بررسی شیوع ریزحذف‌های نسبی gr/gr, b1/b3, b2/b3 در مردان الیگواسپرم ایرانی

پریچهر یغمایی[۱]، ناصر سلسبیلی[۲]، نسیم حیاتی رودباری[۱]، رضا میرفخرایی[۳]، مریم منتظری[۴] و میترا عطایی[۱*]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۲ـ دانشگاه تهران، دانشکده پزشکی، تهران، ایران

۳ـ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران

۴ـ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: ataei_mitra@yahoo.com

چکیده

کروموزوم Y انسان شامل ژن‌هایی است که بر روی یک ناحیه بزرگ جایگزین شده‌اند و به نواحی AZFc, AZFb, AZFa معروف می‌باشند. حذف در این ژن‌ها با نقایصی در اسپرماتوژنز همراه می‌باشد که منجر به الیگواسپرمی و آزواسپرمی می‌گردد. حذف‌های نسبی ناحیه AZFc به عنوان یک فاکتور خطر مهم برای الیگواسپرمی و آزواسپرمی گزارش شده است. هدف اصلی از این پژوهش بررسی شیوع ریزحذف‌های نسبی کروموزم Y (gr/gr, b1/b3, b2/b3) در مردان الیگواسپرم می‌باشد. ۳۰ مرد الیگواسپرمی با میزان اسپرم کمتر $۱۰^{۶}\times۱۰$ و ۵۰ مرد بارور به عنوان گروه شاهد در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی ریزحذف‌های gr/gr, b1/b3, b1/b2 از روش Multiplex PCR استفاده گردید. درمجموع ۵ فرد بیمار بافراوانی ۱۷٪ و ٦ فرد سالم با فراوانی۱۲٪ دارای حذف بودند.در بیماران ٤ فرد با فراوانی ۱۳/۷٪ حذف gr/gr و ۱ نفر با فراوانی ۳/٤٪ حذف b2/b3 را نشان دادند. در بین افراد سالم ۵ نفر با فراوانی۱۰٪ دارای حذف gr/gr و۱ نفر با فراوانی۲٪ حذف b2/b3 را آشکار ساختند. این نتایج پیشنهاد می‌کند اگر چه شیوع ریزحذف‌های ناحیه AZFc در مردان نابارور ایرانی پایین می‌باشد، اما انجام تحقیقات مولکولی قبل از شروع هر اقدام درمانی مفید می‌باشد.

کلمات کلیدی: ریزحذف های کروموزم Y، حذف نسبی، الیگواسپرمی

مقدمه

نقص در فرآیند اسپرماتوژنز منجر به ناباروری می‌گردد. اختلال اسپرماتوژنز روی پارامترهای پلاسمای منی تاثیر گذاشته و منجر به کاهش تراکم اسپرم، کاهش تحرک اسپرم و افزایش مورفولوژی‌های غیرطبیعی می‌گردد [۳]. Tiepolo و Zuffardi در سال ۱۹۷٦ برای اولین بار فرضیه ارتباط بین حذف‌های کروموزوم Y و ناباروری را ارائه دادند. ریزحذف های بازوی بلند کروموزوم Y توسط آنالیز کاریوتایپ در ٦ مرد آزواسپرمی شناسایی شد. این امر منجر به تشخیص فاکتور ضروری در فرایند اسپرماتوژنز یعنی AZF (فاکتور آزواسپرمی) گردید [١٤]. سپس Vogt و همکارانش در سال ۱۹۹۸ تشخیص دادند که ریزحذف-های کروموزوم Y از یک الگوی حذف معین (با ۳ حذف شدگی متداول و احتمالا غیرهمپوشان) در زیرواحدهای نزدیک، میانی و دور در ناحیه Yq11 پیروی می‌کنند این نواحی به ترتیب با AZFc, AZFb, AZFa مشخص می‌شوند [١٦]. اکثر ژن‌های کاندید درگیر در فرایند اسپرماتوژنز در این ۳ ناحیه قرار دارند. AZFa شامل دو ژن عمده DFFRY و DBY می‌باشد. منطقه AZFb نیز ژن RBMY را در برمی‌گیرد که تنها در غدد جنسی بیان می شود. خوشه ژنی DAZ نیز در ناحیه AZFc قرار

