

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكروموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكروموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

**مصطفى صابر مصطفى

*موفق خليل حسن

* جامعة الموصل - كلية العلوم - قسم علوم الحياة

** جامعة صلاح الدين - كلية العلوم - قسم البيئة

المخلص

مع ازدياد توجه الأزواج العقيمين في السنوات الأخيرة إلى الطرق المساعدة على الإنجاب (Assisted ART reproductive techniques) ومنها تقنية حقن النطفة داخل الساييتوبلازم ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) أصبح من الضروري التعرف على وجود مناطق الحذف الدقيق AZF (Azoospermia factor) على الكروموسوم Y والتي تعد أحد أهم الأسباب الوراثية المرتبطة بالعقم لدى هؤلاء الرجال ، لذا هدفت الدراسة الحالية إلى الوقوف على بعض العوامل الوراثية المسببة للعقم في الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI من خلال الكشف عن بعض مناطق الحذف الدقيق في الكروموسوم Y باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل . من مجموع 24 حالة عقم من الرجال أظهرت النتائج وجود مناطق الحذف الدقيق AZF على الكروموسوم Y في 4 حالات وبنسبة (16.67%) تمثلت بمنطقة الحذف الدقيق AZFc للجينات SY254 و SY255 وبنسبة (100%). بينما كانت 20 حالة وبنسبة (83.33%) من الرجال العقيمين لم تظهر لديهم أي منطقة حذف على الكروموسوم Y ولم يشخص وجود لمناطق الحذف الدقيق AZFa و AZFb . الكلمات المفتاحية : العقم , الحذف الدقيق y , كروموسوم ICSI.

Detection of Y Chromosome Microdeletion Region in Infertile Men Need to Conceived with ICSI

Mowafak k. Hassan*

Mustafa S. Mustafa**

*University of Mosul ,College of Science, Department of Biology.

**University of Salahaddin, College of Science, Department of Environment.

Received 13 January 2015 ; Accepted 11 May 2015

Abstract

With the advancements in the field of assisted reproductive technologies including intracytoplasmic sperm injection (ICSI), it is necessary to detect the presence of y chromosome microdeletion regions (AZF) Azoospermia factor which is considered the main genetic causes of male infertility. The current study was conducted to achieve the genetic factors in infertile men needed to conceive with ICSI by detection of Y chromosome microdeletion regions using

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكروموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن

polymerase chain reaction (PCR). Results revealed that out of 24 cases of infertile men 4 cases (16.67%) were positive to the presence of y chromosome microdeletion regions represented with AZFc region(100%) including SY255 and SY254 genes while, 20 cases (83.33%) were negative to presence of microdeletion regions in infertile men. AZFb and AZFa were not detected.

Key words : infertility , microdeletion , y chromosome, ICSI.

المقدمة

العقم من الحالات المرضية المنتشرة في كل المجتمعات في العالم ويعود 30% منه الى العقم الذكري المتمثل بقلة النطف Oligospermia أو انعدام النطف Azoospermia والتي تكون بسبب عوامل وراثية (1، 2). يعتبر الكروموسوم Y أصغر الكروموسومات في الانسان وهو كروموسوم محدد للجنس وحجمه 60Mb حيث يحتوي مايقارب 57-60 مليون زوج من القواعد النتروجينية (bp) ويلعب دورا مهما في التنظيم الوراثي لعملية انتاج النطف ويتكون من الذراع الطويل الحاوي على مناطق مسؤولة عن عملية توليد النطف بشكل طبيعي والذراع القصير الحاوي على الجين (SRY) Specific region of Y chromosome (3، 4، 5، 6) فهو يحمل جينات قليلة عند مقارنته بنظيره الكروموسوم X (7). يحدث العبور الاختزالي واعادة الارتباط في الكروموسوم Y مع الكروموسوم X في منطقتين قصيرتين هما الاوتوسوم الكاذب PAR (Pseudo Autosomal Region) PAR1 Y-q-PAR2 الموجودتين على حافة الذراع القصير YP والذراع الطويل Yq بالتتابع ، وعلى الرغم من أن 95% من الكروموسوم y هي (NRY- Non- Recombining Region of Y Chromosome) والتي عرفت فيما بعد بـ (Male Specific (MSY) Region of Y Chromosome) فإن الكروموسوم Y يميل الى تراكم الطفرات بمعدل أعلى مما هو في الاوتوسوم (8). قسمت فترات الحذف في الكروموسوم Y الى سبع فترات حذف حيث يحتوي الذراع القصير على سبع فترات حذف (7-1) (9) ومن ثم قسمت فترات الحذف السبعة الى 43 فترة ثانوية (10، 11) اعتمادا على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (polymerase chain reaction) وتفسر خرائط الحذف الجزيئي العديد من العيوب في الكروموسوم Y خاصة الحذف الدقيق (12). فأول من لاحظ الحذف في الكروموسوم Y، وتداخله في عملية توليد النطف ودوره بحدوث العقم عند الذكور على مدى 30 سنة مضت هو الباحث Tiepolo (13) وأشار الباحثين الى وجود عامل انعدام النطف Azoospermia factor (AZF) والواقعة ضمنه ثلاثة مناطق من الداني الى القاصي وهي ، AZFb ، AZFa ، AZFc بالتتابع (14، 15، 16، 17) وتعد منطقة AZFc الاكثر تكرارا وبنسبة 65-70% يليها AZFb والـ AFZb-c او AZFa-b-c وبنسبة 25-30% بينما تكون منطقة AZFa نادرة الحدوث وبنسبة 5% (18، 19، 20). تختلف هذه الفترات في طولها كما تختلف في جيناتها المشفرة. وقد وجد ان اغلب التشوهات التركيبية في احداث الحذف الدقيق هي الاكثر سيادة في الرجال عديمي النطف azoospermic او قلبي النطف Oligozoospermic ضمن النمط الخلوي (XY، 46) (21، 22) وتشخص مناطق الحذف الدقيق بدقة باستخدام التقنيات الجزيئية الحديثة

