Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(86): 31-40

Relation of β-defensin 126 gene (*DEFB126)* alteration and protein expression with unexplained male infertility in Iranian population

Rostami Chayjan M[1], Sabbaghian M[2], Alikhani M[3], Sahraneshin Samani F[4], Salman Yazdi R[2], Almadani N [5] , Mohseni Meybodi A[5*]

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2- Department of Andrology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
3- Department of Molecular Systems Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
4- Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
5- Department of Genetic at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.

Received: 21 May 2014, Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

Background: Human β-defensin 126 (12kDa) is a small cationic glycoprotein that is highly rich of cysteine. *DEFB126* gene is located on the subtelomeric end of 20p1.3 in human. High expression of this protein is reported in epididymis. This polypeptide coats the plasma membrane of sperm during epididymal transit. It is likely that β -defensin 126 might have role in unexplained male infertility since it involves in sperm maturation and capacitation. The current research designed to investigate if there is relation between β-defensin 126 gene mutation and unexplained male infertility.

Materials and Methods: In this case- control study we followed a two cytosine nucleotides deletion of β-defensin 126 gene in 35 Iranian men with unexplained infertility and 40 fertile men with normal spermogeram as control group. Standard PCR, SSCP(Single strand conformational polymorphism), and sequencing were used to detect genetic alteration of β-defensin 126. ELISA was performed for the assessment of the protein expression on sperm cells.

Results: Analysis of genetic data revealed 28.6% homozygote deletion in unexplained infertile men while this deletion was detected in 7.5% of controls. The deletion frequency was statistically higher in infertile patients than normal control group ($p<0.05$). The protein expression was less in men with del/del genotype compare to the other genotypes ($p<0.005$).

Conclusion: Our study shows that this common sequence variation of β-defensin 126 takes part in impairment of male reproductive function. Consequently, men with the del/del genotype are significantly less fertile than men who carry the wild type allele.

Keywords: β-defensin 126, unexplained male infertility, glycocalyx, Spermatogenesis, Mutation.

*Corresponding Author:
Address: Department of Genetic at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
Email: anahitamohseni@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 17، شماره 5 (شماره پیاپی 86)، مرداد 1393، 40-31

ارتباط بین جهش ژن و بیان پروتئین بتادفنسین- 126 با ناباروری ناشناخته در مردان ایرانی

مارال رستمی چایجان[1]، مرجان صباغیان[2]، مهدی علیخانی[3]،فاضل صحرانشین سامانی[4]، رضا سلمان یزدی[2]، سید نوید المدنی[5]، آناهیتا محسنی میبدی[5*]

1- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست شناسی، دامغان، ایران

2- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه آندرولوژی، تهران، ایران

3- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست شناسی سامانه های مولکولی، تهران، ایران

4- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلولهای بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

5- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران

تاریخ دریافت:93/2/31 تاریخ پذیرش: 93/3/21

چکیده

زمینه و هدف: بتا دفنسین126 انسانی یک گلیکوپروتئین کوچک کاتیونی (12کیلو دالتون) بسیار غنی از سیستئین است. ژن این پروتئین در انسان بر روی انتهای تلومری بازوی کوتاه کروموزوم 20 قرار دارد. بیان بالایی از این پروتئین در اپیدیدیم گزارش شده است. این پلی‌پپتید سطح سلول‌های اسپرم را در حین عبور از اپیدیدیم پوشش می‌دهد. از آنجا که بتا دفنسین 126 در بلوغ و ظرفیت‌پذیری اسپرم موثر است، می‌تواند نقش مهمی در ناباروری ناشناخته درمردان ایفا نماید. پژوهش حاضر برای بررسی رابطه بین جهش در ژن بتا دفنسین 126 و ناباروری ناشناخته در مردان طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد- شاهد جهش دو نوکلئوتیدی سیتوزین3121 و 3122 در اگزون 2 ژن *DEFB126* در 35 مرد ایرانی با ناباروری ناشناخته و 40 مرد بارور با اسپرموگرام طبیعی به عنوان گروه کنترل مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان بررسی شد. در این مطالعه روش‌های SSCP و تعیین توالی برای یافتن تغییر در ژن مورد استفاده قرار گرفت. روش الایزا برای ارزیابی بیان این پروتئین در سطح سلول‌های اسپرم انجام شد.

یافته‌ها: بررسی داده‌های ژنتیکی نشان داد که 28/6 درصد از مردان با ناباروری ناشناخته و 7/5 درصد از گروه کنترل دارای ژنوتیپ هموزیگوت جهش دارdel/del می‌باشند. فراوانی جهش به طور معنی‌داری در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بود (p0/05 >). بیان این پروتئین در مردان با ژنوتیپ هموزیگوت del/del نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها کمتر است(p0/005 >).

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که این تغییر رایج در توالی ژن *DEFB126* عامل موثری بر عملکرد سیستم تولید مثلی می‌باشد. در نتیجه مردان با ژنوتیپ هموزیگوت جهش دار نسبت به مردانی که آلل هموزیگوت طبیعی را دارا می‌باشند قدرت باروری کمتری دارند.

