مقاله پژوهشی

بررسی حذف های کوچک کروموزوم Y در مردان نابارور مراجعه کننده به بیمارستان فاطمیه همدان با روش Multiplex PCR

کتایون اعتمادی*، دکتر ایرج امیری**

دریافت : ۹۱/۲/۱۳ ، پذیرش : ۹۱/۷/۱۸

چکیده:

مقدمه و هدف : بر طبق گزارشهای سازمان بهداشت جهانی، عامل اصلی ناباروری در ۲۰٪ موارد بین زوجهای فاقد فرزند قطعاً توسط عامل مذکر ایجاد می گردد. ۷۰٪ موارد ناباروری مردان علل شناخته شده ای دارد، اما در ۳۰٪ موارد علت ناشناخته است. کروموزوم Y و حذفهای کوچک بازوی بلندکروموزوم Y در سه ناحیه AZFa ، AZFb ، AZFc مرتبط با نقص روند اسپرماتوژنز می باشد. اهمیت این حذفهای ژنی در احتمال انتقال آن به نسل بعد با روشهای کمک باروری است. در این مطالعه هدف بررسی حذف های کوچک کروموزوم Y در مردان نابارور آزواسپرم و الیگواسپرم شدید مراجعه کننده به مرکز IVF بیمارستان فاطمیه همدان می باشد.

روش کار: در این مطالعه مورد شاهدی ۵۶ مرد نابارور با الیگواسپرمی و آزواسپرمی غیر انسدادی که فاقد هرگونه اختلال سیتوژنتیکی بودند و ٤٤ مرد سالم بارور مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه بیماران جهت تعیین حذفهای کروموزوم Y در سه ناحیهAZFa ، AZFb و AZFc با روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند.پرایمرهای sY84,sY86 برای ناحیه AZFa ، پرایمرهای sY127,sY134 برای ناحیه AZFb و پرایمرهای sY254,sY255 برای ناحیه AZFc استفاده گردید.

نتایج: میزان جهش در مردان الیگو و آزواسپرم ۱/۸۷٪ به دست آمد که با تفکیک به گروههای آزواسپرم و الیگواسپرم شدید به ترتیب مقادیر ٤٪ و ۰٪ به دست آمد. یک بیمار از ۵۶ بیماردارای حذف در ناحیه(AZF) بود، که ۱ حذف در ناحیه (AZFa(sY84، ۲ حذف در ناحیه (Sy134 و AZFb (sY127 و ۱ حذف در ناحیه AZFc (Sy254) مشاهده گردید. در هیچ یک از مردان گروه کنترل در نواحی مورد بررسی جهش مشاهده نگردید.

نتیجه نهایی: این مطالعه تاکید میکند که آنالیز و بررسی حذفهای کوچک کروموزوم بایستی برای کلیه بیماران الیگو وآزواسپرم با علت ناشناخته که کاندید تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم هستند انجام گیرد. نتایج حاصل همچنین تاکید می کند که عوامل شناخته نشده ای در ناباروری مردان وجود دارند که لزوم بررسی های وسیع تر در این زمینه را ایجاب می کند.

کلید واژه ها: آزواسپرم / الیگواسپرم / حذف کروموزوم / ناباروری

مقدمه :

بر اساس گزارشهای سازمان بهداشت جهانی ارائه شده در سال ۱۹۸۷، شیوع ناباروری زوجها بین ۱۰٪ تا ۱۵٪ بوده و عامل اصلی ناباروری در ۲۰٪ موارد بین زوجهای فاقد فرزند قطعاً توسط عامل مذکر ایجاد میگردد. در ۷۰٪ موارد ناباروری مردان علل شناخته شده ای وجود دارد (۱) اما در ۳۰٪ باقیمانده موارد علت ناشناخته است، در اغلب این موارد یک ناهنجاری ژنتیکی بویژه درسطح مولکولی اتفاق می افتد (۲).

کروموزوم Y یک هدف برای افزایش آسیبهای ژنتیکی است. گزارشات حاکی است که احتمال آسیب موتاسیونها در کروموزوم Y به علت تقسیم سریع سلولهای زاینده در طی دوران جنینی و بلوغ می باشد (۳) به علاوه از آنجا که ژنهای روی کروموزوم Y هاپلوئید هستند نقص در یک ژن

* عضو هیأت علمی گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (katayoon_etemadi@yahoo.com)
** دانشیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

مجـرد اثـرات بیـشتری را دارد حتـی اگـر توسـط حـضور چنـدین کپـی ژن روی کرومـوزوم Y نقـص ایجـاد شـده تکمیل گردد (۴).

وجود یک عامـل و فـاکتور ضـروری اسـپرماتوژنز کـه فاکتور آزواسپرمی (Azoospermia Factor ; AZF) خوانده می شود در اوایل سال ۱۹۷۶، در نتیجه جهش های جدید در بازوی بلند کروموزومY در بیماران آزواسپرم شناسـایی شـد (۵). مطالعـات واکـنش زنجیـره ای پلیمـراز (PCR) نـواحی Sequence Tagged Site ; STS حـاکی از بـروز حذفهای کوچکی در ناحیه AZF بود که قابل شناسایی بـا روش هـای سـیتوژنتیک نبـود (۶،۷). ایـن امـر منجـر بـه شناسایی ۳ جایگاه روی بازوی بلنـد کرومـوزوم Y گردیـد که در بر دارنده ژنهایی است که کنترل روند اسپرماتوژنز را بر عهده دارد که بر حسب ۳ ناحیـه اساسـی حـذف شـده AZFa, AZFb, AZFc خوانده می شود (۸،۹).

