مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۷، شماره ٦، بهمن و اسفند۱۳۹۱(شماره پی در پی ۷۲)

تعیین فراوانی حذف های کوچک ناحیه AZF کروموزم Y مردان نابارور در جمعیت اصفهان

مجید متولی باشی[۱]، مریم بردبار[۱]، زهره حجتی[۱]، رضا محمودی[۲]، زهرا رضایی[۲*]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، [۲] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/٤/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: حذف ها در کرومزوم Y یکی از دلایل عمده ژنتیکی ناباروری است. هدف این مطالعه تعیین فراوانی حذف‌های کوچک ناحیه AZF کروموزم Y مردان نابارور در جمعیت اصفهان بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد- شاهدی به طور تصادفی تعداد ۱۰۰ مرد نابارور مراجعه کننده به مرکز ناباروری اصفهان به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ مرد بارور سالم به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. DNA خون افراد هر دو گروه استخراج شد و با استفاده از روش STS-PCR تکثیر شدند. حضور حذف‌های کوچک در ناحیه AZF تشخیص داده شد.

یافته‌ها: هیچ حذفی در نواحی AZFa، AZFb و AZFc در گروه شاهد دیده نشد. تعداد ۱ بیمار حذف در ناحیه AZFb، ۸ بیمار حذف در ناحیه AZFc و ۲ بیمار حذف در ناحیه AZFa را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: فراوانی حذف‌های کروموزوم Y در جمعیت شهر اصفهان از کشور ایران مشابه فراوانی حذف‌ها در جهان می‌باشد. فراوانی حذف در ناحیه AZFc با سایر مطالعات در این زمینه یکسان بود، اما برای حذف‌های ناحیه AZFa، فراوانی پایین‌تر و تفاوت چشمگیری با سایر مطالعات داشت.

واژه‌های کلیدی: ناباروری، کروموزم Y، حذف کوچک

[*] **نویسنده مسئول**: **زهرا رضایی**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: zahrarezaei62@yahoo.com

مقدمه

ناباروری یکی از معضلات مهم زندگی بشری است که حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از زوج‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در ۴۰ تا ۵۰ درصد از موارد ناباروری ناهنجاری‌های کمی و کیفی در اسپرم‌ها مشاهده می‌شود. بروز ناباروری می‌تواند اولیه یا ثانویه باشد. نازایی اولیه در مورد افرادی به کار می‌رود که هرگز باردار نشده اند و نازایی ثانویه برای کسانی به کار می‌رود که سابقه باروری داشته‌اند(۱). اسپرماتوژنز ممکن است به وسیله بیماری‌های بدنی، اختلالات هورمونی، عفونت یا فاکتورهای ایمونولوژیک تحت تأثیر قرار بگیرد. با این وجود در بیش از ۵۰ درصد از موارد، علل ناباروری مردان ناشناخته می‌باشد. در این موارد احتمالاً دلایل ژنتیکی سبب اسپرماتوژنز ناهنجار می‌شود. فاکتورهای ژنتیکی دخیل در ناباروری مردان شامل عوامل کروموزومی‌یا تک ژنی مانند؛ کلاین فلتر و سیستیک فیبروزیز می‌باشند(۳ و۲).

حذف‌ها در کروموزوم Y یکی از دلایل عمده ژنتیکی ناباروری است، که با فراوانی ۱۵ـ۱۰ درصد در افراد آزوسپرمی‌و الیگواسپرمی شدید گزارش شده است. گفته می‌شود که ژن‌های باروری روی کروموزوم Y قرار دارند و نبود آنها سبب ناباروری می‌شود که این فرضیه بعدها به نام آزوسپرمی‌فاکتور[1] نامیده شد(۸ـ۴). کروموزم Y به ۷، ناحیه تقسیم می‌شود که بازوی کوتاه شامل نواحی، ۱ تا ٤ و ناحیه یوکروماتین Yq شامل نواحی ٥ و ٦ از منطقه نزدیک به سانترومر تا منطقه انتهایی نسبت به سانترومر مطابقت دارد و ناحیه هتروکروماتین هم شامل ناحیه ۷ می‌باشد، بعدها کروموزم Y به ٤٣ زیر ناحیه تقسیم شده است(۹). بنابراین ۳ ناحیه به نام آزوسپرمی فاکتور AZFa، AZFb و AZFc به عنوان لوکوس اسپرم سازی تعیین شده‌اند. مکانیسم ژنتیکی نقص اسپرم‌سازی در مردان با حذف‌های Yq هنوز ناشناخته است و هم‌چنین مکانیسم‌های مولکولی تغییر یافته در حذف‌های AZF هم به طور کامل ناشناخته می‌باشند. اکثریت حذف‌ها با از دست دادن ژن‌ها درون ناحیه AZFc, AZFb همراه می‌باشند. حذف‌های AZF به وسیله نوترکیبی همولوگوس درون کروموزومی‌بین بلوک‌های توالی‌های تکراری درون ساختارهای پالیندرومی ایجاد می‌شوند(۱۰).

