

بررسی ریزحذف‌های ناحیه AZF در مردان مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و یا اولیگواسپرمی شدید با کاریوتایپ نرمال

رقیه نوجوان^{۱*}، سید علی رحمانی^۱، عالییه قاسم‌زاده^۲

^۱گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، واحد تبریز، تبریز، ایران، ^۲گروه زنان و مامایی، مرکز آموزشی - درمانی الزهرا(س)، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۴/۰۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: ریز حذف‌های بازوی بلند کروموزوم Y حدوداً باعث بروز ۸-۶ درصد موارد آزواسپرمی غیرانسدادی و درصد کمتری از موارد اولیگواسپرمی شدید می‌شود. شناسایی این ریزحذف‌ها اهمیت بالایی در اتخاذ تصمیمات درمانی بیماران دارد. لذا هدف از این مطالعه، تعیین و بررسی ریزحذف‌های ناحیه AZF در مردان مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و یا اولیگواسپرمی شدید با کاریوتایپ نرمال بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی که طی سال‌های ۱۴۰۳-۱۴۰۲ به وسیله متخصصین به آزمایشگاه ژنتیک انجام شد، ۶۰ فرد مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و یا الیگواسپرمی شدید وارد مطالعه شدند، در ابتدا تحت آزمایشات سیتوژنتیکی و آنالیز کروموزومی قرار گرفتند تا سلامت کاریوتایپ شرکت کنندگان مورد بررسی قرار گیرد و افراد مبتلا به ناهنجاری‌های تعدادی و ساختاری کروموزومی در این مرحله حذف گردیدند. پس از حذف ۸ فرد دارای ناهنجاری کروموزومی، مطالعه با ۵۲ فرد باقی مانده دارای کاریوتایپ نرمال ادامه یافت. بدین ترتیب که وقوع ریزحذف‌های ناحیه AZF با استفاده از سه جفت پرایمر اختصاصی، مختص نشانگرهای SY۱۴ و SY۱۶ برای ناحیه AZFa، نشانگرهای SY۱۲۷ و SY۱۳۴ برای ناحیه AZFb و نشانگرهای SY۲۵۴ و SY۲۵۵ برای ناحیه AZFc، در قالب تکنیک Multiplex-PCR مورد استفاده قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده به وسیله آزمون‌های آماری توصیفی شامل فراوانی مطلق و نسبی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از بین ۳۰ فرد مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی و ۲۲ فرد مبتلا به الیگواسپرمی شدید، در ۶ فرد که ۴ نفر از آن‌ها مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی و ۲ نفر دیگر از موارد الیگواسپرمی شدید بودند (مجموعاً ۱۱/۵۳ درصد از کل موارد مورد مطالعه)، انواع ریزحذف‌های ناحیه AZF دیده شد. بدین ترتیب که در ۱/۹۲ درصد (۱ نفر) حذف کامل این ناحیه، در ۱/۹۲ درصد (۱ نفر) حذف ناحیه AZFb و در ۷/۶۹ درصد (۴ نفر) حذف در ناحیه AZFc مشاهده گشت. فرد حامل حذف ادغامی در مناطق سه گانه AZFa,b,c، شخص دارای حذف در منطقه AZFb و نیمی از حاملین حذف در ناحیه AZFc، مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و کلیه موارد الیگواسپرمی شدید حامل حذف نیز دارای حذف در ناحیه AZFc بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه بر بالا بودن نرخ حذف‌های ناحیه AZF در مردان نابارور دلالت داشته و بر لزوم انجام آزمایشات ژنتیکی مرتبط با این ناحیه در مبتلایان تأکید می‌نماید. این یافته‌ها بار دیگر بر اهمیت انجام آزمایش‌های ژنتیکی هدفمند در بیماران نابارور تأکید کرده و نشان می‌دهد این آزمایشات می‌تواند به تشخیص سریع‌تر، کاهش مداخلات غیرضروری و انتخاب درمان مؤثرتر کمک کند. هدف کلی این مطالعه تعیین شیوع و نوع ریز حذف‌های ناحیه AZF مستقر روی کروموزوم Y در مردان نابارور با کاریوتایپ نرمال بود.

واژه‌های کلیدی: آزواسپرمی، الیگواسپرمی، ریزحذف

* نویسنده مسئول: رقیه نوجوان، تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، واحد تبریز، گروه ژنتیک

Email: roghayyeh.nojavan@gmail.com

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

پانزده تا بیست درصد از زوجین در سراسر جهان از مشکلات مربوط به ناباروری رنج می‌برند (۱). ناباروری به عنوان عدم موفقیت در بارداری پس از یک سال نزدیکی بدون پیشگیری در زوجین تعریف می‌گردد (۲). بی‌تردید مواجه با چنین مشکلاتی زوجین را با درجات بالایی از استرس و تنش رو به رو کرده و از کیفیت زندگی آن‌ها، خصوصاً از منظر روحی به شدت می‌کاهد (۳). امروزه می‌دانیم تمامی موارد ناباروری از فاکتورهای زنانه منشا نمی‌گیرند. به طوری که در ۲۰ تا ۷۰ درصد این موارد فاکتوری مردانه در وقوع ناباروری دخیل می‌باشد (۱). از دیدگاه اتیولوژی می‌توان ابراز داشت که ناباروری در مردان، فنوتیپی مولتی فاکتوریال می‌باشد و عواملی همانند؛ چاقی، عفونت، واریکوسل، مصرف دخانیات، نقص در مجاری اسپرم بر، قرار گرفتن کیسه‌های بیضه در معرض دمای بالا، عدم تعادلات هورمونی، بیماری‌های زمینه‌ای همانند سلیاک، آنتی‌بادی‌های ضد اسپرمی، سرطان بیضه، مصرف برخی داروها، مسمومیت با فلزات سنگین و قرار گرفتن در مقابل تشعشعات یونیزان از اصلی‌ترین عوامل ایجاد کننده آن هستند (۴). تقریباً در ۱۵ درصد موارد نیز که عموماً به عنوان ناباروری‌های ایدیوپاتیک یا به عبارتی بدون علت از آن‌ها یاد می‌شود، اعتقاد بر دخالت عاملی ژنتیکی در ایجاد آن‌ها است (۵-۷). همین موضوعات اهمیت پرداختن به دلایل ایجاد کننده مشکلات در

ارتباط با ناباروری مردان را خصوصاً در راستای انتخاب به هنگام روش درمانی مناسب، بیش از پیش روشن می‌سازد.