فوگت و همکاران موقعیت حذف AZF را در ارتباط بـا توقف مراحل مختلف اسپرماتوژنز بررسی کردند. هرلوکوس AZF در یک مرحلۀ مختلف از روند اسپرماتوژنز نقش دارد و حذف هرلوکوس باعث توقف اسپرماتوژنز در یک مرحلـۀ خاص می گردد. براساس بافت شناسی بیضه، حذف AZFa در ارتباط با حذف کامل سلولهای زاینده و حضور سلولهای سرتولی در توبولهای سمی نیفر که مشخصۀ سـندرم SCO (Sertoli cell – only syndrome) و مرتبط با آزواسـپرمی است، می باشـد. حـذف AZFb درارتبـاط بـا توقـف رشـد سلولهای زاینده در مرحلۀ پاکتین است که منجر به توقـف روند تقسیـم میوز می گردد. حذف AZFc در ارتبـاط بـا توقف سلولهای زاینده در مرحلۀ اسپرماتید و همچنـین در ارتباط با هیپواسپرماتوژنز و توقف بلوغ آنها و کاهش شدید تعداد اسپرم می باشد. بنابراین حـذف یـک لوکـوس AZF خاص نتایج فنوتیپی ویژه ای را خواهد داشت و ژنها در هر لوکوس در یک مرحلۀ خاص از تمایز سلولهای زاینده نقش دارد (۹).

حـذفهای کوچـک کرومـوزوم Y مهمتـرین عامـل ناهنجاریهای ژنتیکی در مردان نابارور است. بـیش از ۳۰٪ مـردان بـا آزواسـپرمی ایـدیوپاتیک حـذفهای کوچـک در کرومـوزوم Y دارنـد (۱۴-۹) شـیوع حـذفهای کوچـک کروموزوم Y در مردان نابارور در مطالعات مختلف بین ۱٪ تا ۵۵٪ آمده اسـت (۱۵) تفـاوت در مقـادیر بـروز مربـوط به عوامل مختلف مانند انتخاب بیمـــاران بر حسب شدت اخـتلال در تعـداد اسـپرم، نـوع اخـتلال اسـپرم، تعـداد پرایمرهـای مـورد اسـتفاده در آزمـایش و تفـاوت هـای منطقه ای می باشد.

امروزه با توجه به کاربرد وسیع روشهای کمک بـاروری (Assistant Reproductive Technology ; ART) بـرای افـراد نابـارور، بررسـی حـذفهای AZF اهمیـت بیـشتری می یابد، چرا که شانس انتقال حـذفها بـه فرزنـد افـزایش می یابد. بنابراین بررسی حذفهای کوچک کروموزوم Y در بیماران ناباروری که نقص اسپرماتوژنز دارند، بویژه قبـل از کـاربرد روش تزریـق درون سیتوپلاسـمی اسـپرم (ICSI) توصیه می گردد.

یافتن عوامل ژنتیکی منجر به ناباروری نـه تنهـا رونـد انتقـال نقـص ژنتیکـی از والـدین بـه فرزنـدان را روشـن می سازد ، بلکه از آنجا که ایـن امـر مـی توانـد منجـر بـه حذفهای ثانویه وسیعتر ودر نتیجـه امکـان بـروز ابهامـات جنسی در زاده های افراد مبتلا باشـد ، لـذا بررسـی هـای ژنتیکی می تواند پـیش آگهـی لازم را بـه فـرد در کـاربرد روشهای تکمیلی جهت باروری بدهد.

با توجه به فعالیـت مرکـز I. V. F در شـهر همـدان و مراجعه زوجهای نابارور جهت استفاده از تکنیک های رایج به منظور حصول باروری، لزوم راه انـدازی و بهینـه شـدن روشهای مولکولی جهت تـشخیص حـذفهای کرومـوزوم Y ضروری بوده است که به واسطه این کار انجام شده اسـت. این امرعلاوه بر تعیـین شـیوع حـذفهای کرومـوزوم Y در مردان نابارور شـهر همـدان و دادن پـیش آگهـی لازم بـه مردان نابارور واجد حذف کروموزومی، از ارجاع بیماران بـه مراکـز تشخیـصی در تهـران و صـرف هزینـه هـای گـزاف جلوگیری می نماید.

روش کار:

در این مطالعه مورد شاهدی ، ۷۴ مرد نابـارور از بـین زوجهای ناباروری کـه در طـی سـالهای ۸۹-۸۷ بـه مرکـز نابـاروری بیمارسـتان فاطمیـه همـدان مراجعـه نمـوده و روشن گردیده بود کـه علـت نابـاروری مربـوط بـه مـردان می شود انتخاب گردیدند. افراد پس از معاینات اولیه جهت بررسی بیشتر و انجام آزمایش اسپرموگرام و انجام آزمایشات هورمـونی (انـدازه گیـریFSH، LH و تـستوسترون) بـه آزمایشگاه معرفی گردیدند. جهـت رعایـت اصـول اخلاقـی پس از ارائه توضیحات لازم به بیمـار رضـایت نامـه از فـرد دریافت و پرسشنامه پر گردید. معیار ورود به مطالعه برای

ناباروری مردان آزواسپرمی و الیگو اسپرمی شدید (غلظت اسپرم کمتر از 5×10^6 /ml)، بیضه های کوچک، سطح بالای سرمی FSH، LH و میزان کم تستوسترون بود. تشخیص الیگو و آزواسپرمی براساس آنالیز سمن و بر اساس دستورالعملWHO، صورت گرفت. سمن جهت قابلیت تحرک، مورفولوژی، شمارش، و قابلیت بقاء اسپرم و pH بررسی گردید. محدوده نرمال برای بررسی هورمون FSH، کمتر از 10 mIV/ml ؛ LH، کمتر از 10 mIV/ml و تستوسترون 270 ng/dl تا 1070 ng/dl در نظر گرفته شد.