واژگان کلیدی: بتا دفنسین 126، ناباروری ناشناخته در مردان، گلیکوکالیکس، اسپرماتوژنز، جهش

نویسنده مسئول: تهران، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک

Email:anahitamohseni@gmail.com

مقدمه

بر اساس جدیدترین تعریف سازمان جهانی بهداشت، ناباروری به صورت عدم موفقیت حاملگی در زوج‌هایی که بدون هیچ روش پیش‌گیری به مدت یک سال مقاربت داشته‌اند، تعریف می‌شود(1). حدود 15 درصد زوج‌ها در سرتاسر دنیا از ناباروری رنج می‌برند(2). از این تعداد، اختلال در شاخص‌های باروری مردان و زنان هرکدام 30 درصد موارد، اختلالات هر دو طرف 10 درصد موارد و نهایتاً عوامل ناشناخته 30 درصد موارد ناباروری را شامل می‌شود(3). در مردان نابارور با علل ناشناخته و فاقد اختلالات غدد درون ریز گرچه اسپرم دارای فاکتورهای اسپرموگرام (تحرک، مورفولوژی، غلظت) طبیعی می‌باشد ولی به دلایلی قادر به رسیدن به تخمک و باروری آن نیست(4). این نوع ناباروری عموما به دلایل ایمنی و ژنتیکی می‌باشد(5).

در طی بلوغ اسپرم پروتئین‌های اپیدیدیمی متعددی مانند دفنسین که تحت کنترل آندروژن‌ها تولید می‌گردند به سطح سلول‌های اسپرم اضافه می‌شوند (6، 7). دفنسین‌ها در ایمنی ذاتی بدن پریمات‌ها و بسیاری از گونه‌های دیگر بسیار حائز اهمیت می‌باشند(8). دفنسین‌های انسانی پپتیدهای کاتیونی کوچکی هستند که توسط نوتروفیل‌ها و سلول‌های اپیتلیالی تولید می‌شوند و به دو زیر خانواده ژنتیکی مشخص آلفا و بتادفنسین تقسیم‌بندی می‌شوند. اولین بتا دفنسین انسانی (hBD_1) در سال 1995 شناسایی شد(9). در بین بتا دفنسین‌ها یک گلیکوپروتئین ترشحی سرشار از سیستئین بنام بتادفنسین 126 وجود دارد که توسط سلول‌های اصلی اپیتلیوم اپیدیدم ترشح شده و کل سطح اسپرم را پوشش می‌دهد(10، 11). این پروتئین یکی از مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده پوشش گلیکوکالیکس در اسپرم پریمات‌ها و انسان می‌باشد و از اسپرم در برابر میکروب‌های عفونت‌زا و سیستم ایمنی زنان محافظت می‌کند و هم‌چنین به نفوذ اسپرم به سرویکس رحم کمک می‌کند. بتادفنسین 126 به دلیل گلیکوزیله بودن دارای بار منفی می‌باشد و با بار منفی سرویکس دافعه ایجاد کرده و حرکت اسپرم‌ها را در این مجرا تسهیل می‌کند(12). ژن این پروتئین بر روی بخش انتهایی تلومری بازوی کوتاه کروموزوم 20 (20p1.3) قرار دارد(13). این ژن دارای دو اگزون و یک اینترون می‌باشد(11). حذف دو نوکلئوتید سیتوزین از اگزون 2 ژن *DEFB126* سبب تغییر قالب خوانش شده و یک mRNA غیر طبیعی و فاقد کدون پایان تولید می‌گردد. بررسی روی 638 زوج به صورت تصادفی بدون در نظر گرفتن هر گونه سابقه باروری یا ناباروری در کشور چین نشان داد که مردان دارای ژنوتیپ هموزیگوت در این جهش دارای شانس موفقیت کمتری در لقاح و باروری هستند(14). پژوهش حاضر در راستای یافتن هرگونه ارتباط بین جهش در ژن *DEFB126* و ناباروری ناشناخته در جمعیت مردان ایرانی در پژوهشگاه رویان طراحی گردید. بر همین اساس با توجه به نقش پروتئین دفنسین در عملکرد اسپرم و هم‌چنین نتایج تحقیق فوق، در این تحقیق این پروتئین در مردان نابارور با علت ناشناخته و اسپرموگرام طبیعی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به صورت مورد – شاهد طراحی شد. در این مطالعه، پس از اخذ رضایت آگاهانه از شرکت کنندگان در طرح، نمونه خون و منی گرفته شد. 35 مرد با ناباروری ناشناخته به عنوان گروه مورد و 40 مرد بارور که در گذشته هیچ گونه سابقه ناباروری، سقط جنین و استفاده از روش‌های کمک باروری نداشته‌اند به عنوان گروه شاهد که در هر دو گروه نتیجه اسپرموگرام بر اساس استانداردهای سازمان جهانی بهداشت طبیعی در نظر گرفته شد.