شدیدترین نوع ناباروری مردانه آواسپرمی است که به عنوان فقدان اسپرم در مایع منی حتی متعاقب سانترویفیوژ مایع مذکور، که با آنالیز میکروسکوپی مشخص می‌گردد، می‌باشد. این فنوتیپ عامل ناباروری در ۱-۱۰ درصد مردان نابارور است (۸). موارد آواسپرمی به دو صورت انسدادی و غیرانسدادی دیده می‌شوند که نوع انسدادی به دلیل گرفتگی در مجاری مسیر انزال و نوع غیر انسدادی به دلیل نقص در پروسه اسپرماتوژنز (تولید اسپرم) رخ می‌دهد (۹). نوع غیر انسدادی در حدود ۶۰ درصد از موارد آواسپرمی دیده شده و از اصلی‌ترین دلایل ایجاد کننده ناباروری در مردان می‌باشد (۱۰). اولیگواسپرمی شدید نیز به عنوان حضور حداکثر پنج میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع منی متعاقب انزال تعریف می‌گردد (۱۱ و ۱۲). بدیهی است که در هر دو حالت آواسپرمی غیرانسدادی و الیگواسپرمی شدید، نقصی در پروسه اسپرماتوژنز مطرح می‌باشد. اسپرماتوژنز یا تولید و بلوغ سلول‌های اسپرم، پروسه تمایزی بسیار پیچیده سلولی می‌باشد به طوری که بررسی‌ها نشان می‌دهند، بیش از ۲۳۰۰ ژن در تنظیم تکامل و بلوغ سلول‌های اسپرم دخیلند که بیشتر آنها روی کروموزوم جنسی مردانه Y قرار دارند (۱۱). گفتنی است اسپرماتوژنز در واقع یک پروسه چند

مرحله‌ای بیولوژیکی است که با تقسیم میتوزی اسپرماتوگونی شروع شده و در نهایت متعاقب تقسیمات میوزی، منجر به تولید و تمایز سلول‌های هاپلوئیدی اسپرم و یا به عبارتی بهتر گامت‌های مردانه می‌گردد (۱۰). ریزحذف‌های کروموزوم Y در ناحیه AZF، که با عنوان فاکتور آزواسپرمی شناخته می‌شود، منجر به نقص در پروسه اسپرمانوژنز و فقدان یا کاهش اسپرم در مایع منی می‌گردد (۱۲). هر دو این حالات شدیداً هتروژن می‌باشند و عوامل ژنتیکی زیادی در ایجاد آنها دخیل هستند. یکی از عوامل ژنتیکی ایجاد کننده چنین فنوتیپ‌هایی با بالاترین میزان شیوع، سندروم کلاین فلتز می‌باشد. سندروم مذکور به وسیله حذف‌های ناحیه AZF به عنوان دومین عامل شایع ایجاد کننده ناباروری در مردان دنبال می‌شود (۱۳). برخی بررسی‌ها حذف این ناحیه را عامل ۳۰ درصد موارد ناباروری مردان معرفی کرده‌اند (۱۴). این ناحیه در بازوی بلند کروموزوم Y قرار داشته و به سه زیرناحیه AZFa، AZFb و AZFc تقسیم می‌شود. ژن‌های مستقر در این ناحیه، کد کننده پروتئین‌هایی هستند که در ساخت اسپرم دخیل‌اند. در حقیقت این ژن‌ها، کد کننده فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های اتصال به RNA و فاکتورهای بازآرایی کننده کروماتین هستند که همگی در تنظیم بیان ژن، متابولیسم RNA، بسته‌بندی، انتقالات سیتوپلاسمیک و ویرایش RNA نقش دارند (۱۵). حدود ۶-۸ درصد از موارد آزواسپرمی

غیرانسدادی و درصد کمتری از موارد اولیگواسپرمی شدید، در نتیجه حذف در ناحیه AZF روی می‌دهند (۱۶). حذف در این ناحیه عموماً به دلیل نوترکیبی همولوگ داخل کروموزومی بین توالی‌های تکراری پالیندرمیک رخ می‌دهد. این نوترکیبی احتمالاً منجر به بیان نامعمول ژنتیکی، نقص در تمایز سلول‌های لایه زاینده، افزایش نرخ آپتوز و توقف بلوغ اسپرم می‌گردد. حذف چندین ژن از ناحیه AZF که متعاقب حذف این قسمت پیش می‌آید، منجر به اختلال شدید تنظیم در مرحله ترجمه و پس‌اترجمه در طی اسپرمانوژنز می‌گردد (۱۷). البته پژوهش‌ها نشان می‌دهند در حدود ۲ درصد از جمعیت بارور مردان نیز حذف بسیار کوچکی از این ناحیه وجود دارد، اما این حذف‌ها عموماً مربوط به مناطق غیر کدکننده می‌باشند (۱۸). از مهم‌ترین ژن‌های این ناحیه که نقش به سزای آن‌ها در اسپرمانوژنز مسجل گشته است، می‌توان به ژن‌های *RBMY1A1*, *DAZ*, *DDX3Y*, *KDM5D* و *CDY* اشاره کرد (۱۹). الگوی فنوتیپی حذف‌ها، بازه‌ای را از فقدان کامل اسپرمانوژنز در اثر حذف در نواحی *AZFb/AZFc* و نیز طیفی از الیگواسپرمی شدید تا وقوع آزواسپرمی در *AZFb* را گزارش کرده است (۲۰-۲۲).^۱ بر همین اساس طبق دستورالعمل مشترک انجمن اورولوژی آمریکا و انجمن پزشکی تولید مثل آمریکا^(۱) لازم است نتیجه آزمایشات ژنتیکی

1-AUA/ASRM Guidelines

مبتنی بر نشانگرهای STS در ناحیه AZF در مبتلایان به آواسپرمی غیرانسدادی و الیگواسپرمی شدید، مبنای تشخیص علت ناباروری قرار گیرد (۲۳). پژوهش‌های اخیر انجام یافته در اقصی نقاط جهان نیز نشان داده‌اند با وجود این که حذف در ناحیه AZFc، شایع‌ترین نوع حذف در این ناحیه است، امکان دستیابی به اسپرم و طی مسیرهای کمک درمانی نیز در این افراد نسبت به سایر افراد واجد حذف بالاتر می‌باشد (۲۴-۲۲).

هر چند بررسی‌ها در ایران درباره ریزحذف‌های AZF انجام شده است، اما با توجه به تنوع ژنتیکی و قومیتی در کشور نمی‌توان نتایج یک منطقه را به کل جمعیت تعمیم داد. شمال غرب ایران از نظر ترکیب قومیتی و الگوهای ازدواج‌های فAMILI تفاوت‌های معنی‌داری با سایر نواحی دارد که می‌تواند بر توزیع ریزحذف‌های کروموزوم Y اثرگذار باشد. بنابراین انجام این مطالعه در این منطقه نه تنها داده‌های بومی ارزشمندی را برای کاربرد بالینی و مشاوره ژنتیکی فراهم می‌سازد، بلکه در کنار سایر پژوهش‌های داخلی به غنای بانک اطلاعات ملی و تدوین راهبردهای دقیق‌تر در تشخیص و درمان ناباروری مردان کمک خواهد کرد (۲۷-۲۵).

