

مقایسه ایمنی زایی اسپرم در روش‌های مختلف ایمن سازی در موش

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

چکیده

مقدمه: با توجه به اینکه وجود ایمنی بر علیه اسپرم به صورت طبیعی در نازایی های ایمونولوژیک دخالت داشته و هم چنین در مطالعات روش های پیشگیری از حاملگی از طریق تحریک سیستم ایمنی (Imunocontracception) از اسپرم و آنتی ژن های آن برای ایجاد ایمنی و پیشگیری از حاملگی استفاده می شود، اطلاع از تأثیر راه ورود اسپرم، در ایمنی زایی آن حائز اهمیت می باشد.

روش برسی: 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 ویریوکلارا (Cholera Toxin Subunit-β) به عنوان آدجونت از طریق خوراکی (Oral)، مقعدی (IR) و اژینال (Ivag)، یعنی (IN) و داخل صفاتی (IP) به گروه های ۱۵ تایی موش سوری تجویز گردید. به گروه های شاهد هر کدام از روش های 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 موش های گروه های آزمایش و شاهد تهیه گردید. برای برسی میزان آنتی بادی تولید شده از روش ایمونوفلوئورسانس (Fluorescein Isothiocyanate) FITC با کونزوگه باستفاده شد، رقت آنتی بادی در سرم و ترشحات با استفاده از آنتی بادی کونزوگه باستفاده شد. آزمون های آماری Fisher exact test، Mann whitney test، آنالیز آماری داده ها نتیجه گیری و لآن تعیین گردید. آزمون های آماری آنالیز آماری داده ها استفاده شد.

نتایج: گروه داخل صفاتی (IP) به دلیل تلفات زیاد از مطالعه خارج گردید و مقایسه آماری بین نتایج سایر گروه های مورد و شاهد نشان می دهد که وجود آنتی بادی در سرم موش های روشن SC، IM، IN به ترتیب با $p=0.04$ ، $p=0.01$ و $p=0.01$ 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.

نتیجه گیری: براساس یافته های تحقیقی می توان نتیجه گرفت که اسپرم کامل از طریق IN، SC، IM می تواند باعث تولید آنتی بادی شود و سایر روش ها برای ایجاد ایمنی بر علیه اسپرم کامل مؤثر نبوده است.

واژه های کلیدی: اسپرم، ایمن سازی، آنتی ژن، ایمونو فلوئورسانس، موش

مقدمه

اسپرم، سلولی است که در زمانی که مکانیزم های تولرانس مرکزی فعال می باشند در بدن تولید نمی شود و تولید آن بعد از بلوغ جنسی صورت می گیرد، محل تولید این سلول که در داخل بیضه می باشد به عنوان یک بافت بدون حضور سیستم ایمنی (Privileged Site) قلمداد می شود^(۱) لذا