کلیه افراد جهت تائید آنومالیهای بیضه و روشن شدن علت اولیه ناباروری مورد بررسی سیتوژنتیک و کشت کروموزومی به روش G-banding مطابق استانداردهای پاریس و دنور قرار گرفتند. برای هر بیمار حداقل ۵ گسترش از متافازهای G-Band، جهت بررسی اختلالات تعدادی و ۱۰ تا ۱۵ گسترش متافازی جهت مطالعه دقیق تغییرات ساختمانی و هترومورفیسم بر اساس پروتکل استاندارد کاریوتیپ بررسی گردید. ۵۶ مرد که فرمول کروموزومی نرمال داشته و 46XY بودند و سطح LH، FSH بالاتر از نرمال و مقادیر تستوسترون کمتر از نرمال داشتند وارد مطالعه گردیدند. ۴۴ مرد بارور با فرمول کروموزومی 46 XY و یک زن بارور نرمال که همگی دارای فرزند بودند به عنوان کنترل های مثبت و منفی انتخاب گردیدند. بررسی های سیتوژنتیکی و مولکولی برای کلیه آنان نیز انجام گردید.پس از استخراج DNA، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت حذف های مربوط به نواحیAZFa, AZFb AZFc روی بازوی بلند کروموزوم Y با استفاده از روش multiplex PCR نمونه ها تکثیر گردید.

استخراج DNA و PCR : برای استخراج DNA از کیت آماده کیاژن FlexiGene DNA Kit,QIAGEN,Cat.No.51204 استفاده گردید. در اساس آنالیزتنها یک جایگاه غیر پلی مورفیک در دو ناحیه AZF برای شناسایی هر حذف STS در یکی از نواحی AZFa، AZFb و یا AZFc کافی است. اما آنالیز دو جایگاه STS در هر ناحیه موجب تقویت وتائید تشخیص می گردد. بنابراین، این نظریه که حداقل دو جایگاه STS در هر ناحیه AZF آنالیز گردد باعث اعتبار آزمایش میگردد. براساس تجربیات بسیاری از آزمایشگاهها و نتایج کنترل کیفی خارجی و بررسی فرمتmultiplex PCR، پرایمرهای STS به شرح زیر انتخاب گردید. پرایمرهای sY86 و sY84 برای بررسی جهش های AZFa، پرایمرهای sY134 و sY127 برای بررسی جهش های AZFb و پرایمرهای sY255 و sY254 برای بررسی جهش های AZFc استفاده شدند. به علاوه ژن SRY روی بازوی کوتاه کروموزوم Y توسط پرایمر(SRY) SY14 جهت تائید و کنترل فاکتور تعیین کننده بیضه روی بازوی کوتاه کروموزوم Y و پرایمر ZFY جهت تائید و کنترل ژن ZFY روی بازوی کوتاه مورد استفاده قرار گرفت (۱۶). استفاده از این پرایمرها تا بیش از ۹۵٪ قدرت تشخیص این حذفها در این ۳ ناحیه را دارا ست (۱۶). دو واکنش Multiplex جهت آنالیز حذف سه ناحیه AZF روی کروموزوم Y طراحی شده است. هر دو Multiplex شامل ۵ قطعه است، برای مثال سه جایگاه ژن AZF و دو قطعه کنترل SRY,ZFY .هر آزمایشگاه بر حسب تناسب بایداعتبار بخشی و صحت پروتکل خود را بهینه نماید. توالی پرایمرها جهت انجام PCR (۱۶) و ترتیب پرایمرها در A و Multiplex B در جدول ۱آمده است.

جدول ۱ : ترتیب پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Multiplex PCR

Multiplex A:	Multiplex B:
ZFY: 495 bp	ZFY: 495bp
SRY: 472 bp	SRY: 472bp
SY254: 400 bp (AZFc)	SY84: 326 bp (AZFa)
SY86: 320 bp (AZFa)	SY134: 301 bp (AZFb)
SY127: 274 bp (AZFb)	SY255:126 bp (AZFc)

کیت (cat.NO.206143, Qiagen, Hilden, Germany) Qiagen Multiplex PCR kit برای انجامMultiplex PCR به کار گرفته شد. برنامه PCR دستگاه بدین شرح می باشد: ۹۴° C به مدت ۱۵ دقیقه ، ۳۵ سیکل شامل ۹۴° C به مدت ۳۰ ثانیه ،C ۵۷° به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲° C به مدت ۶۰ ثانیه را تکرار کرده و در پایان ۱۰دقیقه در ۷۲° C قرار می دهیم. همین مقادیر را جهت Multiplex PCR B نیز با پرایمر های گروه B انجام دادیم. مقدار 5µl از محصول واکنش روی ژل آگارز ۲٪ وارد گردید و ژل به صورت over night با ولتاژ 25V در بافر 1X TBE جدا گردید. نمونه های کنترل مثبت و منفی جهت تأئید همراه با DNA مارکر(Fermentas Gene) Ruler 100 bp DNA Ladder. Cat N: SM0243 روی ژل Load گردید.