نظر به این که ریزحذف‌های این ناحیه علاوه بر ایجاد ناباروری، در صورت استفاده از روش‌های کمک باروری نیز قابل انتقال به اولاد ذکور نسل بعدی هستند، تشخیص آنها می‌تواند کمک شایانی به خانواده‌های درگیر هم در سطح تشخیص عامل ایجاد

کننده آواسپرمی غیرانسدادی و یا اولیگواسپرمی شدید و هم در سطح درمان با بهره‌گیری از روش‌های کمک باروری نماید. لذا هدف از این مطالعه، تعیین و بررسی ریزحذف‌های ناحیه AZF در مردان مبتلا به آواسپرمی غیرانسدادی و یا اولیگواسپرمی شدید با کاربوتایپ نرمال بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی که طی سال‌های ۱۴۰۲-۱۴۰۳ انجام شد، ۶۰ نفر از مردان مبتلا به آواسپرمی غیرانسدادی و یا اولیگواسپرمی شدید به وسیله متخصصین ارولوزی و یا زنان - زایمان و نازایی جهت انجام آزمایشات ژنتیکی به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر رحمانی تبریز ارجاع داده شده بودند، شرکت داده شدند. قابل ذکر است که از تمامی شرکت‌کنندگان در این مطالعه، پیش از انجام هرگونه اقدام آزمایشگاهی، رضایت نامه کتبی دریافت شد تا اطمینان حاصل شود که مشارکت داوطلبان در مطالعه با آگاهی کامل از اهداف و روش‌های تحقیق و نیز با رضایت کامل انجام شده است.

معیار اولیه ورود به این مطالعه، داشتن آزمایش شمارش اسپرم با تعداد صفر تا حداکثر پنج میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع منی (فنوتیپ‌های آواسپرمی تا الیگواسپرمی شدید) بود که توسط شمارش اسپرم از مایع منی تحت میکروسکوپ نوری انجام گرفت و افرادی که شمارش اسپرم آنها بیش از این حد بود یا تمایلی به مشارکت در پژوهش نداشتند،

از مطالعه خارج شدند. علاوه بر این، معیار ثانویه ورود به مطالعه نیز داشتن کاریوتایپ طبیعی در بررسی سیتوژنتیکی بود تا از عدم دخالت ناهنجاری‌های عددی یا ساختاری کروموزومی در بروز ناباروری اطمینان حاصل شود. بدین منظور آزمایش کاریوتایپ با روش GTG-banding در حداقل ۲۰ متافاز انجام شد و افراد دارای هرگونه ناهنجاری کروموزومی از مطالعه کنار گذاشته شدند. همچنین افرادی با سابقه جراحی‌های عمده تناسلی، عفونت‌های شدید دستگاه تناسلی یا مصرف داروهای مؤثر بر اسپرماتوژنز نیز در صورت شناسایی، واجد شرایط ورود نبوده و از مطالعه حذف شدند.

برای انجام آزمایش کاریوتایپینگ، از تمامی این ۶۰ فرد مبتلا به آواسپرمی غیر انسدادی و یا الیگواسپرمی شدید، در قدم اول ۳ میلی‌لیتر خون هپارینه اخذ شد. نمونه مذکور تا زمان کشت کروموزومی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت حداکثر یک هفته نگهداری شد و پس از طی مراحل کشت، هاروست و تهیه لام خون محیطی، افراد از نظر سیتوژنتیکی مورد آنالیز کروموزومی قرار گرفتند تا مبتلایان به هرگونه آنومالی کروموزومی اعم از ناهنجاری‌های تعدادی و ساختاری کروموزومی مشخص و حذف شوند. در مرحله فوق، ۸ نفر از شرکت کنندگان به دلیل ابتلا به ناهنجاری‌های کروموزومی از مطالعه خارج شدند و سایر مراحل مطالعه، با ۵۲ فرد ادامه یافت. شایان ذکر است در این افراد بروز سندروم کلاین فلتز که نوعی ناهنجاری

تعدادی کروموزوم‌های جنسی می‌باشد، در راس انواع آنومالی‌های کروموزومی گزارش شده، قرار گرفت. به عنوان کنترل‌های مثبت و منفی در آزمایشات مولکولی نیز به ترتیب از خون یک مرد دارای کاریوتایپ نرمال صاحب فرزند بدون هیچ‌گونه سابقه ناباروری و یک زن بارور نرمال بدون سوابق سقط و ناباروری استفاده شد. گفتنی است بازه سنی این ۵۲ نفر، ۲۴-۴۶ سال با میانگین ۳۲/۴۶ سال بود.

برای انجام آزمایشات ژنتیک مولکولی جهت تشخیص ریزحذف‌های کروموزوم ۷، در ابتدا ۳ میلی‌لیتر خون EDTA دار از بیماران گرفته شده و نمونه مذکور تا زمان طی مراحل استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در نهایت به مدت یک هفته نگهداری شد. در اینجا باید اشاره کرد چون ماده ضد انعقاد هپارین با مراحل آزمایش PCR و ماده ضد انعقاد EDTA با مراحل کشت کروموزومی تداخل ایجاد می‌کنند، این دو ماده قابلیت استفاده به صورت جایگزین هم را نداشته و لاجرم از شرکت کنندگان دارای کاریوتایپ نرمال، دو بار خون‌گیری با دو ماده ضد انعقاد انجام شد. متعاقب خون‌گیری، با استفاده از کیت ستونی استخراج (ROJE, IRAN) DNA، استخراج DNA صورت گرفت و DNA استخراج شده جهت طی مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به فریزر ۲۰- درجه انتقال داده شد.

برای تشخیص ریزحذف‌های کروموزوم ۷ از توالی‌های STS که یکسری توالی‌های غیرپلی مورف و در عین حال اختصاصی هستند، استفاده شد. نام

توالی‌های STS و منطقه AZF ای که به آن متعلق هستند، در جدول ۱ آورده شده‌اند. همچنین یک نشان‌گر نیز برای منطقه SRY و به عنوان کنترل داخلی، طبق راهنمای استاندارد آکادمی آندرولوژی/شبکه کیفیت ژنتیک مولکولی اروپا (EAA/EMQN)^(۱) در نظر گرفته شد (۱۳) که انتظار می‌رود در تمامی نمونه‌ها به جز کنترل منفی حضور داشته باشد، چرا که حضور این ژن تعیین کننده جنسیت مذکر بوده و اساساً حذف آن منجر به ایجاد فنوتیپ مؤنث می‌گردد (۲۲).

برای تکثیر مناطق STS، به منظور سهولت در انجام آزمایش و استفاده بهینه از مواد مصرفی، از تکنیک Multiplex PCR استفاده شد. در تکنیک مذکور، که یکی از انواع پرکاربرد تکنیک PCR محسوب می‌شود، چندین واکنش تکثیر با استفاده از چندین جفت پرایمر صرفاً در یک ویال PCR به طور هم‌زمان انجام می‌گیرد. واضح و مبرهن است که چنین تکنیکی علاوه بر صرفه‌جویی در زمان، باعث مصرف مقدار کمتری از مواد مصرفی می‌گردد. به منظور انجام واکنش‌های PCR به ازای هر نمونه DNA استخراجی، از مسترمیکس (BIOSYSTEM, ENGLAND) به میزان ۱۸ میکرولیتر، از هر پرایمر رفت و برگشت متعلق به هر یک از STS‌ها (Germany Metabion) به میزان ۱ میکرولیتر، از نمونه DNA استخراجی به میزان ۱ میکرولیتر و از آب مقطر تزریقی (آب مقطر دو بار تقطیر) به میزان ۱۷ میکرولیتر (مجموعاً ۵۰ میکرولیتر) استفاده شد. واکنش PCR توسط دستگاه ترمال

