمن شده بودند سطح بالایی از آنتی اسپرم آنتی بادی در سرم خود داشتند^(۶). ایمن سازی با اسپرم موش از طریق داخل معده ای (Interagastric) موجب تولید IgA ترشحاتی شده و عملکرد اسپرم را مهار نمود^(۷،۸). در مطالعه Naz، ایمن کردن گروه های موش سوری با آنتی ژن های اسپرم از طریق SC، IM، بیشترین مقدار آنتی بادی را در روزهای ۵۰-۴۸ به وجود آورد که تا ۲۵۵ روز این آنتی بادی در سرم قابل تشخیص بود^(۹). عوامل مؤثر در ایمنی زایی هر آنتی ژن از جمله اسپرم، علاوه بر ماهیت خود آنتی ژن به عوامل دیگری از قبیل راه ورود، نوع آدجونت، مقدار آنتی ژن و برنامه ایمن سازی بستگی دارد^(۱۰،۱۱). در مطالعه حاضر اسپرم کامل موش و آدجونت کامل و ناقص فروند و زنجیره β سم ویبریوکلا (Cholera Toxin β Subunit)

شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفت. از تست‌های آماری Fisher exact test, Mann withney جهت مقایسه آماری نتایج استفاده گردید.

نتایج

در طی روند تزریق و نگهداری موش‌ها، تمام موش‌های گروه مورد داخل صفاتی (IP) بجز یک موش تلف گردیدند بنابراین این گروه از مطالعه حذف گردید. در بقیه گروه‌ها نیز تلفاتی وجود داشت که تعداد موش‌های باقی مانده جهت بررسی میزان ایمنی در آنها در جدول (۲) نشان داده شده است. تعداد موش‌های هر گروه در ابتدای کار ۱۵ سر بوده است. نتایج آزمایش ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم در سرم گروه‌های مختلف در جدول (۱) آورده شده است. مقایسه نتایج بین گروه‌های مورد و شاهد نشان می‌دهد که وجود آنتی بادی در سرم موش‌های روش SC, IM و IN بترتیب با $p=0/01$ ، $p=0/01$ و $p=0/04$ اختلاف معنی داری وجود دارد. مقایسه تیترا آنتی بادی در سرم موش‌های مورد و شاهد نشان می‌دهد که در اغلب موارد مثبت، تیترا آنتی بادی در حد ۱/۵ بوده است و در بعضی از موارد ۱/۲۵ هم مثبت گردیده است که جزئیات بیشتر آن در جدول (۲) آورده شده است. مقایسه بین سه گروه IN, SC, IM نشان می‌دهد که بیشترین موارد مثبت ASA در گروه SC و کمترین موارد در گروه IN بوده است (جدول (۱)).

مقایسه میزان در صد موارد مثبت آنتی بادی در نمونه‌های سرمی در گروه‌های مختلف در دیاگرام (۱) نشان داده شده است. نتایج آزمایش ایمونوفلوئورسانس در مورد وجود آنتی بادی ضد اسپرم در ترشحات واژن نشان داد که به جز یکی از موش‌های گروه مورد عضلانی و یکی از موش‌های گروه مورد زیر پوستی در بقیه موش‌های گروه‌های مورد و تمام موش‌های گروه‌های شاهد آنتی بادی ضد اسپرم وجود نداشته است. تیترا آنتی بادی ضد اسپرم در ترشحات واژن در دو مورد مثبت، تشخیص داده شد.