۴۴ مرد بارور با کاریوتیپ نرمال بعنوان کنترل مثبت مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

آنالیز آماری : در این مطالعه از آزمون χ^2 جهت مقایسه فراوانی حذفهای کوچک کروموزوم Y بین مردان نابارور و گروه کنترل (مردان بارور دارای فرزند) استفاده گردید و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

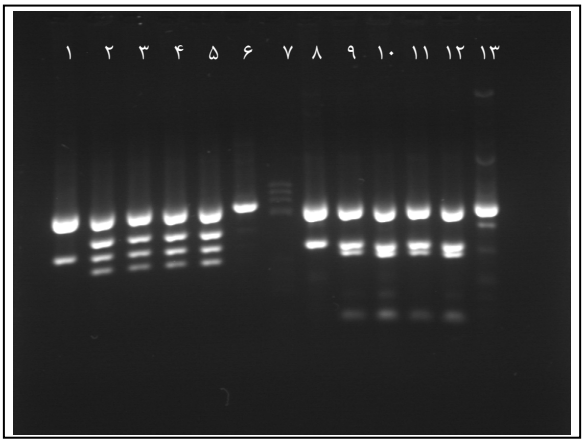
از ۷۴ مرد نابارور مورد مطالعه، ۵۶ نفر دارای فرمول کروموزومی46XY و کاریوتیپ نرمال بودند که وارد مطالعه مولکولی گردیدند. از این تعداد ۳۱ نفر دارای الیگواسپرمی شدید (۵۵/۴٪) و ۲۵ نفر آزواسپرم (۴۴/۶٪) بودند.

از۳۱ مرد الیگواسپرم ۲۱ نفر دارای سابقه فامیلی مثبت برای ناباروری (۶۷/۷٪) و ۱۰ نفر فاقد سابقه فامیلی برای ناباروری (۳۲/۲٪) بودند. از ۲۱ مرد نابارور با سابقه فامیلی مثبت ۸ نفر (۳۸/۱ ٪) دارای خویشاوند درجه اول نابارور و ۱۳ نفر (۶۱/۹٪) دارای خویشاوند درجه ۲ و ۳ بودند.

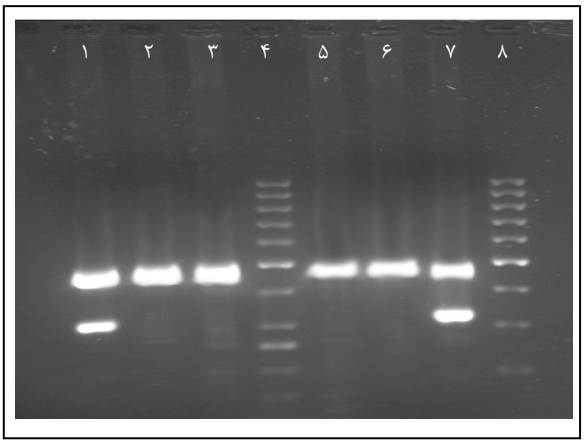
از ۲۵ مرد آزواسپرم ۱۷ نفر دارای سابقه فامیلی مثبت برای ناباروری (۶۸٪) و ۸ نفر فاقد سابقه فامیلی برای ناباروری(۳۲٪) بودند. از ۱۷ مرد نابارور آزواسپرم با سابقه فامیلی مثبت ۱۰ نفر (۵۸/۸۳٪) دارای خویشاوند درجه اول و ۷ نفر (۴۱/۱۷٪) دارای خویشاوند نابارور درجه ۲ و ۳ بودند.

۳۱مرد نابارور الیگواسپرم با وضعیت کروموزومی نرمال که علت شناخته شده ای برای ناباروری آنان بدست نیامده بود با روش Multiplex PCR جهت بررسی حذف های کوچک در سه ناحیه AZFb, AZFc و AZFa مورد بررسی قرار گرفتند. هیچ یک از افراد الیگواسپرم مورد مطالعه دارای حذف در نواحی مذکور نبودند.

۲۵ مرد نابارور آزواسپرم با وضعیت کروموزومی نرمال که علت شناخته شده ای برای ناباروری آنان بدست نیامده بود نیز جهت بررسی حذف های کوچک در نواحی مزبور مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. از بین افراد مورد بررسی فقط یکی از بیماران آزواسپرم دارای حذف در ناحیه AZF بود که ۱ حذف در ناحیه (sY84)AZFa ، ۲ حذف در ناحیه (sY127 , Sy134)AZFb و ۱ حذف در ناحیه (Sy254)AZFc بود. پس از تعیین حذف در بیمار مورد نظر با هر دو Multiplex PCR، A و B نمونه DNA بیمار به صورت Single با ۶ پرایمر جداگانه PCR و نتایج روی ژل آگاروز بررسی گردید (تصاویر۱ و۲).



تصویر ۱ : Multiplex PCR A,B در بیماران آزواسپرم
باند بدست آمده در شماره ۱ و ۸ مربوط به یک بیمار دارای حذف در ناحیه AZF می باشد. شماره ۱ تا ۵ Multiplex A ، شماره ۵ کنترل مثبت و شماره ۶ کنترل منفی ، شماره ۸ تا ۱۲ Multiplex B ، شماره ۱۲ کنترل مثبت و شماره ۱۳ کنترل منفی



تصویر ۲ : محصول PCR , DNA بیمار آزواسپرم دارای حذف در ناحیه AZF به صورت Single با ۶ پرایمر جداگانه
Line 1: Sy86, Line 2: Sy127, Line 3: Sy254 , Line 4: Marker, Line 5: Sy84, Line 6: Sy134 Line 7: Sy255, موارد ۲، ۳، ۵و۶ به ترتیب دچار حذف در ناحیه AZFb ، AZFc ، AZFa و AZFb گردیده است.

این امر به منظور تعیین ناحیه حذف با پرایمرهای ویژه هر ناحیه در ناحیه AZF انجام گردید. مشخصات بیمار واجد حذف در ناحیه AZF در جدول ۲ بیان شده است.

