

# تعیین فراوانی حذف‌های کوچک ناحیه AZF کروموزم Y مردان نابارور در جمعیت اصفهان

مجید متولی باشی<sup>۱</sup>، مریم بردبار<sup>۱</sup>، زهره حجتی<sup>۱</sup>، رضا محمودی<sup>۲</sup>، زهرا رضایی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۱۸

## چکیده

**زمینه و هدف:** حذف‌ها در کروموزم 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 مراجعه‌کننده 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 کروموزم 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

و ۶ از منطقه نزدیک به سانترومر تا منطقه انتهایی نسبت به سانترومر مطابقت دارد و ناحیه هتروکروماتین هم شامل ناحیه ۷ می‌باشد، بعدها کروموزوم Y به ۴۳ 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 اسپرم سازی 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 AZFb، AZFc همراه می‌باشند. حذف‌های AZF به وسیله نوترکیبی همولوگوس درون کروموزومی بین بلوک‌های توالی‌های تکراری درون ساختارهای پالیندرومی ایجاد می‌شوند (۱۰).

اسپرم‌سازی به وسیله تعدادی از ژن‌ها روی کروموزوم Y و اتوزوم‌ها تنظیم می‌شود. فراوانی حذف‌های کروموزوم Y با شدت نقص اسپرماتوژنیک افزایش پیدا می‌کند. تقریباً ۱۵ درصد مردان آزوسپرم و ۵ تا ۱۰ درصد از مردان الیگواسپرم حذف‌های 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 مران<sup>(۲)</sup> مورد نیاز می‌باشد. مطالعات اخیر نشان دادند، تنوع قابل ملاحظه‌ای در

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 نشده‌اند 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 ایمنولوژیک 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 کروموزومی یا تک ژنی مانند؛ کلاین فلتز و سیستمیک فیبروز می‌باشند (۳ و ۲).

حذف‌ها در کروموزوم Y یکی از دلایل عمده ژنتیکی ناباروری است، که با فراوانی ۱۰-۱۵ درصد در افراد آزوسپرمی و 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 آزوسپرمی فاکتور<sup>(۱)</sup> نامیده شد (۸-۴). کروموزوم Y به ۷ ناحیه تقسیم می‌شود که بازوی کوتاه شامل نواحی ۱ تا ۴ و ناحیه یوکروماتین Yq شامل نواحی ۵

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

با ساترن بلات مشخص شده که حداقل ۳ کپی از آن وجود دارند (۱۴). ژن‌های DAZ در طول تکامل پرمیات‌ها درون کروموزوم قرار گرفته است و از ژن DAZL<sup>(۵)</sup> که بر روی کروموزوم ۳ انسانی قرار دارد منشأ گرفته‌اند. از بین رفتن همولوگ DAZL در حشرات باعث ناباروری از طریق توقف در مرحله پاکتی تن میوز 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 پاکتی تن را دارند یا به طور ساده باعث کاهش سلول‌های زایشی می‌شوند (۱۵). در کروموزوم ۷ حدود ۳۰۰ STS<sup>(۶)</sup> شناسایی شده است. STS ها توالی از DNA هستند که به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز 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 حذف‌های کوچک در جمعیت ایران وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی حذف‌های کوچک ناحیه AZF کروموزوم ۷ مردان نابارور در جمعیت اصفهان بود.

فراوانی حذف‌ها وجود دارد. حذف‌های AZF با مرحله‌ای که اسپرما توژنز متوقف می‌شود، ارتباط دارد. هر ناحیه AZF در مراحل مختلفی از اسپرم‌سازی عمل می‌کنند و حذف در هر ناحیه باعث توقف اسپرم‌سازی در مراحل ویژه‌ای می‌شود (۱۲ و ۱۱). حذف AZFa با غیبت کامل سلول‌های زایشی و با سندرم سلول‌های سرتولی<sup>(۱)</sup> همراه می‌شود. حذف AZFb با توقف رشد سلول‌های زایشی در مرحله پاکتین 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 می‌شود و ژن‌ها در هر ناحیه در مرحله ویژه‌ای از تمایز سلول‌های زایشی عمل می‌کنند (۱۳).

