

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA – GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

ANASTASSIA BELOUSOVA

**Androgeeni retseptori, folliikuleid stimuleeriva
hormooni retseptori ja inhibiini α -subühiku
geenide polümorfismide seos
idiopaatilise mehepoolse viljatusega**

Magistritöö

Juhendajad: Andres Salumets, Ph.D.
Prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D.

Tartu
2007

Sisukord

SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Spermatogeneesi füsioloogia	7
<i>1.1.1. Seemnerakkude arengu staadiumid</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2 Sertoli rakud</i>	<i>8</i>
<i>1.1.3 Leydig'i rakud.....</i>	<i>9</i>
1.2 Spermatogeneesi endokriinne regulatsioon	9
<i>1.2.1 Gonadotropiine vabastav faktor (GnRH)</i>	<i>10</i>
<i>1.2.2 Luteiniseeriv hormoon (LH)</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3 Testosteroon ja androgeeni retseptor (AR).....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.4 Follüikuleid stimuleeriv hormoon (FSH) ja selle retseptor (FSHR)</i> <i>.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.5 Inhibiin B.....</i>	<i>15</i>
1.3 Viljatus	17
<i>1.3.1 Viljatuse probleemi ulatus.....</i>	<i>17</i>
<i>1.3.2 Naisepoolse viljatuse põhjused</i>	<i>17</i>
<i>1.3.3 Mehepoolse viljatuse põhjused</i>	<i>18</i>
<i>1.3.4 Meeste viljatuse geneetilised tegurid</i>	<i>20</i>
<i>1.3.5 AR geeni polümorfismid ja mehepoolne viljatus</i>	<i>21</i>
<i>1.3.6 FSHR geeni polümorfismid ja mehepoolne viljatus</i>	<i>23</i>
<i>1.3.7 INHA geeni polümorfismid ja viljatus</i>	<i>24</i>
3. MATERJAL JA METOODIKA	27
3.1 DNA eraldamine vereproovidest	27
3.2 SNP'de analüüs	28
<i>3.2.1 PCR amplifitseerimise tingimused.....</i>	<i>28</i>
<i>3.2.2 RFLP analüüs</i>	<i>28</i>
3.3 Mikrosatelliitide analüüs	29
3.4 Tulemuste statistiline analüüs.....	29

4. TULEMUSED	30
4.1 Uuritud indiviidide kliiniliste andmete analüüsi tulemused	30
4.2 AR geeni polümorfismide analüüsi tulemused	30
<i>4.2.1 AR geeni mikrosatelliitide analüüsi tulemused.....</i>	<i>30</i>
<i>4.2.2 AR geeni SNP'de analüüsi tulemused.....</i>	<i>31</i>
<i>4.2.3 AR geeni mikrosatelliitide ja haplotüüpide omavahelised seosed .</i>	<i>33</i>
<i>4.2.4 AR geeni mikrosatelliitide ja patsientide kliiniliste andmete omavaheline seos</i>	<i>33</i>
4.3 FSHR geeni polümorfismide analüüsi tulemused	34
<i>4.3.1 FSHR geeni SNP'de alleelide ja genotüüpide sagedused</i>	<i>34</i>
<i>4.3.2 Hormoonide kontsentratsioonide jaotus sõltuvalt FSHR geeni SNP'de genotüüpidest</i>	<i>38</i>
<i>4.3.3 FSHR geeni kolme SNP haplotüüpide ja genotüüpide sagedused</i>	<i>39</i>
4.4 INHA geeni polümorfismide analüüsi tulemused	43
<i>4.4.1 INHA geeni SNP'de alleelide ja genotüüpide sagedused.....</i>	<i>43</i>
<i>4.4.2 Hormoonide kontsentratsioonide jaotus sõltuvalt INHA geeni genotüüpidest.....</i>	<i>44</i>
5. ARUTELU	46
5.1 AR geeni polümorfismide seos idiopaatilise mehepoolse viljatusega.....	46
5.2 FSHR geeni polümorfismide seos idiopaatilise mehepoolse viljatusega ..	48
5.3 INHA geeni polümorfismide seos idiopaatilise mehepoolse viljatusega...	50
KOKKUVÕTE.....	52
SUMMARY	53
TÄNUAVALDUSED	54
KASUTATUD KIRJANDUS	55

Kasutatud lühendid

ah	aminohape, valgu struktuurne ühik
AIS	<i>Androgen insensitivity syndrome</i> – androgeeni tundetuse sündroom
Ala	alaniin, aminohape
AR	<i>Androgen receptor</i> – androgeeni retseptor
Asn	asparagiin, aminohape
AS-PCR	<i>Allele-specific PCR</i> – alleel-spetsiifiline PCR
AZF	<i>Azoospermia factor</i> – azoospermia faktor, Y kromosoomi spermatogeneesi regiooni tähistus
CAIS	<i>Complete androgen insensitivity syndrome</i> – täieliku androgeeni tundetuse sündroom
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> – tsükliline adenosiinmonofosfaat
CRE	<i>cAMP response element</i> – cAMP signaalile vastav element, enhanser
CRTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene</i> – tsüstilise fibroosi transmembraanse juhtivuse regulaatori geen
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> – epidermaalne kasvufaktor
Ets	DNA'ga seonduv domään valkude struktuuris
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> – fibroblastide kasvufaktor
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i> – folliikuleid stimuleeriv hormoon
FSHR	<i>Follicle stimulating hormone receptor</i> – folliikuleid stimuleeriva hormooni retseptor
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i> – gonadotropiine vabastav faktor
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i> – insuliiniga sarnane kasvufaktor I
INH	<i>Inhibin</i> - inhibiin
INHA	<i>Inhibin α-subunit gene</i> – inhibiini α -subühiku geen
kb	<i>kilo base pairs</i> – tuhat aluspaari, DNA järjestuse pikkuse ühik
LD	<i>Linkage disequilibrium</i> – aheldatuse tasakaalustamatus
LH	<i>Luteinizing hormone</i> – luteiniseeriv hormoon
MAP	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> – mitogeeni poolt aktiveeritav proteiinkinaas
nt	nukleotiid, DNA ahela struktuurne ühik
OR	<i>odds ratio</i> – tõenäosuste suhe

PAIS	<i>Partial androgen insensitivity syndrome</i> – osalise androgeeni tundetuse sündroom
PI3	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i> - inositoltrifosfaat
PKA	<i>Protein kinase A</i> – proteiinkinaas A
POF	<i>Premature ovarian failure</i> – enneaegne ovariaalne puudulikkus
r	regressioonikordaja, regressiooni mudeli koefitsient
RFLP	<i>Restriktion fragment length polymorphism</i> – restriktiooni fragmentide varieeruvus
SCO	<i>Sertoli cell-only syndrome</i> – ainult Sertoli rakkude esinemine testise koes
SD	<i>Standard deviation</i> – standardhälve
Ser	seriin, aminohape
S-FSH	FSH tase vereseerumis
S-INH	Inhibiin B tase vereseerumis
S-LH	LH tase vereseerumis
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – ühenukleotiidne polümorfism
S-T	testosterooni tase vereseerumis
TGF$\alpha\beta$	<i>Transforming growth factors α and β</i> – α - ja β - transformeerivad kasvufaktorid
Thr	treoniin, aminohape
UTR	<i>Untranslated region</i> – mittetransleeritav regioon

SISSEJUHATUS

Viljatuse on tänapäeval levinud probleem, millega puutub terves maailmas kokku ~15% paaridest. Naiste ja meeste viljatuse esineb peaaegu võrdse sagedusega. Mehepoolse viljatuse põhjustest on levinumad suguteede obstruktsioon, suguteede ja suguorganite põletikud või kromosomaalsed muutused. Ühel neljandikul häiritud spermatogeneesi juhtudel (oligo- ja azoospermia) ei õnnestu viljatuse põhjust kindlaks määrata. Meditsiinis nimetatakse antud olukorda "idiopaatiliseks mehe viljatuseks". Idiopaatilise viljatuse selgitamiseks on esitatud palju erinevaid hüpoteese. Üheks võimalikuks seletuseks on iga indiviidi geneetiline taust, mis võib kaasa tuua eelsoodumuse viljatusele. Geneetilise tausta all mõistetakse ka väikeseid muutuseid geenide nukleotiidses järjestuses, nimelt ühenukleotiidseid polümorfisme ja kordusjärjestuste pikkuse variatsioone, mille erinevuste esinemist püütakse seostada mehepoolse viljatusega.

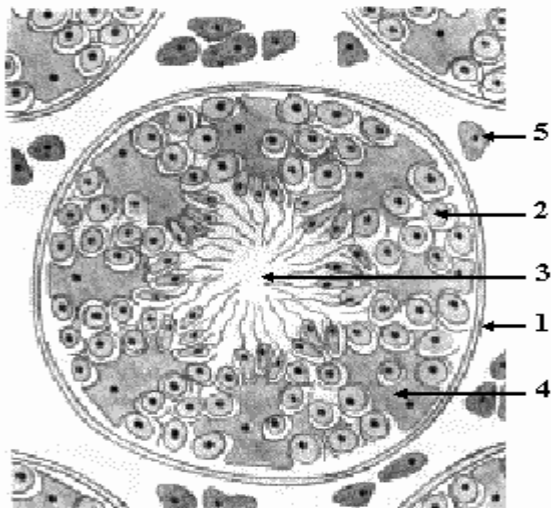
Spermatogeneesi regulatsioon on keeruline ja mitmeastmeline protsess, milles hormoonid (testosteroon, folliikuleid stimuleeriv hormoon ja luteiniseeriv hormoon) mängivad peamist rolli. Üheks hormonaalses regulatsioonis oluliseks faktoriks on ka inhibiin B, mis supresseerib folliikuleid stimuleeriva hormooni sekretsiooni, tagades niiviisi spermatogeneesi regulatsiooni tagasiside.

Käesolevas töös uurisime spermatogeneesi hormonaalses regulatsioonis osalevate geenide polümorfisme: androgeeni retseptori, folliikuleid stimuleeriva hormooni retseptori ja inhibiini α -subühiku geenide polümorfisme, mis võivad avaldada mõju mehe viljatuse kujunemisele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Spermatogeneesi füsioloogia

Spermatogenees hõlmab tervet rida protsesse, mille tulemusena areneb diferentseerunud viljastamisvõimeline haploidne seemnerakk. See protsess toimub testise seemnetorukeste epiteelis, kus esineb nii spermatogoone ehk seemnerakkude eellasrakke, kui ka somaatilisi tugirakke ehk Sertoli rakke (Joonis 1). Spermatogeneesi käivitamine ja kulgemine on suures sõltuvuses hormoonide stimulatsioonist, nimelt testosterooni, folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja luteiniseeriva hormooni (LH) juuresolekust ja kontsentratsioonist.



Joonis 1. Seemnetorukese epiteeli ehituse skeem. 1 – seemnetorukese epiteeli basaalne membraan; 2 – arenev spermatogoon; 3 – seemnetorukese ava; 4 – Sertoli rakk; 5 – Leydig'i rakk.

(http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/1_organisation_app_genital.htm)

1.1.1. Seemnerakkude arengu staadiumid

Arenevad spermatogoonid liiguvad testiste seemnetorukeste epiteeli basaalmembraani lähedast piirkonnast epiteeli pinnani seemnetorukese avasse, läbides järgnevad arengustaadiumid (Bergmann, 2006):

- Spermatogoon – diploidne mitootiliselt jagunev tüvirakk, mis annab alguse seemnerakkudele. Nende hulgas eristatakse A ja B tüüpi spermatogoone nende tuuma kuju järgi, vastavalt kas ovaalse eukromatiinse või ümara

heterokromatiinse tuumaga rakud. Viimased on võimelised meioosi läbima ning edasi diferentseeruma.

- Spermatotsüüt – meiootilist jagunemist alustanud spermatogoon. Esimene meioosi jagunemine võtab aega 1-3 nädalat, sellel ajal muutub primaarne spermatotsüüt tetraploidseks. Esimese jagunemise käigus toimub ka geneetiline ristsiire ehk *crossing over*. Esimesele jagunemisele järgneb meioosi teine jagunemine ning vastavaid rakke nimetatakse juba sekundaarseteks spermatotsüütideks.
- Spermatiid - pärast meioosi lõppemist moodustunud haploidne ümar rakk. Sellest staadiumist algab n.n. spermiogenees, ehk spermatiidi seemnerakuks diferentseerumine. Spermiogeneesi käigus toimub akrosoomi moodustumine (akrosoomi proteolüütiliste valkude süntees ja agregeerumine), tuuma kondenseerumine, saba alge moodustumine, mitokondrite migratsioon saba moodustumise piirkonda, suure osa tsütoplasmast eraldumine jääk-kehakesena (mis fagotsüteeritakse Sertoli rakkude poolt), tuuma ja terve raku elongatsioon ja saba lõplik välja kujunemine.
- Spermatoosoid ehk diferentseerunud seemnerakk. Arenenud seemnerakus on eristatavad „pea”, „kael” ja „saba” piirkonnad. Pea suurema osa hõlmab väga tihedalt kondenseerunud tuum, mis on kaetud akrosoomiga. Akrosoomis sisalduvad proteolüütilised ensüümid, nagu akrosiin, fosfolipiid A, hüaluronidaas, kollageen, neurominidaas ja teised. Neid valke vabastatakse n.n. „akrosomaalse reaktsiooni” käigus, kui seemnerakk hakkab läbi folliikuli *corona radiata* ja munaraku *zona pellucida* kihtide liikuma. Ülemineku osas (kaelas) saavad alguse üheksa paari mikrotoobuleid, mis ulatuvad saba otsani ja tagavad saba elastsuse pöörlemisel. Kaela piirkonnas leidub ka suur hulk mitokondreid, mis sünteesivad liikumiseks vajalikku ATPd (Bergmann, 2006).

1.1.2 Sertoli rakud

Spermatogoonide vahel olevad Sertoli rakud moodustavad spermatogeense epiteeli toe ning ühendavad epiteeli välimist pinda selle basaalmembraaniga. Tänu Sertoli rakkude hargnenud kujule ja omavaheliste sidemete olemasolule tekib epiteelis vere ja testise vaheline barjäär (*blood-testis barrier, BTB*), mille põhiline roll on kaitsta arenevaid spermatotsüüte ja spermatiide autoimmuunsete reaktsioonide eest (Walker, Cheng, 2005; Bergman et al., 1989).

Sertoli rakkude põhiliseks funktsiooniks saab aga nimetada spermatogeneesi käivitamist ja toetamist ning selleks vajalike valkude sünteesi, mida teostatakse vastuseks FSH ja testosterooni hormonaalsele stimulatsioonile (Bergmann, 2006). Sertoli rakud ekspresseerivad nii FSH retseptorit (FSHR), kui ka androgeeni retseptorit (AR) ning hormonaalsel stimulatsioonil sünteesitakse nendes rakkudes terve hulk valke, mille seas on tähtsad kasvufaktorid (TGF α ja β , IGF-I, FGF, EGF), FSH hormooni negatiivset reguleerimist tagav valk inhibiin B, testise kudedes kõrget testosterooni kontsentratsiooni hoidev androgeeni siduv valk (*androgen-binding protein, ABP*), spermatogoonide diferentseerumisel vajalikud valgud transferriin ja tseruloplasmiin ning paljud teised (Walker, Cheng, 2005).

