● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۵، ص ۴۶۹-۴۶۰، ۱۳۹۲

مقالهٔ پژوهشی

مطالعه مولکولی حذف‌های جزیی ناحیه AZFc کروموزم Y در مردان نابارور

زهرا رضایی[*۱]، مجید متولی باشی[۲]، زهره حجتی[۲]، رضا محمودی[۳]

خلاصه

مقدمه: حذف‌ها در ناحیه AZF دلیل عمده ژنتیکی ناباروری در مردان می‌باشد که به وسیله نوترکیبی همولگوس درون و بین کروموزمی، بین آمپلیکون‌ها ایجاد می‌شود. همچنین نوترکیبی همولگوس می‌تواند باعث حذف‌های جزیی ناحیه AZF (Azoospermia factor) گردد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی ارتباط حذف‌های جزیی ناحیه AZFc با ناباروری بود.

روش: از ۱۰۰ مرد نابارور که به مرکز ناباروری اصفهان مراجعه نموده بودند و همچنین ۱۰۰ مرد سالم به عنوان شاهد، نمونه خون تهیه شد. برای مطالعه حذف‌های جزیی از ۵ مارکر sY۱۲۰۱، sY۱۲۰۶، sY۱۱۶۱، sY۱۲۹۱ و sY۱۱۹۱ استفاده گردید. حذف‌های جزیی در منطقه AZF با استفاده از روش Multiplex–STS–PCR (Multiplex- sequence tagged site- polymerase chain reaction) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی اختلاف معنی‌دار، از آزمون Chi-square و در سطح معنی‌دار $P \leq ۰/۰۵$ استفاده شد.

یافته‌ها: در گروه بیمار، ۹ بیمار از ۱۰۰ فرد مورد مطالعه، حذف gr/gr نشان دادند و در گروه شاهد، یک مورد حذف gr/gr مشاهده شد. ۵ مورد، حذف b۲/b۳ در گروه بیماران دیده شد. یک مورد حذف b۲/b۳ در گروه شاهد مشاهده شد. حذف‌های b۲/b۴ در ۳ مورد از بیماران یافت شد و به طور کلی، حذف‌های جزیی در ۱۴ بیمار از ۱۰۰ فرد مورد مطالعه، مشاهده گردید. حذف gr/gr در افراد مورد مطالعه، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد. اما حذف‌های b۲/b۳ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: حذف‌های gr/gr سبب ناباروری می‌گردد و حذف‌های b۲/b۳ بر روی ناباروری اثری ندارد.

واژه‌های کلیدی: ناباروری، حذف در آزوسپرمی، فاکتور آزوسپرمی، مارکر STS

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ۲. استادیار، بخش ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان ۳. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج

نویسنده مسؤول، ● آدرس پست الکترونیک: zahrarezaei62@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۵/۲۲ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۱/۱۲/۵ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۱/۱۲/۱۶

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ناباروری در مردان، دلایل مختلفی دارد که شامل ناهنجاری‌های آندوکرین، تغییرات اپی‌ژنتیک و وضعیت‌های ژنتیکی می‌باشد. عوامل ژنتیکی ممکن است در جمعیت بزرگی از زوج های نابارور دخیل باشد. در حدود ۱۵ درصد از مردان و ۱۰ درصد از زنان نابارور، ناهنجاری های ژنتیکی دخیل می باشد که شامل ناهنجاری کروموزومی و جهش های تک ژنی می باشد. زوج های سالم جوان در دهه سوم زندگی، ۲۵-۲۰ درصد شانس حاملگی در هر سیکل را دارند. بنابراین، میزان متفاوتی از فاکتورها با گستردگی بالایی از کنترل ژنتیکی، ممکن است در این شانس مؤثر باشد (۲، ۱).

حذف‌ها در کروموزوم Y یکی از دلایل عمده ژنتیکی ناباروری است که با فراوانی ۱۵-۱۰ درصد در افراد آزوسپرمی و الیگواسپرمی شدید گزارش شده است. ۳ ناحیه به نام آزوسپرمی فاکتور AZFa، AZFb و AZFc به عنوان لوکوس اسپرم‌سازی تعیین شده‌اند. مکانیسم ژنتیکی نقص اسپرم‌سازی در مردان با حذف‌های Yq هنوز ناشناخته است و همچنین مکانیسم های مولکولی تغییر یافته در حذف های AZF (Azoospermia factor) هم به طور کامل ناشناخته می‌باشد. بیشترین حذف‌ها با از دست دادن ژن ها درون ناحیه AZFc و AZFb همراه می‌باشد. حذف‌های AZF به وسیله نوترکیبی همولوگوس درون کروموزومی بین بلوکه‌های توالی‌های تکراری درون ساختارهای پالیندرومی ایجاد می گردد (۳).

