

## استقصاء تواتر التعدد الشكلي المفرد rs 2247911 في جين GPRC6A لدى عينة من الرجال المصابين بنقص خصوبة في سورية

كندة جاويش\*

مروان الحلبي\*\*

سحر الفاهوم\*

### الملخص

خلفية البحث وهدفه: كشفت الدراسات خلال العقد الفائت أن للعظم أدواراً أكثر مما كان متوقعاً، فالعظم الآن يعد عضواً صماوياً يفرز هرموناً هو الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة المنتج من قبل بانيات العظم، وينظم عدداً من العمليات الفيزيولوجية مثل استقلاب الطاقة، والحساسية للأنسولين، والخصوبة الذكرية عبر مستقبله GPRC6A؛ إذ يشكل الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة ومستقبله (ucOCN/GPRC6A) محوراً هرمونياً يساهم فيه الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة لدى ارتباطه بمستقبله في خلايا ليدغ في الخصية تحفيز الاصطناع الحيوي للتستوستيرون المسؤول عن تحريض توليد النطاف، إذ إنه يقوم بالتوازي مع المحور الكلاسيكي الوطاء-النخامي-الخصية بالتحكم في الخصوبة الذكرية، إن حدوث أي اضطراب في أحد عنصري هذا المحور سينعكس على الخصوبة الذكرية.

مواد البحث وطرقه: لتأكيد ذلك قمنا باستقصاء تواتر التعدد الشكلي المفرد rs 2247911 في جين GPRC6A لدى عينة من الرجال السوريين، وشملت الدراسة 172 رجل، 62 منهم لديهم قلة نطاف (عدد النطاف >39 مليون نطفة/الدفقة)، 52 رجلاً لديهم فقد نطاف (عدد النطاف 0 نطفة/الدفقة)، 59 رجلاً سويو النطاف (عدد النطاف <39 مليون نطفة/الدفقة) كمجموعة شاهدة مماثلة عمرياً، وقمنا بسلسلة القطعة المضخمة بعد إجراء التفاعل السلسلي للبوليميراز (Polymerase Chain Reaction (PCR) لكشف التعدد الشكلي آنف الذكر.

النتائج: أظهرت نتائجنا اختلافاً في توزع النمط الجيني وفقاً لمجموعات عدد النطاف، وقد كان لدى حملة الأليل A ازدياداً في خطورة الإصابة بقلّة النطاف بمعدل (OR=1.898 P=0.036)، وازدياداً في خطورة الإصابة بفقد النطاف بمعدل (OR=2.303 P=0.005)، كما أثبتت نتائجنا اختلافاً في متوسط تعداد النطاف وفقاً للنمط الجيني (P=0.0001)، ووفقاً للآليل (P=0.011).

الاستنتاج: تؤكد النتائج دور التعدد الشكلي المفرد rs 2247911 في جين مستقبل الأوستيوكالسين، وتأثيره في عدد النطاف، ومن ثمّ تحكمه بالخصوبة الذكرية، وتلقي الضوء على تخاطب جديد متعدد الأعضاء يعطي الدافع للبحث عن أدوار استقلابية أخرى للعظام.

الكلمات المفتاحية: نقص الخصوبة الذكرية، الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة، GPRC6A، خلايا ليدغ، التعدد الشكلي وحيد النوكليوتيد.

\*قسم الكيمياء الحيوية و الأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، دمشق، سورية.  
\*\*شعبة طب الإخصاب والجنين والوراثة، كلية الطب البشري، جامعة دمشق، دمشق، سورية

## Investigation of Single Nucleotide Polymorphism rs 2247911 Frequency in GPRC6A Gene in a Sample of Infertile Men in Syria

Kenda Jawich\*

Marwan Al-Halabi\*\*

Sahar ALfahoum\*

### Abstract

**Background & Aim:** During the last decade studies have uncovered that bone has more functions than was expected. In particular, bone is an endocrine organ secreting a growing number of hormones. In that context the discovery of osteoblast derived hormone Osteocalcin in its undercarboxylated form has significantly broadened the field of bone biology because of the number of physiological processes regulated by this hormone. At present, Osteocalcin has been shown to enhance male fertility through its receptor GPRC6A, Osteocalcin and its receptor (ucOCN/GPRC6A) are a novel endocrinal axis control male fertility through enhancing the biosynthesis of testosterone in parallel with the classical hypothalamus-pituitary-testis which is the main regulator of spermatogenesis. Therefore, any unbalance in one of the elements of the newly discovered hormonal axis may affect male infertility.