*- نویسنده مسؤول: دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی ساری

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مازندران

تلفن: ۰۱۵۱-۳۴۴۲۱۰۶

FAX: ۰۱۵۱-۳۲۴۱۰۳۱

Email: Ajami_ghasem@hotmail.com

- دانشیار گروه آناتومی و جنین شناسی

۴- پژوهش عمومی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۴/۷/۲۶

تاریخ پذیرش: ۸۴/۷/۲۶

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

روش بررسی

در یک مطالعه تجربی از موش‌های سوری آلینو ماده، ۱۰–۱۲ هفته و وزن تقریبی ۳۰–۴۰ گرم استفاده گردید. موش‌ها به ۷ گروه ۱۵ تایی مورد و ۷ گروه ۱۵ تایی شاهد تقسیم گردیدند. جهت تهیه آنتی ژن (اسپرم) از موش‌های نر سوری استفاده گردید. اسپرم‌ها از ناحیه اپیدیدیم موش‌ها بعد از قطع نخاع گردندی به وسیله برش Transvers شکم در شرایط استریل استخراج گردید و سپس با بافر فسفات نمکی (PBS) شستشو داده شد (۵ بار در ۳۲۰ g سانتوفیوژ و هر بار ۵ دقیقه). تعداد اسپرم در محلول نهایی به $\frac{3}{8}$ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر رسانده شد. ایمن‌سازی 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 (۴/۲–۳/۸ میلیون در میلی لیتر) و ۵۰ میکرولیتر از آدجونت کامل فروند موجب شستشو داده شد (۵). مطالعه میزان آنتی بادی ضد اسپرم در ترشحات ناباروری شد (۶). ایمن‌سازی در جنس ماده و ترشحات پروستات و رحم و لوله رحمی در جنس ماده و ترشحات ایمن سازی ELISA نشان داد که تیتر آنتی اسپرم آپیدیدیم جنس نر با روش ELISA آزمایش در مقایسه با آنتی بادی (ASA) در حیوانات ماده مورد آزمایش در مطالعه میزان آنتی بادی ضد اسپرم در ترشحات نر ایمن افزایش معنی دار نبوده است (۷). در مطالعه دیگری موش‌هایی که با روش SC و IM، با اسپرم ایمن شده بودند سطح بالایی از آنتی اسپرم آنتی بادی در سرم خود داشتند (۸). ایمن‌سازی با اسپرم موش از طریق داخل معده‌ای مقعدی (IR) و داخل واژیتال (Ivag) مقدار ۳۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم و ۲ میکروگرم از زنگیره بتای سم ویریوکلرا (β -CTS) 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 (β -CTS) در داخل پریتونیوم تزریق گردید. برای گروه‌های کنترل حجم مساوی از آدجونت مورد استفاده در هر گروه به همراه PBS (همه حجم محلول حاوی اسپرم) به همان طبقی که اسپرم و آدجونت تجویز گردیده بود، تزریق شد. سایر شرایط از قبیل شرایط نگهداری و روزهای تزریق عیناً

مولکول‌های تشکیل دهنده آن می‌توانند 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 نازابی‌های ایمونولوژیک هر دو جنس نر و ماده دخالت دارد (۳). هم‌چنین در مطالعات روش‌های پیش‌گیری از حاملگی از طریق تحریک سیستم ایمنی از اسپرم و آنتی ژن‌های آن استفاده می‌شود (۴). در مطالعات مختلف در حیوانات، آنتی ژن‌های مختلف اسپرم، آدجونت‌ها و راه‌های مختلف ایمن‌سازی مورد آزمایش قرار گرفته است و نتایج متفاوتی گزارش شده است. تزریق اسپرم آدجونت‌ها و راه‌های مختلف ایمن‌سازی گزارش شده است. تزریق اسپرم کامل (Whole Sperm) به possum (صاریغ= نوعی پستاندار کیسه‌دار) 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 ایپیدیدیم جنس نر با روش ELISA نشان داد که تیتر آنتی اسپرم آنتی بادی (ASA) در حیوانات ماده مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافته ولی در حیوانات نر ایمن افزایش معنی دار نبوده است (۷). در مطالعه دیگری اسپرم را مهار نمود (۷،۸). در مطالعه Naz، ایمن کردن گروه‌های موش سوری با آنتی ژن‌های اسپرم از طریق SC، IM،Naz، 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 ایمن‌سازی بستگی دارد (۱۰،۱۱). در مطالعه حاضر اسپرم کامل موش و آدجونت کامل و ناقص فروند و زنگیره β سم ویریوکلرا (Cholera Toxin β Subunit) ایمن سازی بستگی دارد (۱۰،۱۱).

شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفت. از تست های آماری Fisher exact test, Mann withney گردید.