داشته و منحصرا در سلولهای زایا بیان می‌شود. ژن DAZ از اعضای یک خانواده چند ژنی است و دارای حداقل ٤ کپی بوده که نوعی پروتین متصل به RNA را کد می کند [۱۳]. این ژن دچار برخی ریزحذف‌های نسبی می‌گردد. آنالیز جز به جز ناحیه AZFc با استفاده از مارکرهای ملکولی جدید وجود ۳ نوع از چنین حذف‌هایی را به نام gr/gr, b1/b2, b1/b3 ثابت کرده است. برخی از این حذف‌ها اثرات کمی برروی باروری دارند در عوض بعضی دیگر از آنها دارای ریسک بالایی در ارتباط با نقص اسپرماتوژنز می‌باشند [۱۲]. Vogt و همکارانش یک حذف بزرگ در ناحیه AZFc که شامل توالی‌هایu3, DAZ3/4 که gr/gr نامیده می‌شود را توضیح دادند [۱۷]. نتیجه حذف‌های b1/b3, b2/b3 به طور مشابه باعث حفظ دو کپی از ژن DAZ و یک کپی یا دوکپی از ژن BPY2 می-گردد. ثابت شده است که غالبا حذف‌های gr/gr توسط نوترکیبی بین توالی‌های تکراری g و r رخ می‌دهند که این امر منجر به حذف دو کپی از چهار کپی ژن DAZ و یکی از سه کپی ژن BPY می‌گردد [۹]. از آنجایی‌که این موضوع که حذف‌های کامل کروموزوم Y به عنوان یک عامل مهم اختلالات شدید اسپرماتوژنز می‌باشند به خوبی پذیرفته شده است اما ارتباط بین حذف‌های نسبی ناحیه AZFc و ناباروری مردان هنوز مشخص نشده است لذا عدم وجود حذف‌های ناحیه AZFc در بیماران الیگواسپرمی مورد مطالعه، ما را بر آن داشت تا به بررسی نقش حذف‌های نسبی کروموزوم Y در تعدادی از بیماران فاقد حذف‌های کامل بپردازیم.

مواد و روش کار

این تحقیق بر روی بیماران الیگواسپرمی با میزان اسپرم کمتر از $۱۰^{٦} \times ۱۰$ کاندید ICSI صورت گرفت. تعداد ۳۰ فرد مبتلا به الیگواسپرمی و ۵۰ فرد بارور (به عنوان نمونه‌های کنترل) جهت انجام آزمایشات انتخاب شدند. نمونه‌های بیماران از مراکز ناباروری کوثر و مرکز IVF بیمارستان میرزا کوچک خان که نوع باروری آنها بر اساس آنالیز پلاسمای منی بر مبنای دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی تعیین شده بود جمع‌آوری گردید. خونگیری پس از کسب رضایت از بیماران انجام گردید. هر نمونه شامل ۵ سی‌سی خون بود. نمونه‌های کنترل نیز از مردان سالم داوطلب با میزان اسپرم $>۲۰\times۱۰^{٦}$ که حداقل دارای یک فرزند بودند دریافت گردید. DNA ژنومی از لنفوسیت‌های خون محیطی با استفاده از کیت تدبیر فن آزما جداسازی گردید. اساس بررسی پلی مورفیسم‌های gr/gr, b1/b2, b2/b3 در این تحقیق، استفاده از روش های مولکولی جهت بررسی پلی‌مور فیسم‌های ذکر شده بود ابتدا ریز حذف‌های کلاسیک سه ناحیه AZF مورد مطالعه قرار گرفت و افرادی که فاقد حذف در این مناطق بودند از نظر حذف‌های نسبی ناحیه AZFc مورد آزمایش قرار گرفتند. درارتباط با بررسی حذف‌های کامل ناحیه AZF سه واکنش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هشت مارکر STS در بازوی بلند کروموزوم (دو مارکر STS به ازاء هر یک از نواحی AZFa، b ، c، d) استفاده شد (جدول۱). لازم بذکر است که از پرایمرهای اختصاصی مناطق SRY و ZFY به عنوان کنترل استفاده گردید. دو مارکرsY84, sY86 به دلیل عدم تفکیک مناسب آنها بر روی ژل آگاروز بصورت واکنش PCR جداگانه مورد بررسی قرارگرفتند. جهت بررسی حذف‌های gr/gr و b1/b3 و b2/b3 پرایمرهای اساسی یعنی sY1191 و sY1291 را انتخاب کردیم. پرایمر sY1191 برای حذف‌های gr/gr و b1/b3 اختصاصی بوده و پرایمر sY1291ویژه حذف b2/b3 می باشد [۵]. توالی پرایمرها