برای بررسی تغییرات ژنتیکی ژن *DEFB126* در افراد مورد مطالعه استخراج DNA به روش نمکی صورت گرفت. گام اول جهت تعیین ژنوتیپ انجام روش PCR بود که تکثیر یک قطعه 258bp از نمونه DNA تمام افراد تحت مطالعه صورت گرفت. جهت انجام این روش از پرایمر رفت 5′-AAGAATGGTTGGGCAATGTGC-3′ و پرایمر برگشت 5′-

CCACAATGCTTTAATGAGTCGGG-3′ استفاده گردید که پیشتر توسط تولنر در سال 2011 طراحی شده بود. برای انجام PCR، 2 میکرولیتر از نمونه DNA به 48 میکرولیتر ازPCR Master افزوده شد. شرایط PCR شامل مرحله واسرشت اولیه در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و سپس انجام 30 چرخه به صورت مراحل واسرشت در 94 درجه سانتی‌گراد برای 45 ثانیه، اتصال در 59 درجه سانتی‌گراد برای 45 ثانیه و بازآرایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه بود.

(SSCP) *Single-Strand Conformation Polymorphism*

این روش با استفاده از شرایط استاندارد به شرح زیر انجام شد: در ابتدا ژل پلی آکریل آمید 10 درصد تهیه شد (مواد محلول آکریل آمید: بیس آکریل آمید (29:1)، TBE Buffer 5×، ddH_2O، گلیسرول 50 درصد، آمونیوم پرسولفات 10 درصد، TEMED) و محصول‌های PCR توسط بافر فرمامید در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه دناتوره شد و سپس در ژل پلی آکریل آمید به مدت 18 ساعت در دستگاه الکتروفورز عمودی (پایا پژوهش پارس) با شدت جریان 20 میلی آمپر بارگذاری گردید. رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید توسط نیترات نقره در سه مرحله صورت گرفت: ابتدا ژل به مدت سه دقیقه در سینی متحرک حاوی 50 میلی‌لیتر محلول اتانول 96 درصد و 2 میلی‌لیتر اسید استیک 99 درصد که در نهایت به حجم 250 میلی‌لیتر رسیده بود قرار گرفت. سپس 25 میلی‌لیتر از محلول نیترات نقره 1 درصد با آب دو بار تقطیر به حجم 250 میلی‌لیتر رسانده شد و ژل به مدت 15 دقیقه درون محلول قرار گرفت. سرانجام 10 میلی‌لیتر از محلول سود 37/5 درصد با آب دو بار تقطیر به حجم 250 میلی‌لیتر رسانده شد و سپس 1 میلی‌لیتر فرمالدهید 36/5 درصد به آن اضافه شد و ژل به مدت 10 دقیقه تا ظهور باندها درون آن قرار داده شد. شایان ذکر است که پس از مرحله اول و دوم ژل توسط آب دو بار تقطیر شستشو داده شد و مرحله دوم در تاریکی صورت گرفت.

تعیین توالی (Sequencing)

محصول PCRهایی که طی انجام SSCP باندهای مشابهی را بر روی ژل پلی آکریل آمید نشان دادند، در گروه‌های مجزا دسته‌بندی شدند و از هر گروه چند نمونه جهت تعیین توالی (شرکت FAZA Biotec - آمریکا) فرستاده شد. تعیین توالی قطعات مورد نظر با استفاده از روش تعیین توالی سنگر در سیستمXLcapillary ABI 3730 sequencer صورت پذیرفت. سپس توالی‌ها توسط نرم افزارهایAlign SequencesNucleotide BLAST و Finch TV آنالیز شدند.

استخراج پروتئین توسط تری‌کلرو استیک اسید-استون (TCA -Acetone)

در ابتدا نمونه منی با استفاده از بافر فسفات شستشو شد. برای این منظور 2میلی‌لیتر از مایع منی به همراه 2 میلی لیتر PBS مخلوط شده، با سرعت 643g به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. فرایند شستشو برای دو بار صورت گرفت. محلول سطحی خارج شده و به پلیت زیری 2 میلی‌لیتر از محلول TCA Acetone اضافه و پیپتاژ شد و یک ساعت در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از یک ساعت محلول در دور 19000g به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل 2 میلی‌لیتر استون اضافه و پس از ورتکس و به مدت یک ساعت در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از یک ساعت محلول در دور 6000g به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی زیر هود شیمیایی دور ریخته و به پلت 2 میلی‌لیتر استون اضافه شد و کاملا ورتکس و به مدت 30 دقیقه در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از 1 ساعت 2 مرحله آخر تکرار شده و محلول رویی خارج گردید و ویال‌ها زیر هود قرار داده شد تا قبل از افزودن بافر لیزکننده رسوب کف آن به خوبی خشک شود. به رسوب کف ویال بافر لیز کننده همراه با مهار کننده پروتئیناز اضافه شد و رسوب کاملا درون بافر حل گردید.

