DOI: 10.22100/jkh.v10i2.595

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

بررسی ژنتیکی و پروتئینی بتا دفنسین ۱۲۶ و ارتباط آن با نتایج درمان ناباروری از طریق تزریق داخل رحمی اسپرم

مهدیه حسنی[۱]، مرجان صباغیان*[۲]، آناهیتا محسنی میبدی[۳]، ویدا حجتی[۱]، ماریا صادقی[۴]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی- واحد دامغان- گروه زیست‌شناسی.
۲ـ پژوهشگاه رویان- پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی- مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل- گروه آندرولوژی.
۳ـ پژوهشگاه رویان- پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی- مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل- گروه ژنتیک.
۴- پژوهشگاه رویان- پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی- مرکزتحقیقات پزشکی تولیدمثل- گروه اندوکرینولوژی و ناباروری زنان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۴، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۳/۶/۳۰

چکیده

مقدمه: *بتا دفنسین ۱۲۶ (DEFB 126) انسانی یک گلیکوپروتئین کوچک کاتیونی است که به‌عنوان جزء مهمی از گلیکوکالیکس اسپرم پریمات‌ها و انسان مطرح می‌شود. این پروتئین از اسپرم در مقابل میکروب‌های عفونت‌زا و سیستم ایمنی زنان محافظت می‌کند. ژن DEFB126 در انسان روی انتهای تلومری بازوی کوتاه کروموزوم ۲۰ قرار دارد. یک تغییر ژنتیکی در چارچوب خوانش این ژن که در اثر حذف دو سیتوزین به‌وجود می‌آید، عملکرد اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. لذا این مطالعه با هدف تعیین ارتباط این جهش با میزان موفقیت در تزریق داخل رحمی اسپرم (IUI) انجام گرفت.*

مواد و روش‌ها: *در این مطالعه میزان جهش ژن DEFB126 در ۷۶ مرد ایرانی با دلایل نامشخص ناباروری که زنان آنها نتایج مثبت یا منفی IUI داشتند مشخص گردید. پس از استخراج DNA از خون بیماران مورد مطالعه، کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. روش‌های (PCR-SSCP) و Sequencing نیز برای تأیید نتایج استفاده شدند. علاوه بر این از تکنیک ایمونوسیتوشیمی برای بررسی میزان بیان این پروتئین در سطح سلول‌های اسپرم استفاده گردید.*

نتایج: *نتایج بررسی DNA نشان داد که ۲۴/۴ درصد از مردانی که نتایج باروری همسرانشان منفی شده بود دارای جهش می‌باشند، درحالی که افرادی که نتایج باروری آنها مثبت شده بود فاقد این جهش بودند. همچنین پروتئین کمتری بر سطح اسپرم مردان دارای آلل جهش‌دار مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که داشتن آلل هموزیگوت جهش‌دار در توالی بتا دفنسین ۱۲۶ عامل مؤثری در عدم موفقیت درمان از طریق IUI می‌باشد.*

واژه‌های کلیدی: بتا دفنسین ۱۲۶، گلیکوکالیکس، تغییرات ژنتیکی، تزریق داخل رحمی اسپرم.

* **نویسنده مسئول:** تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی‌هاشم، میدان بنی‌هاشم، خیابان حافظ شرقی، پژوهشگاه رویان، گروه اندرولوژی، **تلفن:** ۰۲۱-۲۳۵۶۲۷۳۰، **نمابر:** ۰۲۱-۲۲۳۰۶۴۸۱، **Email:** marjan.sabbaghian@gmail.com

ارجاع: حسنی مهدیه، صباغیان مرجان، محسنی میبدی آناهیتا، حجتی ویدا، صادقی ماریا. بررسی ژنتیکی و پروتئینی بتا دفنسین ۱۲۶ و ارتباط آن با نتایج درمان ناباروری از طریق تزریق داخل رحمی اسپرم. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۴؛۱۰(۲):۷۵-۸۲.

