بررسی پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs2286663 در ژن INSL3 مرتبط با ناباروری آقایان با روش RFLP PCR

آسیه فتوح[1*]، رودابه بهزادی اندوهجردی[2]، مسعود زندی[2]

۱. کارشناس‌ارشد، دانشکده علوم پایه، واحد تهران‌مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. عضو هیئت علمی، واحد تهران‌مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۵)

چکیده

ناباروری به عدم توفیق زوجین در بارداری پس از گذشت یکسال از مقاربت‌های متوالی بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری گفته می‌شود. ناباروری در مردان یک سندروم چند عاملی به شمار می‌آید که دلایل ژنتیکی و غیرژنتیکی متعددی می‌تواند داشته باشد. ناباروری Idiopathic به نوعی از ناباروری اطلاق میشود که دلایل آن مشخص نیست. وقوع جهش درژن INSL3 منجر به بروز بیماری پنهان ماندگی بیضه میشودو ممکن است در آزوسپرمی و ناباروری نقش داشته باشد. پروتئین کد شده توسط ژن INSL3 یک هورمون شبه انسولینی می‌باشد که عموماً از بافت‌های گنادی مردان ترشح می‌شود.و تولید آن بستگی به تأثیر تمایزی هورمون LH دارد. این ژن انواع مختلفی از SNPها را دارد که می‌تواند در ایجاد ناباروری دخالت داشته باشد و به همین دلیل در این تحقیق rs2286663 مورد بررسی قرار می‌گیرد.دراین پژوهش ۸۰ بیمار مبتلا به آزوسپرمی و ۸۰ نمونه کنترل مورد مطالعه قرار گرفت با استفاده از تکنیک RFLP PCR. حضور جهش احتمالی مورد نظر بررسی شد. آنالیزهای آماری نشان داد مقدار Pvalue بزرگتر از ۰/۰۵ می‌باشد در نتیجه ارتباط معناداری بین SNP مورد نظر و بیماری یافت نشد.

کلیدواژگان

آزوسپرمی، ژنINSL3، ناباروری.

* نویسنده مسئول، رایانامه: at_fotoohi@yahoo.com

مقدمه

ناباروری به عنوان عدم موفقیت زوجین در ایجاد حاملگی بعد از یک سال رابطه جنسی بدون استفاده از عوامل بازدارنده حاملگی، تعریف می‌شود. حدوداً ۸ تا ۱۰ درصد از زوجین با نوعی مشکل ناباروری روبرو هستند .حدود نیمی از موارد ناباروری به علت عوامل مردانه است.آزواسپرمی[1] شدید(فاقد اسپرم) و بدون علت که به علت تغییرات ژنتیکی ایجاد می شود بخش مهمی از ناباروری مردان را تشکیل می دهند(۱و۲). ناباروری و مشکلات فردی و اجتماعی ناشی از آن به عنوان یکی از مسایل مهم زوج هاست و این امر از آن نظر قابل توجه است که علت ناباروری مردان فقط در ۴۰ درصد موارد قابل تشخیص است و در ۶۰ درصد موارد از نظر پاتولوژیکی قابل تشخیص نیستند(۲) . بنابراین درمان ناباروری در مردان مشکل تراز زنان است،به خصوص در کشورهای در حال توسعه که با توجه به هزینه بالای درمان امکان انجام آن کمتر است. ناباروری مردان بر اساس عوامل ایجاد کننده میتواند به اختلالات مربوط به تحرک یا عملکرد اسپرم، اختلالات مربوط به آسیب‌های ممانعت کننده اختلالات در انتقال اسپرم، نقص در تولید اسپرم، اختلالات مربوط به نعوظ و انزال، اختلالات اندوکرین. بخش اعظم درک اساس ژنتیکی این اختلال هنوز ناشناخته باقی مانده است و به همین دلیل لازم است تا ژنهای مختلف مورد بررسی قرار گیرد و یکی از این ژنها INSL3 است.فاکتور شبه انسولین ۳ که منحصرا در جنین و سلولهای لیدیگ بیضه بالغین در گونه‌های مختلف بیان می‌شود.(۳)این فاکتور می‌تواند نقش حیاتی در تمایز جنسی و همچنین در توسعه ی سلولهایِ ژرمینال و گنادی داشته باشد.(۴)یک مطالعه ضربتی نشان داده است که ژن INSL3 برای بیضه ی نهفته[2] دوطرفه ضروری می‌باشد.(۵) در انسان جهش در این ژن ممکن است باعث ایجاد بیضه ی نهفته شود که این حالت یک نقص تکاملی است که در آن یک یا هر دو بیضه مشاهده نمی‌شود.(۶)این ژن ۳۱ آمینو اسید را کد می‌کند که اندازه MRNA آن ۸۱۰ باز می‌باشد. پروتئین کد شده توسط ژن INSL3 یک هورمون شبه انسولینی می‌باشد که عموماً از بافت‌های گنادی مردان ترشح می‌شود.و تولید آن بستگی به تأثیر تمایزی هورمون LH دارد.(۷و۸)