1.1.3 Leydig'i rakud

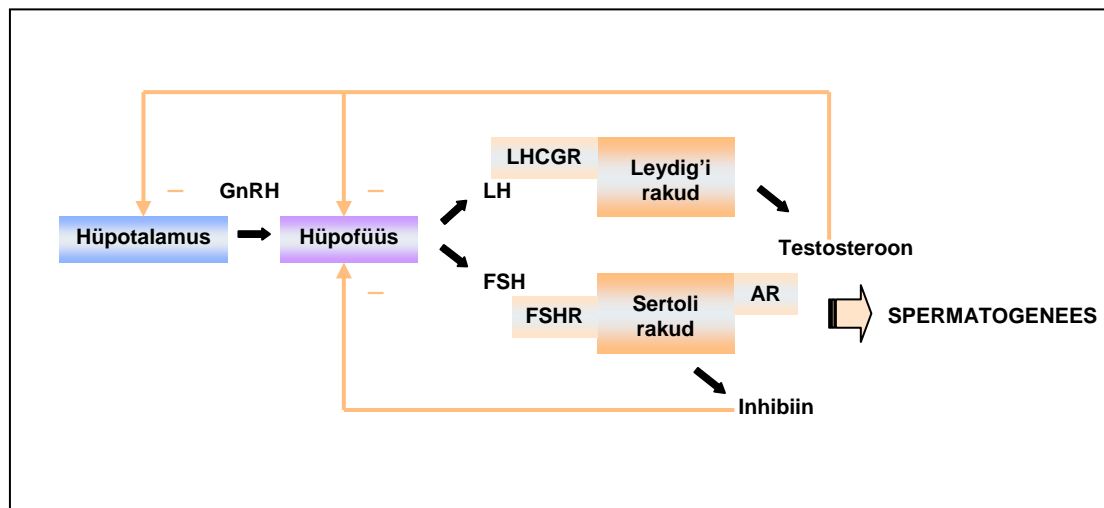
Spermatogenees on tugevas sõltuvuses meeste testosterooni tootmisest. Mõlemad protsessid toimuvad testises, kuid erinevates kompartmentides; spermatogenees – spermatogeense epiteeli seemnetorukestes, steroidogenees – testise torukestevahelises koes Leydig'i rakkudes. Need rakud sisaldavad rohkesti siledat endoplasmaatilist retiikulumi, mis on steroidhormooni sünteesivatele rakkudele iseloomulik tunnus (Meinhardt, 2006). Peale testosterooni sünteesitakse Leydig'i rakkudes ka kasvufaktoreid, neuropeptiide ja tsütokiine (Meinhardt, 2006). Leydig'i rakkude funktsioneerimine sõltub LH stimulatsioonist (Walker, Cheng, 2005).

1.2 Spermatogeneesi endokriinne regulatsioon

Mehe organismis reguleerib sugurakkude arengut mitmeastmeline hormonaalne kaskaad, mida indutseerib hüpotalamuses sünteesitav gonadotropiine vabastav faktor (GnRH). Gonadotropiine vabastav faktor käivitab omakorda FSH ja LH hormoonide tootmise hüpofüüsi poolt (Comhaire, Mahmoud, 2006).

LH stimulatsioonil sünteesitakse Leydig'i rakkudes testosterooni, mis on peamiseks spermatogeneesi käivitavaks hormooniks. Sertoli rakud toetavad omakorda seemnerakkude arengut ja diferentseerumist vastuseks FSH stimulatsioonile. Samal ajal

testosteroon ja inhibiin B suruvad FSH ja LH tootmist maha nii, et gonadotropiinide sekretsioon on reguleeritav negatiivse tagasisideme kaudu (Comhaire, Mahmoud, 2006) (Joonis 2).



Joonis 2. Spematogeneesi reguleeriva hormonaalse kaskaadi skeem.

1.2.1 Gonadotropiine vabastav faktor (GnRH)

Gonadotropiine vabastav faktor on peamine FSH ja LH hormoonide tootmise käivitaja nii mehe kui ka naise organismis. GnRH sekretsioon hüpotalamuse poolt ei ole pidev, vaid toimub pigem tsüklitena tänu endorfiinide ja neurotransmitterite reguleerimisele ning ka mitmetele tagasiside mehhanismidele (Crowley *et al.*, 1991; Comhaire, Mahmoud, 2006). Esiteks supresseerib kõrge GnRH kontsentratsioon GnRH retseptori ekspressiooni maha, tekitades tundetust GnRH suhtes. Seejärel muutub selle hormonaalse kaskaadi hilisemas etapis sünteesitav testosteroon hüpotalamuse rakkudes östradiooliks ning surub koos teiste GnRH sekretsiooni regulaatoritega GnRH sekretsiooni maha (Crowley *et al.*, 1991). Selline mitmekülgne reguleerimine näitab, et tsükliline GnRH sekretsioon on selle süsteemi funktsioneerimiseks kriitiline (Comhaire, Mahmoud, 2006).

1.2.2 Luteiniseeriv hormoon (LH)

Luteiniseeriv hormoon on heterodimeerne glükoproteiin (α - ja β -subühik), mille funktsiooni määrab tema β -subühik. Seevastu α -subühik on LH'l ühine FSH, koorioni gonadotropiini (hCG) ja ka kilpnääret stimuleeriva hormooniga (TSH) (Walker, Cheng,

2005). Luteiniseeriva hormooni tootmine on selgelt seotud GnRH tootmise tõusudega ning LH seondumine oma retseptoriga Leydig'i rakkudel käivitab samas rütmis ka testosterooni sekretsiooni. Sellise rütmilise hormoonide sekretsiooni tegelikku põhjust ei ole teada, kuid on väga tõenäoline, et niiviisi tagatakse erinevate spermatogeneesi staadiumite kulgemine (Comhaire, Mahmoud, 2006).

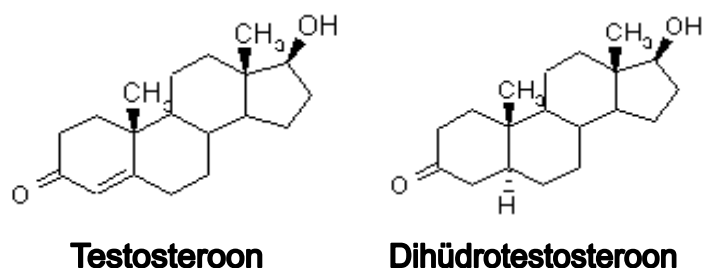
Testosteroon on omakorda LH sekretsiooni negatiivse regulatsiooni vahendaja. Ühelt poolt on perifeerses veres ning ka munandiveenis LH ja testosterooni kontsentratsiooni tõusud selgelt üksteisele järgnevad, mis näitab testosterooni tootmise sõltuvust LH kontsentratsiooni tõusust (positiivne tagasiside). Teiselt poolt on testosterooni kontsentratsiooni tõusud munandiveenis negatiivselt seotud LH tõusudega perifeerses veres (Foresta *et al.*, 1997), mis osutab testosterooni inhibeerivale mõjule LH sünteesile. Tuleb aga täpsustada, et LH tootmise mahasurumine ei ole ainult otseselt testosterooni poolt reguleeritud, vaid sõltub ka GnRH tootmise mahasurumisest testosterooni poolt (Comhaire, Mahmoud, 2006). Seda tõestab LH kontsentratsiooni tõusu hiline mine võrreldes testosterooni kontsentratsiooni tõusudega (Foresta *et al.*, 1997). Seega on luteiniseeriva hormooni ja testosterooni vastasikune regulatsioon tähtsaks mehhanismiks spermatogeneesi hormonaalses regulatsioonis (Comhaire, Mahmoud, 2006).

1.2.3 Testosteroon ja androgeeni retseptor (AR)

Testosteroon on steroidhormoon, mida sünteesitakse kolesteroolist Leydig'i rakkudes vastuseks LH stimulatsioonile ning tema üldkontsentratsioon on Leydig'i rakkude funktsioneerimist peegeldavaks markeriks (Comhaire, Mahmoud, 2006). Testosteroon on peamine meessuguhormoon, mis mõjutab mitte ainult reproduktiivsüsteemi funktsioneerimist (spermatogeneesi), vaid ka meeste suguorganite primaarset ja sekundaarset arengut, meheliku kehaehituse, hääle, karvastiku ja käitumise väljakujunemist (Weber, 2006). Testosterooni puudulikkus põhjustab poistel naiselikku välimust, suguorganite arengu peetust, lihaste vähest arengut, tüsedust ning kehakarvastiku puudumist (Weber, 2006).

Suur osa veres esinevast testosteroonist on suguhormoone siduva globuliiniga (*sex hormone binding globuline, SHBG*) või albumiiniga seotud (Vermeulen *et al.*, 1999). Bioaktiivseteks vormideks on kas vaba (sidumata) testosteroon või albumiiniga seotud

testosteroon. Sihtmärkrakkudes toimib testosteroon kas otse või 5 α -dihüdrotestosterooni näol (Rajender *et al.*, 2007), mida sünteesitakse testosteroonist 5 α -reduktaasi abil (Joonis 3). Dihüdrotestosteroonil on suurem afiinsus androgeeni retseptori suhtes. Dihüdrotestosteroon on testosterooni agonist.



Joonis 3. Testosterooni ja dihüdrotestosterooni molekulide ehitus.

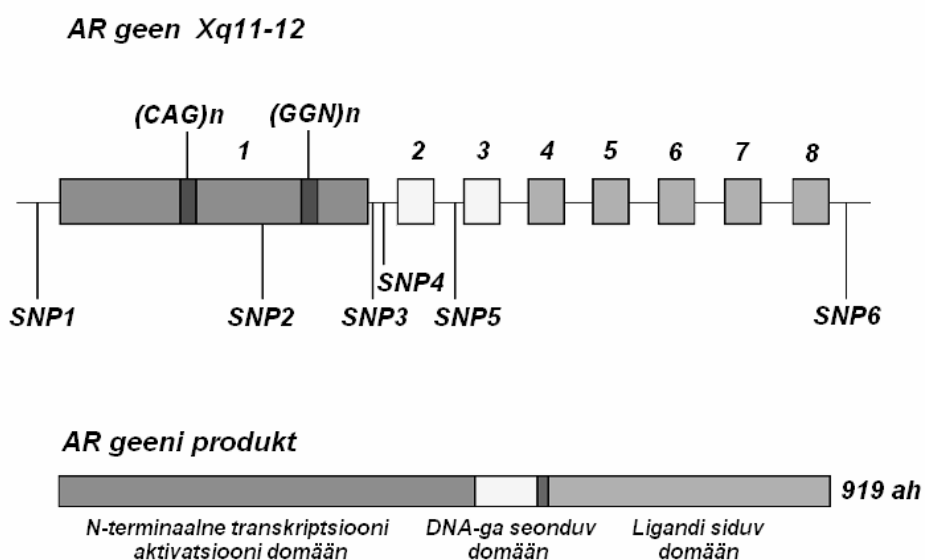
(<http://www.people.vcu.edu/~urdesai/adg.htm>)

Testosteroon avaldab mõju androgeeni retseptori kaudu. Androgeeni retseptor on steroidhormooni poolt aktiveeritav transkriptsiooni faktor, mis vahendab testosterooni spetsiifilist toimet: sihtmärkrakkudesse sattunud testosteroon (või temast sünteesitud dihüdrotestosteroon) seondub tsütoplasmas oleva retseptoriga ning retseptor dimeriseerub. Testosteroon-retseptor kompleks läheb dimeeri kujul tuuma tänu retseptori struktuuris olevale tuumalokalisatsiooni signaalile ning seondub seal testosteroonist sõltuvate geenide enhanserpiirkondadega, tagades nende geenide ekspressiooni (McPhaul *et al.*, 1991). Tuleb aga lisada, et testosteroon käivitab rakus ka MAP kinaasi (mitogeeni poolt aktiveeritava proteiinkinaasi) ülekanderaja ning Ca²⁺ ionide kontsentratsiooni tõusu, mis samuti põhjustavad CRE-enhanserist (cAMP signaalile vastav element, CRE) sõltuvate geenide ekspressiooni (Walker, Cheng, 2005).

Testosterooni mõju spermatogeneesile avaldub Sertoli rakkudes olevate androgeeni retseptorite vahendusel, mille aktiveerimisel käivitub terve rida spermatogeneesi stimuleerivaid ning toetavaid protsesse. Sertoli rakkude poolt sünteesitud valgud edastavad testosterooni impulsi spermatogoonideni (mis ei ekspresseeri androgeeni retseptorit), käivitades nende jagunemise ja diferentseerumise (Rajender *et al.*, 2007).

Androgeeni retseptori geen asub X kromosoomi pikas õlas, on üle 90 kb pikk ning koosneb kaheksast eksonist (Joonis 4). Androgeeni retseptori transaktivatsiooni domääni

kodeeriv esimene ekson on teistest oluliselt pikem. Ülejäänud eksonid kodeerivad DNA'ga seonduvat domääni (tsink-sõrme motiividega), väikest *hinge*-regiooni ning ka ligandi siduvat domääni (Ruhayel *et al.*, 2004).



Joonis 4. Androgeeni retseptori geen ja valk.

AR geeni esimene ekson sisaldab mitut mikrosatelliitset järjestust, millest kaks on polümorfne. Esimene polümorfne järjestus on $(CAG)_nCAA$ (n.n. CAG järjestus), mis kodeerib polüglutamiinset piirkonda. CAG korduste arv varieerub normaalselt 8-35 korduseni (Rajender *et al.*, 2007). Keskmise CAG korduste arv on erinev etniliste gruppide vahel: 19-20 kordust Aafrika päritoluga ameeriklaste populatsioonis, 21-22 kordust Kaukasoides populatsioonis, 22-23 kordust Aasia populatsioonis ning 25 kordust Mehhiko päritoluga ameeriklastel (Edwards *et al.*, 1992). CAG korduste arvu suurenemist on seostatud mitmete patoloogiate ning ka idiopaatilise viljatuse fenotüübiga (Rajender *et al.*, 2007; Wallerand *et al.*, 2001; Mengual *et al.*, 2003).

Teine polümorfne mikrosatelliitne järjestus on $(GGT)_3GGG(GGT)_2(GGC)_n$ (n.n. GGN järjestus), mis kodeerib polüglütsiinset piirkonda. Normaalne GGN korduste arv on 10-30 kordust (Rajender *et al.*, 2007) ning keskmiselt esineb 23 kordust Kaukasoides populatsioonis. Seni ei ole päris selge, kuidas mõjutab GGN korduste arvu suurenemine või vähenemine androgeeni retseptori transaktivatsiooni funktsiooni.

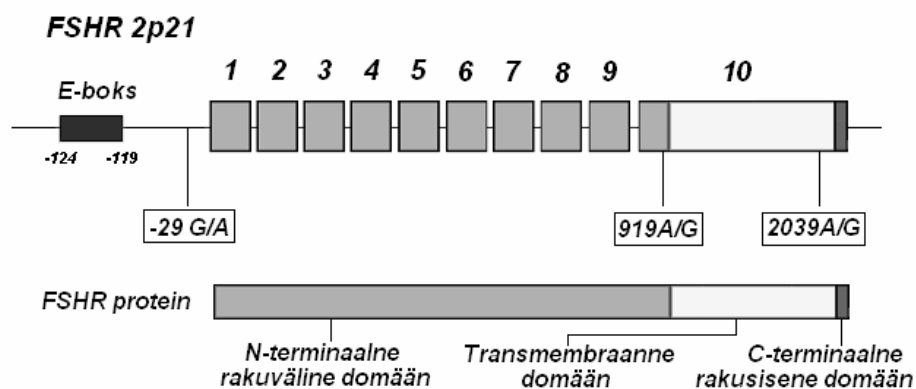
Androgeeni retseptori geenid on kirjeldatud ka mõned ühenukleotiidsed polümorfismid (SNP'd) (täpsem info Lisas 2), kuid nende seost spermatogeneesi häiretega ei ole seni uuritud.

1.2.4 Follükuleid stimuleeriv hormoon (FSH) ja selle retseptor (FSHR)

FSH on heterodimeerse (α - ja β -subühik) ehitusega gonadotroopne hormoon, mida sünteesitakse hüpofüüsis vastuseks GnHR stimulatsioonile (Simoni *et al.*, 1997). FSH heterodimeeri funktsiooni määrab tema β -subühik. FSH toimest sõltub inimorganismis nii suguorganite areng, kui ka sekundaarsete sootunnuste väljakujunemine puberteedieas (Simoni *et al.*, 1997). Lisaks sellele on FSH testosterooni kõrval teine oluline hormoon, mis käivitab ja aitab kaasa seemnerakkude arengule. FSH stimuleerivat toimet edastatakse spermatogoonidele Sertoli rakkude kaudu, aktiveerides nendes rakkudes seemnerakkude arengut toetavaid mehhanisme tänu selleks vajalike geenide ekspressioonile (Walker, Cheng, 2005).

FSH signaali ülekande toimub FSH retseptori abil. FSHR on 695 aa pikk membraanseoseline retseptor (Simoni *et al.*, 1997). FSHR omab seitset transmembraanset domääni ning tema C-terminaalne tsütoplasmaatiline osa on Gs-valguga seotud (Walker, Cheng, 2005; Simoni *et al.*, 1997). FSH retseptori aktivatsioonil käivitatakse rakus cAMP ja PKA vahendatud signaali ülekande rada, mille lõppetapil fosforüleeritakse rakus eelistatult CRE-elementide seoselisi transkriptsioonifaktoreid koos paljude teiste valkudega (Walker, Cheng, 2005; Crepieux *et al.*, 2001). Lisaks sellele on näidatud, et FSHR aktiveerib veel teisi radasid, näiteks MAP kinaasi ülekande rada. Samal ajal FSH stimulatsioonil tõuseb rakus ka Ca^{2+} ionide kontsentratsioon, mis on kriitiline Sertoli-Sertoli rakkude interaktsioonide ja seemnetorukeste epiteeli bärjääri moodustumiseks (Walker, Cheng, 2005; Mruck, Cheng, 2004).