و ناحیه مربوطه در جدول ۱ ذکر گردیده است. چهار واکنش Multiplex PCR طراحی گردید: واکنش A شامل پرایمرهای ZFY، sY254 و sY127، واکنش B: SRY، sY134 و sY125 و واکنش C: SRY، sY145، sY153، واکنش D نیز شامل sY1191 و sY1291. بود مواد متشکله هر واکنش 50µl PCR عبارت بودند از ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ Pmol/l تا ۱/۵ mgcl2، ۱۰mmol/l از dNTP، ۱۰pmol/l از هر پرایمر ۵ µl از PCR Buffer و ۲ u آنزیم Taq پلیمراز. برنامه PCR شامل مرحله واسرشتی اولیه در ۹٤° C به مدت ۲ دقیقه، ۲۸ سیکل شامل ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٦°c به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°c به مدت ٤٥ ثانیه و در نهایت ۱ مرحله طویل سازی نهایی در ۷۲ °c به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام PCR، جهت آنالیز حذف‌های مربوطه، محصولات هر واکنش بر روی ژل آگاروز ۲٪و یا ژل اکریل‌آمید ۱۰٪ جداسازی شدند. به منظور آنالیزهای آماری، نرم افزار SPSS مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی ارتباط میان عوامل نیز از روش‌های Fisher Exat test بهره گرفتیم. در تمامی آزمون‌ها مقادیر Pvalue کمتر از ۰/۰۵ به عنوان مقادیر دارای ارزش آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