**Materials & Methods:** to validate this theory we investigated the impact of a single nucleotide polymorphism rs 2247911 in GPRC6A gene on sperm count, we recruited 172 subject including 59 normospermic men as a control group, 62 oligozoospermic (sperm count<39million sperm/ejaculate), 52 Azoospermic men (sperm count 0 sperm/ejaculate) and 59 age-matched normospermic controls(spermcoun>39millionsperm/ejaculate) were prospectively selected.

**Results:** Our result showed that risk allele A carriers had increased risk of being azoospermic (OR=1.898 fold, p=0.036) and an increased risk of being oligozoospermic by (OR=2.303fold, p=0.005) we also found differences in mean value of sperm count according to alleles p=0.011, and according to genotype p= 0.0001.

**Conclusion:** our findings are in accordance with the proposed hypothesis of the regulation of male infertility by bone, which highlights a discovery of new cross-talk between multiple organs and provides credence to the search of additional endocrine functions of bone.

**Key Words:** Undercarboxylated Osteocalcin, Bone, GPRC6A, Male infertility, Leydig cell, Single Nucleotide Polymorphism.

\* Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic

\*\* Department of Embryology and reproductive Medicine, Faculty of Medicine, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic

## المقدمة:

ويخضع الأوستيوكالسين لعملية تعديل بعد ترجمة معتمدة على الفيتامين K تزداد فيها الألفة لشوارد الكالسيوم الحرة والمرتبطة مع بلورة الهيدروكسي أبانيت. وتبدي إشارة الأنسولين دوراً جوهرياً في إفراز الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة UCN (الشكل الفعال كهرمون)؛ إذ يحرض ارتباط الأنسولين بمستقبله في بانيات العظام حدوث ارتشاف للعظم، وانخفاض ال PH في جوبة الارتشاف مما يؤدي إلى زوال الكرسلة عند الموقع 17 للأوستيوكالسين المكرسل، وتحرر الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة إلى الدوران حيث يمارس دوره الهرموني. (Ferron et al.2010,297).

إن المستقبل الذي يتوسط إشارة الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة في الخلايا الهدف هو مستقبل من نمط GPCR يدعى GPRC6A، يعبر عنه في خلايا الكبد، الخلايا العضلية الهيكلية، والخلايا الشحمية، وخلايا ليديغ في الخصية، إذ يؤدي تحفيز هذا المستقبل إلى إنتاج وإفراز الأنسولين من خلايا بيتا في البنكرياس، وإفراز التستوستيرون من خلايا ليديغ في الخصية، حيث أبدت الفئران معوزة جين المستقبل -/- GPRC6A المظاهر ذاتها التي أبدتها فئران معوزة الأوستيوكالسين -/- OCN بما فيها تغير في الحساسية للأنسولين، ضعف في التكاثر، وانخفاض في وزن الخصية (Pi et al.,2008,2852).

ويتوضع جين GPRC6A لدى البشر على الصبغي السادس، ويضم ست إكسونات، وارتبط تعدد شكلي مفرد rs2247911 في الإكسون الثاني بحدوث سرطان البروستات، ومقاومة الأنسولين، وفشل الخصية. (L. De Toni et al., 2017,664).

نهدف في الدراسة الحالية إلى تفصي تأثير التعدد الشكلي rs2247911 في جين GPRC6A لدى مرضى سوربين مصابين بنقص خصوبة مجهول السبب، ولاسيما أن

نقص الخصوبة هو المصطلح الذي يطلق عندما يفشل الزوجان في تحقيق حمل خلال سنة من ممارسة الجماع غير المحمي (Vander Borgh et al.,2018,2)، وتعزى حوالي 50% من حالات نقص الخصوبة إلى العامل الذكري (Jungwirth et al. 2012,324). ويشمل تحقيق وظيفة إخصاب سليمة لدى الذكور دوراً محورياً للخصية، وتقوم فيه بإنتاج النطاف، وإفراز الأندروجينات، وهذا ينجم عن تكامل بين عوامل جينية وهرمونية وتشريحية وبيئية، حيث يتطلب التنظيم الهرموني تحرراً لموجّهات الغدد التناسلية من الوطاء التي تحت هرمونات الغدة النخامية المسؤولة عن تحفيز توليد النطاف وإنتاج التستوستيرون من الخصية من خلال هرموني FSH و LH (Mawhinney and Mariotti, 2013, 232).