جدول ۲ : مشخصات بیمار واجد حذف در ناحیه AZF

شماره بیمار	سن	آنالیز اسپرم	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	تستوسترون(ng/dl)	بیوپسی بیضه ناحیه حذف شده	مارکر حذف شده
۴۹	۳۷	آزواسپرم	۲۳	۱۲	۱۳۸	AZFa,b,c _	Sy84 , Sy 127 , Sy 134, Sy 254

در هیچیک از ۴۴ مرد بـارور بـا وضـعیت کرومـوزومی نرمال حذفی مشاهده نگردید.

بررسی های آماری نشان داد که بـین بـروز حـذفهای کوچـک کرومـوزوم Y در مـردان نابـارور و مـردان بـارور اختلاف معنی داری وجـود نـدارد. همچنـین ایـن مطالعـه نشان داد که بین بروز حـذفهای کوچـک در کرومـوزوم Y بین دو گروه آزواسپرم و الیگواسپرم شدید اخـتلاف معنـی داری وجود ندارد. همچنین آزمون آماری χ^2 نشان داد کـه بین وجود سابقه مثبت فامیلی ناباروری با ناباروری ناشی از اختلالات الیگواسپرم و آزواسپرم در بیماران مـورد مطالعـه اختلاف معنی دار وجود دارد ($P<0.05$).

بحث:

حـذفهای کوچـک کرومـوزوم Y یـک علـت اساسـی ناباروری مردان است. حذفهای کروموزوم Y با نقایص روند اسپرماتوژنز ارتباط دارد. درحدود ۱۵٪ مـردان آزواسـپرم و ۵٪ تا ۱۰٪ مردان الیگو اسپرم حذفهایی را در کروموزوم Y نشان می دهند. امـا ایـن حـذفهای کوچـک کرومـوزوم Y توسـط یافتـه هـای کلینیکـی، آنـالیز سـمن و روشـهای سیتوژنتیکی قابل پیش بینی و شناسایی نیستند. متدهای مبتنی بر PCR جهت شناسایی حذفهای کوچک کروموزوم Y مورد نیاز است و امکان تشخیص بهتر و انجام مشاوره و مدیریت بیماری را بهتر فراهم می آورد (۱۷).

کروموزوم Y یک هدف بـرای افـزایش آسـیب ژنتیکـی است.گزارش شـده کـه احتمـال آسـیب هـای ژنتیکـی در کروموزوم Y به علت تقسیم سریع سلولهای تولید مثلی در طی دوران زندگی جنینی و بلـوغ افـزایش مـی یابـد ، بـه علاوه از آنجا کـه همـه ژنهـا روی کرومـوزوم Y هاپلوئیـد هستند، به نظر میرسد که نقائص در یک ژن مجرد بیـشتر باعث نقص گردد، حتی اگر آن نقص توسط حضور چندین کپی ژن روی کروموزوم Y کامل گردد (۱۸).

نتایج حاصل از مطالعات انجام شـده در خـصوص بـروز حذف نواحی از کروموزوم Y در مـردان نابـارور در نـواحی مختلف دنیا در جدول ۳ بیان شده است (۳۰-۱۹) .

این تفاوت در فراوانی حـذفها و نقـاط حـذف شـده در مطالعـات مختلـف ، ممکـن اسـت بـه تفاوتهـای ژنتیکـی جمعیت های مختلف و بـویژه هاپلوتیـپ هـای مخـصوص کرومـــوزوم Y، ســابقه ژنتیکـــی یـــا اثـــرات محیطـــی و همچنین پرایمرهای مختلف به کار گرفته مربـوط باشـند. علاوه بر این عوامل ، تعـــــداد بیماران مـــورد بررسی و نحوه انتخاب بیماران بر حسب شدت اخـتلال در تعـداد اسپرم ، اتیولوژی اختلال اسپرماتوژنز، تفاوتهـای اقلیمـی و ناحیه ای نیز میتواند در تفاوت فراوانی ها موثر باشد.

جدول۳ : میزان بروز حذف نواحی از کروموزوم Y در مردان نابارور در نواحی مختلف دنیا

کشور	درصد بروز	کشور	درصد بروز
ترکیه	۱۱/۲ تا ۵/۶	مراکش	۳/۵
چین	۱۷ تا۷/۶	صربستان	۱۵/۶ تا۵/۴
کویت	۲/۶	کرواسی	<۱
هند	۵	چک	۴
ژاپن	۷/۱	ایتالیا	۱۴/۴
تایوان	۱۱/۷	آلمان	صفر
آذربایجان غربی	۲۴/۲	نیوزلند	۵/۵
تونس	۶/۸۵	ایران	۱۲/۵
		مطالعه حاضر	۱/۷۸

در مطالعه حاضر میزان جهـش در مـردان الیگـو و آزو اسپرم ۱/۷۸ ٪ به دست آمد که بـا تفکیـک بـه گروههـای آزواسپرم و الیگواسپرم شدید اخـتلاف معنـی داری وجـود ندارد(۴٪ در مردان آزواسپرم و ۰٪ در مردان الیگواسـپرم). در مطالعـه ای کـه در اسـتان آذربایجـان غربـی توسـط عمرانی و همکاران صورت گرفته، ۱۵/۴ ٪ از بیماران مبتلا به الیگواسپرمی شدید و۳۰٪ از بیماران آزواسپرمیک دارای حذف نواحی از کروموزوم Y در ناحیـه AZF بودنـد (۲۹) که به طور قابل ملاحظـه ای از ارقـام مربـوط بـه مطالعـه حاضـر بـالاتر اسـت. (۱۵/۴٪ در مقابـل ۰ ٪) و (۳۰ ٪ در مقابل ۴ ٪) در مطالعه حاضر حذف در ژنهای ناحیـه AZF تنها در یک بیمار آزواسپرم مشاهده گردید که بـا بررسـی جداگانه پرایمر ها روشن گردید که یـک حـذف در ناحیـه AZFa(sy84) ، دو حذف در ناحیـهAZFb(sy127,sy134) و یک حذف در ناحیه AZFc (Sy254) مشاهده گردید. بـه این ترتیب ۵۰٪ حذف ها در ناحیه AZFb ، ۲۵٪ در ناحیه AZFa و ۲۵٪ در ناحیه AZFc بود.