نتایج

در طی روند تزریق و نگهداری موش ها، تمام موش های گروه مورد داخل صفاتی (IP) بجز یک موش تلف گردیدند بنابراین این گروه از مطالعه حذف گردید. در بقیه گروه ها نیز تلفاتی وجود داشت که تعداد موش های باقی مانده جهت بررسی میزان ایمنی در آنها در جدول (۲) نشان داده شده است. تعداد موش های هر گروه در ابتدای کار ۱۵ سر بوده است. نتایج آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم در سرم گروه های مختلف در جدول (۱) آورده شده است. مقایسه نتایج بین گروه های مورد و شاهد نشان می دهد که وجود آنتی بادی در سرم موش های روش SC, IM و IN بترتیب با $p = 0.01$, $p = 0.01$ و $p = 0.04$ اختلاف معنی داری وجود دارد. مقایسه تیتر آنتی بادی در سرم مشاهد مثبت، تیتر 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 آن در جدول (۲) آورده شده است. مقایسه بین سه گروه ASA در IN, SC, IM نشان می دهد که بیشترین موارد مثبت گروه SC و کمترین موارد در گروه IN بوده است جدول (۱).

مقایسه میزان درصد موارد مثبت آنتی بادی در نمونه های سرمی در گروه های مختلف در دیاگرام (۱) نشان داده شده است. نتایج آزمایش ایمونوفلورسانس در مورد وجود آنتی بادی ضد اسپرم در ترشحات واژن نشان داد که به جز یکی از موش های گروه مورد عضلانی و یکی از موش های گروه مورد زیر پوستی در بقیه موش های گروه های مورد و تمام موش های گروه های شاهد آنتی بادی ضد اسپرم وجود نداشته است. تیتر آنتی بادی ضد اسپرم در ترشحات واژن دردو مورد مثبت، تشخیص داده شد.

شیوه گروه مورد بوده است. بعد از گذشت ۲۶ روز از آخرین تزریق کلیه موش ها قطع نخاع گردندی 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 (تیتر آنتی بادی) ضد اسپرم در سرم و ترشحات واژن با استفاده از آزمایش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم انجام گردید. جهت تهیه لام های حاوی آنتی ژن اسپرم، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول اسپرم و PBS که غاظت آن $2-3 \times 10^9$ sperm/ml بود روی لام قرار داده شد و پس از خشک شدن در هوای آزمایشگاه جهت ثبت 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 رقت های ۱/۱۰۰، ۱/۲۵، ۱/۵ و ۱/۲۰۰ تهیه گردید و مثبت بودن هر کدام از رقت ها عنوان وجود آنتی بادی در نظر گرفته شد.

جهت آزمایش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم از آنتی بادی کونژوگه با FITC نوع پلی کلونال ساخت شرکت سیگما استفاده شد. تمام لام های 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 لام ها از شاهد مثبت و منفی استفاده شد. برای تهیه سرم و ترشحات واژن شاهد مثبت، ۴ خرگوش توسط ۰/۵ میلی لیتر اسپرم موش $4/5 - 3/5$ میلیون اسپرم در یک میلی لیتر) و یک میلی لیتر آدجونت فرونده 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 خرگوش های سالم نیز در همان رقت به عنوان

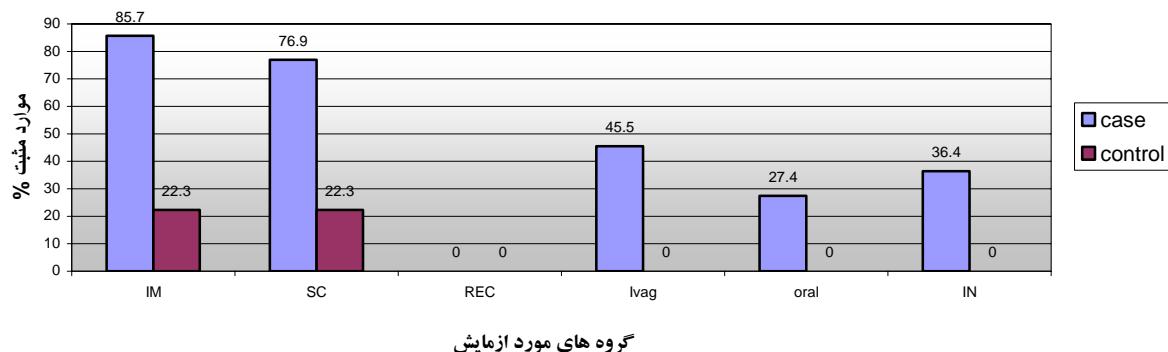
جدول(۱) : موارد مثبت آنتی بادی در سرم موش های مورد و شاهد در روش های مختلف ایمن سازی با اسپرم موش

