

# آنالیز مولکولی ریزحذف‌های کروموزوم Y در ناحیه AZFc و AZFd در بیماران مبتلا به آروسپرمی غیر انسدادی مراجعه کننده به بیمارستان الزهرا تبریز

مصطفی اکبرزاده خیابی<sup>۱</sup>، سید علی رحمانی<sup>۲</sup>، تاج الدین اکبرزاده خیابی<sup>۳</sup>، اعظم صفری<sup>۴،۵</sup>\*

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** نواحی حاوی فاکتورهای آروسپرمی (AZF) واقع در بازوی بلند کروموزوم Y دارای ژن‌هایی است که نقش و عملکرد خاص آنها در اسپرماتوژنز به طور کامل مشخص نشده است. از این رو، شناخت ارتباط بین ریزحذف‌های نواحی AZF با ناباروری در مردان، تشخیص، درمان و مشاوره ژنتیک را مقدور می‌سازد.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه توصیفی-تحلیلی حاضر بر روی ۴۷ مرد نابارور مبتلا به آروسپرمی با دلایل غیر انسدادی مراجعه کننده به بخش ناباروری بیمارستان الزهرا تبریز و کاریوتایپ نرمال انجام گردید. غربالگری مولکولی ناحیه AZF بر روی DNA ژنومی خون محیطی انجام گردید. تکنیک Multiplex PCR و دو مجموعه از پرایمرهای STS برای تشخیص ریزحذف‌های نواحی AZF و توالی‌های ویژه بر روی کروموزوم Y استفاده گردید.

**نتایج:** از بین ۴۷ مرد نابارور، ۱۷ بیمار (۳۶/۱۷ درصد) دارای ریزحذف‌های کروموزوم Y در نواحی AZFc و AZFd بودند ( $P < 0/05$ ). از این ۱۷ نفر ۱۴ بیمار در ناحیه AZFc و دو بیمار تواما در دو ناحیه AZFc+d و یک بیمار در ناحیه AZFd دارای ریزحذف بودند. نتایج نشان داد ریزحذف‌های نواحی AZF تاثیر معنی‌داری بر بروز آروسپرمی در مردان نابارور دارد.

**نتیجه‌گیری:** تجزیه و تحلیل ریزحذف‌های کروموزوم Y به‌عنوان یک آزمایش مولکولی با اهمیت برای کسب اطلاعات ژنتیکی قابل اعتماد در مردان مبتلا به ناباروری، قبل از استفاده از تکنیک‌های کمک باروری توصیه می‌شود؛ این امر به کاهش هزینه‌ها و مشکلات این تکنیک کمک خواهد نمود.

**واژگان کلیدی:** فاکتور آروسپرمی (AZF)، اسپرماتوژنز، ریزحذف‌های کروموزوم Y، ناباروری مردان

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۳، صفحات ۱۲۷-۱۲۲

## مقدمه

مکانیسم مولکولی نقص اسپرم‌سازی در مردان و ارتباط آن با ریزحذف‌های بازوی بلند کروموزوم Y (Yq) هنوز به طور کامل شناخته نشده است. با این وجود، به نظر می‌رسد که حذف‌های کروموزوم Y در ناحیه Yq۱۱ در ناباروری مردان موثر است [۳،۲]. این ناحیه تحت عنوان فاکتور آروسپرمی (AZF) نامیده می‌شود. فاکتورهای کنترل اسپرماتوژنز در نواحی AZFb، AZFa و AZFc و AZFd بر روی بازوی بلند کروموزوم Y قرار دارند [۴]. ژن‌های موجود در ناحیه AZF پروتئین‌های اتصال شونده به RNA را کد می‌کنند که در تنظیم بیان ژن، متابولیسم RNA، بسته‌بندی، نقل و انتقالات سیتوپلاسم و پیرایش RNA دخالت دارند [۵]. حذف‌های نواحی AZF به احتمال زیاد ناشی از نوترکیبی بین توالی‌های تکراری درون کروموزومی می‌باشند. ریزحذف‌های کروموزوم Y بعد از سندروم کلاین فیلتر، شایع‌ترین علت ژنتیکی ناباروری به‌شمار می‌آیند [۶]. حذف ناحیه AZFa با فقدان کامل سلول‌های زایشی، حذف ناحیه AZFb با توقف رشد سلول‌های زایشی در پروفاز میوز I و حذف ناحیه AZFc با کاهش اسپرم‌سازی یا توقف بلوغ اسپرم، همراه می‌گردند [۷]. ناحیه AZFd به‌صورت هم‌پوشان با ناحیه AZFb و AZFc قرار دارد