شناسایی و آنالیز حذف‌های کروموزوم ۷ یک پژوهش مهم برای مطالعه ناباروری مردان می‌باشد. حذف‌های کوچک کروموزوم ۷، در ناحیه یوکروماتین بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۷ در فاصله ۵ و ۶ است. فراوانی حذف‌های کوچک کروموزوم ۷ از ۱ درصد در مردانی که دستخوش تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم<sup>(۲)</sup> هستند تا ۵۵ درصد در مردان با سندرم سلول‌های سرتولی متفاوت است. ژن‌های DAZ<sup>(۳)</sup> و موتیف‌های اتصال یافته به RNA<sup>(۴)</sup> 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

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

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 پلی‌مران از چندین جفت پرایمر<sup>(۱)</sup> 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 پلی‌مران 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 از SRY به عنوان کنترل داخلی برای نشان دادن صحت این واکنش استفاده شد، SRY بر روی انتهای بازوی کوتاه کروموزوم Y واقع شده است. مردان و زنان نرمال نیز به عنوان کنترل خارجی مورد استفاده قرار گرفتند.

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 ۶۰-۲۵ 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 آروسپرمی (فاقد اسپرم) شامل ۷۰ بیمار و یک گروه الیگواسپرمی (میزان اسپرم کمتر از ۲۰ میلیون در ۱ میلی‌لیتر) 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

1-Sequence-Tagged-Site(STS)

درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه، پرایمرهای sY254 و SRY و 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 ۱-۲ درصد با اتیدیوم برمایید رنگ‌آمیزی شدند. در نمونه‌هایی که نقص در تکثیر دیده شد، ۲ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران 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 آروسپرم و ۳۰ درصد الیگواسپرم بودند. در ۱۰۰ مرد گروه شاهد محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران باندهایی با اندازه قابل انتظار ایجاد کردند و هیچ حذفی مشاهده نشد. حذف‌های کوچک کروموزم Y در ۱۱ نفر (۱۱ درصد) از افراد گروه مورد وجود داشت. تعداد ۹ نفر از ۱۱ بیمار با حذف‌های کوچک در میان گروه الیگواسپرمی قرار داشتند که شامل ۱۴/۱۲ از کل حذف‌ها بودند. دو بیمار حذف در ۲ مارکر sY254 و sY255 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 آروسپرم در توالی sY255 و sY254 حذف‌های کوچک

در این بررسی تکثیر پرایمرها در واکنش‌های مختلفی از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران 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 و sY182 می‌باشند.

تکثیر نواحی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای آماده شده و آنزیم Taq DNA Polymerase نو ترکیب 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: ۲-۲ میکرولیتر از DNA ژنومی به عنوان الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر همانندسازی، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از هر پرایمرهای رفت و برگشت ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم و ۰/۳ میکرولیتر از Taq پلی‌مران 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 سانتی‌گراد و ۴۰ ثانیه، پرایمرهای sY255 و SRY ۶۲

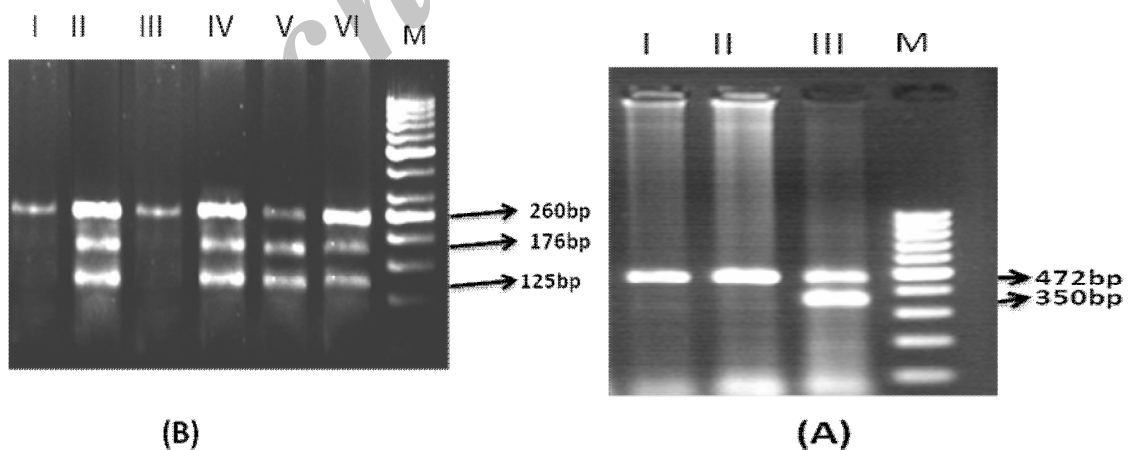
ناباروری بنیادی و اساسی می‌باشند. فراوانی حذف‌های کروموزوم Y با شدت نقص اسپرم‌سازی افزایش پیدا می‌کند (۱۵). هدف این مطالعه تعیین فراوانی حذف‌های کوچک ناحیه AZF کروموزوم Y مردان نابارور در جمعیت اصفهان بود.