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكروموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن

ومنها تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لغرض الوصول الى التشخيص الدقيق للعقم عند الذكور الذين يكون تركيز النطف عندهم أقل من 5×10^6 / مل (23، 24، 25). تعتمد فكرة هذه التقنية على استخلاص الدنا من خلايا الدم البيض في دم الانسان وخلطه بأدلة وراثية لتحديد المواقع المتسلسلة STS -tagged sites على الكروموسوم Y (26، 27، 28). تقترن أكثر الجينات المحذوفة مع اغلب حالات فشل توليد النطف (11) ويكون انتقال هذا الحذف الى المواليد الذكور اجباريا سواء اكان انتقالها طبيعيا او عن طريق تقنيات تكاثرية مساعدة ART (Assisted reproductive techniques) (2، 29) وتتباين النسبة المئوية لحدوث الحذف الدقيق على الكروموسوم Y في المرضى الذين يعانون من قلة أو انعدام النطف من صفر % (30) والى 55 % (31) ويعزى هذا التباين الى معايير الانتخاب وطريقة الاختبار الجزيئي وعدد STSs المستخدمة والاختلافات الفردية بين الذكور وعدد العينات للمرضى (30، 32، 33).

طرائق العمل

انتخبت 24 حالة من الرجال العقيمين الذين يعانون من انعدام النطف المنوية Azospermia والمراجعين للمركز الطبي البريطاني للعقم وأطفال الانابيب في أربيل للتحري عن وجود مناطق الحذف الدقيق على الذراع الطويل للكروموسوم Y لدى الرجال العقيمين والراغبين بالإنجاب ببرنامج التقنيات المساعدة على الانجاب ART بتقنية الحقن المجهرى داخل السايوتوبلازم ICSI. جمعت عينات الدم من الرجال العقيمين وأجري فحص الوراثة الجزيئية في مختبر بايولاب Biolab في عمان وتم تحديد مواقع الحذف الدقيق على الكروموسوم Y بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction) وحسب الطريقة الموصوفة للعدة التشخيصية المجهزة من شركة (Promega) بالاعتماد على وجود أو غياب مناطق الحذف AZFa و AZFb و AZFc حيث جمعت عينات الدم من الرجال العقماء وأرسلت الى مختبر بايولاب في عمان لأجراء الفحص الوراثي الجزيئي عليها. تعتمد فكرة الطريقة على استخلاص الدنا ومضاعفته باستخدام بادئات متخصصة (STS) Sequence Tagged Sites نظام المبلر الحراري Thermocycler- وحسب البرنامج المرفق من الشركة المجهزة يلي ذلك الترحيل على جل الاكاروز وباستخدام صبغة Ethidium Bromide وقراءة النتائج من ملاحظة الحزم باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ومقارنتها مع الدليل Ladder المرفق مع العدة التشخيصية. استخلص الدنا من عينات الدم في الرجال العقيمين باستخدام العدة التشخيصية المجهزة من شركة (promega) الامريكية وحفظ بالتجميد بدرجة -20°م لحين الاستخدام. استخدمت بادئات متخصصة (STS) Sequence Tagged Sites للكشف عن وجود مناطق الحذف في الذراع الطويل للكروموسوم Y والمتمثلة بالمناطق AZFa, AZFb, AZFc, من خلال اختيار ثمانية مواقع تسلسلية خاصة بجينات الموقع AZF وتشمل SY255, SY254, SY127, SY134, SY84, SY86, فضلا عن جين محدد للجنس كجين سيطرة SFY, SRY حيث استخدم زوج من البادئات لكل موقع وكما موضح في الجدول (1).

