

## اتیولوژی و پاتوژنز آنتی اسپرم آنتی بادی

فرهاد شاهسوار<sup>۱</sup>، توماج سابوته<sup>۲</sup>

۱- استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان  
۲- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

یافته / دوره سیزدهم / شماره ۱ / بهار ۹۰ / مسلسل ۴۷

### چکیده

دریافت مقاله: ۸۹/۹/۳، پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۱

**\* مقدمه:** آنتی اسپرم آنتی بادی‌ها (ASA) در مردان و زنان ایجاد می‌شوند و ممکن است به طور قابل توجهی باروری را معیوب نمایند. در این مورد، بیضه یک مکان امن ایمنولوژیک است که در آنجا آنتی ژن‌های سلول ژرم از حمله خودایمنی محافظت می‌شوند. با این وجود، در نتیجه شکسته شدن سد خونی-بیضه‌ای حاصل از آسیب بیضه‌ای یا در نتیجه ضربه به اپیدیدیم یا واژدفران اغلب پروتئین‌های بیضه‌ای در طول برخوردهای ایمنولوژیکی منجر به تشکیل ASA در سرم خون، پلاسمای سمن یا سطح غشا اسپرم، اتوآنتی ژنیک می‌شوند. همچنین گزارش شده است که ASA با التهاب، کریپتورکیدیسم، واریکوسل و مداخله جراحی در اندام‌های تناسلی ارتباط دارد. ASA ممکن است در عملکردهای مختلف اسپرم که برای روندهای باروری ضروری هستند ایجاد اختلال نماید. این مقاله مروری به افزایش فهم ما از مکانیسم‌های اختصاصی که پاسخ خودایمنی به اسپرم را برمی‌انگیزند و پاتوژنز ASA که به ناباروری با واسطه آنتی بادی منجر می‌گردد کمک می‌کند.

**\* واژه‌های کلیدی:** آنتی اسپرم آنتی بادی، ناباروری ایمنولوژیک، اتیولوژی، پاتوژنز

آدرس مکاتبه: خرم آباد، کیلومتر ۳ جاده خرم آباد- بروجرد، پردیس دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی

پست الکترونیک: shahsavarfarhad@yahoo.com

## کلیات

در ایالات متحده آمریکا از هر ۵ زوج در سنین باروری، یک زوج نابارور است. علی‌رغم یک ارزیابی پزشکی دقیق، تقریباً ۱۵ درصد آنها ناباروری تعریف نشده دارند (۱). امروزه مدارک زیادی وجود دارد که از تعدیل ایمنی باروری در بیشتر این زوجها حمایت می‌کند. یکی از جنبه‌های اصلی این تعدیل ایمنی، ممکن است حضور آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی (Antisperm Antibody, ASA) باشد. تحقیق روی آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی‌ها در سال ۱۸۹۹ شروع شد. در آن زمان Land-Steiner گزارش کرد که اسپرم اگر به گونه‌های بیگانه تزریق گردد می‌تواند آنتی‌ژنیک باشد. سپس Metalnikoff دریافت که اسپرم می‌تواند در صورت تزریق به همان گونه نیز آنتی‌ژنیک باشد. تحقیقات اولیه نشان داد که ASA ایجاد شده به طور طبیعی در زنان و مردان می‌تواند یک مکانیسم برای ایجاد ناباروری باشد. Wilson در سال ۱۹۵۴ دو مورد مرد نابارور را گزارش کرد که دارای آگلوتیناسیون خودبخودی اسپرم بودند. این مردان اتوانتی‌بادی‌های طبیعی آگلوتینه کننده اسپرم را در پلاسمای سمن و سرم خود داشتند. بعدها Franklin و Dukes از یک تست میکروسکوپی آگلوتیناسیون اسپرم، برای سرم زنان با ناباروری نامشخص استفاده کردند و نشان دادند که بیش از ۸۰ درصد زنان نابارور، ASA دارند. به هر حال تستی که آنها استفاده کرده بودند میزان مثبت کاذب بالایی داشت زیرا محدوده وسیعی از شیوع ASA را گزارش کرده بودند (۲).

در این مقاله مروری ابتدا به بررسی اتیولوژی تشکیل آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی می‌پردازیم و در ادامه پاتوژنز ناباروری با واسطه آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی را شرح خواهیم داد.

## اتیولوژی تشکیل آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی

## تحمل به اسپرم

لنفوسیت‌های اختصاصی برای آنتی‌ژن‌های خودی، به منظور جلوگیری از واکنش‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های خودی، دچار تحمل یا بی‌پاسخی ایمونولوژیک می‌گردند. شکست تحمل به خود منجر به واکنش‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های خودی می‌شود. چنین واکنش‌هایی خودایمنی نامیده می‌شوند و بیماری‌های خودایمنی را ایجاد می‌کنند. تحمل مرکزی در اندام‌های لنفاوی زایا (تیموس و مغز استخوان) و هنگام برخورد لنفوسیت‌های نابالغ با آنتی‌ژن‌های خودی حاضر در این اندام‌ها القا می‌شود. در حالی که تحمل محیطی هنگامی به وجود می‌آید که لنفوسیت‌های بالغ، آنتی‌ژن‌های خودی را در بافت‌های محیطی و تحت شرایط خاص شناسایی کنند. مکانیسم‌ها اصلی تحمل شامل حذف (آپوپتوز)، آنرژزی (غیرفعال شدن عملکردی) و سرکوب از طریق سلول‌های T تنظیمی می‌باشند. برخی از آنتی‌ژن‌های خودی ممکن است توسط سیستم ایمنی نادیده گرفته شوند و هیچ واکنش قابل شناسایی ایجاد نکنند (۳).

در جوندگان بیان لیگاند Fas بیضوی در سطح اسپرم‌های بالغ، با القا آپوپتوز در لنفوسیت‌های فعال شده حامل Fas، سبب پاسداری بیضه می‌گردد. به عبارت دیگر، حضور Fas در اسپرم‌های بالغ ممکن است بازتاب یک مکانیسم دفاع از خود در مقابل لنفوسیت‌های فعال شده ضداسپرم حاضر در دستگاه تناسلی مردان و زنان باشد. از طرفی، از آنجایی که تحمل به خود در طول زندگی جنینی و پس از عرضه و شناسایی آنتی-ژن‌های خودی رخ می‌دهد، آنتی‌ژن‌های اسپرم که در طول

وزن مولکولی تقریباً ۳۴-۱۸KD می‌باشد که اتصال اسپرم- تخمک را مهار می‌کند(۸).