پیشرفت سریع زیست مولکولی مشخص کرده است که حذف های کروموزم Y دلیل عمده و مهم در ناباروری مردان می‌باشد. این یافته‌ها برای تشخیص سریع ناباروری، بنیادی و اساسی می‌باشند. امروزه مطالعه ناباروری بسیار با اهمیت است، زیرا تکنیک‌های ناباروری پیشرفته را قابل استفاده می کند. تکنیک IVF (In vitro fertilization)، Microinjection یا ICSI (Intra cytoplasmic sperm injection) روش‌های درمانی برای زوج‌های نابارور می‌باشد. استفاده از روش ICSI در مردان نابارور، با مشکلاتی همراه است؛ چرا که حذف‌های کروموزم Y ممکن است از پدر به پسر منتقل شود، در نتیجه پسران نیز نابارور می گردند. بنابراین، مرد نابارور قبل از استفاده از روش ICSI باید از لحاظ حذف‌های کروموزم Y مورد بررسی قرار گیرد (۳).

حذف‌های AZFc شامل همه اعضای خانواده ژنی DAZ (Deleted azoospermia)، دلایل اصلی نقص اسپرم‌سازی می باشند. اطلاعات اخیر پیشنهاد می کند که نوترکیبی های درون کروموزومی دیگر درون AZFc، می‌تواند با افزایش احتمال خطر نقص اسپرم سازی همراه باشد. حذف‌های جزیی (Partial) به وسیله آنالیزهای FISH (Fluorescence in situ hybridization) و Southern blot انجام می‌شود. تعدادی از مطالعات نیز حذف های جزیی AZFc را به وسیله STS (sequence tagged site) های ویژه AZFc و DAZ-Specific-SNV مطالعه نموده‌اند (۵، ۴).

حذف های جزیی ممکن است یک فاکتور برای نقص اسپرم‌سازی باشد، اگر چه هنوز اطلاعات کاملی در این مورد وجود ندارد. با این وجود، روش‌های واقعی برای شناسایی حذف‌های جزیی AZFc هنوز شناخته نشده است (۸-۶).

بعد از مشخص شدن نقشه فیزیکی ناحیه AZFc، چندین فرم از حذف‌های جزیی شامل زیر حذف‌های gr/gr، که حدود ۱/۶ Mb (Mega base pair) از ناحیه AZFc را حذف می کند، زیر حذف‌های b۲/b۳ (که به نام حذف‌های g۱/g۳ یا u۳-gr/gr نامیده می‌شود) حدود ۱/۸ Mb از ناحیه AZFc را حذف می کند و زیر حذف‌های b۱/b۳ (که به ندرت رخ می‌دهد) در ارتباط با ناباروری مشخص شده است. حذف‌های b۲/b۳ که منجر به خروج قطعه ۱/۸ Mb از DNA می‌شود، به وسیله واژگونی رخ می‌دهد؛ به این صورت که از واژگونی b۲/b۳ یا gr/rg حاصل می‌شود. حذف‌های کامل b۲/b۴ ناحیه AZFc به وسیله نوترکیبی همولگوس غیر اللی بین آمپلیکون‌های b در انتهاهای مخالف هم در ناحیه AZFc رخ می‌دهد. حذف‌های gr/gr به وسیله نوترکیبی همولگوس غیر اللی بین آمپلیکون‌های (تکرارهای یکسان، نزدیک و بزرگ) g۱/r۱/r۲ و g۲/r۳/r۴ رخ می‌دهد که منجر به خروج قطعه ۱/۶ Mb از DNA می شود. حذف های gr/gr کپی های ۱ و ۲ DAZ یا کپی های ۳ و ۴ DAZ را بر می‌دارد و حذف‌های b۲/b۳ کپی‌های ۳ و ۴ DAZ را در بر می گیرد (۱۲-۹). مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بین انواع

Archive of SID

www.SID.ir

حذف‌های جزیی در ناحیه AZFc و ناباروری در مردان آزوسپرم و الیگواسپرم انجام شد.

روش بررسی

گروه مورد مطالعه

جمعیت مورد مطالعه شامل گروه‌های بیمار و شاهد از ۱۰۰ مرد نابارور و ۱۰۰ مرد بارور انتخاب شد. همه افراد شاهد و بیمار از یک ناحیه قومی ایران انتخاب شدند. نمونه خون افراد شاهد به صورت تصادفی از میان مردان بارور انتخاب گردید. فرم‌هایی جهت جمع‌آوری مشخصات مراجعین تنظیم شد که با رضایت کامل آن‌ها تکمیل گردید. این بیماران از لحاظ سن، روابط فامیلی و سابقه فامیلی از ناباروری، عفونت دستگاه تناسلی، سابقه سقط‌های مکرر، استعمال دخانیات، استفاده از داروهای استروئیدی و انواع اعمال جراحی، مورد پرسش قرار گرفتند. سن این بیماران بین ۶۱-۲۵ سال و سن میانگین آن‌ها ۳۰ سال بود. بیماران بر اساس بررسی مایع منی به ۲ گروه تقسیم شدند: یک گروه آزوسپرمی شامل ۷۰ بیمار و یک گروه الیگواسپرمی شامل ۳۰ بیمار (میزان اسپرم کمتر از ۲۰ میلیون در ۱ میلی‌لیتر).