در مطالعه ای کـه توسـط عمرانـی و همکـاران صـورت گرفته ۶۲/۵٪ از بیماران واجد یک حـذف ، ۲۵٪ دارای دو حذف و ۱۲/۵٪ دارای سـه حـذف در ژن AZF بودنـد. در این مطالعه بیش از ۸۰٪ حذف ها در ناحیه AZFc و بقیـه در ناحیه AZFb مشاهده گردید و هـیچ حـذفی در ناحیـه AZFa مشاهده نگردید. قابل ذکر اینکه در هـر دو مطالعـه بررسی مولکولی تنها روی مردان واجد کاریوتیپ طبیعـی (46XY) صورت گرفت و کلیه موارد غیر طبیعی از بررسی

مولکولی حذف گردیده است.

در مطالعه مشابهی که توسط میرفخرایی و همکاران صورت گرفته در مجموع در کل بیماران مورد مطالعه ۱۲/۵ درصد وقوع ریز حذف ها را نشان داده اند. در این مطالعه چنانچه فراوانی حذف ها تنها در میان بیماران دارای حذف بررسی گردد در این صورت این فراوانی برای نواحی b ، c ، ab ، bc و abc به ترتیب ۵۳/۳ ، ۲۶/۶۷ ، ۶/۶۷ ، ۶/۶۷ ، ۶/۶۷ درصد خواهد بود. این مطالعه نشان می دهد که در جمعیت مورد مطالعه حذف ژنهای ناحیه AZFb از فراوانی بیشتری در میان بیماران برخوردار بوده است(۳۰). از سوی دیگر در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۱ صورت گرفته است در ۹۷ مرد نابارور با علت ناشناخته هیچ موردی از حذف های کوچک روی کروموزوم Y مشاهده نشده است(۳۱).

مطالعه حاضر نشان داد که بین بروز حذفهای کوچک کروموزوم Y در مردان نابارور و مردان بارور اختلاف معنی داری وجود ندارد. همچنین این مطالعه نشان داد که بین بروز حذفهای کوچک در کروموزوم Y بین دو گروه آزواسپرم و الیگواسپرم اختلاف معنی داری وجود ندارد، لیکن بررسی آماری نشان داد که بین وجود سابقه مثبت فامیلی ناباروری با ناباروری ناشی از اختلالات الیگواسپرم و آزواسپرم در بیماران مورد مطالعه اختلاف معنی دار وجود دارد ، این نتیجه ممکن است ناشی از تعداد کم بیماران مورد مطالعه باشد. جهت تعمیم و نتیجه گیری درباره نقش وراثت در ناباروری مردان می بایست بررسی حذفهای کرموزوم Y در نسلهای متوالی و افراد خانواده بررسی گردد.

در یک گزارش موردی یک بیمار اولیگواسپرمی با نقص اسپرماتوژنز جهت حذف های کوچک کروموزوم Y بررسی و حذفی را در ناحیه AZFb نشان داد. DNA ژنومیک پدر این بیمار دقیقاً همان الگوی حذف را نشان داد. در طی انجام این بررسی یک بارداری اتفاق افتاد و در بررسی DNA مایع آمنیوتیک و خون بند ناف همان حذف مشاهده گردید (۳۲).

از دیدگاه کلینیکی بررسی ریز حذف های کروموزوم Y می تواند در پیشگویی نتایج حاصل از استفاده از روشهایی نظیر TESE/ICSI کمک نماید. مطالعات انجام شده نشان می دهد در مردانی که دارای حذف کامل هر یک از نواحی AZFa,b,bc,abc باشند امکان بازیابی اسپرم از بافت بیضه وجود ندارد در حالیکه در مورد حذف ناحیه C به تنهایی ۷۵ درصد موارد TESE با موفقیت همراه بوده است (۱۶).

لازم بذکر است پیگیری مراحل درمانی در مورد بیمار مطالعه حاضر که حذف در سه ناحیه a,b,c را نشان داد صورت نگرفته است.

علاقه به بررسی حذفهای کروموزوم Y در مردان نابارور به ویژه از آن رو اهمیت می یابد که روشهای کمک باروری و بویژه تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) می تواند عاملی مهم در انتقال حذفهای کوچک بازوی بلند کروموزوم Y به زاده های حاصل از این نوع باروری و مسائل متعاقب آن از جمله ناباروری در زاده های مذکر فرد شود. این انتقال حذف های کوچک در مطالعات قبلی مکررا ذکر گردیده است و یک ضرورت جدی جهت مشاوره ژنتیک و بررسی مولکولی در مردان نابارور است. برخی محققین بر اهمیت مشاوره ژنتیک و بررسی مولکولی حذفهای کوچک کروموزوم Y در کلیه مردانی که برای روش ICSI کاندید می شوند تاکید دارند(۳۳).

