

ASSOCIATION OF SOX5 rs10842262 WITH MALE INFERTILITY IN 325 VIETNAMESE INDIVIDUALS

Duong Thi Thu Ha¹, Dinh Huong Thao¹, Nguyen Thuy Duong^{1,2*}

¹Institute of Genome Research - Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 27/8/2021	Male infertility is becoming increasingly prevalent. Numerous studies demonstrated the association of single nucleotide polymorphisms and increasing male infertility. To assess the relationship between SOX5 rs10842262 and the risk of male infertility in Vietnamese population, 140 male infertility patients diagnosed with non-obstructive azoospermia or oligozoospermia and 185 healthy controls were genotyped using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analysis demonstrated that the allele frequencies of SOX5 rs10842262 followed Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) (p-value > 0.05). The Chi-square test revealed no correlation between the polymorphism and male infertility in this study (p-value > 0.05). Our finding was the first study on the association between single nucleotide polymorphism in SOX5 gene and male infertility in the Vietnamese population. To confirm the results on the association of SOX5 rs10842262 and male infertility in the Vietnamese population, further studies with larger sample size should be conducted.
Revised: 08/4/2022	
Published: 13/4/2022	
KEYWORDS	
PCR-RFLP	
rs10842262	
SOX5	
Vietnamese	
Male infertility	

NGHIÊN CỨU MỐI LIÊN QUAN GIỮA SOX5 rs10842262 VỚI VÔ SINH NAM TRÊN 325 CÁ THỂ NGƯỜI VIỆT NAM

Dương Thị Thu Hà¹, Đinh Hương Thảo¹, Nguyễn Thuỳ Dương^{1,2*}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 27/8/2021	Tình hình vô sinh ở nam giới đang dần trở nên phổ biến. Các nghiên cứu chỉ ra mối tương quan của các đa hình nucleotide đơn trong việc gia tăng tình trạng vô sinh ở nam giới. Với mục đích đánh giá mối tương quan giữa đa hình SOX5 rs10842262 với nguy cơ mắc vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam, 140 nam giới được chẩn đoán vô sinh do số lượng ít hoặc không có tinh trùng và 185 nam giới khỏe mạnh đã được xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP. Kết quả thống kê cho thấy, tần số allele của đa hình SOX5 rs10842262 tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) (p > 0,05). Kết quả kiểm định Chi-square cho thấy đa hình này trên tập mẫu nghiên cứu không ảnh hưởng đến nguy cơ mắc vô sinh nam (p > 0,05). Đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá mối liên quan của đa hình nucleotide đơn trên gen SOX5 với vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam. Để khẳng định chắc chắn về kết quả này các nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn cần được thực hiện ở người Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 08/4/2022	
Ngày đăng: 13/4/2022	
TỪ KHÓA	
PCR-RFLP	
rs10842262	
SOX5	
Việt Nam	
Vô sinh nam	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4930>

* Corresponding author. Email: tdnguyen@igr.ac.vn

1. Giới thiệu

Vô sinh được định nghĩa là tình trạng cặp vợ chồng không có khả năng thụ thai mặc dù không sử dụng bất cứ biện pháp tránh thai nào trong thời gian dài [1]. Một tỷ lệ đáng kể các trường hợp vô sinh gây ra bởi các bất thường trên nhiễm sắc thể và gen. Trong đó 35% các trường hợp vô sinh được gây ra bởi nữ giới [2]. Các nguyên nhân di truyền bao gồm rối loạn nhiễm sắc thể giới tính [3], mất đoạn trên nhiễm sắc thể, hoặc các biến đổi trên gen [4]. Với tỷ lệ cao hơn, ước tính khoảng 50% nguyên nhân gây vô sinh là do những bất thường ở nam giới, với yếu tố di truyền chiếm 15 - 30% [5] bao gồm biến đổi nhiễm sắc thể, đảo đoạn, mất đoạn AZF trên nhiễm sắc thể Y, đột biến gen [6], [7]. Những bất thường này có thể làm thay đổi cấu trúc, hệ ống dẫn tinh hoặc dẫn đến tình trạng thiếu sản tinh, tinh trùng bất động hoặc tinh trùng dị dạng [8]. 50% các ca vô sinh nam gây ra bởi vô sinh nguyên phát, khi không có bất cứ bất thường nào ở bộ phận sinh dục. Yếu tố di truyền chỉ phối 5 - 15% trong các trường hợp này [9]. Trong đó, đa hình nucleotide đơn cũng làm tăng nguy cơ mắc vô sinh nam nguyên phát [10]. Khoảng 2300 gen được dự đoán tham gia vào quá trình hình thành tinh trùng [7]. Nhưng cho đến nay, chỉ có một phần nhỏ trong số đó khoảng 139 gen đã được chứng minh có liên quan trực tiếp đến vô sinh nam [7]. Những gen ứng viên cho nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình nucleotide đơn và tình trạng vô sinh nam bao gồm *MTHFR*, *GSRM1*, *FSHB* [11], *ERCC1*, *ERCC2* [12], *CFAP44* và *CFAP69* [13]. Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng chỉ ra mối liên hệ giữa đa hình nucleotide đơn trên gen *SOX5* và nguy cơ mắc vô sinh nam [14], [15].