مقدمه

یکی از جدی‌ترین مشکلاتی که امروزه کشورهای توسعه یافته با آن روبرو هستند کاهش نرخ تولد می‌باشد. براساس تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۱۱ ناباروری به معنای عدم‌بارداری در زوج‌هایی است که بدون هیچ روش پیشگیری به‌مدت یک سال مقاربت داشته‌اند (۱). علت ناباوری در تقریباً ۲۰ تا ۳۰ درصد زوج‌های نابارور ناشناخته است (۲). یکی از درمان‌های اصلی تلقیح داخل رحمی اسپرم (IUI: Intra uterine inseminati) برای این مشکل است (۳). موفقیت کلی روش IUI، بین نرخ باروری ۵ تا ۶۶ درصد در هر سیکل متغیر است (۴ و ۵). شاخص‌های سلامت اسپرم شامل تعداد، تحرک و مورفولوژی از عوامل موفقیت در IUI می‌باشند (۶). با بلوغ اسپرم در اپی دیدیم، چندین پروتئین اپی دیدیمی از جمله دفنسین‌ها، سطح اسپرم را می‌پوشانند تا از اسپرم‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌ها و مواد شیمیایی مضر محافظت کنند (۷–۹). دفنسین‌ها مهمترین پپتیدهای ضد میکروبی هستند که اولین سد دفاعی میزبان علیه عفونت‌ها به‌شمار می‌آیند (۱۰–۱۲) دفنسین‌ها دارای ساختمان سه بعدی با صفحات بتا b-sheet می‌باشند و دو زیر مجموعه اصلی α و β تقسیم می‌شوند (۱۱ و ۱۲). DEFB126 یکی از پروتئین‌های پوشاننده‌ی اسپرم است که به میزان زیاد در اپیدیدیم تولید می‌شود و از اجزای مهم گلیکوکالیکس اسپرم بوده و در حرکت مؤثر اسپرم و حفاظت ایمونولوژیکی از آن در مجرای تولید مثلی ماده نقش ایفا می‌کند (۱۳). این پروتئین توسط ژن بتا دفنسین ۱۲۶ واقع شده بر روی کروموزوم ۲۰ انسان رمزگذاری می‌شود (۱۴). این پروتئین بسیار شبیه به پروتئین ESP13. 2 یا پروتئین ترشحی مختص اپیدیدیم در میمون سینمولوگوس Cynomolgus می‌باشد و در گذشته نیز به همین نام شناخته می‌شد. این پروتئین کوچک ترشحی دارای یک مرکز دی سولفیدی پایدار است که به‌صورت خاص در سلول‌های اپیتلیالی پوشش‌دهنده‌ی لوله‌های وابران، قسمت ابتدایی و انتهایی اپیدیدیم دیده می‌شود (۱۵ و ۱۶). وجود پوشش بتا دفنسین برای نفوذ و حرکت اسپرم در موکوس گردن رحم ضروری می‌باشد و به‌نظر می‌رسد این توانایی مربوطبه وجود اسید سیالیک با بار منفی در ساختمان بتا دفنسین می‌باشد (۱۷). گلیکوپروتئین DEFB126 در وقایعی همچون ذخیره‌سازی اسپرم در داخل ناحیه دمی اپیدیدیم، حرکت اسپرم در داخل موکوس سرویکس، حفاظت اسپرم در مقابل سیستم ایمنی فرد ماده، حمله‌های آنزیمی و میکروبی، فرآیند ظرفیت‌پذیری Capacitation و اتصال اسپرم به اپی تلیوم اویداکت و سرانجام ایجاد مخزنی از اسپرم در اویداکت دخالت دارد (۱۸ و ۱۹) مطالعات نشان داده است که حذف DEFB126 بااستفاده از آنتی‌بادی‌های ضد DEFB126 از ورود اسپرم به موکوس سرویکس در محیط آزمایشگاهی جلوگیری کرده و منجر به کاهش قابل توجه در تعداد اسپرم‌هایی که قادر به عبور از موکوس سرویکس هستند می‌شود (۱۷). گزارش‌های اخیر نشان داده است که حذف دو نوکلئوتید سیتوزین در ژن DEFB126 باعث ایجاد تغییر قاب خوانش و در نهایت تولید یک mRNA غیر متوقف شونده می‌شود (۲۰). این دو نوکلئوتید سیتوزین در موقعیت ۳۱۷ توالی رمزگذاری شده (CDS: Coding DNA Sequence) ژن قرار گرفته‌اند (۲۱). تحقیقات بیانگر آن است که در بافت اپی دیدیم mRNAهای غیر طبیعی DEFB126 با ژنوتیپ del/del بسیار کمتر از mRNA حاصل از ژنوتیپ وحشی wild type این ژن می‌باشند که این کاهش مقدار mRNA غیر طبیعی می‌تواند به‌علت مکانیسم تخریب mRNA غیر متوقف شونده در سلول (NMD: Nonsense-mediated mRNA decay) و ترجمه ناقص آن باشد (۲۰ و ۲۲–۲۶). نتایج یک مطالعه نشان داد که ۴۷٪ از مردان اروپایی و ۴۵٪ از مردان چینی حامل جهش در ژن بتا دفنسین ۱۲۶ می‌باشند (۲۰). این یافته‌ها نقش مهم DEFB126 را در ناباروری مردان خاطر نشان می‌سازد. باتوجه به اهمیت این ژن و نقش مهم آن، در این مطالعه حذف دو نوکلئوتیدی در ژن DEFB126 مردانی که همسران آنها تحت درمان به روش تزریق داخل رحمی اسپرم قرار گرفته‌اند و رابطه این حذف با نتایج درمان ناباروری از طریق تزریق داخل رحمی اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۷۶ مرد با ناباروری بدون توضیح مراجعه‌کننده برای IUI به مرکز باروری و ناباروری پژوهشگاه رویان صورت گرفت. این مطالعه به‌صورت مورد– شاهد انجام پذیرفت و نمونه خون و اسپرم افراد بعد از تکمیل فرم اطلاعات و رضایت‌نامه توسط آنها در بازه زمانی یک ساله از مهر ماه ۹۱ تا مهر ماه ۹۲ جمع‌آوری گردید.