شبهه گروه مورد بوده است. بعد از گذشت ۲۶ روز از آخرین تزریق کلیه موش‌ها قطع نخاع گردنی گردیده و ترشحات واژن آنها از طریق شستشوی واژن، با تزریق ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی جمع آوری گردید (۳ بار). خون عروق منتهی به قلب نیز از طریق قطع این عروق جمع آوری شده و سرم آن جدا گردید. بررسی میزان آنتی بادی (تیترا آنتی بادی) ضد اسپرم در سرم و ترشحات واژن با استفاده از آزمایش ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم انجام گردید. جهت تهیه لام‌های حاوی آنتی ژن اسپرم، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول اسپرم و PBS که غلظت آن ۳-۲ میلیون اسپرم در میلی لیتر ($10^6 \times 3-2$ sperm/ml) بود روی لام قرار داده شد و پس از خشک شدن در هوای آزمایشگاه جهت تثبیت شدن (Fixation)، به مدت بیست دقیقه در استن خالص قرار داده شد و سپس در هوای محیط خشک شده و در ۲۰- درجه سانتیگراد تا هنگام استفاده نگهداری شد. از سرم و ترشحات رحم هر موش رقت‌های ۱/۵، ۱/۲۵، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰ تهیه گردید و مثبت بودن هر کدام از رقت‌ها بعنوان وجود آنتی بادی در نظر گرفته شد.

جهت آزمایش ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم از آنتی بادی کوئزوگه با FITC نوع پلی کلونال ساخت شرکت سیگما استفاده شد. تمام لام‌های فلورسانس توسط یک نفر و با استفاده از یک میکروسکوپ (میکروسکوپ فلورسانس Leitz ساخت کشور آلمان) و بدون اطلاع از گروه مورد آزمایش و مورد یا شاهد بودن، مشاهده گردید، جهت مقایسه در تمام لام‌ها از شاهد مثبت و منفی استفاده شد. برای تهیه سرم و ترشحات واژن شاهد مثبت، ۴ خرگوش توسط ۰/۵ میلی لیتر اسپرم موش (۴/۵ - ۳/۵ میلیون اسپرم در یک میلی لیتر) و یک میلی لیتر آدجونت فروند با دو تلقیح در روزهای صفر و ۱۴ ایمن سازی شده و سپس سرم و ترشحات واژن آنها مورد آزمایش قرار گرفت و رقت ۱/۵ از سرم مثبت و ترشحات رحم رقیق شده مثبت به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. سرم و ترشحات رحم خرگوش‌های سالم نیز در همان رقت به عنوان

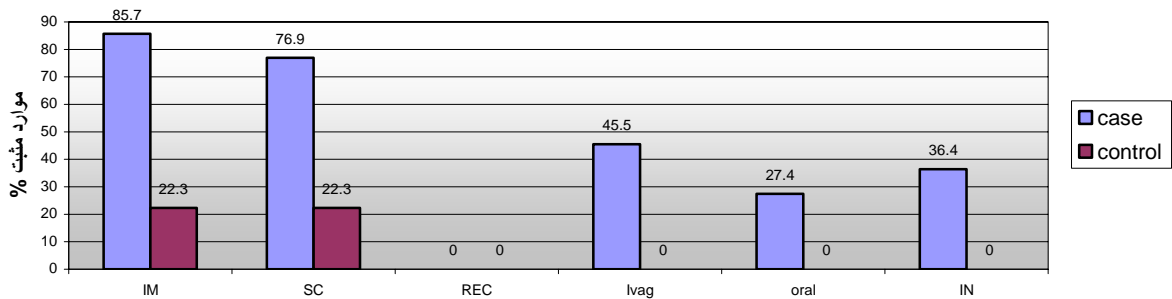
جدول (۱): موارد مثبت آنتی بادی در سرم موش های مورد و شاهد در روش های مختلف ایمن سازی با اسپرم موش

روش ایمنی سازی	عضلانی			زیر پوستی			مقعدی			واژینال			دهانی			یبنی			
	+	-	جمع	+	-	جمع	+	-	جمع	+	-	جمع	+	-	جمع	+	-	جمع	
وجود آنتی بادی																			
گروه																			
شاهد	۲	۷	۹	۲	۷	۹	۱۰	۱۰	۲۰	۹	۵	۱۴	۱۵	۱۵	۳۰	۱۰	۱۰	۲۰	
مورد	۶	۱	۷	۱۰	۳	۱۳	۱۱	۱۱	۲۲	۵	۶	۱۱	۳	۸	۱۱	۴	۷	۱۱	

جدول (۲): تیتراژ موارد مثبت آنتی بادی ضد اسپرم در موش های ایمن شده با اسپرم در روش های مختلف ایمن سازی