اسپرم‌سازی به وسیله تعدادی از ژن‌ها روی کرومزوم Y و اتوزوم‌ها تنظیم می‌شود. فراوانی حذف‌های کرومزوم Y با شدت نقص اسپرماتوژنیک افزایش پیدا می‌کند. تقریباً ۱۵ درصد مردان آزوسپرم و ۵ تا ۱۰ درصد از مردان الیگواسپرم حذف های کروموزوم Y را نشان می‌دهند. با این وجود حذف‌های کروموزوم Y با آنالیز منی مشخص نمی‌شوند. بنابراین برای بررسی حذف‌های کروموزوم Y، انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز[2] مورد نیازمی‌باشد. مطالعات اخیر نشان دادند، تنوع قابل ملاحظه‌ای در

1-Azoospermia Factor (AZF)
2-Polymerase Chain Reaction(PCR)

فراوانی حذف‌ها وجود دارد. حذف‌های AZF با مرحله‌ای که اسپرما توژنز متوقف می‌شود، ارتباط دارد. هرناحیه AZF در مراحل مختلفی از اسپرم‌سازی عمل می‌کنند و حذف در هر ناحیه باعث توقف اسپرم‌سازی در مراحل ویژه‌ای می‌شود(۱۲ و۱۱). حذف AZFa با غیبت کامل سلول‌های زایشی و با سندرم سلول‌های سرتولی [۱] همراه می‌شود. حذفAZFb با توقف رشد سلول های زایشی در مرحله پاکیتن و منجر به توقف میوز می‌شود. حذف‌های AZFc با کاهش اسپرم سازی یا توقف بلوغ اسپرم که با میزان کم اسپرم همراه می‌شود. بنابراین حذف ناحیه AZF باعث فنوتیپ‌های ویژه‌ای می‌شود و ژن‌ها در هر ناحیه در مرحله ویژه‌ای از تمایز سلول‌های زایشی عمل می‌کنند(۱۳).

شناسایی و آنالیز حذف‌های کرومزوم Y یک پژوهش مهم برای مطالعه ناباروری مردان می‌باشد. حذف‌های کوچک کرومزوم‌Y، در ناحیه یوکروماتین بر روی بازوی بزرگ کرومزوم‌Y در فاصله ۵ و۶ است. فراوانی حذف‌های کوچک کرومزوم‌Y از ۱ درصد در مردانی که دستخوش تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم [۲] هستند تا ۵۵ درصد در مردان با سندرم سلول های سرتولی متفاوت است. ژن‌های DAZ [۳] و موتیف‌های اتصال یافته به RNA [۴] در این نواحی مهم هستند و دارای چندین کپی می‌باشد. ژن DAZ کاندید اصلی ناحیه AZFc می‌باشد که یک خانواده چندین کپی است که به آن خانواده ژنی DAZ گفته می‌شود. تعداد دقیق این ژن‌ها در خانواده مشخص نمی‌باشد. اگر چه با ساترن بلات مشخص شده که حداقل ۳ کپی از آن وجود دارند(۱۴). ژن‌های DAZ در طول تکامل پریمات‌ها درون کروموزوم قرار گرفته است و از ژن DAZL [۵] که بر روی کروموزوم ۳ انسانی قرار دارد منشأ گرفته اند. از بین رفتن همولوگ DAZL در حشرات باعث ناباروری از طریق توقف در مرحله پاکی تن میوز I می‌شود و در موش باعث کاهش تعداد سلول‌های زایشی می‌شود. مردانی که فاقد ژن‌های DAZ می‌باشند عقیم بوده (فاقد سلول‌های زایشی) و توقف میوز در پاکی تن I را دارند یا به طور ساده باعث کاهش سلول‌های زایشی می‌شوند(۱۵). در کرومزوم Y حدود ۳۰۰ STS [۶] شناسایی شده است. STS ها توالی از DNA هستند که به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر پیدا می‌کنند. هر STS توالی شناخته شده‌ای از DNA را کپی می‌کند و غیبت آن حذف STS را نشان می‌دهد. STS ها ممکن است برای ژن یا خانواده ژنی اختصاصی باشد یا ممکن است توالی‌های ناشناخته را مشخص کند(۱۶).