از میان مراجعه‌کنندگان به پژوهشگاه رویان، گروه مورد را زوجین نابارور، با ناباروری بدون توضیح که همسر آنها تحت درمان تزریق داخل رحمی اسپرم قرار گرفت تشکیل دادند که به دو گروه تقسیم شدند.

۱) خانم‌هایی که تحت درمان تزریق داخل رحمی اسپرم قرار گرفته و باردار شدند (موفقیت در ایجاد حاملگی کلینیکال به معنی دیدن ساک جنینی توسط سونوگرافی، گروه مثبت).

۲) خانم‌هایی که تحت درمان تزریق داخل رحمی اسپرم قرار گرفته ولی بارداری برای آنها گزارش نشد (عدم ایجاد حاملگی، گروه منفی).

پس از مطالعه پرونده بالینی زوجینی که تحت درمان به روش تزریق داخل رحمی اسپرم قرار گرفتند، در مورد مردان براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی شاخص‌های طبیعی اسپرم شامل مورفولوژی بیش از ۷٪ و مجموع حرکت بیش از ۴۰٪ و تعداد اسپرم بیش از ۲۰٪ در نظر گرفته شد. همچنین در این افراد مواردی همچون مصرف

سیگار، الکل، مواد مخدر و هر گونه بیماری که منجر به نازایی می‌شود مانند واریکوسل (Varicocele)، هیدروسل (Hydrocele)، Orchiopexy, Hernia و... معیار خروج از مطالعه در نظر گرفته شد در مورد خانم‌ها نیز وجود هر گونه اختلال در باروری شامل علل تخمدانی، اندومتریوز، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCO)، عوامل سرویکال (Cervical factor)، کاهش ذخیره تخمدانی (Diminished ovarian reserve)، شکست در تخمک‌گذاری (Ovulatory factor)، مصرف سیگار، الکل، مواد مخدر و... معیار خروج از مطالعه لحاظ گردید.

پس از استخراج DNA از خون بیماران مورد مطالعه، کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر 2000NanoDrop (Scientific) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای بررسی تغییرات ژنتیکی در ژن بتا دفنسین ۱۲۶ در گروه‌های مورد مطالعه از جفت پرایمر طراحی شده '5-AAGAATGGTTGGGCAATGTGC-3' و '5-CCACCATGCTTTAATGAGTCGGG-3' استفاده گردید. برنامه سیکل‌های PCR به شرح زیر بود.

جدول ۱- برنامه سیکل‌های PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	عملکرد هر مرحله
۱ سیکل	۳ دقیقه	۹۴° C	Initiation denaturation
	۱ دقیقه	۹۴° C	Denaturation
۳۰ سیکل	۱ دقیقه	۵۸/۵° C	Annealing
	۱ دقیقه	۷۲° C	Extension
۱ سیکل	۷ دقیقه	۷۲° C	Final extension

محصولات PCR روی ژل‌های آگارز ۲٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید (Sigma) رنگ‌آمیزی شد و توسط دستگاه Bio-Rad (Gel Doc XR, Gel Doc) مشاهده گردید. پلی مورفیسم کنفورماسیون تک رشته‌ای (SSCP: Single-strand conformation polymorphism) به شرح ذیل انجام گردید:

DNA۵µl با ۵µl محلول بارگذاری بروموفنول بلو (Fermentas) حاوی ۹۵٪ فرم آمید (Roche)، ۰/۰۵ زایلین سیانول و EDTA نیم میلی مولار (Merck) ترکیب شد. این مخلوط در ۹۵ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردیده سپس ۱۰ دقیقه روی یخ سرد شده و روی ژل آکریل آمید، بیس آکریل آمید (۲۹: ۱) ۰/۷۵ mm در بافر TBE ۰/۰۵ در دمای ۵° C به‌مدت ۲ ساعت الکتروفورز (Bio-rad/Consort) شد، سپس توسط رنگ‌آمیزی به‌روش نیترات نقره در سه مرحله رنگ‌آمیزی شد. سرانجام پس از ظهور باندها ژل توسط اسکنر (Bio-Rad) و به کمک برنامه Quantity OneVersion4. 6. 2 اسکن و سپس توسط دستگاه GelDoc از ژل عکسبرداری شد.

محصول PCRهایی که طی انجام SSCP، باندهای مشابهی بر روی ژل پلی آکریل آمید نشان دادند، در گروه‌های مجزا دسته‌بندی شده و از هر گروه چندین نمونه جهت تعیین توالی به شرکت فزابیوتک در آمریکا به واسطه شرکت فزاپژوه در ایران سفارش داده شدند. این شرکت تعیین توالی قطعات موردنظر را با استفاده از روش تعیین توالی سنگر در سیستمcapillary sequencer XLABI 3730 انجام داد. سپس توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای FinchTV و Aligen Sequences Nucleotide BLAST آنالیز شدند.