این فاکتور در گونادوتروپین مردان سالم ظاهر نمی‌شود ولی به طور قابل ملاحظه ای در پاسخ به محرومیت گونادوتروپین کاهش می‌یابد.(۲۷)

گیرنده ی این پروتئین شامل تکرارهای غنی از لوسین می‌باشد و به صورت LGR8 می‌باشد.یافته‌های اخیر دلالت بر نقش پاراکرینی INSL3 در بقای سلولهای ژرمینال آقایان دارد. این ژن انواع مختلفی از پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی[3] را دارد که می‌تواند در ایجاد ناباروری دخالت داشته باشد و به همین دلیل در این تحقیق rs2286663 مورد بررسی قرار می‌گیرد و به این سؤالات که آیا بین ژنوتیپ‌های CC,CT,TT و ناباروری ارتباط وجود دارد یا خیر پاسخ داده خواهد شد.

روش کار

در این مطالعه تعداد ۸۰ فرد فاقد اسپرم که با تشخیص پزشک متخصص ارولوژیست شناسایی شده بودو ۸۰ فرد که دارای حداقل یک فرزند می‌باشند به عنوان شاهد به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم مراجعه کردنداز افراد مورد مطالعه حدود ۳ میلی لیتر خون گرفته شد و سپس نمونه خون آنها در ظرف

1. Azoospermia

2. Cryptospermia
3. Single strand polymorphism

حاوی EDTA جمع آوری شده و با روش salting out نمونه DNA استخراج شده و با استفاده از اسپکتروفتومتر مقدار DNAی استخراجی و خلوص آن مشخص می‌شود،سپس با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز[1] و طراحی پرایمر اختصاصی ژن مربوطه تکثیر یافته و با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارزحضور قطعه ژن مورد

نظر تایید می‌شود و در نهایت با استفاده از روش هضم آنزیمی قطعه مورد نظر برش خورده و قطعات حاصله با استفاده از الکتروفورز بررسی شد. برای تکثیر ناحیه مورد نظر rs2286663 که دراگزون شماره یک ژن INSL3 و طول آن ۴۸۵جفت باز می‌باشد جفت پرایمرها forwardوreverse با استفاده از نرم افزار Oligo.5 طراحی شدند. پرایمرها از شرکت سیناژن تهیه شدند. پرایمرها به نسبت یک به پنج رقیق شدند. برای انجام PCR از پرایمرهای رقیق شده استفاده گردید. مواد مصرف شده در واکنش PCR ژن INSL3 شامل DNA template 40ng , Taq premix 10 µ l پرایمرF 5 µMو R بود.

جدول ۱- برنامه PCR ژن INSL3

تعداد سیکل	زمان	دما
۱	۵ دقیقه	۹۵
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۳
	۳۵ ثانیه	۵۹
	۳۵ ثانیه	۷۲
۱	۱۰	۷۲

پس از انجام الکتروفورز محصولات PCR آشکارسازی باندها توسط دستگاهGEI Documentation انجام شد و سپس محصولات حاصل از PCRدر حضور آنزیم Bsr1 تحت هضم قرار گرفتند. جایگاه شناسایی و برش آنزیم به صورت زیر است:

1 Polymerase Chain Reaction

↓

...A C T G G N...

...T G A C C N...

↑

با استفاده از نرم افزار هایو NEBcutter آنزیم محدود گر مورد استفاده انتخاب شد. برای بررسی rs2286663 آنزیم محدود گر *BsrI* انتخاب شد.