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 آروسپرم ۱۵-۱۰ درصد و در مردان با الیگواسپرمی ۶-۲ 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).

در ژن DAZ داشتند تعداد ۱ فرد الیگواسپرم و ۱ بیمار آروسپرم در توالی sY182 دارای حذف‌های کوچک در ناحیه AZFb می‌باشند. ۶ نفر (۶ درصد) از افراد گروه مورد حذف در sY254 را نشان دادند. ۴ نفر (۴ 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 در sY128 را نشان دادند. حذف‌های کامل AZFc در نمونه‌هایی که دارای حذف در دو (sY255 و STS و sY254) بودند، مشاهده شد (تصویر ۱).

### نتیجه‌گیری

اسپرم‌سازی به وسیله تعدادی از ژن‌ها روی کروموزوم Y و کروموزوم‌های اوتوزوم تنظیم می‌شود. پیشرفت سریع زیست مولکولی مشخص کرده است حذف‌های کروموزوم Y دلیل عمده و مهم در ناباروری مردان می‌باشد. این یافته‌ها برای تشخیص سریع



تصویر ۱: مقایسه حذف‌ها در ناحیه AZF با استفاده از STS-PCR. (A) در چاک‌های I، II، III قطعات ۳۵۰ bp 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 چاک III هر دو قطعه تکثیر یافته است بنابراین هیچ حذفی در این ناحیه از AZFc در این نمونه وجود ندارد. M: مارکر ۱۰۰ bp می‌باشد. B: در چاک‌های I، IV، V، VI هر سه قطعه تکثیر یافته است بنابراین هیچ حذفی در نواحی AZFa و AZFb وجود ندارد. در چاک III دو قطعه ۱۲۵bp و ۱۷۲bp مورد انتظار حاصل از تکثیر پرایمرهای sY182 و sY90 مشاهده نمی‌شود. M: مارکر ۵۰ bp می‌باشد.

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<sup>(۴)</sup> (۲۰۱۱) با استفاده از ۹ مارکر STS مختلف در ناحیه AZF نشان دادند که مارکرهای sY254 و sY255 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 ۱۴ حذف کوچک (۱۴ درصد) در افراد الیگواسپرم (۲ درصد) و آزواسپرم (۱۲ درصد) در ناحیه AZF 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 کروموزوم Y هستند، عوامل دیگری مانند جهش در

کوبایاشی و همکاران<sup>(۱)</sup> (۱۹۹۴) با استفاده از ۱۶ مارکر STS مختلف در ناحیه AZF به بررسی حذف‌های کوچک این ناحیه پرداختند که فراوانی حذف‌ها در این ناحیه حدود ۸/۱۵ درصد مشاهده شد و این حذف‌ها در ناحیه AZFc و AZFb بودند (۱۹). نجم‌آبادی و همکاران (۱۹۹۶) 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 6 Yq نقش مهمی در روند اسپرماتوزنز 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<sup>(۲)</sup> با استفاده از ۶ مارکر STS مختلف در ناحیه AZF به بررسی حذف‌های کوچک این ناحیه پرداختند که فراوانی حذف‌ها در این ناحیه حدود ۳/۳۵ 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<sup>(۳)</sup> (۱۹۹۵) نشان دادند که بیشترین ناحیه ای که در ناباروری درگیر است، حذف‌هایی است که منطقه DAZ از کروموزوم Y را در بر می‌گیرد و دلیل عمومی نقص ملکولی ناباروری در انسان می‌باشد (۲۲). بر اساس نتیجه تحقیقات،

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

ژن CFTR<sup>(۱)</sup> می‌تواند موجب بروز آروسپرمی و الیگواسپرمی گردد.

در مطالعات بعدی برای تعیین دقیق اینکه کدام یک از کپی‌های DAZ حذف شده‌اند 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 پایان‌نامه 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, Keyhaneh 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. Selected 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. 4<sup>th</sup> 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 chromosome 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 RNA-binding 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.

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

Motovali-Bashi M<sup>1</sup>, Bordbar M<sup>1</sup>, Hojati Z<sup>1</sup>, Mahmoudi R<sup>2</sup>, Rezaei Z<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, <sup>2</sup>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: zahrrezaei62@yahoo.com