مطالعات نشان داده‌اند حدود ۱۵-۱۰ درصد زوج‌ها مشکل ناباروری دارند که علل ۵۰ درصد از آنها اختلال در اسپرماتوژنز می‌باشد. ژن‌هایی که در جریان اسپرماتوژنز بیان می‌گردند، مسئول کد کردن پروتئین‌های لازم جهت مراحل اختصاصی تولید اسپرم هستند [۱]. کروموزوم Y یکی از کوچک‌ترین کروموزوم‌ها در ژنوم انسان است که با ۶۰ میلیون توالی بازی در DNA خود نزدیک به ۲ درصد کل ژنوم انسانی را تشکیل می‌دهد. نقش اصلی کروموزوم Y در تکثیر گونه‌ها، تعیین جنسیت و کنترل اسپرماتوژنز می‌باشد.

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی ملکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

<sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی ملکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

<sup>۳</sup> کارشناس ارشد، اداره امور آزمایشگاه‌ها، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

<sup>۴</sup> دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

<sup>۵</sup> دانشجوی دکتری، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

## \* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، کیلومتر ۵ بوار قطب رواندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریح

دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

تلفن: ۰۹۱۴۸۱۹۰۰۳۰

پست الکترونیک: safary-az@kaums.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۱۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۸

انتخاب STS پرایمرها: برای بررسی افراد بیمار و کنترل، ۶ مارکر STS برای دو ناحیه AZFc, AZFd و یک مارکر STS برای ناحیه SRY طبق راهنمای استاندارد EAA/EMON از سایت اختصاصی پرایمر STSها (MSY Breakpoint Mapper database) طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. این STSها عبارت بودند از: SY157, SY254 و SY255 برای ناحیه AZFc و SY145, SY152 و SY153 برای ناحیه AZFd که در جدول شماره ۱ آمده است. برای شناسایی ریز- حذف‌های کروموزوم Y در نواحی AZF توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Multiplex PCR دو گروه به صورت زیر طراحی گردید:

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Multiplex: حجم واکنش برای Multiplex PCR، ۲۵ µl در نظر گرفته شد که هر واکنش حاوی DNA پلیمرز Smartaq (سینا ژن، ایران): ۰/۲۵ µl، هر پرایمر: ۰/۵ µl، dNTP (۱۰ میلی‌مولار): ۰/۵ µl، بافر PCR (۱۰X): ۲/۵ µl، MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی‌مولار): ۰/۷۵ µl، DNA فرد بیمار، کنترل‌های مثبت و یا منفی: ۲ µl و dH<sub>2</sub>O: ۱۸ µl بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر Peqlab ساخت شرکت Peqlab کشور آلمان انجام شد. واکنش PCR در ۳۶ سیکل شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C، دناتوراسیون، اتصال پرایمر و طولی سازی به ترتیب ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷/۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و طولی سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. مقدار ۵ µl از محصول واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۰/۵ µg/ml اتیدیوم بروماید، الکتروفورز و مورد مشاهده و تشخیص قرار گرفت.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم-افزار آماری SPSS ویرایش ۱۱/۲ انجام شد. برای استنباط داده‌ها آزمون‌های مجذور کای و پیرسون مورد استفاده قرار گرفت و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