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكرموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن

خطوات العمل

اشتملت طريقة العمل على المراحل الآتية :

- 1- مرحلة استخلاص الدنا DNA Extraction
- 2- مرحلة تطبيق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام Multiplex PCR
- 3- مرحلة الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis
- 4- مرحلة فحص الحزم باستخدام UV Trans- Illuminator system

الجدول (1) يوضح تتابع ازواج البادئات المستخدمة في الدراسة

تتابع البادئ 5'-----3'	رقم البادئ	اسم البادئ	فترات الحذف	الازواج القاعدية bp
5'-GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3	F	SY255	AZFc	123
5'-CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'	R			
5'-GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3'	F	SY254	AZFc	380
5'-GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C-3'	R			
5'-GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG-3'	F	SY134	AZFb	301
5'-ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA-3'	R			
5'-GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3'	F	SY127	AZFb	274
5'-CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'	R			
5'-GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC-3'	F	SY86	AZFa	320
5'-ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT-3'	R			
5'-AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT-3'	F	SY84	AZFa	326
5'-GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'	R			
5'-ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C-3'	F	ZFY		495
5'-GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T-3'	R			
5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3'	F	SRY		472
5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'	R			

استخلاص الحمض النووي منقوص الاوكسجين DNA Extraction

استخلص الحمض النووي DNA من عينات الدم في الرجال العقماء . تم تخفيف مستخلص الدنا باستخدام Free water RNase بنسبة 3:1 قبل استخدام Multiplex PCR . أخذ 3 مللتر من الدم ووضعت في أنبوبة أبندروف نظيفة ومعقمة سعة 1.5 مللتر وأضيف 900 مايكروليتر من محلول محلل الخلايا Lysis solution الى انبوبة أبندروف مزجت محتويات الانبوبة وحضنت بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق مع مراعاة مزجه مرتين خلال فترة الحضانة ، بعدها تم فصل المزيج باستخدام الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة /دقيقة لمدة 20 ثانية وأستبعد الراشح بعدها أضيف 300 مايكروليتر من محلول محلل الانوية Nucleasis solution ومزجت محتويات الانبوبة بالهزاز vortex لتحليل الاغشية النووية لخلايا الدم البيض والى ان يصبح المحلول لزجا وحضنت العينة بدرجة 37°م الى أن تتفكك الكتل بالكامل ، أضيف 100 مايكروليتر

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكروموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن

من محلول ترسيب البروتين لترسيب البروتينات النووية والسائتوبلازمية ومزجت جيدا لمدة 10-20 ثانية بجهاز الهزاز بعدها وضعت الانبوبة بجهاز الطرد المركزي 13000 دورة /دقيقة لمدة 3 دقائق وتم الحصول على راسب بروتيني ذات لون بني وأخذ الراشح ووضع في انبوبة الطرد المركزي حاوية على 300 مايكروليتر ايزوبروبانول ومزجت جيدا لحين الحصول على خيوط او اشربة بيضاء اللون واجري الطرد المركزي بسرعة 23000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة ، أستبعد الراشح وأضيف 300 مايكروليتر من محلول 70% ايثانول ومزجت لغسل الدنا ثم أعيدت عملية الطرد المركزي 13000 دورة /دقيقة لمدة دقيقة واحدة بعدها تخلصنا من الكحول وقلبت الانبوبة على شاش ابيض وجففت لمدة 10-15 دقيقة ومن ثم أضيف 100 مايكروليتر من محلول اعادة التجفيف DNA rehydration solution وحضنت بدرجة 65 °م لمدة ساعة وتم الاحتفاظ بالدنا بدرجة 2-8 °م لحين بدء برنامج (PCR) استخدم خليط التفاعل الرئيسي Master mix reaction والمتضمن لكاشف Qiagen reagents وأنزيم taq polymerase المجهد من شركة KAPA البريطانية ثم أجريت عملية التضاعف في جهاز المبلر الحراري الحلقي Thermocycler المصنع من قبل شركة Corbett RG-6000 بعد برمجة الجهاز على البرنامج الخاص بتفاعل البلمرة المتسلسل حيث وضع المبلر الحراري على درجة 94°م ولمدة 5 دقائق للذئرة الابتدائية ثم 35 دورة تضمنت الذئرة Denaturation بدرجة 94 °م ولمدة دقيقة وارتباط البادئ Annealing عند 55°م ولمدة 45 ثانية وللإستطالة Extension بدرجة 67°م ولمدة دقيقة واحدة أعقب ذلك مرحلة الإستطالة النهائية Final Extension بدرجة 67 °م ولمدة 4 دقائق. تم ترحيل عينات الدنا على قالب هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وباستخدام صبغة الاثيديوم برومايد بتركيز 0.5 مايكروغرام / مل بعدها فحصت الحزم باستخدام UV Trans- Illuminator system وقد قدرت الاحجام الجزيئية لقطع الدنا المتضاعفة عند 260 نانوميتر وقورنت مع الاوزان الجزيئية المعروفة في الدليل الحجمي القياسي DNA Ladder (100 bp) لكل ترحيل على 70 فولت ولمدة 45 دقيقة وقراءة الحزم .

النتائج والمناقشة

بينت نتائج تحليل الوراثة الجزيئية للكشف عن مناطق الحذف الدقيق على الكروموسوم Y في الرجال الذين يعانون من انعدام النطف المنوية وجود مناطق للحذف الدقيق AZF على الكروموسوم Y في 4 حالات وبنسبة (16.67%) لمنطقة الحذف الدقيق AZFc ممثلة بالجينات SY254 و SY255 وبنسبة (100%). ولم يثبت وجود لمنطقة الحذف الدقيق AZFb ممثلة بالجينات SY134 و SY127 أو لمنطقة الحذف الدقيق AZFa على الكروموسوم Y في الحالات المدروسة . وأظهرت النتائج أن (83.33%) من الرجال العقيمين لم تظهر لديهم أي منطقة حذف على الكروموسوم Y وكما موضح في الجدول (2) .