مایع منی از داوطلبان جمع‌آوری و ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. منی با استفاده از PBS شسته و در ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. سپس در یک میلی‌لیتر PBS مخلوط و به روی اسلاید منتقل گردید. اسلایدها پس از خشک شدن، با پارافرمالدهید ۴٪ (Sigma) فیکس و پس از ۱ ساعت با PBS شسته و دوباره خشک شدند. سپس اسلایدها با BSA3% (Sigma) در ۳۷°C انکوبه و پس از گذشت ۱ ساعت با آنتی‌بادی اولیه (رقیق شده با BSA به نسبت ۱: ۵۰) به‌مدت ۲ ساعت تیمار شدند. سپس اسلایدها ۳ بار و هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو شده و با آنتی‌بادی ثانویه FITC کنژوگه (با رقت ۱: ۵۰۰) (Santa cruz biotechnology) به‌مدت ۱ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. سرانجام، نمونه‌ها سه بار در PBS شستشو شدند. برای رنگ‌آمیزی هسته از DAPI استفاده شد. سلول‌ها در نهایت با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss, Germany) بررسی شدند.

در این مطالعه از نرم‌افزار SPSS جهت پردازش داده‌ها و از آزمون آماری Chi-Squaretest برای تعیین ارتباط جهش در ژن بتا دفنسین ۱۲۶ با نتایج باروری از طریق تزریق داخل رحمی اسپرم استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه تغییرات ژنتیکی اگزون۲ از ژن DEFB126 مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام این مطالعه از تکنیک‌های استخراج DNA، PCR، SSCP و Sequencing استفاده شد. همچنین برای بررسی میزان بیان پروتئین بتا دفنسین ۱۲۶ از تکنیک ایمنوسیتوشیمی استفاده گردید.

به‌دنبال بررسی کیفیت DNA مورد استفاده به لحاظ خلوص و غلظت با استفاده از دستگاه نانودراپ مشخص شد که کیفیت نمونه DNA تمام مردان مورد مطالعه در حد مطلوبی است به نحوی که نسبت ۲۸۰ به ۲۶۰ بین ۱/۸ تا ۱/۹۲ بود که نشان‌دهنده عدم آلودگی با پروتئین و RNA می‌باشد. غلظت آنها نیز بین ng/µl ۱۰۰۰–۲۰۰ بود.

بعد از اعمال شرایط بهینه عملکرد پرایمر E2-Beta defensin ۱۲۶، قطعه ۲۵۸ جفت بازی حاوی اگزون۲ ژن DEFB126 در ۷۶ بیمار تکثیر گردید. نتایج عملکرد این جفت پرایمر در شکل ۱ آورده

شده است. در تمامی بیماران عملکرد این جفت پرایمر منجر به تکثیر قطعه موردنظر گردیده است.

پس از انجام تکنیک SSCP برای محصول PCRهای ناحیه ژنومی اگزون۲ از ژن بتا دفنسین ۱۲۶ در ۷۶ بیمار مورد مطالعه، براساس الگوهای باندهی، در ۳ گروه مختلف تقسیم‌بندی شدند (شکل ۱).

در بیماران IUI منفی، ۲۷ نفر در گروه ۱، ۷ نفر در گروه ۲ و نهایتاً ۱۱ نفر در گروه ۳ قرار گرفتند. در بیماران IUI مثبت نیز براساس شکل بالا، ۱۶ نفر در گروه ۱، ۱۵ نفر در گروه ۲ تقسیم‌بندی شدند.

نتایج حاصل از تعیین توالی با نرم‌افزار BLAST به‌طور کامل تأییدکننده نتایج SSCP بوده به‌طوری که در ۱۱ نمونه از بیمارانی که دارای باند گروه ۳، از SSCP بودند یک تغییر دو نوکلئوتیدی (حذف دو نوکلئوتید سیتوزین) در توالی اگزون۲ مشاهده شد. ۵۵ نمونه از بیمارانی که دارای باندهای گروه ۲ و ۱، از SSCP بودند هیچ تغییری در توالی اگزون۲ نشان ندادند.

ژنوتیپ wt/wt مربوطبه فردی است که هیچ تغییر دو نوکلئوتیدی در این ناحیه (اگزون۲) ندارد و تمام ۵ سیتوزین را دارا می‌باشد (هوموزیگوت نرمال) (شکل ۳a).

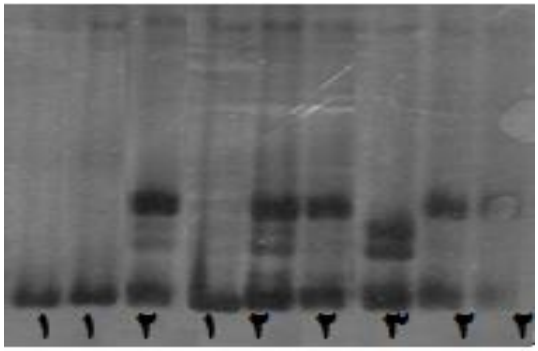
ژنوتیپ wt/del نیز مربوطبه افرادی است که تغییر دو نوکلئوتیدی در ناحیه اگزون۲ ندارند ولی در نرم‌افزار FinchTV مشاهده می‌شود که در ناحیه موردنظر در منطقه نوکلئوتیدی ۳۹۳ و ۳۹۴ دارای دو پیک می‌باشد که یک پیک مربوطبه آلل سالم و یک پیک مربوطبه آلل جهش‌دار می‌باشد (هتروزیگوت) (شکل ۳b).