جهت تعیین غلظت نمونه پروتئین از آزمون براد فورد در حضور پروتئین استاندارد گاماگلوبولین با

غلظت‌های 3 ،6 و 9 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. غلظت پروتئین در طول موج 595 نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر(Termo Scientific) خوانده شد.

روش الایزا

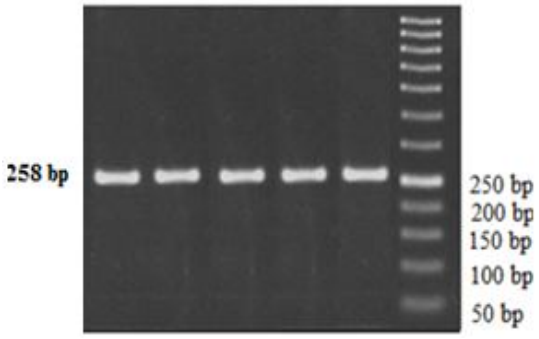
25 میکرولیتر از نمونه پروتئین(50ng/ml)همراه با 75 میکرولیتر از بافر کربنات – بی‌کربنات درون هر چاهک از پلیت 96 خانه مخصوص الایزا ریخته شد و ویال‌ها در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد برای یک شبانه روز قرار داده شد تا به کف پلیت کوت شود. پس از این مرحله محلول درون هر چاهک خارج شد و چاهک‌ها به مدت 10 دقیقه با + PBST با دو بار تکرار شستشو داده شد. 100 ماکرولیتر از محلول 5 درصد BSA درون هر چاهک ریخته و درب پلیت بسته شد و به مدت 1 ساعت در دمای اتاق باقی ماند. محلول درون هر چاهک خارج و چاهک‌ها به مدت 10 دقیقه با PBST با دو بار تکرار شستشو داده شد. آنتی‌بادی اولیه Goat Anti rabbit به نسبت 1 به 20 رقیق شد و درون هر چاهک 100 میکرو لیتر از آنتی بادی رقیق شده اضافه گردید و در دمای اتاق روی شیکر به مدت یک ساعت و نیم قرار گرفت. سپس مایع درون هر چاهک خارج گردیده و 200 میکرو لیتر از PBST روی هر چاهک ریخته و به مدت 10 دقیقه با دو بار تکرار شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه Horseradish Peroxidase (HRP) به نسبت 1 به 1000 درون PBST رقیق شد و 100 میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. محلول درون هر چاهک خارج شد و چاهک‌ها به مدت 10 دقیقه با PBST با دو بار تکرار شستشو داده شد. در اتاق تاریک 100 میکرولیتر، سوبسترای تترامتیل بنزیدین (Tetranethyl benzidine-TMB) به دورن هر چاهک اضافه شد و به مدت 10 دقیقه صبر کرده و در مکان تاریک قرار داده شد و زمانی که رنگ آبی مشاهده گردید 100 میکرولیتر اسید سولفوریک 0/5 مولار به عنوان متوقف کننده واکنش روی هر چاهک اضافه گردید و در پایان توسط دستگاه الایزا ریدر غلظت پروتئین در هر کدام از چاهک‌ها در طول موج 450 نانومتر خوانده شد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه 16 و تست‌های آماری کای اسکوئر برای مقایسه تغییرات ژنتیکی مشاهده شده استفاده گردید و سطح معنی‌داری نیز کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد. در دو گروه مورد مطالعه از آزمون آماری آنووا برای بررسی آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پروتئینی استفاده شد. سطح معنی‌داری نیز کمتر از 0/005 در نظر گرفته شد. جهت انجام آنالیز هاپلوتایپینگ از سایت plink(link http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/index.shtml) استفاده شد.

یافته ها

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 OD 280 به 260 نانومتر بین 1/8 تا 1/92 بود که نشان دهنده عدم آلودگی با پروتئین و RNA می‌باشد. غلظت آنها نیز بین 1000-300 نانوگرم در میکرولیتر بود.

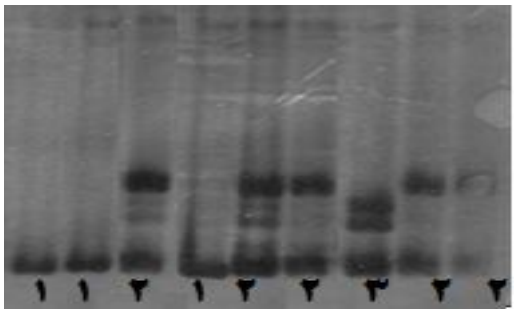
بررسی حذف هتروزیگوت و هموزیگوت ژن *DEFB126* با استفاده از عملکرد جفت پرایمر *DEFB126* بر روی نمونه DNA جمعیت مورد مطالعه (نمونه DNAهای 35 فرد بیمار و 40 فرد کنترل)، PCR بر روی کلیه نمونه‌ها انجام گردید. این پرایمرها در بیماران و افراد کنترل قادر به تکثیر قطعه 258 جفت بازی گردید که نشان دهنده حضور قطعه مورد نظر در ژنوم افراد مورد مطالعه می‌باشد(شکل1).