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكروموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

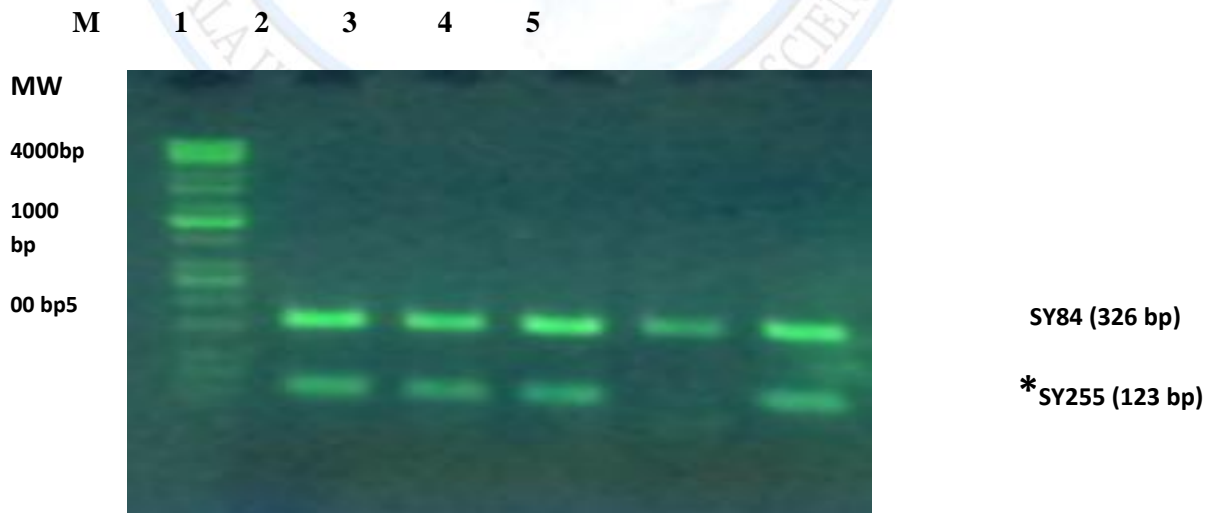
مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن

الجدول (2) النسب المئوية لمناطق الحذف الدقيق على الكروموسوم Y في الرجال العقيمين عديمي النطف

AZFb		AZFc		النسبة المئوية	حالات الحذف الدقيق	العدد الكلي للمرضى
جينات SY127	جينات SY134	جينات SY254	جينات SY255			
-	-	4		16.67%	4 وجود حذف دقيق	24
-	-	-		83.33 %	20 عدم وجود حذف دقيق	

كانت الحالات الموجبة لوجود مناطق الحذف الدقيق ممثلة بمنطقة الحذف AZFc بوزن جزيئي 123 و 380 زوجا قاعديا لكل من الجينات SY254 و SY255 مقارنة مع الدليل الحجمي DNA Ladder بينما كانت الحالات الممثلة بمنطقة الحذف الدقيق AZFb بوزن جزيئي 301 و 274 زوجا قاعديا لكل من الجينات SY134 و SY127 على التتابع ومنطقة الحذف الدقيق AZFa بوزن جزيئي 326 و 320 زوجا قاعديا لكل من الجينات SY86 و SY84 على التوالي سليمة مقارنة مع الدليل الحجمي DNA Ladder كما موضح في الصورة (2 و 1).



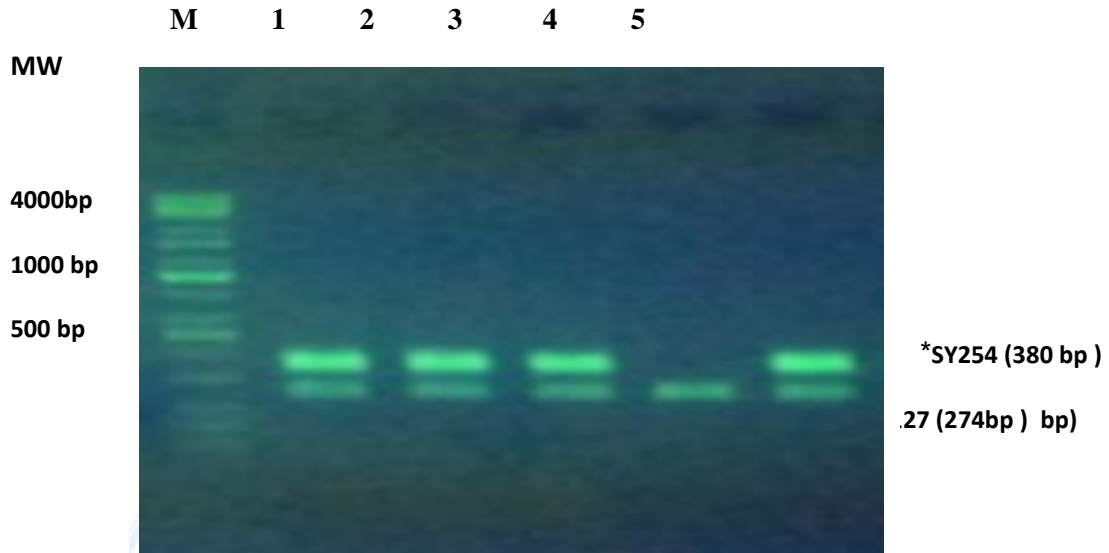
الصورة (1) تضاعف الدنا للرجال العقيمين والمرحلة على هلام الاكاروز بنسبة 1.5% مع الدليل