Gen *SOX5* (NM_006940.6) có kích thước khoảng 1033 kb nằm trên nhiễm sắc thể số 12 (12p12.1) gồm 15 exon. Gen này là thành viên trong họ gen *SOX* (*SRY*-related HMG-box), có cấu trúc và chức năng liên quan mật thiết với vùng xác định giới tính Y (*SRY* – sex determining region Y). Họ gen *SOX* mã hoá các yếu tố phiên mã *SRY*-box 5 có vai trò quan trọng trong việc điều hòa nhiều quá trình phát triển [16]. Trình tự nucleotide của các gen trong họ gen *SOX* có tính bảo thủ cao, đặc biệt trong vùng có tính di động cao (high mobility box – HGM). Vùng này chịu trách nhiệm liên kết với DNA thông qua motif AACAAT tương tự HGM trên *SRY* [17]. Thêm vào đó, vùng HGM của protein *SOX5* và *SRY* có thể hoán đổi để duy trì chức năng. Do đó, protein *SOX5* có chức năng quan trọng trong quá trình phát triển tinh hoàn [18].

Đa hình gen *SOX5* rs10842262 đã được nghiên cứu trên một số quần thể người trên thế giới [14], [15], [19]. Trong quần thể người Trung Quốc và Serbia, đa hình gen này có mối tương quan chặt chẽ với vô sinh nam trong mô hình trội [14], [19]. Tuy nhiên, nghiên cứu khác trên quần thể người Nhật Bản không chỉ ra mối liên quan của đa hình gen này với bệnh [20]. Do đó, kết quả về mối tương quan của đa hình gen này với vô sinh nam là không đồng nhất giữa các quần thể khác nhau. Hơn nữa, chưa có bất cứ báo cáo nào về tần số kiểu gen, allele và mối liên hệ của đa hình gen này với vô sinh nam ở người Việt Nam. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát mối tương quan giữa đa hình gen *SOX5* rs10842262 với nguy cơ mắc vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Ba trăm hai mươi lăm mẫu máu ngoại vi thu thập từ 140 nam giới được chẩn đoán mắc vô sinh nam gây ra bởi số lượng ít hoặc không có tinh trùng và 185 nam giới khỏe mạnh có ít nhất một con đã được sử dụng cho nghiên cứu này. Những bệnh nhân chẩn đoán vô sinh nam đã được kiểm tra sàng lọc tinh dịch đồ và đảm bảo không có mất đoạn *AZF* hoặc những bất thường lớn khác trên nhiễm sắc thể Y. Người tham gia trong nghiên cứu này phải tự nguyện và đồng ý xác nhận vào đơn hiến mẫu cho nghiên cứu. Quá trình nghiên cứu đã được Hội đồng y đức của Viện Nghiên cứu hệ gen thông qua.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp xác định thành phần kiểu gen