FSHR geen asub teise kromosoomi lühikeses õlas ning on 54 kb pikk ja koosneb kümnest eksonist (Simoni *et al.*, 2002) (Joonis 5.) Üheksa esimest eksonit kodeerivad retseptori ekstratsellulaarset domääni, mille funktsiooniks on ligandi ära tundmine. Kümnes ekson on teistest eksonitest oluliselt pikem ning see kodeerib nii transmembraanset, kui ka rakusisest domääni (Simoni *et al.*, 1997).



Joonis 5. Folliikuleid stimuleeriva hormooni retseptori geeni ja valgu skeem.

FSHR kodeerivas piirkonnas esineb kaks SNP'd: 919A/G (307Thr/Ala) ja 2039A/G (680Asn/Ser), mõlemad kümnendas eksonis. Eelnevad uuringud näitasid, et need positsioonid on omavahel tugevalt aheldunud (Ahda *et al.*, 2005) ning nende alusel eristatakse kahte enamlevinud *FSHR* geeni haplotüüpi – 307Thr-680Asn ja 307Ala-680Ser. Nende kahe haplotüübi sagedused on vastavalt ~60% ja ~40% kaukasoidises üldpopulatsioonis (Simoni *et al.*, 2002). Kaks ülejäänud alleelset varianti 307Thr-680Ser ja 307Asn-680Ser on levinud erinevates etnilistes populatsioonides sagedusega 0-5% (Simoni *et al.*, 2002).

Lisaks sellele on *FSHR* geenis uuritud ka promootorala polümorfisme, millest olulisemaks peetakse -29 positsioonis G→A asendust (positsioon translatsiooni alguspunkti suhtes) GGAA motiivis, mis on Ets-domääni sisaldavate transkriptsioonifaktorite seostumissait. Selline ühenukleotiidne muutus on leitud ~30% indiviididel (Simoni *et al.*, 2002). Antud SNP mõju fenotübile ei ole veel täielikult selge.

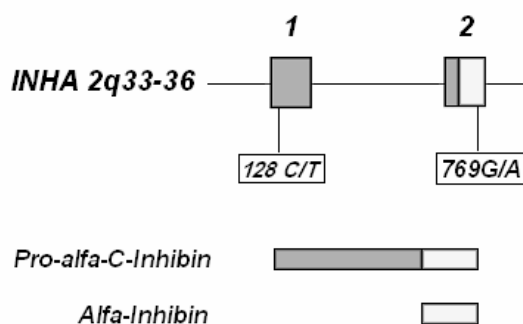
1.2.5 Inhibiin B

Inhibiin B on polüpeptiidne hormoon, mida sünteesitakse testiste Sertoli rakkudes. Inhibiin kuulub transformeeriva kasvufaktori β (TGF β) sarnaste valkude perekonda. Inhibiini heterodimeerne valk koosneb omavahel disulfiidsildadega seotud α - ja β -subühikutest. α -subühik on ühine kõikidel inhibiini isovormidel. β -subühikul on kaks erinevat vormi, A ja B. Selle järgi eristatakse inhibiin A ja inhibiin B, millel on ka

funktsionaalsed erinevused (Pierik *et al*, 1998). Inhibiini peamine roll on regulatoorne, temast sõltub FSH produktsiooni supressioon hüpofüüsis, mis on veel üheks mehhanismiks suguhormoonide taseme tsüklilises regulatsioonis. FSH reguleerimise tagasisidet tagav inhibiin meestel on inhibiin B ning inhibiini A tase on meesorganismis väga madal (Pierik *et al*, 1998).

Inhibiini sekretsioon initsieeritakse koos spermatogeneesi vajalike protsessidega vastuseks FSH stimulatsioonile. Inhibiin B tase täiskasvanud mehe organismis peegeldab Sertoli rakkude vastust FSH stimulatsioonile ning sellega ka spermatogeneesi aktiivsust (Robertson *et al.*, 2003). Madalamad inhibiini B kontsentratsioonid on seotud väiksema testiste ruumala ning madalama seemnerakkude kontsentratsiooniga (Pierik *et al*, 1998). Sellepärast ongi inhibiin B tase infertiilsetel meestel väga tähtis marker spermatogeneesi hindamisel ning munandi biopsia tulemuste ennustamisel (Halder *et al.*, 2005). Inhibiin B taseme erinevusi on näidatud infertiilsete meeste ja kontrollide vahel: inhibiin B tase oli palju madalam hüpospermatogeensetel ja azospermsetel (seemnerakud puuduvad) indiviididel (Halder *et al.*, 2005).

Inhibiini α -subühiku geen (*INHA*) asub teise kromosoomi pikas õlas (2q33-q36) ning on ~3,5kb pikk. *INHA* kodeeriv osa koosneb kahest eksonist (Shelling *et al.*, 2000). Inhibiini α -subühikut sünteesitakse pika prekursorvalguna – geeni esimene ekson ning osa teisest eksonist kodeerivad prekursori osa, mis hiljem eemaldatakse proteolüütiliselt funktsionaalse α -subühiku saamiseks. α -subühiku polüpeptiidset järjestust kodeerib teise eksoni 3' osa. (Joonis 6).



Joonis 6. Inhibiini α -subühiku geeni ja valgu skeem.

INHA geenis on kirjeldatud mitu SNP'd, millest kõige rohkem on uuritud kahte (128C/T ja 769G/A) (Marozzi *et al.*, 2002). Esimene nendest asub esimese eksoni 5' mittetransleeritavas alas ning teine asub teises eksonis (Joonis 6) ja põhjustab Ala/Thr aminohappe muutust valgu 257-ndas positsioonis (Marozzi *et al.*, 2002). Nende ühenukleotiidsete muutuste funktsionaalsest tähendusest on väga vähe teada. Seni on nende geenivariatsioonide tähtsust uuritud ainult naisepoolse viljatuse (enneaegse ovariaalse puudulikkuse e. POF'i) korral (Shelling *et al.*, 2000; Marozzi *et al.*, 2002). *INHA* geeni polümorfisme ei ole seoses meeste viljatusega seni analüüsitud.

1.3 Viljatus

1.3.1 Viljatuse probleemi ulatus

Viljatust defineeritakse, kui ühe aasta jooksul ei ole naisel õnnestunud rasestuda. Selle probleemiga puutub keskmiselt kokku 15% paaridest terves maailmas (Ferlin *et al.*, 2006). Viljatus on alati ootamatu ja raske olukord iga paari kooselus. Kõikidest viljatuse juhtudest on meeste ja naiste osa viljatuse kujunemises ligikaudu võrdne, millest umbes 20% juhtudel jääb viljatuse probleem selgusetuks (n.n. idiopaatiline viljatus). Viljatuse põhjuste uurimine ja ravimine teostatakse paralleelselt mõlemal partneril, sest üle 70% paaridel leitakse viljakust alandavaid faktoreid mõlemal partneril. Ainult 3-15% viljatutel paaridel esineb raske infertiilsus (steriilsus) vähemalt ühel partneritest (The ESHRE Capri Workshop, 1996). See osutab, et enamiku viljatute paaride puhul leitakse võimalus edukaks raviks ja laste saamiseks.

1.3.2 Naisepoolse viljatuse põhjused

Naisepoolsetest viljatuse põhjustest on sagedasemad ja olulisemad suguorganite põletikud ja patoloogiad, neuroendokriinsed häired, autoimmuunhaigused ja kõik rasked organismi nõrgestavad haigused (The ESHRE Capri Workshop, 1996 ja The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Hüpotalamuse-hüpofüüsi-ovaariumide hormonaalne koostöö tagab naisel munarakkude küpsemise, ovulatsiooni ja emaka limaskesta ettevalmistuse. Hüpogonadotroopse hüpogonadismi puhul on naise organismis alanenud gonadotropiinide tase, mis esineb näiteks Kalmann'i sündroomi puhul ning ka suure

kaalu languse korral. Hüpergonadotroopse hüpogonadismiga naistel on kõrgenenud gonadotropiinide tase veres ning see esineb POF'i ning gonadotropiinide retseptorite geenide mutatsioonide korral. Normogonadotroopse anovulatsiooni peamiseks põhjuseks on aga polütsüstiliste munasarjade sündroom. Lisaks esineb terve rida geneetilisi haigusi, mille tagajärjeks on ovulatsiooni puudumine. Näiteks on Turner'i sündroom (45,XO karüotüüp). Immuunsüsteemi reaktsioonid naise enda kudede vastu kaasnevad tihti POF'i, endometrioosi ja polütsüstiliste munasarjade sündroomiga. Peale anovulatsiooni takistavad rasestumist ka munajuhade läbimatus, endometrioos ning emaka ja teiste suguorganite kaasasündinud arenguanomaaliad (The ESHRE Capri Workshop, 1996 ja The ESHRE Capri Workshop Group, 2002).

1.3.3 Mehepoolse viljatuse põhjused

Mehepoolne infertiilsus on suhteliselt sage meditsiiniline probleem. Eelnevad uuringud on näidanud, et ~5% meestel esineb seksuaalelu ja reproduktiivse funktsiooni häireid (Hirsh, 2003). Mehe viljakust uuritakse ja hinnatakse mitmete uuringute alusel: spermogramm, suguorganite anatoomiline läbivaatus ja ultraheli uuring, hormoonide tasemete määramine vereseerumis, põhjalik küsitlus (elustiili ja harjumuste arvestamiseks) ning üldanamnees. Mehe viljatuse raskusastet peegeldavad ennekõike spermogrammi näitajad. Spermogrammi seemnerakkude kvaliteedinäitajad on järgnevad (Hirsh, 2003):

- Ejakulaadi maht > 2 ml
- Seemnerakkude kontsentratsioon > 20 miljoni/ml
- Seemnerakkude liikuvus > 50% progresseeruvalt liikuvaid seemnerakke
- Seemnerakkude morfoloogia >15% normaalse morfoloogiaga seemnerakke
- Leukotsüütide kontsentratsioon < 1 miljoni/ml
- Antikehad seemnerakkude vastu < 10% antikehadega kaetud seemnerakke

Vastavalt spermogrammi andmetele eristatakse: normozoospermiat (kõik spermogrammi parameetrid normi piirides), oligozoospermiat (seemnerakkude kontsentratsioon ejakulaadis < 20 miljoni/ml, raske oligozoospermia < 5 miljoni/ml), asthenozoospermiat (< 50% progresseeruvalt liikuvaid seemnerakke), teratozoospermiat (< 15% normaalse

morfoloogiaga seemnerakke), leukotsütoospermiat (leukotsüütide kontsentratsioon spermas > 1 miljon/ml), azoospermiat (seemnerakkude puudumine ejakulaadis) ja aspermiat (ejakulaadi puudumine) (Hirsh, 2003).

Meeste viljatuse põhjused on väga erinevad. Nende seas eristatakse pretestikulaarseid, testikulaarseid ja post-testikulaarseid faktoreid (De Kretser, 1997).

Pre-testikulaarsete viljatuse faktorite hulka kuuluvad endokriinsed häired, eelkõige hüpotalamuse-hüpofüüsi-testiste hormoonide kaskaadi häired, mis põhjustavad kõrvalekaldeid suguorganite arengus, kudede morfoloogias ja funktsioneerimises (näiteks hüpogonadotropne hüpogonadism e. Kalmann'i sündroom). Samuti on pretestikulaarseteks faktoriteks erektsiooni düsfunktsioon ja ejakulatsiooni puudumine, mida põhjustavad nii füsioloogilised kui ka psühholoogilised tegurid (De Kretser, 1997).

Testikulaarsetest infertiilsuse faktoritest tuleb kindlasti mainida viljatuse geneetilisi põhjuseid, mis on eraldi esitatud tekstis allpool. Lisaks saab antud viljatuse põhjustest nimetada veel munandiveeni laiendeid (varikotseele), mille puhul veeniklappide defektide või puudumise tulemusena laieneb munandiveen, halveneb testise verevarustus ning halveneb munandi funktsionaalsus. Krüptorhismi (munandi laskumise häire) korral on samuti mehe viljakus oluliselt ohustatud. Meeste viljakust alandavad samuti kroonilised suguteede põletikud (nt prostatiit) ja sugulisel teel levivad haigused. Spermatogeneesi aktiivsust kahjustavate faktorite hulka kuuluvad veel kemoterapia, radioterapia, mõned ravimpreparaadid (n.t. anaboolsed steroidid) ja pidev kõrge temperatuur (De Kretser, 1997). Lisaks tuleb silmas pidada ka iga konkreetse mehe eluviisi (toitumist), harjumusi (suitsetamist) ja igapäevaseid töötingimusi (füüsilist stressi) (De Kretser, 1997).

Post-testikulaarseks infertiilsuse faktoriks peetakse obstruktiivset viljatust, mille puhul on munandimanus või seemnejuha seemnerakkude jaoks läbimatu põletiku või ageneesi tõttu (tsüstiline fibroos). Lisaks tuleb mainida veel eesnäärme põletiku ja autoimmunoloogiliste reaktsioonide negatiivset toimet mehe viljakusele (De Kretser, 1997).

Lisaks on oluline, et meditsiinis esineb n.n. idiopaatiline mehepoolne viljatuse, mille all mõistetakse teadmata põhjusega mehepoolset viljatust. Idiopaatilise mehepoolse viljatuse korral on kõik teadaolevad mehe viljatust tekitavad põhjused välistatud, kuid siiski on mehe spermogrammi näitajad halvenenud. Enamik sellistest patsientidest on azoospermsed või oligozoospermsed ning lisaks kaasnevad tihti sellega ka seemnerakkude morfoloogia ja/või liikuvuse muutused (Hirs, 2003). Seemnerakkude kontsentratsiooni, morfoloogia ja liikuvuse häireid nimetatakse oligoasthenoteratozoospermiaks. Enamikul nendest patsientidest on munandi maht normist väiksem, kuid hormoonide väärtused (FSH, LH ja testosteroon) on enamikul juhtudel normaalsed või väikeste kõrvalekalletega (Mahmoud *et al.*, 1998).

1.3.4 Meeste viljatuse geneetilised tegurid

Ligikaudu 15% viljatutest meestest kannavad geneetilisi muutuseid (Ferlin *et al.*, 2006). Viljatust põhjustavate geneetiliste muutuste seas on olulisemad kromosomaalsed aberratsioonid, Y kromosoomi mikroleetsioonid ja geenimutatsioonid.

Kõige levinum kromosomaalne haigus viljatutel meestel on Klinefelter'i sündroom, mille korral esineb 47,XXY karüotüüp. Klinefelter'i sündroom põhjustab patsientidel primaarset testikulaarset puudulikkust, testiste hüpotroofiat ja kõrget gonadotropiinide taset veres (Ferlin *et al.*, 2006). Enamik (> 90%) sellistest patsientidest on azoospermsed, kuid 47,XXY/46,XY mosaiiksed mehed võivad olla kas oligo- või isegi normozoospermsed (Ferlin *et al.*, 2006). Kui Klinefelter'i sündroomiga patsiendil esineb spermatogeneesi, esineb tema seemnerakkudes palju aneuploidseid seemnerakke ja X/autosoomi ja Y/autosoomi vahelisi translokatsioone (Gonsavles *et al.*, 2005).

Autosomaalsed translokatsioonid põhjustavad mõõdukat kuni rasket mehe viljatust. Sagedasemaks juhtumiks on Robertsoni translokatsioonid, mis toimuvad kahe akrosoomse kromosoomi liitumise korral, kromosoomide 13, 14, 15, 21 või 22 vahel (Robinson *et al.*, 1994). Tasakaalustatud või tasakaalustamata translokatsiooni korral on spermatogeneesi patoloogia tingitud kromosoomide lahknemise häiretest meiosis, kusjuures enamik tasakaalustatud translokatsiooni kandvatest indiviididest on normaalse fenotüübiga (Ferlin *et al.*, 2006).

Y kromosoomi pikas õlas on kirjeldatud kolm spermatogeneesi geenide regiooni (n.n. azoospermia faktorite e. AZF regioonid), mille osalised või täielikud deletsioonid põhjustavad rasket mehe viljatust (Ferlin *et al.*, 2006). Nendeks regioonideks on AZFa, AZFb ja AZFc. AZFa regiooni deletsioon põhjustab azoospermiaat ja ainult Sertoli rakkude esinemise sündroomi (SCO). AZFb või ACFc deletsioonid põhjustavad azoospermiaat SCO sündroomi või meioosi seiskumise tõttu (Ferlin *et al.*, 2006). Ükikute AZF regioonide mikroleletsioonid on palju sagedasemad kui terve AZF regiooni deletsioonid (De Kretser, 1997).