استخراج DNA

حدود ml ۲ خون از مردان نابارور و تعدادی افراد سالم به عنوان شاهد گرفته شد. به منظور جلوگیری از انعقاد خون برداشت شده، از لوله‌های حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) استفاده شد. خون درون لوله به آرامی تکان داده می‌شد و بلافاصله درون ظرف یخ قرار می‌گرفت و به سرعت به آزمایشگاه منتقل شده تا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردد. ژنوم DNA از گلبول های سفید خون با استفاده از روش نمکی میلر استخراج شد. 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 ng/ml ۲۰۰-۱۵۰ محاسبه گردید. علاوه بر این، صحت استخراج میزان تقریبی DNA ژنومی توسط ژل آگارز ۱ درصد، مورد بررسی قرار گرفت.

آماده‌سازی پرایمرها

برای بررسی حذف‌های کلی و جزیی در بیماران، از پنج STS ویژه ناحیه AZFc شامل sY۱۱۹۱، sY۱۲۹۱، sY۱۲۰۱، sY۱۲۰۶ و sY۱۱۶۱ استفاده گردید (جدول ۱).

STS (Seqence tagged site) یک توالی کوتاه DNA و حدود ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز است که مکان و توالی آن شناخته شده است. این توالی‌ها منحصر به فرد در ژنوم می‌باشد. STSها می‌توانند به وسیله پرایمرها و PCR (Polymerase chain reaction) مشخص شوند و به همین دلیل از آن‌ها برای تعیین نقشه فیزیکی و ژنتیکی استفاده می‌شود. وقتی لوکوس STS شامل پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی است، آن‌ها به عنوان مارکرهای ژنتیکی ارزشمندی می‌باشند. توالی STSهای مورد نیاز از سایت NCBI به دست آمد. پرایمرهای استفاده شده sY۱۱۹۱، sY۱۲۹۱، sY۱۲۰۱، sY۱۲۰۶ و sY۱۱۶۱ به ترتیب قطعاتی با طول ۳۸۵ bp، ۵۲۷ bp، ۶۷۷ bp، ۳۹۴ bp و ۳۳۰ bp ایجاد می‌کنند.

sY۱۱۶۱: ۵- CGACACTTTTGGGAAGTTTC -۳

۵- TTGTGTCCAGTGGTGGCTTA -۳

sY۱۲۰۱: ۵- CCGACTTCCACAATGGCT -۳

۵- GGGAGAAAAGTTCTGCAACG -۳

sY۱۲۹۱: ۵- TAAAAGGCAGAACTGCCAGG -۳

۵- GGGAGAAAAGTTCTGCAACG -۳

sY۱۱۹۱: ۵- CCAGACGTTCTACCCTTTCG -۳

۵- GAGCCGAGATCCAGTTACCA -۳

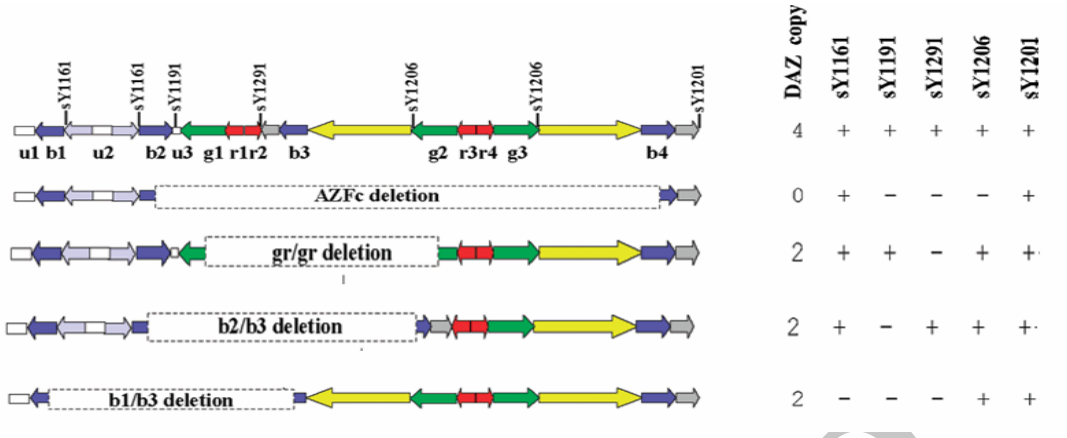
sY۱۲۰۶: ۵- CCTGTGTATCTAATTATGATG -۳

۵- CCTTAAGTTTGTAACAGGGCC -۳

نتایج منفی برای sY۱۲۹۱ و تکثیر نیافتن این STS، حذف‌های gr/gr را مشخص می‌کند. عدم تکثیر sY۱۱۹۱ و نبود باند به طول ۳۸۵ bp، بیانگر حذف‌های b۲/b۳ می‌باشد. نتایج منفی واکنش PCR برای sY۱۱۶۱، sY۱۱۹۱ و sY۱۲۹۱ حذف‌های b۱/b۳ را نشان می‌دهد. اگر نتایج PCR، در sY۱۱۹۱، sY۱۲۹۱ و sY۱۲۰۶ منفی شد و هیچ باندی مشاهده نگردید، نشانگر حذف‌های کلی AZFc (b۲/b۴) می‌باشد (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. *نتایج حذف b۱/b۳ b۲/b۳ b۲/b۴ و g۱/g۲ (۵).*

