مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و نهم، شماره یازدهم، بهمن ۱۴۰۰
تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۰۵/۰۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۱۰/۱۴

بررسی اختلالات تعدادی در کروموزم های X،۱۸ و Y در مردان نابارور الیگوتراتواسپرمی توسط تکنیک FISH

مهسا نصراصفهانی[۱]، سیدمهدی کلانتر[۲]، فاطمه منتظری[۳]، محیا رجبی[۴،۲]، فاطمه دانشمند*[۵]

مقاله پژوهشی

مقدمه: ناباروری، عدم باروری بعد از یک سال مقاربت بدون استفاده از وسایل جلوگیری است. ناباروری در گذشته عمدتاً مشکل زنانه بود اما با مشخص شدن نقش فاکتورهای مردانه، درصد قابل توجهی از ناباروری‌ها به نواقص اسپرم اختصاص یافت.

روش بررسی: این مطالعه به صورت مورد- شاهدی از نمونه‌های اسپرم، ۳۰ مرد نابارور مبتلا به الیگوتراتواسپرمی به‌عنوان گروه مورد و ۳۰ مرد بارور بدون سابقه ناباروری و دارای اسپرم نرمال به عنوان گروه شاهد، همه افراد بیمار و شاهد در محدوده سنی ۲۰ تا ۴۹ سال، که برای درمان ناباروری به پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد مراجعه کرده بودند، به منظور بررسی کروموزوم های X،۱۸ و Y با استفاده از تکنیک FISH انجام گرفت. نتایج با نرم‌افزار SPSS version 16 و تست‌های آماری T-TEST و Chi-Square Tests برای تجزیه و تحلیل آماری و ضریب همبستگی R پیرسون به منظور سنجش ارتباط بین متغیرها و سطح آماری P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: اختلالات مشاهده شده در مردان نابارور الیگوتراتواسپرمی در ارتباط با گروه کنترل و بین اختلالات کروموزومی، شمارش، مورفولوژی اسپرم (P<۰/۰۱) و مدت زمان ناباروری (P<۰/۰۱) ارتباط معناداری وجود داشت. هم‌چنین، بررسی اختلالات کروموزومی با سن افراد عدم وجود همبستگی بود ولی نرخ اختلالات کروموزومی در گروه سنی ۴۹-۴۰ سال به ۵۰٪ افزایش یافته، که بالاترین میزان در بین گروه‌های سنی داشته است و قطعاً نیاز به بررسی در جامعه آماری بزرگتری دارد.

نتیجه‌گیری: بیماران مبتلا به OT ممکن است در معرض خطر افزایش تولد نوزادان آنیوپلوئیدی باشند که پیشنهاد به بررسی آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی توسط تکنیک‌های مولکولار سیتوژنتیک مانند FISH می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ناباروری مردان، اختلالات کروموزومی، الیگوتراتواسپرمی، تکنیک FISH

ارجاع: نصراصفهانی مهسا، کلانتر سیدمهدی، منتظری فاطمه، رجبی محیا، دانشمند فاطمه. **بررسی اختلالات تعدادی در کروموزم های X،۱۸ و Y در مردان نابارور الیگوتراتواسپرمی توسط تکنیک FISH**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۱۱): ۲۱-۴۳۱۲.

۱- گروه آموزشی بیوشیمی،دانشگاه پیام نور تفت، یزد، ایران.
۲- مرکزتحقیقات ناباروری، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهیدصدوقی یزد، یزد، ایران.
۳- مرکزتحقیقات سقط، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهیدصدوقی یزد، یزد، ایران.
۴- گروه زیست شناسی،دانشگاه علم وهنر،یزد، ایران.
۵- گروه زیست شناسی،دانشگاه پیام نور تفت، یزد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۵۵۸۲۷۲، پست الکترونیکی: f.daneshmand@yahoo.com ، صندوق پستی: ۸۹۹۱۹۵۵۷۵۹