### فرضیه‌های تشکیل آنتی اسپرم بادی

دو فرضیه برای تشکیل ASA در مردان وجود دارد :

۱- شکسته شدن سد خونی بیضه‌ای و ایجاد خودایمنی

#### نسبت به اسپرم

از نظر تئوری، سد خونی- بیضه‌ای ممکن است به وسیله مکانیسم‌های مختلفی شکسته شود و آنتی‌ژن‌های ایمونولوژیک اسپرم با سیستم ایمنی مواجه گردند. در نهایت این برخورد می‌تواند یک پاسخ ایمنی ایجاد کند که به واکنش التهابی و تشکیل ASA منجر می‌گردد (۹).

الف- وازکتومی و برگرداندن وازکتومی: انسداد مکانیکی دستگاه تناسلی ممکن است در نتیجه وازکتومی ایجاد گردد (۱۰) ، (۱۱). برگرداندن وازکتومی، در مردان بعد از وازکتومی شایع می‌باشد. چندین گزارش پیشنهاد می‌کند که بین ۷۰-۵۰ درصد این مردان، بعدها ASA سرمی مثبت خواهند داشت (۲، ۱۲).

ب- انسداد وازدفران در فیبروز سیستیک (Cystic Fibrosis, CF): انسداد وازدفران در مردان با CF شایع است. Vazquez-Levin و همکاران ارتباط بین انسداد ثانویه وازدفران در CF و تشکیل ASA را با استفاده از IBT بررسی کردند. تنها ایزوتیپ آنتی‌بادی شناسایی شده در بیماران CF نوبالغ بود. این یافته نشان داد که تشکیل ASA در این مردان، به جهت مواجهه اخیر با اسپرم می‌باشد (۱۳).

ج- انسداد وازدفران به دنبال ترمیم فتق اینگواینال بچگی : Matsuda و همکاران ابتدا گزارش کردند که برخی بیماران نابارور مرد، انسداد یک طرفه یا دوطرفه وازدفران به دنبال ترمیم فتق اینگواینال بچگی دارند(۱۴). آنها بعداً از IBT غیرمستقیم جهت آزمایش سرم ۱۳ مورد از این مردان استفاده

زندگی جنینی حاضر نیستند شناسایی نمی‌شوند و بعداً به عنوان غیرخودی می‌توانند سبب تولید ASA گردند. به همین دلیل اسپرم‌ها در یک جایگاه مراقبت شده از سیستم ایمنی گسترش می‌یابند. به عبارت دیگر ، تولید اسپرم در یک سن سیتیوم توسعه یافته انجام می‌گیرد که به وسیله سدخونی بیضه‌ای از شناسایی ایمنی محافظت می‌گردد. سدخونی بیضه‌ای در غشای پایه لوله‌های سمی نیفر قرار دارد و از اتصالات محکم بین سلول‌های سرتولی تشکیل می‌گردد(۴).

### آنتی‌ژن‌های اسپرم

Ball و Snow روی ۶۹ سرم و ۹ پلاسما سمن از بیماران نابارور ، با استفاده از عصاره دترجنتی اسپرم به عنوان منبع آنتی‌ژن، آنالیز ایمونوبات انجام دادند. نمونه‌های سرم و پلاسما سمن قبلاً به وسیله تست اتصال ایمونوبند (Immunobead Binding Test, IBT) غیرمستقیم از نظر وجود ASA تست شده بودند. واکنش ایمنی اختصاصی با توجه به نتایج IBT ، با پروتئین‌های با وزن مولکولی ۳۵KD ، ۴۰-۴۵KD ، ۵۴-۵۷KD ، ۶۶KD و ۸۸-۹۰ KD مشاهده گردید. این آنتی‌ژن‌ها احتمالاً در ناباروری ایمونولوژیک درگیر می‌باشند. در این مطالعه ، خصوصیات این پروتئین‌ها نیز تعیین گردید. پروتئین‌های ۸۸KD ، ۶۶KD ، ۳۴KD و ۳۵KD به ترتیب یک پروتئین گلیکوزیله غشا پلاسمایی ، یک پروتئین غیرگلیکوزیله غشا داخلی آکروزومال، یک پروتئین غشا داخلی آکروزومال و یک پروتئین غالب دمی بودند (۵). یک گلیکوپروتئین سطحی اسپرم به نام FA-1 با ناباروری ایمونولوژیک در انسان مرتبط می‌شود. این پروتئین در نواحی آکروزومال، قطعه میانی یا دم قرار دارد، به کونکاناوالین A متصل می‌گردد و به صورت دimer با وزن مولکولی ۴۰-۴۵KD و به صورت منومر با وزن مولکولی ۲۱-۲۲KD بررسی شده است (۶، ۷). SP-10 یک پروتئین داخلی آکروزومال اسپرم انسان با

کردند و IgG و IgA به ترتیب در ۵۴ درصد و ۱۵ درصد بیماران شناسایی شد (۱۵).