سایکلر (PEQLAB(ENGLAND) انجام گرفت. شایان ذکر است بر طبق راهنمای استاندارد EAA/EMQN، برای هر ناحیه به منظور اطمینان از صحت آزمایش و تشخیص حذف‌های قسمی، ۲ عدد STS مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی پرایمرها در جدول ۲ و برنامه واکنش PCR در جدول ۳ ذکر شده است. ^۲ در نهایت محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۲ درصد (MERK, GERMANY) و با حضور لدر ۱۰۰ (BIOSYSTEM, ENGLAND) الکتروفورز گردید. سپس تصویر ژل به وسیله دستگاه ژل داکيومنت (EPPENDORF, GERMANY) آشکارسازی و با در نظر گرفتن حضور و عدم حضور باندهای مربوط به هر STS در نمونه‌های مورد مطالعه و نیز کنترل‌های مثبت و منفی آنالیز شد. شکل ۱ به ترتیب از؛ راست به چپ، نشان دهنده لدر، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه حاوی حذف در AZFb، نمونه حاوی حذف در AZFc و نمونه حامی حذف در AZFa,b,c می‌باشد.

گفتنی است در صورت مشاهده مغایرت در هر یک از نتایج مورد انتظار از نمونه‌های کنترل، آزمایش تکرار گشت چرا که مشاهده هر گونه حذف در کنترل مثبت دلالت بر عدم انجام واکنش PCR و رویت هر گونه باند در کنترل منفی دلالت بر آلودگی نمونه‌های PCR داشت.

1-European Academy of Andrology/ European Molecular Genetics Quality Network(EAA/EMQN)

جدول ۱: نام STS های مورد مطالعه و مناطق مربوط به هریک

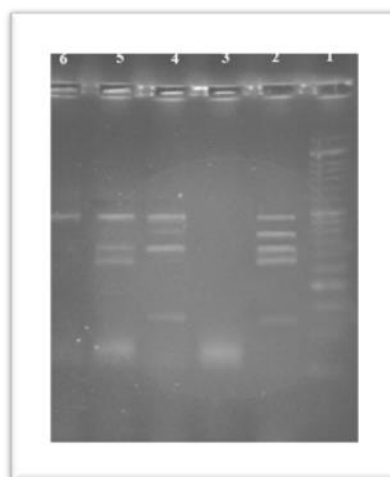
شماره	منطقه/ژن	نام STS
۱	AZFa	sY84
۲	AZFa	sY86
۳	AZFb	sY127
۴	AZFb	sY134
۵	AZFc	sY254
۶	AZFc	sY255
۷	SRY	sY14

جدول ۲: مشخصات پرایمرها

شماره	نام STS	توالی پرایمر رفت	توالی پرایمر برگشت	طول قطعه حاصله
۱	sY84	AGAAGGGTCCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC	۳۲۸
۲	sY86	GTGACACACAGACTATGCTTC	ACACACAGAGGGACAACCCT	۳۲۰
۳	sY127	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	۲۷۴
۴	sY134	GTCTGCCTCACCATAAAACG	ACCACTGCCAAAACCTTTCAA	۳۰۳
۵	sY254	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	۳۸۰
۶	sY255	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	CTCGTCATGTGCAGCCAC	۱۲۴
۷	sY14	GAATATTCCTCCGCTCTCCGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	۴۷۰

جدول ۳: برنامه Multiplex PCR مورد استفاده در آزمایشات

شماره	مرحله	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
۱	واسرشت شدن اولیه	۹۵	۱۲۰	۱
۲	واسرشت شدن	۹۴	۳۰	
۳	اتصال	۵۶	۳۰	۳۵
۴	گسترش	۷۲	۴۵	
۵	گسترش نهایی	۷۲	۱۲۰	۱



شکل ۱: هر یک از چاهک ها به ترتیب نشان دهنده: ۱. لدر 50bp. ۲. کنترل مثبت، ۳. کنترل منفی، ۴. نمونه دارای حذف در ناحیه AZFb، ۵. نمونه دارای حذف در AZFc و ۶. نمونه دارای حذف در نواحی سه گانه AZFa, AZFb, AZFc

