

## مقاله تحقیقی

### بررسی همبستگی میان واریانت‌های دو ژن *TEX11* (rs6525433) و *MLH3* (rs175080) در مردان ایرانی نابارور آزواسپرمی

هانیه سزاوار<sup>۱</sup>، زهرا نورمحمدی<sup>۲\*</sup>، مسعود شیدایی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناس ارشد ژنتیک، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

۲. دانشیار گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

۳. استاد ژنتیک، دانشکده علوم زیستی و زیست فناوری، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: Z-nouri@srbiau.ac.ir

محل انجام تحقیق: واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۶

## چکیده

ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلاتی است که حدوداً بین ۱ از ۶ زوج در سراسر جهان به آن مبتلا هستند. یک وضعیت پیچیده بالینی ناشی از برهم‌کنش عوامل ژنتیکی و محیطی که علت آن در نیمی از موارد به مردان مربوط می‌شود. ژن *MLH3* و *TEX11* نقش کلیدی در مکانیسم ترمیم DNA و کراسینگ اور دارند. در این مطالعه به بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط یک واریانت تک-نوکلئوتیدی (SNP) از ژن *MLH3*.rs175080 و همچنین یک واریانت دیگر rs6525433 مربوط به ژن *TEX11* با مردان آزواسپرم ایرانی پرداخته شده است. نمونه‌ها از ۱۲۰ مرد نابارور آزواسپرم و ۱۱۵ فرد سالم به عنوان کنترل جمع‌آوری شده است. به منظور بررسی این دو واریانت از TETRA-ARMS-PCR (tetra-Amplification Refractory Mutation System-PCR) و PCR-RFLP و تعیین توالی استفاده شد. فراوانی ژنوتیپ‌های GG و GA در ژن *MLH3* بترتیب در مردان آزواسپرم ۳۰/۹٪ و ۶۹/۱٪ و در گروه کنترل بترتیب ۳۱/۳٪ و ۶۸/۷٪ (P=0.619) بود. واریانت rs6525433 در جامعه مطالعه شده فقط یک نفر کنترل ژنوتیپ C و مابقی ژنوتیپ T نشان دادند. نتایج نشان داد که واریانت rs175080 در ژن *MLH3* و واریانت rs6525433 در ژن *TEX11* با خطر آزواسپرمی مردان ارتباطی نداشت. نتایج دموگرافی بر روی نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد در صفات قومیت، pH و مصرف سیگار تفاوت معناداری نداشت. نتایج این تحقق نشان‌دهنده عدم ارتباط مدل‌های مختلف وراثتی ژنوتیپ‌های چندشکلی‌های واقع در ژن-های *MLH3* و *TEX11* در جامعه مورد مطالعه بود.

واژه‌های کلیدی: آزواسپرمی، *TEX11*، *MLH3*، ناباروری، واریانت

## مقدمه

میزان شیوع ناباروری در سراسر جهان ۱۸۶ میلیون نفر اعلام شده است (۲). در برخی از مناطق جهان، میزان ناباروری بسیار بیشتر است، حتی در برخی از جوامع به ۳۰٪ هم می‌رسد (۲). از عوامل ژنتیکی موثر در ناباروری می‌توان به مواردی از جمله اختلالات کروموزومی یا مونوژنیک، جهش

ناباروری در واقع عدم توانایی در باردار شدن پس از حدود یک سال مقاربت بدون جلوگیری تعریف می‌شود (۱). ناباروری می‌تواند موجب تنش‌های روحی-اجتماعی-اقتصادی در افراد نابارور اجتماع شود. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵،

نوکلئوتیدی فراوانترین نوع تغییرات در ژنوم انسان است و می‌تواند برای شناسایی ژن‌هایی که مسبب یا مستعد ابتلا به بیماری‌های پیچیده انسانی از جمله ناباروری هستند، مورد استفاده قرار بگیرند (۸). اسپرمتوزیس صحیح در پستانداران به ویژه انسان فرآیند مهمی در روند باروری جنس نر می‌باشد (۹). در واقع کراسینگ اور و سیناپس کروموزوم بر این اهمیت می‌افزاید. در طی میوز از سلول‌های دیپلوئید اسپرم‌های هاپلوئید جهت تولیدمثل جنسی ایجاد می‌شود که اختلال در این روند می‌تواند منجر به آزواسپرمی و یا الیگواسپرمی شدید شود، هر چند که علت بسیاری از این اختلالات شناخته شده نیست. شواهد نشان می‌دهند که چندین عضو از خانواده ترمیم جفت ناچور DNA یا (MMR) Miss Match Repair در روند نوترکیبی میوز و گامتوزیس شرکت می‌کنند (۱۰). مطالعات بر روی ژن‌های MMR موش در سال ۲۰۰۴ نشان از نقش آن‌ها در پروسه نوترکیبی میوزی و گامتوزیس و ایجاد اطمینان از کارایی و دقت بالای سلول‌های زایشی در روند میوز می‌باشد (۱۱). هر مشکلی در هر مرحله از میوز می‌تواند باعث ناباروری شود. ترمیم شکستگی‌های دو رشته DNA (DSBs)<sup>۱</sup> در جفت شدن کروموزوم هومولوگ و سیناپس کروموزوم مورد نیاز است. ترمیم صحیح DSBها و سیناپس کروموزوم باعث حفظ تمامیت ژنوم می‌شود. این فرایندها برای تشکیل گامت در موجوداتی با تولیدمثل جنسی ضروری هستند (۱۲). نقص در این فرایندها می‌تواند منجر به بیماری‌های مختلفی از جمله ناباروری شود (۱۳). ژن *MLH3* انسان در کروموزوم 14q24.3 با طول کدگذاری 4.3 kbp، از ۱۲ اگزون تشکیل شده است، که اگزون ۱ آن ۳.۳ kbp است و ۷۵٪ کدگذاری را در منطقه کدینگ شامل می‌شود (۱۴). یکی از واریانت‌های ژن *MLH3* که مورد بررسی قرار گرفته rs175080 می‌باشد. در جایگاه نوکلئوتیدی ۵۰۱ و جایگاه کروموزومی ۱۴:۷۵۰۴۷۱۲۵ (GRCh38.p12) بر اگزون ۲ کروموزوم ۱۴ قرار دارد و جایگاه پروتئینی ۸۴۴ می‌باشد (۲۱، ۱۵). در حالت طبیعی در این جایگاه نوکلئوتید G قرار گرفته است. تغییر نوکلئوتیدی G به A در این جایگاه باعث جانشینی آمینواسید پرولین با لوسین در کدون ۲۵۳۱ می‌شود که منجر به اختلال در ساختار و عملکرد پروتئین *MLH3* می‌شود (۱۶). ژن دیگر