د- واریکوسل‌ها: تأثیر واریکوسل‌ها روی ناباروری مردان بحث‌برانگیز است. واریکوسل‌ها در ۱۵-۵ درصد مردان (۱۶) و در ۴۰-۳۰ درصد مردان نابارور (۱۷، ۱۸) وجود دارند. از نظر تئوری، درناژ وریدهای آسیب دیده بیضه ممکن است به آسیب لوله‌های سمی نیفر و در نتیجه تولید ASA منجر گردد (۱۷)، (۱۸). Gilbert و همکاران از روش الیزا جهت نشان دادن وجود ایمونوگلوبولین‌های متصل به اسپرم در ۳۲ درصد مردان نابارور با واریکوسل‌های قابل لمس استفاده کردند. آنها IgA، IgG و IgM را به ترتیب در ۸۵ درصد، ۶۷ درصد و ۷۴ درصد از مردان با ASA یافتند. آنها همچنین یادآور شدند که، مردان با ایمونوگلوبولین‌های متصل به اسپرم، کاهش معنی‌داری در تعداد و تحرک اسپرم و یک افزایش در مورفولوژی غیرطبیعی داشتند. این تغییرات در مردان با ASA سرمی مثبت ولی بدون ایمونوگلوبولین‌های متصل به اسپرم موجود نبود. آنها تصور کردند که در مردان با ایمونوگلوبولین‌های متصل به اسپرم، آسیب‌های شدیدتر اپیدیدیم وجود داشته که منجر به برهم خوردن آنالیز سمن شده است (۱۹). مطالعه شاهسوار و همکاران نیز نشان داد که سابقه واریکوسل با وجود ASA به روش واکنش آنتی گلوبولین مختلط (Mixed Antiglobulin Reaction, MAR) مستقیم ارتباط معنی‌داری دارد (۲۰).

و- لکوسیتواسپرمی: التهاب ممکن است به آسیب دستگاه تناسلی و تشکیل ASA منجر گردد. Korteбani و همکاران جمعیت لکوسیت‌ها را در نمونه سمن ۲۷۹ مرد نابارور آزمایش کردند. ۳۰ درصد از نمونه‌های سمن لکوسیتواسپرمی داشتند. نمونه‌های لکوسیتواسپرمی یک کاهش در تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم نشان دادند. این نمونه‌ها همچنین غلظت فروکتوز سمن کمتری نسبت به نمونه‌های بدون

لکوسیتواسپرمی داشتند. آنتی اسپرم آنتی‌بادی‌ها در گروه گرانولوسیت با غلظت بالا و سطح فروکتوز پایین نسبت به گروه گرانولوسیت با سطح فروکتوز طبیعی شایع‌تر بود. شیوع ASA در مردان با نقص عملکردی وزیکول سمینال، ۳/۳۸ درصد بود، در حالی که شیوع آن در مردان با عملکرد طبیعی وزیکول سمینال، ۱۳ درصد بود. همچنین مردان با عملکرد ضعیف وزیکول سمینال نسبت به مردان با عملکرد طبیعی آن، دارای ماکروفاژ و گرانولوسیت بیشتری بودند. آنها نتیجه گرفتند که بین لکوسیتواسپرمی، نقص عملکردی وزیکول سمینال و وقوع ASA ارتباط وجود دارد (۲۱). Wolff و همکاران ارتباط بین لکوسیتواسپرمی و کاهش در پارامترهای آنالیز سمن را تأیید کردند. آنها یافتند که لکوسیتواسپرمی با کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم، تعداد اسپرم متحرک، سرعت اسپرم و ایندکس حرکت اسپرم مرتبط می‌شود. اگر چه با استفاده از IBT مستقیم، آنها نتوانستند ارتباط بین وجود ASA و لکوسیتواسپرمی را نشان دهند (۲۲).

ر- عفونت‌های تناسلی: ارگاناسم‌هایی که سبب بیماری‌های منتقله از راه جنسی می‌شوند ممکن است آغازگر ASA از طریق روندهای التهابی یا مکانیسم‌های خودایمنی باشند. مطالعات متعددی ثابت کرده‌اند که ذرات باکتریایی، ویروسی و قارچی مختلف ممکن است به غشا خارجی اسپرم متصل شوند. این ذرات ممکن است به عنوان آنتی‌ژن یا هاپتن عمل کنند و یک پاسخ ایمنی را برانگیزند (۲۳، ۲۴). با این وجود Marconi و همکاران ارتباطی میان التهاب و عفونت مزمن دستگاه تناسلی و تشکیل ASA نیافتند (۲۵).

Munoz و Witkin از IBT جهت بررسی کردن ارتباط بین عفونت‌های بدون علامت دستگاه تناسلی مردانه، جمعیت لنفوسیت‌های T نوع  $\beta\alpha$  یا  $\gamma\delta$  و ASA استفاده کردند. آنها نتیجه گرفتند که بین عفونت کلامیدیایی بدون علت در مردان

و عملکرد سلول‌های B افزایش می‌یابد. با توجه به این که سلول‌های T سرکوبگر تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌های B را تنظیم می‌کنند، اگر فعالیت سلول‌های T سرکوبگر کاهش یابد تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌های B افزایش می‌یابد. بنابراین آنها نتیجه گرفتند که احتمالاً عملکرد سلول‌های T سرکوبگر در بیضه نیز از پاسخ ایمنی به اسپرم و تشکیل ASA جلوگیری می‌کند. به عبارت دیگر، کاهش عملکرد سلول‌های T سرکوبگر در بیضه در نهایت ممکن است به تشکیل ASA منجر گردد (۳۶).

### پاتوژنز ناباروری با واسطه آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی

مکانیسم دقیق ایجاد ناباروری با واسطه ASA، نامشخص است. در دستگاه تناسلی مردان یا زنان، ASA ممکن است اثرات زیان‌آوری بر روی بلوغ و عملکرد اسپرم یا کیفیت سمن داشته باشد و با باروری تداخل نماید (۴۰ - ۳۷). جهت باروری لازم است که اسپرم‌ها به اندازه کافی ظرفیت‌یابی یا دیگر تغییرات بلوغی منجر به کسب قدرت باروری را طی کنند. بعلاوه، اسپرم باید مقداری از حرکت رو به جلوی خود را در جهت رسیدن به اووسیت حفظ کند. اسپرم باید به زونا پلوسیدا متصل شود و در آن نفوذ نماید. سرانجام بعد از نفوذ، هسته اسپرم باید از حالت متراکم خارج گردد و تسهیم جنینی آغاز شود.

#### کاهش تعداد اسپرم

ارتباط بین ASA و تعداد اسپرم بحث‌برانگیز است (۴۳ - ۴۱). مطالعه شاهسوار و همکاران نشان داد که تعداد اسپرم کمتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر با ASA به روش MAR مستقیم ارتباط ندارند (۴۴). بدیهی است که کاهش در تعداد اسپرم احتمالاً شانس وقوع باروری را کاهش می‌دهد.