از ۶۰ مرد نابارور مورد مطالعه، ۴۷ بیمار که مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی بودند انتخاب شده و مورد مطالعه مولکولی قرار گرفتند. همه مردان نابارور انتخابی کاربوتایپ نرمال XY، 46 داشتند. در ۱۷ نفر از ۴۷ بیمار (۳۶/۱۷ درصد) ریز- حذف در دو ناحیه AZFc و AZFd مشاهده شد (جدول شماره ۲). از ۱۷ بیمار، ۲ مرد آزواسپرم دارای ترکیبی از ریزحذف‌ها در

و حذف این ناحیه الیگو اسپرمی و یا اختلالات مورفولوژیک اسپرم را باعث می‌شود [۵]. بنابراین، ریزحذف‌های نواحی AZF با الیگو اسپرمی خفیف، شدید و یا آزواسپرمی همراه خواهد بود [۸]. بررسی ریزحذف‌های نواحی AZF به علت توارث آنها به ویژه در موارد استفاده از روش‌های کمک باروری دارای اهمیت فوق‌العاده-ای می‌باشد [۴]. از آنجایی که برای یک فنوتیپ خاص امکان وجود ژنوتیپ‌های متفاوت بر اساس جوامع مختلف وجود دارد، تشخیص ریزحذف‌های کروموزوم Y در یک مرد نابارور، تشخیص مناسب بیماری محسوب می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی فراوانی ریز-حذف‌های کروموزوم Y با استفاده از تکنیک مولکولی Multiplex PCR در بیماران مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی مراجعه‌کننده به مرکز اورولوژی و درمان ناباروری بیمارستان الزهرا تبریز می‌باشد.

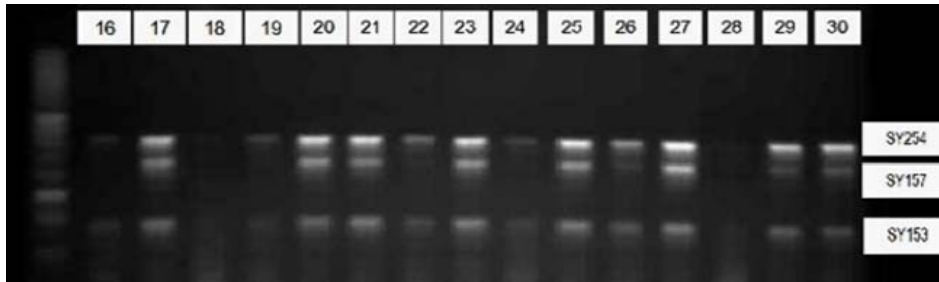
### مواد و روش‌ها

انتخاب بیمار و آنالیز سیتوژنتیکی: در این مطالعه بررسی اولیه بر روی ۶۰ مرد نابارور مراجعه‌کننده به بخش ناباروری بیمارستان الزهراء تبریز انجام شد. بیمارانی که دچار آزواسپرمی ناشی از انسداد مجاری (واریکوسل)، بیماری کریپتور-کیدیم (عدم نزول بیضه) و یا دارای سابقه عمل جراحی بر روی مجاری ادراری بودند، از مطالعه خارج شده و از میان ۶۰ مرد نابارور، ۴۷ بیمار مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی مورد مطالعه قرار گرفتند. این بیماران سطح هورمون‌های FSH و LH بالاتر از نرمال و تستوسترون کمتر از نرمال داشتند (محدوده نرمال برای بررسی هورمون FSH کمتر از ۱۰ mIV/ml و برای LH کمتر از ۱۰ mIV/ml و تستوسترون ۲۷۰ ng/dl تا ۱۰۷۰ ng/dl در نظر گرفته شد). جهت رعایت اصول اخلاقی پس از ارائه توضیحات لازم به بیمار رضایت نامه از فرد دریافت و پرسشنامه پر گردید. کلیه افراد جهت روشن شدن علت اولیه ناباروری طبق روش‌های استاندارد مورد بررسی کاربوتپ قرار گرفتند. چهل مرد بارور دارای فرزند با فرمول کروموزومی ۴۶، XY جهت بررسی و اطمینان از عدم بروز جهش در افراد سالم بارور به عنوان کنترل‌های مثبت و یک زن بارور نرمال به عنوان کنترل منفی جهت اطمینان از عدم حضور فاکتورهای AZF در کروموزوم جنسی انتخاب شدند. استخراج DNA: از افراد مورد مطالعه ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شده و در لوله‌های حاوی EDTA ریخته شد. برای استخراج DNA از کیت استخراج QIAamp DNA Mini Kit (کیاژن، آلمان) استفاده گردید. DNA با غلظت ۱۲-۳ µg درون لوله‌های مخصوص ریخته شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

ریزحذف‌های نواحی آزوسپرمی بر روی کروموزوم Y و ...

