

РОЛЬ МУТАЦИИ ГЕНА ПРОТИВОМИКРОБНОГО ПЕПТИДА DEFB126 В ПАТОГЕНЕЗЕ МУЖСКОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО БЕСПЛОДИЯ

Хасанова Е.М., Ганковская Л.В., Бурмакина В.В.

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Мужское бесплодие является мультифакториальным заболеванием, и выявление этиопатогенетических механизмов, ведущих к его развитию, является актуальной проблемой. Часто установить причину снижения репродуктивной функции сперматозоидов не представляется возможным, что объясняет высокий процент постановки диагноза «идиопатическое бесплодие». Предполагается, что мутация гена противомикробного пептида семейства β -дефензинов DEFB126 негативно сказывается на оплодотворяющей способности сперматозоидов на разных уровнях: ухудшается их способность к миграции сквозь слой цервикальной слизи, снижается способность связываться с эпителием верхних отделов женского репродуктивного тракта, а также повышается подверженность инфекциям репродуктивного тракта ввиду нарушения местной защитной функции дефензинов. Таким образом, целью исследования явилось изучение роли полиморфного маркера rs11468374 гена противомикробного пептида *DEFB126* в патогенезе мужского идиопатического бесплодия.

Выборка пациентов с нарушением репродуктивной функции включала 54 человека в возрасте от 34 до 42 лет, группу контроля составили 19 доноров эякулята без острых или хронических заболеваний в возрасте 28-36 лет. Проведено исследование уровней экспрессии гена *DEFB126*, проанализированы частоты распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 среди мужчин московской популяции и ассоциация этих показателей с показателями подвижности сперматозоидов испытуемых.

Было показано снижение экспрессии гена *DEFB126* в более чем семь раз у пациентов с бесплодием в сравнении с донорами группы контроля. Анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфному маркеру rs11468374 гена *DEFB126* выявил, что среди мужчин с бесплодием мутантный аллель встречается в почти два раза чаще в сравнении с контролем. Среди доноров группы сравнения мужчин с генотипом гена *DEFB126 del/del* выявлено не было, в то время как среди пациентов этот показатель составил 16,1%. Подвижность сперматозоидов пациентов с генотипом *DEFB126 del/del* была ниже нормы в 5,2 раза.

Таким образом, полученные нами данные могут быть использованы для углубления знаний о механизмах патогенеза мужского идиопатического бесплодия и совершенствования методов его диагностики, а также развития персонализированного подхода в терапии нарушения мужской репродуктивной функции. Показанная нами ассоциация носительства мутантного аллеля *del* и снижения уровня подвижности сперматозоидов пациентов свидетельствует о роли данного полиморфизма в патогенезе мужского бесплодия. Снижение уровня экспрессии гена *DEFB126* в группе пациентов с бесплодием также подтверждает вклад дефензина в патогенез заболевания.

Ключевые слова: противомикробный пептид, *DEFB126*, *HBD126*, аллельный полиморфизм, экспрессия генов, идиопатическое бесплодие, подвижность сперматозоидов, спермограмма

Адрес для переписки:

Хасанова Елена Минсалимовна
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: 8 (916) 301-93-57.
E-mail: joimolino@gmail.com

Address for correspondence:

Khasanova Elena M.
N. Pirogov Russian National Research Medical University
117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanov str., 1.
Phone: 7 (916) 301-93-57.
E-mail: joimolino@gmail.com

Образец цитирования:

Е.М. Хасанова, Л.В. Ганковская, В.В. Бурмакина
«Роль мутации гена противомикробного пептида
DEFB126 в патогенезе мужского идиопатического
бесплодия» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23,
№ 5. С. 1115-1124.

doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2342

© Хасанова Е.М. и соавт., 2021

For citation:

E.M. Khasanova, L.V. Gankovskaya, V.V. Burmakina
“Role of antimicrobial peptide *DEFB126* mutation in pathogenesis
of male idiopathic infertility”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2021, Vol. 23, no. 5,
pp. 1115-1124.

doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2342

DOI: 10.15789/1563-0625-ROA-2342

ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE DEFB126 MUTATION IN PATHOGENESIS OF MALE IDIOPATHIC INFERTILITY

Khasanova E.M., Gankovskaya L.V., Burmakina V.V.

N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Male infertility is a multifactorial disease, and elucidation of etiopathogenetic mechanisms of its progression is a topical issue. High percentage of the “idiopathic infertility” diagnosis is largely caused by inability to establish etiology of decrease in reproductive spermatogenic function. Mutation of β -defensin DEFB126 gene is supposed to affect the fertilizing ability of spermatozoa at different levels: it may decrease their ability to migrate through the cervical mucus and reduce binding capacity to epithelial layer of upper female reproductive tract, and it may also increase susceptibility for infections of reproductive tract, due to impairment of local protective function of defensins. Thus, the aim of the present study was to examine possible role of rs11468374 gene polymorphism of the *DEFB126* gene in pathogenesis of male idiopathic infertility. Patients and methods: The group of patient with decreased fertility included 54 male subjects, ages 34 to 42, with a control group of 19 ejaculate donors without acute or chronic disease aged 28 to 36. The indicators of sperm motility in the Moscow population were compared with individual levels of DEFB126 gene expression, as well as with estimated distribution frequency of rs11468374 alleles and genotypes among the subjects.