#### کاهش حرکت اسپرم و مختل کردن نفوذ اسپرم به

#### موکوس سرویکس

و خودایمنی به اسپرم یک ارتباط مثبت وجود دارد. در مطالعه آنها از ۴۸ مرد نابارور، ۲۹/۲ درصد IgA ضد کلامیدیا در سمن و یک تعداد افزایش یافته لنفوسیت‌های T $\delta$  را در سمن نشان دادند ولی مردان با IgG یا IgA ضد کلامیدیا در سرم این افزایش را نشان ندادند. نتایج این محققین از این نظریه که واکنش ایمنی می‌تواند در پاسخ به التهاب موضعی در دستگاه تناسلی ایجاد گردد، حمایت کرد (۲۶). در نهایت Greskovich و همکاران از یک مدل رت استفاده کردند و نشان دادند که اولاً ASA ممکن است بعد از اپیدیدیمیت تشکیل شود و ثانیاً پاسخ ASA می‌تواند به وسیله درمان آنتی‌بیوتیک فوری کند گردد (۲۷).

ز- عفونت‌های ادراری: Micic و همکاران نشان دادند که عفونت‌های دستگاه ادراری می‌توانند سبب تشکیل ASA گردند (۲۸). Shahmanesh و همکاران دریافتند که ۱۶/۲ درصد بیماران مبتلا به اورتریت ASA خواهند داشت (۲۹). مطالعه شاهسوار و همکاران نشان داد که سابقه ابتلا به عفونت‌های تناسلی ادراری با وجود ASA به روش MAR مستقیم ارتباط معنی‌داری دارد (۲۰).

ژ- سایر علل: Kalaydjiev و همکاران نشان دادند که اרקیت اریونی با ASA سرمی ارتباط ندارد (۳۰). پیچ خوردگی بیضه، کارسینومای بیضه، کریپتورکیدیسم، آسیب طناب نخاعی و همجنس‌بازی نیز با تشکیل ASA ارتباط دارند (۳۵ - ۳۱).

#### ۲- کاهش سرکوب ایمنی

کاهش سرکوب ایمنی مکانیسم دیگری است که ممکن است به وسیله آن ASA ایجاد گردد. Liu و همکاران جمعیت‌های لنفوسیتی را در خون محیطی ۲۸ مرد دارای ASA با مردان بدون ASA مقایسه کردند. ASA به وسیله تست بی‌حرکت کردن اسپرم یا الایزا بررسی شده بود. آنها یافتند که در مردان دارای ASA عملکرد سلول‌های T کاهش

در ۲۰۹ زوج نابارور استفاده کردند. در این مطالعه، ۲۵ درصد زوج‌های فاقد ASA از کلاس IgA حامله شدند. در مقایسه، هیچ یک از زوج‌های دارای ASA از کلاس IgA حامله نشدند (۵۱). ارتباط قوی بین ASA از کلاس IgA و ناباروری به وسیله Kremer و Jager نیز حمایت شده است (۵۲). آنها نتیجه گرفتند که وجود ASA از کلاس IgA در غشا اسپرم یک زوج نابارور، واکنش متقابل اسپرم با موکوس سرویکس را مختل می‌نماید (۵۱). Menge و Beitner ارتباط بین ASA آگلوتینه کننده و بی حرکت کننده را با تست نفوذ به موکوس سرویکس در ۸۴۶ آنالیز سمن ارزیابی کردند. در تمام موارد، وجود ASA اثر زیان‌آوری روی حرکت اسپرم، نفوذ اسپرم به موکوس سرویکس و مورفولوژی اسپرم داشت (۵۳). Clark جهت بررسی ارتباط بین ایزوتیپ ایمونوگلوبولین و نفوذ اسپرم به موکوس سرویکس از IBT استفاده کرد. او دریافت که در حضور ASA از کلاس IgA حرکت اسپرم مختل می‌گردد. نمونه‌های دارای ASA از کلاس IgA نسبت به نمونه‌های فاقد ASA از کلاس IgA، نفوذ کمتری به موکوس سرویکس داشتند و میزان لرزش بیشتری نشان می‌دادند. این یافته‌ها در هنگامی که ASA از کلاس IgG وجود داشت ثابت نشد (۵۴). لرزش اسپرم عموماً در نمونه‌ها با حرکت رو به جلوی ضعیف مشاهده می‌گردد (۵۵).

#### جلوگیری از واکنش و ادغام اسپرم-تخمک

جلوگیری از واکنش و ادغام اسپرم-اووسیت، مکانسیم قوی دیگری است که ASA ممکن است به وسیله آن باروری را با شکست مواجه نماید (۵۶). آنتی‌بادهای بی‌حرکت‌کننده اسپرم ممکن است از انجام ظرفیت‌یابی اسپرم جلوگیری نمایند (۵۷). بعلاوه، آنتی‌بادهای بی‌حرکت‌کننده اسپرم با منشا خارجی از انجام واکنش آکروزومی خود بخودی یا القا شده جلوگیری می‌کنند (۵۸، ۵۹).

آنتی‌اسپرم آنتی‌بادهای ممکن است عملکرد طبیعی اسپرم را با آسیب به حرکت اسپرم، مختل کنند. این اختلال ممکن است بعد از برخورد با ASA در حضور کمپلمان هترولوگ اتفاق افتد (۴۵، ۴۶). آنالیز سمن با کمک کامپیوتر جهت ارزیابی پارامترهای مختلف حرکت اسپرم، شامل میدان حرکت سر اسپرم، سرعت حرکت خطی، حرکت مستقیم و حرکت منحنی و درصد حرکت استفاده می‌شود. اثر ASA روی نتایج آنالیز سمن با کمک کامپیوتر بحث برانگیز است (۴۲، ۴۷). Munuce و همکاران نشان دادند که بین حضور ASA و حرکت اسپرم حاصل از آنالیز سمن با کمک کامپیوتر ارتباطی وجود ندارد (۴۸). Check و همکاران از IBT مستقیم برای بررسی اثر ASA روی آنالیز سمن با کمک کامپیوتر در ۲۳۹ مرد استفاده کردند. آنها گزارش دادند که ۱۰ درصد مردان ASA مثبت قوی، ۴/۶ درصد مردان ASA مثبت ضعیف و ۸۵/۴ درصد مردان ASA منفی بودند. همه مردان دارای ASA، کاهش معنی‌داری در سرعت حرکت خطی و درصد حرکت داشتند. این مطالعه از مطالعات قبلی انجام شده به وسیله Upadhyaya و همکاران و Mathur و همکاران حمایت کرد (۴۲). در آن مطالعات نیز مردان با ASA، کاهش در سرعت حرکت خطی و درصد حرکت داشتند (۴۳، ۴۹). مطالعه شاهسوار و همکاران نشان داد که در آنالیز سمن حرکت کمتر از ۵۰ درصد به طور معنی‌داری با ASA به روش MAR مستقیم ارتباط دارد (۴۴).