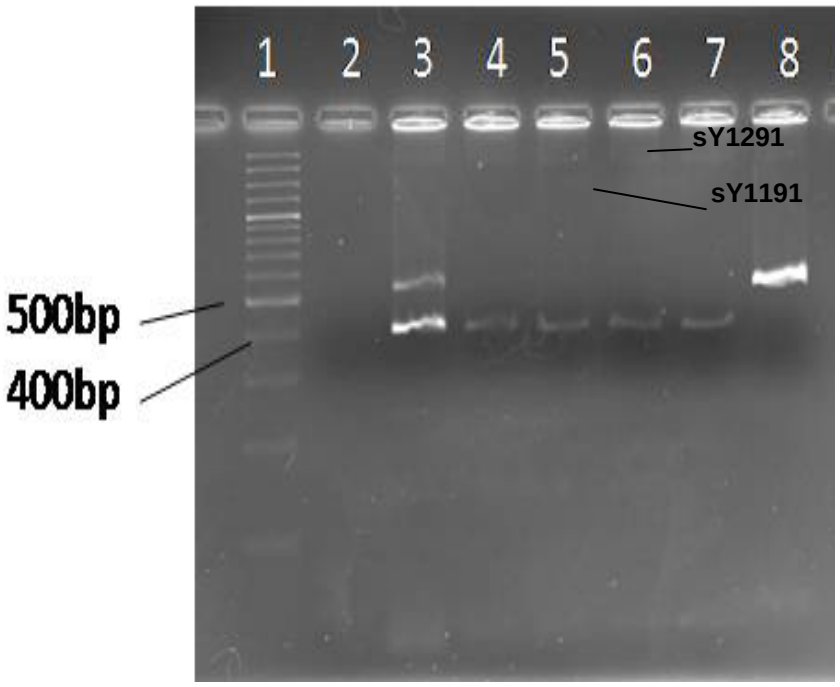
در خصوص حذف‌های کامل تنها یک نفر دارای حذف در ناحیه AZFb بود. بیماران و نمونه‌های کنترل ما در خصوص حذف‌های نسبی AZFc نتایج متفاوتی را از خود نشان دادند. با توجه به موقعیت باندها، نوع حذف بر اساس جدول ۱ ارزیابی گردید. در کل ۱۱فرد (بیمار و سالم) دچار حذف‌های نسبی بودند. ۵ مرد الیگواسپرمی و ٦ فرد سالم دارای این حذف‌ها بودند حذف gr/gr در ٤ بیمار مشاهده گردید درحالی‌که درافراد سالم این حذف در ۵ نفر وجود داشت. حذف b2/b3 نیز در ۱بیمار و ۱ فرد سالم آشکار شد. حذف b1/b3 در هیچکدام از افراد بیمار و سالم مشاهده نشد. فراوانی حذف gr/gr در بیماران ۱۳/۷٪ و در افراد سالم ۱۰٪ بود و فراوانی حذف b2/b3 در بیماران ۳/٤٪ و در افراد سالم ۲٪ برآورد شد. حذف‌های gr/gr مهمترین حذف‌های این ناحیه می‌باشند (شکل ۱). مقایسه جهش gr/gr در دو گروه مردان الیگواسپرمی و سالم تفاوت معنی‌داری را بین این دو گروه نشان نداد (P =۰/۲٥٤). مقایسه جهش b2/b3 در دو گروه مردان الیگواسپرمی و سالم نیز تفاوت معنی‌داری را بین این دو گروه نشان نداد (P=۰/٤۷٦).

جدول ۱ـ طبقه بندی حذف های نسبی AZFc

sY1191	sY1291	AZFc deletion pattern
+	+	No deletion
+	−	gr/gr deletion
−	+	b2/b3 deletion
−	−	b1/b3 deletion

جدول ۲ـ توالی پرایمرها و ناحیه مربوط به هر پرایمر

STS	ناحیه AZF	اندازه محصول PCR(bp)	توالی پرایمر
sY84	AZFa	۳۲۶	F:5’AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT3’ R:5’GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC3’
sY86	AZFa	۳۲۰	F:5’GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC3’ R:5’ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT3’
sY127	AZFb	۲۷٤	F:5’GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA3’ R:5’CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA3’
sY134	AZFb	۳۰۱	F:5’GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG3’ R:5’ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA3’
sY254	AZFc	٤۰۰	F:5’GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA3’ R:5’GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C3’
sY255	AZFc	۱۲٦	F:5’GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT3’ R:5’CTC GTC ATG TGC AGC CAC3’
sY145	AZFd	۱۲٥	F:5’CAA CAC AAA AAC ACT CAT TACTCG3’ R:5’GGG CAT TGT ATG TTA ATA AGA GTT3’
sY153	AZFd	۱۳٥	F:5’GCA TCC TCA TTT TAT GTC CA3’ R:5’ATG AGT CAC GAA AAC CCA AC3’
sY1191	AZFc	۳۹٥	F:5′-CCAGACGTTCTACCCTTTCG-3′ R:5′-GAGCCGAGATCCAGTTACCA-3
sY1291	AZFc	٥۲۷	F:5′-TAAAAGGCAGAACTGCCAGG-3′ R:5′-GGGAGAAAAGTTCTGCAACG-3′
ZFY	–	٤۹٥	F:5′-ACCRTCGTACTGACTGTGATTACAC-3′ R:5′-GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT-3′
SRY	–	٤۷۲	F:5′-GAATATTCCCGCTCTCCGGA-3′ R:5′-GCTGGTGCTCCATTCTTGAG-3