As compared with the control group, the infertile patients exhibited a more than seven-fold reduction of *DEFB126* gene expression. Analysis of distribution frequency for alleles and genotypes rs11468374 polymorphic marker of the *DEFB126* gene revealed that the mutant allele is detected almost twice as often in males with infertility, as compared with control group. No cases with the *DEFB126 del/del* genotype were found among the control group, in contrary to 16.1% in the group of patients. The patients with *DEFB126 del/del* genotype exhibited 5.2-fold reduction of sperm motility. Thus, the data obtained may be used to extend our knowledge on the pathogenetic mechanisms of male idiopathic infertility and to improve techniques for its diagnostics, as well as to provide personalized approach to the treatment of male reproductive disorders. The association between carriage of *del* mutant allele and decreased level of sperm motility suggests a role of this polymorphism in pathogenesis of male infertility. A general decrease in the level of *DEFB126* gene expression in the patients affected by infertility also presumes a contribution of defensin 126 to pathogenesis of the disorder.

Keywords: antimicrobial peptide, *DEFB126*, *HBD126*, gene polymorphism, gene expression, idiopathic infertility, sperm motility, spermogram

Введение

Противомикробные пептиды представляют собой гетерогенную группу молекул, являющихся первой линией защиты организма от патогенов [7]. Это небольшие, состоящие из 12-50 аминокислотных остатков молекулы с различными физико-химическими свойствами и структурой. Наиболее важными противомикробными пептидами млекопитающих являются дефензины [13, 18, 23, 26]. Описано 3 подсемейства дефензинов: α -, β - and θ -дефензины, в организме человека продуцируются α - и β -дефензины [4]. Противомикробные пептиды семейства β -дефензинов являются важными гуморальными компонентами системы врожденного иммунитета и широко экспрессируются эпителиальными клетками слизистых оболочек респираторного и желудочно-кишечного трактов, кожи, рта, глаза, а также мужского и женского урогенитальных трактов [3, 18]. Спектр их функций охватывает такие процессы, как обеспечение прямой противомикробной активности в отношении широкого спектра чужеродных микроорганизмов, влияние на хемотаксис, стимуляцию пролиферации клеток и вы-

работку ими цитокинов, а также участие в процессах репродукции [20, 27].

Было показано, что несколько молекул семейства β -дефензинов (*DEFB118*, *DEFB125-127*), гены которых картированы на коротком плече 20 хромосомы, специфически и на высоком уровне экспрессируются в мужском репродуктивном тракте и мужскими половыми клетками, однако их роли и функции остаются не до конца изученными [27, 33].

Противомикробный пептид *DEFB126* (*HBD126*) является важным структурным компонентом гликокаликса сперматозоидов млекопитающих и представляет собой гомодимер, связанный с мембраной гидрофобными аминокислотными остатками, с молекулярной массой 13 кДа и длиной 111 аминокислот. β -дефензин *DEFB126* и состоит из типичного для этого семейства молекул богатого цистеином бета-дефензинового остова и специфического высоко гликозилированного длинного пептидного конца [29]. Карбоксильный конец протеина имеет порядка 20 сайтов O-гликозилирования и содержит гликаны, богатые сиаловыми кислотами [19]. Как член семейства β -дефензинов, *DEFB126* демонстрирует

противомикробную активность *in vitro* и способность связывать липополисахарид [24]. Противомикробную активность дефензины проявляют, связываясь с плазматическими мембранами бактерий и разрушая их [3, 24]. Подтверждают защитную функцию белка эксперименты, продемонстрировавшие антимикробную активность *in vitro* рекомбинантного *DEFB126* человека и его крысиного аналога *Defb22* [16, 21]. Существуют единичные исследования, показывающие, что спектр функций *DEFB126* также охватывает такие процессы, как обеспечение эффективного продвижения сперматозоида в женском половом тракте, препятствие распознаванию сперматозоидов компонентами женской иммунной системы и успешное оплодотворение яйцеклетки [35, 36, 37].

В последние годы коллективом ученых под руководством Tollner T.L. было продемонстрировано, что идентифицированный в структуре гена дефензина человека *DEFB126* полиморфизм dbSNP (rs11468374), представляющий собой дуплекцию нуклеотидную делецию во втором экзоне (2-nt *del/del*), вовлечен в патогенез снижения мужской репродуктивной функции [30]. Предполагается, что мутация гена *DEFB126* ассоциирована со значительным изменением структуры гликокаликса и снижением количества О-гликанов в структуре его молекул и встречается среди мужчин разных популяций, опосредуя нарушения их фертильной функции невыясненного генеза [11, 14, 30, 35].

В связи с этим **целью исследования** явилось изучение роли полиморфного маркера rs11468374 гена противомикробного пептида *DEFB126* в патогенезе мужского идиопатического бесплодия. Для достижения поставленной цели нами были определены уровни экспрессии гена *DEFB126* в клетках подвижной фракции эякулята мужчин, имеющих нарушения фертильной функции, исследованы распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 среди мужчин московской популяции и ассоциация этих показателей с показателями подвижности сперматозоидов испытуемых.

Материалы и методы

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ (протокол заседания №192 от 27 января 2020 г.). Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных, после чего были получены образцы эякулята.

Исследуемые группы

В исследование были включены 73 человека. В основную группу вошли 54 пациента с нарушением фертильной функции неустановленного генеза (средний возраст — $38,6 \pm 4,5$ лет). Кон-

трольную группу составили 19 здоровых доноров спермы репродуктивного возраста (средний возраст составил $32,8 \pm 4,7$ года). Материал был предоставлен Н.Г. Митюшиной (клиника вспомогательных репродуктивных технологий и лечения бесплодия «ВитроКлиник», руководитель сети центров репродукции, врач-репродуктолог, к.м.н. Базанов П.А.).

Критериями включения в основную группу являлись: мужской фактор бесплодия неустановленного генеза, подписание информированного согласия на участие в исследовании, возраст пациента от 28 до 45 лет.