وتغيرت خلال العقد الأخير النظرة إلى العظم على أنه مجرد تجمع داخلي للكالسيوم بخواص داعمة حيث اعتبر عضواً صمواياً واسعاً يقوم بإفراز هرمونات تضبط العديد من الوظائف الحيوية (Karsenty,2012,109)، فقد أثبتت الدراسات حديثاً أن هرمون الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة المفرز بشكل خاص من قبل بانيات العظم يحفز تكاثر خلايا بيتا في البنكرياس، ويحرض على إفراز الأنسولين، وزيادة الحساسية للأنسولين في الكبد والعضلات والنسج الشحمية البيضاء، كما أنه يحفز الاصطناع الحيوي للتستوستيرون من خلايا ليديغ في الخصية مسهماً بذلك في تحفيز الخصوبة الذكرية، وجرى في عام 1977 عزل وتنميط الأوستيوكالسين، وهو بروتين مفرز بوزن جزيئي 5 كيلو دالتون، ومكوّن من 46-50 حمضاً أمينياً، ويعد واحد من أكثر البروتينات اللاكولاجينية وفرةً، ويحتوي ثلاث ثمالات غاما كاربوكسي غلوتامات، ويصنّع من قبل بانيات العظم بشكل حصري.

وجرى جمع 5 مل من الدم الوريدي بعد صيام ليلة كاملة، وأخذ منه 1 مل دم كامل ضمن أنابيب EDTA بدرجة حرارة -80 إلى حين إجراء عملية استخلاص الدنا الجينومي. بغية تحري التعدد الشكلي rs2247911 في جين مستقبل الأوستيوكالسين GPRC6A، وجرى استخلاص الدنا الجينومي من الكريات البيضاء في الدم المحيطي باستخدام عتيدة QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة، وقيست نقاوة وتركيز العينات بعد عملية الاستخلاص باستخدام جهاز Nanodrop في مخبر الدراسات الوبائية لطفيلي اللايشمانية، حيث تراوحت التراكيز بين 30 نغ/مايكروليتر و 90 نغ/مايكروليتر، اختبرت النقاوة عبر حساب النسبة بين الامتصاص عند طول موجة 260 وطول موجة 280(280/260)، وكانت أكبر من 1.8، وحفظ الدنا المستخلص في دائرة TE، ثم جرى توزيع جميع العينات على صفيحتين للزراعة الخلوية ذات 96 بئراً، حيث وضع 50 مايكروليتراً في كل بئر، وجرى إخضاع الدنا المستخلص لعملية تجفيف للتمكن من الحفظ في درجة حرارة الغرفة، وسهولة النقل تمهيداً لعملية الشحن دون تبريد، حيث جرى تجفيف العينات باستخدام المدور الحراري Biorad USA، California، عند درجة حرارة C<sup>0</sup> 50 لمدة ساعتين للحصول على ثمالة جافة في قعر آبار الصفيحة، حيث جرى ضبط البرنامج الحراري بحيث يستمر بالتسخين للدرجة 50 C<sup>0</sup> خلال ساعتين، وأنجزت عملية التجفيف تحضيراً لعملية الشحن في درجة حرارة الغرفة دون الحاجة للتبريد، بعد تغطيتها بغطاء صفيحة الأليزا، وحفظها ضمن أكياس بلاستيكية، جرى شحن الصفائح إلى مخبر الطب الجزيئي في جامعة بادوفا في إيطاليا حيث جرت استعادة الدنا المجفف عبر حلّه ب 50 مكروليتراً ماءً خالي النوكلياز، ثم التحقق من النقاوة والتركيز للدنا المستخلص

أمراض نقص الخصوبة تشدد خلال الأزمان بسبب تراجع الرعاية الصحية، وتأثير العامل النفسي، في خطوة تسعى لاكتشاف أحد مسببات العقم الذكري المجهولة؛ إذ تصل نسبة الإصابات مجهولة السبب إلى 50%. (Ferlin et.al., 2006,138).

### مواد البحث وطرائقه:

حازت الدراسة على موافقة اللجنة الأخلاقية في جامعة دمشق، واشتملت 172 رجل من مراجعي مشفى الشرق للإخصاب المساعد وطفل الأنبوب، وجمعت العينات استباقياً، وخضع المرضى لفحص سريري من قبل الفريق الطبي في المشفى، حيث جرى اشتغال الرجال الذين يعانون من نقص خصوبة مجهول السبب بينما جرى استبعاد الرجال من الدراسة وفقاً للمعايير الآتية: الإصابة بفقد النطاق الانسدادي، والإصابة بنقص الخصوبة معروف السبب مثل (سرطان خصية، ورض خصية، والتهاب الخصية، والمرضى الخاضعين لمعالجة دوائية ذات تأثير سام للغدد التناسلية)، وجرى فحص السائل المنوي وفقاً للدلائل الاسترشادية لمنظمة الصحة العالمية WHO (2010,WHO)، وجرى تقسيم العينات إلى مجموعات وفقاً للعدد الكلي للنطاق إلى: 1- مجموعة فقد النطاق، وعدد النطاق (0 مليون/الدقة) بلغ عددهم 51 رجلاً. 2 - مجموعة قلة النطاق Oligozoospermia، عدد النطاق (> 39 مليون نطفة/الدقة) بلغ عددهم 62 رجلاً. 3- مجموعة سوي النطاق normozoospermia كمجموعة شاهدة متوافقين عمرياً مع المجموعة المرضية، إذ يبلغ عدد النطاق (<39 مليون/الدقة)، وبلغ عددهم 59 رجلاً، للحصول على قيمة عدد النطاق/الدقة بحسب تركيز النطاق في الملي ويضرب بحجم السائل المنوي.