ینی	دهانی		واژینال		مقدuri		ذیر پوستی		عضلانی		روش ایمنی سازی							
	IN	Oral	Ivag		IR		SC		IM									
جمع	-	+	-	+	جمع	-	+	جمع	-	+	جمع	-	+	وجود آنتی بادی				
						-								گروه				
۱۰	۱۰	-	۱۵	۱۵	-	۱۴	۵	۹	۱۰	۱۰	-	۹	۷	۲	۹	۷	۲	شاهد
۱۱	۷	۴	۱۱	۸	۳	۱۱	۶	۵	۱۱	۱۱	-	۱۳	۳	۱۰	۷	۱	۶	مورد

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

ینی	دهانی	واژینال	مقدuri	ذیر پوستی	عضلانی	روش ایمنی سازی
IN	Oral	Ivag	IR	SC	IM	
$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{5}$	تیتر آنتی بادی
						گروه
-	-	-	-	۴	۵	شاهد
۲	۲	-	۳	-	۵	مورد

درصد موارد مثبت آنتی اسپرم آنتی بادی در گروه های مختلف



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

و در مقایسه بین سه گروه IN , SC, IM یشتربین موارد مثبت در گروه SC مشاهده گردید. Duckworth (1997) هم نشان داد که ایمن سازی سیستمیک علیه اسپرم کامل به صورت معنی داری باروری possum 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

بحث

در تزریق اسپرم کامل به موش های ماده به صورت SC به همراه آدجونت کامل و ناقص فرونند و در روش IN به همراه زنجیره بتای سم ویریوکلر، 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 β -CTS 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 ترشحی 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 ایمونوژن های مختلف در موش^(۱۹,۲۵,۲۶) و در میمون^(۲۷) دیده شده است. استفاده از اسپرم کامل به عنوان آنتی ژن. تشخیص آن^(۲۸) به وسیله IFA و ASA (vaginal washing) شست و شوی واژن) که ممکن است باعث کاهش رقت آنتی بادی در ترشحات گردیده باشد، می تواند دلایلی باشند 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 ایمونولوژی دانشکده پزشکی ساری تشكرون 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). ایمونیزه 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). معتقد است که اسپرم کامل نمی تواند در تهیه واکسن ضدبارداری به کار گرفته شود به این دلیل که بسیاری از آنتی ژنهای 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^(۲,۱۱). مطالعه حاضر، نشان می دهد که وارد کردن اسپرم کامل به همراه آدجونت از طریق SC بیشترین ایمنی زایی را داشته و مخاطرات راه مؤثری برای ایجاد ایمنی بر ایمه 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 مخاطرات 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 (ایمونوفلورسانس غیرمستقیم) نیز از دقت بالایی برای تعیین مقدادر کم آنتی بادی برخوردار نمی باشد.

تزریق اسپرم در هیچکدام از گروه ها باعث ایجاد ASA در مایع Coa حاصل از شستشوی واژینال نشده است. در مطالعه ایمن سازی موش با اسپرم از طریق داخل مقعدی موجب تولید IgA ترشحی شده و عملکرد اسپرم را، مهار و موجب کاهش باروری گردیده است^(۸). هم چنین تجویز داخل معده ای (Intragastric) اسپرم اپیدیدمال 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 -1 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 Microbiology 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 rerognized by antisperm antibodies in patients with infertility and vasectomy*. Journal of Urology 2001; 166(3): 1178-1180.
15. Bernstein DI, Ashley RL, Stanberry LR, Myers MG. *Detection of asymptomatic initial herpes simplex virus (HSV) infection in animals immunized with subunit HSV glycoprotein vaccines*. J Clin Microbiol 1990; 28: ll-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: 1589-1595.

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, Moldoveanu Z, Kiyono H, Marx P, Ehridge JH, Mestecky J, McGhee JR. *Genital Secretory 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. *Immunootherapy 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. *Secretory 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.