DNA میتوکندری (mtDNA)، حذف کروموزوم Y، اختلالات چند عاملی، اختلالات imprinting و همچنین اختلالات غدد درون‌ریز با منشاء ژنتیکی اشاره کرد. تصور می‌شود تقریباً نیمی از موارد ناباروری مردان با نقص ژنتیکی همراه است (۳). ژنتیک با تاثیر بر انواع فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله تعادل هورمونی، اسپرمتوزیس و کیفیت اسپرم موجب ناباروری مردان می‌شود (۴). مطالعات پیوستگی ژنتیکی، غربالگری جهش ژنی، مدل‌های حیوانی و تحقیقات در چند سال گذشته به روشنی نشان‌دهنده شیوع بالای دلایل ژنتیکی در نقص اسپرمتوزیس و ناباروری مردان است (۵). ناباروری مردان را آزواسپرمی (عدم مشاهده اسپرم)، آستنوزواسپرمی (کاهش حرکت اسپرم)، ترانوزواسپرمی (فرم‌های بدشکل اسپرمتوزوآ از نظر ظاهری) و اولیگواسپرمی (کاهش تعداد اسپرم) تشکیل می‌دهند که در اینجا اختصاصاً به آزواسپرمی پرداخته شده است. در این میان ۱ تا ۲۰٪ از مردان نابارور تشخیص آزواسپرمی را دریافت می‌کنند. آزواسپرمی توقف اسپرمتوزیس است که با عدم وجود اسپرم در مایع منی تعریف می‌شود، که معمولاً به عنوان تعداد اسپرم صفر گفته می‌شود (۶). در این‌گونه مردان هیچ اتفاق قابل‌تشخیصی در ظاهر مایع منی نمی‌افتد، چون حدود یک درصد حجم منی را اسپرم‌ها تشکیل می‌دهند. تشخیص آزواسپرمی در یک مرد شوک بزرگی برای وی است. این مردان دارای میل جنسی و عملکرد جنسی طبیعی هستند و فقط مشکل باروری دارند. برای تشخیص آزواسپرمی ابتدا باید مشاوره بالینی انجام شود که طی آن سوالاتی در مورد طول مدت ازدواج و سعی در حاملگی، زمان و دفعات رابطه جنسی با همسر شود. سپس، روش زندگی مانند مصرف سیگار و الکل از فرد نابارور پرسیده می‌شود و برای درک بهتر از علت آزواسپرمی ممکن است تست بالینی، اندازه‌گیری هورمون‌ها، MRI، اندازه‌گیری BMI، بیوپسی بیضه‌ای، آزمایش ژنتیک، سونوگرافی اسپرمی (برای بررسی وضعیت سیاهرگی و اسکروتوم)، اولتراسوند ترانس-رکتال (برای یافتن هر گونه تغییرات در بیضه و اسکروتوم) آنالیز منی و اورولیز بعد از انزال (برای بررسی حضور اسپرم در ادرار که نشانه انسداد و اختلال مربوط به انزال است) انجام گیرد (۷). آزواسپرمی به ۳ دسته آزواسپرمی پیش‌بیضه‌ای، آزواسپرمی غیرانسدادی و انسدادی تقسیم می‌شود. واریانت‌ها در سرتاسر ژنوم انسانی گسترش یافته‌اند. واریانت تک-

<sup>۱</sup>Double Strand Breaks

نرمال از لحاظ باروری به عنوان کنترل که بدون استفاده از تکنیک‌های کمک باروری دارای فرزند و ۱۲۰ نمونه مرد نابارور آزواسپرم که از لحاظ کاربوتاپ و ریزحذف‌های کروموزوم Y نرمال بودند، بر اساس آنالیز مایع منی بیماری تایید شد. این نمونه‌ها از مرکز فوق تخصصی ناباروری جهاد قم جمع‌آوری شدند که نمونه‌های خون افراد بیمار و کنترل بین رده‌های سنی ۲۴ تا ۴۰ سال پس از دریافت رضایت نامه‌ی کتبی آگاهانه برای انجام مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است. ۵ میلی‌لیتر خون محیطی از ورید افراد مورد مطالعه در لوله‌های حاوی EDTA (به ازای هر ۱ میلی‌لیتر خون ۱۰۰ میکرولیتر EDTA 20 میلی‌مولار با pH=8) جهت جلوگیری از انعقاد منتقل و تا زمان استخراج در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. دموگرافی و اطلاعات مایع منی از افراد بیمار و کنترل تهیه شد. افراد مورد مطالعه از ۶ قومیت فارس، ترک، کرد، لر، عرب و گیلک انتخاب شدند.

#### بررسی واریانت‌ها

DNA ژنومی از خون محیطی به روش نمک اشباع استخراج و کیفیت و کمیت آنها توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و نانودراپ بررسی شد. به منظور بررسی rs175080 مربوط به اسمبلی GRCh38.p12 و کد ژن ۲۷۰۳۰ (MLH3) از روش Tetra-ARMS PCR دو پرایمر خارجی (قطعه‌ی ۸۱۸ جفت بازی) و دو پرایمر اختصاصی داخلی برای این جایگاه توسط نرم‌افزار oligo7 طراحی شدند که برای ال ال T یک قطعه به طول ۳۲۱ و برای ال ال G یک قطعه به طول ۴۹۷ جفت باز ایجاد می‌کند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad در ویال ۲ میکرولیتر انجام شد. واکنش به ازای هر نمونه در حجم ۲۵ میکرولیتر با 1.5Mm MgCL2(50mM)، 2x بافر، 0.16Mm dNTPs (10mM)، 1 (U) آنزیم انجام شد. برای rs175080 که ۴ پرایمر استفاده شد به میزان یکسان از هر کدام ۰/۲ pmol به مخلوط اضافه شد. در مورد rs6525433 که دو پرایمر به میزان ۰/۲۴ pmol به مسترمیکس اضافه شد. شرایط زمانی و دمای واکنش برای واسرشتی اولیه ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه و واسرشتی به مدت ۴۵ ثانیه و دمای اتصال برای rs175080 بر اساس گراداینت دمای گرفته شده ۵۷/۵