اطلاعات اندکی از حذف های کوچک در جمعیت ایران وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی حذف‌های کوچک ناحیه AZF کروموزم Y مردان نابارور در جمعیت اصفهان بود.

1-Sertoli Cell Only Syndrome (SCOS)
2-Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)
3- Deleted Azoospermia
4-RNA-Binding Motif (RBM)
5-DAZ Like-Autosomal (DA2L)
6-Sequence Tagged Site (STS)

روش بررسی

در این مطالعه مورد- شاهدی از ۱۰۰ مرد نابارور اصفهانی که به مرکز ناباروری اصفهان مراجعه نمودند به عنوان گروه مورد و ۱۰۰ مرد بارور به عنوان شاهد نمونه خون تهیه شد. نمونه خون افراد گروه شاهد به صورت تصادفی از میان مردان بارور انتخاب گردید. از افراد شرکت کننده در مطالعه رضایت کتبی گرفته شد. شرکت‌کنندگان از لحاظ سن، روابط فامیلی و سابقه فامیلی ناباروری، عفونت دستگاه تناسلی، سابقه سقط‌های مکرر در همسر، استعمال دخانیات، استفاده از داروهای استروئیدی، انواع اعمال جراحی مورد پرسش قرار گرفتند. افراد شرکت کننده بین ۶۰ـ۲۵ سال داشته و میانگین سن آنها ۳۰ سال بود. از آنان خواسته شد تا حداقل ۱ میلی‌لیتر نمونه منی بعد از ۳ روز پرهیز از روابط جنسی فراهم کنند. نمونه‌ها بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی ارزیابی شدند(۱۷). میزان اسپرم‌ها، تحرک و شکل اسپرم‌ها بررسی شدند. افراد گروه مورد بر اساس بررسی منی به ۲ گروه تقسیم شدند. یک گروه آزوسپرمی(فاقد اسپرم) شامل ۷۰ بیمار و یک گروه الیگواسپرمی(میزان اسپرم کمتر از ۲۰ میلیون در ۱ میلی لیتر) شامل ۳۰ بیمار بودند.

حدود ۲ میلی‌متر خون از افراد هر دو گروه گرفته شد، به منظور جلوگیری از انعقاد خون، از لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA استفاده شد. سپس به آرامی لوله‌های حاوی خون را تکان داده و بلافاصله درون ظرف یخ قرار داده شدند و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA ژنوم از گلبول‌های سفید خون با استفاده از روش نمکی میلر با مقداری دستکاری و تغییرات استخراج شد(۱۸). خلوص و مقدار DNA به دو روش ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. با روش اسپکتروفتومتری غلظت DNA به طور متوسط بین ۲۰۰-۱۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. علاوه بر این صحت استخراج میزان تقریبی DNA ژنومی به وسیله ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از چندین جفت پرایمر[1] برای تشخیص حذف‌ها استفاده شد. یک توالی کوتاه DNA که حدود ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز است که مکان و توالی آن شناخته شده است و این توالی‌ها منحصر به فرد در ژنوم می‌باشند.STSها می‌توانند به وسیله پرایمرها و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مشخص شوند. به همین دلیل از آنها برای تعیین نقشه فیزیکی و ژنتیکی استفاده می‌شود. توالی STSهای مورد نیاز از سایت NCBI به دست آورده شد. هم‌چنین ازSRY به عنوان کنترل داخلی برای نشان دادن صحت این واکنش استفاده شد،SRY بر روی انتهای بازوی کوتاه کروموزم Y واقع شده است. مردان و زنان نرمال نیزبه عنوان کنترل خارجی مورد استفاده قرار گرفتند.