تکثیر نمونه‌ها به وسیله PCR

در این مطالعه از Multiplex-PCR (Multiplex- polymerase chain reaction) برای تشخیص سریع حذف‌ها استفاده شد. بدین صورت که از چندین جفت پرایمر درون یک مخلوط PCR برای تولید آمپلیکون‌ها در سایزهای مختلف، که مخصوص توالی‌های مختلف DNA می‌باشد، استفاده گردید (۱۳). دمای اتصال برای هر جفت پرایمر بایستی بهینه گردد تا واکنش به درستی انجام شود. اندازه باندها و طول قطعات باندها باید متفاوت باشند تا به وسیله ژل الکتروفورز مشخص گردند.

به دلیل نزدیک بودن طول قطعات sY۱۲۰۶، sY۱۱۶۱ و sY۱۱۹۱ از دو واکنش PCR مجزا استفاده شد. واکنش اول (Multiplex-STS-PCR) شامل چهار جفت پرایمر sY۱۲۹۱، sY۱۱۹۱، sY۱۲۰۱ و sY۱۱۶۱ در حجم ۵۰ µl انجام گرفت. واکنش دوم (PCR) برای تکثیر sY۱۲۰۶ در حجم ۲۵ µl صورت گرفت.

تکثیر نواحی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و آنزیم Taq DNA Polymerase نوترکیب ساخت شرکت CinnaGen با غلظت ۵ واحد در هر µl انجام شد. مواد و میزان بهینه شده جهت انجام PCR در ۲۵ µl مخلوط واکنش در هر میکروتیوب شامل ۲/۵ µl بافر PCR، ۱ µl MgCl2 ۱/۲۵ (۵۰ میلی‌مول)، ۰/۵ µl dNTP mix (۱۰ میلی‌مول)، ۲ µl پرایمر رفت (۱۰ میکرومول)، ۲ µl پرایمر برگشت (۱۰ میکرومول)، ۲ µl DNA الگو، ۱۴/۹۵ µl آب دوبار تقطیر و ۰/۳ µl Taq DNA Polymerase بود. مواد و میزان بهینه شده جهت انجام PCR در در ۵۰ µl مخلوط واکنش در هر میکروتیوب شامل ۵ µl بافر PCR، ۱ µl MgCl2، ۲ µl dNTP mix، ۲ µl (۲۵ پیکومول) پرایمر رفت، ۲ µl (۲۵ پیکومول) پرایمر برگشت، ۵ µl DNA الگو، ۳۴/۲ µl آب دوبار تقطیر و ۰/۶ µl Taq DNA Polymerase بود.

بعد از ۵ دقیقه مرحله دناتوراسیون اولیه، واکنش Multiplex-STS-PCR در دمای (Annealing) ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام گرفت و تکثیر sY۱۲۰۶ در دمای (Annealing) ۵۸/۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل اگارز ۲ درصد با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی می‌شود. در نمونه‌هایی که نقص در تکثیر دیده شد، ۲ واکنش PCR اضافی برای تأیید غیاب STSها انجام می‌شود. در این مطالعه از زنان به عنوان شاهد منفی و از مردان بارور به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیزهای آماری

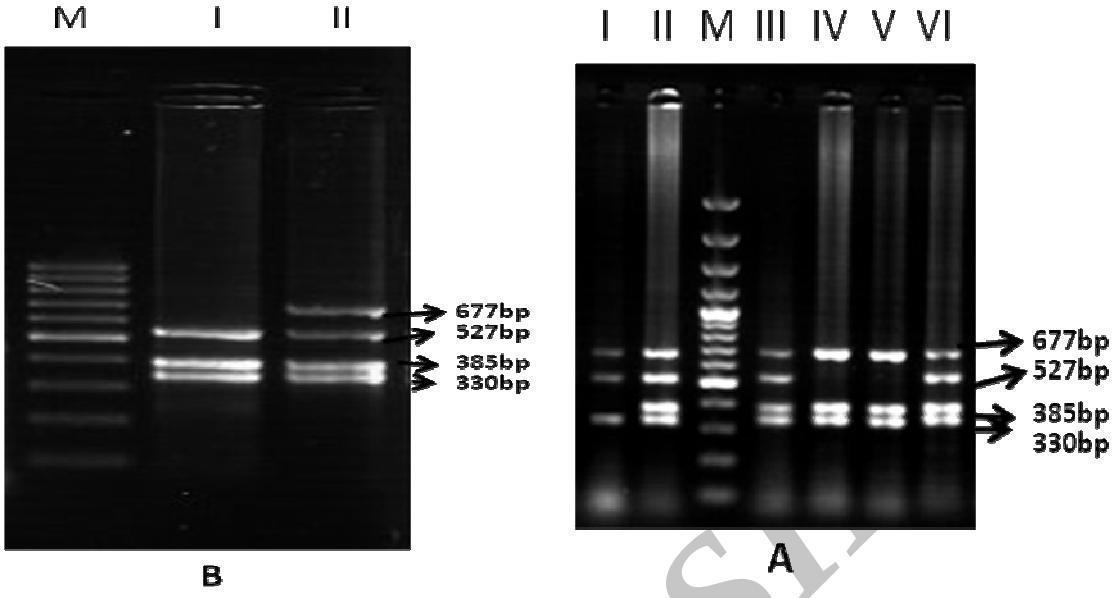
در این تحقیق برای آنالیز آماری نتایج از آزمون Chi-square به منظور بررسی فراوانی حذف ها میان افراد بیمار و کنترل استفاده گردید. همچنین نسبت افزاینده با فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان حذف‌ها با ناباروری محاسبه گردید. در کلیه محاسبات سطح احتمال $P < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار فرض گردید. بررسی آنالیزهای آماری از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.