*TEX11* (Testis expressed 11) که روی کروموزوم Xq13.1 قرار دارد، پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که نوترکیبی و سیناپس‌های کروموزومی هومولوگ و ترمیم شکستگی دو رشته‌ی DNA را تنظیم می‌کند. این ژن به‌طور انحصاری در بین اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها در مردان با قدرت باروری طبیعی بیان شده است. با این حال، در بین مردان با جهش *TEX11* که با آزواسپرمی همراه هستند، بیوپسی بیضه توقف بلوغ و توقف اسپرماتوژنز را نشان می‌دهد. ژن *TEX11* ژن بیان شده بیضه 11) از ۳۱ آگرون تشکیل شده است که یک پروتئین حفاظت‌شده 104kDa را کد می‌کند (۱۷). پروتئین *TEX11* فقط در سلول زایا و بیضه خوک‌های بالغ جایی که اسپرماتوژنز کامل رخ می‌دهد، تشخیص داده شده است. *TEX11* به‌عنوان یک ژن وابسته به X مخصوص میوز در موش، خوک و انسان در بیضه‌ی افراد بالغ بیان می‌شود که نشان از عملکرد مهم آن در اسپرماتوژنز و باروری دارد، البته این ژن در هر دو جنس نر و ماده وجود دارد، ولی فقط در نر بالغ بیان می‌شود (۱۸). اختلال در این ژن‌ها منجر به فنوتیپ‌های ناباروری می‌شود. یکی از واریانت‌های ژن *TEX11* که مورد بررسی قرار گرفته rs6525433 می‌باشد که در جایگاه نوکلئوتیدی ۵۰۱ و جایگاه کروموزومی X:70853309 بر آگرون ۷ کروموزوم X قرار دارد (۱۹). در حالت طبیعی در این جایگاه نوکلئوتید T قرار گرفته است. تغییر نوکلئوتیدی تیمین به سیتوزین در این جایگاه باعث جانشینی آمینواسید لایزین با آرژنین در کدون ۱۳۰ می‌شود که منجر به اختلال در ساختار و عملکرد پروتئین *TEX11* می‌شود. rs6525433 بار (شارژ) را در موقعیت ۱۳۰ پروتئین (K130A) خنثی می‌کند، که ممکن است تأثیر منفی بر ساختار پروتئین داشته باشد (۲۰). هدف از این پژوهش بررسی همبستگی دو واریانت دو ژن *MLH3*(rs175080) و *TEX11*(rs6525433) در مردان ایرانی نابارور آزواسپرمی است.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری

این تحقیق با شناسه‌ی اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1399.069 که از کمیته‌ی اخلاق زیست پزشکی علوم تحقیقات دریافت شده، روی ۱۱۵ نمونه مرد

برای صفات دموگرافی شامل قومیت، حجم اسپرم، pH و مصرف سیگار در افراد بیمار و کنترل استفاده شد. ارزش احتمال  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف در میان دو گروه در نظر گرفته شد. با استناد به یافته‌ها در این مطالعه نتایج نشان داد که هر دو واریانت بررسی شده در این تحقیق در تعادل هاردی واینبرگ نبودند.

#### نتایج

در این تحقیق ۱۲۰ فرد بیمار آزواسپرم و ۱۱۵ فرد کنترل بارور به عنوان شاهد از لحاظ دو پلی-مورفیسم rs175080 و rs6525433 مورد بررسی قرار گرفتند. محصول PCR مربوط به واریانت rs175080 به طول ۸۱۸ جفت باز روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی شد که در شکل ۱ نمونه‌ای از آن دیده می‌شود. فراوانی ژنوتیپی پلی-مورفیسم rs175080 مربوط به ژن *MLH3* در این مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است. فراوانی ژنوتیپ GG در گروه بیمار ۳۰/۹٪ و در گروه شاهد ۳۱/۳٪ است. فراوانی ژنوتیپ GA در افراد بیمار ۶۹/۱٪ و در گروه شاهد ۶۸/۷٪ است. در این تحقیق بیشترین درصد فراوانی ژنوتیپی در بین گروه بیمار و شاهد مربوط به ژنوتیپ GA. در حالی که درصد فراوانی ژنوتیپی GG در هر دو حال بیمار و شاهد کمتر بوده است و ژنوتیپ TT در هر دو گروه مشاهده نشده است. در ۲۳۵ فرد مورد بررسی در این تحقیق آلل G در گروه کنترل و بیمار ۶۵٪ و آلل A ۳۵٪ می‌باشد.

همانطور که در جدول ۲ ارائه شده، فراوانی ژنوتیپ GG و GA بین افراد کنترل و بیمار با آزمون مربع کای  $P=0.619$  ارتباط معناداری را بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در دو گروه نشان نداد. در واقع آلل A با ریسک خطر ۰/۸۶۸ با فاصله اطمینان ۹۵٪ بین ۰/۴۹۶-۱/۵۱۸ در ابتلا به آزواسپرمی نقشی ندارد.

مدل‌های مختلف وراثتی برای ژنوتیپ‌های مشاهده شده مورد بررسی قرار گرفت. هیچ کدام از مدل‌های هم‌غالبی، غالب، مغلوب و برتری هتروزیگوتی ارتباط معناداری بین بیمار و کنترل نشان نداد که در جدول ۲ ارائه شده است.

درجه و rs6525433 ۵۸ درجه به مدت ۴۵ ثانیه در نظر گرفته شد. دمای طویل شدن ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و طویل شدن نهایی هم به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. نهایت نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برای بررسی محصول تکثیر برده شدند. برای واریانت rs175080 مشاهده‌ی ۳ باند ۸۱۸ جفت بازی، ۴۹۷ و ۳۲۱ جفت باز نشان‌دهنده‌ی ژنوتیپ GA، باند ۸۱۸ و ۴۹۷ جفت بازی نشان از ژنوتیپ GG و باندهای ۸۱۸ و ۳۲۱ بازی هم نشان‌دهنده‌ی ژنوتیپ AA بوده است. برای واریانت rs6525433 مربوط به اسمبلی GRCh38.p12 از روش PCR-RFLP<sup>۲</sup> بهره گرفته شد. DNA-ی ژنومی استخراج شده توسط واکنش PCR با دو پرایمر طراحی شده (جدول ۱) و به طول ۶۷۸ جفت باز تکثیر شد. محصولات واکنش با کمک آنزیم *EARI* هضم آنزیمی صورت گرفت. بدین منظور ۳/۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۱ میکرو لیتر بافر آنزیم با غلظت 10X و ۰/۱ میکرولیتر آنزیم *EARI* و ۲/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل دو بار تقطیر مخلوط کرده و در بن ماری در دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده تا هضم آنزیم صورت گیرد. نتایج حاصل روی ژل پلی‌آکرلامید ۲٪ نمایان سازی شد. الل اجدادی T در جایگاه این واریانت باعث ایجاد جایگاه شناسایی برای آنزیم نمی‌شود و با توجه به دو جایگاه برش دیگر برای آنزیم در قطعه‌ی ۶۷۸ جفت بازی، قطعاتی به طول ۳۱۰ و ۲۸۰ و ۸۸ جفت باز بدست می‌آید. در صورتی که در جایگاه آن الل C قرار گیرد، این جایگاه توسط آنزیم شناسایی می‌شود و با توجه به دو جایگاه برش دیگر ۴ قطعه به طول ۲۸۰، ۲۹۶، ۸۸ و ۱۴ جفت بازی ایجاد می‌کند. برای اطمینان از نتایج و تایید ژنوتیپ‌های بدست آمده، ۲۱ نمونه از هر دو واریانت توسط شرکت پیشگام تعیین توالی شده است.