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

مقدمه

طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی، زوجی که پس از یک سال مقاربت‌های منظم، متوالی و بدون استفاده از روش‌های پیشگیری، با عدم موفقیت در باروری مواجه شوند، نابارور گفته می‌شود (۱). امروزه، ناباروری در حدود ۱۵ درصد زوج‌هایی که برای فرزنددار شدن تلاش می‌کنند، مشکلی بزرگ در حوزه سلامت محسوب می‌شود (۲) بیش از ۲۰٪ زوج‌های ایرانی در طول زندگی خود ناباروری را تجربه می‌کنند. اگرچه بسیاری از افراد مشکلات ناباروری خود را می‌پذیرند، فناوری‌های کمک باروری (ART) جدیدی وجود دارد که می‌تواند در اکثر موارد بر ناباروری غلبه کند (۳). میزان ناباروری در کشورهای مختلف حدود ۵ تا ۳۰ درصد است. ناباروری در ایالات متحده آمریکا از ۱۱/۲٪ در سال ۱۹۶۵ به ۹٪ (دامنه: ۳/۵٪ -۱۶/۷٪) در سال ۲۰۰۷ روند نزولی داشته است. به‌علاوه، تخمین زده می‌شود که حدود ۱۰٪ تا ۱۵٪ زوجین در انگلستان دارای مشکلات ناباروری باشند، از جمله ۲/۴٪ کسانی که ناباروری حل نشده دارند. علاوه بر این، متوسط میزان شیوع ناباروری مادام‌العمر در ایران ۱۰/۹٪ است که ۳/۳٪ از جمعیت دارای ناباروری رایج هستند در حالیکه بروز ناباروری در خاورمیانه بین ۱۰٪ تا ۱۵٪ تخمین زده شده است. با این حال، تقریباً یک سوم زوجین پس از یک سال در مناطق مرکزی و جنوبی آفریقا نمی‌توانند باردار شوند(۴). مهم‌تر از همه، تجزیه و تحلیل اسپرم عامل نهایی در تشخیص ناباروری با فاکتور مردانه نیست و بسیاری از اتیولوژی‌ها و مکانیسم‌های مختلف پاتوفیزیولوژیک ممکن است منجر به تغییر اسپرم شوند. تجزیه و تحلیل اسپرم صرفاً پتانسیل باروری و وضعیت سلامتی بیضه‌ها و مجاری منی را نشان می‌دهد بر این اساس، هیچ درمانی نباید فقط بر اساس تجزیه و تحلیل اسپرم آغاز شود. علاوه بر این، اطلاعات به دست آمده از تجزیه و تحلیل اسپرم باید از ارزیابی کامل تمام پارامترها (ارزیابی ماکروسکوپی، ارزیابی میکروسکوپی اسپرم و سلول‌های غیر اسپرم‌زا) و در متن سایر اطلاعات بالینی بیمار خاص حاصل شود (۵). براساس آمار سازمان بهداشت جهانی حدود ۱۰-۸ درصد از زوج‌ها به نوعی با مشکل عدم باروری مواجه هستند. در مواردی، مردان مسئول ناباروری هستند با اینکه حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد مردان دارای اسپرم هستند، ولی از جمله بیماری‌های مربوط به اختلالات اسپرم می‌توان به آزواسپرمی (یعنی فقدان اسپرم در مایع انزالی)، الیگواسپرمی (افراد با تعداد اسپرم کمتر از ۱۵ میلیون در میلی‌لیتر)، تراتوزومی (مورفولوژی نرمال کمتر از ۳۰درصد)، آستنواسپرمی (مردانی که اسپرم دارند اما حرکت ندارند) و... اشاره کرد (۶). به‌طور معمول عوامل ژنتیکی و غیر ژنتیکی دو عامل ناباروری در مردان هستند (۷). مهم‌ترین عوامل ژنتیکی درگیر در ناباروری مردان نیز شامل ریزحذف‌های کروموزوم Y، ناهنجاری‌های کروموزومی و جهش های تک ژنی می‌باشد (۸). عوامل محیطی و غیر ژنتیکی در ایجاد ناباروری مردان نقش دارند. از عوامل عمده غیر ژنتیکی مانند عفونت‌های باکتریایی مایع سمن، بیضه‌ها و مجاری تناسلی، واریکوسل، عوامل هورمونی، کریپتورکیدیسم، هیپوگنادیسم و غیره مواردی هستند که ناباروری مردان را موجب می‌شوند (۱۰-۹). عوامل گوناگونی با ناباروری ارتباط دارند از جمله نقص در تخمک‌گذاری، عدم اسپرماتوژنز، سن والدین، چاقی و عفونت به علاوه این که کاریوتایپ‌های خاص و ژنتیک می‌تواند با ناباروری در ارتباط باشند (۱۱). از مهم‌ترین عوامل موثر بر ناباروری مردان واریکوسل، الیگو اسپرمی، آزواسپرمی می‌باشد. سایر عواملی دخیل در ناباروری مردان شامل: انسداد مجرای اسپرم بر، اختلالات جنسی، اختلالات ژنتیکی، اختلالات کروموزوم (کاهش یا تولید نکردن اسپرم) اعتیاد به مواد مخدر ازجمله مصرف سیگار، الکل، کوکائین می‌باشد (۱۲). ناباروری با عوامل مردانه می‌توان به اختلال در اسپرم (۱۳)، اشاره کرد. در آنالیز مایع سمن باید حجم، غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم بررسی شود (۱۴). از زمینه‌های مهم تولید اسپرم در مردان، وجود هورمون‌های طبیعی است که از هیپوتالاموس شروع می‌شود و به هیپوفیز و سپس به غدد ترشح‌کننده هورمون‌های جنسی می‌رسدکه منجر به تولید اسپرم می‌گردد اگر در طول این مسیر اختلالی صورت گیرد یا غدد جنسی دچار مشکل در تولید هورمون‌های (Follicle stimulating Hormone)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