### الاختبارات الإحصائية:

جرى تطبيق معادلة هاردي ويمبيرغ باستخدام اختبار جودة التوافق goodness- of- fit بهدف مقارنة تكرارات النمط الجيني المشاهدة مع التكرارات المتوقعة لدى المجموعة الشاهدة، واستخدم اختبار بيرسون كاي سكوير أو اختبار فيشر عندما كانت التكرارات المتوقعة خمسة أو أقل ؛ لاختبار الاختلافات في التوزع بين تكرارات الحالات والشواهد، وجرى تصحيح المقارنات المتعددة باستخدام تصحيح بنفروني.

وجرى تقييم الارتباط بين التعدد الشكلي rs2247911 ، ومجموعات عدد النطاق عبر احتساب نسبة الأرجحية ORs وحدي الثقة CIs بتطبيق اختبار الانحدار اللوجستي، وجرى تطبيق اختبار ANOVA ، ثم POST HOC لتحري الفروق في متوسط عدد النطاق وفقاً للنمط الجيني و T TEST لاختبار فروق متوسط عدد النطاق وفقاً للألائل اعتمدت قيمة  $P > 0.05$  قيمة معنوية واستخدم برنامج SPSS 25 لبرنامج الويندوز.

### النتائج:

أظهرت النتائج أن تكرار الأليل الأصغري Minor Allel Frequency 26.25% MAFs مقارب لقواعد بيانات الجينات لحجم عينة أكبر مثل مشروع 1000 جينوم، وقواعد بيانات NCBI وكان dbSNP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). توزع النمط الجيني للتعدد الشكلي خاضعاً لمعادلة هاردي ويمبيرغ،  $P > 0.05$  ، ووجدت اختلافات ذات دلالة إحصائية بين توزع الألائل  $0.05 < P = 0.01$  وفقاً للمجموعات، وكان تواتر الأليل G أعلى عند مجموعة سوبي النطاق Normo (35.6%)، ثم مجموعة Azo (22.5%)، ثم مجموعة Oligo (19.4%)

باستخدام جهاز Nanodrop، وجرى تبني المشاريع المستخدمة في الدراسة السابقة المجراة في جامعة بادوفا من أجل تضخيم القطعة من جين GPRC6A التي تشتمل التعدد الشكلي المفرد. (c.117130704; G□A; Pro91Ser) حيث كانت المشاريع المستخدمة

'AATGAGATACAGCCATGTCCA3' 5مقدم

'GCAATGTTTGGAGGTAGCAC3' 5عكوس

(De Toni et al,2016,955)، وجرى تضخيم منطقة

الجين التي تضم التعدد الشكلي المذكور باستخدام مزيج

تفاعل التضخيم يحتوي 100نغ من الدنا الجينومي، 1.5

وحدة من إنزيم AmpliTaq Gold (Applied

Biosystems) ، 2%DMSO، وقاء 1X PCR Gold ،

(Amersham Biosciences) 2مايكرومولار من dNTP،

10 ميكرو مولار من زوج المشاريع، واستكمل الحجم إلى

25 ميكرو ليلتر بإضافة 13.8ميكروليلتر ماءً خالي

النوكلياز. وكان البرنامج الحراري على النحو الآتي تمسيخ

بدئي لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة  $94C^0$ ، وتمسيخ على