#### آنالیز داده‌ها

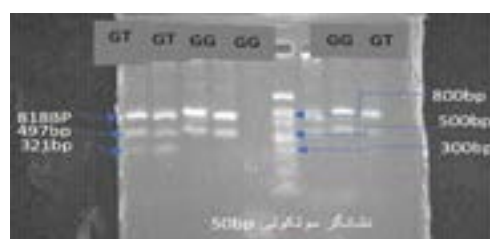
فراوانی اللی و ژنوتیپی برای هر دو گروه کنترل و بیمار مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی و آنالیز آماری نتایج به دست آمده از نرم‌افزار SPSS ver.21 و SNPSTATS با استفاده از آزمون‌های آماری مربع کای، رگرسیون لجستیک و آزمون T و واریانس تحلیل یک‌طرفه (ANOVA، One Way

<sup>۲</sup>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

جدول ۱ - پرایمرهای استفاده شده در بررسی rs175080 و rs6525433

طول محصول PCR	توالی پرایمر	نوع پرایمر
۸۱۸	ACCGGATTCATTAACATTCCACT	پرایمر رفت خارجی Rs175080
	TCCAAACCAATCGTCCGTAAG	پرایمر برگشت خارجی rs175080
۳۲۱	GGTCATAGGACTTTCTCTCAAACGAA	پرایمر رفت اختصاصی rs175080
۴۹۷	GATGAAGATTGTTTAGAACAACAGAGGC	پرایمر برگشت اختصاصی rs175080
۶۷۸	TGCCACGATACCTACTGAC	پرایمر رفت rs6525433
	AAAACCTAGAACCCAGTAGTCTAAT	پرایمر برگشت rs6525433

شکل ۱ - ژل آگارز ۱/۵٪ جهت بررسی نتایج PCR مربوط به rs175080 و مشاهده‌ی دو نوع ژنوتیپ GG و GT که در اثر عملکرد ۴ تا پرایمر در کنار هم اگر دو باند ۸۱۸ و ۴۹۷ جفت بازی دیده شود، ژنوتیپ GG است. اگر دو باند ۸۱۸ و ۳۲۱ جفت بازی دیده شود، ژنوتیپ TT و اگر ۳ باند ۸۱۸، ۴۹۷ و ۳۲۱ مشاهده شود، ژنوتیپ GT است.



جدول ۲ - فراوانی آللی و نسبت خطر (OR) با فاصله اطمینان ۹۵٪ در بیمار و کنترل مربوط به rs175080 و مدل‌های مختلف وراثتی و نسبت خطر (OR) با فاصله اطمینان ۹۵٪ در بیمار و کنترل مربوط به rs175080

ژنوتیپ‌ها وال‌ها	سالم (N=115)	بیمار (N=120)	OR (CI 95%)	P Value
GG	۳۶ (۳۱/۳)	۳۴ (۳۰/۹)	۰/۸۶۸ (۱/۵۱۸-۰/۴۹۶)	۰/۶۱۹
GA	۷۹ (۶۸/۷)	۸۶ (۶۹/۱)		
G	۱۵۱	۱۵۴		
A	۷۹	۸۶		
مدل وراثتی				
هم غالبی	G/G	۳۶ (۳۱/۱)	۳۴ (۳۰/۹)	۱/۰۰
	G/A	۷۹ (۶۸/۶۹)	۸۶ (۶۹/۱)	۱/۰۹ (۰/۶۱-۱/۹۴)
غالب	G/G	۳۶ (۳۱/۱)	۳۴ (۳۰/۹)	۱/۰۰
	G/A	۷۹ (۶۸/۶۹)	۸۶ (۶۹/۱)	۱/۰۷ (۰/۶۰-۱/۹۲)
مغلوب	G/G-G/A	۱۱۵ (۱۰۰)	۱۲۰ (۱۰۰)	۱/۰۰
برتری	G/G	۳۶ (۳۱/۱)	۳۴ (۳۰/۹)	۱/۰۰
هتروزیگوتی	G/A	۷۹ (۶۸/۶۹)	۸۶ (۶۹/۱)	۱/۱۲ (۰/۶۳-۱/۹۹)

گروه آوزاسپریم معنادار نمی‌باشد (P=0.308). اختلاف فراوانی مشاهده شده بین مصرف کننده‌ی سیگار و غیرسیگاری‌ها در دو گروه بیمار و سالم با استفاده از آزمون آماری مربع کای معنادار نمی‌باشد (P=0.089).

آزمون آماری t مشخص کرد که اختلاف میانگین مشاهده شده بین دو گروه از نظر میانگین حجم مایع منی متفاوت می‌باشند (P<0.0001) و در افراد سالم بیشتر است. آزمون

در بررسی rs175080 در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق همانطور که در جدول ۳ ارائه شده است، آزمون آماری مربع کای مشخص کرد که اختلاف فراوانی مشاهده شده بین قومیت‌های فارس، ترک، کرد، لر، عرب و گیلک در گروه سالم و آوزاسپریم معنادار نمی‌باشد (P=0.967). همچنین آزمون آماری مربع کای نشان داد که اختلاف فراوانی ژنوتیپ‌های GG و GA مشاهده شده در این واریانت بین قومیت‌ها در

نیست، ولی با گروه‌های سالم و ژنوتیپ GA و سالم و ژنوتیپ GG معنادار است ( $P < 0.0001$ ). اختلاف میانگین حجم مایع منی بین گروه بیمار و ژنوتیپ GA با گروه‌های سالم و ژنوتیپ GA و سالم و ژنوتیپ GG معنادار است ( $P < 0.0001$ ). در نهایت اختلاف میانگین مشاهده شده بین دو گروه از نظر مقدار pH متفاوت نبود ( $P = 0.082$ ). اختلاف میانگین pH بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA عدم ارتباط را نشان داد ( $P = 0.216$ ).