ریزحذف در نواحی AZF (۳۶/۱۷ درصد) دارد. هیچ ریزحذفی در نمونه‌های کنترل مشاهده نگردید. الگوی فراوانی نواحی دارای ریزحذف بر اساس پرایمرهای مورد استفاده (جدول شماره ۳) و نتایج مربوط به Multiplex PCR و ژل الکتروفورز در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

دو ناحیه AZF (AZFc+d) بودند. در این مطالعه، ۱۴ نفر از ۱۷ بیمار (۸۲/۳۵ درصد) دارای ریزحذف در ناحیه AZFc بر روی کروموزوم Y بوده و بیشترین ریزحذف این ناحیه در پرایمر SY157 (Locus: DYS240) مشاهده شد. بررسی‌های آماری نشان داد بروز ریزحذف‌های کروموزوم Y تاثیر معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در ابتلا به آزواسپرمی در مقایسه با مردان نابارور فاقد



تصویر شماره ۱- نتایج آنالیز Multiplex PCR. بیماران ستون‌های ۱۷، ۲۳-۲۰، ۲۷-۲۵، ۲۹ و ۳۰ در هیچ‌یک از پرایمرهای گروه I ریزحذف نداشتند. بیماران ستون‌های ۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۲، ۲۴ و ۲۸ در پرایمر SY157 دارای ریزحذف بودند (به ترتیب بیماران کدهای ۰۱۶، ۰۲۴، ۰۳۶، ۰۴۱ و ۰۱۸).

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای STS و مناطق مربوط به آنها

| STS   | Locus   | Region | Genbank accession | Size (bp) | Sequence 5'—3'  |
|-------|---------|--------|-------------------|-----------|---|
| SY254 | DAZ     | AZFc   | G38349            | 380       | GGGTGTTACCAGAAGGCAAAA<br>GAACCGTATCTACCAAAGCAGC       |
| SY255 | DAZ     | AZFc   | G65827            | 126       | GTTACAGGATTCGGCGTGAT<br>CTCGTCATGTGCAGCCAC            |
| SY157 | DYS240  | AZFc   | G12005            | 290       | CTTAGGAAAAAGTGAAGCCG<br>CCTGCTGTCAGCAAGATACA          |
| SY153 | DYS237  | AZFd   | G12004            | 139       | GCATCCTCATTTTATGTCCA<br>CAACCCAAAAGCACTGAGTA          |
| SY152 | DYS236  | AZFd   | G75623            | 120       | AAGACAGTCTGCCATGTTTCA<br>ACAGGAGGGTACTTAGCAGT         |
| SY145 | DYF51S1 | AZFd   | G66358            | 143       | CAACACAAAAACACTCATATACTCG<br>TTGAGAATAATTGTATGTTACGGG |
| SY14  | SRY     | Yp     | G38356            | 491       | GAATATTCCTCCGCTCTCCGGA<br>GCTGGTGCTCCATTCTTGAG        |

جدول شماره ۲- انواع ریزحذف‌های کروموزوم Y در نواحی AZF

| Phenotype   | Karyotype     | AZFc deletion, % (n) | AZFd deletion, % (n) | Combined deletion, % (n) | Total number of deletion, % (n) |
|-------------|---------------|----------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Azoospermic | Normal, 46,XY | ۲۹/۷۸ (۱۴/۴۷)        | ۲/۱۲ (۱/۴۷)          | ۴/۲۵ (۲/۴۷)              | ۳۶/۱۷ (۱۷/۴۷)                   |