اسپرم با حرکت غیرطبیعی ممکن است در موکوس سرویکس نفوذ ننماید. Steen و همکاران یافتند که مردان دارای ASA علیه قطعه میانی اسپرم در سرم یا سمن نسبت به مردان بدون ASA، نفوذ کمتری به موکوس سرویکس دارند (۵۰). Eggert-Kruse و همکاران از تست MAR جهت ارزیابی اثر ASA روی نفوذ اسپرم به موکوس سرویکس

(۶۵) و Liu و همکاران (۶۶) با استفاده از IBT تأیید کردند که ASA اتصال اسپرم به زونا پلوسیدا را مهار کند.

#### سیتوتوکسیسیتی اسپرم با واسطه کمپلمان

Mathur و همکاران اثر سیتوتوکسیک ASA و کمپلمان دست نخورده را در سرم، مایع سمن و موکوس سرویکس ۹۳ زوج نابارور و ۴۰ زوج بارور آزمایش کردند (۴۱، ۶۷). هنگامی که اسپرم‌ها با سرم‌های مردان یا زنان دارای ASA انکوبه شدند، کاهش فاحشی در بقا آزمایشگاهی اسپرم‌ها دیده شد. همچنین هنگامی که اسپرم‌ها با پلاسمای سمن یا موکوس سرویکس مردان یا زنان دارای ASA انکوبه شدند، کاهش معنی‌داری در حرکت و بقا اسپرم‌ها مشاهده گردید. اگر چه مایع سمن تحت شرایط فیزیولوژیک طبیعی حاوی کمپلمان نمی‌باشد ولی کمپلمان ممکن است بعد از یک آسیب در سیستم انزالی نشت نماید (۴۲).

#### سیتوتوکسیسیتی اسپرم با واسطه نوتروفیل و

##### وابسته به کمپلمان

سیتوتوکسیسیتی اسپرم با واسطه نوتروفیل و وابسته به کمپلمان ممکن است مکانیسم دیگری جهت ایجاد ناباروری توسط ASA باشد. غشا پلاسمایی اسپرم حاوی آنتی‌ژن‌های اختصاصی می‌باشد که در آسیب اسپرم با واسطه نوتروفیل درگیر می‌باشند (۶۸، ۶۹). نوتروفیل‌ها و کمپلمان‌ها هر دو در دستگاه تولید مثل زنان وجود دارند. تحت شرایط طبیعی، بیان مهار کننده‌های کمپلمان از قبیل CD35 (رستپور C3b و C4b)، CD46 یا پروتئین کوفاکتور غشا (Membrane Cofactor Protein, MCP)، CD55 یا فاکتور تسریع کننده زوال (Decay Accelerating Factor, DAF) و CD59 یا مهار کننده کمپلکس حمله به غشا بر روی غشا پلاسمایی خارجی اسپرم از آسیب به اسپرم جلوگیری می‌نماید. البته این مهار کننده‌های کمپلمان ممکن است توسط ASA

ASA به عنوان عامل بلوک کننده ممکن است نفوذ اسپرم به زونا پلوسیدا را مهار کند (۵۹، ۶۰). Bronson و همکاران از تست نفوذ به تخمک بدون زونای هامستر استفاده کردند و نشان دادند که ASA نفوذ آزمایشگاهی اسپرم را کاهش می‌دهد (۶۱). این موضوع توسط Francavilla و همکاران تأیید نشد (۶۲). نتایج مختلف این مطالعات ممکن است ناشی از وجود ASA در طول تلقیح سمن به تخمک هامستر در مطالعه Bronson و همکاران باشد.

Wolfe و همکاران نیز پیشنهاد کردند که ASA از کلاس IgG و IgA می‌تواند ادغام غشا اسپرم-اووسیت را مختل نماید. ۲۹ زوج که قبلاً در لقاح آزمایشگاهی (In Vitro Fertilization, IVF) با شکست مواجه شده بودند با بزرگتر یا مساوی ۶۰ درصد اسپرم دارای یک کلاس ASA تحت تلقیح تحت زونایی اسپرم (Subzonal Sperm Insemination, SUZI) قرار گرفتند. درصد اسپرم‌های پوشیده شده با IgA در سیکل‌های باروری ناموفق نسبت به سیکل‌های موفق به طور معنی‌داری بالاتر بود. در این مطالعه با افزایش IgA متصل به اسپرم میزان باروری کاهش یافت. آنها در بیشتر شکست‌های باروری، ASA متصل به سر اسپرم را نشان دادند (۶۳). بعدها مطالعات شاهسوار و همکاران بر روی ۸۰ زوج نابارور تحت IVF نیز این موضوع را تأیید کردند (۳۹، ۴۰).

تأثیر ASA روی نفوذ اسپرم به زونا پلوسیدا، بار دیگر توسط Tsukui و همکاران با تست بی‌حرکت کردن اسپرم روی سرم ۱۶۰ زن نابارور ارزیابی گردید. آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی‌ها در ۶/۹ درصد زنان نابارور مشخص گردید. اسپرم‌های انکوبه شده با سرم‌های ASA مثبت در مقایسه با اسپرم‌های انکوبه شده با سرم‌های ASA منفی، اتصال کمتری به زونا پلوسیدا داشتند (۶۴). به علاوه، مطالعات انجام شده توسط De Almedia و Zouari

بیضه‌ای یا در نتیجه ضربه به اپیدیدیم یا واژدفران شکسته شود و آنتی‌ژن‌های ایمونولوژیک اسپرم با سیستم ایمنی مواجه گردند. در نهایت این برخورد می‌تواند به ایجاد یک پاسخ ایمنی و تشکیل ASA منجر گردد.