آنالیز واریانس ANOVA اختلاف میانگین حجم مایع منی بین ژنوتیپ‌های مختلف در افراد سالم و بیمار معنادار نشان داد ( $P < 0.0001$ ). با آزمون تعقیبی توکی مشخص شد اختلاف میانگین حجم مایع منی بین گروه سالم و ژنوتیپ GG و گروه سالم و ژنوتیپ GA معنادار نیست ( $P = 0.515$ ). ولی با گروه‌های بیمار و ژنوتیپ GG و بیمار و ژنوتیپ GA معنادار است ( $P < 0.0001$ ). اختلاف میانگین حجم مایع منی بین گروه بیمار و ژنوتیپ GG و بیمار و ژنوتیپ GA معنادار

جدول ۳ - فراوانی افراد بیمار و سالم از لحاظ قومیت و مصرف سیگار و میانگین حجم مایع منی و میانگین pH مربوط به rs175080.

سطح معنی‌داری	ژنوتیپ GA		ژنوتیپ GG		فراوانی		
	بیمار	سالم	بیمار	سالم	بیمار	سالم	
قومیت							
	۵۴	۴۴	۲۲	۴۴	۶۴	۶۹	فارس
	۲۳	۲۵	۱۲	۲۵	۳۵	۳۸	ترک
۰/۹۶۷	۴	۵	۱	۵	۷	۶	لر
	۲	۲	۱	۲	۴	۴	کرد
	۰	۲	۰	۲	۴	۲	عرب
	۰	۱	۰	۱	۱	۱	گیلک
مصرف سیگار							
	۵	۲	۱	۵	۱۴	۷	بله
۰/۰۸۹	۸۱	۳۲	۳۵	۷۴	۱۰۱	۱۱۳	خیر
حجم مایع منی	۲/۵±۰/۶	۲/۴±۰/۷	۳/۵±۰/۷	۳/۳±۰/۷	۲/۴±۰/۷	۲/۵±۰/۶	
pH	۷/۴±۰/۱	۷/۴±۰/۱	۷/۳±۰/۱	۷/۴±۰/۱	۷/۳±۰/۱	۷/۴±۰/۱	

و در ژنوتیپ C باند ۲۹۶ جفت بازی دیده شد. در نتایج بدست آمده با توجه به فراوانی بسیار پایین ژنوتیپ C در جمعیت مطالعه شده که فقط یک فرد کنترل حامل این ژنوتیپ بود و تعیین توالی تعدادی نمونه در جهت اطمینان از نتایج این تحقیق نشان داد که واریانت rs6525433 با آژواسپرمی در جمعیت مورد مطالعه ارتباط ندارد.

برای اطمینان از نتایج و تایید ژنوتیپ‌های بدست آمده، ۲۱ نمونه توسط شرکت پیشگام توالی یابی شده است. نمونه‌های واریانت rs6525433 با پرایمر رفت در جهت بررسی ژنوتیپ همی زیگوت (T/C) و نمونه‌های rs175080 نیز با پرایمر های رفت و برگشت خارجی برای بررسی ژنوتیپ

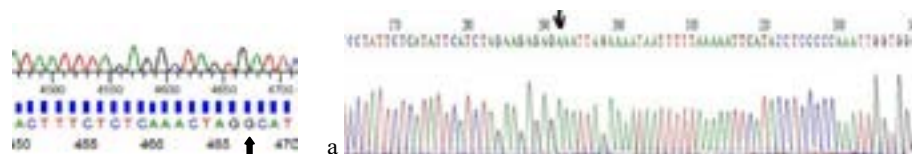
طول قطعه محصول PCR جهت بررسی جایگاه rs6525433 در ژن *TEX11* ۶۷۸ جفت باز بوده است که پس از هضم آنزیمی با آنزیم *EARI* تعداد قطعات حاصله بررسی گردید. آنزیم جایگاه (C) rs6525433 را شناسایی می‌کند و 5 نوکلئوتید جلوتر را می‌برد. طبق شکل ۲ پس از مشاهده باندها بر روی ژل پلی آکرلامید از دو حالت ژنوتیپی T, C در افراد کنترل و بیمار یک حالت ژنوتیپی T مشاهده شد به جز یک نمونه کنترل که ژنوتیپ C دیده شد. در هر دو حالت ژنوتیپی باندهای ۲۸ و ۸۸ جفت بازی ایجاد می‌شود و تنها با مشاهده باند ۳۱۰ جفت باز می‌توان این دو ژنوتیپ را از هم تشخیص داد. در ژنوتیپ T باند ۳۱۰ جفت بازی مشاهده

مشاهده می‌شود. در اثر برش *EarI* در ژنوتیپ C، این جایگاه را شناسایی می‌کند و دو قطعه ۲۹۶ و ۱۴ جفت بازی ایجاد می‌شود.

هتروزیگوت و هموزیگوت (G/G, G/A) سکانس انجام شده- است. در شکل ۳ دو نمونه از سکانس هر دو واریانت نشان داده شده‌است. نتایج توالی‌یابی تاییدی بر یافته‌های ما بود. عملکرد آنزیم *EarI*: آنزیم *EarI* ژنوتیپ T را شناسایی نمی‌کند و بنابراین برش نمی‌دهد و قطعه ۳۱۰ جفت بازی

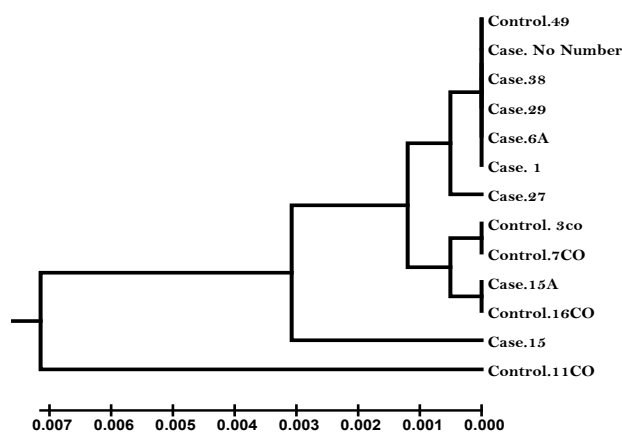


شکل ۲ - ژل پلی آکرلامید جهت نمایان سازی نتایج هضم آنزیمی جایگاه rs6525433 در اثر آنزیم *EarI* و ژنوتیپ T. سایز مارکر ۵۰ جفت بازی.



b  
A(T) در نمونه ی

شکل ۳ - a: توالی پلی مورفیسم rs6525433 در منطقه نوکلئوتید ۲۹۲ ژنوتیپ توالی یابی شده. b: توالی مربوط به پلی مورفیسم rs175080 در منطقه ۴۶۷ ژنوتیپ هموزیگوت GG(CC).



شکل ۴ - دندروگرام UPGMA حاصل از توالی های پلی مورفیسم rs6525433.