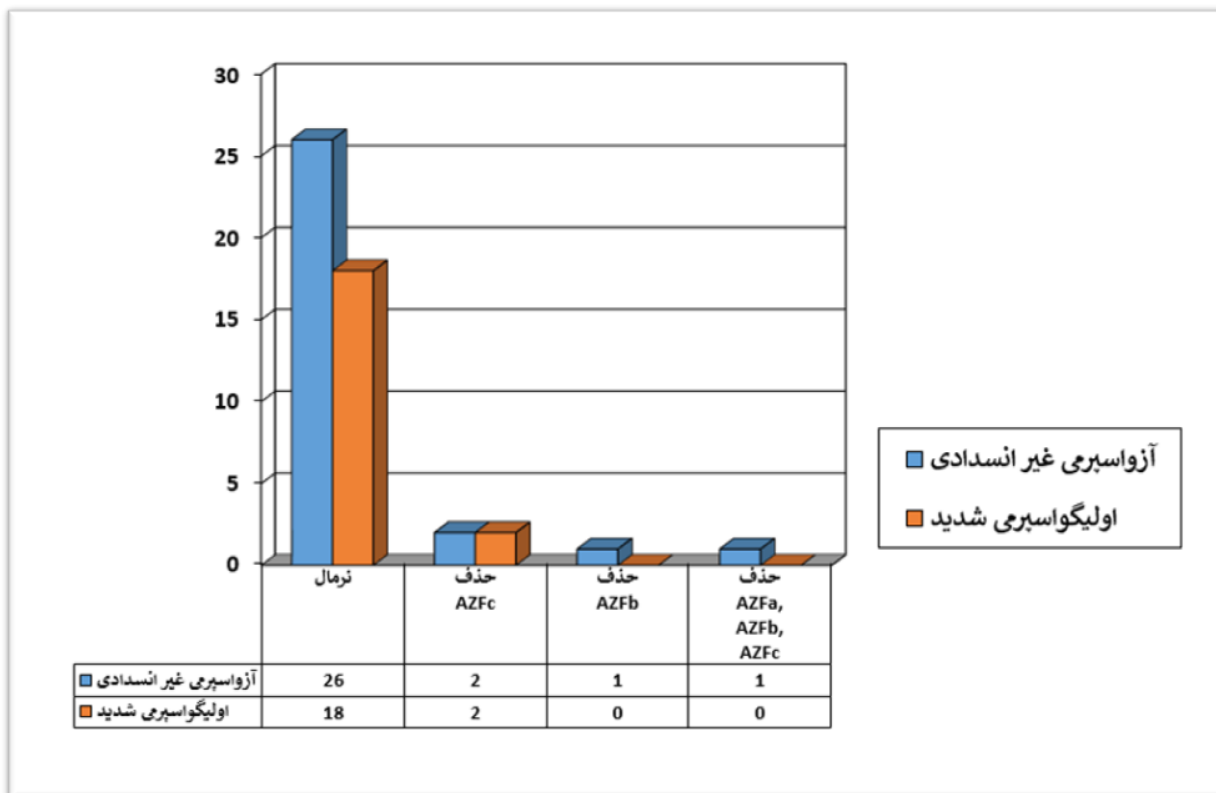
یافته‌ها

از بین ۵۲ مرد مورد مطالعه، ۳۰ فرد به آزواسپرمی غیرانسدادی و ۲۲ فرد به اولیگواسپرمی شدید مبتلا بودند که همگی به وسیله متخصصین ارولوژی و متخصصین زنان - زایمان و ناباروری به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر رحمانی تبریز ارجاع داده شده و از نظر ریز حذف‌های ناحیه AZF مستقر بر روی کروموزوم ۷ مورد بررسی قرار گرفتند. از این بین، ۶ نفر مبتلا به ریز حذف در نواحی متفاوت ناحیه AZF بودند. به این ترتیب که ۱ نفر دارای ریز حذف در هر سه ناحیه $AZF_{a,b,c}$ به صورت ادغامی، ۱ فرد دارای حذف در ناحیه AZF_b و ۴ نفر دارای حذف در ناحیه AZF_c بودند. لازم به ذکر است جهت اطمینان از صحت نتایج حاصله، مراحل آزمایش PCR در افراد دارای حذف تکرار گشت که در تمامی موارد، نتیجه گرفته شده، تأیید گردید. همچنین باید خاطر نشان ساخت در فرد دارای حذف در هر سه ناحیه از نواحی سه گانه، حضور باند مربوط به ژن SRY به عنوان کنترل مثبت داخلی، نشان دهنده صحت آزمایش بود. نتایج گرفته شده از بررسی مناطق حذفی در نمودار ۱ آورده شده است.

بر اساس نتایج گرفته شده، در ۱۱/۵۳ درصد از افراد مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و یا

اولیگواسپرمی شدید، انواع حذف‌های منطقه AZF دیده شد. به طوری که در ۱/۹۲ درصد حذف کامل این ناحیه (عدم مشاهده باند در SY_{86} ، SY_{84} ، SY_{134} ، SY_{127} ، SY_{255} و SY_{254}) در ۱/۹۲ درصد حذف ناحیه AZF_b (عدم مشاهده باند در SY_{127} و SY_{134}) و در ۷/۶۹ درصد حذف در ناحیه AZF_c (عدم مشاهده باند در SY_{254} و SY_{255}) مشاهده شد. نرخ شیوع مناطق حذفی نیز به تفکیک فنوتیپ در جدول ۴ آورده شده است.

از داده‌های جدول ۴ می‌توان دریافت که در ۱۳/۳۳ درصد موارد آزواسپرمی و ۹/۰۹ درصد موارد اولیگواسپرمی شدید حذف‌های نواحی AZF وجود داشت. از این بین حذف‌های ناحیه AZF_c با ۶/۶۶ درصد بیشترین سهم را در این مطالعه به خود اختصاص دادند. در ۱۶/۶۶ درصد نیز حذف در ناحیه AZF_b تشخیص داده شد و در نهایت ۱۶/۶۶ درصد موارد نیز حذف به صورت توأما در نواحی $AZF_{a,b,c}$ دیده شد. این در حالی است که هیچ یک از افراد حذف تکی در ناحیه AZF_a و یا حذف‌های توأما در نواحی $AZF_{a,b}$ ، $AZF_{a,c}$ و $AZF_{b,c}$ را نشان ندادند.



نمودار ۱: نتایج بررسی ریزحذف‌های منطقه AZF

جدول ۴: فراوانی مطلق و نسبی ریزحذف‌ها در بیماران براساس فنوتیپ

فنوتیپ بیماران	تعداد کل حذف (ها/عدد)	حذف AZFa (درصد/تعداد)	حذف AZFb (درصد/تعداد)	حذف AZFc (درصد/تعداد)	حذف AZFa,b (درصد/تعداد)	حذف AZFa,c (درصد/تعداد)	حذف AZFb,c (درصد/تعداد)	حذف AZFa,b,c (درصد/تعداد)
آزواسپرمی غیرانسدادی	۴	۰	۱ (۲۵)	۲ (۵۰)	۰	۰	۰	۱ (۲۵)
اولیگواسپرمی شدید	۲	۰	۰	۲ (۱۰۰)	۰	۰	۰	۰

بحث

نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی حذف مربوط به ناحیه AZFc بود و حذف سایر نواحی با شیوع کمتری مشاهده گردید. یافته‌های این مطالعه، با نتایج پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد. چرا که در بسیاری از بررسی‌های مشابه نیز حذف ناحیه AZFc به عنوان شایع‌ترین ناحیه حذف شده در بیماران نابارور گزارش شده است (۲۵). علاوه بر این، فراوانی

حذف‌ها در بیماران آزواسپرم در بیماران اولیگواسپرمی بیشتر بود که این موضوع می‌تواند بیانگر ارتباط قوی بین حذف‌های ژنی و شدت اختلال در پروسه اسپرماتوژنز باشد. لذا هدف از این مطالعه، تعیین و بررسی ریزحذف‌های ناحیه AZF در مردان مبتلا به آزواسپرمی غیرانسدادی و یا اولیگواسپرمی شدید با کاریوتایپ نرمال بود.

گرفتند، در حالی که در مطالعه حاضر، برای هر ناحیه دو STS بررسی شد. آمار گزارش شده از سرتاسر جهان نیز ۱۹/۶-۲/۲ درصد می باشد که نتیجه گرفته شده در مطالعه حاضر، در بازه فوق قرار گرفت (۳۰). تفاوت در نتایج بازه عددی دیده شده نیز احتمالاً از دقت‌های متفاوت در تشخیص که نشأت گرفته از تعداد STS مورد مطالعه می باشد، معیارهای ورود به مطالعه متفاوت و اختلاف در اندازه نمونه‌های مورد مطالعه نشأت گرفته است. به طوری که در برخی بررسی‌ها صرفاً یک STS به ازای هر منطقه مورد بررسی قرار گرفته بود (۲۹) در حالی که در برخی دیگر به ازای هر منطقه بیش از دو STS بررسی شده است (۳۱). در برخی پژوهش‌ها معیار ورود به مطالعه، نه شمارش اسپرم بلکه ابتلا به سایر فنوتیپ‌های ناباروری و یا نازایی می‌باشد (۱۵). اندازه نمونه‌ها نیز از ۳۰ نفر تا بیش از ۴۰۰۰ نفر متغیر بودند (۳۲ و ۳۳) که خود این موضوع احتمال دخالت شانس در آمارهای به دست آمده را مطرح می‌سازد. چرا که اندازه نمونه مورد مطالعه و احتمال دخالت فاکتور شانس در نتایج حاصله دارای رابطه معکوس هستند. بین مناطق حذفی نیز بیشترین تعداد حذف در عموم پژوهش‌ها در ناحیه AZFc گزارش شده است (۳۴). در مطالعه حاضر نیز حذف ناحیه مذکور با نرخ بروز ۶۶/۶۶ درصد در بین تمامی حذف‌های نواحی سه گانه، رتبه اول را به خود اختصاص داد. این ناحیه در قسمت دیستال ناحیه AZF قرار گرفته و صرفاً حاوی ژن‌های تکمیل کننده پروسه

فاکتورهای ژنتیک جزو عوامل اصلی ایجاد کننده ناباروری مردان هستند. این فاکتورها عموماً شامل ناهنجاری‌های کروموزومی، واریانت‌های تعدادی کپی‌های ژنی، جهش‌های تک ژنی و ریزحذف‌های کروموزوم Y می‌باشند که به ترتیب ناهنجاری‌های کروموزومی و ریزحذف‌های کروموزومی شایع‌ترین آنها هستند (۲۶).