شکل۱ـ نمونه‌هایی از افراد دارای حذف در ناحیه sY1191 ,sY1291. ستون۱ مارکر ۱۰۰جفت باز. ستون۲ کنترل منفی. ستون ۳ نمونه شاهد. ستون ۷-٤ نمونه‌های بیمار دارای حذف در ناحیه sY1291. ستون ۸ نمونه بیمار دارای حذف در ناحیه sY1191.

بحث

مطالعه حاضر بر روی مردان الیگواسپرمی با میزان شمارش اسپرم کمتر از ۱۰ میلیون که هدف درمان از طریق ICSI بودند انجام شد. از دیدگاه کلینیکی بررسی ریزحذف‌های کروموزوم Y می‌تواند در پیشگوئی نتایج حاصل از استفاده از روش‌هایی نظیر TESE/ICSI کمک نماید. چرا که حذف کامل AZFa ، AZFb، AZFbc وAZFabc با سندروم SCO همراه است و امکان بازیابی اسپرم از بافت بیضه وجود ندارد. حذف کامل ناحیه AZFb باعث توقف اسپرماتوژنز و عدم بلوغ اسپرم می‌گردد در حالی‌که حذف ناحیه AZFc با فنوتیپ متغیری از الیگواسپرمی شدید تا آزواسپرمی همراه است و حذف‌های جزئی در ناحیه اخیر هم می‌تواند باعث کاهش اسپرم شود و هم می‌تواند با فنوتیپ طبیعی همراه باشد در تعداد زیادی از مردان که دارای اختلال در فرایند اسپرماتوژنز می‌باشند علت واضحی که مسئول ناباروری این افراد باشد نمی‌توان مشخص نمود. از آنجائی‌که حذف‌های نسبی ناحیه AZFc در جمعیت عمومی افراد بارور نیز مشاهده می‌شوند، در ابتدا چنین تصور می‌شد که آنها هیچ‌گونه تاثیری بر روی باروری افراد ندارند. اما در سال‌های اخیر جهت تشخیص ارتباط بین این ریزحذف‌ها با ناباروری مطالعات زیادی انجام پذیرفته است، اما نتایج در جمعیت‌های مختلف، متفاوت بوده است. در بررسی حاضر نیز حذف gr/gr بیشترین فرکانس را در جمعیت بیمار و گروه کنترل نشان داده است. به طوری که در این تحقیق ٤ فرد دارای حذف gr/gr (با فراوانی ۱۳/۷٪) و ۱ فرد دارای حذف b2/b3 (۳/٤٪) بودند و در گروه کنترل نیز جمعاً ٦ فرد (با فراوانی ۱۲٪) دارای این