خوشه‌بندی تمامی نمونه‌های توالی‌یابی شده مربوط به rs6525433 در شکل ۴ ارائه شده‌است. در بررسی‌های اطراف واریانت rs6525433 میان افراد کنترل و بیمار تمایزی دیده نشد. قطعه‌ی ۶۷۸ جفت بازی در منطقه‌ی حفاظت

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود دندروگرام بر اساس توالی‌یابی بخشی از ژن *TEX11* انجام شده است. توالی نمونه‌های بیمار و سالم با استفاده از نرم‌افزار MEGA و رزژن ۷ در زیر هم مرتب یا همتراز (Alignment) شده‌اند و آنالیز



شده و کدگذار است که بیشترین تفاوت مربوط به نمونه‌ی 11co (نمونه ۱۱ در گروه کنترل) می‌باشد که هم در جایگاه واریانت بررسی شده‌ی ما rs6525433 هم در چند نوکلئوتید دیگر در قطعه‌ی ۶۷۸ جفت بازی متفاوت بوده‌است که تفاوت‌ها در حد ۰/۰۰۱ است.

### بحث

ناباروری در واقع عدم توانایی در باردار شدن پس از حدود یک سال مقاربت بدون جلوگیری تعریف می‌شود که البته می‌توان اذعان داشت که علت حدود ۵۰٪ موارد ناباروری، مردان عامل آن می‌باشند (۱۶). عوامل ناباروری برای زوجها و پزشکان، زمینه‌ای برای شروع تحقیقات و درمان است. مطالعات در مورد ژنتیک ناباروری مردان دشوار و پیچیده است، زیرا ناباروری یک اختلال هتروژن می‌باشد که نیازمند عملکرد و ارتباط هزاران ژن است و علل متعددی دارد. حداقل ۲۳۰۰ ژن در اسپرماتوژنز نقش دارند و به طور بالقوه هر یک از آنها می‌تواند یک آزمایش مشخص برای تشخیص ناباروری مردان باشد (۲۱). ژن *MLH3* اولین بار در سال ۲۰۰۰ شناسایی شد. پروتئین *MLH3* یکی از اعضای *MUTL* می‌باشد که همراه با پروتئین *MLH1* هتروداپیری تشکیل می‌دهد که با تجزیه Holliday junction (۱۸،۲۲) در شکل‌گیری و پیشبرد کراسینگ‌اور در حین تقسیم میوز و ترمیم DNA اشتباه در طول شکست دو رشته‌ای DNA ((Double Strand Breaks, DSBs)) نقش اساسی دارد (۲۳). مطالعات پیشین ثابت کرده‌اند که عدم فعالیت پروتئین *MLH3* در هر دو جنس موش‌های ناکاوت شده از نظر ژن *MLH3* با وجود این‌که از رفتار جنسی نرمالی برخوردار هستند، تمایز سلول‌های پیش‌ساز جنسی در مرحله پاک‌ی تن از تقسیم میوز متوقف شده و نابارور می‌باشند (۲۲). از طرف دیگر پروتئین *TEX11* به افزایش یا تثبیت کمپلکس سیناپتونمال (SC) کمک می‌کند. نوترکیبی با تشکیل DSBs آغاز می‌شود. پس از تشکیل DSBs، *TEX15* پروتئین‌های ترمیم DNA را بر سایت DSBs تنظیم می‌کند. سپس *TEX11*، *MLH1* و *MLH3* در شکل‌گیری کراسینگ-اور و ترمیم شکستگی دورشته‌ی DNA شرکت می‌کنند (۲۰). یکی از واریانت‌های تک نوکلئوتیدی موجود در ژن *MLH3*، rs175080 است که در تحقیق حاضر مورد مطالعه

قرار گرفته است. در حالت اجدادی در این جایگاه نوکلئوتید G قرار گرفته است و تغییر نوکلئوتیدی G به A باعث جانشینی آمینواسید پرولین با لوسین در کدون ۲۵۳۱ می‌شود که منجر به اختلال در ساختار و عملکرد پروتئین *MLH3* و افزایش خطر ابتلا به ناباروری می‌شود. تاکنون در مورد تاثیر تغییر نوکلئوتید در این جایگاه بر روی عملکرد ژن *MLH3* به صورت تجربی کار نشده ولی پیش‌بینی شده که می‌تواند باعث افزایش بیان ژن *MLH3* شود که این افزایش بیان ژن باعث غلبه‌ی هتروداپیر *MLH3/MLH1* می‌شود که اجازه‌ی عملکرد و جایگزینی *PMS2* داده نمی‌شود، البته که عملکرد *PMS2* برای تکمیل کراسینگ اور در دیپلوتن و ادامه‌ی میوز لازم است. اما تاثیر تغییر آلل‌ها در این پلی-مورفیسم بر روی ساختار این پروتئین به طور دقیق شناسایی نشده است (۲۴). مطالعه‌ی جمعیتی در جنوب چین (سال ۲۰۱۰) ارتباط این واریانت با آزواسپرمی و الیگواسپرمی شدید بین ۱۶۲ مرد نابارور و ۱۶۰ مرد بارور تایید شد (۲۲). در مطالعه‌ی ۱۱۰ مرد بارور و ۱۱۰ مرد نابارور آزواسپرم و الیگواسپرم از استان یزد در ایران (سال ۲۰۱۳)، ارتباط معناداری بین rs175080 با آزواسپرمی و الیگواسپرمی شدید نشان داده شد (۲۵). در مطالعه‌ی دیگر (سال ۲۰۱۵) Zhang و همکارانش در بررسی ۲۹۸ مرد بارور و ۳۱۶ فرد نابارور آزواسپرم و الیگواسپرم در سیچوان چین به بررسی ژن‌های دخیل در شکست DNA دورشته‌ای DNA و سیناپس کروموزومی و ارتباط واریانت‌های آن با ناباروری مردان پرداختند. نتیجه این بررسی نشان‌داد واریانت تک-نوکلئوتیدی rs175080 با آزواسپرمی و الیگواسپرمی مردان ارتباط داشت (P=0.019) (۲۶). در بینچوان چین (سال ۲۰۱۹) بین ۲۰۱ کنترل و ۲۰۹ بیمار آزواسپرم و الیگواسپرم ارتباط rs175080 با ناباروری مردان تایید نشد (۲۳). این عدم انطباق در نتایج به دست آمده در جهان می‌تواند به دلیل دو عامل مهم و تاثیرگذار در مطالعات انجام شده باشد. یک دلیل مهم تاثیر ساختار ژنتیکی قومیت مورد مطالعه می‌باشد، حتی در پروژه‌ی ۱۰۰۰ ژنوم هم فراوانی آلل‌های مربوطه در افراد سالم جمعیت‌ها و قومیت‌های مختلف متفاوت بوده است (۲۷). همچنین، تعداد نمونه‌ها می‌تواند تاثیر به‌سزایی در نتایج مطالعات داشته باشد هر چند که در جمعیت مطالعه شده در یزد تعداد نمونه‌ها نزدیک به تحقیق حاضر بوده، اما



قومیت‌های فارس، ترک، لر، کرد، عرب و گیلک ارتباطی با بیماری آواسپریمی نداشت.