Критериями исключения из основной группы являлись: наличие острых и обострения хронических заболеваний, гидроцеле, варикоцеле, паховой грыжи и других заболеваний, негативно влияющих на репродуктивную функцию, установленный женский фактор бесплодия в паре, употребление алкоголя и курение.

В группу контроля включались доноры с нормальными параметрами спермограммы и без каких-либо нарушений со стороны репродуктивной системы, соматических заболеваний, острых или обострения хронических заболеваний на момент участия в эксперименте.

Сбор эякулята и анализ подвижности сперматозоидов проводился в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения по исследованию и обработке эякулята [9]. Подвижность сперматозоидов оценивали методом фазово-контрастной микроскопии [9]. В зависимости от направления движения и скорости половые клетки принято делить на 4 категории — А, В, С, D. К категории А относятся сперматозоиды,двигающиеся по прямолинейной траектории с высокой скоростью, к категории В — так же прямолинейно двигающиеся клетки, однако с меньшей скоростью. Категорию С составляют сперматозоиды, имеющие аномалии строения шейки или хвоста, в связи с чем они двигаются вокруг своей оси или хаотично, и к категории D относятся неподвижные клетки. Таким образом, согласно рекомендациям ВОЗ, показатель подвижности складывается из процентного содержания в эякуляте сперматозоидов категорий А и В, и в норме составляет 50%.

Получение подвижной фракции сперматозоидов

В соответствии с рекомендациями, описанными в «Руководстве ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека», с использованием коммерческого набора SPERMGRAD™ (Vitrolife Sweden AB) в строгом соответствии с протоколом производителя методом центрифугирования эякулята в градиенте плотностей производили отделение фракции подвижных сперматозоидов от округлых клеток, лейкоцитов, дегенерирующих половых клеток и клеточного дебриса.

Для получения двуслойного градиента, состоящего из 45%-ных и 90%-ных растворов, 100%-ный раствор SpermGrad (Vitrolife Sweden AB) разводили с использованием рН-стабильной среды G-MOPS (Vitrolife Sweden AB). В чистые пробирки для центрифугирования с коническим дном сначала вносили 1 мл 90%-ного раствора, затем медленно наслаивали на него 1 мл 45%-ного раствора. Затем осторожно, не нарушая сепарации слоев, путем наслаивания на градиент, вносили 1 мл разжиженного эякулята, и центрифугировали при 600 g в течение 20 минут. Далее пастеровской пипеткой осторожно удаляли надосажок, содержащий семенную плазму, верхнюю интерфазу, 45%-ный слой и нижнюю интерфазу, а осадок, содержащий 90%-ный слой и целевые клетки, переносили в другую стерильную коническую пробирку для центрифугирования, добавляли 2 мл буфера для гамет SpermRinse (Vitrolife Sweden AB) и центрифугировали при 600 g 11 минут. Затем удаляли супернатант, наслаивали на осадок 1 мл буфера SpermRinse и инкубировали в течение 2 часов при +37 °С в атмосфере 6% CO₂.

После определения подвижности сперматозоидов и выделения подвижной фракции сперматозоидов, биоматериал в течение часа транспортировали в лабораторию кафедры иммунологии МБФ (зав. каф. д.м.н., проф. Ганковская Л.В.), где определяли экспрессию и полиморфный маркер rs11468374 гена *DEFB126*.

Анализ экспрессии и полиморфного маркера гена *DEFB126*

Для выделения нуклеиновых кислот из полученной фракции сперматозоидов использовали набор реактивов для выделения ДНК/РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля «АмплиПРАИМ Рибо-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия) строго в соответствии с протоколом производителя. Полученные образцы хранили при -70 °С. Далее осуществлялась постановка реакции обратной транскрипции (ОТ) в объеме 25 мкл с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» («Синтол», Россия) для синтеза копий кДНК на основе выделенной матричной РНК. Затем полученную кДНК использовали в постановке полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» («Синтол», Россия), согласно рекомендациям фирмы-производителя. Реакцию ПЦР-РВ проводили в амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Германия). Уровень экспрессии гена *DEFB126* оценивался по методу 2^{-ΔΔCt} в относительных единицах относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β-актина *ACTB* (рис. 1, 2, 3) [6, 8]. Необходимые праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Программа ПЦР для исследования экспрессии гена *DEFB126* состояла из следующих этапов:

- денатурация 95 °С – 5 мин, амплификация (отжиг 94 °С – 20 с, элонгация 64 °С – 30 с) – 35 циклов;

- финальная экстенция 72 °С 5 мин.

Для определения мутации гена человека *DEFB126* rs11468374 проводилась постановка ПЦР-РВ. Последовательности аллель-специфичных праймеров для определения мутации в гомозиготном состоянии *del/del* *DEFB126* и для определения аллеля дикого типа в гомозиготном состоянии *wt/wt* *DEFB126* были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Программа для определения полиморфизма гена *DEFB126* rs11468374 представлена ниже:

- денатурация 94 °С – 3 мин;

- амплификация (отжиг 94 °С – 60 с, элонгация 60 °С – 20 с, экстенция 72 °С – 1 мин) 35 циклов;

- финальная экстенция 72 °С 7 минут.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016, STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, США). Данные были проверены на нормальность распределения, определены их дисперсии. Сравнение исследуемых групп проводили с использованием непараметрического аналога дисперсионного анализа – критерия Краскела–Уоллиса и U-критерия Манна–Уитни.

Частоту встречаемости мутантного аллеля и аллеля дикого типа определяли прямым подсчетом. Для оценки степени различий в частоте встречаемости генотипов между исследуемыми группами использовался точный критерий χ^2 Пирсона. При этом рассчитывали коэффициент отношения шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (DI), а также р-значение. Соответствие распределения генотипов в обследованных группах каноническому распределению Харди–Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 . Уровень достоверности принимали 0,05.