ژنوتیپ del/del مربوطبه افرادی است که تغییرات دو نوکلئوتیدی (حذف دو نوکلئوتید سیتوزین) را در ناحیه اگزون۲ نشان می‌دهند (هوموزیگوت جهش‌یافته) (شکل ۳c).

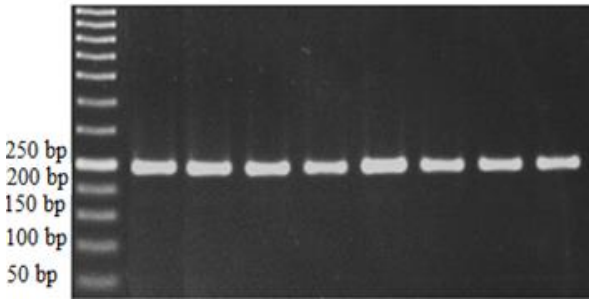
پس از آنالیز آماری داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های wt/wt و del/del مشاهده شدکه به‌ترتیب دارای P.Value ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۳ می‌باشند. این نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌دار می‌تواند عاملی در ناباروری مردان باشد. (نمودار ۱، جدول ۲).

جدول ۲- نتایج آنالیز آماری داده‌های حاصل از بررسی ژنتیکی اگزون۲ ژن بتا دفنسین ۱۲۶ با در نظر گرفتن P ≤۰/۰۵

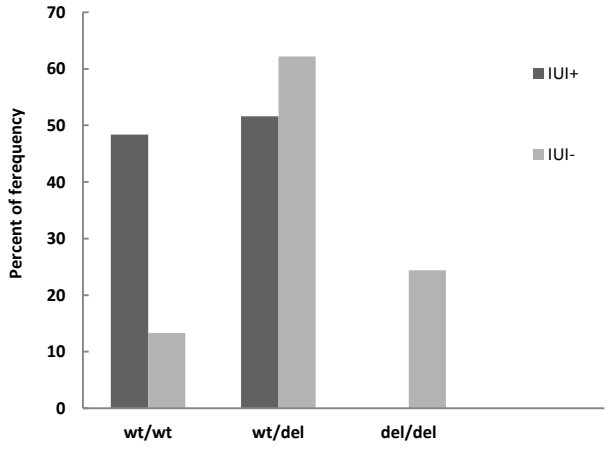
		هتروزیگوت	هموزیگوت سالم	هموزیگوت جهش‌دار	جمع
نتایج منفی	تعداد	۲۸	۶	۱۱	۴۵
	درصد	٪۶۲/۲	٪۱۳/۳	٪۲۴/۴	٪۱۰۰
نتایج مثبت	تعداد	۱۶	۱۵	۰	۳۱
	درصد	٪۵۱/۶	٪۴۸/۴	٪۰/۰	٪۱۰۰
جمع	تعداد	۴۴	۲۱	۱۱	۷۶
	درصد	٪۵۷/۹	٪۲۷/۶	٪۱۴/۵	٪۱۰۰
P.V		۰/۳۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱



شکل ۱- تصویر ژل پلی آکریل آمید دناتوره پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

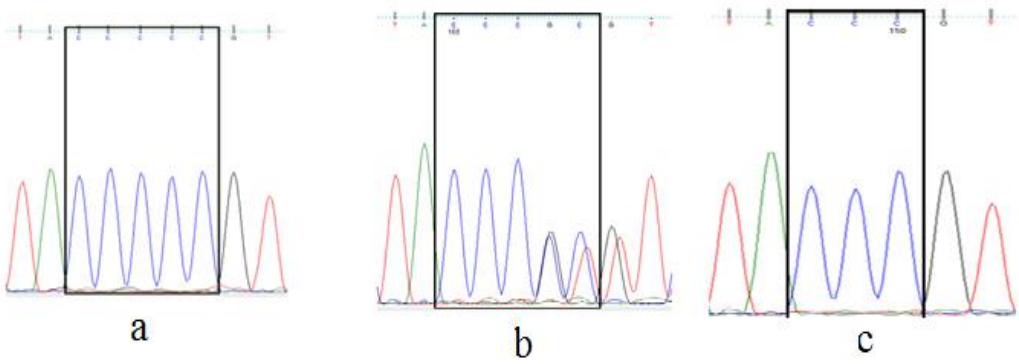


شکل ۲- تصویر گرفته شده از یک ژل پلی آکریل آمید دناتوره پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره برای محصول PCRهای ناحیه ژنومی اگزون۲ در ۹ نفر از گروه +IUI و -IUI