روش ایمنی سازی	عضلانی		زیر پوستی		مقعدی		واژینال		دهانی		یبنی	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
تیتراژ آنتی بادی												
گروه												
شاهد	۱	۱	۲	۲	۰	۰	۵	۴	۰	۰	۰	۰
مورد	۱	۵	۵	۵	۰	۰	۵	۳	۳	۲	۲	۲

درصد موارد مثبت آنتی اسپرم آنتی بادی در گروه های مختلف



گروه های مورد آزمایش

نمودار (۱): مقایسه میزان درصد موارد مثبت آنتی اسپرم آنتی بادی در سرم موش های گروه شاهد و مورد در روش های مختلف ایمن سازی با اسپرم

بحث

و در مقایسه بین سه گروه IM, SC, IN بیشترین موارد مثبت ASA در گروه SC مشاهده گردید. Duckworth (1997) هم نشان داد که ایمن سازی سیستمیک علیه اسپرم کامل به صورت معنی داری باروری possumه های ماده را مهار کرده که این اختلال باروری به واسطه افزایش ASA در سرم و ترشحات واژینال میانجی گری شده است^(۵). ایمن سازی با اسپرم کامل در

در تزریق اسپرم کامل به موش های ماده به صورت SC, IM به همراه آدجونت کامل و ناقص فرزند و در روش IN به همراه زنجیره بتای سم و ویروکلرا، آنتی بادی ضد اسپرم (ASA) در سرم بوجود آمد ولی در سایر گروه ها (Ivag, Oral, IR) تولید در گروه شاهد و مورد اختلاف آماری معنی داری نداشت

بوده است^(۷). روش ایمن سازی داخل بینی (IN) به همراه CTS- β توانست میزان بالای ASA را در ترشحات تناسلی ایجاد نماید^(۱۴). استفاده از روش داخل رحمی در موش ها به همراه آدجونت کامل فروند، سطحی بالایی از ASA را ایجاد نمود^(۱۶) و با تجویز Oral اسپرم، سطح آنتی بادی در ترشحات واژینال افزایش یافت^(۱۷). ارایه آنتی ژن های باکتریایی به شیوه رکتال پاسخ IgA را در دستگاه تناسلی ماده به دنبال داشته است^(۱۸) ولی مطالعات دیگری نشان داده است که این نحوه از ایمن سازی تولید IgA ترشحي در واژن را به دنبال ندارد^(۲۱،۲۰). ایمن سازی از طریق واژن با یک آنتی ژن منجر به پاسخ آنتی بادی در ترشحات واژینال شد^(۲۲،۲۳)، در حالی که در بعضی از مطالعات دیگر هیچ پاسخی مشهود نبود^(۲۴). بعضی از مطالعات معتقدند روش IN بهترین پاسخ آنتی بادی را در ترشحات تناسلی نسبت به روش های دهانی، واژینال، مقعدی و حتی سیستمیک ایجاد می کند^(۴). سطوح بالایی از IgA و IgG اختصاصی در ترشحات Cervicovaginal بعد از ایمن سازی IN با تعدادی از ایمنوژن های مختلف در موش^(۱۹،۲۵،۲۶) و در میمون^(۲۷) دیده شده است. استفاده از اسپرم کامل به عنوان آنتی ژن. تشخیص ASA به وسیله IFA و vaginal washing (شست و شوی واژن) که ممکن است باعث کاهش رقت آنتی بادی در ترشحات گردیده باشد، می تواند دلایلی باشد که نتایج این مطالعه یعنی منفی بودن ASA در ترشحات دستگاه تناسلی را موجب گردیده باشند. استفاده از اسپرم کامل در روش های سیستمیک (SC, IM) می تواند باعث میزان بالایی از ASA در سرم گردد ولی روش های مخاطی قادر به تحریک سیستم ایمنی بر علیه اسپرم کامل نمی باشند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری و راهنمایی های آقایان: دکتر علیرضا خلیلیان و دکتر جلیل توکلی اعضای هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مشهد و کمک های سرکارخانم فرشیده عابدیان و خانم محمدی در آزمایشگاه ایمنولوژی دانشکده پزشکی ساری تشکر و قدردانی می شود.