Eelnevalt on kirjeldatud ka üksikute geenide mutatsioone, mis on mehepoolse viljatuse põhjuseks. Tsüstilise fibroosi transmembraanse juhtivuse regulaatori geeni (*CFTR*) mutatsiooni tõttu kujuneb välja tsüstiline fibroos. Tsüstilise fibroosi kergemate vormide korral esineb meestel ainult seemnejuhade agenees ning sellest tingitud obstruktiivne azoospermia. Kuni 80% juhtudel puuduvad *CFTR* geenis kolm nukleotiidi, mis kodeerivad 508 positsioonis fenüülalaniini (De Kretser, 1997). Seemnejuhade ageneesi korral esineb patsiendi munandites ja munandimanustes piisavalt seemnerakke, mis tõestab, et seemnerakkude areng jääb *CFTR* geeni mutatsioonide korral häirimatuks (Oates, Amos, 1994).

Lisaks ülaltoodud geneetilistele muutustele pööratakse tähelepanu ka väiksematele DNA järjestuste muutustele, nimelt ühenukleotiidsetele polümorfismidele ja mikrosatelliitsetele järjestustele. Usutakse, et reproduktiivsüsteemi geenide variatsioonid võivad põhjustada geneetilist eelsoodumust/kaitset mehe viljatusele (Ferlin *et al.*, 2006). Selliseid geneetilisi eelsoodumus- ja kaitsefaktoreid uuritakse eriti palju seoses idiopaatilise mehe viljatusega, mille korral on võimalik tuvastada konkreetsete polümorfismide ja fenotüübi varieeruvuste omavaheliseid seoseid. Uuritud on järgmisi kandidaatgeene: *DAZ* (*deleted in azoospermia*), *DAZL* (*deleted in azoospermia-like*), *MTHFR* (*5-methylenetetrahydrofolate reductase*), *POLG* (*polymerase gamma*), *ERα* (*estrogen receptor alpha*), *FSHR*, *AR* ja *INHA* (Ferlin *et al.*, 2006).

1.3.5 AR geeni polümorfismid ja mehepoolne viljatuse

Funktsionaalse androgeeni retseptori puudumine indiviidil põhjustab kas täielikku (*complete androgen insensitivity syndrome*, CAIS) või osalist (*partial androgen*

insensitivity syndrome, PAIS) tundetust androgeenide suhtes. CAIS põhjustab naiseliku välimuse ning ka naise välissuguorganite väljakujunemist (Rajender, *et al.*, 2007). Sellistel patsientidel puuduvad Wolffii juhad testosterooni stimulatsiooni puudumise tõttu. Samal ajal puuduvad nendel ka Mülleri juhad, sest anti-Mülleri hormooni stimulatsioon ei ole häiritud. PAIS fenotüüp võib varieeruda sõltuvalt tundetuse raskusest naise välissuguorganitega naiselikust fenotüübist kuni meheliku fenotüübini. Viimase puhul võivad meeste sisemised suguelundid olla kas normaalsed (esineb siiski viljatus) või alaarenenud (Rajender, *et al.*, 2007). Androgeeni tundetus on sageli põhjustatud *AR* geenis olevatest mutatsioonidest, mis põhjustavad mõne domääni või selle osa puudumist, kriitilise aminohappe muutust, splaissimis-saidi rikkumist või sisemise stop-koodoni teket (McPhaul, *et al.*, 1991).

AR geeni mikrosatelliitsete järjestuste varieeruvust seostatakse ka mitmete patoloogiliste fenotüüpidega. CAG korduste arvu suurenemine (> 40 korduse) põhjustab spinaalset ja bulbulaarset muskulaarset atroofiat (*Spinal and bulbar muscular atrophy, Kennedy's disease*), millega kaasneb kas kergem või raskem viljatus (Ruhayel *et al.*, 2004). Chamberlain ja tema kolleegide (1994) poolt saadud tulemused näitasid, et nii inimestel kui ka hiirtel tõstab CAG piirkonna täielik deletsioon androgeeni retseptori transaktiivsiooni aktiivsust umbes kolm korda ning CAG korduste arvu suurenemisega kahanes lineaarselt ka *AR* retseptori vahendatud transaktiivatsioon. Huvitav on ka see, et CAG piirkonna pikenemine ei põhjusta androgeeni retseptori aktiivsuse täielikku kadu (Chamberlain, *et al.*, 1994).

Teostatud on palju uuringuid, kus analüüsiti CAG korduste arvu seost idiopaatilise meeste viljatusega ning nendest uuringutest saadud tulemused olid vastukäivad. Paljude uuringute kohaselt puudub seos CAG korduste arvu ja jaotuse ning viljatuse fenotüübi vahel Euroopa (Dadze *et al.*, 2000; van Golde *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2003; Ferlin *et al.*, 2004; Ruhayel *et al.*, 2004) ja Aasia (Thangaraj *et al.*, 2002) populatsioonides. Teised uuringud on aga vastupidiselt näidanud, et pikemad CAG piirkonnad esinevad sagedamini viljatutel kui viljakatel meestel nii Euroopa (Wallerand *et al.*, 2001; Mengual *et al.*, 2003) kui ka erinevates Ameerika ja Aasia (Tut *et al.*, 1997; Dowsing *et al.*, 2001; Patrizio *et al.*, 2001) populatsioonides.

AR geeni GGN kordusjärjestusi ei ole seni väga palju uuritud. Üheks huvipakkuvaks avastuseks on see, et GGN mikrosatelliitse järjestuse deletsioon põhjustas Gao ja kolleegide (1996) andmetel androgeeni retseptori transaktivatsiooni aktiivsuse kahanemise 30% võrra (Gao *et al.*, 1996). Idiopaatilise viljatuse põhjuste uuringutes ei ole aga leitud GGN korduste arvu ja jaotuse seost viljatuse fenotüübiga (Tut *et al.*, 1997; Ferlin *et al.*, 2004; Rajender *et al.*, 2007). Ruhayel ja kolleegid (2004) analüüsisid CAG ja GGN järjestuste koosmõju mehe viljakuse fenotüübile ning leidsid, et CAG < 21 ja GGN = 23 kombinatsioonid esinesid sagedamini kontrollindiviididel kui viljatutel patsientidel (Ruhayel *et al.*, 2004).

Androgeeni retseptori geenis leidub ka SNP'sid, kuid selle geeni haplotüüpe ei ole seoses spermatogeneesi häiretega ning idiopaatilise viljatusega seni uuritud. Eelnevad uuringud näitasid, et *AR* geeni haplotüübid ei oma seost eesnäärme (Freedman *et al.*, 2005), munasarja (Terry *et al.*, 2005) ja endomeetriumi (McGrath *et al.*, 2006) kasvajate esinemisega.

1.3.6 *FSHR* geeni polümorfismid ja mehepoolne viljatuse

FSHR geeni mutatsioonid on väga haruldased. Seda tõestavad uuringute andmed, kus suure grupi idiopaatilise viljatusega meeste hulgas ei tuvastatud ühtegi *FSHR* geeni mutatsiooni kandjat (Leifke *et al.*, 1997; Simoni *et al.*, 1997). Ainukesed mutatsioonid, mis on seni kirjeldatud, leiti Soome meestel, kes olid homosügootid 566T mutantse alleeli suhtes. Nende patsientide suguvõsas oli sama mutatsiooni suhtes homosügootseid naisi, kellel oli diagnoositud hüpergonadotroopne ovariaalne puudulikus. Kirjeldatud viljatutel meestel esines erineva raskusastmega viljatust (kuid mitte azoospermiat), testise mahu vähenemist ja kõrgeenenud seerumi FSH tasemeid (Tapanainen *et al.*, 1997).

Varasemates uuringutes on näidatud seoseid *FSHR* geeni polümorfismide ja naiste viljakuse erinevate aspektide vahel. Analüüsides ovariaalse kasvajatega patsiente näitasid Yang kolleegidega (2006), et 307Ala-680Ser haplotüüp on riskifaktoriks ovariaalsete kasvajate tekkes (Yang *et al.*, 2006). Kahe uurimisgrupi poolt on näidatud, et 680Ser/Ser homosügootsete naiste FSH tase veres (menstruaaltsükli follikulaarses faasis) on kõrgem ning need naised vajavad suuremat eksogeense FSH doosi ovaariumide stimuleermisel võrreldes 680Asn alleeli kandvate naispatsientidega (Sudo *et al.*, 2002; Perez Mayorga *et*

al., 2000). Põhjuseks on pakutud, et 680Ser/Ser genotüübiga naistel on FSH retseptorvalgu afiinsus ligandi suhtes madalam kui 680Asn/Ser ja 680Asn/Asn genotüüpidega naistel. See hüpotees ei ole aga *in vitro* katsetes tõestatud. COS-7 ja 293T rakuliinides ekspresseeritud FSH retseptorvalkude kaks isovormi (307Thr-680Asn ja 307Ala-680Ser) näitasid võrdset afiinsust FSH suhtes ning cAMP tootmist vastuseks FSH stimulatsioonile (Simoni *et al.*, 1999; Sudo *et al.*, 2002). Naistel kirjeldatud 680Ser/Ser homosügootide seerumi kõrgemat FSH taset ei ole aga meestel leitud (Simoni *et al.*, 2002; Ahda *et al.*, 2005).

Viimasel ajal on analüüsitud ka *FSHR* geeni promootoris leiduva *FSHR* -29G/A polümorfismi seost mehepoolse viljatusega. Senini on selle polümorfismi funktsionaalne roll jäänud selgusetuks, kuna *in vitro* ekspressiooni katsed ei tuvastanud *FSHR* geeni transkriptsiooni taseme sõltuvust -29G/A SNP'st (Wunsch *et al.*, 2005). -29G/A polümorfismi uuringute kohaselt ei ole see SNP seotud meeste viljatuse fenotüübiga (Ahda *et al.*, 2005; Pengo *et al.*, 2006; Wunsch *et al.*, 2005).

Meeste idiopaatilise viljatuse riski- ja kaitsefaktoreid uurides leiti aga, et *FSHR* geeni -29G/A, 307Thr/Ala ja 680Asn/Ser SNP'de haplotüübid (A-Ala-Ser ja G-Thr-Asn) on seotud mehe viljakuse ja viljatusega (Ahda *et al.*, 2005). Ahda ja kolleegide (2005) poolt saadud tulemused näitasid, et A-Ala-Ser haplotüübi sagedus oli oluliselt kõrgem uuritud viljatutel patsientidel ($p < 0,01$) ning G-Thr-Asn haplotüübi sagedus oli oluliselt kõrgem kontrollindiviididel ($p < 0,01$) (Ahda *et al.*, 2005).

1.3.7 *INHA* geeni polümorfismid ja viljatus

INHA geeni polümorfismide tähtsust naise- ja mehepoolse viljatuse tekkes ei ole seni väga palju uuritud. Enamikus seni avaldatud uuringutes analüüsiti antud geeni polümorfismide seost naiste enneaegse sekundaarse viljatuse väljakujunemisega. Inhibiin A ja B, millede peamisteks funktsioonideks on FSH taseme tagasisideme regulatsioon on olulisteks kandidaatideks nii naise- (POF'i) kui ka mehepoolse viljatuse kujunemises. Näiteks POF'i põhjuseks peetakse vähenenud ovariaalset reservi, kiirenenud follikulaarset atreesiat ning folliikulite arengu ja küpsemise häireid (Christin-Maitre *et al.*, 1998; Shelling *et al.*, 2000). POF kandidaatgeenide leidmisel on pööratud erilist tähelepanu geenidele, mille valgud võivad mõjutada FSH taset vereringes (Marozzi *et al.*,

2002). Kuigi eelnevad uuringud on näidanud *INHA* geeni ja naise viljatuse (POF sündroomi) omavahelisi seoseid (Shelling *et al.*, 2000), siis *INHA* geeni variatsioonide mõju mehe selgusetu etioloogiaga viljatusele seni uuritud ei ole.

2. TÖÖ EESMÄRGID

Antud töö eesmärgiks oli selgusetu etioloogiaga mehe viljatuse tekke võimalike geneetiliste tegurite leidmine ja kirjeldamine.

Antud töö raames uuriti: i) *AR* geeni CAG ja GGN mikrosatelliitseid järjestusi ning haplotüüpe; ii) *FSHR* geeni SNP'sid ja iii) *INHA* geeni SNP'sid.

Konkreetsed töö eesmärgid olid järgnevad:

1. Kirjeldada uuritavate geenide (*AR*, *FSHR* ja *INHA*) polümorfismide jaotust viljatute ja viljakate Eesti meeste seas.
2. Analüüsida uuritavate geenide polümorfismide seost selgusetu mehepoolse viljatuse tekkega (assotsiatsiooni uuring).
3. Analüüsida uuritavate geenide polümorfismide seost mehe viljakuse kliiniliste parameetritega nii viljatute kui ka kontrollindiviidide seas.

3. MATERJAL JA METOODIKA

Antud uuring tehti koostöös TÜ Kliinikumi Androloogia Keskusega. Uuritavate gruppi kuuluvad inividid käisid Androloogia Keskuses vastuvõtul 2005. - 2006. aastal ning nendel tuvastati selgusetu põhjusega mitte-obstruktiivne azoospermia või raske oligozoospermia ($< 5 \times 10^6$ seemnerakku/ml ejakulaadi kohta). Kõikidele patsientidele tehti seerumi hormoonide ja sperma analüüs. Uuringust jäeti välja patsiendid, kellel esines konkreetne infertiilsuse põhjus (n. kromosoomaberratsioon, Y kromosoomi mikrodeletsioon, krüptorhism jne.). Kontrollgrupis on viljakad ($> 75 \times 10^6$ seemnerakku/ml ejakulaadi kohta) terved noored mehed, kellele teostati seerumi hormoonide ja sperma analüüsid. Uuritud inividide kliinilised parameetrid on toodud Lisas 1. Uuringule oli antud Tallinna Meditsiiniliste Uuringute Eetikakomitee luba (nr. 791/2005).

3.1 DNA eraldamine vereproovidest

DNA eraldati 3-5 ml verest väljasoolamise meetodi abil (Aljanabi and Martines, 1997). DNA puhastamisel kasutati järgnevat protokollit. Verele lisati neljakordses mahus puhver A-d [0,32M sahharoos, 1mM Tris-Cl (pH 7,5), 5mM MgCl₂ ja 1% Triton X-100] ning segati. Segu tsentrifugeeriti 1850g (3000 rpm) 15 minutit + 4°C juures. Supernatant eemaldati ning sademele lisati teist korda puhver A-d (kahekordses mahus). Tsentrifugeeriti 1850g (3000 rpm) 15 minutit 4°C juures. Supernatant eemaldati ja sademele lisati puhver B-d [400 mM NaCl, 2mM EDTA (pH 8) ja 10mM Tris-HCl (pH 7,5)] (0,9 x esialgse vere ruumala) ning sade lahustati. Seejärel lisati tilkhaaval puhver C-d [20% SDS ja Proteinaas K (20mg/ml)] (0,1 x esialgse vere ruumala) ning segu inkubeeriti üleöö 37°C juures. Järgmisel päeval lisati küllastatud NaCl lahust (0,27 x esialgse vere ruumala), segati 15 sekundi jooksul ning tsentrifugeeriti 3200g (4000 rpm) 40 minutit 20°C juures. Supernatant tõsteti puhtasse tuubi, kuhu lisati 96% etanooli (2 x saadud supernatandi ruumala) ja segati ettevaatlikult keerates tuubi paar korda. Saadud DNA sadet pesti 70% etanooliga, kuivatati ja lahustati 500 µl-s mQ vees.

3.2 SNP'de analüüs

Detailne info kõikide genotüpiseeritud SNP'de kohta on toodud Lisas 2. *AR* geenis genotüpiseeriti 6 SNP'd. Neli SNP'd (SNP1, SNP2, SNP4 ja SNP5) analüüsiti RFPL (*Restriction fragment length polymorphism*) meetodil. SNP3 ja SNP6 genotüpiseeriti aga alleel-spetsifilise PCR'i (AS-PCR, *allele-specific PCR*) meetodil. *FSHR* geenis analüüsiti kolm SNP'd: -29G/A, 919A/G ja 2039A/G. Nende SNP'de analüüs teostati RFLP meetodil. *INHA* geenis genotüpiseeriti kaks SNP'd (128C/T ja 769G/A), mis teostati RFLP meetodil. Vastavate praimerite järjestused ning analüüsi tingimused on esitatud Lisas 2.