نتایج

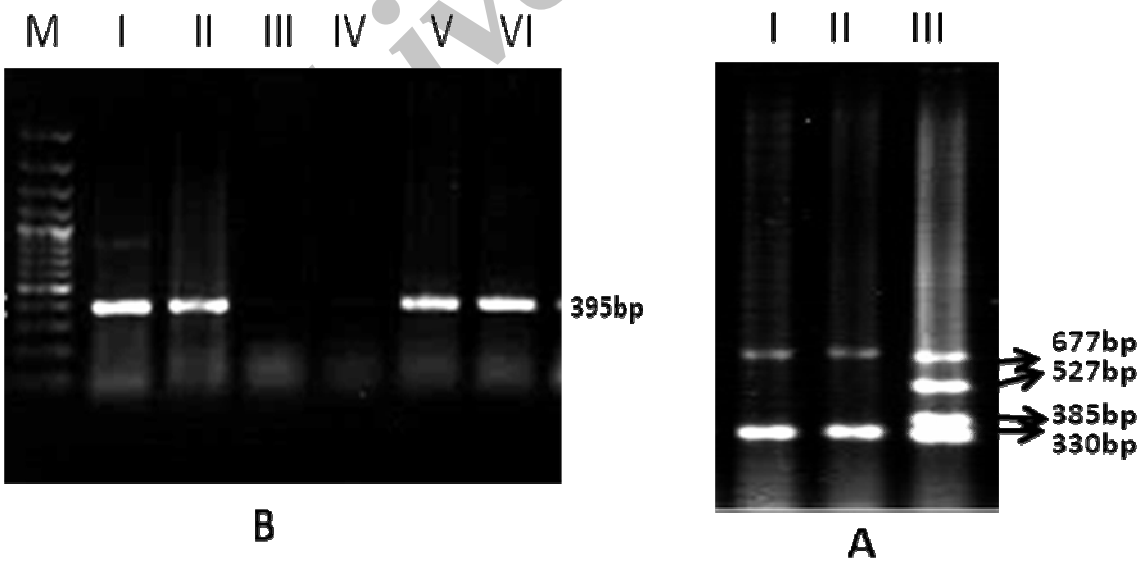
در این مطالعه از STSهای sY۱۲۹۱، sY۱۱۹۱، sY۱۲۰۱، sY۱۲۰۶ و sY۱۱۶۱ استفاده گردید. sY۱۲۹۱ قطعه‌ای به طول ۵۲۷ bp، sY۱۱۹۱ قطعه‌ای به طول ۳۸۵ bp، sY۱۱۶۱ قطعه‌ای به طول ۳۳۰ bp، sY۱۲۰۱ قطعه‌ای به طول ۶۷۷ bp و sY۱۲۰۶ قطعه‌ای به طول ۳۹۴ bp تکثیر می‌کنند. نتایج منفی PCR و عدم مشاهده باند، نشان دهنده عدم تکثیر STSها می‌باشد. در این بررسی، به دلیل نزدیک بودن طول قطعات sY۱۲۰۱، sY۱۲۰۶ و sY۱۱۹۱ از دو واکنش PCR مجزا استفاده شد. در مطالعه حاضر به بررسی حذف‌های جزیی و فرکانس این جهش در جمعیت مورد مطالعه و بررسی ارتباط آماری آن با ناباروری در مردان با استفاده از روش Plus/minus STS پرداخته شده است. حذف‌های جزیی در ۱۴ فرد از ۱۰۰ بیمار (۱۴ درصد) مورد مطالعه وجود داشت. حذف‌های مشاهده شده فقط در میان گروه آزوسپرمی بیماران بود و چندین حذف (۲ درصد) نیز در گروه شاهد یافت شد. ۹ فرد از ۱۰۰ بیمار (۹ درصد) مورد مطالعه، حذف gr/gr را به واسطه غیاب محصول مورد انتظار واکنش PCR توسط جفت پرایمر sY۱۲۹۱ و حضور سایر STSها در گروه بیماران را نشان دادند (شکل ۲A). یک مورد (۱ درصد) حذف gr/gr در گروه شاهد مشاهده شد. آنالیز آماری حذف gr/gr در افراد بیمار و شاهد نشان داد که مقدار Chi-square برابر با ۸/۹۷۶ و ارزش P برابر با ۰/۰۰۳ می‌باشد. ۵ فرد از ۱۰۰ بیمار (۵ درصد) مورد مطالعه حذف b۲/b۳ را با غیاب محصول مورد انتظار واکنش PCR توسط جفت پرایمر sY۱۱۹۱ و حضور سایر STSها در گروه بیماران نشان دادند (شکل ۲B). یک مورد (۱ درصد) حذف b۲/b۳ در گروه شاهد دیده شد. در آنالیز آماری حذف‌های b۲/b۳، مقدار Chi-square برابر با ۳/۷۰۱ و ارزش P برابر با ۰/۰۵۴ در افراد بیمار و شاهد محاسبه گردید.

حذف‌های b۲/b۴ در ۳ مورد از بیماران (۳ درصد) با غیاب محصول مورد انتظار واکنش PCR توسط جفت پرایمرهای sY۱۱۹۱، sY۱۲۹۱ و sY۱۲۰۶ یافت شد (شکل های ۳B و ۳A). حذف‌های b۱/b۳ در نمونه‌های شاهد و بیمار مشاهده نشد. ۵ مورد (۵ درصد) حذف در sY۱۲۰۱ در میان بیماران یافت شد. همچنین دو مورد (۲ درصد) حذف sY۱۲۰۱ نیز در گروه شاهد دیده شد. حذف در sY۱۲۰۱ تاکنون در هیچ جمعیتی گزارش نشده است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲. *تشخیص حذف‌های gr/gr و b۲/b۳ در ناحیه AZFc در نمونه‌های IV و V قطعه ۵۲۷bp حاصل از تکثیر پرایمر sY۱۲۹۱ مورد انتظار مشاهده نمی‌شود؛ در حالی که قطعات دیگر تکثیر یافته‌اند، که بیانگر حذف‌های gr/gr می‌باشد. در چاهک I قطعه ۳۸۵ bp مورد انتظار حاصل از تکثیر پرایمر sY۱۱۹۱ مشاهده نمی‌شود که بیانگر حذف‌های b۲/b۳ می‌باشد. در چاهک‌های دیگر، همه STSها تکثیر یافته است که نشان دهنده عدم وجود حذف‌های تکه‌ای می‌باشد (A). مشاهده حذف‌ها در sY۱۲۰۱ در چاهک I قطعه ۶۷۷bp حاصل از تکثیر پرایمر sY۱۲۰۱ مشاهده نمی‌شود؛ در حالی که قطعات sY۱۲۹۱، sY۱۱۹۱ و sY۱۱۶۱ تکثیر یافته‌اند (B). M مارکر ۱۰۰ bp می‌باشد.*



شکل ۳. *تشخیص حذف‌های b۲/b۴ در ناحیه AZFc. در چاهک‌های I و II (نمونه‌های ۱۶ و ۹۱) قطعات ۵۲۷pb و ۳۸۵ bp حاصل از تکثیر پرایمر sY۱۲۹۱ و sY۱۱۹۱ مشاهده نمی‌شود؛ در حالی که قطعات sY۱۲۰۱ و sY۱۱۶۱ تکثیر یافته‌اند (A). مشاهده حذف در sY۱۲۰۶. در چاهک III و IV (نمونه‌های ۱۶ و ۹۱) قطعه ۳۹۴ bp حاصل از تکثیر پرایمر sY۱۲۰۶ مشاهده نمی‌شود؛ در حالی که در چاهک‌های I II V و VI قطعه sY۱۲۰۶ تکثیر یافته‌اند (B).M مارکر ۱۰۰ bp می‌باشد.*

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

حذف‌هایی که بر روی کروموزم Y صورت می‌گیرد و سبب الیگوسپرمی و آزوسپرمی می‌شود، یکی از دلایل شایع ناباروری در مردان می‌باشد (۱۵، ۱۴). ناحیه Yq۱۱ واجد ژن‌های ضروری برای اسپرم‌سازی می‌باشد. این ناحیه به ۳ قسمت AZFa، AZFb و AZFc تقسیم می‌شود. حذف‌ها در این ناحیه، باعث درجات مختلف نقص اسپرم‌سازی (از اسپرم نرمال تا آزوسپرمی) و فنوتیپ‌های ناباروری می‌گردد. مکانیسم ژنتیکی نقص اسپرم‌سازی در مردان با حذف‌های Yq۱۱ هنوز ناشناخته است. بیشتر حذف‌ها با از دست دادن ژن‌ها درون ناحیه AZFc و AZFb همراه می‌باشد (۱۵). حذف‌های جزیی در ناحیه AZFc طی مطالعات de Vries و همکاران (۱۶) و Ferlin و همکاران (۱۰) گزارش شد. این حذف‌ها در نتیجه نوترکیبی بین تکرارهای مستقیم درون ساختار AZFc حاصل می‌شوند.

