مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۰۵/هفته دوم آذر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۲۵

بررسی ارتباط بین پروتئین اتصال دهنده‌ی غشای اسپرم و تخمک با میزان موفقیت روش درمانی تزریق درون رحمی اسپرم (IUI)

رحیمه سیفعلی[۱]، دکتر روشنک ابوترابی[۲]، دکتر عبدالحسین شاهوردی[۳]، دکتر بیتا ابراهیمی[۴]، فاطمه مازنی[۵]، وحید اسماعیلی[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لقاح در پستانداران، وابسته به اتصال موفق بین غشای پلاسمایی اسپرم و تخمک می‌باشد. فرایند اتصال گامت‌ها (لقاح) تا حد زیادی در موش مورد مطالعه قرار گرفته است و نقش CD۹ که عضوی از خانواده‌ی تتراسپانین‌ها می‌باشد، در اتصال گامت‌ها در موش اثبات شده است. CD۹ یک پروتئین موجود در غشای داخلی آکروزوم در اسپرم می‌باشد و فقط مقدار کمی از CD۹ در غشای پلاسمایی پوشاننده‌ی قطعه‌ی میانی اسپرم بیان می‌شود. پروتئین‌های غشای داخلی آکروزوم، نقش مهمی در فرایند لقاح ایفا می‌کنند. هدف از این مطالعه، به دست آوردن ارتباط بین درصد اسپرم‌های CD۹ مثبت با نتایج درمان به روش تلقیح درون رحمی اسپرم بود.

روش‌ها: در مجموع ۱۲۰ نمونه‌ی مایع منی به طور تصادفی از زوج‌های نابارور مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان که تحت درمان به روش IUI (Intrauterine insemination) قرار گرفتند، جمع‌آوری شد. پارامترهای اسپرمی (تحرک، مورفولوژی، غلظت اسپرمی، شمارش اسپرمی و کشسانی) بر اساس (دستورالعمل) WHO ۲۰۱۰ (World Health Organization ۲۰۱۰) مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌ها شسته شد و رنگ‌آمیزی ایمنی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD۹ انجام شد. سپس نمونه‌ها به وسیله‌ی تکنیک فلوسیتومتری آنالیز شدند.

یافته‌ها: CD۹ تنها در ۱۹ درصد اسپرم‌های بالغ شناسایی شد. با توجه به نتایج سطح زیر منحنی ROC (Receiver operating characteristic) که برابر ۰/۴۴۶ است، CD۹ متغیر پیش‌بینی کننده‌ی خوبی برای وضعیت باروری نیست (P = ۰/۴۸۲).

نتیجه‌گیری: ارتباط معنی‌داری بین بیان پروتئین CD۹ در نمونه‌های اسپرمی و نتایج حاصل از درمان به روش تلقیح درون رحمی اسپرم مشاهده نگردید.

واژگان کلیدی: پارامترهای اسپرم، CD۹، فلوسیتومتری، تلقیح درون رحمی اسپرم

ارجاع: سیفعلی رحیمه، ابوترابی روشنک، شاهوردی عبدالحسین، ابراهیمی بیتا، مازنی فاطمه، اسماعیلی وحید. **بررسی ارتباط بین پروتئین اتصال دهنده‌ی غشای اسپرم و تخمک با میزان موفقیت روش درمانی تزریق درون رحمی اسپرم (IUI).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۵): ۱۷۰۵-۱۶۹۸

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و آزمایشگاه نازایی، بیمارستان شهید بهشتی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۶- کارشناس ارشد، گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر عبدالحسین شاهوردی
Email: shahverd2002@yahoo.com