3.2.1 PCR amplifitseerimise tingimused

PCR'i reaktsioone tehti 10 µl ruumalas, reaktsiooni segu sisaldas 1 x reaktsiooni puhvrit [800 mM Tris - HCl (pH 9.4 - 9.5); 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0.2% w/v Tween-20] (Solis BioDyne, Tartu, Eesti), 2,5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Tartu, Eesti), 0,25 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas, Vilnius, Leedu), 0,4 µM primereid (Metabion GmbH, Saksamaa), 0,5 U HOT FIREPol DNA polümeraasi (Solis BioDyne, Tartu, Eesti) ning DNA proovi (~50ng). PCR viidi läbi GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) masinaga, kasutades järgmist PCR'i programmi: 10 minutit 95°C juures, siis 35 tsüklit: 30 sekundit 95°C, 30 sekundit 59-63°C ja 30 sekundit 72°C ning lõpuks 7 minutit 72°C (Lisa 2). PCR-i fragmentide olemasolu kontrolliti 1,5% agarosgeelis 0,5 x TBE [45mM Tris-boraat; 1mM EDTA-Na₂ (dinaatriumetüleendiamiin-tetraatsetaat)] puhvris.

3.2.2 RFLP analüüs

Restriktsioon teostati 10µl ruumalas, mis sisaldas 1 x restriktsiooni puhvrit (vastavalt kasutatavale restriktaasile); 2U vastavat restriktaasi (Fermentas, Vilnius, Leedu) (Lisa 2) ning 4 µl PCR'i fragmenti. Restriktsiooni segu inkubeeriti 37°C juures vähemalt 3 tundi (tavaliselt üleöö). Saadud tulemused kontrolliti 2% agarosgeelis 0,5 x TBE puhvris.

3.3 Mikrosatelliitide analüüs

AR geenis analüüsiti kaks polümorfset mikrosatelliitset järjestust, vastavalt CAG ja GGN trinukleotiidseid kordusi sisaldavad alad. Analüüsi meetodi aluseks on amplifitseeritavate fragmentide pikkuste erinevus vastavalt antud polümorfses alas sisalduvate korduste arvule.

PCR'il kasutatud praimerid on toodud tabelis Lisas 3. PCR'il saadud produktide pikkust kontrolliti standardtingimustel 6% polüakrüülamiidgeelil kasutades ABI Prism 377 DNA sekvenaatorit (PE Applied Biosystems) ja Genescan 2.1 tarkvara analüüsiprogrammi. Suuruse standardiks võeti Rox 500 (PE Applied Biosystems). CAG ja GGN kordusjärjestuste genotüpiseerimist kontrolliti 40 patsiendi ja kontrolli proovide sekveneerimisega, milleks kasutati BigDye Terminaator v3.1 sekveneerimiskomplekti (PE Applied Biosystems) ning ABI 3730 XL DNA sekvenaatorit.

3.4 Tulemuste statistiline analüüs

Uuritavate ja kontrollindiviidide kliinilisi parameetreid võrreldi kasutades Mann-Whitney U testi. *AR* geeni CAG ja GGN mikrosatelliitsete järjestuste variatsioone analüüsiti t-testiga. LD (linkage disequilibrium) analüüs teostati Haploview version 3.2 programmi abil (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>), kasutades Lewontin's D' statistikat (Gabriel *et al.*, 2002). Kõikide uuritud geenide variatsioonide võimalikku seost viljatuse fenotüübiga hinnati logistilise regressioonanalüüsi abil (*logistic regression analysis*). Hormoonide kontsentratsioonide võimalikku varieeruvust sõltuvalt geenide polümorfismide genotüüpidest analüüsiti lineaarse regressioonanalüüsi abil. Kõik statistilised testid teostati Kadri Halleri poolt kasutades programmi R 2.0.0 A (Free Software Foundation, Boston, MA). Statistiliselt oluline p väärtus oli $< 0,05$.

4. TULEMUSED

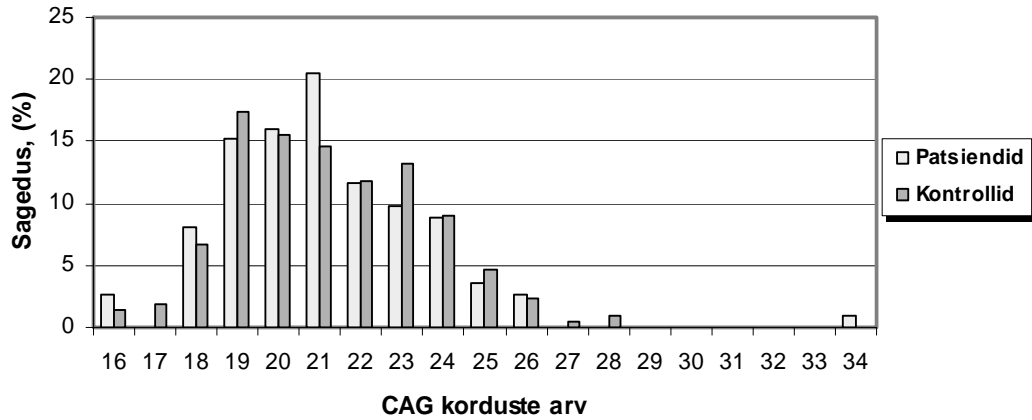
4.1 Uuritud indiviidide kliiniliste andmete analüüsi tulemused

Uuritud indiviidide kliiniliste andmete kokkuvõte ja statistilise analüüsi tulemused on esitatud Lisas 1. Nii spermogrammi näitajad, kui ka hormoonide kontsentratsioonid seerumis on erinevad patsientide ja kontrollide vahel. Võrreldes kontrollidega oli patsientide testosterooni tase oluliselt madalam, kuid LH ja FSH tasemed kõrgemad, testiste keskmine ruumala väiksem ning seemnerakkude kontsentratsioon ja liikuvus halvemad. Kliiniliste andmete omavaheline võrdlus näitas, et testiste keskmise ruumala kasv on positiivselt seotud seemnerakkude kontsentratsiooni tõusuga seemnevedelikus (Pearsoni korrelatsiooni test; $p < 0,001$).

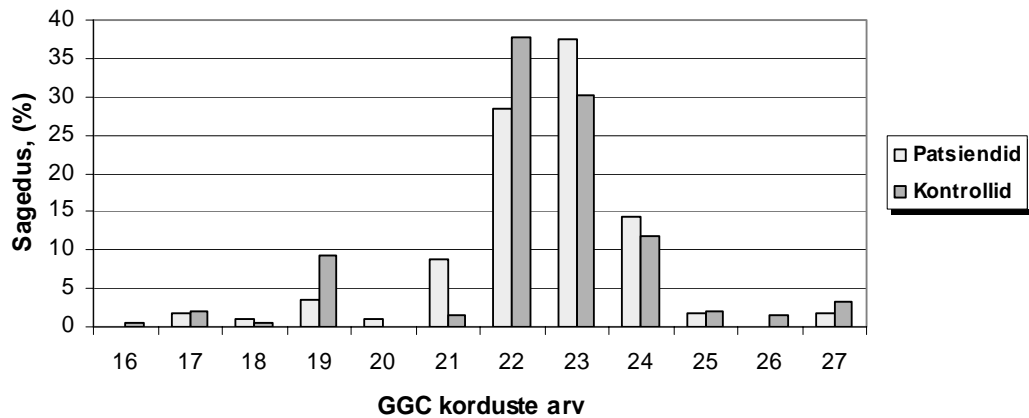
4.2 AR geeni polümorfismide analüüsi tulemused

4.2.1 AR geeni mikrosatelliitide analüüsi tulemused

AR geeni polümorfismid analüüsiti kokku 112 patsiendil ja 212 kontrollindiviidil. AR geeni mikrosatelliitide uuring näitas, et patsientide ja kontrollide CAG (keskmise \pm SD vastavalt $21,1 \pm 2,5$ ja $21,2 \pm 2,3$; t-test, $p = 0,806$) ja GGN (keskmise \pm SD vastavalt $22,5 \pm 1,5$ ja $22,4 \pm 1,9$; t-test, $p = 0,672$) trinukleotiidsete korduste arv ei erinenud kahe grupi vahel. CAG korduste arv varieerus patsientidel 16 kuni 34 kordust ja kontrollidel 16 kuni 28 kordust (Joonis 7). GGN korduste arv varieerus patsientidel 17 kuni 27 kordust ja kontrollidel 16 kuni 27 kordust (Joonis 8).



Joonis 7. AR CAG korduste arvu jaotus patsientide ja kontrollide grupis.

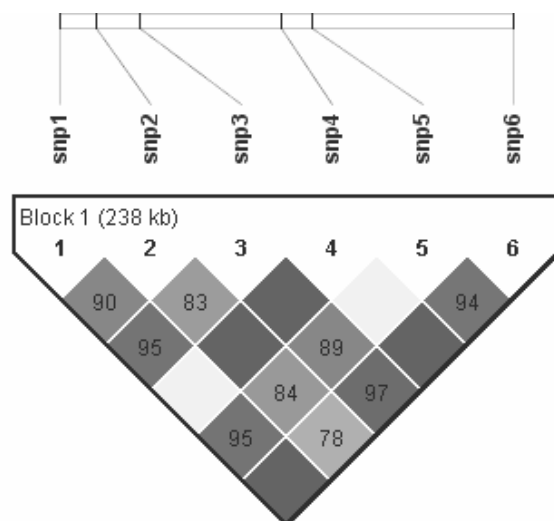


Joonis 8. AR GGC korduste arvu jaotus patsientide ja kontrollide grupis.

Kõikide uuritud indiviidide analüüs näitas positiivset korrelatsiooni CAG ja GGC korduste arvu suurenemise vahel (Pearson'i korrelatsiooni koefitsient $r = 0,129$, $p = 0,02$). Sageasemad AR geeni CAG/GGC haplotüübid olid 21/22 kordust (8/112; 7,1%) patsientidel ja 22/22 kordust (14/212; 6,6%) kontrollidel. Ühegi CAG/GGC haplotüübi puhul ei leitud seost idiopaatilise mehepoolse viljatusega.

4.2.2 AR geeni SNP'de analüüsi tulemused

AR geenis analüüsiti kokku 6 SNP'd. Uuringus saadud andmete LD analüüs näitas, et kõik uuritud SNP'd on omavahel tugevas seoses ($D' \geq 0,8$) ning moodustavad ühe haplobloki (Joonis 9).



Joonis 9. *AR* geeni haploblokk.

AR geeni SNP'd moodustavad kokku 13 haplotüüpi (Tabel 1), millest neli on teistest oluliselt sagedasemad (HAP1 - 4) . Kõikide haplotüüpide sagedusi võrreldi esimese haplotüübiga (HAP1), mis on mõlemas grupis kõige enam esindatud.

Tabel 1. *AR* geeni haplotüüpide jaotus patsientidel ja kontrollidel ¹.

	Haplotüüp	Patsiendid % (n)	Kontrollid % (n)	OR	p väärtus
HAP1 ²	TGCAAT	67,0 (75/112)	75,9 (161/212)	1	-
HAP2	TGCGAT	3,6 (4/112)	7,1 (15/212)	0,62	p > 0,100
HAP3	CATAGC	7,1 (8/112)	5,2 (11/212)	1,57	p > 0,100
HAP4	TATAAC	10,7 (12/112)	2,4 (5/212)	5,19	p = 0,003
Teised	-	11,6 (13/112)	9,4 (20/212)	1,41	p > 0,100

¹ - Logistiline regressioonanalüüs; ² – genotüüp on võetud referentsiks;
OR, *odds ratio* – tõenäosuste suhe

AR geeni HAP4 sagedus on patsientidel oluliselt kõrgem kui kontrollidel (OR = 5,19; p = 0,003), millest saab järeldada, et antud haplotüüp on seotud mehe idiopaatilise viljatuse fenotüübiga (Tabel 1). Samuti võib lisada, et SNP2 A alleel (OR = 2,15; p = 0,014), SNP3 T alleel (OR = 1,90; p = 0,051) ja SNP6 C alleel (OR = 20,2; p = 0,017) on võimalikud mehepoolse infertiilsuse geneetilised riskifaktorid.

4.2.3 AR geeni mikrosatelliitide ja haplotüüpide omavahelised seosed

Antud uuringus leiti, et *AR* geeni haplotüübid ja SNP'd on omavahel seotud (Tabel 2). HAP2 korral on keskmised CAG järjestused pikemad ($r = 1,17$; $P=0,033$) ning HAP3 korral lühemad ($r = -2,9$; $P<0,001$) võrreldes HAP1 haplotüübiga. HAP3 ja HAP4 korral on GGN järjestused pikemad (vastavalt $r = 1,3$; $p = 0,001$ ja $r = 1,4$; $p = 0,002$) võrreldes HAP1 haplotüübiga.

Tabel 2. *AR* geeni haplotüüpide assotsiatsioon CAG ja GGN korduste arvuga ¹.

Haplotüübid	Keskmine CAG korduste arv \pm SD	p väärtus	Keskmine GGN korduste arv \pm SD	p väärtus
HAP1 ²	21,4 \pm 2,5	-	22,2 \pm 1,9	-
HAP2	22,5 \pm 1,9	$p = 0,033$	22,4 \pm 0,5	$p > 0,100$
HAP3	18,4 \pm 0,7	$p < 0,001$	23,6 \pm 0,6	$p = 0,001$
HAP4	20,8 \pm 0,8	$p > 0,100$	23,6 \pm 0,5	$p = 0,002$

¹ - Logistiline regressioonanalüüs; ² - genotüüp on võetud referentsiks; SD, *standard deviation* - standardhälve

4.2.4 AR geeni mikrosatelliitide ja patsientide kliiniliste andmete omavaheline seos

Lineaarse regressiooni mudel (kohandatud uuritava vanusele) näitas, et seerumi FSH väärtuse vähenemine on seotud *AR* CAG kordusjärjestuse pikenemisega ($r = -0,05$; $p = 0,009$). Lisaks leidsime, et *AR* GGN korduste arvu kasv on seotud seerumi madalamate LH väärtustega (lineaarne regressioonanalüüs, kohandatud vanusele ja testise ruumalale; $r = -0,03$; $p = 0,028$).

4.3 FSHR geeni polümorfismide analüüsi tulemused

4.3.1 FSHR geeni SNP'de alleelide ja genotüüpide sagedused

FSHR geeni SNP'sid (-29G/A, 919A/G = 307Thr/Ala ja 2039A/G = 680Asn/Ser) uuriti kokku 150 patsiendil ja 208 kontrollindiviidil. Uuritud variatsioonide alleelide ja genotüüpide sagedused on esitatud Tabelites 3, 4 ja 5. Kaks indiviidi (üks patsient ja üks kontroll) jäeti statistilisest analüüsist välja, kuna nendel tuvastati 10. eksoni rekombinantsed alleelid. 307Thr/Ala ja 680Asn/Ser polümorfismide alleelide ja genotüüpide sagedused langesid omavahel kokku, sest kõikidel uuritud indiviididel (välja arvatud kaks indiviidi) olid need kaks positsiooni aheldunud.

Saadud andmetest on näha, et uuritud SNP'de alleelide ning genotüüpide jaotus ei erine kontrollide ja patsientide vahel ($p > 0,100$) ning seda isegi siis, kui analüüsida azoospermsete ja oligozoospermsete patsientide gruppe eraldi.

Tabel 3. *FSHR* -29G/A alleelide ja genotüüpide sagedused.

	Geeni variatsioonid	Uuritud patsiendid, % (n = 149), χ^2 test			Kontrollindiviidid, % (n = 207)
		Azoospermsed patsiendid % (n = 36)	Oligozoospermsed patsiendid % (n = 113)	Kõik patsiendid % (n = 149)	
<i>FSHR</i> -29G/A					
Alleelide sagedus	A	33,3 (24/72)	26,1 (59/226)	27,9 (83/298)	26,8 (111/414)
	G	66,7 (48/72) p = 0,438	73,9 (167/226) p = 0,729	72,1 (215/298) p = 0,824	73,2 (303/414)
Genotüüpide sagedus	A/A	5,5 (2/36)	7,9 (9/113)	7,4 (11/149)	6,3 (13/207)
	G/A	55,6 (20/36)	36,3 (41/113)	40,9 (61/149)	41,0 (85/207)
	G/G	38,9 (14/36) p = 0,264	55,8 (63/113) p = 0,652	51,7 (77/149) p = 0,917	52,7 (109/207)
Genotüüpide kombinatsioonide sagedused	A/A	5,5 (2/36)	7,9 (9/113)	7,4 (11/149)	6,3 (13/207)
	G/G+G/A	94,5 (34/36) p = 0,835	92,1 (104/113) p = 0,735	92,6 (138/149) p = 0,845	93,7 (194/207)
	G/G	38,9 (14/36)	55,7 (63/113)	51,7 (77/149)	52,6 (109/207)
	A/A+G/A	61,1 (22/36) p = 0,179	44,3 (50/113) p = 0,679	48,3 (72/149) p = 0,940	47,4 (98/207)

Tabel 4. *FSHR* 919A/G alleelide ja genotüüpide sagedused.