Результаты

Оценка подвижности сперматозоидов и экспрессии гена *DEFB126* у пациентов с нарушением репродуктивной функции

На первом этапе исследования нами были проанализированы показатели подвижности сперматозоидов и определены уровни экспрессии гена *DEFB126* среди пациентов с нарушением фертильной функции и доноров здоровой группы.

Сперматозоиды пациентов с нарушением репродуктивной функции демонстрировали нарушение подвижности различной степени выраженности, чем объясняется разброс этого показателя

(рис. 1). Достоверных различий выявлено не было без изучения генотипа.

Экспрессия гена противомикробного пептида *DEFB126* у пациентов основной группы была снижена в 7,48 раза в сравнении с группой контроля ($p = 0,0001$).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *DEFB126*

Далее нами был исследован аллельный полиморфизм rs11468374 гена *DEFB126* (табл. 1).

Полученное распределение генотипов по полиморфизму rs11468374 среди обследованных мужчин соответствовало ожидаемому распределению Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 1,98$, $p = 0,159$ в исследуемой группе и $\chi^2 = 1,82$, $p = 0,176$ в контрольной группе). Согласно полученным данным, у обследованных пациентов с нарушением фертильной функции ($n = 56$) в сравнении с группой контроля ($n = 19$) частота встречаемости мутантного аллеля *del* в популяции возрастает в 1,9 раза – с 23% до 45% (табл. 1).

Среди мужчин с бесплодием носителями нормального генотипа *wt/wt* явились 25% обследованных, в то время как среди доноров контрольной группы этот показатель в 2 раза больше и составляет 52,6%. Генотип *wt/del* встречается у 58,9% мужчин основной группы и у 47,4% контрольной группы. Примечательно, что неблагоприятный мутантный генотип *del/del* был обнаружен только среди бесплодных мужчин (16,1%), мужчин-носителей мутации в гомозиготном положении среди контрольной группы обнаружено не было (табл. 1).

Достоверное увеличение частоты носительства мутантного аллеля *del* в основной группе пациентов с бесплодием ($\chi^2 = 6,073$, $p = 0,013$, OR = 3,15; 95% CI 1,04-9,52) свидетельствует об ассоциации данного аллеля с повышенным риском нарушения репродуктивной функции мужчин.

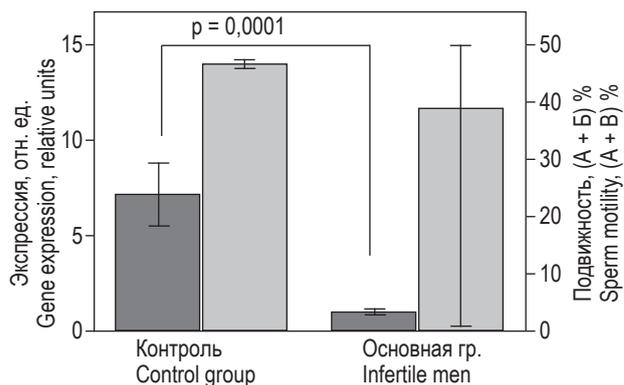


Рисунок 1. Уровни экспрессии гена *DEFB126* и уровни подвижности сперматозоидов обследуемых мужчин

Примечание. Серым цветом выделены колонки, демонстрирующие уровень экспрессии, голубым – уровень подвижности.

Figure 1. Expression levels of the *DEFB126* gene and levels of sperm motility in the examined men

Note. Columns showing the level of expression are highlighted in grey, and the level of mobility is highlighted in blue.

Исследование уровней экспрессии гена *DEFB126* в зависимости от генотипа пациентов по полиморфному маркеру rs11468374

При наличии генетической мутации *DEFB126 del* в ходе транскрипции гена образуются aberrantные мРНК, лишённые стоп-кодона, которые быстро разрушаются вследствие непрерывной работы клеточных механизмов контроля качества образующихся мРНК – nonstop-деградации (nonstop mediated decay). В связи с этим на следующем этапе исследования мы распределили больных на группы в зависимости от определенного генотипа по полиморфному маркеру rs11468374 гена *DEFB126* и провели оценку уровней экспрессии этого гена в полученных группах.

В начале мы провели сравнение уровня экспрессии целевого гена в сперматозоидах группы больных с генотипом *DEFB126 del/del* с экспрессией здоровых доноров с генотипами *DEFB126 wt/wt* и *DEFB126 wt/del* (рис. 2).

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА RS11468374 ГЕНА *DEFB126* В ОБСЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ МУЖЧИН

TABLE 1. FREQUENCIES OF DISTRIBUTION OF ALLELES AND GENOTYPES OF THE POLYMORPHIC MARKER RS11468374 OF THE *DEFB126* GENE IN THE EXAMINED GROUPS OF MEN

Обследуемая группа Group	Аллель Allele		Генотип Genotype					
	wt	del	wt/wt		wt/del		del/del	
	%	%	n	%	n	%	n	%
Мужчины с бесплодием Infertile men	54	45	14	25	33	58,9	9	16,1
Контрольная группа Control group	76	23	10	52,6	9	47,4	0	0