1-Sequence-Tagged-Site(STS)

در این بررسی تکثیر پرایمر ها در واکنش های مختلفی از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت مجزا انجام گرفت. در این مطالعه از سه مخلوط واکنش شامل دو STS و یک مخلوط واکنش شامل سه STS برای بررسی حذف‌های کوچک در ناحیه *AZFc* استفاده شد. مخلوط واکنش یک، شامل پرایمرهای ویژه sY255 و SRY می‌باشد که SRY به عنوان کنترل داخلی برای نشان دادن صحت این واکنش استفاده شد، مخلوط واکنش دو، شامل پرایمرهای ویژه sY254 و SRY بوده، مخلوط واکنش سه، شامل پرایمرهای ویژه sY128 و SRY بوده و مخلوط واکنش چهار، شامل پرایمرهای ویژه sY90، sY117 وsY182 می‌باشند.

تکثیر نواحی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای آماده شده و آنزیم Taq DNA Polymerase نوترکیب ساخت شرکت سینا ژن کشور ایران با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر انجام شد. مواد و میزان بهینه شده جهت انجام در حجم ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش در هر میکروتیوب شامل؛ ۲ـ۱ میکرولیتر از DNA ژنومی به عنوان الگو ،۲/۵ میکرولیتر بافر همانندسازی، ۰/۵ میکرولیترdNTP ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمرهای رفت و برگشت ۱میکرولیتر کلرید منیزیم و ۰/۳ میکرو لیتر از Taq پلی‌مراز بود.

بعد از ۵ دقیقه مرحله دناتوراسیون اولیه، واکنش در دمای واسرشتگی ویژه برای هر جفت پرایمر انجام شد. دما و زمان اتصال به ترتیب برای پرایمرهای sY90، sY117 و sY182 ۶۰ درجه سانتی‌گرادو ۴۰ ثانیه، پرایمرهای sY255 و SRY ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه، پرایمرهای sY254 و SRY ۵۸/۸ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ ثانیه و پرایمرهای sY128 و SRY ۶۱ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه می‌باشند. محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۲ـ۱ درصد با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شدند. در نمونه‌هایی که نقص در تکثیر دیده شد، ۲ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اضافی برای تأیید غیبت STS ها انجام گردید. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر مدل اپندرف ساخت کشور آلمان انجام شد.

یافته‌ها

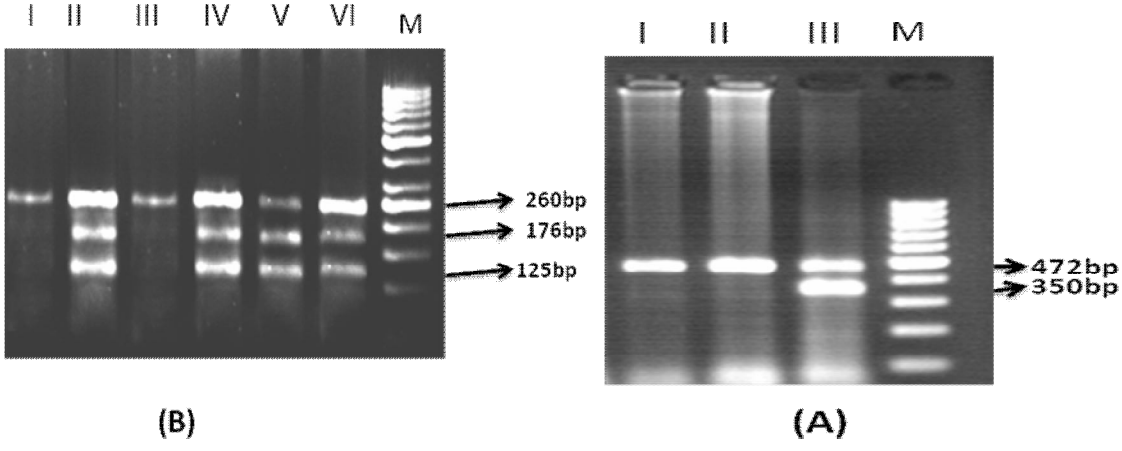
بر اساس آنالیزهای منی ۷۰ درصد از مردان نابارور آزوسپرم و ۳۰ درصد الیگواسپرم بودند. در ۱۰۰ مرد گروه شاهد محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز باندهایی با اندازه قابل انتظار ایجاد کردند و هیچ حذفی مشاهده نشد. حذف های کوچک کروموزمY در ۱۱ نفر(۱۱ درصد) از افراد گروه مورد وجود داشت. تعداد ۹ نفر از ۱۱ بیمار با حذف‌های کوچک در میان گروه الیگواسپرمی‌قرار داشتند که شامل ۱۴/۱۲ از کل حذف‌ها بودند. دو بیمار حذف در ۲ مارکر sY254 وsY255 را نشان دادند و ۱ بیمار در ۲ مارکر sY90 و sY128 دارای حذف کوچک بودند. تعداد ۸ بیمار حذف کوچک در یک مارکر STS را نشان دادند. دو نفر از ۱۱ بیمار با حذف‌های کوچک در میان گروه الیگواسپرمی قرار داشتند. که شامل ۱۴/۲ از کل حذف‌ها بودند. هر ۲ بیمار حذف کوچک در یک STS را نشان دادند. تعداد ۱ فرد الیگواسپرم و ۷ بیمار آزوسپرم در توالی sY255 و sY254 حذف‌های کوچک