Thermo SCIENTIFIC

PRODUCT INFORMATION

BseNI (BsrI)

#ER0881 1000 U

Lot: ____ **Expiry Date: _**

5'...A C T G G N↓...3'

3'...T G A C↑C N ...5'

Concentration: 10 U/µL
Source: *Bacillus species* N
Supplied with: 1 mL of 10X Buffer B
1 mL of 10X Buffer Tango

Store at -20°C

B 65° 20° 80° LO

In total 3 vials. BSA included

www.thermoscientific.com/onebio

توالی پرایمر مورد استفاده در این واکنش به صورت زیر است:

AACCTGCCCACCTCCCTG

CACGTGTGCATCTGCGCCTACGTGCACCTGCC
CCACCTCGGCTTCCCAGAGCGCTGTCCC
TGCCCGTCCCCACTCACGGTCGCCTCCGGTCG
CAGGCCTCCTGGCTTCGGTGGACCAGCG
GGGGCCCCCGCACACGCGCACTAGCGCGCGT
ACGAAGTGGTGGCCGCACAACTTCTCACG
CATCTCTGGGGTGGGCGCGGGGCCCAACGCG
AACACCAGGGCAGGGCCCAGCAGCACCAG
C/T
GCCCAGGCGGGCAGACGGGGGTCCATGGTGG
TGGGTGGCGCCGGGGCCAAGCGGGGACCC
CCTTTATAGGCGCCTGGGCCGTCCCAGCTGGG
GGCCTTGGAGAAGGGACAGAACATTCTT
CAGGACCGCCCAGGAAAAAGGTCAAGGGTGG
GGTTAGTGCCAGAGCCTTTCTCCCAGGGC

شکل ۱- توالی پلیمر

جدول ۲- مشخصات جفت پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر rs2286663

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AACCTGCCCACCTCCCTG	18	61.26	66.67	2.00	1.00
Reverse primer	CTCGTTGCCCAGTGCTCC	18	60.74	66.67	3.00	1.00

واکنش RFLP[1] شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR ,۱واحد آنزیمBsr1 و۱میکرولیتر بافر مناسب می‌باشد. حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر بود.انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت.در پایان به منظور بررسی نحوه عمل آنزیم از الکتروفورز ژل آگارز٪۲ استفاده گردید.

آمار و آنالیز

در این مطالعه ۸۰ نفر به عنوان گروه کنترل که ۶۷ نفر ژنوتیپ CC و ۹ نفر ژنوتیپ CT داشتند و ۴ نفر ژنوتیپ TT داشتند و ۸۰ نفر به عنوان گروه بیمار ۶۰ نفر ژنوتیپ CC،۱۲ نفر ژنوتیپ CT و ۸ نفر ژنوتیپ TT داشتند در گروه کنترل فراوانی آلل C برابر با ۰.۹۰۵۵ و برای آلل T برابر با ۰.۰۹۴۵ می‌باشد.

در گروه بیمار فراوانی آلل C برابر با ۰.۸۴۴۴ و برای آلل T برابر با ۰.۱۵۵۶ می‌باشد.

در کل جمعیت فراوانی آلل C برابر با ۰.۸۷۵ و برای آلل T برابر با ۰.۱۲۵ می‌باشد.

۰.۸۷۵(۲) × ۰.۱۲۵(۲ × ۰.۸۷۵ ×۰.۱۲۵ = ۱

چون حاصل رابطه بالا برابر با یک شده است پس جمعیت در حال تعادل هاردی واینبرگ خواهد بود.

میانگین سن در افراد کنترل ۱.۹۴۳± ۲۹.۳۳ و در افراد بیمار ۲.۱۶۸ ± ۲۹.۹۲ می‌باشد و بین دو گروه مورد بررسی از لحاظ سن اختلاف معناداری ندارد.

نتایج برای بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی مورد نظر با ناباروری مردان با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن۵ /۱۱ آزمون انجام شد. با توجه به نتیجه آزمون Chi-squared (میزان =P value 5.838 و df=1) اختلاف بی معنی هست.در واقع تغییر نوکلئوتیدی مذکور در افراد با ناباروری ارتباط ندارد.