FSH، LH (Luteinizing Hormone) و تستوسترون گردد که در این صورت درمان هورمونی ضرورت می‌یابد (۱۵). از اختلالات کروموزومی که منجر به ناباروری می‌گردند، می‌توان به حذف، واژگونی و جا به جایی کروموزومی اشاره کرد، که جا به جایی رایج‌ترین آن‌ها می‌باشد. ازجمله بیماری‌های تولید مثلی که به علت مشکلات کروموزومی به وجود می‌آیند، می‌توان به سندروم ترنر اشاره کرد (۱۶). سندروم ترنر یا تریزومی ۱۸یک تریزومی با شیوع کمتری است حدوداً ۱در ۶۰۰۰ تولد زنده این تریزومی معلول عدم جداشدگی مادری است و با سن بالای مادر باردار همراهی دارد. یافته‌های بالینی شامل تاخیر در رشد قبل از تولد، علائم چهره‌ای خاص (گوش کوچک، دهان کوچک و چانه کوتاه)، اختلال قلبی مادرزادی و عقب ماندگی ذهنی شدید است، احتمال زنده ماندن بسیار ضعیف و میزان مرگ و میر تا سن یک ماهگی ۵۰٪ است (۱۷). رایج‌ترین شکل سندرم کلاین‌فلتر با کاریوتایپ۴۷,XXY است که تقریباً در ۸۰٪ از موارد مشاهده شده‌اند که نتیجه عدم جدایی کروموزوم X در طول میوز است (۱۸). سندرم کلاین‌فیلتر تا حد زیادی مختل‌کننده اسپرماتوژنز است. این تغییرات در مردان الیگواسپرمی شدید یا آزواسپرمی مشاهده شده است (۱۹). تقریباً در۶۰٪ موارد علت ناباروری مردان ناهنجاری‌های کروموزومی و ریزحذف‌های کروموزوم Y است که منجر به نقص در اسپرماتوژنز می‌شود. وقوع ناهنجارهای کروموزومی در جمعیت عمومی مردان بین۰/۷ تا ۱٪ گزارش شده است (۲۰). روش FISH(Fluorescent in situ hybridization) راه مؤثری را برای شناسایی آسیب‌های کروموزومی فراهم آورد و به طور گسترده در بررسی کروموزوم تا شناسایی ناهنجاری‌ها و اختلالات کروموزومی مورد استفاده قرار گرفت (۲۱). در این روش توالی مکمل رشته DNA به وسیله مواد فلورسنت نشان دارشده و پس از اتصال به توالی هدف، محل مربوط روی کروموزوم توسط میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده و شناسایی است. این روش برای مطالعه آنیوپلوئیدی و تعیین کروموزوم جنسی در اسپرم می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲۲). M.Arafa و همکاران برای بررسی انواع ناهنجاری‌های کروموزومی، بین بیماران مبتلا به ناهنجاری‌های کروموزومی و بیماران مبتلا به ناباروری ایدیوپاتیک بر اساس یافته‌های ژنتیکی، شیوع ناهنجاری‌های کروموزومی ۵۹/۹٪ بود. حدود۶۳/۶ درصد از نمونه ها دارای آزواسپرمی بودند که ۸ ,۱۰ درصد آن‌ها اختلالات کروموزومی داشتند. تقریباً ۳۶/۴٪ از نمونه‌ها دارای الیگواسپرمی، که ۷/۵٪ آنها اختلالات کروموزومی داشتند. که دراین پژوهش ما به وسیله تکنیک هیبریداسیون فلورسنت درجا (FISH)، به بررسی اختلالات کروموزومی الیگوتراتواسپرمی، که یکی از عوامل مردانه ناباروری می‌باشد بپردازیم. از روش FISH برای تشخیص آنیوپلوپلوئیدی‌های شایع کروموزوم‌های X، Y و ۱۸ می‌توان استفاده کرد (۲۳) .

روش بررسی

در این مطالعه مورد- شاهدی، از نمونه‌های اسپرم مربوط به ۳۰ مرد نرمال (نرمواسپرمیا) (تحرک، مورفولوژی و غلظت نرمال اسپرم) و ۳۰ مرد نابارور الیگوتراتواسپرمی (OT) (مردانی با کمتر از ۱۵ میلیون / میلی‌لیتر اسپرم، تحرک اسپرم کمتر از ۴۲ درصد و مورفولوژی اسپرم کمتر از ۴ درصد است)، همه افراد بیمار و شاهد در محدوده سنی ۲۰ تا ۴۹ سال قرار داشتند که برای درمان ناباروری به پژوهشکده علوم تولید مثل یزد مراجعه کرده بودند. پس از کسب رضایت نامه کتبی از همه افراد شرکت‌کننده دراین مطالعه، به منظور بررسی کروموزوم‌های ۱۸، X و Y اسپرم هر دو گروه بیمار و نرمال (مردانی با بیشتر از ۱۵ میلیون / میلی‌لیتر اسپرم، تحرک اسپرم بیشتر از ۴۲ درصد و مورفولوژی اسپرم بیشتر از ۴ درصد است)، نمونه گرفته شد. در این تحقیق از پروب مخصوص FISH سه رنگ Y/X/۱۸ (کمپانی. Cytocell) که سه پروب دارد و این کیت به علت اینکه همراه پروب تشخیصی کروموزوم‌های جنسی پروب کروموزوم ۱۸ هم داشت. کروموزوم ۱۸ به طور مستقیم با یک فلورکروم بنفش (Aqua) و کروموزوم X با یک فلورکروم سبز (FITC) و کروموزوم Y با یک فلورکروم قرمز(Texas red) نشاندار شده است. هم‌چنین نمونه‌های اسپرم این افراد را پس از انجام مراحل شست و شوی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