در ژن DAZ داشتند تعداد۱ فرد الیگواسپرم و ۱ بیمار آزوسپرم در توالی sY182 دارای حذف های کوچک در ناحیه AZFb می‌باشند. ۶ نفر (٦ درصد) از افراد گروه مورد حذف در sY254 را نشان دادند. ٤ نفر(٤ درصد) از افراد گروه مورد حذف در sY255 را نشان دادند، ۱ نفر (۱ درصد) حذف در sY90 را نشان داد و ۱ نفر (۱ درصد) حذف درsY128 را نشان دادند. حذف‌های کامل AZFc در نمونه‌هایی که دارای حذف در دو (sY255 STS و sY254) بودند، مشاهده شد(تصویر ۱).

نتیجه‌گیری

اسپرم‌سازی به وسیله تعدادی از ژن‌ها روی کروموزم Y و کروموزم‌های اوتوزوم تنظیم می‌شود. پیشرفت سریع زیست مولکولی مشخص کرده است حذف‌های کروموزم Y دلیل عمده و مهم در ناباروری مردان می‌باشد. این یافته‌ها برای تشخیص سریع ناباروری بنیادی و اساسی می‌باشند. فراوانی حذف‌های کروموزم Y با شدت نقص اسپرم‌سازی افزایش پیدا می‌کند(۱۵). هدف این مطالعه تعیین فراوانی حذف‌های کوچک ناحیه AZF کروموزم Y مردان نابارور در جمعیت اصفهان بود.

مطالعه حاضر اطلاعات تشخیص حذف‌های کوچک کروموزوم Y، ۱۰۰ مرد نابارور را نشان داد. اگر چه تا کنون فراوانی حذف‌های کوچک در ناحیه AZF در مردان نابارور روشن نیست، اما بر طبق اطلاعات منتشر شده در مقالات مختلف، فراوانی جهانی حذف‌ها در مردان آزوسپرم ۱۵-۱۰ درصد و در مردان با الیگواسپرمی٦-۲ درصد نشان داده شده است. بر اساس مقایسه تحقیقات انجام شده بین جمعیت مردان نابارور در فرانسه، دانمارک و ایتالیا موقعیت جغرافیایی و جمعیت مورد مطالعه دو فاکتور مهم در فراوانی حذف‌های کوچک می‌باشند(۱۲).



تصویر ۱: مقایسه حذف‌ها درناحیه *AZF* با استفاده از STS-PCR. (A: در چاهک های I،II قطعات ۳۵۰bp حاصل از تکثیر به وسیله پرایمر sY254 مشاهده نمی‌شود در حالی که قطعه SRY (کنترل) تکثیر یافته است که نشان دهنده درستی انجام واکنش PCR می‌باشد. در چاهک III هر دو قطعه تکثیر یافته است بنابراین هیچ حذفی در این ناحیه از *AZFc* در این نمونه وجود ندارد M: مارکر ۱۰۰bp می‌باشدB: در چاهک های IV، V، VI هر سه قطعه تکثیر یافته است بنابراین هیچ حذفی در نواحی *AZFb* و *AZFa* وجود ندارد. در چاهک *I،III* دو قطعه 172bp و 125bp مورد انتظار حاصل از تکثیر پرایمرهای sY90 و sY182 مشاهده نمی‌شود. M: مارکر ۵۰bp می‌باشد).