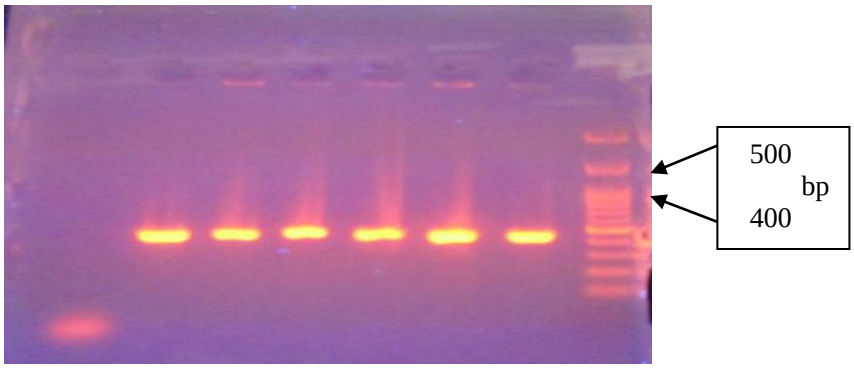
نتایج

در این تحقیق نمونه‌ها با استفاده از روش Salting Outاستخراج شدند، کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده الکتروفورز ژل آگارز بررسی شدند.

برای تکثیر ناحیه مورد نظر rs2286663 که دراگزون شماره یک ژن INSL3 قرار گرفته است. جفت پرایمرهای forward و reverse با استفاده از نرم افزار Oligo.5 طراحی شدند. جفت پرایمرها از شرکت سیناژن تهیه شدند. پرایمرها به نسبت یک به پنج رقیق شدند. برای انجام PCR از پرایمرهای رقیق شده استفاده گردید.

همانطور که قبلاً ذکر شده از یک جفت پرایمر طراحی شده برای تکثیر ناحیه مورد بررسی استفاده شد و پس از انجام PCR محصولات آن بر روی ژل آگارز.٪۲ الکتروفورز شدند.

1. PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism



شکل ۲- نتایج تکثیرشده با استفاده از آزمایش PCR بر روی ژل آگارز

قطعه تکثیر شده ۴۸۵ جفت باز می‌باشد و با توجه به الگوی نشانگر1kb مورد استفاده (چاهک شماره M) این قطعه بین باندهای 400 bp و ۵۰۰ bp نشانگر می‌باشد که با اندازه قطعه تکثیر شده مطابقت دارد.

نتایج آزمایش RFL-PCR

همان گونه که قبلاً ذکر شد تمامی نمونه‌های تکثیر شده با استفاده از PCR با استفاده از آنزیم محدود گر *BsrI* هضم شدند. سپس محصولات هضم بر روی آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند.

شکل۳- محصولات RFLP روی ژل آگارز ۲٪

پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی مورد بررسی (rs2286663) در حالت طبیعی در جایگاه نوکلئوتیدی ۵۰۳۲ می‌باشد که در شکل بالا نشان داده شده است و پس از هضم محصولات PCR با استفاده از آنزیم BsrI نمونه‌های حاوی نوکلئوتید C در هر دو آلل (هموزیگوت‌های طبیعی) در محل پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی مورد بررسی (rs2286663) دارای دو باند (7 bp و 478bp) می‌باشند و نمونه‌های دارای جهش هموزیگوت (احتمالاً دارای نوکلئوتید تغییر یافته T در هر دو آلل) دارای سه باندد (7bp و 223bp و 255bp) می‌باشند، زیرا تغییر نوکلئوتیدی C→T در محل مورد بررسی جایگاه برش آنزیم محدود کننده را از ایجاد می‌کند و بنابراین این نمونه‌ها دارای سه باند می‌باشند. همچنین نمونه‌های دارای جهش هتروزیگوت (احتمالاً دارای نوکلئوتید C در یک آلل و نوکلئوتید تغییر یافته T در آلل دیگر) دارای چهار باند (7 bp، 478 bp و 255 bp و 223bp) می‌باشند.