مقدمه

اختلال باروری، فیزیوپاتولوژی چند عاملی دارد و در جامعه به صور علل مردانه، علل زنانه مشاهده می‌گردد. در این میان، عوامل ناباروری با علت مردانه ۵۰-۴۰ درصد موارد ناباروری زوج‌ها را تشکیل می‌دهد (۲-۱). یکی از علل شایع ناباروری در مردان، نقص در عملکرد اسپرم می‌باشد. بسیاری از عوامل محیطی، ژنتیکی و فیزیولوژیکی، در عملکرد ضعیف اسپرم نقش دارند. بنابراین شناخت این عوامل و شرایطی که بر فعالیت طبیعی اسپرم اثر می‌گذارند، می‌توانند در درمان بیماران مؤثر باشند. یکی از این عوامل، نشانگرهایی هستند که روی غشای اسپرم قرار دارند. آمیزش اسپرم و تخمک در نتیجه‌ی تعاملات بین یک سری مولکول‌ها شامل اینتگرین در تخمک، فرتیلین در اسپرم و دو عضو خانواده‌ی تتراسپانین‌ها شامل CD۹ و CD۸۱ انجام می‌پذیرد (۳، ۱).

CD۹ یک نشانگر ایمونولوژیکی سطح سلول و از اعضای خانواده‌ی تتراسپانین‌ها (پروتئین‌های نوع ۳ غشایی) می‌باشد (۶-۴). خانواده‌ی تتراسپانین‌ها در بسیاری از گونه‌ها یافت می‌شوند (۷). CD۹ در مغز استخوان، مغز و عضله بیان می‌شود (۱۰-۸). برخی سلول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی جنینی، هماتئوپوئتیک، سلول‌های عصبی و سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال نیز این مولکول را بیان می‌کنند (۱۱). در سلول‌های جنسی شامل اسپرم و تخمک نیز CD۹ بیان می‌شود و برای لقاح ضروری می‌باشد. علاوه بر این در مهاجرت، تقسیم سلول و چسبندگی سلولی نقش ایفا می‌کند (۱۴-۱۲).

در سیستم تناسلی بیان CD۹ در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال و در سلول‌های اسپرمی بالغ می‌باشد (۵-۴، ۱۵) شناخت CD۹ اولین بار در سلول اسپرمی بالغ در موش و در سال ۲۰۱۰ انجام شد (۱۶).

CD۹ در اسپرم یک پروتئین وابسته به غشای داخلی آکروزوم می‌باشد و بیشتر در ناحیه‌ی حاشیه‌ی قدامی آکروزوم قرار می‌گیرد. وزن مولکولی CD۹، ۲۴ kDa است که از جرم سل بیضه‌ای تا اسپرم بالغ بدون تغییر می‌باشد. بعد از واکنش آکروزومی، بیشترین مقدار CD۹ اسپرمی در غشای داخلی آکروزوم باقی می‌ماند، اما مقداری از CD۹ در غشای پلاسمایی پوشاننده‌ی قطعه‌ی میانی به وسیله‌ی آنتی‌بادی CD۹ یافت می‌شود (۱۶). بیان CD۹ در بیضه در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال، نشان دهنده‌ی اهمیت این پروتئین در اسپرماتوژنز می‌باشد. همچنین بیان CD۹ در سر اسپرم در اپیدیدیم (مکانی که بلوغ اسپرم صورت می‌گیرد)، دلالت بر نقش این پروتئین در باروری و آمیزش اسپرم و تخمک دارد. به هر حال، شناخت عوامل مولکولی غشای اسپرم که در بلوغ و کسب قدرت باروری و لقاح موفق دخیل هستند، یکی از عوامل کمک کننده در پیشبرد مطالعات در درمان ناباروری مردان می‌باشد.

در این مطالعه، میانگین درصد بیان CD۹ ارزیابی شد. پارامترهای اسپرمی نیز مورد ارزیابی و آنالیز قرار گرفت. هدف از این مطالعه، یافتن ارتباطی بین درصد بیان CD۹ در اسپرم و رابطه‌ی آن با نتایج تلقیح درون رحمی اسپرم می‌باشد.

روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: این مطالعه، مطالعه‌ای مقطعی (Cross sectional) بود و جمعیت مورد مطالعه ۱۲۰ نفر از زوج‌های نابارور بودند که تحت درمان به

روش IUI (Intrauterine insemination) قرار گرفتند. افراد به طور تصادفی انتخاب شدند. سن مردان بین ۴۰-۲۰ سال و سن زنان ۳۵-۲۰ سال بود و از همه‌ی شرکت کنندگان، رضایت‌نامه‌ی کتبی دریافت شد. تابلوی بالینی آنالیز سیمن (Cymene) مردان انتخاب شده، در محدوده‌ی طبیعی معیار ۲۰۱۰ WHO (World Health Organization ۲۰۱۰) قرار داشت. نمونه‌ی سیمن افراد پس از ۳-۲ روز ممانعت از رابطه‌ی جنسی جمع‌آوری شد. هر نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شد تا فرایند مایع شدن سیمن انجام شود.

آنالیز مایع سیمن: بعد از آبکی شدن سیمن، بخشی از هر نمونه (۵ µl) برای بررسی پارامترهای اسپرمی (تحرک، مورفولوژی، شمارش اسپرمی، الگوهای حرکت اسپرم و زنده بودن اسپرم) مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز سیمن با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار CASA و با توجه به معیار ۲۰۱۰ WHO انجام شد.

آماده‌سازی اسپرم و آنالیز به وسیله‌ی فلوسیتومتری: جداسازی اسپرم: هر نمونه‌ی سیمن با Ham's F۱۰ هم حجم خود رقیق شد. سپس ۲ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه نمونه‌ها با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی خارج شد و اسپرم‌های ته‌نشین شده در ته ظرف باقی ماند. ml ۱ از F۱۰ Ham's که حاوی ۱۰ درصد HSA ۱۰ درصد بود، به آرامی روی نمونه ریخته شد و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C و CO_2 ۵ درصد صورت گرفت. اسپرم‌هایی که تحرک و شناوری خوب و حرکت به سمت بالا داشتند، جمع‌آوری شدند و تعداد اسپرم‌های متحرک ارزیابی شد.

تکنیک فلوسیتومتری برای شناسایی CD۹ اسپرمی: حدود µl ۱۰۰ از سوسپانسیون سلولی که حاوی حداقل ۱ میلیون اسپرم بود، به هر دو لوله‌ی مورد و شاهد اضافه شد. به هر لوله، مقدار µl ۱۰۰ از محلول تثبیت کننده (پارافرمالدئید ۴ درصد) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ ^{o}C انکوبه شد. بعد از گذشت این زمان، نمونه‌ها با محلول PBS منفی شستشو داده شدند. برای نفوذ پذیر کردن غشای اسپرم به منظور نفوذ آنتی‌بادی به داخل سلول‌ها، µl ۱۰۰ از دترجنت (۰/۱ درصد، Triton X۱۰۰) به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید.

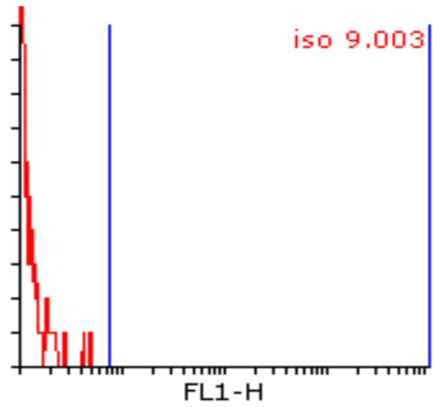
در مرحله‌ی بعد، µl ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۲ درصد FBS (Fetal bovine serum) + PBS (Phosphate buffered saline) روی نمونه‌ها ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون نمونه‌ها انجام شد. برای انجام Immumo staining، به سوسپانسیون سلولی لوله‌ی مورد µl ۲ از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD۹ که کونژوگه با فیکواریترین بود (From Bio legend) اضافه شد (با رقت نهایی ۲:۱۰۰). برای حذف پس زمینه‌ی اضافی در لوله‌ی شاهد، IgG (Immunoglobulin G) سرم موش با مقدار و غلظت مساوی به این لوله اضافه شد. در مرحله‌ی آخر، نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ ^{o}C و در تاریکی انکوبه شدند و سپس نمونه‌ها یک بار با PBS شسته شده و هر نمونه با فلوسیتومتری آنالیز شد.