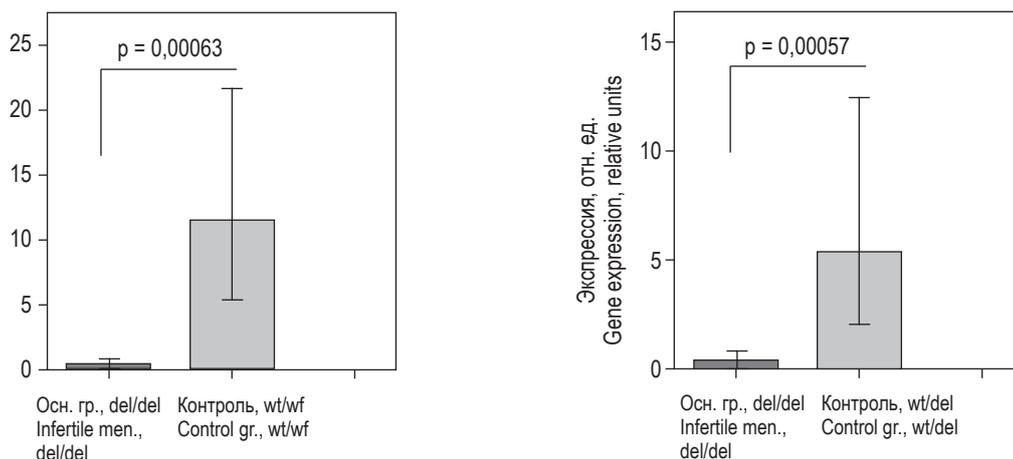


Рисунок 2. Левый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 del/del*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/wt*). Правый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* у пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 del/del*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/del*)

Примечание. Уровень значимости принимался < 0,05.

Figure 2. Left graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (*DEFB126 del/del* genotype) and control group (*DEFB126 wt/wt* genotype). Right graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (genotype *DEFB126 del/del*) and control group (genotype *DEFB126 wt/del*)

Note. The significance level was taken < 0.05.

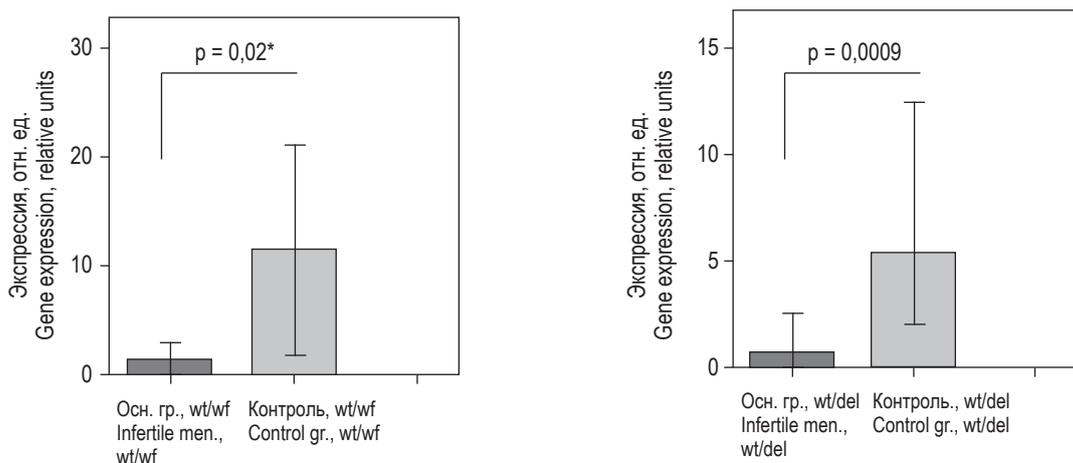


Рисунок 3. Левый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* у пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 wt/wt*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/wt*). Правый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* у пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 wt/del*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/del*)

Примечание. * – уровень значимости принимался < 0,05.

Figure 3. Left graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (*DEFB126 wt/wt* genotype) and the control group (*DEFB126 wt/wt* genotype). Right graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (*DEFB126 wt/del* genotype) and control group (*DEFB126 wt/del* genotype)

Note. *, the significance level was taken < 0.05.

Наиболее выраженной оказалась разница в уровнях экспрессии гена β-дефензина *DEFB126* у пациентов основной группы, являющихся носителями мутации в гомозиготном положении (генотип *DEFB126 del/del*), при сравнении с пациентами группы контроля с генотипом *DEFB126 wt/wt*: разница составила 12,32 раза, $p = 0,00063$ (рис. 2, левый график). В сравнении с донора-

ми здоровой группы с генотипом *DEFB126 wt/del* экспрессия была достоверно снижена в 10,64 раза, $p = 0,00057$ (рис. 2, правый график).

Далее мы сравнили экспрессию гена β-дефензина *DEFB126* среди пациентов основной группы с генотипом дикого типа *DEFB126 wt/wt* и донорами контрольной группы с аналогичным генотипом, и пациентами-носителями мутации в

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА *DEFB126*, Me±SD

TABLE 2. SPERM MOTILITY DEPENDING ON GENOTYPE *DEFB126*, Me±SD

Генотип Genotype	Группа Group	Основная группа (А+Б), % Infertile men (A+B), %	Контрольная группа (А+Б), % Control group (A+B), %
wt/wt		41,5±4,4	47,00±3,06*
wt/del		39,0±7,6	46,00±3,04
del/del		9,0±5,5*	–

гетерозиготном положении с группой контроля (генотип *DEFB126 wt/del*).

При изучении уровня экспрессии гена β-дефензина в сперматозоидах пациентов с нарушением репродуктивной функции и генотипом *DEFB126 wt/wt* было также обнаружено снижение этого показателя в 5,25 раза в сравнении с пациентами контрольной группы с генотипом *DEFB126 wt/wt* ($p = 0,02$) (рис. 3, левый график). Далее мы определили уровни экспрессии в группе пациентов-носителей мутантного аллеля *del* в гетерозиготном положении (генотип *DEFB126 wt/del*) и также обнаружили снижение уровня мРНК в 4,28 раза в сравнении с пациентами контрольной группы с аналогичным генотипом *DEFB126 wt/del* ($p = 0,0009$) (рис. 1, правый график).