همان گونه که ذکر گردید بسیاری از موارد آزواسپرمی های غیر انسدادی منشا ژنتیکی دارند. به علاوه در بسیاری مطالعات مشاهده شده است که حذفهای کوچک کروموزوم Y نتیجه بدتر شدن پیشرونده تولید اسپرم باشد که نتیجه آن تبدیل الیگواسپرمی به آزواسپرمی می باشد. بنابراین توصیه میشود که همه مردان با حذفهایAZFc ، چه از طریق انتقال طبیعی و یا از طریق ISCI در زمان بلوغ تحت آزمایشات آندرولوژیکی قرار بگیرند و اگر اسپرم وجود دارد بایستی در ابتدای دوران جوانی قبل از اینکه امکان آسیب و صدمه با بالا رفتن سن وجود داشته باشد ذخیره شود. تخمین زده شده که اگر نیمی از همه مردان آزواسپرم، ICSI شوند شیوع ناباروری مردان در طی ۷ نسل دو برابر میشود (۳۴).

پاتسالیس و همکاران در سال ۲۰۰۲ تاکید کردند که مردان با حذفهای کوچک AZFc که کاندید ICSI هستند، باید مشاوره ژنتیک شوند و به آنها در باره احتمال ابهام جنسی و دیگر ناهنجاریهای احتمالی زاده های آنها توضیح داده شود. علاوه بر ناباروری، AZF را با موارد متعددی مرتبط دانسته اند. در مطالعات مختلف ارتباط آن با سرطان یا همراهی آن با ابهام جنسی دیده شده است (۳۵).

نتیجه نهایی:

امروزه بررسی دلایل ژنتیکی و کروموزومی ناباروری جایگاه بسیار مهمی پیدا کرده است. به منظور یافتن

اتیولوژی و دسترسی به مشاوره و دادن خدمات درمانی بـه بیمـاران،اتیولوژی ژنتیکـی نابـاروری بایـد روشـن گـردد. روشهای تشخیصی و درمانی قدمی برای ایجاد پیشرفتهای سریع در روشهای مولکولی تولید مثلی در انسان است.

فراوانی متفاوت بروز حذف نـواحی از کرومـوزوم Y در مردان نابارور در نواحی مختلف دنیا و حتی نواحی مختلف ایران می تواند قابل توجه باشد. لذا تفاوت فراوانـی جهـش بدست آمـده مـی توانـد قابـل تامـل باشـد. بررسـی هـای اپیدمیولوژیک و مطالعات بیـشتر پیرامـون پلـی مورفیـسم های ژنتیکی، تفاوتهای نـژادی ، اثـرات اقلیمـی و بررسـی اثرات اپی ژنتیکی در نابـاروری مـردان مـی توانـد دلایلـی جهت تفاوت قابل توجه میزان جهـش در نـواحی مختلـف ارائه نماید.

سپاسگزاری :

این مقاله بخـشی از طـرح پژوهـشی مـصوب معاونـت پژوهـشی دانـشگاه علـوم پزشـکی همـدان بـا شـماره ۱۶/۳۵۳۷۰۷۶/پ مورخ ۸۶/۳/۲۲ می باشد.

لازم می دانیم از زحمات همکار ارجمند جنـاب آقـای مهندس عباس مرادی که بررسی آماری مطالعـه حاضـر را انجـام داده انـد قـدردانی نمـائیم. همچنـین از همکـاری صمیمانه خانم فهیمه طالب زاده که در انجام آزمایشات ما را یاری نموده اند و سرکار خانم قربـانی و سـایر همکـاران ایشان در مرکز ناباروری بیمارسـتان فاطمیـه سپاسـگزاری می نمائیم.

منابع :

1. Krausz C, Forti G. Clinical aspects of male infertility. In : Mc Elveavey K (ed.). The genetic basis of male infertility. Berlin : Springer-Verlage 2000: 1-21.
2. Huynh T, Molard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. Hum Reprod Update 2002; 8 : 183 – 198.
3. Joffe M. Iinfertility and environmental pollutants. BMJ 2003;68 : 47-70.
4. Hargreave TB. Genetic basis of male fertility. Br Med Bull 2000;56 : 650-671.
5. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 1976;34:119-24.
6. Foote S, Vollrath D, Hilton A, Page DC. The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. Science 1992; 258:60-6.
7. Vollrath D, Foote S, Hilton A. The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. Science 1992;258:52-9.
8. Reijo R, Lee TY, Salo P. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat Genet 1995;10:383-93.
9. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Hum Mol Genet 1996;5:933-43.
10. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. N Engl J Med 1997;336:534-9.
11. Nagafuchi S, Namiki M, Nakahori Y, Kondoh N, Okuyama A, Nakagome Y. A minute deletion of the Y chromosome in men with azoospermia. J Urol 1993;150:1155-7.
12. 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 Mol Genet 1994; 3: 1965-7.
13. Najmabadi H, Huang V, Yen P. Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged sitebased mapping strategy. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:1347-52.
14. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. Lancet 1996;347:1290-3.
15. Foresta C, Ferlin A, Garolla A. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. Hum Reprod 1998;13:302-7.
16. 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.
17. Dadu R, Gupta NP, Kacheria K. yamicrodeletions , Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia, J Biosci 2003; 28(2):163-168.
18. Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. Int J Androl 2003 ; 26(2):70-5.
19. Kumtepe Y, Beyazyurek C, Cinar C, Ozbey I, Ozkan S, Cetinkaya K, et al. A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility. Reprod Biomed Online 2009; 18(4): 465-74.
20. Li HG, Ding XF, Zhao JX, Zuo MD, Xiong CL. [Y chromosome microdeletions of 664 Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2008;25(3):252-5. (Chinese)
21. Ristanovic M, Bunjevacki V, Tulic C, Novakovic I, Perovic V, Lukovic LJ, et al. Prevalence of Y chromosome microdeletions in infer-