بحث

فعالیت‌های تولید مثلی مردان پروسه‌های فیزیولوژیکی پیچیده‌ای هستند. فاکتورهای پاتوژنیک تداخل کننده با هر یک از بخش‌ها ممکن است منجر به ناباروری شوند. اکنون به وضوح می‌دانیم که فاکتورهای زیادی مثل واریس بیضه[1]، بیضه نهفته[2]، عفونت تناسلی، کم کاری بیضه[3] و غیره می‌توانند منجر به ناباروری مردان شوند. اما هنوز اتیولوژی حدود ۵۰٪ از ناباروری مردان ناشناخته است و از آنها به عنوان

1 Varicoceles
2 Cryptospermia
3 Sub fertility

ناباروری ناشناخته مردان یاد می‌شود (۲۳). این موارد به خاطر اتیولوژی ناشناخته شان مشکلات زیادی را در تشخیص‌های کلینیکی و درمان ایجاد می‌کنند (۲۴). باروری مردان پروسه بسیار پیچیده ای است که به حدود ۲۰۰۰ ژن نیاز دارد که در مسیرهای متعدد کنترل کننده اسپرماتوژنز و همچنین نمو بیضه و حمایت از بیضه عمل می‌کنند (۳۲). گزارش‌های اخیر نشان داده اند که اختلالات ژنتیکی تأثیر گذار بر اسپرماتوژنز ممکن است مسئول اکثر موارد ناباروری ناشناخته مردان باشند

در این بررسی جهش تقاطعی[1] C→T ۵۰۳۲ را در ژن INSL3 بررسی کردیم و این تغییر منجر به تغییر آمینو اسید الانین نشد و همچین بررسی پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی موردنظر با روش‌های آماری ارتباط معناداری را با ناباروری نشان نداد. Jing Zhang و همکاران (۲۰۱۳) ارتباط ۵ پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن INSL3 (*rs28368062* و *rs28368064* و *rs79564060* و *rs23736832* و *rs28368082*) را با ناباروری مردان در جمعیت Han چین بررسی کردند. این گروه از تکنیک PCR-RFLP استفاده کردند. هیچکدام از این پلی مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی‌ها با ناباروری ارتباط معناداری نداشتند.

ژن IN L3S ممکن است عنوان تحقیقاتی مهمی در مطالعات ناباروری در آینده باشد. تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم[2] (ICSI) یکی از تکنولوژی‌های کمک باروری است. تشخیص ژن‌هایی که با ناباروری ارتباط کلینیکی دارند به توسعه تکنولوژی‌های جدید تر کمک خواهد کرد. جهش ژن INSL3می تواند به عنوان یک شاخص تشخیصی قبل از روش ICSI استفاده شود(۲۶).

جهش‌ها در ژن INSL3 ممکن است با ناباروری مردان مرتبط باشد. با توسعه تکنیک‌های بیولوژی مولکولی، نقش دقیق ژن INSL3در پاتوفیزیولوژی ناباروری ناشناخته مردان روشن خواهد شد (۲۶).

امروزه مشخص شده است که پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی با حساسیت به بیماری‌ها ارتباط دارند. بنابراین بررسی آنها امری ضروری به نظر می‌رسد. برای بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی‌ها با بیماری‌ها از دو نوع مطالعه مورد-شاهد[3] و مطالعات خانوادگی استفاده می‌شود. در مورد مطالعات مورد-شاهد ممکن است ارتباط مشاهده شده بین پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی مورد بررسی و بیماری مثبت کاذب باشد. برای جلوگیری از این مشکلات بهتر است افراد بیمار و افراد کنترل از یک جمعیت انتخاب شوند. رعایت این نکته بسیار ضروری است. زیرا گاهی یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی خاص در یک جمعیت شایع می‌باشد، یعنی هم افراد بیمار و هم افراد کنترل جمعیت آن پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی خاص را دارند. بنابراین اگر افراد بیمار از جمعیتی انتخاب شوند که پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در کل آن جمعیت رایج است و افراد کنترل از جمعیتی انتخاب شوند که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی مورد نظر در آنها شایع نیست، به طور غلط ارتباط مثبت مشاهده می‌شود. برای جلوگیری از این مشکل بهتر است افراد بیمار و کنترل از یک جمعیت انتخاب شوند. اگر افراد کنترل از خویشاوندان سالم افراد بیمار انتخاب شوند به میزان زیادی از ایجاد ارتباطات مثبت کاذب جلوگیری می‌شود.استفاده از مطالعات خانوادگی که در آن بیماری در نسل‌های مختلف خانواده‌ها بررسی می‌شود بسیار مناسب می‌باشد، استفاده از این روش مشکلات موجود در روش مورد-شاهد را ندارد. اما در این روش دسترسی به تعداد زیادی خانواده دارای بیماری مورد بررسی بسیار مشکل می‌باشد.