اگر چه برخی محققین به شیوع ASA در بیماران نابارور تاکید داشته‌اند، ولی برخی دیگر ASA را در درصد نسبتاً بالایی از مردان و زنان بارور نیز نشان داده‌اند. با این وجود مطالعات تحقیقاتی در سیستم‌های حیوانی و انسانی نشان داده‌اند که وجود ASA می‌تواند با باروری تداخل نماید.

ASA روی سطح اسپرم و در ترشحات تناسلی در پاتوژنز ناباروری دخیل است، در حالی که اهمیت کلینیکی ASA سرم بحث برانگیز می‌باشد. بعلاوه، ASA متصل به سطح اسپرم (روی ناحیه آکروزومال سراسپرم و دم اسپرم) ممکن است با گسترش اولیه جنینی تداخل نماید. اطلاعات موجود از این فرض حمایت می‌کنند که ASA متصل آنتی‌ژن‌های سر اسپرم بیشترین تاثیر را در معیوب کردن عملکرد اسپرم دارد. بنابراین وجود ASA به عنوان فاکتور ایمونولوژیک، یکی از علل اصلی ناباروری مردان در نظر گرفته می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از راهنمایی‌های با ارزش جناب آقای دکتر عبدالرضا خیرالهی استادیار گروه ارولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تقدیر و تشکر می‌گردد.

بلوک شوند. D, Cruz و Haas بیان این مهار کننده‌های کمپلمان را در اسپرم تحت شرایط ظرفیت‌یابی ارزیابی کردند. CD59 و CD55 روی آکروزوم دست نخورده و اسپرم واکنش آکروزومی انجام داده بیان شدند ولی CD46 تنها بعد از انجام واکنش آکروزومی بیان شد. آنها پیشنهاد کردند که چون CD55 و CD59 با منشا خارجی می‌تواند در آزمایشگاه جزیی از غشاهای سلولی گردد، اضافه نمودن این پروتئین‌های نو ترکیب به اسپرم ASA مثبت ممکن است آسیب با واسطه کمپلمان را محدود نماید (۷۰).

### مهار تسهیم و گسترش اولیه جنین

ASA همچنین ممکن است اثر زیان‌آوری بر روی گسترش اولیه جنینی و جایگزینی پس از باروری داشته باشد. Naz پیشنهاد کرد که آنتی‌ژن‌های اختصاصی غشا اسپرم یک سیگنال تسهیم ایجاد می‌کنند که در نهایت سبب تقسیم اووسیت می‌گردد. ASA علیه این آنتی‌ژن‌ها می‌تواند تسهیم را مهار نماید (۷۱).

### سقط

سرانجام ASA ممکن است نقش مهمی در از دست رفتن حاملگی بازی کند (۷۲). Witkin و Chaudhry ارتباط بین شیوع ASA در سرم زنان و سقط‌های راجعه را گزارش کردند (۷۳). این ارتباط توسط Witkin و David نیز تأیید گردید (۷۴). ولی این ارتباط توسط Steeg و همکاران مورد حمایت قرار نگرفت (۷۵). البته نتایج مختلف مطالعات ممکن است ناشی از اختلاف در روش تعیین ASA باشد (۷۶).

### بحث و نتیجه‌گیری

بیضه یک مکان امن ایمونولوژیک است که در آنجا آنتی‌ژن‌های سلول ژرم از حمله خودایمنی محافظت می‌شوند. با این وجود، سدخونی-بیضه‌ای ممکن است به وسیله آسیب

## References

1. Wallach EE, Zacur HA. Reproductive Medicine and Surgery. Baltimore: Mosby, 1995
2. Li TS. Sperm immunology, infertility and fertility control. *Obstet Gynecol.* 1974;44:607-623.
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular immunology. Philadelphia: Saunders, 2007
4. D'Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, Padula F, Mcciaccia B, De Cesaris P et al. Testicular FasL is expressed by sperm cells. *PNAS.* 2001;98:3316-3321
5. Snow K, Ball GD. Characterization of human sperm antigens and antisperm antibodies in infertile patients. *Fertil Steril.* 1992;58:1011-1019
6. Bronson RA, Cooper GW, Margalioth EJ, Naz RK, Hamilton MS. The detection human sera of antisperm antibodies reactive with FA-1, and evolutionarily conserved antigen, and with murine spermatozoa. *Fertil Steril.* 1989;52:457-462
7. Naz RK, Alexander NJ, Isahakia M, Hamilton MS. Monoclonal antibody against human germ cell glycoprotein that inhibits fertilization. *Science.* 1984;225:342-344
8. Herr JC, Filckinger CJ, Homyk M, Klotz K, John E. Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP-10 from human sperm. *Biol Reprod.* 1990;42:181-193
9. Wang XW, Ding GR, Shi CH, Zeng LH, Liu JY, Li J et al. Mechanisms involved in the blood-testis barrier increased permeability induced by EMP. *Toxicology.* 2010;276(1):58-63
10. Alexander NJ, Anderson DJ. Vasectomy: consequences of autoimmunity to sperm antigens. *Fertil Steril.* 1979;32:253-260
11. Mandelbaum SL, Diamond MP, De Cherney AH. The impact of antisperm antibodies on human infertility. *J Urol.* 1987;138:1-8
12. Linnet L. Clinical immunology of vasectomy and vasovasostomy. *Urology.* 1983;22:101-114
13. Vazquez-Levin MH, Kupchick GS, Torres Y, Chaparro CA, Shtainer A, bonforte RJ. Cystic fibrosis and Congenital agenesis of the vas deferens, antisperm antibodies and CF-genotype. *J Reprod Immunol.* 1994;27:199-212
14. Matsuda T, Horii Y, Yoshida O. Unilateral obstruction of the vas deferens caused by childhood inguinal herniorrhaphy in male infertility patients. *Fertil Steril.* 1992;58:609-613
15. Matsuda T, Muguruma K, Horii Y, Ogura K, Yushida O. Serum antisperm antibodies in men with vas deferens caused by childhood inguinal herniorrhaphy. *Fertil Steril.* 1993;59:1095-1097
16. Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest.* 1981;68:39-45
17. Dubin L, amelar RD. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril.* 1971;22:469-481
18. Stewart BH. Varicocele in infertility: incidence and results of surgical therapy. *J Urol.* 1974;112:222-228