یافته‌ها

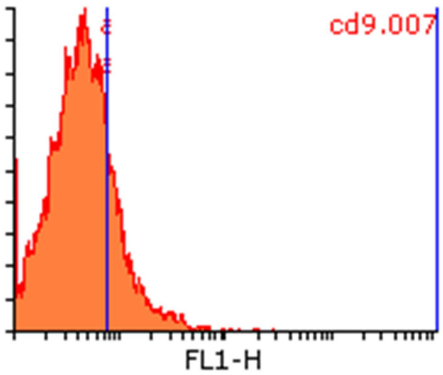
این مطالعه از نوع توصیفی- تحلیلی و مقطعی بود. با استفاده از آزمون‌های t و ROC Curve

(Receiver operating characteristic) داده‌ها آنالیز شد. در ادامه به نتایج آنالیز اشاره می‌گردد.

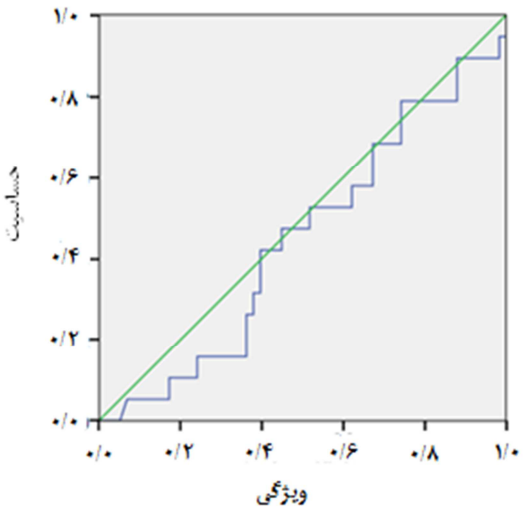
CD۹ فقط در ۱۹ درصد اسپرم‌های بالغ بیان شد (شکل‌های ۱ و ۲). با توجه به این که سطح زیر منحنی برابر با ۰/۴۴۶ بود، بین میزان بیان CD۹ در اسپرم‌ها و نتایج IUI رابطه‌ی مثبتی مشاهده نشد؛ به عبارت دیگر، در این مطالعه CD۹ متغیر پیشگویی کننده‌ی مناسبی برای لقاح و باروری نبود (Area = ۰/۴۴۶، P = ۰/۴۸۲) (شکل ۳).



شکل ۱. هیستوگرام رسم شده، نشان دهنده‌ی رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی شاهد (Mouse serum IgG) برای حذف رنگ پس زمینه‌ی اضافی



شکل ۲. هیستوگرام رسم شده، نشان دهنده‌ی رنگ‌آمیزی CD۹ با آنتی‌بادی اصلی [آنتی‌بادی ثانویه‌ی کونژوگه با PE (Phycoerythrin)] و درصد بیان CD۹



شکل ۳. ROC curve نشان دهنده‌ی رابطه‌ی درصد بیان CD۹ در اسپرم‌ها و نتایج درمان به روش تلقیح درون رحمی اسپرم
Area = ۰/۴۴۶; Std. Error[a] = ۰/۰۷۴;
Asymptotic Siq.[b] = ۰/۴۸۲

همچنین در آنالیز به وسیله‌ی آزمون t، تفاوتی در پارامترهای اسپرمی در افراد باردار و غیر باردار مشاهده نشد.

بحث

تا کنون جزییات کمی از تعداد پروتئین‌های اسپرم که کاندیدای شرکت در آمیزش اسپرم و تخمک بوده‌اند، به دست آمده است.

CD۹ پروتئینی است که در بیشتر سلول‌های بدن بیان می‌شود و عضوی از خانواده‌ی تتراسپانین‌ها می‌باشد و نقش‌های مختلفی ایفا می‌کند (۶-۴). در دستگاه تناسلی مؤنث، حضور CD۹ در غشای تخمک برای لقاح ضروری است (۱۵، ۴). در دستگاه تناسلی مردان، این پروتئین در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال و در اسپرم بالغ اپیدیمی می‌باشد. شناخت CD۹ در سلول اسپرمی بالغ در سال ۲۰۱۰

در موش انجام شد که یک پروتئین وابسته به غشای داخلی آکروزوم می‌باشد (۱۶). کسب CD۹ توسط اسپرماتوزوا در طول عبور اپیدیدیمی آن می‌باشد که وزیکول‌های CD۹ مثبت، این مولکول را به سطح اسپرم در ناحیه‌ی غشای داخلی آکروزوم و غشای پلاسمایی قطعه‌ی میانی اسپرم انتقال می‌دهند (۱۷).

فرض بر این است که CD۹ اسپرمی در هنگام اتصال گامت‌ها نقش ایفا می‌کند. در این مطالعه، درصد بیان CD۹ در سلول اسپرمی مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعه‌ی حا ضر برای یافتن ارتباطی میان میزان بیان CD۹ و میزان لقاح در زوج‌های کاندید IUI صورت گرفت. در بیضه، بیان CD۹ مختص سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال نیست؛ بلکه پروتئین CD۹ در سیتوپلاسم و هسته‌ی اسپرماتوزوا، اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت انسان مستقر می‌باشد (۱۸). میزان بیان این پروتئین در سلول بنیادی اسپرماتوگونیال موش و رت به ترتیب ۲۸ و ۸۶/۵ درصد گزارش شده است (۵).

در مقایسه با مطالعه‌ی انجام شده در موش و رت، در مطالعه‌ی حاضر میانگین درصد بیان CD۹ در سلول‌های اسپرمی تیمار شده توسط آنتی‌بادی مونوکلونال و توسط تکنیک فلوسیتومتری، ۱۹ درصد می‌باشد.

در مطالعه‌ای که به روش Immunohistochemistry انجام شد، درصد اسپرم‌های CD۹ مثبت در افراد نورمواسپرم ۹۵/۲ درصد که در ناحیه‌ی سر شدت رنگ‌آمیزی متوسط و در دم متوسط تا خوب بود. در نمونه‌ی افراد آستنواسپرم، بیان ۹۰/۱ درصد بود و شدت رنگ‌آمیزی در ناحیه‌ی سر منفی و در دم خفیف بود و در مقایسه‌ی این دو گروه، درصد بیان در افراد آستنواسپرمی کمتر می‌باشد و درصد بیان CD۹ می‌تواند در آستنواسپرمی ایدیوپاتیک نقش داشته باشد (۱۵).

در مطالعه‌ی حاضر، ارتباطی بین درصد اسپرم‌های CD۹ مثبت و نتایج IUI یافت نشد. اگر چه در این مطالعه، ارتباط مستقیمی بین بیان CD۹ و لقاح یافت نشد، ممکن است که CD۹ اسپرمی، عملکرد متفاوتی داشته باشد که به طور غیر مستقیم لقاح را تحت تأثیر قرار دهد. شاید این امکان وجود داشته باشد که CD۹ نقش دومین اتصال اسپرم به زونا پلاسیدا را بازی کند؛ چرا که مولکول‌های غشای داخلی آکروزوم مثل (Sperm associated membrane protein۳۲) SAMP۳۲ و EQ (Equatorial) در اتصال ثانویه به زونا پلاسیدا درگیر هستند (۱۹، ۱۶) و ممکن است CD۹ به عنوان یکی از پروتئین‌های غشای داخلی آکروزوم نیز در اتصال ثانویه به زونا پلاسیدا نقش داشته باشد.