DNA tổng số của 325 cá thể được tách chiết từ các mẫu máu ngoại vi bằng kit GeneJet Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo). Kết quả định tính và định lượng DNA được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% và phương pháp đo mật độ quang trên máy quang phổ NanoDrop™ One, Thermo Fisher. Đoạn gen chứa đa hình gen SOX5 rs10842262 được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu có trình tự F: 5'-CTGACAGAAGTAGAAAGTAG-3' và R: 5'-CATTTGACCATAGAACTT-3'. Cặp mồi đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu được thiết kế bằng phần mềm Primer3. PCR được thực hiện với các thành phần bao gồm: 1 µl buffer PCR 10X; 0,5 µl dNTP 2,5 mM; 0,15 µl mồi xuôi và ngược (10 pmol); 0,05 µl Taq polymerase; 2 µl tDNA (10 ng/µl) và H₂O, tổng thể tích 10 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng: 95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/30 giây, 72°C/5 phút (40 chu kỳ). Sản phẩm PCR với kích thước dự kiến 384 bp được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Sau đó, sản phẩm PCR còn lại được xử lý với enzyme giới hạn *BcuI* trong 5 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sản phẩm cắt sau đó được kiểm tra trên gel agarose 2%.

Bảng 1. Số lượng và kích thước các băng DNA tương ứng với kiểu gen của đa hình gen SOX5 rs10842262 sau khi được xử lý với enzyme *BcuI*

Kiểu gen	Số lượng băng DNA	Chiều dài băng (bp)
GG	2	122, 262
GC	3	122, 262, 384
CC	1	384

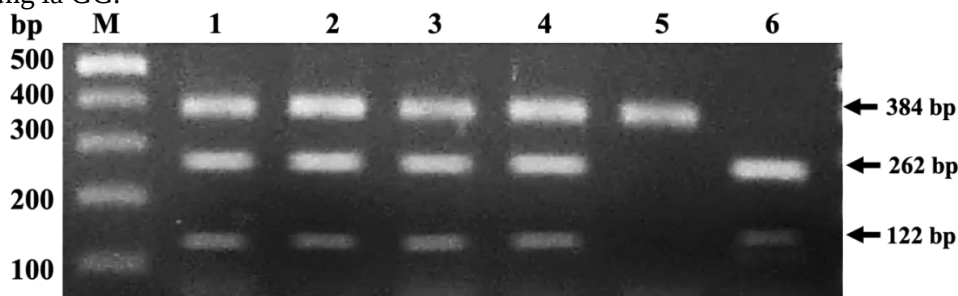
2.2.2. Phân tích thống kê

Kết quả thống kê trong nghiên cứu này được sử dụng với phần mềm thống kê chuyên dụng R.3.6.1 [21]. Độ lệch chuẩn và quy luật di truyền quần thể trong tập nghiên cứu có tuân theo định luật cân bằng HWE hay không được đánh giá bằng kiểm định HWExact [21]. Hồi quy logistic được sử dụng để ước tính khoảng tin cậy 95% (CI) và tỷ lệ chênh lệch (OR) cho biến nhị phân, với giá trị p là 0,05 được đặt làm mức ý nghĩa. Thành phần allele, kiểu gen của biến thể di truyền và mối liên quan giữa đa hình gen với nguy cơ vô sinh được kiểm tra theo ba mô hình di truyền: trội, lặn và cộng gộp. Các phân tích liên kết được thực hiện bằng SNPAssoc.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác định thành phần kiểu gen

Đoạn DNA đặc hiệu chứa đa hình gen SOX5 rs10842262 sau khi nhân lên bằng PCR được tiến hành xử lý với enzyme giới hạn *BcuI*. Kích thước và số lượng các băng DNA của sản phẩm cắt được sử dụng để xác định kiểu gen của đa hình này (Bảng 1). Với số lượng 3 băng DNA có kích thước lần lượt là 384 bp, 262 bp và 122 bp, giếng 1, 2, 3, 4 trong hình 1 có kiểu gen tương ứng là GC. Trong khi giếng số 5 chỉ xuất hiện băng DNA có kích thước 384 bp tương ứng với kiểu gen CC. Giếng số 6 xuất hiện hai băng DNA kích thước 262 bp và 122 bp mang kiểu gen tương ứng là GG.