درجة  $94C^0$ ، وتلدين عند درجة حرارة  $60 C^0$ ، وإطالة

بدرجة حرارة  $72C^0$ ، بعدد الدورات 35 دورة، ومن ثم إطالة

نهائية بدرجة حرارة  $72C^0$  باستخدام المدور الحراري

(Thermocycler GeneAMP PCR System 2700

Applied Biosystems)، وبعد عملية التضخيم جرت

عملية تنقية المنتج المكون من 400 زوج أساس باستخدام

عتيدة تنقية SAP-EXO GenaBioscience وإجراء السلسلة

المباشرة Direct Sequencing لكشف التعدد الشكلي

المفرد باستخدام جهاز ABI 3130xl Genetic

، وThermofisher Analyzer، وباستخدام تطبيق online

free gap4 software of the Staden Package، حيث

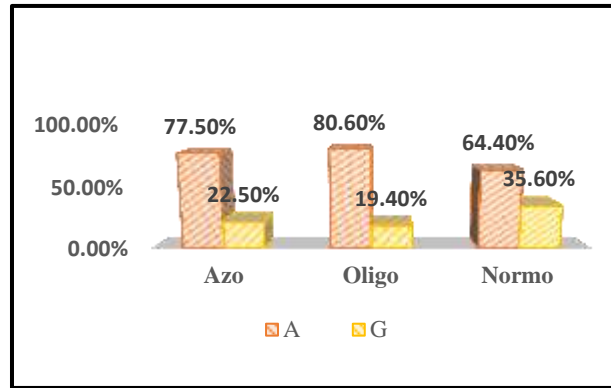
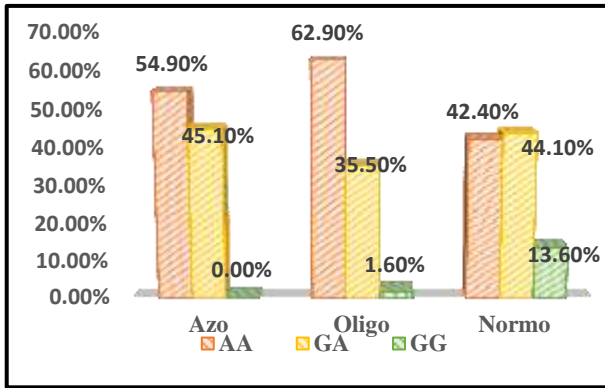
كان من الصعب إجراء عملية السلسلة لجميع العينات في

سورية ضمن الوضع الراهن بسبب عدم توافر العتائد

اللازمة لإجراء هذه التقنية.

مجموعة Azo (54.9%)، ثم مجموعة Normo (42.4%)، بينما كان تواتر النمط الجيني GA أعلى لدى Azo (45.1%)، ثم (44.1%)، ثم Oligo (35.5%)، وكان تواتر النمط الجيني GG الأعلى لدى Normo (13.6%)، ثم Oligo (1.6%)، وكان  $p=0.007 < 0.05$ ، وهكذا يوجد فرق مهم إحصائياً بين المجموعات من حيث تواتر النمط الجيني، الشكل (2).

بينما كان تواتر الأليل A أعلى عند مجموعة Oligo (80.6%)، ثم مجموعة Azo (77.5%)، ثم مجموعة Normo (64.4%)، ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق أُجري اختبار Pearson Chi-Square، فكانت القيمة  $P=0.002$ ، وهكذا يوجد فرق مهم إحصائياً بين المجموعات من حيث تواتر الألائل، الشكل (1). ولدى تحري تواتر النمط الجيني لوحظ أن تواتر النمط الجيني AA أعلى لدى مجموعة Oligo (62.9%)، ثم



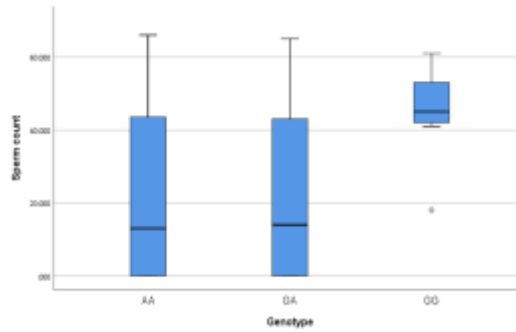
الشكل (2): تواتر النمط الجيني وفقاً لمجموعات عدد النطاق، حيث كان النمط الجيني GG أعلى تواتراً لدى مجموعة Normo، والنمط الجيني AG أعلى تواتراً لدى مجموعة Azo والنمط الجيني AA أعلى تواتراً لدى مجموعة Oligo.

الشكل (1): تواتر الألائل وفقاً لمجموعات عدد النطاق التي قسمت إلى المجموعات التالية: Normo سويي النطاق، وندرة النطاق، Azo وفقد النطاق، حيث كان الأليل G أكثر تواتراً لدى مجموعة Norm والأليل A أكثر تواتراً لدى مجموعة Oligo ومن ثم لدى مجموعة Azo.