ریزحذف‌ها بودند که ۵ فرد از آنها دارای حذف gr/gr (با فراوانی ۱۰٪) و ۱ نفر دارای حذف b2/b3 (با فراوانی ۲٪) که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نبود (P=./۲۵٤). در سایر مطالعات نسبت‌های متفاوتی از این حذف‌ها گزارش شده است. از بین این حذف‌ها فقط حذف DAZ1/DAZ2 که توسط نوترکیبی gr/gr ایجاد می‌شود علت مهم اختلال اسپرماتوژنز است. از نظر درصد شیوع بر طبق تحقیقاتی بر روی جمعیت آسیای شرقی فراوانی، حذف gr/gr در بیماران و گروه کنترل به ترتیب دارای ۱۰/۳ و ۱۰/۱ درصد تخمین زده است و در نهایت مطالعاتی که بر روی مردان الیگواسپرمی و آزواسپرمی جمعیت ایرانی در سال ۱۳۸۷ انجام شد فراوانی حذف gr/gr در بیماران مورد مطالعه در مقایسه با فراوانی این ریزحذف در جمعیت افراد بارور اختلاف معنی‌داری را نشان نداد [۱]. لذا نتایج تحقیق حاضر تاییدی است بر مطالعاتی که تاکنون در جمعیت‌های اروپایی، چینی و ایرانی انجام شده است اما فرکانس حذف در افراد نابارور ایرانی با سایر کشورها متفاوت است که می‌تواند ناشی از تعداد کم نمونه‌ها باشد لذا جهت تایید این موضوع تحقیقات بیشتری مورد نیاز می باشد. De Llanos در سال ۲۰۰۵ شیوع حذف‌های gr/gr در مردان الیگواسپرمی کاندید ICSI را در حدود ۵-۳ %گزارش کرد[11] و اعلام داشت که حذف‌های gr/gr به‌عنوان یک عامل خطر برای اختلال در اسپرماتوژنز مطرح می باشند [٤]. Visser در سال ۲۰۰۹ آزمایشات متاآنالیز را بر روی ۷ مطالعه‌ای که از سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۸ گزارش شده بود انجام داد او مشاهده کرد که حذف‌های gr/gr در مردان الیگواسپرمی و آزواسپرمی در مقایسه با گروه کنترل دارای فرکانس بالاتری بودند علاوه بر آن در مردان با حذف gr/gr میزان کمتری اسپرم در پلاسمای منی وجود داشت در مطالعه حاضر نیز افراد دارای حذف gr/gr دارای میزان کمتری اسپرم در پلاسمای منی بودند [۱۵]. Kihalicf و همکارانش جهت تاثیر زمینه ژنتیکی افراد و میزان وقوع این حذف‌ها، دو جمعیت ژاپنی و آفریقایی را مورد بررسی قرار دارند. آنها فرکانس ٦/۲% حذف‌ها را در جمعیت ژاپنی اعلام داشتند در حالی‌که در نمونه آفریقایی هیچ‌گونه حذفی وجود نداشت. لذا از جمله عوامل دیگری که سبب اختلاف در نتایج تحقیقات متفاوت می‌شود زمینه ژنتیکی جوامع مختلف است که خود منشا در هاپلوگروه‌های کروموزوم Y در جمعیت های مورد مطالعه دارد طبق نظر این دانشمند هاپلوگروه E در مقایسه با سایر هاپلوگروه‌ها بیشتر دچار حذف می‌گردد و هاپلوگروه J در برابر وقوع حذف‌ها از مقاومت بیشتری برخوردار است [٦]. علاوه بر آن که مطالعه‌ای که توسط Nebel و همکارانش انجام شد نشان داده شده است که ذخیره کروموزومی Y فلسطینی ها از اروپایی‌ها و دیگر جمعیت‌های خاورمیانه متفاوت است [۱۰]. به طور مثال حدود ۵۵,۲% فلسطینی‌ها که مورد بررسی قرارگرفتند دارای هاپلوگروه J بودند که نسبت به این حذف‌ها مقاومت نشان می‌دهند. درحالی‌که در جمعیت شرق آسیا هاپلوگروه D با ریزحذف gr/gr ارتباط معنی-داری را نشان داده است.بنابراین طبیعی است در ایران نیز به دلیل موقعیت جغرافیایی و منطقه‌ای این کشور هاپلوگروه های متنوعی یافت می‌شود که انواع G, R, J از فراوانی بیشتری برخوردار می باشند. لذا این عامل نیز می-تواند علت اختلاف آماری ما باشد. بنابراین جهت تعیین نقش حذف gr/gr در قالب هاپلوگروه‌های Y مطالعات بیشتری باید انجام شود. البته فاکتورهای مختلفی وجود دارند که بر روی نتایج مطالعات اثر می‌گذارند. به‌طوری که تفاوت مشاهده شده در حذف‌های ناحیه AZF در مطالعات مختلف می‌تواند ناشی از ترکیب جمعیتی متنوع، تفاوت معیار و ملاک‌های انتخاب بیماران مورد بررسی، اثرات محیطی و همچنین نحوه طبقه‌بندی استفاده شده برای تعریف الیگواسپرمی که از میزان اسپرم ^{٦}۱۰×۱ و ^{٦}۱۰×۲ و ^{٦}۱۰×۵ متفاوت باشد ناشی می‌شود. به عنوان مثال Vogt در سال ۱۹۹٦ معیار االیگواسپرمی را در مطالعات خود کمتر