#### نتیجه گیری

اگرچه اعتقاد بر این است که این دو ژن در تنظیم کراسینگ‌اور و سیناپس کروموزوم و ترمیم شکستگی دو رشته DNA و ناباروری مردان نقش دارد، اما نتایج بدست آمده‌ی ما از بررسی دو واریانت از این دو ژن عدم ارتباط را نشان داد. جامعه مورد مطالعه در این تحقیق می‌تواند به عنوان نماینده جمعیتی از ایران محسوب شود. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده از ۱۱۵ مرد بارور و ۱۲۰ آواسپریم در این دو واریانت rs175080 در ژن *MLH3* و rs6525433 در ژن *TEX11* و تعیین توالی انجام شده از نمونه‌های کنترل و بیمار و آنالیزهای آماری نشان داد این دو واریانت در جمعیت مردان آواسپریمی ایرانی از قومیت‌های بررسی شده فارس، ترک، لر، کرد، عرب و گیلک ارتباطی با آواسپریمی مردان نابارور ایرانی ندارد و ممکن است توالی‌های همراه این دو واریانت هم در ناباروری این قومیت‌ها نقشی نداشته باشد. شایان ذکر است که ناباروری یک بیماری چندعاملی و هتروژن می‌باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتر عوامل محیطی و ژنتیکی و واریانت‌های بیشتری می‌باشد. هر چند که آواسپریمی به خصوص غیرانسدادی یک وضعیت بسیار پیچیده شامل شرایط مختلف از جمله توقف میوز حتی هایپواسپریماتوزن با الگوی بافت‌شناسی خاص و اتیولوژی متمایز می‌باشد که نیاز به داشتن معیارهای دقیق برای انتخاب گروه مورد مطالعه است که متأسفانه در بیشتر مطالعات امکان پذیر نمی‌باشد. عدم ارتباط مشاهده شده در این تحقیق می‌تواند به علت کوچک بودن جمعیت بررسی شده باشد که میتوان با تغییر دادن خزانه ی ژنی و تغییر در تعداد افراد مورد بررسی به نتایج دقیق‌تر دست یافت زیرا که این نتایج مربوط به جمعیت محدودی از ۶ قومیت مختلف در ایران است و برای دستیابی به نتایج قطعی‌تر به جامعه‌ی آماری بزرگ‌تری از قومیت‌های مختلف نیاز است چرا که همانطور که اشاره شد دو عامل مهم و تاثیرگذار ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و قومیت‌ها و همچنین تعداد نمونه‌های بررسی شده در نتایج تحقیقات تاثیر به‌سزایی دارد. با توجه به اینکه تغییرات ژنتیکی مختلف و فاکتورهای دیگر در ناباروری

نکته قابل تامل این است که افراد آواسپریم و الیگواسپریم در یزد به عنوان جامعه‌ی نابارور در نظر گرفته شد. اما در تحقیق حاضر تلاش شده که ارتباط این واریانت با آواسپریمی مورد مطالعه قرار گیرد که نتایج ما عدم ارتباط rs175080 با آواسپریمی را نشان داد. در rs6525433 در ژن *TEX11* در حالت طبیعی نوکلئوتید T قرار گرفته‌است. تغییر نوکلئوتیدی تیمین به سیتوزین در این جایگاه باعث جانشینی آمینواسید لایزین با آرژنین در کدون ۱۳۰ می‌شود که منجر به اختلال در ساختار و عملکرد پروتئین *TEX11* می‌شود. تاکنون تاثیر تغییر آلل در جایگاه این واریانت بر روی عملکرد و ساختار پروتئین *TEX11* به صورت تجربی مورد بررسی قرار نگرفته است، اما مطالعات ژنتیکی در مدل‌های موش نشان داد *TEX11* یکی از سه مورد ژن‌های وابسته به X (*Nxf2* و *Tex11, Taf71*) می‌باشد که تنظیم‌کننده مهمی برای باروری مردان هستند (۲۸،۱۷). مطالعات انجام شده بر روی موش نشان داده است که در صورت عدم بیان ژن *TEX11* شاهد توقف میوز و توقف اسپرماتوزن و ناباروری مردان آواسپریم خواهیم بود. در مطالعه‌ی بروجنی و همکارانش (سال ۲۰۱۸) بر روی موش‌های جهش یافته از نظر *TEX11* که بیان آن کاهش یافته یا به طور کلی بیان نداشته نشان داده شد که ناباروری در موش‌های نر همراه بوده است. آنها پیش بینی کردند که سطح پروتئین *TEX11* باید بالاتر از یک سطح آستانه باشد تا پیشرفت میوز رخ دهد و در صورت عدم بیان آن ناباروری در موش‌های نر را شاهد خواهیم بود (۲۹). سیچوان چین در سال ۲۰۱۵ ارتباط این واریانت با آواسپریمی و الیگواسپریمی بین ۶۱۴ فرد بیمار و کنترل تایید کردند (۲۶). دو عامل ساختار ژنتیکی قومیت و تعداد نمونه‌ها می‌تواند علت نتایج متناقض بدست آمده در مطالعه‌ی چین با مطالعه‌ی حاضر باشد. در تحقیق حاضر با توجه به فراوانی پایین ژنوتیپ C در rs6525433 مربوط به ژن *TEX11* که تنها یک فرد کنترل حامل این ژنوتیپ بود و تعیین توالی انجام شده در جهت اطمینان از نتایج، نشان داد که واریانت rs6525433 با آواسپریمی در جامعه مطالعه شده ارتباط ندارد. در پروژیه ۱۰۰۰ ژنوم، فراوانی آلل C مربوط به rs6525433 حتی در بعضی قومیت‌ها صفر گزارش شده است (۳۰). این دو واریانت در جمعیت مردان آواسپریمی ایرانی از

## تقدیر و تشکر

از تمامی بیماران و افراد سالم که در این پژوهش یاری رسان بودند و آزمایشگاه ژنتیک واحد علوم و تحقیقات تهران سپاسگزاریم.