کوبایاشی و همکاران[1](۱۹۹۴) با استفاده از ۱۶ مارکر STS مختلف درناحیه *AZF* به بررسی حذف های کوچک این ناحیه پرداختند که فراوانی حذف ها در این ناحیه حدود ۸/۱۵ درصد مشاهده شد و این حذف‌ها در ناحیه *AZFb* و *AZFc* بودند(۱۹). نجم‌آبادی و همکاران(۱۹۹٦) شیوع بالا (۱۸ درصد) حذف‌های کوچک Yq در مردان دارای اختلال ناشناخته آزواسپرمی الیگواسپرمی را نشان دادند. محل فیزیکی این حذف‌های کوچک بر این مفهوم که حذف ژن‌ها در فاصله Yq 6 نقش مهمی‌در روند اسپرماتوژنز ایفا می‌کند، تأکید دارند. حضور حذف‌هایی که با منطقه DAZ هم‌پوشانی ندارند، نشان می‌دهد که ژن‌ها غیر از ژن DAZ هم‌چنین ممکن است در ناباروری مردان دخیل باشد(۲۰).

بهولوا و همکاران[2] با استفاده از ۶ مارکر STS مختلف درناحیه AZF به بررسی حذف‌های کوچک این ناحیه پرداختند که فراوانی حذف‌ها در این ناحیه حدود۳/۳۵ درصد مشاهده شد و این حذف‌ها در همه نواحی *AZFa*، *AZFb* و *AZFc* وجود داشتند(۲۱). مطالعه حاضر ۱۰ حذف کوچک در ۱۱ بیمار در ناحیه AZFc، ۳ حذف کوچک در ناحیه AZFa و ۱ حذف کوچک در ناحیه AZFb مشاهده شد.

رجیو و همکاران[3](۱۹۹۵) نشان دادند که بیشترین ناحیه ای که در ناباروری درگیر است، حذف‌هایی است که منطقه *DAZ* از کروموزم Y را در بر می‌گیرد و دلیل عمومی نقص ملکولی ناباروری در انسان می‌باشد(۲۲). بر اساس نتیجه تحقیقات، بیشترین تعداد حذف‌های کوچک ناحیه AZF مردان نابارور مربوط به ژن DAZ در ناحیه AZFc می‌باشد. خوشه ژنی DAZ در ناحیه دیستال یوکروماتین منطقه از کروموزوم Y (منطقه AZFc) یکی از مهم‌ترین ژن‌های نامزد در ناباروری است. غیبت ژن DAZ از طریق توقف میتوز یا عدم وجود سلول‌های اولیه سبب ناباروری می‌شود. وو و همکاران[4] (۲۰۱۱) با استفاده از ۹ مارکر STS مختلف درناحیه AZF نشان دادند که مارکرهای sY255 و sY254 در ناحیه DAZ بیشترین حذف‌ها را به خود اختصاص داده است (۲۳). در مطالعه حاضر، حذف‌های کوچک ژن DAZ در ۸ بیمار دیده شد و اکثر حذف‌های کوچک در منطقه AZFc رخ داده است که موافق با سایر مطالعات می‌باشد، اما برای حذف‌های کوچک ناحیه AZFa نتایج این مطالعه شیوع پایین‌تر را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به طور کلی ۱٤ حذف کوچک(۱٤ درصد) در افرد الیگواسپرم(۲ درصد) و آزواسپرم(۱۲ درصد) در ناحیهAZF مشاهده شد. اکثریت حذف‌های کوچک در منطقه DAZ مشاهده شدند. این نتایج نقش DAZ در پروسه اسپرم‌سازی مردان را تأیید می‌کند. در افراد بیماری که فاقد حذف در کروموزم Y هستند، عوامل دیگری مانند جهش در

1-Kobayashi et al
2-Behulovaa et al
3-Reijo et al
4-Wu et al

ژن CFTR[1] می‌تواند موجب بروز آزوسپرمی‌و الیگواسپرمی‌گردد.