شکل1. عملکرد جفت پرایمر بر روی نمونه DNA افراد مورد مطالعه

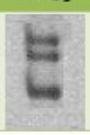
بررسی تغییرات ژنتیکی ناحیه ژنومی اگزون 2 از ژن *DEFB-126* در دو گروه مورد مطالعه با استفاده از تکنیکSSCP

روش SSCP برای مشاهده تغییرات ژنتیکی در قطعه DNA مورد نظر و با استفاده از محصولات واکنش PCR صورت می‌گیرد. در مطالعه حاضر بررسی SSCP برای محصولات PCR ناحیه ژنومی اگزون 2 از ژن *DEFB126* در 35 بیمار و 40 شاهد بارور، باندهای متفاوتی را نشان داد. پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره بر اساس الگوهای باندهی، در 3 گروه مختلف تقسیم‌بندی شدند که از هر دو گروه بیمار و کنترل تعدادی از نمونه‌ها در هر الگو جای گرفتند(شکل2) (جدول 1).



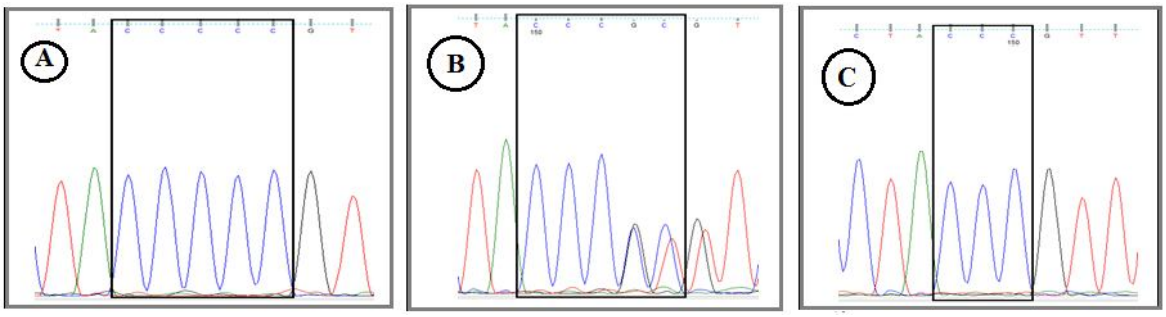
شکل 2. تصویر ژل پلی آکریل آمید دناتوره پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره

جدول1. دسته بندی نتایج روش SSCP

	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳
الگو باند SSCP			
نتایج	Homozygote (WT/WT)	heterozygote (WT/DEL)	Homozygote (DEL/DEL)

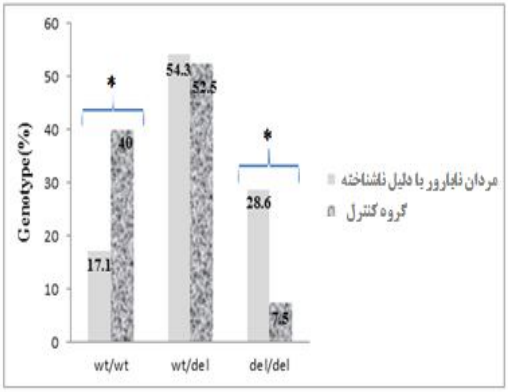
مقایسه توالی خوانش شده اگزون 2 با توالی مرجع در بیماران

توالی‌های خوانش شده مربوط به اگزون 2 ژن *DEFB126* در تمامی بیماران با توالی مرجع (NC_000020.10)در سایت NCBI-Gene مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج خوانش توالی 258 جفت بازی حاوی اگزون 2 ژن *DEFB126* نشان داد که افرادی که دارای الگوی باند شماره 1 در ژل پلی آکریل آمید بودند، درست در ناحیه مورد مطالعه دارای 5 سیتوزین بوده ژنوتیپ آنها به صورت هموزیگوت سالم wt/wt در نظر گرفته شد. افرادی که دارای الگوی باند شماره 2 بودند در ناحیه مورد نظر دارای یک پیک اضافه بودند به طوری که یک آلل دارای 5 سیتوزین و آلل دیگر دارای 3 سیتوزین بود و ژنوتیپ آنها به صورت هتروزیگوت wt/del در نظر گرفته شد و خوانش توالی از دو سو نتایج را تائید کرد. در جمعیت مورد مطالعه، از 40 فرد گروه کنترل 21 نفر و از 35 فرد گروه بیمار 19 نفر دارای این ژنوتیپ بودند. افرادی که نمونه آنها در ژل پلی آکریل آمید دارای الگوی 3 بودند در ناحیه مورد نظر دارای یک جهش دو نوکلئوتیدی سیتوزین بوده و تنها 3 سیتوزین را دارا بودند و ژنوتیپ آنها به صورت هموزیگوت جهش دار del/del در نظر گرفته شد(شکل3)، در جمعیت مورد مطالعه، از40 فرد گروه کنترل 3 فرد و از 35 فرد گروه بیمار 10 نفر دارای این ژنوتیپ بودند. نتایج حاصل از تعیین توالی افراد با ژنوتیپ هموزیگوت سالم نشان داد که این افراد در ژن *DEFB126* در منطقه نوکلئوتیدی 3121 و 3122 هموزیگوت سالم بوده و در این ناحیه ژنی دارای 5 سیتوزین هستند و هر دو آلل این ژن در این افراد wt می‌باشد و ژنوتیپ آنها به صورت هموزیگوت wt/wt است در جمعیت مورد مطالعه، از 40 فرد گروه کنترل 16 نفر و از 35 فرد گروه بیمار 6 نفر دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم بودند.