	Geeni variatsioonid	Uuritud patsiendid, % (n = 149), χ^2 test			Kontrollindiviidid, % (n = 207)
		Azoospermsed patsiendid % (n = 36)	Oligozoospermsed patsiendid % (n = 113)	Kõik patsiendid % (n = 149)	
919A/G (307Thr/Ala)					
Alleelide sagedus	A (Thr)	58,3 (42/72)	57,5 (130/226)	57,7 (172/298)	57,5 (238/414)
	G (Ala)	41,7 (30/72) p = 0,970	42,5 (96/226) p = 0,965	42,3 (126/298) p = 0,987	42,5 (176/414)
Genotüüpide sagedus	A/A (Thr/Thr)	27,8 (10/36)	35,4 (40/113)	33,6 (50/149)	31,9 (66/207)
	G/A (Thr/Ala)	61,1 (22/36)	44,2 (50/113)	48,3 (72/149)	51,2 (106/207)
	G/G (Ala/Ala)	11,1 (4/36) p = 0,502	20,4 (23/113) p = 0,477	18,1 (27/149) p = 0,864	16,9 (35/207)
Genotüüpide kombinatsioonide sagedused	A/A (Thr/Thr)	27,8 (10/36)	35,4 (40/113)	33,6 (50/149)	31,9 (66/207)
	G/G+G/A (Ala/Ala+Thr/Ala)	72,2 (26/36) p = 0,767	64,6 (73/113) p = 0,607	66,4 (99/149) p = 0,828	68,1 (141/207)
	G/G (Ala/Ala)	11,1 (4/36)	20,4 (23/113)	18,1 (27/149)	16,9 (35/207)
	A/A+G/A (Thr/Thr+Thr/Ala)	88,9 (32/36) p = 0,530	79,6 (90/113) p = 0,540	81,9 (122/149) p = 0,876	83,1 (172/207)

Tabel 5. FSHR 2039A/G alleelide ja genotüüpide sagedused.

	Geeni variatsioonid	Uuritud patsiendid, % (n = 149), χ^2 test			Kontrollindiviidid, % (n = 207)
		Azoospermsed patsiendid % (n = 36)	Oligozoosperm-sed patsiendid % (n = 113)	Kõik patsiendid % (n = 149)	
2039A/G (680Asn/Ser)					
Alleelide sagedus	A (Asn)	58,3 (42/72)	57,5 (130/226)	57,7 (172/298)	57,5 (238/414)
	G (Ser)	41,7 (30/72) p = 0,970	42,5 (96/226) p = 0,965	42,3 (126/298) p = 0,987	42,5 (176/414)
Genotüüpide sagedus	A/A (Asn/Asn)	27,8 (10/36)	35,4 (40/113)	33,6 (50/149)	31,9 (66/207)
	G/A (Ser/Asn)	61,1 (22/36)	44,2 (50/113)	48,3 (72/149)	51,2 (106/207)
	G/G (Ser/Ser)	11,1 (4/36) p = 0,502	20,4 (23/113) p = 0,477	18,1 (27/149) p = 0,864	16,9 (35/207)
Genotüüpide kombinatsioonide sagedused	A/A (Asn/Asn)	27,8 (10/36)	35,4 (40/113)	33,6 (50/149)	31,9 (66/207)
	G/G+G/A (Ser/Ser+Ser/Asn)	72,2 (26/36) p = 0,767	64,6 (73/113) p = 0,607	66,4 (99/149) p = 0,828	68,1 (141/207)
	G/G (Ser/Ser)	11,1 (4/36)	20,4 (23/113)	18,1 (27/149)	16,9 (35/207)
	A/A+G/A (Asn/Asn+Ser/Asn)	88,9 (32/36) p = 0,530	79,6 (90/113) p = 0,540	81,9 (122/149) p = 0,876	83,1 (172/207)

4.3.2 Hormoonide kontsentratsioonide jaotus sõltuvalt *FSHR* geeni SNP'de genotüüpidest

Seerumi testosterooni ja FSH tasemeid analüüsiti iga *FSHR* SNP suhtes nii patsientide kui ka kontrollide gruppides ning analüüsi tulemused on esitatud Tabelis 6.

Tabel 6. Hormoonide tasemete jaotus sõltuvalt -29G/A, 919A/G (307Thr/Ala) ja 2039A/G (680Asn/Ser) SNP'de genotüüpidest ¹.

	Hormoonide keskväärtused ± SD					
	Uuritud patsiendid (n = 149)			Kontrollindiviidid (n = 207)		
<u>-29G/A</u>	G/G²	A/G	A/A	G/G²	A/G	A/A
S-T (nmol/L)	18,9 ± 7,3	17,7 ± 6,3	16,0 ± 5,1	21,5 ± 6,0	22,7 ± 8,7	21,2 ± 5,5
		r = -1,41 p = 0,250	r = -2,58 p = 0,270		r = 1,43 p = 0,411	r = -0,40 p = 0,942
S-FSH (IU/L)	11,8 ± 11,3	13,2 ± 2,2	11,5 ± 10,9	3,1 ± 1,4	3,3 ± 1,7	5,6 ± 3,5
		r = 3,10 p = 0,072	r = -1,07 p = 0,743		r = 0,11 p = 0,761	r = 1,73 p = 0,136
<u>307Thr/Ala – 680Asn/Ser</u>	Thr/Thr – Asn/Asn²	Thr/Ala – Asn/Ser	Ala/Ala – Ser/Ser	Thr/Thr – Asn/Asn²	Thr/Ala – Asn/Ser	Ala/Ala – Ser/Ser
S-T (nmol/L)	19,1 ± 6,5	18,0 ± 6,8	17,1 ± 7,4	20,9 ± 6,2	23,4 ± 7,9	18,0 ± 6,2
		r = 1,48 p = 0,271	r = -1,78 p = 0,313		r = 2,82 p = 0,098	r = -3,49 p = 0,280
S-FSH (IU/L)	10,9 ± 10,1	12,6 ± 13,1	14,6 ± 9,4	3,0 ± 1,3	3,2 ± 1,6	5,1 ± 2,5
		r = -0,90 p = 0,635	r = -0,94 p = 0,708		r = 0,14 p = 0,694	r = 1,90 p = 0,006

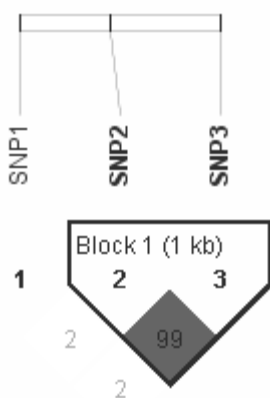
¹ – Lineaarse regressiooni mudel kohandatud vanusele, abstinentsile ja testiste keskmisele ruumalale; ² – genotüüp on võetud referentsiks; SD, *standard deviation* – standardhälve; r – regressioonikordaja

Seerumi FSH tase oli oluliselt kõrgem *FSHR* 307Ala/Ala-680Ser/Ser kontrollide seas võrreldes 307Thr/Thr-680Asn/Asn kontrollidega (p = 0,006). Lisaks oli testosterooni kontsentratsioon kontrollidel tendentsiga kõrgem 307Thr/Ala-680Asn/Ser

heterosügootidel võrreldes 307Thr/Thr-680Asn/Asn homosügootidega ($p = 0,098$) ning FSH tase oli patsientidel tendentsiga kõrgem -29A/G heterosügootidel võrreldes -29G/G homosügootidega ($p = 0,072$).

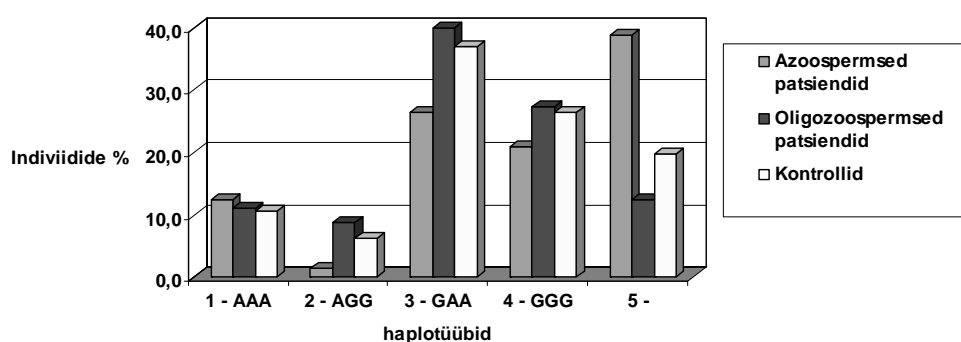
4.3.3 *FSHR* geeni kolme SNP haplotüüpide ja genotüüpide sagedused

Kolme *FSHR* SNP analüüs andis võimaluse analüüsida geeni haplotüüpe ja haplotüüpide genotüüpe. Uuritud SNP'de LD analüüs näitas, et kümnenda eksoni kaks SNP'd on omavahel väga tugevalt seotud ($D'=0,99$) ning moodustavad ühtse haplobloki (Joonis 10).



Joonis 10. *FSHR* geeni haploblokk. Joonisel tähistatud SNP1, SNP2 ja SNP3 on vastavalt -29A/G, 307Thr/Ala ja 680Asn/Ser polümorfismid.

Arvestades 10. eksoni SNP'de aheldatust, moodustavad *FSHR* geeni 3 SNP'd kokku neli enamlevinud haplotüüpi: A-A-A (A-Thr-Asn), A-G-G (A-Ala-Ser), G-A-A (G-Thr-Asn) ja G-G-G (G-Ala-Ser). Nende haplotüüpide sagedused kahes uuritud grupis on esitatud Tabelis 7 ning nende sageduste jaotus on kujutatud Joonisel 11.



Joonis 11. *FSHR* geeni haplotüüpide jaotus azoospermsete ja oligozoospermsete patsientide ja kontrollide seas. Viienda haplotüübi alla kuuluvad kaksikheterosügoodi (A/G-A/G-A/G) genotüübi eristamata haplotüübid (A-A-A / G-G-G või G-A-A / A-G-G).

Tabel 7. *FSHR* geeni haplotüüpide sagedused.

Haplotüüb	Uuritud patsiendid, % (n=149), χ^2 test			Kontroll-indiviidid, % (n=207)
	Azoospermised patsiendid % (n=36)	Oligozoospermised patsiendid % (n=113)	Kõik patsiendid % (n=149)	
1. A-A-A (A-Thr-Asn)	12,5 (9/72) p = 0,790	11,1 (25/226) p = 0,971	11,4 (34/298) p = 0,835	10,6 (44/414)
2. A-G-G (A-Ala-Ser)	1,4 (1/72) p = 0,163	8,8 (20/226) p = 0,297	7,0 (21/298) p = 0,799	6,3 (26/414)
3. G-A-A (G-Thr-Asn)	26,4 (19/72) p = 0,110	40,3 (91/226) p = 0,460	36,9 (110/298) p = 0,947	37,0 (153/414)
4. G-G-G (G-Ala-Ser)	20,8 (15/72) p = 0,400	27,4 (62/226) p = 0,835	25,8 (77/298) p = 0,952	26,3 (109/414)
5. eristamata alleelid¹	38,9 (28/72) p < 0,001	12,4 (28/226) p = 0,233	18,8 (56/298) p = 0,809	19,8 (82/414)

¹ – A/G-A/G-A/G kaksikheterosügoodi genotüübi alleelid koos

Alleelide jaotus uuritud patsientide gruppide ja kontrollide vahel ei ole statistiliselt oluline ($p > 0,100$), välja arvatud eristamata haplotüübid, mille jaotus on statistiliselt erinev azoospermsete patsientide ja kontrollide vahel ($p < 0,001$). Mainitud erinevused ei

peegelda aga haplotüüpide seost viljatuse fenotüübiga, sest antud juhul ei ole selge, millise haplotüübiga on tegemist iga konkreetse indiviidi korral.

Neli enamlevinud haplotüüpi moodustavad kokku 9 põhilist *FSHR* genotüüpi, mille jaotus on näidatud Tabelis 8. Genotüüpide sagedus ei erine oluliselt azoospermsete, oligozoospermsete või kõikide patsientide ja kontrollindiviidide vahel ($p > 0,05$). Ainsaks märgatavaks tendentsiks on viienda genotüübi kõrgem sagedus azoospermsete ja madalam sagedus oligozoospermsete patsientide seas võrreldes kontrollindiviididega (p väärtused vastavalt 0,071 ja 0,067).

Tabel 8. *FSHR* geeni kolme SNP genotüüpide sagedused

Geeni variatsioonid (-29G/A – 919A/G – 2039A/G)	Uuritud patsiendid, % (n=149); OR ¹			Kontroll- indiviidid, % (n=207)
	Azoospermsed patsiendid (n=36)	Oligozoospermsed patsiendid (n=113)	Kõik patsiendid (n=149)	
0. G-A-A / G-A-A² (G-Thr-Asn / G-Thr-Asn)	8,3 (3/36) OR = 1,00	19,5 (22/113) OR = 1,00	16,8 (25/149) OR = 1,00	14,5 (30/207)
1. A-A-A / A-A-A (A-Thr-Asn / A-Thr-Asn)	2,8 (1/36) OR = 3,33; p = 0,356	2,7 (3/113) OR = 1,36; p = 0,719	2,7 (4/149) OR = 1,60; p = 0,562	1,4 (3/207)
2. A-A-A / A-G-G (A-Thr-Asn / A-Ala-Ser)	2,8 (1/36) OR = 2,00; p = 0,580	3,5 (4/113) OR = 1,09; p = 0,905	3,4 (5/149) OR = 1,20; p = 0,791	2,4 (5/207)
3. A-G-G / A-G-G (A-Ala-Ser / A-Ala-Ser)	0,0 (0/36) OR = 0,00; p = 0,993	1,8 (2/113) OR = 0,55; p = 0,492	1,3 (2/149) OR = 0,48; p = 0,404	2,4 (5/207)
4. A-A-A / G-A-A (A-Thr-Asn / G-Thr-Asn)	16,7 (6/36) OR = 1,82; p = 0,426	13,3 (15/113) OR = 0,62; p = 0,254	14,1 (21/149) OR = 0,76; p = 0,488	15,9 (33/207)
5. A-A-A / G-G-G (A-Thr-Asn / A-Ala-Ser) või G-A-A / A-G-G (A-Thr-Asn / A-Ala-Ser) ³	38,9 (14/36) OR = 3,41; p = 0,071	12,4 (14/113) OR = 0,47; p = 0,067	18,8 (28/149) OR = 0,82; p = 0,586	19,8 (41/207)
6. A-G-G / G-G-G (A-Ala-Ser / G-Ala-Ser)	0,0 (0/36) OR = 0,00; p = 0,990	10,6 (12/113) OR = 1,49; p = 0,430	8,1 (12/149) OR = 1,31; p = 0,588	5,3 (11/207)
7. G-A-A / G-G-G (G-Thr-Asn / G-Ala-Ser)	19,4 (7/36) OR = 1,17; p = 0,832	28,3 (32/113) OR = 0,73; p = 0,371	26,2 (39/149) OR = 0,78; p = 0,465	29,0 (60/207)
8. G-G-G / G-G-G (G-Ala-Ser / G-Ala-Ser)	11,1 (4/36) OR = 2,11; p = 0,363	8,0 (9/113) OR = 0,65; p = 0,375	8,7 (13/149) OR = 0,82; p = 0,661	9,2 (19/207)

¹ - Logistiline regressioonanalüüs; ² - genotüüp on võetud referentsiks; ³ - kaksikheterosügooti genotüüp; OR – šanside suhe

Kahe indiviidi genotüübid ei kuulu 9 põhilise genotüübi hulka, nimelt ühe patsiendi genotüüp G-G-G / G-G-A (G-Ala-Ser / G-Ala-Asn) ning ühe kontrolli genotüüp G-A-A / G-A-G (G-Thr-Asn / G-Thr-Ser). Mõlema genotüübi korral on toimunud rekombinatsioon 10. eksoni SNP'de vahel. Nende kahe indiviidi väike osakaal uuritute hulgas ei võimalda analüüsida antud genotüüpide seost mehepoolse viljatuse fenotüübi või üksikute kliiniliste parameetritega.

