



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

مهدیه حسنی^۱، مرجان صباغیان^{۲*}، آناهیتا محسنی میبیدی^۳، ویدا حجتی^۱، ماریا صادقی^۴

۱- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد دامغان- گروه زیست‌شناسی.

۲- پژوهشگاه رویان- پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی- مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل- گروه اندرولوژی.

۳- 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- مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل- گروه اندوکرینولوژی و ناباروری زنان.

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

چکیده

مقدمه: بتا دفنسنین 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 دفنسنین ۱۲۶ عامل مؤثری در عدم موفقیت درمان از طریق IUI می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بتا دفنسنین 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:

Email: marjan.sabbaghian@gmail.com، ۰۲۱-۲۲۳۰۶۴۸۱

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

مقدمه

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 به علت مکانیسم تخریب mRNA غیر متوقف شونده در سلول (NMD: Nonsense-mediated mRNA decay) و ترجمه ناقص آن باشد (۲۰-۲۲). نتایج یک مطالعه نشان داد که ۴۷٪ از مردان اروپایی و ۴۵٪ از مردان چینی حامل جهش در ژن بتا دفسین 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 به صورت 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

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 عدم بارداری در زوج‌هایی است که بدون هیچ روش پیشگیری به مدت یک سال مقاربت داشته‌اند (۱). علت ناباروری 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 دفسین‌ها، سطح اسپرم را می‌پوشانند تا از اسپرم‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌ها و مواد شیمیایی مضر محافظت کنند (۷-۹). دفسین‌ها مهمترین پپتیدهای ضد میکروبی هستند که اولین سد دفاعی میزبان علیه عفونت‌ها به‌شمار می‌آیند (۱۰-۱۲) دفسین‌ها 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 اپیدیم 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 دفسین ۱۲۶ واقع شده بر روی کروموزوم ۲۰ انسان رمزگذاری می‌شود (۱۴). این پروتئین بسیار شبیه به پروتئین 2. ESP13 یا پروتئین ترشخی مختص اپیدیم در میمون سینمولوگوس *Cynomolgus* می‌باشد و در گذشته نیز به همین نام شناخته می‌شد. این پروتئین کوچک ترشخی دارای یک مرکز دی سولفیدی پایدار است که به صورت خاص در سلول‌های اپیتلیالی پوشش‌دهنده‌ی لوله‌های وایران، قسمت ابتدایی و انتهایی اپیدیم دیده می‌شود (۱۵ و ۱۶). وجود پوشش بتا دفسین برای نفوذ و حرکت اسپرم در موکوس گردن رحم ضروری می‌باشد و به نظر می‌رسد این توانایی مربوطه وجود اسید سیالیک با بار منفی در ساختمان بتا دفسین می‌باشد (۱۷). گلیکوپروتئین DEFB126 در وقایعی همچون ذخیره‌سازی اسپرم در داخل ناحیه دمی اپیدیم، 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 با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد DEFB126 از ورود اسپرم به موکوس سرویکس در محیط آزمایشگاهی

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 فرابیوتک در آمریکا به واسطه شرکت فراپژوه در ایران سفارش داده شدند. این شرکت تعیین توالی قطعات موردنظر را با استفاده از روش تعیین توالی سنگر در سیستم XLABI 3730 capillary sequencer انجام داد. سپس توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای FinchTV و Aligen Sequences و 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 (Sigma) BSA ۳٪ در ۳۷°C آنکوبه و پس از گذشت ۱ ساعت با آنتی‌بادی اولیه (رقیق شده با BSA به نسبت ۱:۵۰) به مدت ۲ ساعت تیمار شدند. سپس اسلایدها ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو شده و با آنتی‌بادی ثانویه FITC کژوگه (با رقت ۱:۵۰۰) شستشو شدند. (Santa cruz biotechnology) به مدت ۱ ساعت در ۳۷°C آنکوبه 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 دفنسنین ۱۲۶ با نتایج باروری از طریق تزریق داخل رحمی اسپرم استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه تغییرات ژنتیکی آگزون ۲ 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 دفنسنین ۱۲۶ از تکنیک ایمنوسیتوشیمی استفاده گردید.

به دنبال 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 ۱۰۰۰-۲۰۰ ng/μl بود.

بعد از اعمال شرایط بهینه عملکرد پرایمر E2-Beta defensin ۱۲۶، قطعه ۲۵۸ جفت بازی حاوی آگزون ۲ ژن DEFB126 در ۷۶ بیمار تکثیر گردید. نتایج عملکرد این جفت پرایمر در شکل ۱ آورده

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.