اسپرم، رسوب‌های ته نشین شده که حاوی اسپرم هستند در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. تکنیکFISH: برای شناسایی آنیوپلوئیدی و تعیین کروموزوم جنسی در اسپرم می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. از روش FISH می‌توان برای تشخیص آنیوپلوپلوئیدی‌های شایع درکروموزوم‌های X ، Y و ۱۸ استفاده کرد (۱۸). نمونه اسپرم شست و شو شده بر روی لام فیکس کردیم ولام‌ها را در ۱۰۰ میلی‌لیتر Xssc ۲ در دمای۳۷ درجه سانتی،۲ دقیقه قرار دادیم. شکست پیوندهای پپتیدی با هضم پروتئازی به‌طور مستقیم کیفیت سیگنال‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. جهت هضم پپسینی، ۱۰۰ میلی لیتر، HCL ۰/۰۱ نرمال دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و۷۰ میلی‌گرم پودر پپسین حل کرده و ۱۰ دقیقه لام درآن قرار می‌دهیم. سپس لام به مدت ۳ دقیقه ۱۰۰ میلی لیتر PBS (Phosphate buffered saline) و سپس درون جار ۲,۷ میلی‌لیتر فرمالدهید که با PBS به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسیده و ۰/۵۷۸گرم $MgCl_2$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار دادیم و مجدداً ۳ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS شستشو داده می‌شود. مرحله بعد لام‌ها در سری رقت های اتانول ۷۰ ، ۸۵ و ۱۰۰ درصد به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد سپس در محیط خشک می‌کنیم. برای انجام دو رگه سازی باید با کمترین نور ممکن انجام شود، ۴ میکرولیتراز پروب ۱۸ /X/Y بروی نمونه روی لام قرار داده شد. جهت انجام واسرشته سازی، لام‌ها را بر روی صفحه Thermo Brite که دمای آن به ۷۸ درجه سانتی‌گراد رسیده است به مدت ۶ دقیقه قرار می‌دهیم. لام‌ها را در Humidity Chamber قرار داده و آن را به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اجازه داده می‌شود حداقل ۲ ساعت و حداکثر تا ۱۶ ساعت در انکوباتور بماند. سپس لام‌ها را از انکوباتور خارج کرده و داخل ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول Xssc ۴, ۰و ۲۱۰ میکرولیتر توئین ۲۰ که قبلا تا دمای ۷۶ درجه سانتی‌گراد درون بن ماری جوش گرم شده، به مدت ۲ دقیقه شستشو می‌دهیم. سپس لام‌ها را در۱۰۰ میلی‌لیتر محلول X ssc۲و ۷۰ میکرولیتر توئین ۲۰ به مدت ۱دقیقه شستشو داده می‌شود.لام‌ها را برای آبگیری درون ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول‌های ۷۰، ۸۵، ۱۰۰ و در هر کدام به مدت ۱ دقیقه و در دمای محیط به قرار دادیم تا خشک شوند. برای رنگ آمیزی کل DNA، از رنگ DAPI (۴،۶ دی آمیدینو -۲- فنیل ایندول) استفاده شد که تحت نور ماورابنفش (UV) ایجاد فلورسنس آبی می‌کند. ۵ میکرولیتر از رنگ DAPI را بر روی لام قرار داده و برای عدم تشکیل حباب، لامل قرار می‌دهیم و دور تا دور لبه کناری لامل‌ها را با لاک می‌پوشانیم تا ثابت شود. برای نگهداری و آنالیز لام‌ها، آن‌ها را در تاریکی و باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قرار داد. اساس هر میکروسکوپ فورسنت شامل تحریک فلورکروم (رنگ فلورسنت) با طول موجی از نور است که باعث ساطع شدن نوری با طول موج ثانویه می‌شود. طول موج استفاده شده برای هر فلورکروم متفاوت بوده و نسبت به طول موج ساطع شده کوتاه تر است. با توجه به استفاده از پروب نشان‌دار شده با FITC مخصوص کروموزوم X و پروب نشان‌دار شده با Texas red مخصوص کروموزوم Y و پروب نشان‌دار شده با Aqua مخصوص کروموزوم ۱۸ و استفاده ازDAPI برای رنگ آمیزی مخالف، جهت مشاهده سیگنال‌ها از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX51) مجهز به فیلترهای مخصوص DAPI، FITC، Texas red و Aqua استفاده شد. برای هر نمونه ۵۰ سلول اسپرم به‌صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی سلول‌های اسپرم، سلولی مورد آنالیز قرار گرفت که حداقل یک سیگنال در آن‌ها قابل مشاهده و از هسته‌هایی که فاقد همپوشانی بودند استفاده شد هسته‌هایی با سیگنال ضعیف و یا دارای همپوشانی در شمارش سیگنال استفاده نشد. تعداد کل سیگنال‌های سبز، قرمز و بنفش در هسته‌های اسپرم شمارش شده و برای آن نمونه تعداد سیگنال‌های شمارش شده برای کروموزوم های 18 / Y/X ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از SPSS version 16 و تست‌های آماری به نام T-TEST، Chi-Square Tests برای تجزیه و تحلیل آماری مورد استفاده قرار گرفت. ضریب همبستگی R پیرسون به‌منظور سنجش ارتباط بین متغیر استفاده شده است و اهمیت آماری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