شکل 3 . توالی خوانش شده از اگزون 2 ژن *DEFB126* در افراد مورد مطالعه
A، ژنوتیپ هموزیگوت سالم B) ژنوتیپ هتروزیگوت C) هموزیگوت جهش دار

پس از انجام روش‌های Standard PCR، SSCP و تعیین توالی جهت بررسی جهش دو نوکلئوتیدی سیتوزین در اگزون 2 ژن *DEFB126* ، در 35 فرد با ناباروری ناشناخته تحت گروه بیمار و40 فرد بارور با اسپرموگرام طبیعی به عنوان گروه کنترل، مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان نشان داده شد که در گروه بیمار از 35 نفر، 6 فرد دارای ژنوتیپ هموزیگوت wt/wt (17/1 درصد)، 19 فرد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت wt/del (54/3 درصد) و 10 فرد دارای ژنوتیپ هموزیگوت del/del (28/6 درصد) بودند. در گروه کنترل از 40 فرد مورد مطالعه، 16 فرد دارای ژنوتیپ هموزیگوت wt/wt (40 درصد)، 21 فرد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت wt/del (52/5 درصد) و 3 فرد دارای ژنوتیپ هموزیگوت del/del (7/5 درصد) بودند. بر اساس آنالیز آماری انجام شده به روش کای اسکوئر، با در نظر گرفتن p0/05 >، فراوانی جهش به طور معنی‌داری در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بود(شکل4).



شکل4. مقایسه درصد فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف در ژن *DEFB126*(*p≤0.05)

نتایج بررسی بیان پروتئین بتا دفنسین 126 در سطح سلول‌های اسپرم با استفاده از روش الایزا

برای بررسی میزان پروتئین بتادفنسین 126 در سطح اسپرم و مقایسه آن ژنوتیپ‌های مختلف ژن *DEFB126* از روش الایزا استفاده گردید. همان‌طور که دربخش روش کار اشاره شد پس از انجام مراحل مختلف مقدار جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج 450 نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد که میانگین نتایج حاصل از خوانش در طول موج 450 نانومتر توسط دستگاه در جدول 2 آورده شده است.

جدول2. میانگین نتایج حاصل از خوانش جذب پروتئین *DEFB126*در نمونه‌های بیماران در ژنوتیپ‌های مختلف

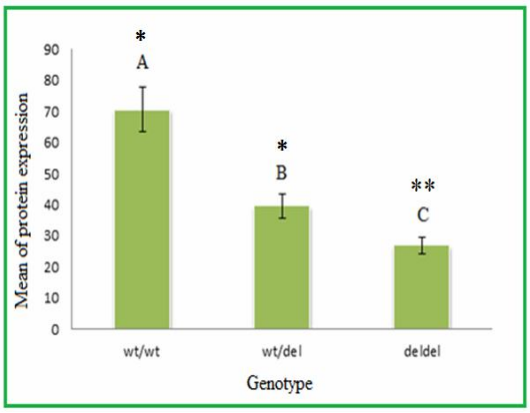
wt/wt	wt/del	del/del
0/7069±0/08211(SE)	0/3966±0/01944(SE)	0/2697±0/01562(SE)

نتایج به دست آمده از روش الایزا نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین بتادفنسین 126 در سطح اسپرم، بین گروه‌های مورد مطالعه وجود دارد و میزان این پروتئین در افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم و افراد هتروزیگوت بیشتر از افراد هموزیگوت جهش دار بود، میزان پروتئین در افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم با ژنوتیپ هتروزیگوت اختلاف معنی‌داری نشان داد (0/003 > p) و هم‌چنین در افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم و هتروزیگوت به نسبت ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌دار تفاوت معنی‌داری مشاهده شد(0/0001> p). (Anova p< 0/005 between group) (جدول3)(شکل5).