Исследование уровней подвижности сперматозоидов в зависимости от генотипа пациентов по полиморфному маркеру rs11468374

На следующем этапе работы мы исследовали, как меняется степень выраженности астенозооспермии сперматозоидов у пациентов основной группы в зависимости от их генотипа по полиморфному маркеру rs11468374.

Было показано, что у пациентов с генотипом *DEFB126 del/del* наблюдается наиболее выраженная астенозооспермия: подвижность сперматозоидов снижена в 5,2 раза в сравнении с показателем подвижности доноров контрольной группы ($p = 0,00009$). Подвижность сперматозоидов пациентов с нарушением фертильной функции и нормальным генотипом *DEFB126 wt/wt* снижена незначительно (табл. 2). Таким образом, носительство неблагоприятного гомозиготного генотипа *DEFB126 del/del* достоверно ассоциировано со развитием астенозооспермии ($\chi^2 = 9,902$; $p = 0,008$).

Обсуждение

В последние годы бесплодие приобретает статус глобальной проблемы, с которой сталкивается до 15% пар при планировании семьи, и на сегодняшний день число пар, столкнувшихся с данным диагнозом, составляет 49 млн, что явля-

ется острой как медицинской, так и социальной проблемой [2]. Особенная актуальность проблемы заключается в том, что около 30–40% обследуемых мужчин сталкиваются с диагнозом идиопатического бесплодия, т. е. причинный фактор нарушения фертильной функции выявить не удается [1, 5, 10, 17]. Рутинное исследование эякулята в рамках спермограммы позволяет изучить морфо-функциональное состояние сперматозоидов, но не учитывает биохимические особенности этих клеток, и потому требуется расширение методов диагностики мужской репродуктивной дисфункции.

В ходе созревания в семенниках сперматозоиды претерпевают ряд морфологических, физиологических и биохимических пост-трансляционных модификаций, существенно сказывающихся на их функциональной активности [28]. Эти изменения влияют на подвижность клеток, их способность к миграции, капацитации и оплодотворению яйцеклетки в женских половых путях [14]. Появление на поверхности сперматозоидов белка *DEFB126* является пост-трансляционной модификацией, в ходе которой он синтезируется *de novo* в аппарате Гольджи, после чего мигрирует в составе секреторных везикул к клеточной поверхности и встраивается в мембрану [32]. Данные иммунофлуоресцентного анализа и электронной микроскопии показывают, что данный дефензин равномерно распределен по всей клеточной поверхности сперматозоида [34, 35].

Впервые роль молекулы *DEFB126* в репродуктивных процессах была предположена в ходе исследований, проведенных на сперматозоидах приматов: удаление с клеточной поверхности молекул белка дефензина вело к нарушению способности половых клеток самцов проходить через слой цервикального мукуса. Группа ученых во главе с Theodore L. Tollner продемонстрировала значительное сокращение числа сперматозоидов, способных продвигаться сквозь слой цервикальной слизи при оплодотворении, после удаления концевых остатков сиаловых кислот с поверхности гликокаликса, являющихся

компонентами карбоксильного конца молекулы DEFBI26. При этом добавление растворимого белка DEFBI26 к суспензии таких сперматозоидов вело к восстановлению структуры гликокаликса и способности клеток к миграции [36]. В ходе дальнейших исследований был обнаружен двунауклеотидный аллельный полиморфизм гена *DEFBI26* (rs11468374), и авторами было выдвинуто предположение о том, что носительство мутантного генотипа *DEFBI26 del/del* ассоциировано со значительным изменением структуры гликокаликса и снижением количества сиаловых кислот в структуре молекул DEFBI26, что объясняет снижение способности к миграции сперматозоидов в женском репродуктивном тракте [29]. Полученные нами данные согласуются с гипотезами и результатами исследований прошлых лет: сперматозоиды пациентов с бесплодием с генотипом *DEFBI26 del/del* демонстрируют снижение подвижности в 5,2 раза в сравнении с показателями доноров группы сравнения, что позволяет сделать вывод о том, что носительство неблагоприятного мутантного аллеля *del* ассоциировано с развитием астенозооспермии.

В своей работе мы изучили распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *DEFBI26* среди мужчин московской популяции, 89% обследуемых — представители славянской народности, 11% составили представители кавказской, прибалтийской и татарской народностей. Согласно полученному нами результату, распространение мутантного аллеля в изученной популяции подчиняется равновесию Харди–Вайнберга и частота его распределения составляет 0,45 (табл. 1) среди мужчин с нарушением фертильной функции. Подобное исследование было проведено в иранской, китайской, японской, нигерийской и британской популяциях, где также было установлено соответствие закону о генетическом равновесии, частота распределения мутантного аллеля составила 0,44–0,61 [14, 30].

Анализ распределения частот мутантного аллеля *del* показал, что у мужчин с бесплодием данный аллель встречается в 1,9 раза чаще, чем среди доноров группы сравнения. При исследовании частот распределения генотипов полиморфного маркера rs11468374 нами было показано, что 16,1% мужчин с бесплодием являются носителями неблагоприятного аллеля *del* в гомозиготном состоянии, в то время как среди доноров группы контроля мужчин с генотипом *DEFBI26 del/del* обнаружено не было (табл. 1). Таким образом, мы продемонстрировали достоверную ассоциацию между носительством аллеля *del* и повышенным риском нарушения фертильной функции ($\chi^2 = 6,073$, $p = 0,013$, $OR = 3,15$; 95% CI 1,04–9,52). В исследовании, проведенном Вогоҗени Р.В. и соавт., было выявлено, что мутантный генотип *DEFBI26 del/del* статистически чаще встречается

в группе пациентов с идиопатическим бесплодием в сравнении с контролем [14].