مردان دخیل‌اند و با در نظر گرفتن پیشرفت‌های بدست آمده در تکنیک‌های کمک باروری با شناسایی بیومارکرهای تشخیصی در مشاوره‌ی بیماران به خصوص آزواسپرمی غیرانسدادی می‌توان علل ناباروری آنها و احتمال موفقیت در بازیابی اسپرم و لقاح آزمایشگاهی و سلامت فرزند را بیان کرد.

## منابع مورد استفاده

1. Massart, A., Lissens, W., Tournaye, H., Stouffs, K., 2012. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian Journal of Andrology* 14(1): 40-48.
2. Inhorn, M. C., Patrizio, P., 2015. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies, and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update* 21(4): 411-426.
3. O'Brien, K. L., Varghese, A. C., Agarwal, A., 2010. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and sterility* 93(1): 1-2.
4. Ghalkhani, E., Sheidai, M., Gourabi, H., Noormohammadi, Z., Bakhtari, N., Malekasgar, A. M., 2014. Study of single nucleotide polymorphism (rs28368082) in SPO11 gene and its association with male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31(9):1205-1210.
5. Walter, C. A., Intano, G. W., McMahan, C. A., Kelner, K., McCarey, J. R., Walter, R. B., 2004. Mutation spectral changes in spermatogenic cells obtained from old mice. *DNA Repairs* 3(5): 495-504.
6. Niederberger, C., 2016. Re: X-Linked *TEX11* mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *The Journal of Urology* 195(2): 444-446.
7. Poursmaeili, F., Fazeli Atar, Z., Afjeh, S., Heidari, H., 2017. A review on diagnostic and therapeutic methods of azoospermia. *Research in Medicine* 41(1): 1-9.
8. Frazer, K. A., Ballinger, D. G., Cox, D. R., Hinds, D. A., Stuve, L. L., Gibbs, R. A., Shen, Y., 2017. A second generation human haplotype map of over 123 million SNPs. *Nature* 113(7311): 813-818.
9. Sha, Y., Zheng, L., Ji, Z., Mei, L., Ding, L., Lin, S., Wang, X., Yang, X., Li, P., 2018. A novel *TEX11* mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Medical Genetics* 19 (63): 1-7.
10. Kunkel, T. A., Erie, D. A., 2005. DNA mismatch repair. *Annual Review Biochemistry* 74: 681-017.
11. Richardson, C., Horikoshi, N., Pandita, T.K., 2004. The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. *DNA Repair* 3(8-9): 1149-1146.
12. Inagaki, A. M., Schoenmakers, S., Baarends, W. M., 2010. DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis. *Epigenetics* 5(4): 255-266.
13. Aparicio, T., Baer, R., Gautier, J., 2014. DNA double-strand breaks repair pathway choice and cancer. *DNA Repair* 19: 169-175
14. Lipkin, S. M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevarian, A. D., Lynch, H. T., Elliott, R. M., Collins, F. S., 2000. *MLH3*: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature Genetics* 24(1): 27-35.
15. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/SNP\\_ref.cgi?do\\_not\\_redirect&rs=rs175080](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/SNP_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs175080).
16. Kenny, L., 2018. Genome-wide epigenetic and genetic investigation of male infertility. Master Science thesis, Vancouver, Canada. <https://open.library.ubc.ca/cIRcle/collections/ubctheses/24/items/1.0366003>.
17. Yang, F., Silber, S., Leu, N. A., Oates, R. D., Marszalek, J. D., Skaletsky, H., Brown, L. G., Rozen, S., Page, D. C., Wang, P. J., 2015. *TEX11* is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Molecular Medicine* 7(9): 1198-1210.
18. Stouffs, K., Tournaye H., Liebaers, I., Lissens, W., 2009. Male infertility and the involvement of x chromosome. *Human Reproductive Update* 15(6): 623-627.
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variant/rs6525433>
20. Koslowski, M., Sahin, U., Huber, C., Türeci, Ö., 2006. The human X chromosome is enriched for germline genes expressed in premeiotic germ cells of both sexes. *Human Molecular Genetics* 15(15): 2392-2399.

21. Markandona, O., Dafopoulos, K., Anifandis, G., Messini, C. I., Dimitraki, M., Tsezou, A., Georgoulas, P., Messinis, I. E., 2015. Single-nucleotide polymorphism rs 175080 in the *MLH3* gene and its relation to male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32(12): 1795-1799.
22. Xu, K., Lu, T., Zhou, H., Bai, L., Xiang, Y. 2010. The role of *MSH5* C85T and *MLH3* C2531T polymorphisms in the risk of male infertility with azoospermia or severe oligozoospermia. *Clinica Chimica Acta* 411(1-2): 49-52.
23. Zhao, X., Mu, C., Ma, J., Dai, X., Jiao, H., 2019. The association of four SNPs in DNA mismatch repair genes with idiopathic male infertility in northwest China. *International Journal of Immunogenetics* 46(6): 451-458.
24. Ferrás, C., Fernandes, S., Silva, J., Barros, A., Sousa, M. 2012. Expression analysis of *MLH3*, *MLH1*, and *MSH4* in maturation arrest. *Reproductive Sciences* 19(6): 587-596.
25. Pashaiefar, H., Sheikha, M. H., Kalantar, M., Jahaninejad, T., Zaimy, M. A., 2013. Analysis of *MLH3* C2531T polymorphism in infertile men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *SSU\_Journals* 21(1): 62-69.
26. Zhang, X., Ding, M., Ding, X., Li, T., Chen, H., 2015. Six polymorphisms in genes involved in DNA double strand break repair and chromosome synapsis: association with male infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 61(4): 187-193.
27. [https://asia.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:75046625-75047625;v=rs175080;vdb=variation;vf=76603057](https://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:75046625-75047625;v=rs175080;vdb=variation;vf=76603057)
28. Yang, F., Gell, K., Van Der Heijden, G. W., Eckardt, S., Leu, N. A., Page, D. C., Benavente, R., Her, C., Höög, C., McLaughlin, K. J., Wang, P. J., 2008. Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. *Genes and Development* 22(5): 682-691.
29. Boroujeni, P. B., Sabbaghian, M., Totonchi, M., Sodeifi, N., Sarkardeh, H., Samadian, A., Sadighi-Gilani, M. A., Gourabi, H., 2018. Expression analysis of genes encoding *TEX11*, *TEX12*, *TEX14* and *TEX15* in testis tissues of men with non-obstructive azoospermia. *JBRA Assisted Reproduction* 22(3): 185-192.
30. [https://asia.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=X:70852809-70853809;v=rs6525433;vdb=variation;vf=142648314](https://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=X:70852809-70853809;v=rs6525433;vdb=variation;vf=142648314)