جدول 3. نتایج بررسی آماری روش الایزا با استفاده از آزمونANOVA

95%Confidence Interval		Sig.	Std.Error	Mean Difference(I-J)	(I)group2 (J)group2
Upper Bound	Lower Bound				
-0.983	-0.5223	0.003	0.8438	-0.31031	wt/del wt/wt
0.1882	0.656	0.000	0.2494	0.12690	del/del
0.5223	0.983	0.003	0.8438	-0.31031	wt/wtwt/del
0.6476	0.2268	0.000	0.8358	0.43721	del/del
-0.656	-0.1882	0.000	0.2494	-0.12690	del/del wt/del
-0.2268	-0.6476	0.000	0.8358	-0.43721	wt/wt

*The mean difference is significant at the 0.005 level.



شکل5. مقایسه بیان پروتئین *DEFB126*در سه ژنوتیپ، حروف A,B,C درج شده در بالای ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح بیان پروتئین در ژنوتیپ‌های سالم، هتروزیگوت و جهش‌دار است. (p≤0.005*)

بحث

براساس آمار انتشار یافته توسط سازمان جهانی بهداشت، شیوع ناباروری در دنیا بیش از 15 درصد برآورد می‌شود، ناباروری در مردان به صورت سندرمی چند عاملی تعریف می‌شود که سبب بروز ناتوانی‌هایی مانند عدم تولید اسپرم، تعداد کم اسپرم یا کیفیت بد اسپرم‌های تولید شده می‌گردد. احتمال می‌رود دلایل ناشناخته بیش از 30 درصد عوامل ناباروری در مردان باشد(15). با توجه به نقش مهم پروتئین بتا دفنسین 126 در تسهیل حرکت اسپرم در مجرای تناسلی ماده، حفاظت اسپرم در مقابل آنتی بادی‌های ضد اسپرم و افزایش پتانسیل لقاح اسپرم با تخمک می‌توان انتظار داشت که وقوع جهش در ژن این پروتئین می‌تواند یکی از عوامل کاهش شانس در دست یابی به باروری در مردان باشد.

در مطالعه حاضر، درگام اول بررسی جهت تکثیر قطعه مورد مطالعه از ژن *DEFB126* ، پرایمر *DEFB126* با استفاده از مطالعه تولنر و همکاران در سال 2011 بررسی و پس از تایید مورد استفاده قرار گرفت(13). نتایج بررسی حاضر و بررسی انجام شده توسط تولنر حضور قطعه مورد نظر از ژن *DEFB126* را در DNA نمونه افراد جمعیت‌های مورد مطالعه تایید کرد. در ادامه و برای اولین بار از روش SSCP برای بررسی الگوی تغییرات ژنوتیپ مربوط به ژن *DEFB126* استفاده شد. نتایج ما بیانگر الگوهای متفاوت ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت در نمونه‌های مورد بررسی بود. به علاوه این الگوها در هر دو گروه بیمار و کنترل مشاهده شد. در ادامه برای تایید نتایج حاصل از روش SSCP نمونه‌های DNA برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج به دست آمده در این بخش به طور کامل نتایج حاصل از سایر مطالعات ژنتیکی صورت گرفته را مورد تایید قرار داد. در این مطالعه برای اولین بار در ایران، بررسی حذف هموزیگوت و هتروزیگوت ژن *DEFB126* در مردان دارای ناباروری ناشناخته و مردان بارور انجام شد. نتایج نشان داد که حذف در این ژن به طور معنی‌داری در گروه مردان با ناباروری ناشناخته بیشتر از گروه کنترل می‌باشد. به طوری که درصد شیوع حذف هموزیگوت در گروه بیمار 28/6 درصد و در گروه کنترل 7/5 درصد محاسبه گردید (p0/05 >). پیش از این نیز تولنر و همکاران در تنها مطالعه صورت گرفته در این زمینه، حذف دو

نوکلئوتیدی ژنوتیپ 638 مرد چینی را مورد بررسی قرار داده بودند. افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم 29 درصد، ژنوتیپ هتروزیگوت 52 درصد و ژنوتیپ هموزیگوت جهش دار 19 درصد از افراد مورد مطالعه را تشکیل دادند(13). در مطالعه حاضر نیز در افراد با ناباروری ناشناخته شیوع ژنوتیپ هموزیگوت جهش دار بیش از گروه کنترل محاسبه گردید. در 75 فرد مورد مطالعه شامل گروه بیمار و کنترل، 29/3 درصد افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت سالم، 53/3 درصد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت و 17/3 درصد دارای ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌دار می‌باشند($p<0/05$) که به نسبت مطالعه گذشته درصد مشابهی را به خود اختصاص داد و ژنوتیپ هموزیگوت سالم و هتروزیگوت با مطالعه گذشته هم‌خوانی داشت.

در این مطالعه برای اولین بار از روش الایزا برای بررسی میزان پروتئین بتادفنسین 126 بر سطح سلول‌های اسپرم استفاده شد.