tile men with severe oligozoospermia in Serbia. Genet Couns 2007;18(3):337-42.
22. Mohammed F, Al-Yatama F, Al-Bader M, Tayel SM, Gouda S, Naguib KK. Primary male infertility in Kuwait: a cytogenetic and molecular study of 289 infertile Kuwaiti patients. Andrologia 2007;39(3): 87-92.
23. Singh K, Raman R. Male infertility: Y-chromosome deletion and testicular etiology in cases of azoo-/oligospermia. Indian J Exp Biol 2005; 43 (11):1088-92.
24. Okutman-Emonts O, Pehlivan S, Tavmergen E, Tavmergen-Goker EN, Ozkinay F. Screening of Y chromosome microdeletion which contains AZF regions in 71 Turkish azoospermic men. Genet Couns 2004;15(2):199-205.
25. Aknin-Seifer IE, Lejeune H, Touraine RL, Levy R. Y chromosome microdeletion screening in infertile men in France: a survey of French practice based on 88 IVF centres. Hum Reprod 2004; 19(4):788-93.
26. Machatková M, Krebsová A, Smetanová I, Matěj-cková M, Vilímová S, Sobek A, et al. [Chromo-some Y microdeletions in Czech men with severe reproductive disorders]. Cas Lek Cesk 2003;142 (11):670-5. (Slovak)
27. Kerr NJ, Zhang J, Sin FY, Benny P, Sin IL. Frequency of microdeletions in the azoospermia factor region of the Y-chromosome of New Zealand men. N Z Med J 2000;113(1121):468-70.
28. Lin YM, Chen CW, Sun HS, Hsu CC, Chen JM, Lin SJ, et al. Y-chromosome microdeletion and its effect on reproductive decisions in taiwanese patients presenting with nonobstructive azoospermia. Urology 2000;56(6):1041-6.
29. Omrani MD, Samadzadae S, Bagheri M, Attar K. Y Chromosome Microdeletions in Idiopathic Infertile Men from West Azarbaijan. Urol J 2006; 3(1):38-43.
30. Mirfakhraie R, Mirzajani A, Salsabili N, Montazeri M, Fazli H, Hoshmand M, et al. [Frequency of micro deletion of chromosome Y in Iranian infertile men with azoospermia and oligospermia]. Genetic Novin 2008; 3(1): 69-78.(Persian)
31. Tzshach A, Thamm B, Imthurn B, Weber W, Alexander H, Glander HJ, et al. Absence of Yq microdeletions in infertile men. Arch Androl 2001:47(3):167-71
32. Plotton I, Ducros C, Pugeat M, Morel Y, Lejeune H. Transmissible microdeletion of the Y-chromosome encompassing two DAZ copies, four RBMY1 copies, and both PRY copies. Fertil Steril 2010 Dec;94(7):2770.e11-6
33. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. Hum Reprod 1998;13:3332-7.
34. Faddy MJ, Silber SJ, Gosden RG. Intracytoplasmic sperm injection and infertility. Nat Genet 2001;29: 131.
35. Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb- Bekkouche F, Krausz C, McElreavey K . Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. Lancet 2002; 360: 1222-1224.

Original Article

Y Chromosome Microdeletion Study in Idiopathic Infertile Men in Hamadan Fatemieh Hospital with Multiplex PCR Method

K. Etemadi, M.Sc. [*]; I. Amiri, Ph.D. [**]

Received: 2.5.2012 Accepted: 9.10.2012

Abstract

Introduction & Objective: Male factor is the major cause of infertility in 20% of cases (WHO). There are known etiologies for 70% of cases .However, 30% of infertility cases are of idiopathic origin. The Y chromosome and micro deletion of the long arm of the Y chromosome (Yq) in three regions (AZFa, AZFb ,AZFc) are associated with spermatogenic failure and is a major etiology for oligo and azoospermia in infertile men. With the advent of assisted reproductive technology and intracytoplasmic sperm injection, knowledge about the various factors leading to spermatogenic impairment is one of the most important aspects of scientific research. Therefore, this study was designed to identify the frequency of microdeletions of Yq in azoospermia and oligozoospermia males refered to Hamadan Fatemieh hospital.

Materials & Methods: 56 infertile males with non obstructive oligozoospermia and azoospermia and without any cytogenetic abnormality and 44 fertile men with normal cytogenetic were included in this case-control study. Semen analysis was done is each case to determine the spermatogenic statuse. Patients with normal karyotyping were analyzed for determination of microdeleton in Y chromosome in the AZFa, AZFb and AZFC regions with multiplex PCR method. The sequence tagged sites (STS) primers sY84, sY86 (AZFa); sY127, sY134 (AZFb); sY254, sY255 (AZFc) were used for each case.

Results: In this study the rate of mutation were 1.87% in oligo and azoospermia infertile men, 4% in azoosperm and 0% in oligospermia patients. Of 56 cases, 1 case showed deletion in AZF region ,1 deletion was in AZFa(sY84), 2 deletions in AZFb (sY127, sY134), and 1 deletion in AZFc (sY254). That had 1 deletion in AZF a (sY84), 2 deletions in AZFb (sY134, sY127) , and 1 deletion in AZFc(sY254). No microdeletions were seen in the SRY gene and no microdeletions were found in men in the control group.

Conclusion : Our results emphasize that Y chromosome microdeletion analysis should be carried out in all patients with idiopathic azoospermia or severe oligospermia who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. Moreover, it is highly suggested to perform further studies to discover the numerous etiologies of idiopathic male infertility.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2013; 19 (4):48-56)

Keywords: Azoospermia / Infertility / Chromosome Deletion / Oligozoospermia

---

* Academic Member, Department of Genetics & Molecular Medicine, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (katayoon_etemadi@yahoo.com)
** Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.