الحجمي القياسي DNA Ladder المتمثل بـ M، (4) Lan تمثل منطقة الحذف الدقيق AZF

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكرموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن



الصورة (2) تضاعف الدنا للرجال العقيمين والمرحلة على هلام الاكاروز بنسبة 1.5%

الحجمي القياسي DNA Ladder المتمثل بـ M، (4) Lan تمثل منطقة الحذف الدقيق AZFc

أن النسبة المئوية لتكرار حدوث الحذف الدقيق على الكرموسوم Y في الدراسة الحالية (16.67%) تعد نسبة مقارنة للنسبة التي حصل عليها (19) وهي (14%) في الرجال العقيمين ومقارنة الى حد ما لنسبة تكرار ظهور مناطق الحذف الدقيق AZF في الرجال العقيمين في مصر (12%) (34). وإذا ما قورنت هذه النسبة بالدراسات المحلية التي أجريت للكشف عن وجود مناطق الحذف الدقيق على الكرموسوم Y في الرجال العقيمين تعتبر نسبة منخفضة فقد وصلت النسبة المئوية لمناطق الحذف الدقيق AZF (24.4%) منها الـ AZFc (22.2%) والـ AZFb (55.5%) (35) والذي أشار الى أن حدوث الحذف في منطقة AZFc هي الاكثر شيوعا في العراق مقارنة ببقية مناطق الحذف AZFa و AZFb وأعزى ذلك الى أن الجينات الواقعة ضمن هذه المنطقة هي جينات هشة وضعيفة . وبلغت النسبة المئوية لتكرار حدوث الحذف الدقيق في الكرموسوم Y (64%) في الرجال العقيمين في محافظة الانبار (36) والذي أوعزها الى التلوث البيئي بمخلفات اليورانيوم بسبب الحروب التي تعرض لها العراق في السنوات الاخيرة . في حين كان وجود الحذف الدقيق على الذراع الطويل للكرموسوم Y (27.9%) في الرجال العقيمين (37) وهي أحد أغلب الاسباب المتكررة للعقم عند الذكور والمقترنة مع عملية توليد النطف والاستنزاف الكامل للخلايا المولدة للنطف والتي أصبح من الواضح اليوم ارتباطها ارتباطا وثيقا بالجينات الواقعة على الذراع الطويل للكرموسوم Y (38، 39، 40). ويعتبر الكرموسوم Y أكثر عرضة لحدوث الحذف الدقيق المسبب لحالات العقم مقارنة ببقية الكروموسومات (41) حيث أن وجود المواقع المتسلسلة على الحدود بين الكروماتين الحقيقي والكروماتين المغاير في الذراع الطويل لها دورا مهما في حفظ توازن الكرموسوم Y (42). ولا تنحصر الفائدة المرجوة من الكشف عن مناطق الحذف الدقيق في الكرموسوم Y على تشخيص العقم في الرجال بل تتعداه الى فائدتها في الكشف المبكر عن العقم لدى ابناءهم من الذكور للوصول الى العلاج المبكر والامثل لهذه الحالات وقد يكون الحذف عند الابناء أكبر مما هو لدى الاباء

الكشف عن مناطق الحذف الدقيق للكروموسوم Y لدى بعض الرجال العقيمين الراغبين بالإنجاب بتقنية ICSI