از ۲×۱۰^{۶} اسپرم در میلی لیتر در نظر گرفت اما در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰٤ توسط Currara و در سال ۲۰۰٦ توسط Mellani انجام پذیرفت معیار الیگواسپرمی کمتر از ۱×۱۰^{۶} اسپرم در میلی لیتر بود که مسلماً این امر بر روی نتایج مطالعات تاثیر بسزایی دارد [۸]. علاوه بر آن در برخی از مطالعات اکثریت بیماران انتخاب شده شامل مجموعه‌ای از ترکیب افراد نابارور با علل ناشناخته و افراد نابارور با علت مشخص بوده‌اند حتی تعداد بیماران مورد بررسی در هر تحقیق نیز با یکدیگر تفاوت داشته است [۲].

منابع

۱. رحمانی، س. ۱۳۸۷. بررسی ریزحذف های کروموزم Y در مردان نابارور ایرانی. رساله کارشناسی ارشد.

2. Arruda, J T., Bordin, B M., Santos, P R., Mesquita, W E., Silva, RC., Maia, MC., Approbato, MS., Florencio, R S., Amaral, W N., Rocha Filho, M A. & Moura, K K. (2007), Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients. Genetics and Molecular Research, 6 (2), 461-9.

3. Blanchard, Y., Lescoat, D. & Le Lannou, D. (1990). Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. Andrologia journal, 22 (6), 549-55.

4. De Llanos M, Ballesca JL, Gazquez C, Margarit E and Oliva R (2005), High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates. Human Reproduction 20,216–220.

5. Ferlin, A., A. Tessari, et al. (2005), "Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility." Journal of Medical Genetics, 42(3): 209-13.

6. Ferlin A, Arredi B. A., E Speltra, et al (2007), Molecular and clinical characterization of Y chromosome micro deletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 97, 762-770.

7. Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E & Simoni M (2005). Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. Human Reproduction, 20 (1), 191-7.

8. J.T., A., B.M., B & .SntosP.R. (2007), Y chromosome microdeletions in brazilian fertility clinic patients. Genetics and Molecular Research, 6, 461-469

9. Lynch M, Cram D.S. (2005), The Y chromosome gr/gr subdeletion is

10. associated with male infertility. Molecular Human reproduction, 11(7): 507-512.

11. Nebel, A., Filon, D., Brinkmann, B., Majumder, P. P., Faerman, M. & Oppenheim ,A. (2001), The y chromosome pool of Jews as part of the genetic landscape of the Middle East. American Journal of Human Genetics, 69 (5), 1095-1112.

12. Repping S, Skaletsky H, Brown L et al. (2003), Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. Nature Genetics, 35, 247–251.

13. Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S. (2004), A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. Genomics, 83(6):1046-52.

14. Saxena R, devries JW., Repping S (2000), Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. Genomics, 67, 256-267

15. Tiepolo, L. & Zuffardi, O. (1997), Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. . Human Genetics, 34 (2), 119-24.

16. Visser. L, W. G., Korver. C.M, Van Delen. S.K.M, Hovingh. S.E, Rozen. S, Vanderveen. F, Repping. S. (2009), Y chromosome gr/gr deletions are a risk factor for low semen quality. Human Reproduction, 1-7.

17. Vogt, P. H. (1998a), Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. Molecular Human Reproduction, 4 (8), 739-744.

18. Vogt, P. H., Edelmann, 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. & Haidl, G. (1996), Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Human Molecular Genetics, 5 (7), 933-43.