В дополнение нами впервые была изучена ассоциация между экспрессией гена *DEFBI26* и носительством мутантного аллеля. Известно, что данный полиморфизм представляет собой делецию двух нуклеотидов во втором экзоне, и результатом этой мутации является сдвиг рамки считывания и образование мРНК, лишенной стоп-кодона [22]. При исследовании других генов, несущих мутации, при которых отсутствует стоп-кодон внутри рамки считывания, было показано, что экспрессия дефектных мРНК достоверно понижена в сравнении с уровнем соответствующей нормальной мРНК [12, 15]. Мы показали, что экспрессия гена *DEFBI26* в группе мужчин с генотипом *DEFBI26 del/del* достоверно снижена в 12,32 раза в сравнении с донорами контрольной группы с генотипом *DEFBI26 wt/wt* (рис. 2). Однако также мы выявили, что у пациентов с нарушением репродуктивной функции с генотипом *DEFBI26 wt/wt* экспрессия изучаемого гена достоверно снижена в 5,25 раза в сравнении с донорами с генотипом *DEFBI26 wt/wt* (рис. 3). Можно предположить, что причинами снижения экспрессии в данной случае являются механизмы посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и влияние микроРНК, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Анализируя данные проведенных исследований по изучению механизмов нарушения репродуктивной функции, известные на сегодняшний день, можно утверждать, что генетический механизм является сложным и не до конца изученным. Показанная нами ассоциация носительства мутантного аллеля *del* и снижения уровня подвижности сперматозоидов пациентов свидетельствует о роли данного полиморфизма в патогенезе мужского бесплодия. Снижение уровня экспрессии гена *DEFBI26* в группе пациентов с бесплодием также подтверждает вклад дефензина в патогенез заболевания. Предложенное нами комплексное исследование на структурном и экспрессионном уровне гена *DEFBI26* и его ассоциации с подвижностью сперматозоидов в эякуляте представляет собой новый подход к выявлению конкретной причины нарушения мужской репродуктивной функции и может быть использовано для усовершенствования диагностики мужского бесплодия. Дальнейшее изучение молекулярно-генетических механизмов снижения мужской фертильной функции и выявление предиктивных маркеров позволит проводить более качественную стратификацию пациентов на группы риска и предложить им персонализированный подход в терапии и назначении вспомогательных репродуктивных технологий.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических тех-

нологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России за возможность использования молекулярно-генетических технологий.

Список литературы / References

1. Винник Ю.Ю., Борисов В.В. Диагностика мужского бесплодия: современное состояние проблемы // Клиническая лекция. Consilium Medicum, 2017. Т. 19, № 7. С. 65-69. [Vinnik Yu.Yu., Borisov V.V. Diagnostics of men's infertility: current state of the problem. *Klinicheskaya leksiya. Consilium Medicum = Clinical Lecture. Consilium Medicum*, 2017, Vol. 19, no. 7, pp. 65-69. (In Russ.)]
2. Гамидов С.И., Иремашвили В.В., Тхагапсоева Р.А. Мужское бесплодие: современное состояние проблемы // Фарматека, 2009. № 9. С. 12-17. [Gamidov S.I., Iremashvili V.V., Tkhaqapsoeva R.A. Male infertility: current state of the problem. *Farmateka = Pharmateca*, 2009, no. 9, pp. 12-17. (In Russ.)]
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. *Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology*. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 640 p.]
4. Коновалова М.В., Зубарева А.А., Луценко Г.В., Свирщевская Е.В. Антимикробные пептиды в норме и при патологиях (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология, 2018. № 3. С. 236-243. [Konovalova M.V., Lutsenko G.V., Svirshchevskaya E.V., Zubareva A.A. *Antimicrobial peptides in health and disease (review). Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, Vol. 54, no. 3, pp. 238-244. (In Russ.)]
5. Лебедев Г.С., Голубев Н.А., Шадеркин И.А., Шадеркина В.А., Аполихин О.И., Сивков А.В., Комарова В.А. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы // Экспериментальная и клиническая урология, 2019. № 4. С. 4-12. [Lebedev G.S., Golubev N.A., Shaderkin I.A., Shaderkina V.A., Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Komarova V.A. *Male infertility in the Russian Federation: statistical data for 2000-2018. Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2019, no. 4, pp. 4-12. (In Russ.)]
6. Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М., Ганковская Л.В. Гиперэкспрессия генов инфламмосомного комплекса NLRP1 и цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-18 в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных с псориазом // Иммунология, 2021. Т. 42, № 1. С. 58-65. [Merkushova E.D., Khasanova E.M., Gankovskaya L.V. *Hyperexpression of NLRP1 inflammasome complex and cytokines IL-1 β , IL-18 genes in biopates of lesion and healthy skin of patients with psoriasis. Immunologiya = Immunologiya*, 2021, Vol. 42, no. 1, pp. 58-65. (In Russ.)]
7. Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 3. С. 295-308. [Musin Kh.G. *Antimicrobial peptides — a potential replacement for traditional antibiotics. Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 295-308. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-295-308.
8. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР «в реальном времени». М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с. [Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. *Polymerase chain reaction "in real time"*. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2009. 215 p.]
9. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. М.: Капитал-Принт, 2012. 292 с. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. World Health Organization]. Moscow: Capital-Print, 2012. 292 p.]
10. Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2015, Vol. 13, no. 1, 37. doi:10.1186/s12958-015-0032-1.
11. Akgul Y., Word R.A., Ensign L.M., Yamaguchi Y., Lydon J., Hanes J., Mahendroo M. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth. *J. Clin. Investig.*, 2014, Vol. 124, no. 12, pp. 5481-5489.
12. Ameri A., Machiah D.K., Tran T.T., Channell C., Crenshaw V., Fernstrom K., Khachidze M., Duncan A., Fuchs S., Howard T.E. Nonstop mutation in the factor (F)X gene of a severely haemorrhagic patient with complete absence of coagulation FX. *Thromb. Haemost.*, 2007, Vol. 98, no. 6, pp. 1165-1169.
13. Beisswenger C., Bals R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2005, Vol. 6, no. 3, pp. 255-264.
14. Boroujeni P.B., Ebrahimian S., Abedini M., Chayjan M.R., Hassani M., Gourabi H., Meybodi A.M. The role of DEFBI26 variation in male infertility and assisted reproductive technique outcome. *Reprod. Biomed. Online*, 2019, Vol. 39, no. 4, pp. 649-657.
15. Chatr-Aryamontri A., Angelini M., Garelli E., Tchernia G., Ramenghi U., Dianzani I., Loreni F. Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.*, 2004, Vol. 24, no. 6, pp. 526-533.
16. Diao H., Yu H.G., Sun F., Zhang Y.L., Tanphaichitr N. Rat recombinant β -defensin 22 is a heparin-binding protein with antimicrobial activity. *Asian J. Androl.*, 2011, Vol. 13, no. 2, pp. 305-311.
17. Dohle G.R., Colpi G.M., Hargreave T.B., Papp G.K., Jungwirth A., Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.*, 2015, Vol. 48, no. 5, pp. 703-711.
18. Dorin J.R., McHugh B., Cox S., Davidson D. *Mammalian Antimicrobial Peptides; defensins and cathelicidins. Molecular Medical Microbiology – 2nd Edition. Elsevier. (ed). 2014, pp. 539-566.*