Hình 1. Điện di đồ một số sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *BcuI*
M: Marker 100 bp; 1- 6: Sản phẩm PCR cắt với *BcuI* trên một số mẫu đại diện

Kết quả thống kê thành phần kiểu gen và tần số allele của đa hình gen SOX5 rs10842262 cho thấy không có sự khác biệt quá lớn về thành phần kiểu gen và tần số allele ở hai nhóm nghiên cứu (Bảng 2). Sự phân bố của đa hình này được kiểm tra trên hai nhóm nghiên cứu và trên tổng thể đối tượng nghiên cứu đều tuân theo định luật cân bằng HWE thông qua phương pháp kiểm định Chi-square ($p > 0,05$). Tỷ lệ kiểu gen GG/GC/CC trong quần thể nghiên cứu lần lượt là 0,16/0,48/0,36 (Bảng 2). Từ kết quả phân tích cho thấy tính đại diện và ngẫu nhiên trong việc thu thập mẫu nghiên cứu, do đó đảm bảo tính khách quan trong các phân tích mối liên quan của đa hình gen SOX5 rs10842262 với nguy cơ mắc vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam.

Bảng 2. Thống kê thành phần kiểu gen và tần số allele của đa hình gen SOX5 rs10842262

	Kiểu gen			Tần số allele (%)		Giá trị p	HWE
	GG	GC	CC	C	G		
Nhóm đối chứng	32 (0,17)	93 (0,50)	60 (0,33)	0,58	0,42	0,69	+
Nhóm bệnh	20 (0,14)	63 (0,45)	57 (0,41)	0,63	0,37	0,70	+
Tổng	52 (0,16)	156 (0,48)	117 (0,36)	0,60	0,4	1,00	+

Ghi chú: HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; “+”: Tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg.

3.2. Phân tích tương quan giữa đa hình gen SOX5 rs10842262 và nguy cơ mắc vô sinh nam

Kiểm định Chi-square trên cả ba mô hình trội, lặn và cộng gộp cho thấy không có bất cứ mối liên quan nào giữa đa hình này với nguy cơ mắc vô sinh nam với giá trị p lớn hơn mức ý nghĩa 0,05 (Bảng 3).

Bảng 3. Mối tương quan giữa SOX5 rs10842262 và vô sinh nam

Mô hình	Đối chứng (n=140)	Bệnh (n = 185)	OR	95%CI	p
Cộng gộp					0,296
GG	32 (17,297%)	20 (14,285%)	1,00		
GC	99 (50,270%)	63 (45,0%)	0,924	0,478 – 1,756	0,808
CC	60 (32,432%)	57 (40,714%)	0,660	0,334 – 1,283	0,216
Trội					
GC+CC	153 (82,703%)	120 (85,715%)	1,00		
GG	32 (17,297%)	20 (14,285%)	0,799	0,428 – 1,461	0,46
Lặn					
GG+GC	125 (67,567%)	83 (59,285%)	1,00		
CC	60 (32,432%)	57 (40,714%)	1,393	0,442 – 1,106	0,123

Ghi chú: n: Số lượng cá thể; OR: Tỷ số odds ratio; 95%CI: Khoảng tin cậy 95%; p: Được tính bằng phương pháp Chi-square.

SOX5 mã hóa yếu tố phiên mã SRY-box 5. Protein SOX5 duy trì mức độ biểu hiện cao trong suốt quá trình sinh tinh, đặc biệt cao trong giai đoạn đầu và giai đoạn muộn của tế bào sinh tinh tròn [22]. Quá trình sinh tinh là quá trình phát triển hình thái và phân tử đối với tinh trùng. Đây được coi là quá trình quan trọng nhất, cần thiết cho sự phát triển chức năng và hình thái cho các giao tử đực [23]. Năm 2011, nghiên cứu tương quan trên toàn bộ hệ gen (Genome wide association study – GWAS) trên quần thể người Hán, Trung Quốc lần đầu chỉ ra rằng những đa hình trên SOX5 có liên quan tới vô sinh nam do không có tinh trùng (non-obstructive azoospermia - NOA). Trong đó, đa hình gen SOX5 rs10842262 có mối tương quan chặt chẽ đến nguy cơ mắc vô sinh nam trên quần thể này ($OR = 1,23$; $p = 2,3 \times 10^{-9}$) [24]. Ngoài ra, nghiên cứu trên 550 bệnh nhân NOA và 555 người Hán, Trung Quốc khỏe mạnh khẳng định tần số kiểu gen và allele khác biệt rõ rệt giữa hai nhóm nghiên cứu với các giá trị p lần lượt là 0,0095 và 0,0023 [15]. Hai nghiên cứu năm 2015 [22] và năm 2017 [25] cũng trên quần thể người Hán, Trung Quốc đều khẳng định mối tương quan chặt chẽ giữa đa hình gen SOX5 rs10842262 với nguy cơ mắc vô sinh nam. Năm 2020, nghiên cứu trên quần thể người Hán được tiến hành trên tập mẫu lớn hơn gồm 631 bệnh nhân vô sinh nam (NOA) và 720 người khỏe mạnh. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng các cá thể mang allele G có nguy cơ mắc vô sinh nam cao hơn so với các