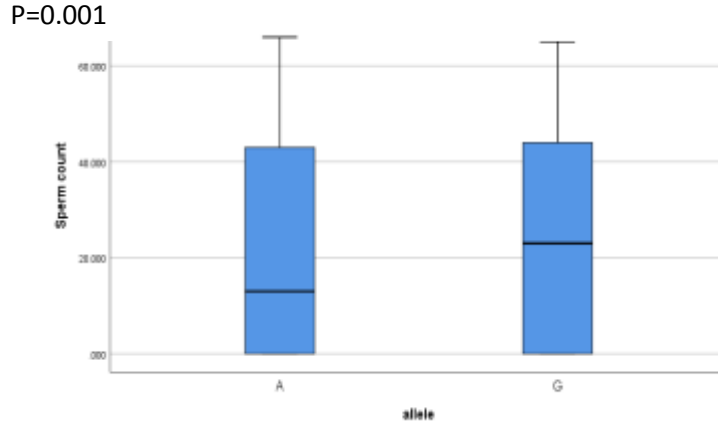
لدى تطبيق اختبار الانحدار اللوجستي لتقييم تأثير أليل الخطوة A في مجموعات عدد النطاف، وُجد أن أليل الخطوة A قد زاد نسبة خطورة الإصابة بقلة النطاف بمقدار 1.9 (OR=1.898.CI=1.044-3.452،P=0.036) ، ونسبة خطورة الإصابة بفقد النطاف بمقدار 2.3 (OR=2.3.CI=1.285-4.127،P=0.005) ، ولدى إجراء مقارنة بين مجموعتي الألائل A،G من حيث متوسط عدد النطاف عن طريق اختبار T-Test كانت قيمة  $p = 0.011 < 0.05$ ، وهكذا يوجد فرق مهم إحصائياً بين المجموعتين بمتوسط عدد النطاف  $G > A$ . الشكل (3).

ولدى تحري فارق متوسطات عدد النطاف وفقاً للنمط الجيني لوحظ أن متوسط عدد النطاف كان أعلى لدى مجموعة النمط GG بالمقارنة مع مجموعة النمط GA بفرق مهم إحصائياً  $p = 0.001 < 0.05$  كما كان أعلى بالمقارنة مع مجموعة النمط AA أيضاً بفرق مهم إحصائياً  $p = 0.0001 < 0.05$ ، كما كان متوسط عدد النطاف أعلى لدى مجموعة النمط GA مقارنة بمجموعة النمط AA لكن بفرق غير مهم إحصائياً ( $P = 0.11 > 0.05$ ). الشكل (4).

P=0.0001



الشكل (4): فرق متوسطات عدد النطاف لدى أفراد الدراسة وفقاً للنمط الجيني AA, GG, AG للتعدي الشكلي rs2247911 حيث كان لدى حملة النمط الجيني GG عدد أعلى من النطاف بالمقارنة مع كل من حملة النمط الجيني AA, AG وذلك بفارق ذي دلالة إحصائية



الشكل(3): فرق متوسطات عدد النطاف لدى أفراد الدراسة وفقاً للأليل حيث كان لدى حملة الأليل G عدد أعلى من النطاف بالمقارنة مع حملة الأليل A، ذلك بفارق ذي دلالة إحصائية

الجدول (1): نسبة الأرجحية خطورة الإصابة بندرة النطاف و قلة النطاف وفقاً للنمط الجيني

حدّي الثقة		الدلالة الإحصائية SIG	نسبة الأرجحية OR	المجموعات	
الحد الأدنى	الحد الأعلى			A الأليل	AZO
1.285	3.452	0.036	1.898	G الأليل	
1.044	4.127	0.005	2.303	A الأليل	OLIGO
				G الأليل	
Normo الفئة المرجعية هي عدد النطاف الطبيعي					



**المناقشة:**

وتبدل في متغيرات السائل المنوي، ومستويات منخفضة من التستوستيرون، ومستويات مرتفعة من الهرمون الملوتن (Oury et al. 2013, 2429) كما أثبتت الدراسات الجينية واسعة الارتباط أن التعدد الشكلي rs2247911 في جين GPRC6A كان مرتبطاً بشكل أعظم مع سرطان البروستات حيث منح الأليل الأصغر G تأثيراً وقائياً ضد الإصابة بسرطان البروستات (Haiman et al., 2013, 8). إن ضلوع ومشاركة عوامل مشتقة من العظم في تنظيم الوظائف الجهازية قد جرى إثباته، ما يلقي ضوءاً جديداً على وجود تخاطب متعدد الأعضاء يقوم فيه العظم عبر هرمون مفرز؛ وهو الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة، إذ يمثل منظم صماوي بمجال واسع من الأهداف من أبرزها تحفيز إنتاج التستوسترون من خلايا ليدغ.