مسئله دیگری که توجه به آن ضروری است ناحیه

1 Cross mutation

2 Intracytoplasmic sperm injection

3 Case – Control

مورد بررسی می‌باشد. انتخاب ژن و ناحیه مورد بررسی با هر استدلالی که صورت گیرد توالی ناحیه مورد بررسی بسیار مهم می‌باشد. آیا در توالی ناحیه مورد بررسی پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی دیگری وجود دارد؟ چه بسا ارتباط با بیماری به دلیل وجود پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی دیگری در ناحیه مورد بررسی باشد.

در نهایت باید به این نکته توجه نمود که ارتباط پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی خاص با بیماری کاملاً به جمعیت مورد مطالعه بستگی دارد. چه بسا پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در یک جمعیت خاص با بیماری مورد بررسی ارتباط قوی داشته باشد و در جمعیتی دیگر اصلاً ارتباط نداشته باشد.

ما در این بررسی جهش تقاطعی$C \rightarrow T$ ۵۰۳۲را در ژن INSL3 بررسی کردیم و این تغییر منجر به تغییر آمینو اسید الانین نشدو همچنین بررسی پلی مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی مورد نظر با استفاده از روش‌های اماری ارتباط معناداری را با ناباروری نشان نداد.

منابع و مآخذ

1. Scott F.Gilbert. Developmental Biology.6th Edition.Chaptet 7 & 19.
2. Sandra Amaral and João Ramalho-Santos. Aging, Mitochondria and Male Reproductive Function. 2009. Current Aging Science. 2:165-173.
3. Shauf C, Moffett D and Moffett S. Reproduction and its Endocrinecontrol. 1990. In: Allen D, Ed. Human physiology. Times mirror/Mosbycollege publishing. US, St Louis: Missouri. pp. 646-661.
4. Junqueira LC and Carneiro J. The male reproductive system.2003. In:Foltin J, Lebowitz H and Boyle P, Eds. Basic histology. US:MacGraw Hill companies. pp. 431-447.
5. Holstein AF, Schulze W and Davidoff M. Understanding spermatogenesisis a prerequisite for treatment. 2003. Reprod Biol Endocrinol. 1: 107.
6. Hess RA. Spermatogenesis, overview. 1999. In: Knobil E and Neill JD,Eds. Enciclopedia of reproduction. San Diego: Academic Press. pp. 539-545.
7. Kreteser DM and Kerr JB.The Cytology of the testis.1994. In: KnobilE and Neill JD, Eds.The physiology of reproduction. New York:Raven Press Ltd. pp. 1212-1241
8. Holdcraft RW and Braun RE.Hormonal regulation of spermatogenesis. 2004. Int J Androl. 27: 335-342.
9. Maclachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, De Kretser DM andRobertson DM. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. 1996. J Endocrinol. 148: 1-9.
10. Rooij, D. G. and Mizrak, S. C.Deriving multipotent stem cells from mousespermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. 2008. Development. 135, 2207-2213
11. Cheng, C. Y. and Mruk, D. D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoligermcell interactions and male contraceptive development. 2002. Physiol. Rev. 82, 825-874
12. Yan C. Cheng and Dolores D. Mruk.The biology of spermatogenesis: the past, present and future. 2010. Phil. Trans. R. Soc. B. 365, 1459–1463.
13. Adolf-Friedrich Holstein ,Wolfgang Schulze and Michail Davidoff. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. 2003. Reproductive Biology and Endocrinology. 1:107
14. Pearl P. Y. Lie and Dolores D. Mruk, Will M. Leeand C. Yan Cheng. Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. 2010. Phil. Trans. R. Soc. B. 365, 1581–1592.
15. Norman B. H. Molecular mechanisms of malegerm cell differentiation. 1998. Bio Essays. 20:555–561.
16. Russell LD, Griswold MD. The Sertoli cell.1993. Cache River Press, Clearwater FL.
17. Breucker H, Schaefer E, Holstein AF. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. 1985. Cell Tissue Res. 240:303–309. [PubMed]
18.. Kavita Shah, Gayathri Sivapalan, Nicola Gibbons, Helen Tempestand Darren K. Griffin. The genetic basis of infertility. 2003. Reproduction. 126, 13–25.
19. Bielanski, W., Kaczmarski, F. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normalfertility. 1979. J. Reprod. Fertil. Suppl. 27: 39-45.
20. Johnson, L., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Scrutchfield, W. L. Factors affectingspermatogenesis in the stallion. 1997. Theriogenology. 48: 1199-1216.
21. Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: whatwe ask them to survive. 1990. J. Androl. 11: 73-88
22. Kim KS, Cha MC, Gerton GL. Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. 2001. Biol Reprod 64: 36–43.

23. Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation andacrosomal reaction. 2002. Mol Cell Endocrinol. 187: 139–144.

24. Brucker C, Lipford GB. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanism. 1995. An update. Hum Reprod update 1(1): 51–62.

25. Boue F, Blais J, Sullivan R. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. 1996. Biol Reprod 54: 1009–1017.

26. 186. Jing Zhang and Dang-xia Zhou & Hai-xu Wang & Zhao Tian. An association study of SPO11 gene single nucleotide polymorphisms with idiopathic male infertility in Chinese Han population. 2011. J Assist Reprod Genet. 28:731–736.

27. Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. 1994. In: Knobil, E., Neill,J.D. (Eds.), The physiology of reproduction, Vol. 2. Raven Press, NewYork.

28. Tsai PS, Gil NG, Haeften TV, Gadella BM. How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane. 2010. PLoS ONE. 5(6): e11204.

29. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gameteadhesion, exocytosis, and fusion.1999. Cell. 96: 175–183.

30. Nagae, T., Yanagimashi, R., Srivastava, P.N., Yanagimashi, H.Acrosome reaction in human spermatozoa. 1986. FertilSteril. 45, 701–707.

31. Krausz, C., Bonaccorsi, L., Maggio, P., Luconi, M., Criscuoli, L., Fuzzi,B., Pellegrini, S., Forti, G., Baldi, E.Two functional assays ofsperm responsiveness to progesterone and their predictive values ininvitro fertilization. 1996. Hum. Reprod. 11, 1661–1667.

32. Huckins C.& Hellerstein D. Spermatogenesis in the adult: characteristics, kinetics and control. 1991. In: Infertility in the male. Eds: Lipshultz L. I., Howards S. S., Mosby-Year Book Inc., St. Louis.

33. Dana A. Ohl and and Alan C. Menge. Assessment of sperm function and clinical aspects of impaired sperm function. 1996. Frontiers in Bioscience.1, e96-108.

34. Brooks.D.E. Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. 1981. Physiol Rev. 61, 515- 55.

35. Settlage. D.S., Motoshima.M & Tredway.D.R. Sperm transport from the external cervicalos to the fallopian tubes in women: a time and quantitation study. 1973. FertilSteril. 24, 655-61.

36. Chang. M.C.The meaning of sperm capacitation.A historical perspective.1984.J Androl. 5, 45-50.

37. Burkman. L. The motility of human spermatozoa before and after capacitation. 1995. In: Gametes-The Spermatozoon. Eds: Grudzinskkas J., Yovich J., Cambridge University Press, Cambridge.

38. Bedford.J.M. Sperm capacitation and fertilization in mammals. 1970. BiolReprod. 2, 128-58.

39. Liu.D.Y & Baker. H.W. Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zonapellucida. 1993. BiolReprod. 48,340-8.

40. Urch.U.A , Wardrip.N.J & Hedrick.J.L. Proteolysis of the zonapellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis products. 1985. J ExpZool. 236, 239-43.

41. Duin.M. van., Polman.J.E. , Breet.I.T. De., Ginneken.K.van., Bunschoten. H., Grootenhuis.A., Brindle.J.& Aitken.R.J. Recombinant human zonapellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. 1994. BiolReprod. 51, 607-17.

42. Tesarik.J. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. 1989. Hum Reprod. 4, 957-61.

43. World Health Organization .Laboratory manual for the examination of human semen and semencervical mucus interaction. 1992. Cambridge University Press, Cambridge.

44. Pickett, B. W. Factors affecting sperm production and output. 1993. In: Mckinnon, A. O., Voss, J. L.Equine Reproduction. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 689-704.