ملاحظات اخلاقی

در این تحقیق ملاحظات اخلاقی مورد تایید شورای کمیته اخلاق، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد (کد اخلاق IR.SSU.RSI.REC.1396.5) قرار گرفته است.

نتایج

در بررسی انجام شده از میان ۳۰۰۰ سلول نشان داد که به طور کلی، ۲۸۳۷ سلول (۹۴٪) نرمال و ۱۶۳ سلول (۵/۴٪) در کروموزوم ۱۸ اختلال وجود داشت. کروموزوم ۱۸ غیرنرمال در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (جدول۱). در بررسی کروموزوم X از میان ۳۰۰۰ سلول به طور کلی، ۱۵۸۸ سلول (۵۲/۹٪) نرمال و ۱۴۱۲ سلول (۴۷/۱٪) اختلال در کروموزوم X وجود داشت. کروموزوم X غیر نرمال در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (جدول۱). هم‌چنین در کروموزوم Y از میان ۳۰۰۰ سلول به‌طور کلی، ۱۴۹۴ سلول (۴۹/۲٪) نرمال و در ۱۵۰۶ سلول (۴۹/۸٪) اختلال در این نوع کروموزوم وجود داشت، این اختلال در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (جدول۱). همبستگی اختلالات کروموزومی کل با تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم با توجه به شاخص سازمان جهانی بهداشت، مردان با تعداد اسپرم ۱۵ میلیون و بیشتر از آن، از نظر تعداد نرمال گفته می‌شوندکه در این مطالعه افراد گروه کنترل دارای تعداد اسپرم نرمال بالای ۱۵ میلیون و افراد گروه بیمار دارای تعداد اسپرم کمتر از۱۵ میلیون هستند. با بررسی انجام شده بر روی تعداد اسپرم در این مطالعه ($P<۰/۰۱$) آن، میان دو متغیر، اختلالات کروموزومی کل و تعداد اسپرم همبستگی وجود دارد که با پایین آمدن از محدوده نرمال باعث افزایش نرخ اختلالات کروموزومی می‌شود. مردان بارور، با حرکت اسپرم بالای ۴۲ از نظر حرکت نرمال هستند در این مطالعه همه افراد گروه کنترل و بیمار دارای حرکت نرمال می‌باشند ($P>۰/۰۱$)، بنابراین میان دو متغیر اختلالات کروموزومی کل و حرکت اسپرم همبستگی وجود ندارد. در شاخص سازمان جهانی بهداشت، مردان با مورفولوژی اسپرم ۴ و بالاتر از آن از نظر مورفولوژی نرمال هستند. در این پژوهش گروه بیمار انتخاب شده افرادی هستند دارای مورفولوژی کمتر از ۴ هستند. بنابراین تعداد افراد بیشتری در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، دارای مورفولوژی غیر نرمال هستند و به طور کلی ۹۵/۵٪ درصداز سلول‌های اسپرم بررسی شده از افراد بیمار، مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم داشتند که در مقایسه با مورفولوژی اسپرم افراد کنترل ۲۱/۱ درصد، ($P<۰/۰۱$) میان دو متغیر اختلالات کروموزومی کل و مورفولوژی اسپرم همبستگی وجود دارد.

جدول ۱: نوع کروموزوم و اختلالات کروموزوم های جنسی(X,Y)و اتوزوم (۱۸) در دو گروه بیمار و کنترل

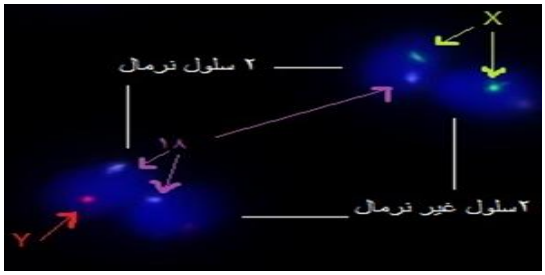
کروموزوم‌ها	بیمار N=۳۰	کنترل N=۳۰	کل N=۶۰	P
۱۸	۶(٪۲۰)	۰(٪۰)	۶(٪۲۰)	۰/۰۲۴*
X	۹(٪۳۰)	۰(٪۰)	۹(٪۳۰)	۰/۰۰۲**
Y	۱۰(٪۳/۳۳)	۰(٪۰)	۱۰(٪۳/۳۳)	۰/۰۰۱**
اختلال کروموزوم جنسی	۱۰(٪۳/۳۳)	۰(٪۰)	۱۰(٪۳/۳۳)	۰/۰۰۱**
اختلال کروموزوم اتوزوم	۶(٪۲۰)	۰(٪۰)	۶(٪۲۰)	۰/۰۰۰**
اختلال کروموزوم کلی	۱۵(٪۵۰)	۰(٪۰)	۱۵(٪۵۰)	۰/۰۰۰**