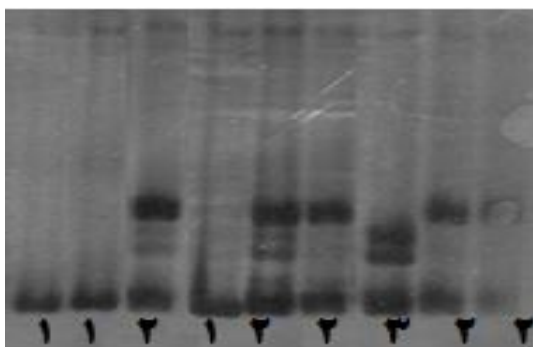
پس از استخراج DNA از خون بیماران مورد مطالعه، کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر 2000NanoDrop Scientific) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای بررسی تغییرات ژنتیکی در ژن بتا دفنسنین ۱۲۶ در گروه‌های مورد مطالعه از جفت پرایمر طراحی شده '5'-AAGAAATGGTTGGGCAATGTGC-3' و '5'-CCACCATGCTTTAATGAGTCGGG-3'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

جدول ۱- برنامه سیکل‌های PCR

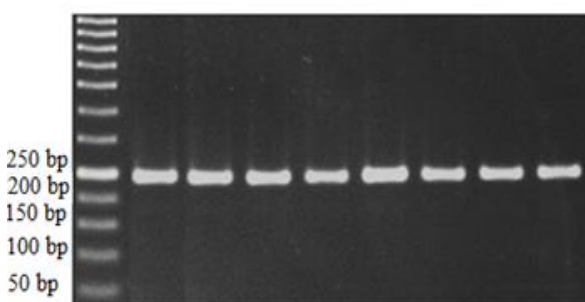
تکرار	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	عملکرد هر مرحله
۱ سیکل	۳ دقیقه	۹۴°C	Initiation denaturation
	۱ دقیقه	۹۴°C	Denaturation
۳۰ سیکل	۱ دقیقه	۵۸/۵°C	Annealing
	۱ دقیقه	۷۲°C	Extension
۱ سیکل	۷ دقیقه	۷۲°C	Final extension

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. پلی‌مورفیسم کنفورماسیون تک رشته‌ای (SSCP: Single-strand conformation polymorphism) به شرح ذیل انجام گردید:

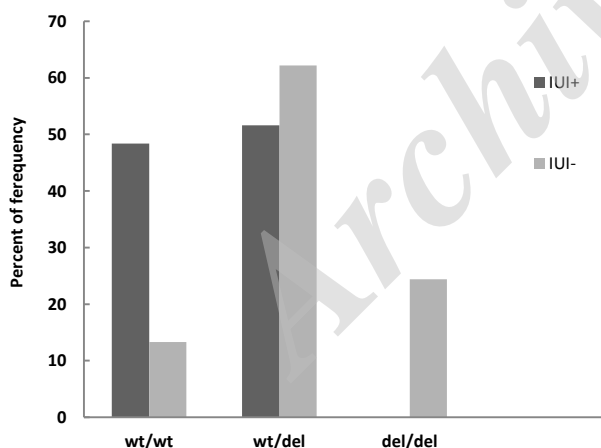
۵μl DNA با ۵μl محلول بارگذاری بروموفنول بلو (Fermentas) حاوی ۹۵٪ فرم آمید (Roche)، ۰/۰۵ زایلین سیانول و EDTA نیم میلی مولار (Merck) ترکیب شد. این مخلوط در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه آنکوبه گردید. سپس ۱۰ دقیقه روی یخ سرد شده و روی ژل آکریل آمید، بیس آکریل آمید (۲۹:۱) در بافر ۰/۷۵ TBE در دمای ۵°C به مدت ۲ ساعت الکتروفورز (Bio-rad/Consort) شد، سپس توسط رنگ‌آمیزی به روش نترات 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.



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



شکل ۲- تصویر گرفته شده از یک ژل پلی آکریل آمید دنا توره پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره برای محصول PCRهای ناحیه ژنومی اگزون ۲ در ۹ نفر از گروه IUI- و IUI+



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

به منظور تأیید وجود پروتئین بتا دفسین ۱۲۶ بر روی سطح اسپرم انسان و بررسی بیان این پروتئین در سطح اسپرم افرادی با ژنوتیپ مختلف رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی اختصاصی بتا دفسین ۱۲۶ انجام شد. نتایج ایمونوسیتوشیمی در شکل ۴ نشان داده شده است.

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

پس از انجام تکنیک SSCP برای محصول PCRهای ناحیه ژنومی اگزون ۲ از ژن بتا دفسین ۱۲۶ در ۷۶ بیمار مورد مطالعه، براساس الگوهای باندهای، در ۳ گروه مختلف تقسیم بندی 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 تقسیم بندی شدند.