cá thể mang allele C ($p = 0,004$; OR = 1,35; 95%CI = 1,1 – 1,64). Hơn nữa, kiểu gen GG cũng làm tăng nguy cơ mắc NOA cao hơn kiểu gen GT và TT ($p = 0,008$; OR = 0,66; 95%CI = 1,10 – 1,64). Ngoài ra, nghiên cứu trên 208 bệnh nhân nam thiếu tinh/không tinh trùng và 223 người khỏe mạnh trên quần thể người Serbia cho thấy đa hình này cũng có mối liên quan chặt chẽ đến vô sinh nam trong mô hình đồng trội ($p = 0,048$) và mô hình trội ($p = 0,017$) [19]. Tuy nhiên, nghiên cứu khác trên 409 bệnh nhân NOA và 1167 nam giới khỏe mạnh trên quần thể người Nhật Bản cho thấy không có bất cứ sự tương quan nào giữa đa hình gen SOX5 rs10842262 ($p > 0,05$; OR = 1,11; 95%CI = 0,94 – 1,32) với vô sinh ở nam giới [20]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng không tìm thấy sự liên quan nào giữa đa hình này và nguy cơ mắc vô sinh nam ở người Việt Nam. Do đó, sự liên quan của đa hình gen SOX5 rs10842262 với vô sinh nam là không đồng nhất giữa các quần thể khác nhau. Nguyên nhân của sự sai khác này có thể do đặc trưng di truyền giữa các quần thể người, môi trường sống, hoặc các điều kiện chi phối khác.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm thấy tỷ lệ kiểu gen GG/GC/CC của đa hình gen SOX5 rs10842262 lần lượt là 0,16/0,48/0,36 ở 140 nam giới mắc vô sinh nam và 185 nam giới khỏe mạnh người Việt Nam. Sự phân bố kiểu gen của đa hình này tuân theo định luật cân bằng HWE. Nghiên cứu không tìm thấy mối tương quan giữa SOX5 rs10842262 và nguy cơ mắc vô sinh ở nam. Đây là nghiên cứu đầu tiên về tần số kiểu gen và allele của đa hình gen SOX5 rs10842262 ở người Việt Nam. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cung cấp thông tin hữu ích cho các nghiên cứu tương quan giữa đa hình trên gen SOX5 và vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với sự tài trợ từ đề tài khoa học thuộc nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Mã số ĐTĐL.CN.60/19).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] J. Poongothai, T. S. Gopenath, S. Manonayaki, and S. Poongothai, "Genetics of human male infertility," *Singapore Medical Journal*, vol. 50, no. 4, pp. 336-47, 2009.
- [2] S. A. Yatsenko and A. Rajkovic, "Genetics of human female infertility," *Biology of Reproduction*, vol. 101, no. 3, pp. 549-566, 2019.
- [3] M. Grynberg *et al.*, "Fertility preservation in Turner syndrome," *Fertility and Sterility*, vol. 105, no. 1, pp. 13-19, 2016.
- [4] L. Huang *et al.*, "Novel mutations in PATL2 cause female infertility with oocyte germinal vesicle arrest," *Hum. Reprod.*, vol. 33, no. 6, pp. 1183-1190, 2018.
- [5] F. T. L. Neto, P. V. Bach, B. B. Najari, P. S. Li, and M. Goldstein, "Genetics of Male Infertility," *Curr. Urol. Rep.*, vol. 17, no. 10, pp. 1-12, 2016.
- [6] S. Colaco and D. Modi, "Consequences of Y chromosome microdeletions beyond male infertility," *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 36, no. 7, pp. 1329-1337, 2019.
- [7] S. Colaco and D. Modi, "Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 16, no. 1, pp. 1-24, 2018.
- [8] F. Dehghanpour, F. Fesahat, F. Yazdinejad, L. Motamedzadeh, and A. R. Talebi, "Is there any relationship between human sperm parameters and protamine deficiency in different groups of infertile men?," *Rev. Int. Androl.*, vol. 18, no. 4, pp. 137-143, 2020.
- [9] U. A. Mau-Holzmann, "Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women," *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 111, no. 3-4, pp. 317-336, 2005.
- [10] W. Liu *et al.*, "Bi-allelic Mutations in TTC21A Induce Asthenoteratospermia in Humans and Mice," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 104, no. 4, pp. 738-748, 2019.
- [11] K. I. Aston, "Genetic susceptibility to male infertility: News from genome-wide association studies," *Andrology*, vol. 2, no. 3, pp. 315-321, 2014.
- [12] V. Singh *et al.*, "SNPs in ERCC1, ERCC2, and XRCC1 genes of the DNA repair pathway and risk of male infertility in the Asian populations: association study, meta-analysis, and trial sequential

- analysis,” *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 36, no. 1, pp. 79-90, 2019.
- [13] J. -F. Nsota Mbango, C. Coutton, C. Arnoult, P. F. Ray, and A. Touré, “Genetic causes of male infertility: snapshot on morphological abnormalities of the sperm flagellum,” *Basic Clin. Androl.*, vol. 29, no. 1, p. 2, Dec. 2019.
- [14] X. Gu *et al.*, “PEX10, SIRPA-SIRPG, and SOX5 gene polymorphisms are strongly associated with nonobstructive azoospermia susceptibility,” *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 36, no.4, pp. 759-768, 2019.
- [15] S. Zou *et al.*, “Association study between polymorphisms of PRMT6, PEX10, SOX5, and nonobstructive azoospermia in the Han Chinese population,” *Biol. Reprod.*, vol. 90, no. 5, pp. 1-4, 2014.
- [16] R. W. Y. Lee, J. Bodurtha, J. Cohen, A. Fatemi, and D. Batista, “Deletion 12p12 involving SOX5 in two children with developmental delay and dysmorphic features,” *Pediatr. Neurol.*, vol. 48, no. 4, pp. 317-320, 2013.
- [17] N. Takamatsu *et al.*, “A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 3759-3766, 1995.
- [18] T. Jiang, C. C. Hou, Z. Y. She, and W. X. Yang, “The SOX gene family: Function and regulation in testis determination and male fertility maintenance,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 40, no. 3, pp. 2187-2194, 2013.
- [19] V. Nemanja *et al.*, “Association study between single-nucleotide variants rs12097821, rs2477686, and rs10842262 and idiopathic male infertility risk in Serbian population with meta-analysis,” *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 37, no. 11, pp. 2839-2852, 2020.
- [20] Y. Sato *et al.*, “Replication study and meta-analysis of human nonobstructive azoospermia in Japanese populations,” *Biol. Reprod.*, vol. 88, no. 4, pp. 1-4, 2013.
- [21] R. Core Team, “R: A language and environment for statistical computing,” *R Foundation for Statistical Computing*, vol. 1, pp. 79318, 2019.
- [22] W. Tu *et al.*, “Genome-wide loci linked to non-obstructive azoospermia susceptibility may be independent of reduced sperm production in males with normozoospermia,” *Biol. Reprod.*, vol. 92, no. 2, pp. 1-6, 2015.
- [23] M. K. Skinner, *Encyclopedia of reproduction*. 2018.
- [24] Z. Hu *et al.*, “A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia,” *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 2, pp.183-186, 2012.
- [25] S. Y. Liu *et al.*, “Strong association of SLC1A1 and DPF3 gene variants with idiopathic male infertility in Han Chinese,” *Asian J. Androl.*, vol. 18, pp. 486, 2016.