*P Value <۰/۰۵ **P Value<۰/۰۱

آزمون آماریT-TESTو Chi-Square Tests

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]



شکل۱: سلول اسپرم نرمال (دارای یک کروموزومX یاYو۱۸) و غیرنرمال

جدول ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار در فاکتورهای اسپرمی، متغیر سن و مدت ناباروری در دو گروه بیمار و کنترل

بیمار	کنترل(N=۳۰)	بیمار (N=۳۰)	P-value
(سال) مدت زمان ناباروری	۴/۰۱±۰/۷۱	۵/۵۶±۰/۵۵	۰/۰۰۰**
سن	۳۲/۳۳±۱/۰۰	۳۲/۵۰±۰/۷۸	۰/۰۹۷*
تعداد اسپرم	۱۰۷/۶۳±۵/۳۴	۸/۳۰±۰/۵۶	۰/۰۰۰**
مورفولوژی	۶/۲۶±۰/۳۰	۲/۰۳±۰/۱۵	۰/۰۰۰**
تحرک	۴۸/۳۷±۱/۴۲	۴۲/۸۰±۱/۳۲	۰/۰۰۶**

آزمون آماریT-TEST و Chi-Square Tests

بحث

هدف از انجام این پژوهش، بررسی میزان شیوع آنیوپلوئیدهای کروموزومی با استفاده از تکنیک FISH و هم چنین تغییرات هورمونی در مردان نابارور الیگوتراتواسپرمیا می‌باشد درهر فرد، تعداد ۵۰ سلول (در مجموع ۳۰۰۰ سلول) از نظر کروموزوم‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به داده‌ها و نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، اختلالات مشاهده شده در کروموزوم‌های ۱۸، X و Y در مردان نابارور الیگوتراتواسپرمی در ارتباط با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱)، متفاوت بود. طبق بررسی انجام شده در این مطالعه و با توجه به (P<۰/۰۱) به دست آمده بین اختلالات کروموزومی و شمارش اسپرم (۱۵×۱۰^{۶}/ میلی‌لیتر) و مورفولوژی اسپرم (۴>) ارتباط معنادار و هم‌چنین، پارامتر طول مدت ناباروری با (P<۰/۰۱)، همبستگی معناداری وجود دارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از سن مردان، نشان داد که میان اختلالات کروموزومی و سن مردان همبستگی معناداری وجود ندارد ولی در گروه سنی ۴۹-۴۰ سال به میزان ۵۰٪ افزایش یافته است که بالاترین میزان در بین گروه‌های سنی داشته است اما ایراد کار به این است که تعداد افراد مورد مطالعه ما دراین محدوده گروه سنی از سایر گروه‌ها کمتر بوده است و قطعا نیازی به بررسی در جامعه آماری بزرگتری دارد. در این مطالعه همه افراد گروه بیمار و گروه کنترل دارای حرکت اسپرم نرمال هستند، بنابراین الیگوتراتواسپرمی با تحرک اسپرم در مردان رابطه‌ای ندارد. در مطالعه D Ioannou, M.D و همکاران در سال ۲۰۱۹ تجزیه و تحلیل FISH متعاقب این اسپرم‌های طبیعی نشان داد که آنوپلوئیدی در گروه نابارور از ۱/۸ تا ۵/۵ درصد در مقایسه با ۰ تا ۲/۶درصد در گروه کنترل (بارور) است. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در بروز آنوپلوئیدی برای کروموزوم‌های جنسی و هم‌چنین برای هر سه کروموزوم (X ، Yو ۱۸) مشاهده شد (۲۴) . Andreescu N و همکاران در سال ۲۰۱۶ شیوع آنیوپلوئیدی در کروموزوم‌های ۱۳، ۱۸، ۲۱، X وY در اسپرم ۳۵ مرد نابارور الیگوآستنوتراتوزوسپرمی (OAT) و ۲۰ مرد با باروری طبیعی را با استفاده ازتکنیک FISH بررسی کرد که نتایج نشان دهنده بالا بودن نرخ اختلالات در گروه OAT نسبت به گروه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