4.4 *INHA* geeni polümorfismide analüüsi tulemused

4.4.1 *INHA* geeni SNP'de alleelide ja genotüüpide sagedused

INHA geeni polümorfisme uuriti kokku 159 patsiendil ja 211 kontrollil. Analüüsiti kahte SNP'd (128C/T ja 769G/A) ning nende alleelide segedused on ära toodud Tabelites 9 ja 10.

Tabel 9. *INHA* geeni 128C/T alleelide ja genotüüpide sagedused.

	Geeni variatsioonid	Uuritavad patsiendid, % (n=159), χ^2 test			Kontroll-indiviidid, % (n=211)
		Azoospermsed patsiendid, % (n=39)	Oligozoo-spermsed patsiendid, % (n=120)	Kõik patsiendid, % (n=159)	
128C/T					
Alleelide sagedus	C	80,8 (63/78)	84,6 (203/240)	83,6 (266/318)	81,8 (345/422)
	T	19,2 (15/78) p = 0,963	15,4 (37/240) p = 0,412	16,4 (52/318) p = 0,566	18,2 (77/422)
Genotüüpide sagedus	C/C	61,5 (24/39)	71,7 (86/120)	69,2 (110/159)	66,4 (140/211)
	C/T	38,5 (15/39)	25,8 (31/120)	28,9 (46/159)	30,8 (65/211)
	T/T	0,0 (0/39) p = 0,401	2,5 (3/120) p = 0,606	1,9 (3/159) p = 0,758	2,8 (6/211)
Genotüüpide kombinatsioonide sagedused	C/C	61,5 (24/39)	71,7 (86/120)	69,2 (110/159)	66,4 (140/211)
	C/T+ T/T	38,5 (15/39) p = 0,401	28,3 (34/120) p = 0,606	30,8 (49/159) p = 0,643	33,6 (71/211)

Tabel 10. *INHA* geeni 769G/A alleelide ja genotüüpide sagedused

	Geeni variatsioonid	Uuritavad patsiendid, % (n=159), χ^2 test			Kontroll-indiviidid, % (n=211)
		Azoospermse d patsiendid (n=39)	Oligozoo-spermsed patsiendid (n=120)	Kõik patsiendid (n=159)	
769G/A (257Ala/Thr)					
Alleelide sagedus	G	100,0 (78/78)	99,2 (238/240)	99,4 (316/318)	97,4 (411/422)
	A	0,0 (0/78) p = 0,307	0,8 (2/240) p = 0,193	0,6 (2/318) p = 0,081	2,6 (11/422)
Genotüüpide sagedus	G/G	100,0 (39/39)	98,3 (118/120)	98,7 (157/159)	94,8 (200/211)
	A/G	0,0 (0/39)	1,7 (2/120)	1,3 (2/159)	5,2 (11/211)
	A/A	0,0 (0/39) p = 0,301	0,0 (0/120) p = 0,193	0,0 (0/159) p = 0,078	0,0 (0/211)

Uuringu andmete kohaselt ei erine alleelide ega genotüüpide sagedused uuritud patsientide ja kontrollide vahel. Ainuke statistiliselt piirilähedane p väärtus osutub sellele, et 769A alleel esineb sagedamini kontrollidel kui patsientidel (p = 0,078).

Analüüsitud *INHA* SNP'de LD analüüs ei leidnud seost 128C/T ja 769G/A polümorfismide vahel. *INHA* geeni haplotüüpe ei olnud võimalik analüüsida *INHA* 769G/A A alleeli madala sageduse tõttu.

4.4.2 Hormoonide kontsentratsioonide jaotus sõltuvalt *INHA* geeni genotüüpidest

Uuringus analüüsiti ka vereseerumi inhibiin B taseme sõltuvalt 128C/T polümorfismi genotüüpidest. Saadud tulemused on esitatud Tabelis 11.

Tabel 11. Seerumi inhibiini B taseme sõltuvus 128C/T genotüüpidest ¹.

	Inhibiini B keskvaartused ± SD					
	Azoospermsed patsiendid (n = 39)		Oligozoospermsed patsiendid (n = 120)		Kõik patsiendid (n = 159)	
<u>128C/T</u>	C/C ²	C/T + T/T	C/C ²	C/T + T/T	C/C ²	C/T + T/T
S-INH (pg/mL)	67,0 ± 60,0	28,1 ± 17,7	73,7 ± 58,1	95,1 ± 77,6	72,8 ± 57,9	80,4 ± 74,2
		r = -67,6 p = 0,114		r = 16,8 p = 0,197		r = 14,9 p = 0,213

¹ - Lineaarse regressiooni mudel kohandatud vanusele, abstinentsile ja testiste keskmisele ruumalale; ² - genotüüp on võetud referentsiks; SD, *standard deviation* - standardhälve; r - regressioonikordaja

Inhibiini B kontsentratsioonide analüüsi tulemused näitasid, et inhibiini B taseme erinevused vereseerumis ei ole 128C/T genotüüpidega seotud ($p > 0,100$). Sarnased tulemused saadi ka 128C/T genotüüptide ja seerumi FSH kontsentratsioonide uuringus (Tabel 12). FSH tase ei sõltu 128C/T genotüüpidest ei kontrollidel ega ka patsientidel ($p > 0,100$).

Tabel 12. Seerumi FSH taseme sõltuvus *INHA* 128C/T genotüüpidest ¹.

	FSH keskvaartused ± SD			
	Kõik patsiendid (n = 159)		Kontrollindiviidid (n = 211)	
<u>128C/T</u>	C/C ²	C/T + T/T	C/C ²	C/T + T/T
S-FSH (IU/L)	12,1 ± 10,6	14,0 ± 14,6	3,1 ± 1,8	3,5 ± 1,4
		r = 0,59 p = 0,743		r = 0,48 p = 0,181

¹ - Lineaarse regressiooni mudel kohandatud vanusele, abstinentsile ja testiste keskmisele ruumalale; ² - genotüüp on võetud referentsiks; SD, *standard deviation* – standardhälve; r - regressioonikordaja

769G/A SNP A alleeli madala esinemissageduse tõttu ei ole võimalik analüüsida inhibiini B ja FSH seoseid antud geenivariatsiooniga.

5. ARUTELU

5.1 *AR* geeni polümorfismide seos idiopaatilise mehepoolse viljatusega

AR geeni CAG mikrosatelliitset järjestust on palju uuritud seoses erinevate haigustega. CAG piirkonna pikenemise puhul (> 40 korduse) on kirjeldatud spinaalse ja bulbaarse lihasatroofia esinemist, millega kaasneb ka tundetus androgeenide suhtes, testikulaarne atroofia ja seemnerakkude kontsentratsiooni vähenemine (La-Spada *et al.*, 1991). Lisaks on CAG korduste arvu varieeruvust normi piires seostatud erinevate kasvajate esinemisega: lühemad CAG kordused assotsieeruvad eesnäärme kasvajatega (Zeegers *et al.*, 2004) ning pikemad CAG kordused assotsieeruvad rinna (Suter *et al.*, 2003) ja endomeetriumi (Sasaki *et al.*, 2003) kasvajatega.

CAG korduste arvu uuringud seoses halvenenud spermatogeneesiga ja mehepoolse viljatusega on senini andnud vasturääkivaid tulemusi. Käesoleva töö tulemused näitasid, et *AR* CAG korduste arvu keskmised väärtused ning korduste jaotus ei erine patsientide ja kontrollide vahel. Meie tulemused kattuvad mitmete eelnevate uuringutega (Dadze *et al.*, 2000; van Golde *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2003; Ferlin *et al.*, 2004; Ruhayel *et al.*, 2004; Thangaraj *et al.*, 2002). Teiste uuringute tulemuste kohaselt esinevad aga pikemad CAG alleelid sagedamini viljatutel meestel kui viljakatel meestel (Wallerand *et al.*, 2001; Mengual *et al.*, 2003; Tut *et al.*, 1997; Dowsing *et al.*, 2001; Patrizio *et al.*, 2001). Positiivsete assotsiatsiooniuuringute tulemuste alusel arvatati välja, et CAG korduste arvu suurenemine > 28 korduse toob kaasa ligikaudu 4 kordse riski viljatuse tekkeks (Tut *et al.*, 1997). Samal ajal kui CAG korduste arvu vähenemist ≤ 23 korduse on kaitseks mehepoolse viljatuse puhul. Siiski leidsime meie oma uuringus, et > 28 CAG kordust esines ainult ühel patsiendil (34 kordust) ning kahel kontrollgrupi indiviidil (mõlemal 28 kordust). Lisaks näitasime, et meil esines ≤ 23 CAG kordust 83,9% (94/112) patsientidest ning 82,6% (175/212) kontrollindiviididest.

Erinevates uuringutes saadud andmete lahknemisi saab seletada uuritud indiviidide etniliste erinevuste, patsientide valiku ja uuritavate gruppide väikese arvulisusega. Kõige tõenäolisem põhjus nendest paistab olevat CAG korduste jaotuse varieerumine erineva päritoluga populatsioonides. Meie uuringus saadud tulemused, mis andsid keskmiseks ~ 21

CAG kordust nii patsientidel kui ka kontrollidel langevad kokku Euroopa päritoluga populatsioonide uuringute tulemustega (Edwards *et al.*, 1992). Lisaks sellele saab mainida, et osades eelnevates uuringutes leitud CAG korduste jaotuse erinevus patsientide ja kontrollide vahel on ~2 CAG kordust (Dowsing, *et al.*, 1999; Mifsud *et al.*, 2001; Patrizio *et al.*, 2001; Wallerand *et al.*, 2001; Mengual *et al.*, 1993). Tõestatud on, et CAG piirkonna pikenemine normi piires võib vähendada AR valgu transaktivatsiooni funktsiooni (Chamberlain *et al.*, 1994), kuid on vähetõenäoline, et olulist funktsiooni langust põhjustab kordusjärjestuse pikenemine 2 korduse võrra.

Hetkel on ainult mõningad uuringud analüüsinud GGN korduste variatsioone seoses mehepoolse viljatusega (Tut *et al.*, 1997; Ferlin *et al.*, 2004; Rajender *et al.*, 2007). Meie poolt saadud tulemused (keskmine korduste arv vastavalt patsientidel ja kontrollidel on 22,5 ja 22,4 kordust) langevad kokku teiste uuringute tulemustega, näidates GGN korduste arvu variatsioonide sarnasust patsientide ja kontrollide vahel. Ühes uuringus siiski leiti, et lühemad GGN kordusjärjestused (≤ 23 kordust) assotsieeruvad madalama seemnerakkude kontsentratsiooniga tänu AR retseptori aktiivsuse muutustele (Lundin *et al.*, 2006). Teistes uuringutes need andmed tõestatud ei ole (Ferlin *et al.*, 2004).

Kuigi CAG ja GGN kordusjärjestuste variatsioonide seos idiopaatilise viljatusega jääb hetkel veel lahtiseks on siiski välja pakutud, et nende kombinatsioon võib mõjutada AR valgu funktsiooni (Ferlin *et al.*, 2004; Ryhayel *et al.*, 2004). Rootsi meeste seas on CAG < 21 ja GGN = 23 korduste kombinatsioone leitud kontrollidel ~4 korda sagedamini (~16%) võrreldes patsientidega (~4%) (Ruhayel *et al.*, 2004). Meie tulemuste CAG/GGN kombinatsioonide analüüs ei näidanud olulisi erinevusi kordusjärjestuste jaotuvuses gruppide vahel.

Haplotüüpide uuringud on tänapäeval tõestanud oma olulisust haiguste kandidaatgeenide tuvastamisel. Käesoleva uuringu uudseks aspektiks oli analüüsida AR geeni haplotüüpe seoses mehepoolse viljatusega. Kuue SNP analüüs näitas väga suurt aheldatust nende vahel. Antud SNP'd moodustavad kokku 13 haplotüüpi, millest sagedasemad kontrollidel on: HAP1 (75,9%), HAP2 (7,1%), HAP3 (5,2%) ja HAP4 (2,4%), hõlmates kokku 90,6% kõikidest haplotüüpidest. Patsientide sagedasemad haplotüübid on: HAP1 (67,0%), HAP4 (10,7%), HAP3 (7,1%) ja HAP5 (6,3%). AR haplotüüpide analüüs koos CAG ja GGN

kordusjärjestuste pikkustega näitas, et HAP2 ja HAP3 on seotud vastavalt pikema ja lühema CAG piirkonnaga ning HAP3 ja HAP4 esinevad sagedamini koos pikemate GGN alleelidega kui HAP1.

Meie andmete kohaselt esineb aga HAP4 neli korda sagedamini patsientidel võrreldes kontrollidega (vastavalt 10,7% ja 2,4%). Meie eeldame ka, et üksikud SNP'd võivad olla mehe infertiilsuse riskifaktoriteks. SNP2 A alleel, SNP3 C alleel ja SNP6 C alleel esinevad sagedamini patsientide grupis võrreldes kontrollidega. Kuidas *AR* geeni haplotüübid mõjutavad geeniekspressiooni või valgu funktsionaalsust on hetkel selgusetu ning vajab edasisi *in vitro* uuringuid.

5.2 *FSHR* geeni polümorfismide seos idiopaatilise mehpoolse viljatusega

FSHR geeni polümorfisme on eelnevalt uuritud seoses meeste viljatusega, kuid ükski uuring ei ole seni näidanud 10. eksoni haplotüüpide jaotuse statistiliselt olulist erinevust viljatute ja viljakate indiviidide vahel (Simoni *et al.*, 1999; Sudo *et al.*, 2002; Ahda *et al.*, 2005; Pengo *et al.*, 2006). Meie poolt uuritud patsientide ja kontrollide seas ei esinenud samuti statistiliselt olulist erinevust *FSHR* geeni 10. eksoni haplotüüpide sagedustes.

Seni on kahes uuringus näidatud, et kliinilised parameetrid, mis on seotud FSH toimega (testiste ruumala ning seerumi testosterooni, FSH ja inhibiin B tasemed) ei sõltu *FSHR* geeni 10. eksoni haplotüüpidest ei viljakatel ega ka viljatutel meestel (Simoni *et al.*, 2002; Ahda *et al.*, 2005). Naistel on aga *FSHR* geeni 680Ser/Ser genotüübi korral kõrgemad seerumi FSH tasemed ning munasarjad on vähem tundlikud FSH stimulatsiooni suhtes kui 680Asn/Asn naistel (Sudo *et al.*, 2002; Perez Mayorga *et al.*, 2000). Meie uuringus seevastu ilmnis, et viljakatel *FSHR* 680Ser/Ser homosügootsetel meestel on seerumi FSH tase (5,1 IU/L) kõrgem kui 680Asn/Asn homosügootsetel meestel (3,0 IU/L). Kuigi *FSHR* 680Ser/Ser patsientide FSH väärtus (14,6 IU/L) oli samuti kõrgem kui vastav näitaja 680Asn/Asn homosügootsetel patsientidel (10,9 IU/L) ei olnud antud erinevus statistiliselt oluline. Meie poolt näidanud *FSHR* geeni 10. eksoni variatsioonide seosed seerumi FSH tasemega on sarnased, mida eelnevates uuringutes on näidatud naistel (Sudo *et al.*, 2002; Perez Mayorga *et al.*, 2000). Sarnaselt Simoni ja kolleegide poolt saadud tulemustele

(Simoni *et al.*, 1999) ei leidnud ka meie seoseid *FSHR* genotüüpide ja seerumi testosterooni taseme vahel.

FSHR -29G/A polümorfismi on vähe uuritud (Ahda *et al.*, 2005; Pengo *et al.*, 2006; Wunsch *et al.*, 2005) ning saadud tulemuste kohaselt ei ole -29 positsiooni polümorfism mehe viljatuse fenotüübiga seotud. Ka meie ei leidnud oma uuringus olulist erinevust selle SNP genotüüpide jaotuses infertiilsete ja viljakate meeste vahel. Samuti ei olnud võimalik välja tuua statistiliselt olulisi seoseid testosterooni ja FSH taseme ning -29G/A genotüüpide vahel. Tuleks aga mainida, et -29A/G heterosügootsete patsientide seerumi FSH tase on meie tulemuste kohaselt kõrgem võrreldes -29G/G homosügootidega ($p = 0,072$).