19. Gilbert BR, Witkin SS, Goldstein M. Correlation of sperm-bound immunoglobulins with impaired semen analysis in infertile men with varicoceles. *Fertil Steril*.1989;52:469-473
20. Shahsavar F, Kheirollahi AR, Assadifar B, Tarrahi MJ. Antisperm antibody and the risk factors of its formation in infertile men. *Qom University of Medical Sciences Journal*.2007;2:39-44 (In Persian)
21. Kortebani G, Gonzales GF, Barrera C, Mazzolli AB. Leukocyte populations in semen and male accessory gland function: relationship with antisperm antibodies and seminal quality. *Andrologia*.1992;24:197-204
22. Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril*.1990;53:528-536
23. Eggert-Kruse W, Buhlinger-Gopfarth N, Rohr G, Probst S, Aufenenger J, Naher H. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in semen and relationship with parameters of male fertility. *Hum Reprod*.1996;11:1408-1417
24. Witkin SS, Kligman I, bongiovanni AM. Relationship. Between asymptomatic male genital tract exposure to *Chlamydia trachomatis* and an autoimmune response to spermatozoa. *Hum Reprod*.1995;10:2952-2955
25. Marconi M, Nowotny A, Pilatz P, Diemer T, Weidner W. Antisperm antibodies detected by mixed agglutination reaction and immunobead test are not associated with chronic inflammation and infection of the seminal tract. *Andrologia*.2008;40:227-234
26. Munoz MG, Witkin SS. Autoimmunity to spermatozoa, asymptomatic *Chlamydia trachomatis* genital tract infection and  $\gamma\delta$  T lymphocytes in seminal fluid from the male partners of couples with unexplained infertility. *Hum Reprod*.1995;10:1070-1074
27. Greskovich F, Mathur S, Nyberg LM Jr, Collins BS. Effect of early antibiotic treatment on the formation of sperm antibodies in experimentally induced epididymitis. *Arch Androl*.1993;30:183-191
28. Micic S, Petrovic S, Dotlic R. Seminal antisperm antibodies and genitourinary infection. *Urology*.1990;35:54-56
29. Shahmanesh M, Stsdronska J, Hendry WF. Antispermatozoal antibodies in man with urethritis. *Fertil Steril*.1984;46:308-311
30. Kalaydjiev S, Dimitrova D, Tsvetkova P, Tsvetkov D. Serum sperm antibodies unrelated to mumps orchitis. *Andrologia*.2001;33:69-70
31. Kurpisz M, Mazurkiewicz, Fernandez N. Morphological and immunological observations in experimentally induced torsion of testes in rats. *Am J Reprod Immunol Microbiol*.1985;9:129-135
32. Guazzei S, Lembo A, Ferro G, Artibani W, Merol J, Zanchetta R. Sperm antibodies and infertility in patients with testicular cancer. *Int J Androl*.1991;14:179-185
33. Kurpisz M, Havryluk A, Nakonechnyj A, Chopyak V, Kamieniczna M. Cryptorchidism and long-term consequences. *Reprod Biol*.2010;10(1):19-35
34. Beretta G, Zanolla A, Chelo E, Livi G. Seminal parameters and autoimmunity in paraplegic/quadriplegic men. *Acta Eur Fertil*.1987;1:203-205
35. Wolff H, Schill WB. Antisperm antibodies in infertile and homosexual: relationship to

- serologic and clinical findings. *Fertil Steril*.1985;44:673-677
36. Liu J, Zhang Y, shen G, Wang X, Su N, Zhu H. An approach to pathogenesis of male infertility with antisperm antibodies. *Int J Fertil*.1993;38:187-191
37. Haidl G. Characterization of fertility related antisperm antibodies: a step towards causal treatment of immunological infertility and immuno-contraception. *Asian J Androl*.2010;12: 793-794
38. Cline AM, Kutteh WH. Is there a role of autoimmunity in implantation failure after in-vitro fertilization? *Curr Opin Obstet Gynecol*.2009;21(3):291-295
39. Rezaei A, Nasr Esfahani MH, Adib M, Shahsavar F, Oreizi F. Relationship between in vitro fertilization rate and level of antisperm antibody in seminal plasma measured by flow cytometry. *Reproduction and Infertility*.2004;5:35-43 (In Persian)
40. Shahsavar F, Rezaei A, Nasr Esfahani MH, Kheirollahi AR, Farhadi A. The effect of antisperm antibodies measured by direct mixed agglutination reaction on in vitro fertilization rate. *Yafte*.2004;20:51-57 (In Persian)
41. Mathur S, Rosenlund C, Carlton M, Caldwell J, Barber M, Rust PF. Studies on sperm survival and motility in the presence of cytotoxic sperm antibodies, and *J Reprod Immunol Microbiol*.1988;17:41-47
42. Check JH, Adelson HG, Bollendorf A. Effect of antisperm antibodies and on computerized semen analysis. *Arch Androl*.1991;27:61-63
43. Upadhyaya M, Hibbard BM, Walker SM. Antisperm antibodies and male infertility. *Br J Urol*.1984;56:531-536
44. Shahsavar F, Kheirollahi AR, Farhadi A. Relationship between antisperm antibodies and semen parameters. *Yafte*.2004;21:37-42 (In Persian)
45. Isojima S. Sperm antibodies detected by immobilization. In: Mathur S, Fredericks CM. *Fundamentals of Immunoreproduction: Conception and Contraception*. Washington: Hemisphere Publishing Company,1988
46. Marange-pangan S, Behraman SJ. Spermatoxicity of immune sera in human infertility. *Fertil Steril*.1971;22:145-156
47. Mathur S, Williamson HO, Baker ME, Rust PF, Holtz GL, Fudenberg HH. Sperm motility on Postcoital testing correlates with male autoimmunity to sperm. *Fertil Steril*.1971; 22:145-156
48. Munuce MJ, Berta CL, Pauluzzi F, Caille AM. Relationship between antisperm antibodies, sperm movement, and semen quality. *Urol Int*.2000;65:200-203
49. Mathur S, Barber M, Carlton M, Ziegler J, Williamson HO. Motion characteristics of spermatozoa from men with cytotoxic sperm antibodies. *Am J Reprod Immunol Microbiol*.1986;12:87-89
50. Steen Y, Forssman L, Lonnerstedt E, Jonasson K, Wassen AC, Lycke E. Antisperm IgA antibodies against the equatorial segment of the human spermatozoa are associated with impaired sperm penetration and subfertility. *Int J Fertil*.1994;39:52-56
51. Eggert-Kruse W, Hofsab A, Haury E, Tilgen W, Gerhard I, Runnebaum B. Relationship between local antisperm antibodies and sperm-mucus interaction in vitro and in vivo. *Hum Reprod*.1991;6:267-276