انسان و سایر حیوانات باعث تولید ASA در سرم و ترشحات رحمی گردیده و کاهش باروری را موجب شده است^(۱۲،۱۳). ایمنیزه کردن موش های سوری با آنتی ژن های اختصاصی اسپرم از طریق SC و IM باعث تولید ASA در سرم موش ها گردیده است^(۹). با وجود این که مطالعات بالینی در انسان نشان داده است که ASA می تواند باعث کاهش باروری شود^(۱۴) ولی در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که نوع آنتی ژن اسپرم که آنتی بادی علیه آن ساخته می شود در میزان ناباروری مهم می باشد^(۱۵). Naz معتقد است که اسپرم کامل نمی تواند در تهیه واکسن ضدبارداری به کار گرفته شود به این دلیل که بسیاری از آنتی ژن های آن به شکل داخلی (Intrinsic) وجود دارد و سطح اسپرم از آنتی ژن های سوماتیکی پوشیده شده است که در سایر سلول ها نیز وجود داشته و خاصیت ایمنی زایی قوی ندارد^(۲۱). مطالعه حاضر، نشان می دهد که وارد کردن اسپرم کامل به همراه آدجونت از طریق SC بیشترین ایمنی زایی را داشته و مخاطات راه مؤثری برای ایجاد ایمنی بر علیه اسپرم کامل نمی باشد. به نظر می رسد که اسپرم کامل و آنتی ژن های ناشی از تخریب آن در سطوح مخاطی در معرض سیستم ایمنی قرار نگرفته و یا این که مکانیزم های ایجاد تولرانس در مخاطات از ایمنی زایی آن جلوگیری می کنند، باید توجه داشت که حتی در روش IN که اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و آزمایش در تولید آنتی بادی وجود داشته است فقط ۴ مورد از ۱۱ موش گروه آزمایش، ASA تولید کرده بودند. هم چنین لازم به توضیح است که روش به کار رفته برای تعیین ASA (ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم) نیز از دقت بالایی برای تعیین مقادیر کم آنتی بادی برخوردار نمی باشد.

تزریق اسپرم در هیچکدام از گروه ها باعث ایجاد ASA در مایع حاصل از شستشوی واژینال نشده است. در مطالعه Coa ایمن سازی موش با اسپرم از طریق داخل مقعدی موجب تولید IgA ترشحي شده و عملکرد اسپرم را، مهار و موجب کاهش باروری گردیده است^(۸). هم چنین تجویز داخل معده ای (Intragastric) اسپرم اپیدیمال همولوگ در رت های ماده موجب تولید زود هنگام IgA ضد اسپرم در ترشحات تناسلی