در این مطالعه نیز شیوع ریزحذف‌های کروموزوم Y در مردان مبتلا به آواسپرمی غیرانسدادی و اولیگواسپرمی شدید دارای کاریوتایپ نرمال که به وسیله متخصصین اورولوژی و زنان - زایمان و نازایی به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر رحمانی تبریز ارجاع داده شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، در ۱۱/۵۳ درصد موارد ارجاعی ریزحذف‌های کروموزوم Y دیده شد. این میزان در مقایسه با سایر پژوهش‌های انجام شده در ایران و جهان قابل توجه است. برای مثال، در مطالعه‌ای بزرگ در سطح ملی ایران شیوع ریزحذف‌ها حدود ۵ درصد گزارش شد (۲۷)، در حالی که متاآنالیز منتشر شده در سال ۲۰۱۴ میانگین شیوع را حدود ۱۲ درصد برآورد کرده است (۲۸). در مطالعه‌ای بر روی جمعیت بیماران نابارور مشهد، نرخ ریزحذف‌های کروموزوم Y حدود ۱۳/۴ درصد گزارش شده است که بیشترین فراوانی مربوط به ناحیه AZFc بوده است (۲۹) البته در مطالعه مشهد، تنها ۳ جفت پرایمر برای سه ناحیه مذکور مورد استفاده قرار

اسپرماتوژن می‌باشد. این ناحیه حاوی ۱۲ ژن و عناصر رونویسی می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها در پروسه اسپرماتوژن، ژن DAZ است (۱۰). حذف در این ناحیه می‌تواند انواع فنوتیپ‌ها، از آواسپرمی گرفته تا اولیگواسپرمی را ایجاد کند. از این رو این حذف چه از طریق باروری طبیعی و چه از طریق روش‌های کمک باروری، قابل انتقال به نسل‌های بعدی نیز می‌باشد. افراد دارای این حذف در بیشتر موارد نه از ناباروری بلکه از کم باروری رنج می‌برند (۳۵). از این رو به نظر می‌رسد پروسه‌های درمانی در این افراد، با موفقیت بیشتری همراه هستند.

از دیگر نواحی حذفی مشاهده شده در مطالعه حاضر، حذف ناحیه AZFb با فرکانس ۱۶/۶۶ درصد می‌باشد. این ناحیه حاوی ژن‌های مورد نیاز برای شروع پروسه اسپرماتوژن می‌باشد (۱۰). ناحیه مذکور در میانه منطقه AZF قرار گرفته و منطقه کوچکی از آن با AZFc حالت همپوشانی دارد (۲۸). این ناحیه نیز حاوی ۱۳۲ ژن می‌باشد که از این میان ۱۵ ژن کد کننده پروتئین، ۱۷ ژن کد کننده RNAهای غیر کد کننده و ۱۰۰ ژن کاذب می‌باشند. برخی از این ژن‌های کد کننده به طور اخص در بیضه‌ها بیان می‌شوند (۳۰). نرخ حذف در این ناحیه کمتر از AZFc گزارش شده است. این حذف، باعث توقف اسپرماتوژن در مرحله اسپرماتوسیت اولیه می‌گردد. از این رو فرد حامل حذف فاقد هرگونه سلول اسپرماتوزوآ می‌باشد. به همین دلیل حذف در این ناحیه تنها از روش‌های کمک باروری قابل انتقال به

نسل بعدی هستند و به دلیل فقدان اسپرماتوزوآ، افراد عموماً از آواسپرمی غیرانسدادی رنج می‌برند. لازم به ذکر است در مطالعه حاضر حذف ناحیه AZFa از نواحی سه گانه، صرفاً به صورت حذف کامل ناحیه AZF و نه به صورت تکی مشاهده گردید. حذف کامل منطقه AZF نیز ۱۶/۶۶ درصد حذف‌ها را به خود اختصاص داد. به طور کلی این ناحیه در قسمت پروگزیمال ناحیه AZF واقع شده و برخلاف دو منطقه دیگر، هر یک از ژن‌های آن صرفاً دارای یک کپی هستند. حذف این ناحیه کمیاب بوده و منجر به بلوک شدن ساخت و بلوغ اسپرماتوزوآ در لوله‌های سمینال می‌گردد و در نتیجه افراد دارای حذف عموماً فاقد هر گونه سلول اسپرماتوزوآ هستند. پس انتظار می‌رود این افراد نیز عمدتاً فنوتیپ آواسپرمی غیرانسدادی را نشان دهند. از این رو حذف در این ناحیه نیز مگر به کمک روش‌های کمک باروری قابل انتقال به نسل بعد نمی‌باشد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به اندازه نمونه کوچک و انتخاب بیماران تنها از یک مرکز تشخیصی اشاره کرد که می‌تواند موجب کاهش تعمیم‌پذیری نتایج به کل جمعیت شمال غرب شود. همچنین، استفاده از تعداد کمی از مارکرهای STS، احتمال عدم شناسایی ریزحذف‌های کوچک تر را مطرح می‌سازد.

از منابع احتمالی تورش نیز می‌توان به انتخاب بیماران صرفاً بر اساس ارجاع و همچنین احتمال خطاهای تکنیکی در انجام PCR اشاره نمود.

NGS برای شناسایی حذف‌های کوچک‌تر و غیر قابل تشخیص به وسیله مارکرهای STS پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که حذف‌های ناحیه AZF واقع بر روی کروموزوم جنسی Y، با شدت اختلال پروسه اسپرماتوژنز در مردان نابارور ارتباط مستقیم دارد. به طوری که فراوانی این حذف‌ها در بیماران آزواسپرمی نسبت به بیماران اولیگواسپرمی بیشتر است. این موضوع بیانگر نقش کلیدی این اختلالات در شدت ناباروری مردان می‌باشد. از این رو بررسی این ریزحذف‌ها می‌تواند به عنوان ابزاری تشخیصی و پیش‌بینی کننده در ارزیابی ناباروری و برنامه‌ریزی درمان‌های مناسب مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همراهی کلیه متخصصین ارولوژی، زنان - زایمان و نازایی که با ارجاع بیماران به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی رحمانی ما را در جمع‌آوری داده‌ها یاری کردند و قطعاً بدون کمک ایشان دست یابی به نمونه‌های مورد اطمینان مقدور نبود تشکر می‌کنیم، هم‌چنین بر خود لازم می‌دانیم از مدیریت محترم آزمایشگاه، سید علی رحمانی و کارکنان خبره و دقیق آزمایشگاه که در تمامی مراحل انجام این پروژه از نمونه‌گیری گرفته تا انجام آزمایشات قدردانی کرده، چرا که عدم حضور این

برای مقابله با این محدودیت‌ها و کاهش احتمال تورش، در این مطالعه از دو مارکر مستقل برای هر ناحیه AZF استفاده شد. نیز کلیه تست‌های مشکوک به صورت تکراری انجام گردید و کنترل‌های مثبت و منفی در تمامی مراحل PCR لحاظ شدند. با این وجود، توصیه می‌شود در پژوهش‌های آینده استفاده از مارکرهای بیشتر و حجم نمونه بزرگ‌تر استفاده گردد تا اعتبار و قابلیت تعمیم نتایج افزایش یابد.