(Clemens and Riddle, Zoch, 2016, 43)

ويتمثل الهدف الجزيئي للأوستيوكالسين بالمستقبل GPRC6A، ويعبر عن هذا المستقبل في الخصية وفي العديد من النسيج ذات الأهمية الاستقلابية مثل البنكرياس، والنسج الشحمية والعضلات الهيكلية والكبد، كما أنه يتواسط التأثيرات اللاجينية للأندروجينات، وبذلك التأثير المتبادل تعلق العروة الصماوية الكائنة بين العظم والخصية حيث يقوم التستوستيرون بتنظيم تطور العظم والبقيا والنمو والتمايز عبر الحياة وبالمقابل يعد العظم منظماً إيجابياً للخصوبة الذكرية حيث إنه عبر الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة الذي لدى ارتباطه بمستقبله GPRC6A الموجود في خلايا ليدغ في الخصية يحرض الاصطناع الحيوي للتستوستيرون (Wei and Karsenty, 2015, 6)، وذلك بطريقة معتمدة على الـ CREB (cAMP responsive element binding) التعبير عن الإنظيمات المفتاحية اللازمة للاصطناع الحيوي للتستوستيرون، ويحرض بقيا الخلايا الجنسية (المنشئة)، وتوليد النطاف (Oury et al. 2011, 796)

قمنا في الدراسة الحالية بتقييم -وللمرة الأولى- تأثير التعدد الشكلي rs2247911 في جين GPRC6A على الخصوبة الذكرية لدى مرضى سوريين يعانون من نقص خصوبة مجهول السبب. وأثبتت النتائج ارتباط أليل الخطورة A مع انخفاض عدد النطاف، وكان الأليل الأكثر تواتراً لدى مجموعة ندرة النطاف، ورفع نسبة أرجحية الإصابة بقلة النطاف بمعدل 1.898، ونسبة أرجحية الإصابة بفقد النطاف بمعدل 2.303 كما كان لدى حملة النمط الجيني AA وAG متوسط عدد النطاف أقل من حملة النمط الجيني GG كما أبدى حملة الأليل A تعداداً من النطاف أقل من حملة الأليل G، وهذا يتوافق مع دراسة دي توني ورفاقه في إيطاليا (De Toni et al, 2016, 955) الذين وجدوا أن أليل الخطورة A قد زاد أرجحية الإصابة بقلة النطاف، وأثبتت هذه الدراسة الاحتمالية المترابطة بمعدل ضعفين لخطورة الإصابة بفقد النطاف وذلك بشكل مترافق مع وجود أليل الخطورة A، كما أثبت وجود اختلاف في مستويات التستوستيرون تبعاً للنمط الجيني حيث كان هناك ميل لتزايد مستويات التستوستيرون لدى حملة النمط الجيني GG بالمقارنة مع حملة النمط AG وAA، ولدى تحري الآلية المرضية وراء هذا التغير الجيني وجدت هذه الدراسة أن أليل الخطورة قد أدى إلى تعرض أقل للمستقبل على سطح الخلية، ومن ثم انخفاض في تنبيغ إشارة مسار ERK1/2، في خلايا HEK293T (De Toni et al. 2016, 261). وقد جرى إثبات تورط المستقبل GPRC6A في الوظيفة التكاثرية للذكور من قبل أوري ورفاقه حين كُشف عن مريضين يحملان طفرة F464Y التي أدت إلى حجب توضع المستقبل على الغشاء الخلوي، وعطلت مسار الإشارة، وكانت التظاهرات السريرية لدى هذين المريضين متمثلة بفشل في الخصية،

هذه الحقائق تفترض وجود محور هرموني يتألف من البنكرياس، والعظم، والخصية يعمل بالتوازي مع محور الوطاء، والنخامى، والخصية، لكل منهما تأثير في الخصوية الذكرية؛ لذلك فإن خلايا ليدىغ هي هدف لمحورين هرمونيين مستقلين، وهما: محور الهرمون الملوتن LH ومستقبله LH receptor، ومحور الأوستيوكالسين ومستقبله GPRC6A، وكلتا الدارتين تساهمان في تحريض إنتاج التستوستيرون والإنتاف. (De Toni et al. 2014,1105)

ويؤدي وجود اضطراب في محور ucOC/GPRC6A الناجم عن مستويات منخفضة من الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة أو خلل في وظيفة المستقبل إلى تعرض متدنٍ للأندروجينات، ومن ثم ينعكس ذلك على الخصوية الذكرية. (De Toni et al., 2017,4)

في الدراسة الحالية قمنا بتقييم -وللمرة الأولى- تأثير التعدد الشكلي rs2247911 في جين GPRC6A على الخصوية الذكرية لدى مرضى سوريين يعانون من نقص خصوية مجهول السبب، وقد ارتبط أليل الخطورة A مع انخفاض عدد النطاف، ورفع نسبة أرجحية الإصابة بقلة النطاف ونسبة أرجحية الإصابة بفقد النطاف، كما كان