References

1. Beckerman Karen P. *Reproduction and the Immune system in : Stites Daniel P, Terr Abba I, Tristram G Parslow*, Medical immunology, ninth 9th edi. California: Appelton and lang. 1998: 613-631.
2. Naz RK, Bhargava K. *Antbodies to sperm surface fertilization antigen (FA-1) Their specificities and site of interaction with sperm in male genital tract.* Mol Reprod Develop 1990; 26: 173-183.
3. Naz RK. *Application of sperm antigens in immunocontraception.* Frontiers in Bioscience 1996; 1: 87-95.
4. Bronson RG, cooper G. Rosenfeld D. *sperm antibodies: their role in infertility.* Fertile Steril 1984; 42: 171-183.
5. Duckworth JA, Buddle BM, Scobie S. *Fertility of brushtail possums (Trichosurus Vulpecula) immunized against sperm.* J. Reprod Immunology 1998; 37: 125-138.
6. Parr EL, Parr MB, Thapar M. *A comparison of specific antibody responses in mouse vaginal fluid after immunization by various routes.* J Reprod Immunol 1988; 14: 164-176.
7. Allardyce RA, Rademaker M. *Female genital tract immunity and infertility after oral vaccination with sperm antigens in mice.* Adv Exp Med Biol 1987; 21: 1807-1813.
8. Cao X, Ben K, Ma L, Wang Y, Chen Y, Zhou H. *Secretory monoclonal IgA antibody to human sperm produced by gasterointestinal immunization inhibits human sperm activity and mouse in vitro fertilization.* J Reprod Immunol 1993; 24(1): 13-28.
9. Naz RK, Zhu X. *Recombinant fertilization antigen -I causes a contraceptive effect in actively immunized mice.* Biology of Reproduction 1998; 59: 1095-1100.
10. Frayne J, Hall L. *The potential use of sperm antigens as targets for immunocontraception; past, present and future.* J Reprod Immunol 1999; 43: 1-33.
11. Kozlowski PA, Cu-uvin S, Neutra MR, Flanigan TP. *Comparison of the oral, rectal and vaginal immunisation routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of woman.* Infect Immun 1997; 65: 1387.
12. Baskin MJ. *Temporary sterilization by injection of human spermatozoa.* Am J. Reprod Immunol and Microbiogy 1932; 24: 892.
13. Bradely MP. *Experimental strategies for the Development of an Immuno contraceptive vaccine for the European red fox, vulpes vulpes,* Reproduction Fertility and Deveopment 1994; 6: 307-317.
14. Behring C, Krause W. *Difference in antigen pattern rerognizod by antisperm antibodies in patients with infertility and vasectomy.* Journal of Urology 2001; 166(3): 1178-1180.
15. Bernstein DI, Ashley RL, Stanberty LR, Myers MG. *Detection of asymptomatic initial herpes simplex virus (HSV) infection in animals immunized with subunit HSV glycioprotien vaccines.* J Clin Microbiol 1990; 28: 11-15.
16. Straus SE, Corey L, Burke RL, Savarese B, Barnum G, Krause PR, Kost RG, Meier JL, Sekulovich R, Adair SF, Dekker CL. *Placebo-Controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes.* Lancet 1994; 343: 1460-1463.
17. Gallichan WS, Rosenthal KL. *Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus.* Vaccine 1995; 13: 1589-1959.

18. Bouvet J, Belec L, Pires R, Pilot J. *Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination*. Infect Immun 1994; 62: 3957-3961.
19. Miller CJ, Kang DW, Marthas M, Moldoveahu Z, Kiyono H, Marx P, Ehdrige JH, Mestecky J, MCGhee JR. *Genital Secretary immune response to chronic simian immunodeficiency virus (SIV) infection: A Comparison between intravenously and genitally inoculated rhesus macaques*. Clin Exp Immunol 1992; 88: 520-526.
20. Nakao M, Hazama M, Maymi-Aono A, Hinuma S, Fujisawa Y. *Immuotherapy of acute and recurrent herpes simplex virus type 2 infection with an adjuvant, free from of recombinant glycoprotein D – interleukin – 2 fusion protein*. J Infect Dis 1994; 169: 787-791.
21. Thapar MA, Parr EL, Parr MB. *Secretary immune responses in mouse vaginal fluid after pelvic, parenteral or vaginal immunization*. Immunology 1990; 70: 121-125.
22. Hordnes K, Tynning T, Brwon TA, Haneburg B, Jonsoon R. *Nasal immunization with group B streptococci can induce high levels of specific IgA antibodies in cervicovaginal secretions of mice*. Vaccine 1997; 15: 1244-1251.
23. Johansson EL, Rask C, Fredriksson M, Eriksson K, Szerkinsky C, Holmgren J. *Antibodies and antibody secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates*. Infect Immun 1998; 66: 514-520.
24. Russell MW, Moldoveanu Z, White PL, Sibert GJ, Mwstecky J, Michalek SM. *Salivary, nasal, genital and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin β subunit*. Infect Immun 1996; 64: 1272-1283.
25. Mestecky J, Russell MW. *Induction of mucosal immune responses in the human genital tract*. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 27: 351-355.
26. Crowley-Norwick PA, Bell MC, Brockweel R, Edwards RP, Chen S, Partridge EE, Mestecky J. *Rectal immunization for induction of specific antibody in the genital tract of woman*. J Clin Immunol 1997; 17: 370-374
27. Alexander NJ, Bialy G. *contraceptive vaccine development*. Reprod Fert Dev 1994; 6: 273-280.