کنترل بود. بروز دیزومی در گروه OAT، بالاترین شیوع، مربوط به کروموزوم‌های جنسی و سپس کروموزوم‌های ۱۳، ۲۱ (با ارزش مساوی) و پس از آن کروموزوم ۱۸ بود. شیوع نولیزومی در گروه OAT برای کروموزوم‌های جنسی بالاتر بود و به دنبال آن نولیزومی کروموزوم‌های اتوزوم ۱۳، پس از آن ۲۱ و ۱۸ زیاد بود. در بیماران مبتلا به الیگوسپرمی، بسیاری از مطالعات به میزان قابل توجهی، افزایش آنیوپلوئیدی اسپرم را گزارش کرده‌اند و بنابراین افزایش خطر انتقال یک اختلال کروموزومی را با تزریق اسپرم‌های غیر طبیعی نشان می‌دهد. با این حال، فراوانی آنیوپلوئیدی در بین بیماران بسیار متغیر است (۲۵). Faure و همکاران در سال ۲۰۰۷ نرخ آنیوپلوئیدی کروموزوم‌های X، Y، ۱۳، ۱۸ و ۲۱ را در اسپرم ۳۱ مرد نابارور مبتلا به الیگواسپرمی شدید و در جمعیت کنترل مردانی که باروری آن‌ها اثبات شده بود، بررسی کردند که تقریباً نیمی از مردان الیگوآزواسپرمی (۱۵/۳۱) دارای نرخ اختلال برای حداقل یکی از پنج کروموزوم در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود. Zerelli و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان فراوانی آنیوپلوئیدی بیماران مبتلا به الیگوآزواسپرمی را با استفاده از تکنیک FISH برای کروموزوم‌های X ، Y و ۸ در ۱۶ مرد نابارور مبتلا به الیگوآزوسوپرمی شدید بررسی کردند که میزان کل اسپرماتوژنزهای غیرطبیعی کروموزومی در بیماران مبتلا به الیگوآزواسپرمی شدید نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود که با نتایج ما موافق بود (P<۰/۰۱) و ارتباط معنی‌داری بین سن بیماران، FSH، غلظت اسپرم و مورفولوژی و میانگین میزان انحراف جنسی کروموزوم‌ها مشاهده شد.

سپاس‌گزاری

مطالعه حاضر گزیده‌ای از پایان‌نامه "بررسی میزان شیوع آنیوپلوئیدی با استفاده از تکنیک FISH و تغییرات هورمونی در مردان نابارور الیگوتراتواسپرمیا" مصوب در پژوهشگده علوم تولیدمثل یزد بوده است. باسپاس و قدردانی فراوان از اساتید بزرگوار، مدیر پژوهشکده علوم و تولیدمثل یزد و تمامی پرسنل آزمایشگاه ژنتیک این مرکز کمال تشکر را دارم.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1-Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. ***A Comprehensive Review of Genetics and Genetic Testing in Azoospermia.*** Clinics 2013; 68(SUPPL. 1): 39-60.

2-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.

3-Review S, Azizi F, Omrani MD, Ali M, Gilani S, Hosseini J. ***The Genetic Causes of Male Infertility in Iranian Population; A System Atic Review Review***. Men's Health Journal 2018; 2(1): e1.

4-ID FA, Soheila Jahangiri Mirshekarlou2 FR. ***A Comparative Study of the National Infertility Registry System and the Proposed Model for Iran***. Crescent J Med Biol Sci 2019; 6(3): 318-24.

5-Ferlin A, Foresta C. ***Infertility: Practical Clinical Issues for Routine Investigation of the Male Partner.*** J Clin Med 2020; 9(6): 1644.

6-Alhathal N, Maddirevula S, Coskun S, Alali H, Assoum M, Morris T, et al. ***A Genomics Approach to Male Infertility.*** Genet Med 2020; 22(12): 1967-75.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

7-Wang H, Mcgoldrick LL, Chung JJ. ***Sperm Ion Channels and Transporters in Male Fertility and Infertility***. Nat Rev Urol 2021; 18(1): 46-66.

8-Coutton C, Satre V, Arnoult C, Ray P. ***Genetics of Male Infertility: The New Players***. Med Sci 2012; 28(5): 497-502.

9-Imamovic Kumalic S, Pinter B. ***Review of Clinical Trials on Effects of Oral Antioxidants on Basic Semen and Other Parameters in Idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia***. Biomed Res Int 2014; 2014: 426951.

10- Bultitude MF. ***Campbell-Walsh Urology Tenth Edition***. BJU Int 2012; 109(3): E10.

11- Venkatesh T, Suresh PS, Tsutsumi R. ***New Insights Into the Genetic Basis of Infertility***. Appl Clin Genet 2014; 7: 235-43.

12- Olooto W. ***Infertility in Male; Risk Factors, Causes and Management- A Review***. J Microbiol Biotechnol Res 2012; 2(4): 641-5.

13- Gokler ME, Unsal A, Arslantas D**.** ***The Prevalence of Infertility and Loneliness among Women Aged 18-49 Years Who are Living in Semi-Rural Areas in Western Turkey***. Int J Fertil Steril 2014; 8(2): 155.

14- Patel AS, Leong JY, Ramasamy R. ***Prediction of Male Infertility by the World Health Organization Laboratory Manual for Assessment of Semen Analysis: A Systematic Review***. Arab J Urol [Internet] 2018; 16(1): 96-102.