نتایج حاصل از تعیین توالی با نرم افزار BLAST به طور کامل تأیید کننده نتایج SSCP بوده به طوری که در ۱۱ نمونه از بیمارانی که دارای باند گروه ۳، از SSCP بودند یک تغییر دو نوکلئوتیدی (حذف دو نوکلئوتید سیتوزین) در توالی اگزون ۲ مشاهده شد. ۵۵ نمونه از بیمارانی که دارای باندهای گروه ۲ و ۱، از SSCP بودند هیچ تغییری در توالی اگزون ۲ نشان ندادند.

ژنوتیپ wt/wt مربوطه فردی است که هیچ تغییر دو نوکلئوتیدی در این ناحیه (اگزون ۲) ندارد و تمام ۵ سیتوزین را دارا می باشد (هوموزیگوت نرمال) (شکل ۳a).

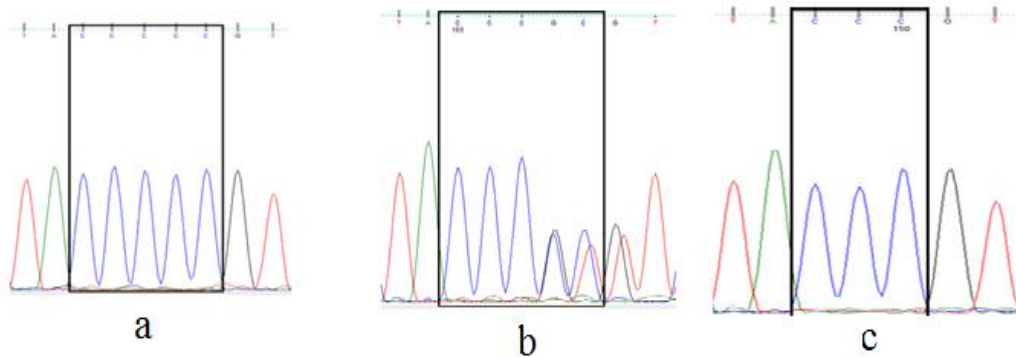
ژنوتیپ wt/del نیز مربوطه افرادی است که تغییر دو نوکلئوتیدی در ناحیه اگزون ۲ ندارند ولی در نرم افزار FinchTV مشاهده می شود که در ناحیه مورد نظر در منطقه نوکلئوتیدی ۳۹۳ و ۳۹۴ دارای دو پیک می باشد که یک پیک مربوطه آل سالم و یک پیک مربوطه آل جهش دار می باشد (هتروزیگوت) (شکل ۳b).

ژنوتیپ del/del مربوطه افرادی است که تغییرات دو نوکلئوتیدی (حذف دو نوکلئوتید سیتوزین) را در ناحیه اگزون ۲ نشان می دهند (هوموزیگوت جهش یافته) (شکل ۳c).

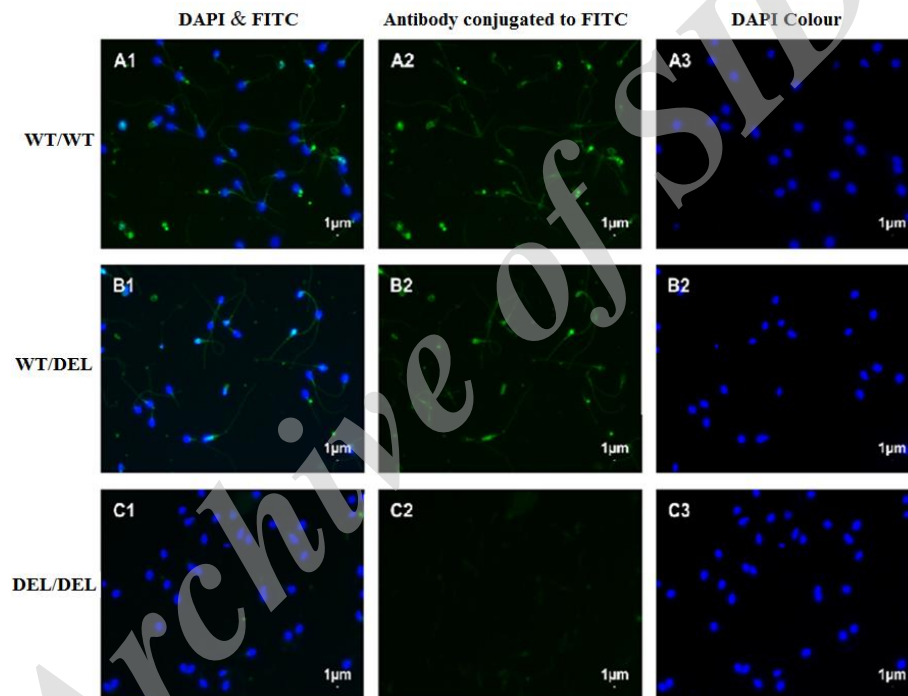
پس از آنالیز آماری داده ها تفاوت معنی داری بین دو گروه مورد مطالعه در ژنوتیپهای wt/wt و del/del مشاهده شد که به ترتیب دارای P.Value ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۳ می باشند. این نتایج نشان می دهد که ژنوتیپ هوموزیگوت جهش دار می تواند عاملی در ناباروری مردان باشد. (نمودار ۱، جدول ۲).