19. Drake P.M., Nathan J.K., Stock C.M., Chang P.V., Muench M.O., Nakata D., Reader J.R., Gip P., Golden K.P., Weinhold B., Gerardy-Schahn R., Troy F.A., Bertozzi C.R. Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 10, pp. 6850-6858.
20. Gregory M.S. Innate immune system and the eye. In: Encyclopedia of the Eye. Academic Press, London, 2010, pp. 439-445.
21. Huang L., Leong S.S., Jiang R. Soluble fusion expression and characterization of bioactive human beta-defensin 26 and 27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, Vol. 84, no. 2, pp. 301-308.
22. Isken O., Maquat L.E. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.*, 2007, Vol. 21, no. 15, pp. 1833-3856.
23. Izadpanah A., Gallo R.L. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005, Vol. 52, no. 3, pp. 381-390.
24. Liu H., Yu H., Gu Y., Xin A., Zhang Y., Diao H., Lin D. Human beta-defensin DEFB126 is capable of inhibiting LPS-mediated inflammation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, Vol. 97, no. 8, pp. 3395-3408.
25. Matzuk M.M., Lamb D. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.*, 2008, Vol. 14, no. 11, pp. 1197-1213.
26. Pazgier M., Hoover D.M., Yang D., Lud W., Lubkowski J. Human β -defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006, Vol. 63, no. 11, pp. 1294-1313.
27. Rodriguez-Jimenez F.J., Krause A., Schulz S., Forssmann W.G., Conejo-Garcia J.R., Schreeb R. Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics*, 2003, Vol. 81, no. 2, pp. 175-183.
28. Teclé E., Gagneux P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol. Reprod. Dev.*, 2015, Vol. 82, no. 9, pp. 635-650.
29. Tollner T.L., Bevins C.L., Cherr G.N. Multifunctional glycoprotein DEFB126--a curious story of defensin-clad spermatozoa. *Nat. Rev. Urol.*, 2012, Vol. 9, no. 7, pp. 365-375.
30. Tollner T.L., Venners S.A., Hollox E.J., Yudin A.I., Liu X., Tang G., Xing H., Kays R.J., Lau T., Overstreet J.W., Xu X., Bevins C.L., Cherr G.N. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci. Transl. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 92, 92ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3002289.
31. Tollner T.L., Yudin A.I., Treece C.A., Overstreet J.W., Cherr G.N. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Hum. Reprod.*, 2008, Vol. 23, no. 11, pp. 2523-2534.
32. Tulsiani D.R. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006, Vol. 250, no. 1-2, pp. 58-65.
33. Yamaguchi Y., Nagase T., Makita R., Fukuhara S., Tomita T., Tominaga T. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 5, pp. 2516-2523.
34. Yudin A.I., Tollner T.L., Treece C.A. Beta-defensin 22 is a major component of the mouse sperm glycocalyx. *Reproduction*, 2008, Vol. 136, no. 6, pp. 753-765.
35. Yudin A.I., Tollner T.L., Li M.W., Treece C.A., Overstreet J.W., Cherr G.N. ESP13.2, a member of the beta-defensin family, is a macaque sperm surface-coating protein involved in the capacitation process. *Biol. Reprod.*, 2003, Vol. 69, no. 4, pp. 1118-1128.
36. Yudin A.I., Generao S.E., Tollner T.L., Treece C.A., Overstreet J.W., Cherr G.N. Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biol. Reprod.*, 2005, Vol. 73, no. 6, pp. 1243-1252.
37. Yudin A.I., Treece C.A., Tollner T.L., Overstreet J.W., Cherr G.N. The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glycocalyx. *J. Membr. Biol.*, 2005, Vol. 207, no. 3, pp. 119-129.

Авторы:

Хасанова Е.М. — ассистент кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Бурмакина В.В. — студентка 5 курса МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Khasanova E.M., Assistant Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Burmakina V.V., Student, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.04.2021
Принята к печати 26.04.2021

Received 18.04.2021
Accepted 26.04.2021