به نظر می‌رسد بررسی ریز حذف‌های ناحیه AZF خصوصاً متعاقب اطمینان از نرمال بودن کاریوتایپ، علاوه بر روشن ساختن دلیل ناباروری و مشخص نمودن مسیر کمک باروری پیش رو و کمک به کاهش هزینه‌های درمانی، احتمال انتقال و یا عدم انتقال مشکل مذکور به نسل‌های آتی را نیز مشخص می‌سازد و از این طریق می‌توان با انتخاب روش‌های کمک باروری و آزمایشات تکمیلی، از این انتقال ناخواسته جلوگیری کرد. قطعاً طی چنین مسیری می‌تواند علاوه بر صرفه جویی در زمان درمان، با کسب اطمینان زوجین از مسیر پیش رو و با کمتر کردن فشارات روحی و استرس‌هایی که زوجین با آنها مواجه هستند، کیفیت زندگی زوجین را نیز بهبود می‌بخشد، لذا انجام پژوهش‌های مشابه در ناحیه شمال غرب ایران با نمونه آماری بزرگ‌تر برای افزایش قدرت تعمیم‌پذیری نتایج حاصله از بررسی‌های انجام یافته، بررسی تک ژن‌های دخیل در پروسه اسپرماتوژنز در افراد فاقد حذف در ناحیه AZF، استفاده از روش‌های مولکولی پیشرفته‌تر مانند

آزمایشگاهی. نویسنده سوم: مشاوره بالینی، ارجاع
بیماران به آزمایشگاه و ارزیابی داده‌های بالینی.

بزرگواران قطعاً می‌توانست از صحت و دقت
آزمایشات انجامی شدیداً بکاهد. همچنین با علم بر
شرایط خاص شرکت کنندگان در این مطالعه و با
دانستن فشارات روحی احتمالی این عزیزان از
همکاری داوطلبانه آنها کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه
تعارض منفعی در خصوص این مقاله وجود
ندارد.

حمایت مالی

این مطالعه هیچ‌گونه حمایت مالی از هیچ
موسسه و یا سازمانی دریافت نکرده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی دانشگاه
علوم پزشکی تبریز با کد اخلاق
IR.TBZMED.REC.1397.367 می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان این مقاله در تمامی مراحل
همکاری و مشارکت داشته‌اند. به طور مشخص؛
نویسنده اول: جمع‌آوری و تحلیل داده‌ها، طراحی
مطالعه و نگارش پیش نویس مقاله. نویسنده دوم:
راهنمایی علمی و تخصصی، نظارت بر طراحی و
اجرای آزمایش‌ها و فراهم نمودن امکانات

REFERENCES

- 1.Yuen W, Golin AP, Flannigan R, Schlegel PN. Histology and sperm retrieval among men with Y chromosome microdeletions. *Transl Androl Urol* 2021; 10(3): 1442–56.
- 2.Khabour OF, Fararjeh AS, Alfaouri AA. Genetic screening for AZF Y chromosome microdeletions in Jordanian azoospermic infertile men. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2014; 5(1): 47–50.
- 3.Emirdar V, Acet F. The effect of azoospermia factor microdeletions on intracytoplasmic sperm injection results in azoospermia patients. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 2023; 39(3): 672.
- 5.
- 4.Ricchetto L, Vieira TP, Viguetti-Campos NL, Mazzola TN, Guaragna MS, Fabbri-Scallet H, et al. Clinical and laboratory differences between chromosomal and undefined causes of non-obstructive azoospermia: A retrospective study. *Sao Paulo Med J* 2022; 141(4): e2022281.
- 5.Kalantari H, Sabbaghian M, Vogiatzi P, Rambhatla A, Agarwal A, Colpi GM, et al. Bridging the Gap between AZF Microdeletions and Karyotype: Twelve Years' Experience of an Infertility Center. *World J Mens Health* 2023; 41(3): 659–70.
- 6.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.
- 7.Behjati F, Mousavi SF, Abdi A, Vand Rajab por F, Mehrabi Sisakht J, Dokhanchi A, et al. Cytogenetic Investigation of patients with infertility, recurrent abortions, and unsuccessful assisted reproductive technologies (arts) referred to sarem women's hospital in tehran between 2006 and 2017. *Sarem Journal of Medical Research* 2020; 4(4): 187–93.
- 8.Kherraf ZE, Cazin C, Bouker A, Fourati Ben Mustapha S, Hennebicq S, Septier A, et al. Whole-exome sequencing improves the diagnosis and care of men with non-obstructive azoospermia. *Am J Hum Genet* 2022; 109(3): 508–17.
- 9.Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K. Human male infertility and its genetic causes. *Reprod Med Biol* 2017; 16(2): 81–8.
- 10.Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2018; 16(1): 14.
- 11.Xie C, Chen X, Liu Y, Wu Z, Ping P. Multicenter study of genetic abnormalities associated with severe oligospermia and non-obstructive azoospermia. *J Int Med Res* 2018; 46(1): 107–14.
- 12.Kamiński P, Baszyński J, Jerzak I, Kavanagh BP, Nowacka-Chiari E, Polanin M, et al. External and genetic conditions determining male infertility. *Int J Mol Sci* 2020; 21(15): 5274.
- 13.Krausz C, Navarro-Costa P, Wilke M, Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: State of the art 2023. *Andrology* 2024; 12(3): 487–504.
- 14.Li LX, Dai HY, Ding XP, Zhang YP, Zhang XH, Ren HY, et al. Investigation of AZF microdeletions in patients with Klinefelter syndrome. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 15140–7.
- 15.Pazoki N, Salehi M, Angaji SA, Abdollahpour-Alitappeh M. Association of Y chromosome AZF region microdeletions with recurrent miscarriage in Iranian couples: A case-control study. *Mol Genet Genomic Med* 2024; 12(2): e2392.
- 16.Yatsenko AN, Yatsenko SA, Weedin JW, Lawrence AE, Patel A, Peacock S, et al. Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men. *J Urol* 2010; 183(4): 1636–42.
- 17.Zhang YS, Li LL, Xue LT, Zhang H, Zhu YY, Liu RZ. Complete azoospermia factor b deletion of y chromosome in an infertile male with severe oligoasthenozoospermia: case report and literature review. *Urology* 2017; 102: 111–5.
- 18.Choi JM, Chung P, Veeck L, Mielnik A, Palermo GD, Schlegel PN. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2004; 81(2): 337–41.
- 19.Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 936569.
- 20.Brannigan RE, Hermanson L, Kaczmarek J, Kim SK, Kirkby E, Tanrikut C. Updates to Male Infertility: AUA/ASRM Guideline(2024). *J Urol* 2024; 212(6): 789–99.
- 21.Fang Y, Zhang Z, Cheng Y, Huang Z, Pan J, Xue Z, et al. Independent factors associated with intracytoplasmic sperm injection outcomes in patients with complete azoospermia factor c microdeletions. *Human Reproduction Open* 2024; 2024(4): hoae071.