پیشنهاد شده است که CD۹ در سلول اسپرمی و در طول لقاح به عنوان سازمان دهنده‌ی بقیه‌ی پروتئین‌ها در غشای داخلی آکروزوم عمل می‌کند و یا به عنوان سازمان دهنده‌ی شبکه‌ی تتراسپنین ایفای نقش می‌نماید (۲۰).

CD۹ رها شده از تخمک می‌تواند با CD۹ اسپرم وارد واکنش شود که این واکنش از طریق واکنش هوموفیلیک CD۹ اسپرم و CD۹ تخمک انجام می‌شود (۱۶).

گزارش شد که CD۹ در Germ cells در بخش پایه‌ای اپیتلیوم منی‌ساز بیان می‌شود و نه تنها در سلول بنیادی اسپرماتوگونیال موش، بلکه در

Germ cells انسان با توانایی تولید مثل در ارتباط می‌باشد و برای بازیابی قدرت باروری مردان از طریق پیوند کمک کننده است و می‌تواند در بیضه‌ی موش تکثیر و بیان شود و به عنوان یک نشانگر برای تقویت این سلول‌ها عمل کند (۴). در مطالعه‌ی Ikeyama و همکاران مشاهده شد که در موش‌های نر فاقد CD۹، ظاهر تناسلی غیر طبیعی بوده است و CD۸۱ نیز این وظیفه را بر عهده دارد (۸).

میزان بیان CD۹ در نمونه‌های اسپرمی که شمارش اسپرمی بالا و تحرک خوبی داشتند، نسبت به نمونه‌هایی که تحرک و شمارش اسپرمی پایین داشتند، بیشتر بوده است (۲۱) که نشانگر نقش CD۹ در بلوغ اسپرم –عامل تأثیرگذار در یک باروری موفق– می‌باشد.

تفاوتی بین پارامترهای اسپرمی گروه بارور و نابارور مشاهده نشد. شاید تعداد نمونه‌ی بیشتری لازم باشد تا این تفاوت‌ها را آشکار کند. مطالعات بیشتری در مورد عملکرد و نقش CD۹ در MRT (Male reproductive tract) توصیه می‌شود.

نتایج نهایی مطالعه‌ی حاضر بیانگر این بود که بین بیان CD۹ و نتایج IUI رابطه‌ای یافت نشد. همچنین تفاوتی بین پارامترهای اسپرمی گروه بارور و نابارور مشاهده نشد؛ اما به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری جهت اثبات نقش CD۹ در سلول‌های اسپرم، برای آمیزش موفق اسپرم– تخمک ضروری باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر تحت حمایت مالی مشترک دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (کد طرح: ۳۹۲۲۶۵) و پژوهشگاه رویان تهران (۹۱۰۰۰۲۳۶) به انجام رسیده است. بدین وسیله از زحمات کارکنان پژوهشگاه رویان به ویژه سرکار خانم شربت اوغلی، خانم خسروانی و آقای سامانی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Hwang K, Walters RC, Lipshultz LI. Contemporary concepts in the evaluation and management of male infertility. Nat Rev Urol 2011; 8(2): 86-94.
2. Sullivan R. Male fertility markers, myth or reality. Anim Reprod Sci 2004; 82-83: 341-7.
3. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. Nat Cell Biol 2001; 3(2): E59-E64.
4. Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P, Nagano M. CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes. Biol Reprod 2012; 87(2): 27.
5. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. Biol Reprod 2004; 70(1): 70-5.
6. Horejsi V, Vlcek C. Novel structurally distinct family of leucocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. FEBS Lett 1991; 288(1-2): 1-4.
7. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. Annu Rev Cell Dev Biol 2003; 19: 397-422.
8. Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. J Exp Med 1993; 177(5): 1231-7.
9. Tachibana I, Hemler ME. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. J Cell Biol 1999; 146(4): 893-904.
10. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEB J 1997; 11(6): 428-42.

11. Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, et al. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13(4): 1274-81.
12. Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, et al. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. J Cell Sci 2006; 119(Pt 3): 416-24.
13. Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, Stahlberg H, et al. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. Dev Biol 2007; 304(1): 317-25.
14. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. Nat Rev Immunol 2005; 5(2): 136-48.
15. Salvolini E, Buldreghini E, Lucarini G, Vignini A, Lenzi A, Di PR, et al. Involvement of sperm plasma membrane and cytoskeletal proteins in human male infertility. Fertil Steril 2013; 99(3): 697-704.
16. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. Cell Tissue Res 2010; 340(3): 583-94.
17. Caballero JN, Frenette G, Belleannee C, Sullivan R. CD9-positive microvesicles mediate the transfer of molecules to Bovine Spermatozoa during epididymal maturation. PLoS One 2013; 8(6): e65364.
18. Son WY, Lee JH, Lee JH, Han CT. Acrosome reaction of human spermatozoa is mainly mediated by alpha1H T-type calcium channels. Mol Hum Reprod 2000; 6(10): 893-7.
19. Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Takamori K, et al. Equatorin: identification and characterization of the epitope of the MN9 antibody in the mouse. Biol Reprod 2009; 81(5): 889-97.
20. Charrin S, Manie S, Thiele C, Billard M, Gerlier D, Boucheix C, et al. A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. Eur J Immunol 2003; 33(9): 2479-89.
21. Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, Grosse-Brinkhaus C, Jonas E, Tesfaye D, et al. Association study and expression analysis of CD9 as candidate gene for boar sperm quality and fertility traits. Anim Reprod Sci 2011; 125(1-4): 170-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 08.08.2014
Vol. 32, No. 305, 2nd Week, December 2014
Accepted: 17.10.2014

The Relationship of Oocyte and Sperm Membrane Binding Protein with the Success of Intrauterine Insemination

Rahimeh Seifali[1], Roshank Aboutorabi PhD[2], Abdolhossein Shahverdi PhD[3], Bita Ebrahimi PhD[4], Fatemeh Mazani MSc[5], Vahid Esmaili MSc[6]

Original Article

Abstract

Background: Fertilization in mammals is dependent on successful connection between the sperm and oocyte plasma membrane. Gametes binding largely been studied in mice and the crucial role of CD9 (Cluster of differentiation 9), a member of tetraspanin family, is shown in gametes binding in mice. CD9 found in the inner membrane of the acrosome; and only a small amount of CD9 is expressed on the plasma membrane of mid piece. Inner sperm membrane proteins play an important role in the fertilization process. The aim of this study was to obtain correlation between the percentages of CD9-positive sperm with outcome of intrauterine insemination (IUI).

Methods: A total of 120 semen samples from infertile couples referred to Royan Institute (Isfahan, Iran) who were undergoing intrauterine insemination treatment were collected. Semen parameters such as motility, morphology, sperm concentration and viscosity were analyzed according to World Health Organization (WHO) 2010 guidelines. Sperm washed and stained via using anti-CD9 monoclonal antibody. The samples were analyzed via flow cytometry technique.

Findings: CD9 was detected only in 19% of mature sperms. The result of the receiver operating characteristic (ROC) area under the curve was equal to 0.446; therefore, CD9 was not a good variable predictor for fertility status (P = 0.482).

Conclusion: There was not a significant correlation between the CD9 expression and fertilization in patients underwent intrauterine insemination.

Keywords: Sperm parameter, Flow cytometry, Intrauterine insemination, Cluster of differentiation 9 (CD9)

Citation: Seifali R, Aboutorabi R, Shahverdi A, Ebrahimi B, Mazani F, Esmaili V. **Evaluation of Relationship between Oocyte and Sperm Membrane Binding Protein with the Success of Intrauterine Insemination.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(305): 1698-705

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Infertility Laboratory, Shahid Beheshti Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
5- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6- Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
Corresponding Author: Abdolhossein Shahverdi PhD, Email: shahverd2002@yahoo.com