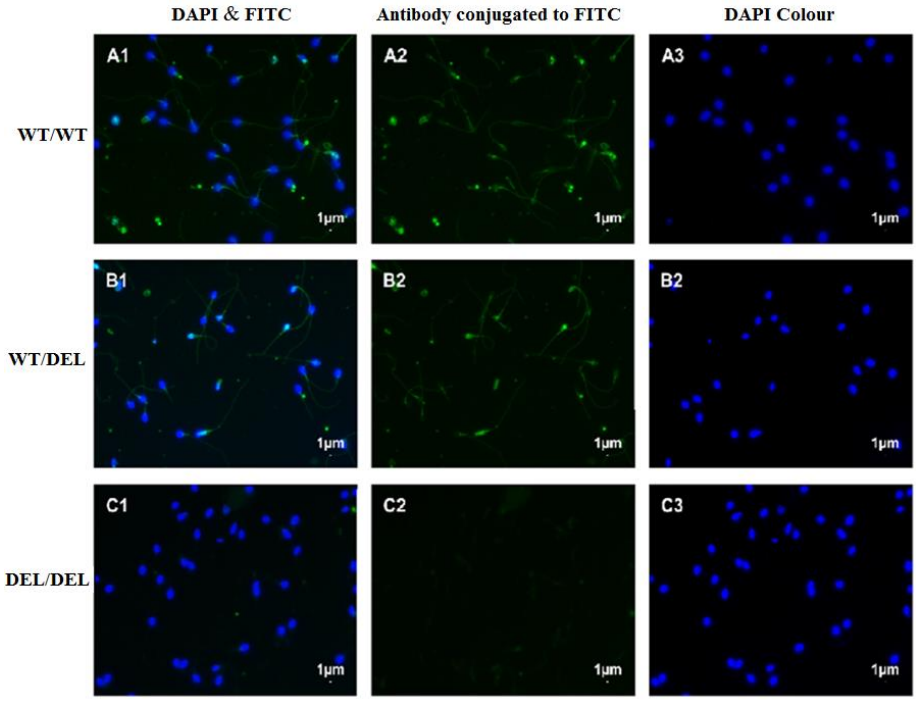


نمودار ۱- بررسی درصد ژنوتیپ‌های مختلف در دو گروه + IUI و -IUI

به‌منظور تأیید وجود پروتئین بتا دفنسین ۱۲۶ بر روی سطح اسپرم انسان و بررسی بیان این پروتئین در سطح اسپرم افرادی با ژنوتیپ مختلف رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی اختصاصی بتا دفنسین ۱۲۶ انجام شد. نتایج ایمونوسیتوشیمی در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳- توالی خوانش شده الگوهای مختلف ژل پلی آکریل آمید دناتوره از اگزون۲ بیماران



شکل ٤- نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی، ستون A شامل ادغام عکس‌های رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با رنگ دپی و رنگ‌آمیزی توسط آنتی‌بادی کنژوگه به FITC، ستون B شامل عکس‌های رنگ‌آمیزی توسط آنتی‌بادی کنژوگه به FITC و ستون C شامل رنگ‌آمیزی هسته‌ها توسط رنگ دپی می‌باشد.

باتوجه به این که آنتی‌بادی ثانویه منتخب (کونژوگه به FITC)، به رنگ سبز است، سطح اسپرم‌ها به رنگ سبز دیده شد. رنگ آبی نشان‌دهنده هسته سلول‌هاست که با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شده‌اند. همان‌طورکه در شکل نشان داده شده میزان این پروتئین در افرادی که هموزیگوت del/del بودند کمتر از افرادی با ژنوتیپ هموزیگوت wt/wt می‌باشد. همچنین میزان این پروتئین در سطح اسپرم افرادی که هتروزیگوت هستند نیز کمتر از افرادی بود که هموزیگوت سالم بودند.

بحث

واریانت ژنتیکی مورد مطالعه یک حذف دو نوکلئوتیدی است که منجر به تشکیل یک mRNA بدون کدون خاتمه می‌گردد. مردانی که دارای این حذف به‌صورت هموزیگوت هستند، اسپرم‌هایی تولید می‌کنند که در الیگوساکاریدهای متصل به پروتئین‌های سطحی دچار نقص هستند و در نفوذ به ژل‌های هیالورونیک اسید (HA) در محیط آزمایشگاهی (in Vitro) با مشکل مواجه می‌شوند (۲۷). مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی اثر ژنوتیپ خاص (del/del) در ژن بتا دفنسین