15- Nishimura H, L'Hernault SW**.** ***Spermatogenesis***. Curr Biol 2017; 27(18): R988-94.

16- Tüttelmann F, Ruckert C, Röpke A. ***Disorders of Spermatogenesisperspectives for Novel Genetic Diagnosticsafter 20 Years of Unchanged Routine***. Med Genet 2018; 30(1): 12-20.

17- Salem MSZ. ***Basic Concepts of Medical Genetics***. Egypt J Med Hum Genet 2012; 13(2): 239-44.

18- Skakkebæk A, Viuff M, Nielsen MM, Gravholt CH. ***Epigenetics and Genomics in Klinefelter Syndrome.*** Am J Med Genet Part C Semin Med Genet 2020; 184(2): 216-25.

19- Mallepaly R, Butler PR, Herati AS, Lamb DJ. ***Genetic Basis of Male and Female Infertility***. Monogr Hum Genet 2017; 21: 1-16.

20- Krausz C, Rosta V. ***Chromosome Abnormalities and the Infertile Male.*** Male and Sperm Factors That Maximize IVF Success. . Camrige University Press 2020; 28-40 .

21- Chen AYY, Chen A. ***Fluorescence in Situ Hybridization***. J Invest Dermatol 2013; 133(5): e8.

22- Qiu Y, Wang LG, Zhang LH, Li J, Zhang AD, Zhang MH**.** ***Sperm Chromosomal Aneuploidy and DNA Integrity of Infertile Men with Anejaculation***. J Assist Reprod Genet 2012; 29(2): 185-94.

23- Arafa MM, Majzoub A, Alsaid SS, Elansari W, Al Ansari A, Elbardisi Y, et al. ***Chromosomal Abnormalities in Infertile Men with Azoospermia and Severe Oligozoospermia in Qatar and their Association with Sperm Retrieval Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes***. Arab J Urol 2018; 16(1): 132-9.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

24- Ioannou D, Fortun J, Tempest HG. ***Meiotic Nondisjunction and Sperm Aneuploidy in Humans.*** Reproduction 2019; 157(1): R15-31.

25- Andreescu NI, Cosma M, Farcaş SS, Stoian M, Amzăr DG, Puiu M**.** ***Assessment of Chromosomal Aneuploidies in Sperm of Infertile Males by Using FISH Technique***. Rom J Morphol Embryol 2016; 57(1): 173-8.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 29| NO 11 | Feb 2022

Received: 28 July 2019
Accepted: 4 Jan 2020

Aneuploidy Assessment of X, Y, 18 Chromosomes in Sperm of Oligoteratospermia Using FISH Technique

Mahsa Nasr Esfahani[1], Seyed Mehdi Kalantar[2], Fatemeh Montazri[3], Mahya Rajabi[2,4], Fatemeh Daneshmand[†5]

Original Article

Introduction: Not being to get pregnant, after one year of unprotected sex is called infertility. In the post, infertility was mainly a female problem, but the role of male factors in infertility has denotation, although a greater percentage of this infertility is related to the deficiencies of semen.

Methods: This case-control study was performed on sperm samples from 30 infertile oligoteratozoospermia (OT) patients as case group and 30 fertile and normosperm as controls, all the patients and controls between the ages of 20-49 years, who were referred to the Yazd Infertility Center for the treatment of infertility, were used to check the chromosomes 18, X and Y using the FISH technique. The results were considered using SPSS version 16 software and statistical tests T-TEST and Chi-Square Tests for statistical analysis and Pearson R correlation coefficient to measure the relationship between variables and statistical level P <0.05.

Results: Disorders were observed in infertile oligoteratozoospermia men who were significantly related to the control group and between the chromosomal abnormalities, sperm counts and morphology (P<0/01) and there was also significant difference in correlation between chromosomal abnormalities and duration of infertility (P<0/01). In addition, there was no correlation between chromosomal abnormalities and age, but the rate of chromosomal abnormalities in the age group of 40-49 years increased to 50%, which has the highest rate among age groups and definitely needs to be examined in a larger statistical population.

Conclusion: This finding suggest that patients with OT may be at an increased risk of producing aneuploid offspring. Considering the chromosomal aneuploidy is recommended by cytogenetic molecular techniques.

Keywords: Male infertility, Abnormalities chromosomes, FISH.

Citation: Nasr Esfahani M, Kalantar S.M, Montazri F, Rajabi M, Daneshmand D. **Aneuploidy Assessment of X,Y,18 Chromosomes in Sperm of Oligoteratospermia Using FISH Technique.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 29(11): 4312-21.

[1]Department of Biochemistry, Payame- Noor Taft University, Yazd, Iran.
[2]Infertility Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.
[3]Abortion Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.
[4]Department of Biology, Science and Arts University, Yazd, Iran.
[5]Department of Biology, Payame-Noor University, Taft, Yazd, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09132558272**, email:** f.daneshmand @yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2022-02-07]

[DOI: 10.18502/ssu.v29i11.8507]