بررسی‌های قبلی نشان داده است که حذف دو نوکلئوتید سیتوزین از نوکلئوتیدهای 3121 و 3122 اگزون 2 ژن *DEFB126* سبب تولید یک mRNA فاقد کدون پایان می‌گردد. هم‌چنین با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوفلئوروسنت ثابت گردید که در افرادی که این ژنوتیپ را به صورت هموزیگوت del/del دارا بودند، در پوشش o- الیگوساکاریدی سطح اسپرم دچار نقص بوده و دارای میزان کمتری از پوشش پروتئین بتادفنسین 126 بودند. جالب اینجاست که در این مطالعه و مطالعه‌ای که قبلا صورت گرفته کیفیت مایع منی (دانسیته اسپرم، درصد اسپرم‌های متحرک، تحرک پیشرونده اسپرم و مورفولوژی اسپرم) این افراد با در نظر گرفتن استانداردهای سازمان جهانی بهداشت همانند افراد دارای آلل سالم ژن *DEFB126* ، طبیعی به نظر می‌رسید(14). از آنجا که افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت del/del به نسبت افراد با ژنوتیپ‌های هتروزیگوت wt/del و هموزیگوت سالم wt/wt به میزان قابل توجهی از قدرت باروری کمتری برخوردارند، بنابراین ژنوتیپ *DEFB126* می‌تواند پارامتر مفیدی در ارزیابی ناباروری مردان محسوب گردد. با توجه به اهمیت یافتن روش‌هایی جهت تشخیص دلایل ناباروری ناشناخته در مردان و هم‌چنین اهمیت پوشش گلیکوکالیکس در قابلیت اسپرم جهت انجام لقاح و حضور بالقوه پروتئین بتادفنسین 126 در این پوشش، مطالعه حاضر در راستای یافتن هرگونه ارتباط بین ژنوتیپ ژن *DEFB126* و ناباروری ناشناخته در مردان طراحی شد.

نتیجه گیری

این مطالعه نرخ بالایی از جهش در ژن *DEFB126* در بین جمعیت مردان نابارور با دلایل نامعلوم را تایید کرد و احتمال آن را در این افراد بیمار به صورت معنی‌داری بالاتر از افراد طبیعی نشان داد. این جهش سبب تغییر سطح بیان و هم‌چنین عملکرد پروتیین بتا دفنسین در سطح اسپرم شده که بر عملکرد اسپرم و در نتیجه شانس باروری تاثیر می‌گذرد. در صورت انجام مطالعات بیشتر در این زمینه می‌توان این ژنوتیپ را به عنوان معیاری جهت تعیین و پیش بینی نتایج درمان ناباروری، مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایانامه کارشناسی ارشد خانم مارال رستمی چایجان تحت عنوان " بررسی ارتباط جهش ژن و بیان پروتئین بتادفنسین- 126با ناباروری ناشناخته در مردان" می‌باشد که در پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی انجام شد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی و پرسنل پژوهشگاه رویان تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Hamada AJ, Montgomery B, Agarwal A. Male infertility: a critical review of pharmacologic management. Expert opinion on pharmacotherapy. 2012;13(17):2511-31.
2. Hamada A, Esteves SC, Agarwal A. The role of contemporary andrology in unraveling the

mystery of unexplained male infertility. Open Reprod Sci J. 2011;3:27-41.
3. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update. 2010: 16(3):231-45.
4. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained male infertility: diagnosis and management. International braz j urol. 2012;38(5):576-94.
5. Kamath MS, Bhattacharya S. Demographics of infertility and management of unexplained infertility. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2012;26(6):729-38.
6. Dunkel-Schetter C, Stanton AL. Psychological adjustment to infertility. Infertility: Springer; 1991. p. 197-222.
7. Heininger U, Kleemann WJ, Cherry JD. A controlled study of the relationship between Bordetella pertussis infections and sudden unexpected deaths among German infants. Pediatrics. 2004;114(1):e9-e15.
8. Palladino M, Mallonga T, Mishra M. Messenger RNA (mRNA) expression for the antimicrobial peptides β-defensin-1 and β-defensin-2 in the male rat reproductive tract: β-defensin-1 mRNA in initial segment and caput epididymidis is regulated by androgens and not bacterial lipopolysaccharides. Biology of reproduction. 2003;68(2):509-15.
9. Droin N, Hendra J-B, Ducoroy P, Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. Journal of proteomics. 2009;72(6):918-27.
10. Tollner TL, Bevins CL, Cherr GN. Multifunctional glycoprotein DEFB126—A curious story of defensin-clad spermatozoa. Nature Reviews Urology. 2012;9(7):365-75.
11. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, et al. Identification of multiple novel epididymis-specific β-defensin isoforms in humans and mice. The Journal of Immunology. 2002;169(5):2516-23.
12. Yudin A, Treece C, Tollner T, Overstreet J, Cherr G. The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glycocalyx. The Journal of membrane biology. 2005;207(3):119-29.
13. 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. Science translational medicine. 2011;3(92):92ra65-92ra65.
14. Rozen S. Defending male fertility. Science translational medicine. 2011;3(92):92ps31-92ps31.
15. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. Nature medicine. 2008; 14(11): 1197-213.