مصطفى صابر مصطفى

موفق خليل حسن

ويتداخل ذلك بالعوامل الوراثية والعوامل البيئية (43). أن التباين في النسب المئوية لحدوث مناطق الحذف الدقيق على الذراع الطويل للكروموسوم Y قد تعود الى التباين في نوع وعدد البادئات المستخدمة وعلى حجم العينة (44، 45). أن عدم ظهور مناطق الحذف الدقيق على الموقعين AZFa و AZFb في هذه الدراسة جاءت متفقة مع نتائج الباحث (46) والذي لم يلحظ حذف دقيق في منطقة AZFa مما يؤكد قلة شيوع هذا النوع مقارنة بمواقع الحذف الأخرى AZFb و AZFc مشيراً الى ارتفاع نسب حدوث الطفرات الوراثية في هذه الكروموسومات (47، 48). في حين لم تتفق هذه النتائج مع تكرار حدوث الحذف الدقيق بنسبة (12.4%) في الرجال السوريين العقيمين والتي كانت أكثرها ممثلة بمنطقة الحذف الدقيق AZFa (49) تحمل منطقة الحذف الدقيق AZFa ثلاث جينات مهمة وهي Candidate gen الممثلة بـ USPay و DBY و UTY وهي الجينات المسؤولة عن قلة أو انعدام النطف وتحمل منطقة AZFb جين RBMY في حين أن منطقة AZFc هي المنطقة الأكثر تكراراً لحدوث الحذف وتحمل الجينات DAZ والتي غالباً ما تكون محذوفة في الرجال العقيمين (22، 50) وذكر بعض الباحثين أن الكشف عن وجود مناطق الحذف الدقيق على الذراع الطويل للكروموسوم Y يعتبر عاملاً تنبؤياً جيداً في الرجال العقيمين والذين لديهم مناطق حذف دقيقة واقعة ضمن الموقع AZFc على امتلاكهم نطف قابلة لاختصاصهم لبرنامج ART بتقنية ICSI (24، 51). وقد تعزى زيادة نسبة حدوث الحذف الدقيق على الذراع الطويل للكروموسوم Y عند الرجال العقيمين الى وجود عوامل مرضية منها الإصابة بدوالي الخصيتين Varicocele والذي قد ينجم عن توسع غير طبيعي للأوردة في الخصيتين (45، 52). فضلاً عن اقتران الحذف الدقيق للكروموسوم Y ببعض مجاميع haplo للكروموسوم Y حيث يكون بعضها أكثر حساسية للحذف الدقيق في حين أن هناك مجاميع أخرى تزيد من حماية الكروموسوم من الحذف الدقيق من خلال فقدان العناصر التي تسهل إعادة الارتباط بين الكروموسومات (53، 54). يساهم الكشف عن مناطق الحذف الدقيق في الكروموسوم Y وبدرجة كبيرة في تجنب التعرض للعلاجات الهرمونية غير الضرورية وتغني عن التعرض للتدخل الجراحي والذي ليس ذو جدوى في هذه الحالات (55، 56). كما وأن وجود الحذف الدقيق على الذراع الطويل للكروموسوم Y لدى بعض الرجال الذين يعانون من قلة إنتاج النطف والخاضعين لبرامج الإنجاب المساعدة ICSI كأحدى التقنيات المساعدة على الإنجاب تسهم بدرجة كبيرة في انتقال العيوب الوراثية الى الأجنة بسبب اختيار نطفة واحدة لتلقيح البويضة الناضجة مما يزيد بدوره من فرصة حدوث التشوهات في المواليد وبالتالي العقم لدى الذكور منهم (57، 58).

المصادر

1. Jungwirth, A. ; Diemer, T. ; Dohle, G. R. ; Giwercman, A. ; Kopa, Z. ; Tournaye, H. ; and Krausz, C. (2013). Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology: 16-20.
2. Hellani, A. ; Al-Hassan, S. ; Iqbal, M. and Coskun, S.(2006).Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. J. Experim. and Clinic. Assis. Repro. 3:1-4.

3. Rizk, B. R. ; Aziz, N. ; Agarwal, A. and Sabanegh, E. (2014). Medical and surgical management of male infertility. Jaypee Brothers medical publisher. 1st ed. New Delhi.
4. Graves, J. A. M. (2006) . Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. Cell. 124 (5): 901–914.
5. Venter, J. C. ; Adams, M. D. ; Myers, E. W. ; Li, P. W. ; Mural, R. J. Sutton, G. G. ; Smith, H. O. Yandell, M. ; Evans, C. A. ; Holt, R. A. ; et al., (2001) . The sequence of the human genome. Science 291(5507): 1304–1351.
6. Yen, P. (2001). The fragility of fertility. Nat. Genet. 29,243 – 244.
7. Carvalho, C. and Santos, F. (2005). Human Y-chromosome variation and male dysfunction. J. Mol. Genet. Med. 1(2): 63-75.
8. Skaletsky, H. ; Kuroda-Kawaguchi, T. ; Minx ,P. ; Cordum, H. and Hillier, L. (2003).The male specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature.423:825–837.
9. Vergnaud, G. ; Page, D. ; Simmler, M. ; Brown, L. ; Rouyer, F. and Noel, B. (1986). A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. Amer. J. Hum. Gen. 38(2):109–124.
10. Dada, R. ; Gupta, N. and Kucheria, K. (2003). Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. J. Biosc. 28(2):163-168.
11. Foresta, C.; Moro, E. and Ferlin, A. (2001). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. Endoc. Rev. 22(2) :226-239.
12. Vogt, P. (2005). AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. Hum. Repr. 11(4): 319-336.
13. Tiepolo, L. and Zuffardi, O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum. Gene. 34(2):119-124.