جدول شماره ۳- الگوی فراوانی نواحی دارای ریزحذف‌ها بر اساس پرایمرهای STS مورد مطالعه

| % of Patients | AZFc  |       |       | AZFd  |       |       |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|               | SY255 | SY254 | SY157 | SY153 | SY152 | SY145 |
| ۷۷/۴۷         | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| ۱۱/۲۶         | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| ۵/۸۸          | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| ۵/۸۸          | -     | -     | -     | -     | -     | -     |

کروموزوم Y باعث افزایش میزان نقص در روند اسپرماتوژنز می‌شود [۱۰]: به طوری که فراوانی این ریزحذف‌ها، بین ۱ تا ۵۵ درصد گزارش شده است [۱۲، ۱۱]. تفاوت‌های قومی و منطقه‌ای از عوامل

بحث

ریزحذف‌های کروموزوم Y دومین علت اصلی ناباروری در مردان، بعد از سندروم کلاین فلتز می‌باشد [۹]. حذف‌های

این، تعداد بیماران مورد بررسی و نحوه انتخاب بیماران بر حسب شدت اختلال در تعداد اسپرم، اتیولوژی اختلال اسپرماتوژنز، تفاوت‌های اقلیمی و ناحیه ای نیز می‌تواند در تفاوت فراوانی‌ها موثر باشد [۲۴]. بر اساس نتایج مطالعات اخیر، بسیاری از موارد آژواسپرمی‌های غیر انسدادی، منشا ژنتیکی دارند. بنابراین، توصیه می‌شود که همه مردان دارای حذف‌های ناحیه AZFc، با توجه به تاثیر منفی پیش‌رونده ریزحذف‌های کروموزوم Y در تولید، کاهش و حتی فقدان کامل اسپرم، در زمان بلوغ تحت آزمایشات آندروژنیک قرار بگیرند و در صورت مشاهده اسپرم، در ابتدای دوران جوانی قبل از آسیب‌های ناشی از بالا رفتن سن، اسپرم آن‌ها ذخیره گردد [۲۶]. هدف این مطالعه بررسی ریزحذف‌های کروموزوم Y در مردان مبتلا به ناباروری آژواسپرمی غیرانسدادی در شمال غرب ایران و در منطقه آذربایجان و شناسایی مارکرهای STS های مناسب مرتبط با آژواسپرمی بوده است. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، آنالیز مولکولی ریزحذف‌های کروموزوم Y برای کسب اطلاعات دقیق جهت مشاوره ژنتیکی، قبل از استفاده از تکنیک‌های کمک باروری با توجه به شانس انتقال آنها به نسل بعدی بایستی صورت پذیرد.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج آماری به‌دست آمده بین بروز ریزحذف‌های نواحی AZFc,d کروموزوم Y در مردان مبتلا به آژواسپرمی در مقایسه با مردان آژوسپرم فاقد ریزحذف در این نواحی به-خصوص پرایمر SY157 اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با توجه به سهم این پرایمر در شناسایی ریزحذف‌های کروموزوم Y (۱۳ نفر از ۱۷ بیمار آژواسپرم، ۷۶/۴۷ درصد)، به‌نظر می‌رسد این STS برای شناسایی ریزحذف‌های کروموزوم Y اختصاصیت بیشتری دارد. با این وجود، برای اطمینان بیشتر از کارایی بالای این پرایمر بهتر است در مناطق مختلف و نژادهای متفاوت و جمعیت‌های بزرگ‌تر از مردان مبتلا به ناباروری غیر انسدادی مورد استفاده قرار گیرد.

#### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری مرکز ناباروری بیمارستان الزهرا تبریز، مرکز تحقیقات علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی کاشان و همچنین راهنمایی جناب آقای دکتر اعظمی و زحمات جناب آقای دکتر مطلبی آذر در راستای انجام این پروژه صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

موثر در تنوع و میزان شیوع ریزحذف‌های کروموزوم Y به شمار می‌روند [۱۳]. علاوه بر این، ناهمگونی فنوتیپی در حذف‌های نواحی AZF می‌تواند ناشی از تاثیرات محیطی، بیان ژنی متفاوت در اثر تغییرات ژنی، نفوذ متغیر و حضور همولوگ‌های اتوزومال مانند DAZLA (DAZ like autosomal on 3p25) باشد [۱۴]. در دهه گذشته مطالعات فراوانی در رابطه با ریزحذف‌های کروموزوم Y انجام شده است؛ نتایج حاصل از این مطالعات نشان داده است که بیشترین ریزحذف‌های کروموزوم Y در دو ناحیه AZFc و AZFb به‌ترتیب با فراوانی ۶۰ و ۱۶ درصد در مردان مبتلا به ناباروری اتفاق افتاده است [۱۳]. در مطالعه حاضر میزان ریزحذف‌های کروموزوم Y بالغ بر ۳۶/۱۷ درصد بود که این میزان بیشتر از فراوانی (۱۶ درصد) گزارش شده توسط آکادمی آندروژنولوژی اروپا (EAA) می‌باشد [۱۵]. از ۴۷ مرد نابارور مبتلا به آژواسپرمی، ۱۴ نفر (۲۹/۷۸ درصد) دارای ریزحذف در ناحیه AZFc، یک بیمار (۲/۱۲ درصد) دارای ریزحذف در ناحیه AZFd و دو نفر (۴/۲۵ درصد) دارای ریزحذف ترکیب در دو ناحیه AZFc+d بودند. بیشترین میزان ریزحذف‌های کروموزوم Y مردان مبتلا به آژواسپرمی غیرانسدادی مربوط به ناحیه AZFc با فراوانی ۲۹/۷۸ درصد و در پرایمرهای SY157 و SY254 بود که از این میزان در ۳ بیمار حذف ژن DAZ (SY254) مشاهده گردید. این در حالی است که هیچ حذفی در پرایمر SY255 مشاهده نگردید. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین که میزان ریزحذف‌های ناحیه AZFc را بیشتر از ریزحذف‌های سایر نواحی AZF بیان کرده بودند، مطابقت دارد [۲۰-۱۶]. این در حالی است که بعضی مطالعات میزان ریزحذف‌های ناحیه AZFc را ۵ درصد از ۴۰ مرد نابارور و میزان کل ریزحذف‌های نواحی AZF را بسیار پایین گزارش کرده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارند [۲۱-۲۳]. هم‌چنین، در مطالعه انجام شده توسط میرفخرایی و همکاران بر روی مردان نابارور مبتلا به آژواسپرمی، بیشترین میزان ریزحذف‌های کروموزوم Y در ناحیه AZFb با فراوانی ۶۶/۶۷ درصد و ناحیه AZFc با فراوانی ۴۱/۶۷ درصد گزارش شده است که با نتایج این مطالعه مغایرت دارد [۴]. این در حالی است که در بعضی مطالعات هیچ ریزحذفی در نواحی AZF بر روی کروموزوم Y مردان نابارور گزارش نشده است [۲۵،۲۴]. این تفاوت در فراوانی حذف‌ها و نقاط حذف شده در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف، به‌ویژه هاپلوטיפ‌های مخصوص کروموزوم Y، سابقه ژنتیکی یا اثرات محیطی و هم‌چنین پرایمرهای مختلف به‌کار گرفته باشند. علاوه بر