۱۲۶ مردانی که همسران آنها تحت درمان به روش تزریق داخل رحمی اسپرم قرار گرفته‌اند و ارتباط آن با ناباروری با عامل ناشناخته پرداخته است و این سوال مطرح بوده که آیا ژنوتیپ هموزیگوت del/del می‌تواند عاملی در عدم موفقیت درمان IUI باشد؟ با آنالیز داده‌های به دست آمده از بررسی ژن بتا دفنسین ۱۲۶ در بیماران مورد مطالعه در دو گروه IUI مثبت و IUI منفی مشاهده شد که حذف در این ژن به‌طور معنی‌داری در گروه IUI منفی بیشتر از IUI مثبت می‌باشد. به‌طوری که درصد شیوع حذف هموزیگوت در بیمارانی که نتایج باروری آنها منفی شده بود ۲۴/۴ درصد و در بیمارانی که نتایج باروری آنها مثبت شده بود صفر درصد محاسبه گردید (P≤۰/۰۵). پیش از این تولنر و همکاران در تنها مطالعه انجام گرفته در این زمینه، ۶۳۸ مرد چینی را مورد بررسی قرار دادند. افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم ۲۹ درصد، ژنوتیپ هتروزیگوت ۵۲ درصد و ژنوتیپ هموزیگوت جهش دار ۱۹ درصد از افراد مورد مطالعه را تشکیل دادند (۲۰) . در مطالعه حاضر نیز فراوانی افراد دارای جهش با نتایج باروری منفی، بیش از افراد با نتایج باروری مثبت بود. در ۷۶ فرد مورد مطالعه در دو گروه IUI مثبت و IUI منفی افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم ۲۷/۶٪ هتروزیگوت ۵۷/۹٪ و هموزیگوت جهش‌دار ۱۴/۵٪ می‌باشند (P≤۰/۰۵). پس از بررسی‌های ژنتیکی و تعیین ژنوتیپ افراد مورد مطالعه، از تکنیک ایمونوسیتوشیمی برای بررسی پروتئین استفاده گردید. در این بررسی از اسپرم افراد مورد مطالعه، برای سنجش کیفی میزان بیان پروتئین بتا دفنسین۱۲۶ و همچنین ارتباط آن با ناباروری مردان و موفقیت درمان IUI استفاده گردید. نتایج نشان داد که بیان این پروتئین در سطح اسپرم بیمارانی که دارای حذف دو نوکلئوتید سیتوزین در ژن بتا دفنسین۱۲۶ بودند نسبت‌به بیمارانی که فاقد این حذف بودند (ژنوتیپ del/del در مقابل wt/wt) کمتر بود. همچنین مشاهده شد که میزان بیان این پروتئین در سطح اسپرم افرادی که دارای ژنوتیپ wt/del بودند نیز به مراتب کمتر از افرادی است که دارای ژنوتیپ wt/wt هستند. این نتایج با مطالعه صورت گرفته توسط Rozen با تکنیک ایمونوفلوئورسنت نشان داده بود که در افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌دار در پوشش o–الیگوساکاریدی سطح اسپرم دچار نقص هستند (۲۱). بر این اساس بتا دفنسین ۱۲۶ یک مؤلفه اصلی در گلیکوکالیکس سطح اسپرم است و برای عملکرد طبیعی اسپرم شامل حرکت مؤثر اسپرم در مجرای تولید مثلی ماده مؤثر می‌باشد. از آن جایی که در روش IUI حرکت مؤثر اسپرم در مجرای تولید مثل ماده نقش بسیار مهمی دارد، بنابراین بتا دفنسین ۱۲۶ می‌تواند عاملی در موفقیت درمان به روش تزریق داخل رحمی اسپرم در این بیماران باشد. باتوجه به نقش مهم این پروتئین در تسهیل حرکت اسپرم در مجرای تناسلی ماده، حفاظت اسپرم در مقابل آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم و افزایش پتانسیل لقاح اسپرم با تخمک (۲۰) و باتوجه به نتاج به دست آمده در مطالعه حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که وقوع جهش در ژن بتا دفنسین ۱۲۶ می‌تواند در نتایج باروری آنها تأثیر داشته و موجب کاهش موفقیت در درمان با روش IUI گردد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به کم بودن تعداد نمونه‌های زوج‌های نابارور با علت ناشناخته که کاندیدای عمل IUI باشند در مدت زمان محدود انجام طرح اشاره نمود. در صورت انجام مطالعات بیشتر در این زمینه می‌توان این ژنوتیپ را به‌عنوان معیاری جهت تعیین و پیش‌بینی نتایج درمان ناباروری مورد استفاده قرار داد و در این صورت پزشکان قادر خواهند بود تکنیک مناسب‌تری را برای درمان ناباروری این بیماران انتخاب نموده و در زمان و هزینه‌های درمانی صرفه‌جویی خواهد شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی که حمایت مالی این تحقیق را بر عهده داشت، ابراز می دارند. این مقاله حاصل طرح "بررسی ژنتیکی و پروتئینی بتا دفنسین ۱۲۶ و رابطه آن با نتایج درمان ناباروری از طریق تزریق داخل رحمی" می‌باشد.

References

1. Hamada AJ, Montgomery B, Agarwal A. Male infertility: a critical review of pharmacologic management. Expert Opinion on Pharmacotherapy 2012;13:2511-31.
2. Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. Hum Reprod 1998;1:33-44.
3. Quaas A, Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. Reviews in Obstetrics and Gynecology 2008;1:69-76.
4. Allen NC, Herbert CM 3rd, Maxson WS, Rogers BJ, Diamond MP, Wentz AC. Intrauterine insemination: a critical review. Fertil Steril 1985;44:569-80.
5. Iberico G, Vioque J, Ariza N, Lozano JM, Roca M, Llacer J, et al. Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. Fertil Steril 2004;81:1308-13.
6. Yalti S, Gurbuz B, Sezer H, Celik S. Effects of semen characteristics on IUI combined with mild ovarian stimulation. Arch Androl 2004;50:239-46.
7. Haendler B, Kratzschmar J, Theuring F, Schleuning WD. Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. Endocrinology 1993;133:192-8.
8. Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Lan ZJ, Labus JC. The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. Curr Top Dev Biol 1996;33:102-61.
9. Holland MK, Orgebin-Crist MC. Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. Biol Reprod 1988;38:487-96.
10. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. ReprodBiol Endocrinol 2003;1:116.

11. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. Annu Rev Immunol 1993;11:105-28.

12. Cao D, Li Y, Yang R, Wang Y, Zhou Y, Diao H, et al. Lipopolysaccharide-induced epididymitis disrupts epididymal beta-defensin expression and inhibits sperm motility in rats. Biol Reprod 2010;83:1064-70.

13. Yudin AI, Tollner TL, Li MW, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. ESP13. 2, a member of the beta-defensin family, is a macaquesperm surface-coating protein involved in the capacitation process. Biol Reprod 2003;69:1118-28.

14. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, et al. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoformsin humans and mice. J Immunol 2002;169:2516-23.

15. Perry AC, Jones R, Moisyadi S, Coadwell J, Hall L. The novel epididymal secretory protein ESP13. 2 in Macaca fascicularis. Biol Reprod 1999;61:965-72.

16. Hollox EJ, Barber JC, Brookes AJ, ArmourJA. Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23. 1. Genome Research 2008;18:1686-97.

17. Tollner TL, Yudin AI, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. Hum Reprod 2008;23:2523-34.

18. Yudin AI, Treece CA, Tollner TL, Overstreet JW, Cherr GN. The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glycocalyx. J Membr Biol 2005;207:119-29.

19. Toshimori K, Araki S, Oura C, Eddy EM. Loss of sperm surface sialic acid induces phagocytosis: an assay with a monoclonal antibody T21, which recognizes a 54K sialoglycoprotein. Arch Androl 1991;27:79-86.

20. Tollner TL, Venners SA, Hollox EJ, Yudin AI, Liu X, Tang G, et al. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. Sci Transl Med 2011;3:92ra65.

21. Rozen S. Defending male fertility. Sci Transl Med 2011;3: 92ps31.

22. Ameri A, Machiah DK, Tran TT, Channell C, Crenshaw V, Fernstrom K, et al. A nonstop mutation in the factor (F) X gene of a severely haemorrhagic patient with complete absence of coagulation FX. Thromb Haemost 2007;98:1165-9.

23. Chatr-Aryamontri A, Angelini M, Garelli E, Tchernia G, Ramenghi U, Dianzani I, et al. Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in diamond-blackfan anemia. Hum Mutat 2004;24:526-33.

24. Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerio AL, Parker R, Dietz HC. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. Science 2002;295:2258-61.

25. Maquat LE. Molecular biology. Skiing toward nonstop mRNA decay. Science 2002;295:2221-2.

26. Akimitsu N, Tanaka J, Pelletier J. Translation of nonSTOP mRNA is repressed post-initiation in mammalian cells. Embo J 2007;26:2327-38.

27. Tollner TL, Yudin AI, Tarantal AF, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia. Biol Reprod 2008;78:400-12.

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 10, No 2
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v10i2.595

Original Article

Genetic and Protein Analysis of Betadefensin 126 and Association with Success Rate of Intrauterin Insemination

Mahdeye Hassani (M.Sc.)[1], Marjan Sabbaghian (Ph.D.)[2*], Anahita Mohseni Meybodi (Ph.D.)[3], Vida Hojati (Ph.D.)[1], Mareya Sadeghi (Ph.D.)[4]

1- Dept. of Biology, School of Biological Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2- Dept. of Genetic at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
3- Dept. of Andrology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
4- Dept. of Endocrinology and Female Infertility at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

Received: 25 June 2014**, Accepted:** 21 August 2014

Abstract:

Introduction*: Human β-defensin 126 (DEFB126) is a small cationic glycoprotein that is considered as an important component of the primates and human sperm glycocalix. It protects sperm from infection-causing microbes and against the female immune system antibodies. Human DEFB126 gene is located on the sub-telomeric region of 20p13. DEFB126 variations caused by a frame shift deletion of two cytosines was found to affect the sperms functionality. The aim of this study was to verify the correlation of this gene mutation with success rate of IUI.*

Methods: *In the present study, the rate of DEFB126 gene mutation was elucidated in 76 Iranian men with unexplained infertility whose wives had undergone IUI with either positive or negative results. DNA properties quantified with NanoDrop spectrophotometers. Standard PCR, Single-strand conformation polymorphism (SSCP) and sequencing were used to confirm the results. Moreover,immunocytochemistry was performed for the assessment of the protein expression on sperm cells.*

Results: *DNA quantification revealed that 24.4% of men, whose wives showed a negative result for IUI, were homozygote for this mutation, whereas none of the couples with a positive IUI result carried the mutation for this gene ($P \leq 0.05$). Moreover, the amount of this protein was decreased on the sperms of men who carried the mutant allele.*

Conclusion: *Results of the present study suggested that common alteration in DEFB126 gene could be considered as a critical factor in the success rate of IUI operation.*

Keywords: β-defensin 126, Glycocalyx, Genetic variations, IUI (Intrauterin Insemination).

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** M. Sabbaghian**, Email:** marjan.sabbaghian@gmail.com*

Citation: Hassani M, Sabbaghian M, Mohseni Meybodi A, Hojati V, Sadeghi M. Genetic and protein analysis of betadefensin 126 and association with success rate of intrauterin insemination. Journal of Knowledge & Health 2015;10(2):75-82.