حذف‌های AZF با مرحله‌ای که اسپرماتوژنزیز متوقف می‌شود، ارتباط دارد. هر ناحیه AZF در مراحل مختلفی از اسپرم‌سازی عمل می‌کند و حذف در هر ناحیه، باعث توقف اسپرم‌سازی در مراحل ویژه‌ای می‌شود. حذف AZFa با غیاب کامل سلول‌های زایشی و با سندرم SCOS همراه است. حذف AZFb با توقف رشد سلول‌های زایشی در مرحله پاکیتن و منجر به توقف میوز می‌شود. حذف‌های AZFc با کاهش اسپرم‌سازی یا توقف بلوغ اسپرم که با میزان کم اسپرم همراه می‌شود. بنابراین، حذف ناحیه AZF باعث فنوتیپ‌های ویژه‌ای می‌گردد و ژن‌ها در هر ناحیه در مرحله ویژه‌ای از تمایز سلول‌های زایشی عمل می‌کند.

تشخیص حذف‌ها در مردان نابارور موجب تشخیص مناسب این بیماری می‌گردد و سبب می‌شود که متخصصان بالینی از درمان‌های گران و غیر لازم جلوگیری کنند و این بیماران کاندیدای استفاده از روش‌های باروری دیگری می‌شوند. واضح است که تست‌های تشخیصی مولکولی حذف‌های کروموزم Y، می‌تواند حداقل در همه افراد آزوسپرم و الیگواسپرم تأیید شود (۱۰). آنالیز حذف‌های با استفاده از PCR، فراوانی و مکان حذف ژن را مشخص می‌کند. بنابراین، به تشخیص فنوتیپ بیضه‌ای، همچنین دقت پیش‌بینی و در نهایت مشاوره‌های ارزشمند برای زوج‌ها با حذف‌های کروموزم Y کمک می‌کند (۱۶).

Fernandes و همکاران با استفاده از روش FISH به بررسی این حذف‌ها پرداختند (۱۷). همچنین de Vries و همکاران با استفاده از روش‌های SFVs (Sequens family variants) حذف‌های جزیی در ناحیه AZFc را بررسی نمودند (۱۶). Repping و همکاران با استفاده از Plus/minus STS این حذف‌ها را مورد مطالعه قرار دادند (۵).

Fernandes و همکاران با استفاده از مارکرهای STS، حذف‌های جزیی در جمعیت سریلانکا را مورد مطالعه قرار دادند که ۴/۱۷ درصد حذف gr/gr و حدود ۱ درصد حذف‌های b۲/b۳ را مشاهده نمودند. در این مطالعه، ۴/۲ درصد حذف gr/gr در افراد بیماران و افراد گروه شاهد وجود داشت (۱۷). بنابراین، پیشنهاد می‌شود که حذف‌های جزیی AZFc نمی‌تواند سبب نقص‌های اسپرم‌سازی گردد، اما برخی پژوهشگران مانند de Llanos و همکاران ارتباط معنی‌داری بین حذف‌های gr/gr و نقص در اسپرم‌سازی در مردان اسپانیا نشان می‌دهند (۸). بررسی Eloualid و همکاران ارتباط معنی‌داری بین حذف‌های b۲/b۳ در مردان با نقص در اسپرم‌سازی را نشان داد (۱۸).

Hucklenbroich و همکاران (۷) و نیز Machev و همکاران (۶) اختلاف معنی‌دار بین دو گروه شاهد و بیمار نیافتند. Hucklenbroich و همکاران نشان دادند که حداقل ۸ الگوی حذف‌های جزیی در ناحیه AZFc گزارش شده است که فقط حذف‌هایی که کپی‌های DAZ۱ و DAZ۲ را در بر می‌گیرند (در نتیجه نوترکیبی gr/gr)، در نقص اسپرم‌سازی مؤثر می‌باشند (۷).

برخی مطالعات نشان دادند که حذف‌هایی که همه کپی‌ها را از DAZ در بر نمی‌گیرد، ممکن است یک دلیل نقص در اسپرم‌سازی باشد.

تعداد کپی‌های حذف شده از ژن‌های ناحیه AZFc در الگوهای حذف gr/gr و b۲/b۳ در مطالعات Fernandes و همکاران آورده شده است (۱۷، ۴).

در تحقیق حاضر، مشابه مطالعه de Llanos و همکاران فراوانی حذف gr/gr در بیماران نابارور در مقایسه با گروه

Archive of SID
www.SID.ir

شاهد از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد که حاکی از ارتباط حذف gr/gr با خطر ناباروری می‌باشد (۸). فراوانی حذف b۲/b۳ مشابه مطالعه Fernandes و همکاران در بیماران نابارور، با گروه شاهد نیز متفاوت بود، اما این تفاوت بین گروه شاهد و بیمار از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد که نشان دهنده عدم ارتباط این حذف با خطر ناباروری می‌باشد (۱۷). مقایسه فراوانی حذف sY۱۲۰۱ در بیماران نابارور با گروه شاهد، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد. بنابراین، احتمال می‌رود حذف sY۱۲۰۱ بر روی باروری اثری نداشته باشد و فرایند اسپرم‌سازی را تحت تأثیر قرار ندهد.