- 22.Jiao ZY, Li MR, Zhuo L, Fang YY, Pan JY, Hong K. Sperm retrieval rate and patient factors in azoospermia factor c microdeletion azoospermia: a systematic review. *BJU Int* 2024; 134(1): 6–12.
- 23.Colaco S, Modi D. Azoospermia factor c microdeletions and outcomes of assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility* 2024; 121(1): 63–71.
- 24.Kurtz S, Lucas-Hahn A, Schlegelberger B, Göhring G, Niemann H, Mettenleiter TC, et al. Knockout of the HMG domain of the porcine SRY gene causes sex reversal in gene-edited pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118(2): e2008743118.
- 25.Elfateh F, Rulin D, Xin Y, Linlin L, Haibo Z, Liu RZ. Prevalence and patterns of Y chromosome microdeletion in infertile men with azoospermia and oligozoospermia in Northeast China. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(6): 383–8.
- 26.He Q, Zhang Y, Song M, Zhou Y, Lin D, Ma Y, et al. Detection of AZF microdeletions and analysis of reproductive hormonal profiles in Hainan men undergoing assisted reproductive technology. *BMC Urol* 2024; 24(1): 123.
- 27.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.
- 28.Yousefi-Razin E, Nasiri MJ, Omrani MD. Frequency of Y chromosome microdeletions among iranian infertile men with azoospermia and severe oligozoospermia: A Meta-analysis. *J Reprod Infertil* 2016; 17(4): 208–12.
- 29.Vakili Azghandi M, Nassiri MR, Shamsa A, Jalali M, Shariati MM. Molecular investigation of Y chromosome microdeletions in AZF regions of the non-obstructive azoospermic and oligospermic patients referred to Montaseriyeh infertility center in Mashhad. *Journals of Birjand University of Medical Sciences* 2015; 22(2): 154.
- 30.Elsaid HOA, Gadkareim T, Abobakr T, Mubarak E, Abdelrhem MA, Abu D, et al. Detection of AZF microdeletions and reproductive hormonal profile analysis of infertile sudanese men pursuing assisted reproductive approaches. *BMC Urol* 2021; 21(1): 69.
- 31.Thanh TN, Tien ST, Van PN, Thai SD, Cong TL, Le TD, et al. Optimization of Multiplex-PCR Technique To Determine Azf Deletions in infertility Male Patients. *Int J Gen Med* 2024; 17: 1579–89.
- 32.Witherspoon L, Dergham A, Flannigan R. Y-microdeletions: a review of the genetic basis for this common cause of male infertility. *Transl Androl Urol* 2021; 10(3): 1383–90.
- 33.Deng CY, Zhang Z, Tang WH, Jiang H. Microdeletions and vertical transmission of the Y-chromosome azoospermia factor region. *Asian J Androl* 2023; 25(1): 5–12.
- 34.Yu XW, Wei ZT, Jiang YT, Zhang SL. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(9): 14634–46.
- 35.Colaco S, Modi D. Consequences of Y chromosome microdeletions beyond male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36(7): 1329–37

Study of AZF Microdeletions in Men with Non-obstructive Azoospermia or Severe Oligospermia with Normal Karyotype

Short Title: AZF and Infertility

Noujavan R^{1*}, Rahmani SA¹, Ghasemzadeh A²

¹Department of Genetics, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz Branch, Tabriz, Iran, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Alzahra Educational and Medical Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received Date: 13 May 2025 Accepted Date: 13 Sep 2025

Abstract

Background & aim: Microdeletions of the long arm of the Y chromosome cause approximately 6-8% of cases Non-obstructive azoospermia and a smaller percentage of severe oligospermia cases. Identifying these microdeletions is of great importance in making treatment decisions for patients. Therefore, the aim of this study was to determine and investigate microdeletions of the AZF region in men with non-obstructive azoospermia or severe oligospermia with normal karyotype.

Methods: In the present descriptive-analytical study conducted by specialists in the genetic laboratory during 2022-2024, sixty individuals with non-obstructive azoospermia or severe oligospermia were enrolled in the study. Initially, they underwent cytogenetic tests and chromosome analysis to examine the health of the participants' karyotypes, and individuals with numerical and structural chromosomal abnormalities were excluded at this stage. After eliminating 8 individuals with chromosomal abnormalities, the study continued with the remaining 52 individuals with normal karyotypes. Accordingly, the occurrence of AZF microdeletions was detected using three pairs of specific primers, specific for markers 84sY and 86sY for the AZFa region, markers 127sY and 134sY for the AZFb region, and markers 254sY and 255sY for the AZFc region, in the form of Multiplex-PCR technique. The collected data were analyzed by descriptive statistical tests including absolute and relative frequencies.

Results: Among 30 individuals with non-obstructive azoospermia and 22 individuals with severe oligospermia, 6 individuals, 4 of whom had non-obstructive azoospermia and 2 others with severe oligospermia (total 11.53% of the total cases studied), had various types of AZF microdeletions. Thus, in 92.1% (1 person) of the complete deletion of this region, in 92.1% (1 person) of the deletion of the AZFb region and in 69.7% (4 people) of the deletion in the AZFc region was observed. The carrier of the integrated deletion in the triple regions AZFa,b,c, the person with the deletion in the AZFb region and half of the carriers of the deletion in the AZFc region, had non-obstructive azoospermia and all cases of severe oligospermia of the carrier of the deletion also had the deletion in the AZFc region.

Conclusion: The results of the present study indicated the high rate of deletions in the AZF region in infertile men and emphasize the need to perform genetic tests related to this region in affected patients. These findings once again emphasized the importance of performing targeted genetic tests in infertile patients and show that these tests can help in faster diagnosis, reducing unnecessary interventions and choosing more effective treatment. The overall aim of the present study was to determine the prevalence and type of microdeletions of the AZF region located on the Y chromosome in infertile men with normal karyotype.

Keywords: Azoospermia, Oligospermia, Microdeletion

***Corresponding author:** Roghayeh Noujavan, Department of Medical Genetics, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Email: roghayeh.noujavan@gmail.com

Please cite this article as follows: Noujavan R, Rahmani SA, Ghasemzadeh A. Study of AZF Microdeletions in Men with Non-obstructive Azoospermia or Severe Oligospermia with Normal Karyotype Short Title: AZF and Infertility. Armaghane-danesh 2025; 30(3): 410-425.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal