

# Khảo sát mối liên quan của đa hình *DNAH1* rs12163565 với bệnh vô sinh nam ở người Việt Nam

Nguyễn Thùy Dương<sup>1,\*</sup>, Lê Đức Duy<sup>1</sup>, Nông Văn Hải<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 23/8/2021; ngày chuyển phản biện 27/8/2021; ngày nhận phản biện 17/9/2021; ngày chấp nhận đăng 22/9/2021

## **Tóm tắt:**

Vô sinh nam là một bệnh ảnh hưởng tới sinh sản ở nam giới gây ra bởi nhiều yếu tố, gồm những bất thường về di truyền, các rối loạn miễn dịch hoặc nội tiết. Một số nghiên cứu đã chứng minh đa hình gen *DNAH1* có liên quan với nguy cơ mắc bệnh vô sinh nam. Do đó, với mục đích đánh giá sự liên quan của đa hình *DNAH1* rs12163565 với bệnh vô sinh nam ở người Việt Nam, các tác giả đã tách chiết DNA tổng số của 213 mẫu máu (110 mẫu bệnh vô sinh nam và 103 mẫu đối chứng). Kiểu gen của đa hình rs12163565 được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP. Sự phân bố kiểu gen của đa hình và mối liên hệ với bệnh vô sinh nam được phân tích bằng các phương pháp thống kê sinh học. Kết quả cho thấy, sự phân bố kiểu gen của đa hình rs12163565 tuân theo định luật Hardy-Weinberg (HWE) ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu không tìm thấy mối liên quan giữa đa hình *DNAH1* rs12163565 với nguy cơ mắc bệnh vô sinh nam ( $p > 0,05$ ) ở người Việt Nam. Đây sẽ là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu về mối liên quan của gen *DNAH1* với bệnh vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam sau này.

**Từ khóa:** *DNAH1*, PCR-RFLP, rs12163565, Việt Nam, vô sinh nam.

**Chỉ số phân loại:** 1.6

## **Đặt vấn đề**

Vô sinh nam đã ảnh hưởng tới cuộc sống gia đình của hơn 20 triệu nam giới trên toàn cầu và đang trở thành một trong những vấn nạn sức khỏe nghiêm trọng [1]. Vô sinh nam có thể được gây ra bởi nhiều nhân tố khác nhau, gồm bất thường di truyền, các rối loạn hệ miễn dịch hoặc hệ nội tiết, giãn tĩnh mạch thừng tinh và các bệnh nhiễm trùng [2-4]. Trong đó, dị dạng ở đuôi tinh trùng là một nhân tố có tiềm năng cao gây ra vô sinh nam. Một bệnh nhân có thể có nhiều dạng khiếm khuyết khác nhau ở đuôi tinh trùng cùng một lúc như sai lệch cấu trúc sợi trục, không có thể đôi trung tâm và không có ty thể [5]. Đột biến ở họ gen *DNAH* (Dynein axonemal heavy chain) gây khiếm khuyết ở đuôi tinh trùng với nhiều mức độ khác nhau, dẫn tới tinh trùng dị dạng (teratozoospermia) hoặc tinh trùng yếu (asthenozoospermia) [5-7]. Trong đó, đột biến ở gen *DNAH1* được tìm thấy ở bệnh nhân vô sinh nam do tinh trùng yếu hoặc đuôi tinh trùng xuất hiện nhiều kiểu biến dạng (Multiple morphologic abnormalities of the flagella - MMAF) [5, 8, 9].

*DNAH1* (NM\_015512.5) nằm trên nhiễm sắc thể số 3 (3p21.1), có kích thước hơn 87 kb và mã hóa cho một chuỗi nặng của enzyme ở phía trong dynein. *DNAH1* giúp cho liên kết giữa thể đôi phía ngoài và radical spoke (RS) trở nên vững chắc, còn RS đóng vai trò kết nối các thể đôi phía

ngoài với thể đôi trung tâm [10]. Đột biến gây bệnh ở gen *DNAH1* có thể làm mất hoặc rối loạn chức năng của protein *DNAH1*, dẫn tới sự di chuyển vị trí của thể đôi trung tâm khỏi vị trí ban đầu [5]. Sự khiếm khuyết này còn có thể làm yếu liên kết giữa hai thể đơn trung tâm, dẫn tới cấu trúc bất thường “9+0” của sợi trục được phát hiện ở các bệnh nhân bị MMAF [11], và nó cũng có thể liên quan tới rối loạn vận động nhưng mao nguyên phát (Primary ciliary dyskinesia - PCD) ở các bệnh nhân nữ [10, 12, 13].

Ở Việt Nam, hiện tại chưa có nghiên cứu cụ thể nào về đa hình *DNAH1* rs12163565. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xác định mối liên hệ của đa hình *DNAH1* rs12163565 (c.11402G>A) với bệnh vô sinh nam ở quần thể người Việt Nam.

## **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu**

### **Đối tượng nghiên cứu**

Nghiên cứu bao gồm mẫu máu của 213 cá thể được thu thập từ một số bệnh viện lớn ở Việt Nam, trong đó 110 mẫu từ người bị mắc bệnh vô sinh nam và 103 mẫu đối chứng (không mắc bệnh vô sinh nam). Các tiêu chuẩn để lựa chọn mẫu bệnh bao gồm: (1) Không có con sau ít nhất 12 tháng khi quan hệ vợ chồng không sử dụng biện pháp tránh thai và chưa bao giờ có con; (2) Được chẩn đoán không có tinh trùng (azoospermia) hoặc số lượng tinh trùng thấp

\*Tác giả liên hệ: Email: tnguyen@igr.ac.vn

# Study on the association of *DNAH1* rs12163565 with male infertility in Vietnamese individuals

Thuy Duong Nguyen<sup>1,2\*</sup>, Duc Duy La<sup>1</sup>, Van Hai Nong<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genome Research,  
Vietnam Academy of Science and Technology  
<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology,  
Vietnam Academy of Science and Technology

Received 23 August 2021; accepted 22 September 2021

## Abstract:

Male infertility is a disease that affects men's fertility caused by various factors including genetic abnormalities, and immunological or endocrine diseases. Several studies have demonstrated the correlation between *DNAH1* polymorphisms and the risk of having male infertility. To assess the association of *DNAH1* rs12163565 with male infertility, we extracted total DNA from whole blood of 213 Vietnamese, including 110 patients with male infertility and 103 healthy controls. The genotypes of the polymorphism were determined by PCR-RFLP method. The distribution of genotypes and their relationship with male infertility were analyzed by statistical methods. The results indicated that *DNAH1* rs12163565 followed Hardy-Weinberg equilibrium ( $p > 0.05$ ). However, no association was established between the polymorphism and male infertility in the three models (additive, dominant, and recessive) ( $p > 0.05$ ). This study would provide the knowledge about the association of *DNAH1* with male infertility in Vietnamese population.

**Keywords:** *DNAH1*, male infertility, PCR-RFLP, rs12163565, Vietnam.

**Classification number:** 1.6

(oligospermia); (3) Được chẩn đoán vô tinh không do bế tắc (Non obstructive azoospermia - NOA); (4) Có bộ nhiễm sắc thể bình thường và không bị mất đoạn ở vùng AZF (Azoospermia factor); (5) Không có bệnh sử về các bệnh gây vô sinh như quai bị (làm teo tinh hoàn), các bệnh truyền nhiễm, hay nghiện ma túy. Các mẫu đối chứng được chọn từ nam giới có ít nhất một con mà không phải tìm đến công nghệ hỗ trợ sinh sản (Assisted reproductive technology - ART). Tất cả những đối tượng đáp ứng đủ các điều kiện trên đều đồng ý cung cấp máu sau khi được giải thích về việc lấy máu. Nghiên cứu này được chấp thuận bởi Hội đồng thẩm định cơ sở của Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

## Xác định kiểu gen của đa hình *DNAH1* rs12163565

DNA tổng số sau khi tách chiết từ mẫu máu sử dụng Kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania) được sử dụng để khuếch đại vùng gen *DNAH1* chứa đa hình rs12163565 với cặp môi đặc hiệu được thiết kế sử dụng phần mềm Primer3 với trình tự như sau:

*DNAH1*-rs12163565-F: 5'-AGCCTGCCAGCAACAAG-3'.

*DNAH1*-rs12163565-R: 5'-TCCCATGGAACAAGCACAGAG-3'.

Thành phần của phản ứng PCR bao gồm: 1  $\mu$ l Dream Taq buffer (10X), 0,6  $\mu$ l dNTP (2,5 mM), 0,2  $\mu$ l mỗi xuôi và ngược (10 pmol), 0,05  $\mu$ l Taq polymerase, 2  $\mu$ l DNA (10 ng/ $\mu$ l) và H<sub>2</sub>O, tổng thể tích 10  $\mu$ l. Chu trình nhiệt của phản ứng: 95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/30 giây, 72°C/5 phút (35 chu kỳ). Sản phẩm PCR (2  $\mu$ l) được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Sản phẩm PCR được xử lý bằng enzyme *Eco*130I (Thermo Fisher) ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ. Thành phần của phản ứng cắt bao gồm: 0,3  $\mu$ l buffer O, 0,1  $\mu$ l enzyme *Eco*130I, 3  $\mu$ l DNA và 1,6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, tổng thể tích 5  $\mu$ l. Sản phẩm sau khi xử lý được điện di kiểm tra trên gel agarose 2%. Dựa trên kích thước và số lượng các băng DNA thu được của sản phẩm PCR sau khi được xử lý bằng enzyme, kiểu gen của đa hình rs12163565 sẽ được xác định (bảng 1).

**Bảng 1. Số lượng và kích thước các băng sản phẩm cắt tương ứng với các kiểu gen *DNAH1* rs12163565.**

Kiểu gen	Số lượng băng DNA	Chiều dài băng (bp)
GG	1	108, 154
GA	2	108, 154, 262
AA	3	262

## Giải trình tự Sanger

Để kiểm tra lại kết quả của phương pháp PCR-RFLP, khoảng 10% số mẫu được chọn ngẫu nhiên để tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification kit (Thermo Fisher) và được giải trình tự bằng ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Bio-systems, Carlsbad, CA, USA). Kết quả thu được sau khi giải trình tự được dùng để so sánh với trình tự tham khảo của *DNAH1* (NG\_052911.1) bằng phần mềm SnapGene Viewer.

## Phân tích số liệu

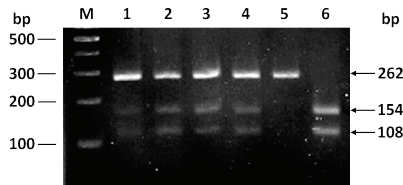
Việc phân tích số liệu được thực hiện trên phần mềm Microsoft Excel và R phiên bản 4.1.1 [14]. Kiểm định chi bình phương ( $\chi^2$ ) trong package "HardyWeinberg" [15] được sử dụng để kiểm tra trạng thái cân bằng HWE của quần thể. Thêm vào đó, package "epitools" [16] được dùng để đánh giá sự liên quan giữa đa hình và bệnh vô sinh nam trên 3 mô hình khác nhau, bao gồm cộng gộp (additive model), trội

(dominant model), lặn (recessive model) và được ước tính bằng chỉ số OR (odds ratio) với khoảng tin cậy 95%. Tất cả các phép kiểm định đều có tính chất hai phía. Các kiểm định được coi là có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $p < 0,05$ .

**Kết quả**

**Xác định kiểu gen đa hình của DNAH1 rs12163565**

Vùng trình tự đích chứa đa hình DNAH1 rs12163565 được khuếch đại bằng PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu DNAH1-rs12163565-F và DNAH1-rs12163565-R. Kết quả điện di cho thấy băng sản phẩm PCR sáng rõ và có kích thước đúng dự đoán. Sau đó, sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme Eco130I. Kết quả điện di sản phẩm của một số mẫu đại diện cho thấy, ở các giếng 1, 2, 3, 4 có 3 băng DNA (108, 154 và 262 bp) tương ứng với kiểu gen GA; giếng 5 có duy nhất 1 băng DNA (262 bp) tương ứng với kiểu gen AA; giếng 6 xuất hiện 2 băng DNA (108 và 154 bp) tương ứng với kiểu gen GG (hình 1).



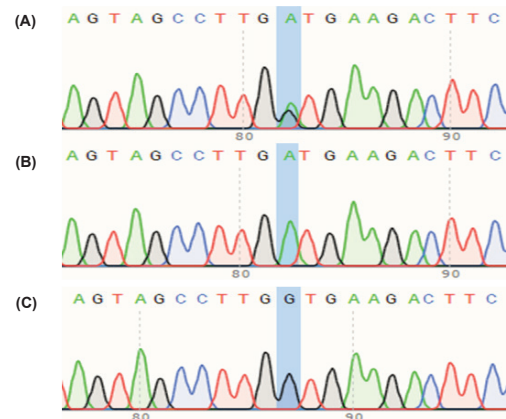
**Hình 1. Ảnh điện di đại diện một số sản phẩm PCR cắt bằng enzyme Eco130I.** M: marker 1 kb; giếng 1, 2, 3, 4: kiểu gen GA; giếng 5: kiểu gen AA; giếng 6: kiểu gen GG.

Kết quả xác định kiểu gen và tần số allele của đa hình rs12163565 của 213 mẫu nghiên cứu được thống kê ở bảng 2. Tỷ lệ kiểu gen (GG/GA/AA) quan sát được trên nhóm bệnh (30,9%/56,4%/12,7%) không sai lệch nhiều so với nhóm chứng (37,8%/48,5%/13,7%) và tỷ lệ này cũng không thay đổi trên toàn bộ nhóm đối tượng nghiên cứu (34,27%/52,58%/13,45%). Khi so sánh tần số allele A (allele nhỏ) ở nhóm bệnh (0,409) với nhóm đối chứng (0,379), chúng tôi không nhận thấy sự khác biệt đáng kể nào. Phân tích thống kê cho thấy, sự phân bố kiểu gen của đa hình rs12163565 (G>A) tuân theo định luật cân bằng HWE trên cả nhóm bệnh, nhóm chứng và trên toàn bộ nhóm đối tượng nghiên cứu ( $p > 0,05$ ) (bảng 2). Ngoài ra, kết quả giải trình tự bằng phương pháp Sanger của 10% mẫu chọn ngẫu nhiên cho kết quả nhất quán với phương pháp PCR-RFLP (hình 2).

**Bảng 2. Thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình rs12163565.**

	Kiểu gen			Tần số allele		Giá trị p	HWE
	GG	GA	AA	G	A		
Nhóm bệnh (n=110)	34 (30,9%)	62 (56,4%)	14 (12,7%)	0,591	0,409	0,114	+
Nhóm chứng (n=103)	39 (37,8%)	50 (48,5%)	14 (13,7%)	0,621	0,379	0,836	+
<b>Tổng số</b>	<b>73 (34,27%)</b>	<b>112 (52,28%)</b>	<b>28 (13,45%)</b>	<b>0,606</b>	<b>0,394</b>	<b>0,195</b>	<b>+</b>

Ghi chú: +: tuân theo định luật HWE.



**Hình 2. Kiểm tra kết quả của phương pháp PCR-RFLP bằng phương pháp giải trình tự Sanger.** (A) Kiểu gen dạng dị hợp GA của mẫu đối chứng; (B) Kiểu gen dạng đồng hợp AA của mẫu vô sinh nam; (C) Kiểu gen dạng đồng hợp GG của mẫu đối chứng.

**Phân tích mối tương quan giữa DNAH1 rs12163565 và bệnh vô sinh nam**

Chúng tôi sử dụng kiểm định chi bình phương ( $\chi^2$ ) để đánh giá mối tương quan giữa kiểu gen và tần số allele của đa hình DNAH1 rs12163565 với khả năng mắc bệnh vô sinh nam. Kết quả phân tích cho thấy, giá trị p thu được ở cả 3 mô hình (cộng gộp, trội, lặn) đều lớn hơn 0,05, do đó các phép kiểm định không có ý nghĩa thống kê (bảng 3). Như vậy, kiểu gen cũng như allele của đa hình rs12163565 không liên quan đến nguy cơ mắc bệnh vô sinh nam ở nhóm đối tượng nghiên cứu.

**Bảng 3. Phân tích mối liên hệ giữa đa hình rs12163565 với bệnh vô sinh nam.**

Mô hình	Nhóm bệnh (n, %)	Nhóm chứng (n, %)	OR	95% CI	Giá trị p
<b>Mô hình cộng gộp</b>					0,844
GG	34 (30,91%)	39 (37,86%)	1,000		
GA	62 (56,36%)	50 (48,54%)	0,704	0,387-1,275	0,242
AA	14 (12,73%)	14 (13,59%)	0,873	0,360-2,116	0,757
<b>Mô hình trội</b>					
GG	34 (30,91%)	39 (37,86%)	1,000		
GA + AA	76 (69,09%)	64 (62,14%)	0,735	0,414-1,300	0,285
<b>Mô hình lặn</b>					
GG + GA	96 (87,27%)	89 (86,4%)	1,000		
AA	14 (13,73%)	14 (13,6%)	1,078	0,48-2,422	0,851
<b>Allele</b>					
G	65 (59,09%)	64 (62,13%)	1,000		
A	45 (40,91%)	39 (37,87%)	0,881	0,505-1,530	0,649

Ghi chú: n (%): số lượng cá thể (phần trăm); OR: tỷ số odds; 95% CI: khoảng tin cậy 95%; p-value được tính bằng kiểm định Chi-square.



## Bàn luận

Khiếm khuyết ở đuôi tinh trùng là một trong các nhân tố gây vô sinh nam, có ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình thụ tinh của tinh trùng. Đuôi tinh trùng là một bộ phận rất phức tạp, được cấu thành bởi hàng loạt protein khác nhau mà bất kỳ bất thường nào của chúng cũng có thể ảnh hưởng đến quá trình lắp ráp và chức năng của đuôi tinh trùng. Đuôi tinh trùng đóng vai trò cốt lõi cho việc di chuyển của tinh trùng bằng việc tạo ra lực đẩy để tiến về phía trước. Thành phần chính của đuôi tinh trùng là sợi trục, kéo dài suốt chiều dài của đuôi. Sợi trục cấu tạo bởi 9+2 vi ống, bao gồm một cặp vi ống ở giữa và 9 thể đôi vi ống ở xung quanh theo một trật tự nhất định [17]. Chín thể đôi phía ngoài đều có các protein dynein đính ở mặt hướng vào thể đôi trung tâm, và ở mặt còn lại [18]. Dị dạng ở đuôi tinh trùng do các yếu tố ngoại sinh và nội sinh bao gồm các nhân tố di truyền có thể làm giảm khả năng di chuyển của tinh trùng [19, 20]. *DNAH1* mã hóa cho một chuỗi nặng của chuỗi enzyme ở phía trong của dynein - một thành phần cấu tạo nên sợi trục của tinh trùng. Sự vắng mặt của protein DNAH1 làm mất vị trí đính của RS3 vào thể đôi phía ngoài, dẫn tới việc liên kết giữa hai vi ống trung tâm bị yếu đi [9], ảnh hưởng trực tiếp đến sự hình thành của sợi trục và cuối cùng dẫn đến đuôi tinh trùng xuất hiện nhiều kiểu biến dạng (MMAF) và phát triển không bình thường ở bao đuôi (dysplasia of the fibrous sheath - DFS) [5].

Một số nghiên cứu gần đây đã tìm thấy một số đột biến ở gen *DNAH1* có liên quan tới bệnh vô sinh nam do các nguyên nhân khác nhau [9, 10, 21, 22]. Nghiên cứu thực hiện trên 200 bệnh nhân không có tinh trùng người Trung Quốc đã phát hiện được 8 biến đổi của *DNAH1* trên 6 bệnh nhân [23]. Trong đó, 4 biến đổi đã được công bố tại các cơ sở dữ liệu thế giới 1000 genomes và ExAC và 4 biến đổi mới. 3 biến đổi mới g.52430536del, g.52412620del và g.52418050del gây dịch khung đọc của protein, còn biến đổi c.6446T>G được dự đoán ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng của protein. Nghiên cứu khác của Sha và cs (2017) [9] đã phát hiện được mối liên quan của hai đột biến trên *DNAH1* (c.11726\_11727delCT, c.C7066T) với các kiểu biến dạng của đuôi tinh trùng MMAF ở quần thể người Hán. Trong đó, đột biến c.11726\_11727delCT làm protein DNAH1 ngắn hơn bình thường và ảnh hưởng nghiêm trọng tới vùng chuỗi nặng của dynein ở đầu C cũng như cấu trúc bậc 3 của protein này [21]. Gần đây, Yu và cs (2021) [24] đã chỉ ra rằng, đột biến c.11726\_11727delCT và đa hình *DNAH1* rs12163565 có liên kết với nhau và khả năng chúng

có cùng nguồn gốc Nam Á. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xem xét sự liên quan của đa hình *DNAH1* rs12163565 với nguy cơ mắc bệnh vô sinh nam ở người Việt Nam. Tuy nhiên, kết quả cho thấy đa hình này không có liên quan tới bệnh nhân vô sinh nam ở tất cả các mô hình phân tích ( $p>0,05$ ).

## Kết luận

Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp PCR-RFLP chúng tôi đã xác định được kiểu gen của đa hình *DNAH1* rs12163565 ở quần thể người Việt với tỷ lệ kiểu gen GG/GA/AA lần lượt là 34,27%/52,28%/13,45%. Các phân tích thống kê dựa trên dữ liệu kiểu gen - kiểu allele của rs12163565 đều xác định đa hình này không liên quan đến nguy cơ mắc bệnh vô sinh nam ( $p>0,05$ ). Để khẳng định những kết quả này, chúng tôi sẽ tiếp tục mở rộng nghiên cứu với số mẫu lớn hơn ở quần thể người Việt Nam.