52. Kremer J, Jager S. The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Hum Reprod.*1992;7:781-784
53. Menge AC, Beitner O. Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril.*1989;51:486-492
54. Clarke GN. Immunoglobulin class and regional specificity of antispermatozoal autoantibodies blocking cervical mucus penetration by human spermatozoa. *Am J Reprod Immunol Microbiol.*1988;16:135-138
55. De Almeida M, Zouari R, Jounnet P, Feneux D. In vitro effects of antisperm antibodies on human sperm movement. *Hum Reprod.*1991;6:405-410
56. Funn CH, Lee CYG. Monoclonal antibodies affecting sperm-zona binding and/or zona-induced acrosome reaction. *J Reprod Immunol.*1992;21:175-187
57. Bandoh R, Yamano S, Kamada M, Daitoh T, Aono T. Effect of sperm-immobilizing antibodies on the acrosome reaction of human spermatozoa. *Fertil Steril.*1992;57:387-392
58. Tasdemir I, Tasdemir M, Fukuda J, Kodama H, Matsui T, Tanaka T. Effect of sperm-immobilizing antibodies on the spontaneous and calcium-ionophore (A23187) induced acrosome reaction. *Int J Fertil.*1995;40:192-195
59. Cheng GY, Shi JL, Wang M, Hu YQ, Liu CM, Wang YF et al. Inhibition of mouse acrosome reaction and sperm-zona pellucida binding by anti-human sperm membrane protein 1 antibody. *Asian J Androl.*2007;9:23-29
60. Mahony MC, Alexander NJ. Sites of antisperm antibody action. *Hum Reprod.*1991;6:1426-1430
61. Bronson RA, Copper GN, Rosenfeld DL. Ability of antibody-bound human sperm to penetrate zona-free hamster ova in vitro. *Fertil Steril.*1981;36:778-783
62. Francavilla F, Romano R, Santucci R. Effect of sperm-antibodies on acrosoma reaction of human sperm used for the hamster egg penetration assay. *Am J Reprod Immunol.*1991;25:77-80
63. Wolfe JP, DeAlmeida M, Ducot B, Rodrigues D, Jounnet P. High levels of sperm-associated antibodies impair human sperm oolemma interaction after subzonal insemination. *Fertil Steril.*1995;63:584-590
64. Tsukui S, Noda Y, Yano J, Fukuda A, Mori T. Inhibition of sperm penetration through human zona pellucida by antisperm antibodies. *Fertil Steril.*1986;46:92-96
65. Zouari R, De Almeida M. Effect of sperm Associated antibodies on human sperm ability to bind to zona pellucida and to penetrate zona-free hamster oocytes. *J Reprod Immunol.*1993;24:175-186
66. Liu DY, Clarke GN, Baker HWG. Inhibition sperm-zona pellucida and sperm-oolemma binding by antisperm antibodies. *Fertil Steril.*1991;55:440-442
67. Mathur S, Williamson HO, Derrick FC, Madyastha PR, Melchers JT, Holtz GL. A new

- microassay for spermocytotoxic antibodies in couples with unexplained infertility. *J Immunol*.1981;126:905-909
68. D,Cruz OJ, Haas GG.  $\beta$ 2-Intgrin (CD11b/CD18) is the seminal plasma adhesive glycoprotein complex involved in neutrophil-mediated immune injury to human sperm. *Boil Reprod*.1990;53:1118-1130
69. D,Cruz OJ, Haas GG. Lack of complement activation in the seminal Plasma of men with antisperm antibodies associated in vivo on their sperm. *Am J Reprod Immunol*.1990;24:51-57
70. D,Cruz OJ, Haas GG. The expression of the complement regulators CD46, CD55 and CD59 by human sperm does not protect them from antisperm antibody and complement mediated immune injury. *Fertil Steril*.1993;58:876-884
71. Naz RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol Reprod*.1992;46:130-139
72. Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, Repping S, Sch?ls W, van der Veen F et al. Immunoglobulin G antisperm antibodies and prediction of spontaneous pregnancy. *Fertil Steril*.2009;92(5):1659-1665
73. Witkin SS, Chaudhry A. Association between recurrent spontaneous abortions and circulating IgA antibodies to sperm tails in women. *J Reprod Immunol*.1989;15:151-158
74. Witkin SS, David SS. Effect of sperm antibodies on pregnancy outcome in a subfertile population. *Am J Obstet Gynecol*.1988;158:59-62
75. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, Habbema JD, Hompes PG, Broekmans FJ et al. Pregnancy is predictable: a large-scale prospective external validation of the prediction of spontaneous pregnancy in subfertile couples. *Hum Reprod*.2007;22(2):536-542
76. Shahsavar F, Rezaei A, Nasr Esfahani MH, Assadifar B, Nasiri MR, Jafari M et al. Detection of antisperm antibodies by indirect flow cytometry: comparison with direct mixed agglutination reaction test. *Qom University of Medical Sciences Journal*.2007;3:25-30 (In Persian)

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.