حذف‌های gr/gr بر اساس نتایج آماری رابطه قوی با ناباروری دارند. از آن جایی که حذف b۲/b۳ کپی‌های ۳ و ۴ ژن DAZ را در بر می‌گیرد و از لحاظ آماری بر روی ناباروری اثری ندارد، ممکن است حذف کپی‌های ۱ و ۲ ژن DAZ باروری مردان را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که برخی از کپی‌های ژن DAZ بیان شده و عملکردی باشند. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی برای تعیین دقیق این که کدام یک از کپی‌های DAZ حذف شده‌اند، می‌توان از روش SNVs (Sequence nucleotid variants) استفاده نمود؛ بدین صورت که بر حسب وجود Single nucleotide variantهای مختلف در کپی‌های DAZ و استفاده از آنزیم‌های محدود کننده در روش RFLP-PCR (PCRRestriction fragment length polymorphism-)، می‌توان کپی حذف شده را مشخص نمود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی و اداره تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به خاطر فراهم کردن تجهیزات و از همکاری‌های بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان، مرکز ناباروری و سازمان انتقال خون برای جمع‌آوری نمونه‌ها، صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Balkan M, Tekes S, Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25(11-12): 559-65.
2. Yeom HJ, Her YS, Oh MJ, Paul S, Park MS, Yeoun JP, et al. Application of multiplex bead array assay for Yq microdeletion analysis in infertile males. *Mol Cell Probes* 2008; 22(2): 76-82.
3. Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, Rajpert-de ME, et al. Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet* 2009; 46(1): 21-31.
4. Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De ME, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(3): 286-98.
5. Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, et al. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 2004; 83(6): 1046-52.
6. Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, et al. Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet* 2004; 41(11): 814-25.

Archive of SID
www.SID.ir

7. Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod* 2005; 20(1): 191-7.

8. de Llanos M, Ballesca JL, Gazquez C, Margarit E, Oliva R. High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates. *Hum Reprod* 2005; 20(1): 216-20.

9. Lu C, Zhang J, Li Y, Xia Y, Zhang F, Wu B, et al. The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet* 2009; 18(6): 1122-30.

10. Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet* 2005; 42(3): 209-13.

11. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011; 17(2): 197-209.

12. Shahid M, Dhillon VS, Khalil HS, Sexana A, Husain SA. Associations of Y-chromosome subdeletion gr/gr with the prevalence of Y-chromosome haplogroups in infertile patients. *Eur J Hum Genet* 2011; 19(1): 23-9.

13. Ravel C, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Rouba H, Legendre M, Lorenco D, et al. Y-chromosome AZFc structural architecture and relationship to male fertility. *Fertil Steri*l 2009; 92(6): 1924-33.

14. Li Z, Haines CJ, Han Y. "Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *J Genet Genomics* 2008; 35(4): 193-9.

15. Meschede D, Horst J. The molecular genetics of male infertility. *Mol Hum Reprod* 1997; 3(5): 419-30.

16. de Vries JW, Hoffer MJ, Repping S, Hoovers JM, Leschot NJ, van der Veen F. Reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men. *Fertil Steril* 2002; 77(1): 68-75.

17. Fernandes AT, Fernandes S, Goncalves R, Sa R, Costa P, Rosa A, et al. DAZ gene copies: evidence of Y chromosome evolution. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(8): 519-23.

18. Eloualid A, Rhaissi H, Reguig A, Bounaceur S, El Houate B, Abidi O, et al. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS One* 2012; 7(4): e34902.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular Study of Partial Deletions of AZFc Region of the Y Chromosome in Infertile Men

Rezaei Z., M.Sc. [1*], Motovali-Bashi M., Ph.D.[2], Hojati Z., Ph.D.[2], Mahmoudi R., Ph.D.[3]

1. Department of Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
2. Assistant Professor, Department of Genetics, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3. Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

* Corresponding author; Email: zahrarezaei62@yahoo.com

(Received: 13 August 2012 Accepted: 7 March 2013)

Abstract

Background & Aims: The most significant cause of infertility in men is the genetic deletion in the azoospermia factor (AZF) region that is caused by the process of intra- and inter-chromosomal homologous recombination in amplicons. Homologous recombination could also result in partial deletions in AZF region. The aim of this research was to determine the association between the partial AZFc deletions and infertility.

Methods: The blood samples were taken from 100 infertile men, who referred to the Infertility Center of Isfahan, Iran. 100 healthy matched people were also selected as the control group. The five markers of sY1201, sY1206, sY1161, sY1291, and sY1191 were applied in order to study partial deletions. Partial deletions were analyzed in AZF region using the Multiplex–STS–PCR technique. The chi-square test was conducted to check the difference between pretest and posttest. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

Results: 9% of studied persons showed gr/gr deletion (in the patient group). Only one case of gr/gr deletion was observed in the control group. Five patients showed b2/b3 deletion. One b2/b3 deletion was seen in the control group. The b2/b4 deletion was observed in 3 patients. In conclusion, partial deletions were observed in 14% of the patients. The statistical analysis of the gr/gr deletion in the study indicates a meaningful difference, but b2/b3 deletion does not represent a meaningful difference.

Conclusion: Our results suggest that gr/gr deletions are associated with spermatogenic failure, and there is no association between b2/b3 deletion and infertility.

Keywords: Infertility, Deleted azoospermia, Azoospermia factor, STS marker

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(5): 460-469

Archive of SID

www.SID.ir