14. Ma, K.; Inglis, J. ; Sharkey, A. ; Bick more, W. and Hill, R. (1993). A Y-chromosome gene family with RNA binding protein homology Candidate for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell*. 75(7):1287–1295.
15. Nagafuchi, S. ; Namiki, M. ; Nakahori , Y. ; Kondoh, N. ; Okuyama, A. and Nakagome, A. (1993). A minute deletion of the Y chromosome in men with azoospermia. *J. Urol*. 150(4):1155-1157.
16. Vogt, P. M ; Chandley, A. M. ; Hargreave ,T.M. ; Keil, R. ; Ma ,K. and Sharkey, A. (1992). Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum. Gen*. 89(5):491-496.
17. Ma, K. ; Sharke, A. ; Kirsch, S. ; Vogt, P. and Keil, R. (1992). Towards the molecular localization of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum. Mol. Gen*. 1(1):29-33.
18. Saxena, R.; de Vries, J.; Repping, S.; Alagappan, R. and Skaletsky, H. (2000). Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Geno*.67:256-267.
19. Martinez, M. C. ; Bernabe, M. J. ; Gomez, E. ; Ballesteros, A. ; Landeras, J. ; Glover, G. ; Gil-Salom, M. ; Remohi, J. and Pellicer, A. (2000). Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J. Androl*. 21(5):651–655.
20. Tse, J.; Yeung ,W.; Lau, E.; Ng, E.; So, W. and Ho, P. (2000). Deletions within the azoospermia factor subregions of the Y-chromosome in Hong Kong Chinese men with severe male-factor infertility: controlled clinical study; *Hong Kong Med. J*. 6(2) :143–146.
21. Reijo, R. ; Lee, T. ; Salo, P. ; Alagappan , R. and Brown, L. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y-chromosome deletion encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat.Gen*. 10:383-393.
22. Reijo, R. ; Alagappan, R. ; Patrizio, P. and Page, D. (1996). Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*. 347(9011):1290-1293.

23. Mitra, A. ; Dada, R. ; Kumar, R. ; Gupta, N. P. ; Kucheria, K. and Gupta, S. K. (2008). Screening for Y-chromosome microdeletions in infertile Indian males: Utility of simplified multiplex PCR Indian J Med Res 127 : 124-132.
24. Hopps, C. V. ; Mielnik, A. ; Goldstein, M. ; Palermo, G. D. ; Rosenwaks, Z. and Schlegel, P. N. (2003). Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions . Hum Reprod. 18(8):1660-1665.
25. Simoni, M. ; Bakker, E. ; Eurlings, M. ; Matthijs, G. and Moro, E. (1999). Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Inter. J. Androl. 22:292–299.
26. Evenson, D., P., and R, Wixon., 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. Theriogenology, 65:979–991.
27. Chohan, K. R. ; Griffin, J. T. ; Lafromboise, M. De Jonge, C. J. Carrell, D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J. Androl . 27(1):53–59.
28. Carrell, D. T. ; Wilcox, A. L. ; Lowy, L. ; Peterson, C. M. ; Jones, K. P. ; Erickson, L. ; Campbell, B. ; Branch, D. W. and Hatasaka, H. H. (2003). Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. Obstet. Gynecol. 101(6):1229–1235.
29. Oates, R. ; Silber, S. ; Brown, L. and Page, D. (2002) . Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. Hum. Repro. 17(11):2813-2824.
30. Tzschach, A. ; Thamm, B. ; Imthurn, B. ; Weber, W. ; Alexander, H. ; Glander, H. J. and Froster, U. (2001). Absence of Yq microdeletions in infertile men. Arch Androl. 47(3):167-71.
31. Foresta, C. ; Ferlin, A. ; Garolla, A. ; Moro, E. Pistorello, M. ; Barboux, S. and Rossato, M. (1998). High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. Hum. Reprod. 13(2) : 302-307.
32. Krausz, C. ; Degl'Innocenti, S. (2006). Y chromosome and male infertility : Front Biosci. 11:3049–3061.

33. Krausz, C. and McElreavey, K. (1999). Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Bioscience*. 4, 1–8.
34. El Awady, M. K. ; El Shater, S. F. ; Ragaa, E. ; Atef, K. ; Shaheen, I. M. and Megiud, N. A. (2004). Molecular study on Y chromosome microdeletions in Egyptian males with idiopathic infertility . *Egypt. Asian J. Androl*. 6(1): 53-57.
35. Hussein, Z. A. ; Al-Faisal, A. M. and Al-Jiboori, B. M. (2009). Y chromosome azoospermia factors (AZF) microdeletions in azoospermic men. *Iraqi J. Med. Sci*. 7 (1):102-108.
36. Khalaf, S. M. ; Shehab, A. F. and Al-Asse, A. H. A. (2012). A Molecular Study of Azoospermia & Sever Oligospermia in a Sample of Infertile Males Al-Anbar Governorate. *Eng. And Tech. J*. 30(12):2116-2124.
37. Al-Faisal, A. M. ; Alnajar, A. F. and Ghareeb, A. M. (2010). AZF, SRY Microdeletions and Hormonal Disturbances among Azoospermic Iraqi men. *IJPS* 6(2):92-97.
38. McElreavey, K. ; Ravel , C. ; Chantot-Bastaraud, S. and Siffroi, J. P. (2006). Y chromosome variants and male reproductive function. *Int. J. Androl*. 29(1):298-303.
39. Fernandes, S. ; Huellen, K. ; Goncalves, J. et al. (2002). High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod*. 8(3): 286-98.
40. Krausz, C. ; Murci, L.Q. ; McElreavey, K. (2001). Prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis. *Hum Reprod*. 15(7): 1431-34.
41. Siffroi, J. P. ; Le Bourhis, C. ; Rouba, H. ; Krausz, C. ; Barboux, S. ; Quintana-Murci, L. ; Bujan, L. ; Bourrouillou, G. ; Seifer, I. ; Boucher, D. ; Fellous, M. ; McElreavey, K. and Dadoune, J. P. (2000). Sex chromosome mosaicism in infertile males carrying Y chromosome long arm deletions. *Human Reproduction*. 15, 2559-62.
42. Jakubowski, L. ; Jeziorowska, A. ; Constantinou, M. and Kaluzewski, B. (2000). Molecular analysis of Y chromosome long arm structural instability in patients with gonadal dysfunction. *Clin. Genet*. 57(4):291–295.
43. Stuppia, L. ; Calabrese, G. ; Franchi, P. G. ; Mingarelli, R. ; Gatta, V. ; Palka, G. and Dallapiccola, B. (1996). Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted

- from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the RBM1 and DAZ genes. *Am. J. Hum. Genet.* 59(6):1393–1395
44. Ozdemir, O. ; Gul, E. ; Kilicarslan, H. ; Gokce, G. ; Beyaztas, F. Y. ; Ayan, S. and Sezgi, I. (2007). SRY and AZF gene variation in male infertility : a cytogenetic and molecular approach. *Int. Urol. Nephrol.* 39 (11): 1183-89.
45. Rao, L. ; Babu, A. ; Kanakavalli, M. ; Padmalatha, V. ; Singh, A. ; Singh, P.K. ; Deenadayal, M. and Singh, L. (2004). Chromosomal Abnormalities And Y Chromosome Microdeletions In Infertile Men With Varicocele And Idiopathic Infertility Of South Indian Origin. *J. Of Andrology* . 25 (1): 147-153.
46. Dohle, G. R. ; Halley, D. J. J. ; Hemel, J. O. V. ; Ouweland, A. M. ; Pieters, M. H. ; Weber, R. F. ; Govaerts, L. C. P. (2002). Genetics risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum. Reprod.* 17(1):13-16.
47. McElreavey, K. ; Krausz, C. and Bishop, C. E. (2000). The human Y chromosome and male infertility. *Results. Probl. Cell. Differ.* 28:211-232.
48. Vogt, P. H. ; Edelman, A. ; Kirsch, S. ; Henegariu, O. ; Hirschmann, P. ; Kiesewetter, F. ; Kohn, F. M. ; Schill, W. B. ; Farah, S. ; Ramos, C. ; Hartmann, M. ; Hartschuh, W. ; Meschede, D. ; Behre, H. M. ; Castel, A. ; Nieschlag, E. ; Weidner, W. ; Grone, H. J. ; Jung, A. ; Engel, W. and Haidl, G. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 5(7):933-943.
49. أبو الشامات ، غالية و عيسى ، محي الدين وحلي، مروان. (2010). الأسباب الوراثية الكامنة وراء العقم مجهول السبب عند الرجال في سورية . مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية. مجلد 5 العدد 2 : 177-192
50. Vineeth, V. S. and Malini, S. S. (2011). A Journey on Y Chromosomal Genes and Male Infertility. *Int. J. Hum. Genet.* 11(4): 203-215 .
51. Nowroozi, M. R. ; Radkhah, K. ; Ranjbaran, A. ; Ghaffari, S. R. ; Gilani, M. A. S. and Gourabi, H. (2010). Is karyotyping and Y chromosome microdeletion study necessary in men candidate for ICSI? *Iranian J. Reprod. Med.* 8 (4): 173-178
52. Marmer, J. L. (2001). Varicocele and male infertility: part II. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum. Reprod. Update*, 7(5):461-472 .

53. Ferlin, A. ; Arredi, B. ; Speltra, E. ; Cazzadore, C. ; Selice, R. ; Garolla, A. ; Lenzi, A. and Foresta, C. (2007). Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men a ten year experience in Italy. The J. Clinical Endocrinology and Metabolism; 92(3):762-770.
54. Kihale, P. ; Yasui, A. and Shuto, Y. (2005). Prospective assessment of Y chromosome microdeletions and reproductive outcomes among infertile couples of Japanese and African origin. J. Exper. and Clinical Assisted Reproduction. 2:9-15.
55. Balkan, M. ; Tekes, S. and Gedik, A. (2008) .Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. J. Assist. Reprod. Genet. 25(11-12): 559–565.
56. Badawi, A. M. ; Awwad, A. A. ; Amer, M. K. ; Hussein, I. R. (2001). Detection of Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic azoospermia. PH. D. Thesis. Cairo University Giza, Egypt.
57. Bonduelle, M. ; Jons, H. ; Hofmans, K. ; Liebaers, I. ;Van Steirteghem, A. and Liebaers, I.(1995). Comparative follow up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and children born after in-vitro fertilization. Hum Reprod. 10(12):3327–3331.
58. de Kretser, D. (1995). The potential of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to transmit genetic defects causing male infertility. Reprod. Fertil. Dev. 7:1