## LỜI CẢM ƠN

Công trình được hoàn thành với sự tài trợ từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp quốc gia do Bộ Khoa học và Công nghệ quản lý (mã số 60/19-ĐTĐL.CN-XNT). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Boivin, et al. (2007), "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care", *Hum. Reprod.*, **22**(6), pp.1506-1512.
- [2] M. Luconi, G. Forti, E. Baldi (2006), "Pathophysiology of sperm motility", *Frontiers in Bioscience*, **11**, DOI: 10.2741/1894.
- [3] K.L. O'Flynn O'Brien, A.C. Varghese, A. Agarwal (2010), "The genetic causes of male factor infertility: a review", *Fertility and Sterility*, **93**(1), pp.1-12.
- [4] K. Tremellen (2008), "Oxidative stress and male infertility - A clinical perspective", *Hum. Reprod. Update*, **14**, pp.243-258.
- [5] M. Ben Khelifa, et al. (2014), "Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella", *American Journal of Human Genetics*, **94**(1), pp.95-104.
- [6] D. Zuccarello, et al. (2008a), "Mutations in dynein genes in patients affected by isolated non-syndromic asthenozoospermia", *Hum. Reprod.*, **23**(8), pp.1957-1962.
- [7] D. Zuccarello, et al. (2008b), "A possible association of a human tektin-t gene mutation (A229V) with isolated non-syndromic asthenozoospermia: case report", *Hum. Reprod.*, **23**(4), pp.996-1001.
- [8] C. Coutton, et al. (2018), "Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in Trypanosoma and human", *Nature Communications*, **9**(1), pp.1-18.
- [9] Y. Sha, et al. (2017), "*DNAH1* gene mutations and their

potential association with dysplasia of the sperm fibrous sheath and infertility in the Han Chinese population”, *Fertility and Sterility*, **107(6)**, pp.1312-1318.

[10] C. Wambergue, et al. (2016), “Patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella due to DNAH1 mutations have a good prognosis following intracytoplasmic sperm injection”, *Hum. Reprod.*, **31(6)**, pp.1164-1172.

[11] H.E. Chemes, V.Y. Rawe (2003), “Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men”, *Hum. Reprod. Update*, **9(5)**, pp.405-428.

[12] A. Amiri-Yekta, et al. (2016), “Whole-exome sequencing of familial cases of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF) reveals new DNAH1 mutations”, *Hum. Reprod.*, **31(12)**, pp.2872-2880.

[13] F. Imtiaz, et al. (2015), “Variation in DNAH1 may contribute to primary ciliary dyskinesia”, *BMC Medical Genetics*, **16(1)**, DOI: 10.1186/s12881-015-0162-5.

[14] <https://www.r-project.org/>.

[15] J. Graffelman (2015), “Exploring diallelic genetic markers: the Hardy Weinberg package”, *Journal of Statistical Software*, **64(3)**, DOI: 10.18637/jss.v064.i03.

[16] <https://cran.r-project.org/package=epitools>.

[17] K. Inaba (2011), “Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components”, *Molecular Hum. Reprod.*, **17**, pp.524-538.

*Reprod.*, **17**, pp.524-538.

[18] M. Kikkawa (2013), “Big steps toward understanding dynein”, *Journal of Cell Biology*, **202(1)**, pp.15-23.

[19] K. Inaba (2003), “Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling”, *Zoological Science*, **20**, pp.1043-1056.

[20] R.D. Peralta-Arias, et al. (2015), “ATPases, ion exchangers and human sperm motility”, *Reproduction*, **149(5)**, pp.475-484.

[21] X. Wang, et al. (2017), “Homozygous DNAH1 frameshift mutation causes multiple morphological anomalies of the sperm flagella in Chinese”, *Clinical Genetics*, **91(2)**, pp.313-321.

[22] C. Coutton, et al. (2016), “Commentary on ‘morphological characteristics and initial genetic study of multiple morphological anomalies of the flagella in China’”, *Asian Journal of Andrology*, **18**, DOI: 10.4103/1008-682x.164195.

[23] X. Yang, et al. (2018), “Associations between DNAH1 gene polymorphisms and male infertility - A retrospective study”, *Medicine (United States)*, **97(49)**, DOI: 10.1097/MD.00000000000013493.

[24] W. Yu, et al. (2021), “Mutational landscape of DNAH1 in Chinese patients with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella: cohort study and literature review”, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **38**, pp.2031-2038.