حملة النمط الجيني GG لديهم تعداد للنطاف أعلى من حملة النمط الجيني AG وAA. وتقدم النتائج التي حصلنا عليها لدى مجموعة عرقية تدرس للمرة الأولى دليلاً جديداً يسهم في تأكيد الدور المقترح للعظم كمنظم للخصوية الذكرية، وذلك بإفراز الأوستيوكالسين ناقص الكرسلة الذي عبر ارتباطه بمستقبله GPC6A في خلايا ليدىغ يحرض الاصطناع الحيوي للتستوستيرون ويحرض عملية الإنتاف، ويمكن أن يغير نظام المعالجة لدى الرجال الذين يحملون أليل الخطورة بحيث يمكن أن يجري التحريض الهرموني بالتستوستيرون عوضاً عن تحفيز موجهاً الأفتاد، يعد هذا السبيل الاستقلابي المكتشف حديثاً دليلاً مهماً إضافياً في فهم التنظيم المتأزر في الجسم، ويلقي ضوءاً جديداً على التخابط متعدد الأعضاء الذي يتحكم فيه العظم بالاستقلاب و الخصوبة، ويستدعي بذل المزيد من الأبحاث التي تشمل عدداً أكبر من العينات، ومجموعات عرقية أخرى للتحقق من هذا الدور بشكل شامل.

## References:

1. De Toni, L., Di Nisio, A., Rocca, M. S., De Rocco Ponce, M., Ferlin, A., & Foresta, C. (2017, July 1). Osteocalcin, a bone-derived hormone with important andrological implications. *Andrology*, Vol. 5, pp. 664–670. <https://doi.org/10.1111/andr.12359>
2. De Toni, Luca, De Filippis, V., Tescari, S., Ferigo, M., Ferlin, A., Scattolini, V., ... Foresta, C. (2014). Uncarboxylated osteocalcin stimulates 25-hydroxy vitamin D production in Leydig cell line through a GPRC6a-dependent pathway. *Endocrinology*, 155(11), 4266–4274. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1283>
3. De Toni, Luca, De Nisio, A., Speltra, E., Rocca, M. S., Ghezzi, M., Zuccarello, D., ... Foresta, C. (2016). *Polymorphism rs2274911 of GPRC6A as a Novel Risk Factor for Testis Failure*. 101(March), 953–961. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3967>
4. Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R. A., Teti, A., ... Karsenty, G. (2010). Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell*, 142(2), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.003>
5. Gundberg, C. M., Lian, J. B., & Booth, S. L. (2012). Vitamin K-Dependent Carboxylation of Osteocalcin: Friend or Foe? *Advances in Nutrition*, 3(2), 149–157. <https://doi.org/10.3945/an.112.001834>
6. Haiman, C. A., Han, Y., Feng, Y., Xia, L., Hsu, C., Sheng, X., ... Stram, D. O. (2013). Genome-Wide Testing of Putative Functional Exonic Variants in Relationship with Breast and Prostate Cancer Risk in a Multiethnic Population. *PLoS Genetics*, 9(3), e1003419. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003419>
7. Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. (2012). European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *European Urology*, 62(2), 324–332.
8. Karsenty, G. (2012, May). The mutual dependence between bone and gonads. *Journal of Endocrinology*, Vol. 213, pp. 107–114. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0452>
9. Mawhinney, M., & Mariotti, A. (2013). Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontology 2000*, 61(1), 232–251. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00408.x>
10. Organization, W. H. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. WHO Press.
11. Oury, F., Ferron, M., Huizhen, W., Confavreux, C., Xu, L., Lacombe, J., ... Karsenty, G. (2013). *Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis*. 123(6), 2421–2433. <https://doi.org/10.1172/JCI65952.insulin>
12. Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C. E., ... Karsenty, G. (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell*, 144(5), 796–809. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.004>
13. Pi, M., Chen, L., Huang, M. Z., Zhu, W., Ringhofer, B., Luo, J., ... Quarles, L. D. (2008). GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS ONE*, 3(12), e3858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003858>
14. Toni, L De, Nisio, A. Di, Rocca, M. S., Ponce, M. D. R., Ferlin, A., & Foresta, C. (2017). *Osteocalcin , a bone-derived hormone with important andrological implications*. 1–7. <https://doi.org/10.1111/andr.12359>
15. Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*, 62, 2–10. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2018.03.012>
16. Wei, J., & Karsenty, G. (2015, June 1). An Overview of the Metabolic Functions of Osteocalcin. *Current Osteoporosis Reports*, Vol. 13, pp. 180–185. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0267-y>
17. Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016, January 1). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, Vol. 82, pp. 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.0>