جدول ۲- نتایج آنالیز آماری داده های حاصل از بررسی ژنتیکی اگزون ۲ ژن بتا دفسین ۱۲۶ با در نظر گرفتن $P \leq 0/05$

	جمع	هوموزیگوت جهش دار	هوموزیگوت سالم	هتروزیگوت
نتایج منفی	تعداد	۱۱	۶	۲۸
	درصد	۲۴/۴٪	۱۳/۳٪	۶۲/۲٪
نتایج مثبت	تعداد	۰	۱۵	۱۶
	درصد	۰/۰٪	۴۸/۴٪	۵۱/۶٪
جمع	تعداد	۱۱	۲۱	۴۴
	درصد	۱۴/۵٪	۲۷/۶٪	۵۷/۹٪
P.V		۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۳۵



شکل ۳- توالی خوانش شده الگوهای مختلف ژل پلی آکریل آمید دنا توره از اگزون ۲ بیماران



شکل ۴- نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی، ستون A شامل ادغام عکس های رنگ آمیزی هسته سلولها با رنگ دیی و رنگ آمیزی توسط آنتی بادی کنژوگه به FITC، ستون B شامل عکس های رنگ آمیزی توسط آنتی بادی کنژوگه به FITC و ستون C شامل رنگ آمیزی هسته ها توسط رنگ دیی می باشد.

بحث

واریانت ژنتیکی مورد مطالعه یک حذف دو نوکلئوتیدی است که منجر به تشکیل یک mRNA بدون کدون خاتمه می گردد. مردانی که دارای این حذف به صورت هموزیگوت هستند، اسپرم هایی تولید می کنند که در الیگوساکاریدهای متصل به پروتئین های سطحی دچار نقص هستند و در نفوذ به ژل های هیالورونیک اسید (HA) در محیط آزمایشگاهی (in Vitro) با مشکل مواجه می شوند (۲۷). مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی اثر ژنوتیپ خاص (del/del) در ژن بتا دهنسین

باتوجه به این که آنتی بادی ثانویه منتخب (کنژوگه به FITC)، به رنگ سبز است، سطح اسپرمها به رنگ سبز دیده شد. رنگ آبی نشان دهنده هسته سلولهاست که با رنگ DAPI رنگ آمیزی شده اند. همان طور که در شکل نشان داده شده میزان این پروتئین در افرادی که هموزیگوت del/del بودند کمتر از افرادی با ژنوتیپ هموزیگوت wt/wt می باشد. همچنین میزان این پروتئین در سطح اسپرم افرادی که هتروزیگوت هستند نیز کمتر از افرادی بود که هموزیگوت سالم بودند.

و افزایش پتانسیل لقاح اسپرم با تخمک (۲۰) و باتوجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که وقوع جهش در ژن بتا دفسین 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 می‌دارند. این مقاله حاصل طرح "بررسی ژنتیکی و پروتئینی بتا دفسین ۱۲۶ و رابطه آن با نتایج درمان ناباروری از طریق تزریق داخل رحمی" می‌باشد.

References

- Hamada AJ, Montgomery B, Agarwal A. Male infertility: a critical review of pharmacologic management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2012;13:2511-31.
- Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod* 1998;1:33-44.
- Quaas A, Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. *Reviews in Obstetrics and Gynecology* 2008;1:69-76.
- Allen NC, Herbert CM 3rd, Maxson WS, Rogers BJ, Diamond MP, Wentz AC. Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil Steril* 1985;44:569-80.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Holland MK, Orgebin-Crist MC. Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. *Biol Reprod* 1988;38:487-96.
- King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:116.

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 دفسین 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 $24/4\%$ درصد و در بیمارانی که نتایج باروری آنها مثبت شده بود صفر درصد محاسبه گردید ($P \leq 0.05$). 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 $27/6\%$ هتروزیگوت $57/9\%$ و هموزیگوت جهش دار $14/5\%$ می‌باشند ($P \leq 0.05$). 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 دفسین ۱۲۶ 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 دفسین ۱۲۶ بودند نسبت به 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 ۰-الیگوساکاریدی سطح اسپرم دچار نقص هستند (۲۱). بر این اساس بتا دفسین 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 دفسین 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

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 macaque sperm 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 isoforms in 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, Armour JA. 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, Guerrero 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.



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 glycocalyx. 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.