در مطالعات بعدی برای تعیین دقیق اینکه کدام یک از کپی های DAZ حذف شده اند می‌توان از روش(Sequens Nucleotid Variants(SNVS استفاده نمود و هم‌چنین تعداد STSهای بیشتری در ناحیه AZFc مورد مطالعه قرار گیرد تا بتوان محدوده دقیق حذف‌ها را مشخص نمود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک بود که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان و همکاری دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

1-Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)

REFERENCES:

1.Ristanovic M, Bunjevacki V, Tulic C, Novakovic L. Nikolic A. Molecular Analysis of Y Chromosome Microdeletions in Idiopathic Cases of Male Infertility in Serbia. Genetika 2007; 43: 705-8.
2.Li Z, Haines CJ, Han Y. Micro-deletions of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. Genet Genomics 2008; 35: 193-9.
3.Yoem HJ, Her YS, Park M, Lee S, Hwan S. Application of multiplex bead array assay for Yq microdeletion analysis in infertile men. Molecular Cellular and Probes 2007; 10: 1-6.
4.Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhanee M, Pujol M. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. Hum Reprod 2009; 24: 2356-61.
5.Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. Hum Reprod 2005; 11: 337-49.
6.Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. Hum Reprod 2005; 11: 473–82.
7.Oliva R. Protamines and male infertility. Hum Reprod 2010; 12: 417–35.
8.Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. Hum Reprod Update 2003; 126: 13–25.
9.Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, et al. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. Am J Hum Genet 1986; 38: 109-24.
10.Huynh T, Mollard R, Trounson A. Slected genetic factors associated with male infertility. Hum Reprod 2002; 8: 183-98.
11.Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. Hum Reprod 1999; 14: 2689-94.
12.Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L McElreavey K, Skakkebaek NE. Double - blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: Microdeletions are specific for spermatogenic failure. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 2636-42.
13.Spiridonov N, Wong L, Zerfas P, Starost F, Pack S, Paweletz C. Identification and characterization of SSTK, a serin/threonine protein kinase essential for male infertility. Mol Cell Biol 2005; 10: 4250-61.
14.Ferlin A, Garolla A, Foresta C. Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. Cytogenet Genome Res 2005; 111: 310–6.
15.Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. Cytogenet Genome Res 2005; 111: 317–36.
16.Vicdan A, Vicdan K, Gu¨nalp S, Kence A, Akarsu C. Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2004; 117: 49-58.
17.World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999: 7-15.
18.Miller SA, Dybes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.
19.Kobayashi K, Mizuno K, Hida A. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. Hum Molec Gene 1994; 3: 1965–7.
20.Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L. Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligospermia detected using a sequence tagged site based mapping strategy. J Clin Endoc Metab 1996; 81: 1347-52.
21.Behulovaa R, Varga I, Strhakova L, Bozikova A, Gabrikova D, Boronova I, Repiska V. Incidence of Microdeletion in the AZF region of the Y chrosome in Slovak patients with azoospermia. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2011: 1; 33–8.
22.Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNAbinding protein gene. Nature Genetics 1995; 10: 383–93.
23.Wu Q, Wang H, Liu YL, Xu Y, Wang P, Shi HJ, et al. Sequence tagged sites of AZFc microdeletion in Chinese Han population. Zhonghua Nan Ke Xue 2011; 17: 391-5.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Study of Y Chromosome Microdeletion in AZF Region in Infertile Males of Isfahan Population

Motovali-Bashi M[1], Bordbar M[1], Hojati Z[1], Mahmoudi R[2], Rezaei Z[2*]

[1]Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Centre, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 22 Apr 2012 Accepted: 08 Jul 2012

Abstract

Background & aim: One of the main genetic factors of infertility is the deletions in the chromosome Y. Accordingly; this study was conducted to determine the frequency of microdeletion of AZF region in infertile men of Isfahan, Iran.

Methods: In this case-control study, 100 infertile men referred to the Infertility Center of Isfahan and 100 fertile men as controls were randomly selected. Genomic DNA was extracted from their blood and amplified by sequence tagged sites-polymerase chain reaction (STS-PCR) method. The presence of microdeletion in AZF locus was diagnosed.

Results: No AZFa, AZFb or AZFc deletions were found in the control group. Microdeletions were observed in one patient in AZFb region, eight patients in AZFc region and two patients in AZFa region.

Conclusion: The incidence of Yq microdeletions in Iranian population is similar to the international frequency. Our data agree with other studies regarding microdeletions of AZFc, but for microdeletions of AZFa (2%) our results show smaller frequency and differ significantly with many studies.

Key words: Infertility, Y chromosome, Microdeletion

***Corresponding Author: Rezaei Z,** Cellular and Molecular Research Centre, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
Email: zahrarezaei62@yahoo.com