## References:

- [1] Park SH, Lee HS, Choe JH, Lee JS, Seo JT. Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in 127orean men with y chromosome microdeletions. *Korean J Urol* 2013; 54(8): 536-40.
- [2] Moore FL, Reijo-Pera RA. Male sperm motility dictated by mother's mtDNA. *Am J Hum Genet* 2000; 67(3): 543-48.
- [3] Choi DK, Gong IH, Hwang JH, Oh JJ, Hong JY. Detection of Y Chromosome Microdeletion is Valuable in the Treatment of Patients with Nonobstructive Azoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia: Sperm Retrieval Rate and Birth Rate. *Korean J Urol* 2013; 54(2): 111-6.
- [4] Mirfakhraie R, Mirzajani F, Kalantar SM, Montazeri M, Salsabili N, Pourmand GR, et al. High prevalence of AZFb microdeletion in Iranian patients with idiopathic non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res* 2010; 132: 265-70.
- [5] Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. Genetics of Azoospermia: Current Knowledge, Clinical Implications, and Future Directions. Part II Y Chromosome Microdeletions. *Urol J* 2007; 4(4): 192-206.
- [6] Ferlin A, Moro E, Onisto M, Toscano E, Bettella A, Foresta C. Absence of testicular DAZ gene expression in idiopathic severe testiculopathies. *Hum Reprod* 1999; 14(9): 2286-92.
- [7] Kim MJ, Choi HW, Park SY, Song IO, Seo JT, Lee HS. Molecular and cytogenetic studies of 101 infertile men with microdeletions of Y chromosome in 1,306 infertile Korean men. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(6): 539-46.
- [8] Ghorbian S. Routine diagnostic testing of Y chromosome deletions in male infertile and subfertile. *Gene* 2012; 503(1): 160-4.
- [9] Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 2004; 27(4): 240-9.
- [10] 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(6): 2638-42.
- [11] Osterlund C, Segersteen E, Arver S, Pousette A. Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre. *Int J Androl* 2000; 23(4): 225-9.
- [12] Chiang HS, Yeh SD, Wu CC, Huang BC, Tsai HJ, Fang CL. Clinical and pathological correlation of the microdeletion of Y chromosome for the 30 patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Asian J Androl* 2004; 6(4): 369-75.
- [13] Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* 2003; 26(2): 70-5.
- [14] Dada R, Gupta NP, Kucheria K. AZF microdeletions associated with idiopathic and non-idiopathic cases with cryptorchidism and varicocele. *Asian J Androl* 2002; 4(4): 259-63.
- [15] Hadj-Kacem L, Hadj-Kacem H, Ayadi H, Ammar-Keskes L, Chakroun-Fki N, Rebai T, et al. Screening of Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile men. *Arch Androl* 2006; 52(3): 1-7.
- [16] Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 2000; 9(8): 1161-69.
- [17] Fu L, Xiong DK, Ding XP, Li C, Zhang LY, Ding M, et al. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(6): 521-7.
- [18] Lin YM, Chen CW, Sun HS, Hsu CC, Chen JM, Lin SJ, et al. Y-chromosome microdeletion and its effect on reproductive decisions in 127aiwanese patients presenting with nonobstructive azoospermia. *Urology* 2000; 56(6): 1041-6.
- [19] Totonchi M, Mohseni Meybodi A, Borjian Boroujeni P, Sedighi Gilani M, Almadani N, Gourabi H. Clinical data for 185 infertile Iranian men with Y-chromosome microdeletion. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(8): 847-53.
- [20] Omrani MD, Samadzade S, Bagheri M, Attar K. Y chromosome microdeletions in idiopathic infertile men from west azarbaijan. *Urol J* 2006; 3(1): 38-43.
- [21] Akbari Asbagh F, Sina A, Najmabadi H, Akbari MT, Tabaroki A, Pourmand Gh. Prevalence of Y chromosome microdeletions in Iranian infertile men. *Acta Med Iran* 2003; 41(3): 164-70.
- [22] Bor P, Hindkjær J, Kølvrå S, Ingerslev HJ. Y chromosome microdeletions and cytogenetic findings in unselected ICSI candidates at a Danish fertility clinic. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(5): 224-31.
- [23] Sargin CF, Berker-Karazüm S, Manguoğlu E, Erdoğan T, Karaveli S, Gülkesen KH, et al. AZF microdeletions on the Y chromosome of infertile men from Turkey. *Ann Genet* 2004; 47(1): 61-8.
- [24] 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.
- [25] Güney AI, Javadova D, Kırac D, Ulucan K, Koc G, Ergec D, et al. Detection of Y chromosome microdeletions and mitochondrial DNA mutations in male infertility patients. *Genet Mol Res* 2012; 11(2): 1039-48.
- [26] Faddy MJ, Silber SJ, Gosden RG. Intra-cytoplasmic sperm injection and infertility. *Nat Genet* 2001; 29(2): 131.