Hetkel on publitseeritud kaks uuringut, mis on käsitlenud koos *FSHR* -29G/A ja 10. eksoni polümorfisme seoses mehepoolse infertiilsusega (Ahda *et al.*, 2005; Pengo *et al.*, 2006). Ahda kolleegidega (2005) näitas, et kolme SNP variatsioonid määravad neli peamist *FSHR* haplotüüpi (A-Thr-Asn, A-Ala-Ser, G-Thr-Asn ja G-Ala-Ser), mille jaotus oli uuringu tulemuste kohaselt erinev patsientide ja kontrollide gruppides. A-Ala-Ser ja G-Thr-Asn haplotüübid olid enam esindatud vastavalt patsientide ja kontrollide grupis, mis teeb nendest vastavalt võimalikud riski ja kaitse faktorit (Ahda *et al.*, 2005). Meie uuringus ei ole aga antud kahe haplotüübi jaotus patsientide ja kontrollide vahel statistiliselt erinev. Selle põhjuseks võib olla, et mõlema, nii -29 kui ka 307-680 positsioonide heterosügootide korral ei saa haplotüüpe eristada ning nende jaotust antud grupis hinnata. Eristamata alleelide osakaal kõikide patsientide ning kontrollide seas on ~20% ning azoospermsete patsientide grupis isegi ligikaudu 40%.

Hinnates analüüsitud kolme SNP genotüüpe võib öelda, et ainult 5. genotüübi (kaksikheterosügootid) sagedus on kõrgem azoospermsetel ja madalam oligozoospermsetel patsientidel võrreldes kontrollindiviididega, kuid siiski ei ole see erinevus statistiliselt oluline. Ülejäänud genotüüpide jaotus patsientide ja kontrollide vahel ei erine, kinnitades Ahda ja kolleegide (2005) *FSHR* genotüüpide uuringu tulemusi (Ahda *et al.*, 2005).

5.3 *INHA* geeni polümorfismide seos idiopaatilise mehepoolse viljatusega

INHA geeni 5'UTR ala 128C/T asendus esineb erinevate andmete kohaselt > 19% naisindiviididel ning varieerub vahemikus 19-28% viljatutel ja 22-45% viljakatel naistel (Marozzi et al., 2002; Harris et al., 2005; Sundblad et al., 2006). Eelnevad uuringud näitavad, et 128C alleeli sagedus on kõrgem POF fenotüübiga naistel võrreldes kontrollidega (Marozzi et al., 2002; Harris et al., 2005). C alleeli võimalikuks funktsionaalseks rolliks pakutakse *INHA* geeni transkriptsiooni langemist ning selle tulemusena FSH taseme tõusu, mis omakorda initsieerib suurema arvu folliikulite küpsemise ning seetõttu kiirema ovariaalse reservi languse (Marozzi et al., 2002). Samuti on välja pakutud, et T alleel võib POF'i väljakujunemise eest kaitsta (Harris et al., 2005). Sarnane mehhanism võib samuti põhjustada mehepoolset viljatust, kuna spermatogeneesi häirete korral on sarnaselt POF'iga täheldatud kõrgeenenud FSH väärtuseid. Samas on ka vasturääkivaid uuringuid, milles ei ole leitud *INHA* 128C/T SNP seost POF'iga (Sundblad et al., 2006). Sundblad ja kolleegid (2006) analüüsisid samuti seerumi inhibiini B taset 128T alleeli omavatel kontrollindiviididel ja 128C/C homosügootidel ning ei leidnud genotüüp-fenotüüp vahelisi seoseid (Sundblad et al., 2006).

Meie tulemuste põhjal võib öelda, et 128T alleeli sagedus on 16,4% uuritud viljatutel meestel ning 18,2% kontrollindiviididel. Antud alleelide jaotus ei kinnita seost mehepoolse viljatuse ja 128C/T alleelide vahel. Siiski on T alleeli sagedus natukene kõrgem kontrollide seas, mis langeb samuti kokku viljakate naiste uuringute tulemustega. Lisaks ei leidnud meie erinevusi seerumi FSH ja inhibiini B kontsentratsioonides sõltuvalt 128C/T genotüübist. Kindlasti peegeldavad meie tulemused ainult Eesti populatsiooni ning vajavad kinnitust edasistes uuringutes teiste populatsioonide meesindiviididel.

INHA 769G/A positsiooni A alleel on väga harva esinev. Kirjanduse andmete kohaselt leitakse kas ainult üksikuid 769G/A heterosügoote (Shelling et al., 2000; Marozzi et al., 2002; Dixit et al., 2004; Sundblad et al., 2006) või puuduvad uuringus A alleeli kanvad indiviidid täielikult (Jeong et al., 2004). Antud polümorfismi mõju inhibiini funktsioonile ei ole lõpuni selge. Esitatud on hüpotees, et 769G/A asendus on toimunud piirkonnas, mis osaleb valgu seondamises retseptoriga ning seetõttu võib see häirida hormoon-retseptor interaktsiooni (Shelling et al., 2000). Samuti on spekulatsioonid, et inhibiini α -subühiku

Ala → Thr muutus võib häirida inhibiini seondumist ja seetõttu pärssida FSH sekretsiooni supressiooni (Shelling *et al.*, 2000). 769A alleeli tähtsusele osutab ka see, et praeguseini ei ole kirjeldatud ühtegi 769A/A homosügooti.

Hetkel on avaldatud kolm uuringut, mis näitasid 769G/A asenduse seost POF'iga (Shelling *et al.*, 2000; Marozzi *et al.*, 2002; Dixit *et al.*, 2004). Shelling ja kolleegid (2000) näitasid, et 769A alleeli sagedus on oluliselt kõrgem POF patsientidel kui tervetel viljakatel naistel (Shelling *et al.*, 2000). Marozzi ja kolleegide (2002) poolt saadud tulemuste kohaselt on 769A alleel sagedasem POF'i ja primaarse amenorröaga patsientidel (Marozzi *et al.*, 2002). Samas uuringus näidati samuti, et A alleeli esinemise tõenäosus oli tähtis perekondliku POF'i korral, kuid ei olnud tähtis sporaadilise POF'i korral. Lisaks tõestasid Dixit ja kolleegid (2004) 769A alleeli olulisust POF'i ning primaarse ja sekundaarse amenorröa tekkes (Dixit *et al.*, 2004). Meie uuringus olid 2 patsienti (1,3%, 2/159) ja 11 kontrollindiviidi (5,2%, 11/211) 769G/A heterosügootid, esinedes võrdse sagedusega mõlemas grupis. Seetõttu on väga vähe tõenäoline, et meie poolt uuritud *INHA* geenivariatsioonid omavad tähtsust mehe viljatuse patogeneesis.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö kirjanduse osas antakse ülevaade spermatogeneesi füsioloogiast ja selle hormonaalsest regulatsioonist. Kirjeldatakse meeste reproduktiivsüsteemi hormone, nende funktsioone ja omavahelisi interaktsioone. Erilist tähelepanu pöörati testosteroonile ja androgeeni retseptorile, FSH'le ja tema retseptorile ning inhibiini B'le ja tema α -subühikule, mille geenide polümorfisme antud töös uuriti.

Samuti käsitletakse kirjanduse osas meeste ja naiste viljatuse põhjuseid ning täpsemalt analüüsitakse mehe viljatuse geneetilisi faktoreid. Mehe viljatuse korral selgitatakse idiopaatilise (selgusetu) põhjusega viljatuse mõistet. Idiopaatilise viljatuse põhjuste selgitamisel peetakse oluliseks uuritavate indiviidide geneetiliste iseärasuste analüüsimist, ehk reproduktiivsüsteemi funktsioonis osalevate valkude geenide polümorfismide uurimist. Antud töös uuriti *AR*, *FSHR* ja *INHA* geenide variatsioonide seoseid mehe viljatuse patogeneesiga.

Magistritöö praktilises osas uuriti järgnevate mehe viljatuse kandidaatgeenide polümorfisme: *AR* geeni (CAG)_n ja (GGN)_n mikrosatelliitsed järjestused ja haplotüübid, *FSHR* geeni SNP'd ja *INHA* geeni SNP'd. Uuringus leiti, et *AR* geeni mikrosatelliitsete järjestuste jaotus ei ole seotud mehe viljatusega, kuid *AR* geeni HAP4 haplotüüp esineb viljatute meeste seas oluliselt sagedamini kui viljakatel meestel. Seetõttu saab *AR* HAP4 nimetada mehe viljatuse riskihaplotüübiks. Lisaks leiti, et seerumi FSH ja LH väärtused on vastavalt seotud mehe *AR* geeni (CAG)_n ja (GGN)_n korduste variatsioonidega.

Uuringu tulemuste kohaselt on *FSHR* geeni 10. eksoni SNP'd (307Thr/Ala ja 680Asn/Ser) tugevalt aheldunud. Kuigi *FSHR* geeni 680Ser/Ser homosügootide korral näidati kõrgemat seerumi FSH taset, polnud analüüsitud *FSHR* variatsioonid seotud mehe viljatuse probleemiga. Samuti puudusid meie uuringus seosed inhibiini α -subühikut kodeeriva *INHA* geeni variatsioonide ja spermatogeneesi patoloogiate vahel.

SUMMARY

In theoretical part of this work we discuss the physiology of spermatogenesis and the hormonal regulation of this process. Reproductive hormones, their functions and mutual interactions are discussed in details. Special attention is paid to testosterone and androgen receptor, to FSH and its receptor, and to inhibin B and its α -subunit, because *AR*, *FSHR* and *INHA* genes' polymorphisms were the subjects of the current study.

Besides abovementioned, we provide detailed review of aetiology of male and female infertility with special focus on genetic causes of male infertility. The particular case of male infertility is so-called idiopathic infertility, when despite the thorough analysis the underlying cause of the pathology remains obscure. Genetic alterations of genes, protein products of which are involved in the physiology of male reproductive system are believed to be associated with the development of male infertility, thus assuming the role of genetic background in this process.

In this study we analyzed possible associations between idiopathic infertility and the following polymorphisms: (CAG)_n and (GGN)_n microsatellite tracts and six single-nucleotide polymorphisms (SNP's) in *AR* gene, three SNP's in *FSHR* gene and two SNP's in *INHA* gene. Our study revealed no association between variations in *AR* microsatellite tracts' length and male infertility phenotype. However, we found significant association of serum FSH and LH level with *AR* (CAG)_n and (GGN)_n microsatellite tract length, respectively. Yet another intriguing finding of our study was significantly higher frequency of one particular *AR* haplotype (HAP4) in experimental group compared to controls ($p = 0,003$). Thus, our results suggest HAP4 haplotype as a potential risk factor in the development of idiopathic male infertility.

FSHR gene SNPs' analysis revealed an almost complete linkage between 307Thr/Ala and 680Asn/Ser polymorphisms in exon 10. *FSHR* 680Ser/Ser homozygote controls had significantly higher serum FSH level compared to individuals carrying 680Asn allele, but no association between *FSHR* polymorphisms and male infertility was found. The *INHA* gene polymorphisms' distribution showed also no association with idiopathic male infertility phenotype.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin eelkõige tänada oma juhendajat Andres Salumetsa. Samuti soovin tänada Maire Petersit abi eest katsete planeerimisel ja tulemuste analüüsimisel. Suur tänu Merli Saarele, kes teostas *AR* geeni SNP'de analüüsi. Tahaksin tänada väga ka Kadri Hallerit, kes teostas tulemuste statistilise analüüsi. Veel tänan Margus Punabit, Kristo Ausmeest ja Olev Poolametsa Tartu Ülikooli Kliinikumi Androloogiakeskusest koostöö eest. Samuti suured tänud Andres Metspalule ja laborikaaslastele toetuse ja meeldiva tööseltkonna eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahda Y, Gromoll J, Wunsch A, Asatiani K, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M. Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotype distribution in normozoospermic and azoospermic men. *J Androl.* 2005 Jul-Aug;26(4):494-9.
- Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997 Nov 15;25(22):4692-3.
- Bergmann M, Nashan D, Nieschlag E. Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia. *Cell Tissue Res.* 1989 Apr;256(1):183-90.
- Bergmann, M. (2006) Physiology of Spermatogenesis. In: Schill W.-B., Comhaire F.H., Hargreave T.B. (Eds.), *Andrology for the Clinician* (pp. 272-280). Springer, 14 Jun 2006.
- Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug 11;22(15):3181-6.
- Christin-Maitre S, Vasseur C, Portnoi MF, Bouchard P. Genes and premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol.* 1998 Oct 25;145(1-2):75-80. Review.
- Comhaire, F., Mahmoud, A. (2006) Endocrine Regulation. In: Schill W.-B., Comhaire F.H., Hargreave T.B. (Eds.), *Andrology for the Clinician* (pp. 288-291). Springer, 14 Jun 2006.
- Crowley WF Jr, Whitcomb RW, Jameson JL, Weiss J, Finkelstein JS, O'Dea LS. Neuroendocrine control of human reproduction in the male. *Recent Prog Horm Res.* 1991;47:27-62; discussion 62-7. Review.
- Dadze S, Wieland C, Jakubiczka S, Funke K, Schroder E, Royer-Pokora B, Willers R, Wieacker PF. The size of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile Caucasoid sample of German origin. *Mol Hum Reprod.* 2000 Mar;6(3):207-14.
- De Kretser DM. Male infertility. *Lancet.* 1997 Mar 15;349(9054):787-90. Review.
- Dixit H, Deendayal M, Singh L. Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian women with ovarian failure. *Hum Reprod.* 2004 Aug;19(8):1760-4. Epub 2004 Jun 17.

- Dowsing AT, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, de Kretser DM, Trounson AO. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):640-3.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*. 1992 Feb;12(2):241-53.
- Ferlin A, Bartoloni L, Rizzo G, Roverato A, Garolla A, Foresta C. Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Mol Hum Reprod*. 2004 Jun;10(6):417-21. Epub 2004 Mar 25.
- Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol*. 2006 Aug;22(2):133-41. Epub 2006 Jun 27. Review.
- Foresta C, Bordon P, Rossato M, Mioni R, Veldhuis JD. Specific linkages among luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone release in the peripheral blood and human spermatic vein: evidence for both positive (feed-forward) and negative (feedback) within-axis regulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Sep;82(9):3040-6.
- Freedman ML, Pearce CL, Penney KL, Hirschhorn JN, Kolonel LN, Henderson BE, Altshuler D. Systematic evaluation of genetic variation at the androgen receptor locus and risk of prostate cancer in a multiethnic cohort study. *Am J Hum Genet*. 2005 Jan;76(1):82-90. Epub 2004 Nov 29.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9. Epub 2002 May 23
- Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Shelling AN. INHA promoter polymorphisms are associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 2005 Nov;11(11):779-84. Epub 2006 Jan 3.
- Hirsh A. Male subfertility. *BMJ*. 2003 Sep 20;327(7416):669-72. Review
- Jeong HJ, Cho SW, Kim HA, Lee SH, Cho JH, Choi DH, Kwon H, Cha WT, Han JE, Cha KY. G769A variation of inhibin alpha-gene in korean women with premature ovarian failure. *Yonsei Med J*. 2004 Jun 30;45(3):479-82.

- Leifke E, Simoni M, Kamischke A, Gromoll J, Bergmann M, Nieschlag E. Does the gonadotrophic axis play a role in the pathogenesis of Sertoli-cell-only syndrome? *Int J Androl.* 1997 Feb;20(1):29-36.
- Lund A, Tapanainen JS, Lahdetie J, Savontaus ML, Aittomaki K. Long CAG repeats in the AR gene are not associated with infertility in Finnish males. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003 Feb;82(2):162-6.
- Lundin KB, Giwercman YL, Rylander L, Hagmar L, Giwercman A. Androgen receptor gene GGN repeat length and reproductive characteristics in young Swedish men. *Eur J Endocrinol.* 2006 Aug;155(2):347-54.
- Mahmoud AM, Comhaire FH, Depuydt CE. The clinical and biologic significance of serum inhibins in subfertile men. *Reprod Toxicol.* 1998 Nov-Dec;12(6):591-9.
- Marozzi A, Porta C, Vegetti W, Crosignani PG, Tibiletti MG, Dalpra L, Ginelli E. Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure. *Hum Reprod.* 2002 Jul;17(7):1741-5.
- McGrath M, Lee IM, Hankinson SE, Kraft P, Hunter DJ, Buring J, De Vivo I. Androgen receptor polymorphisms and endometrial cancer risk. *Int J Cancer.* 2006 Mar 1;118(5):1261-8.
- McPhaul MJ, Marcelli M, Tilley WD, Griffin JE, Wilson JD. Androgen resistance caused by mutations in the androgen receptor gene. *FASEB J.* 1991 Nov;5(14):2910-5. Review.
- Meinhardt, A. (2006) Anatomy and Histology of the Male Genital Tract. In: Schill W.-B., Comhaire F.H., Hargreave T.B. (Eds.), *Andrology for the Clinician* (pp. 259-266). Springer, 14 Jun 2006.
- Mengual L, Oriola J, Ascaso C, Balleca JL, Oliva R. An increased CAG repeat length in the androgen receptor gene in azoospermic ICSI candidates. *J Androl.* 2003 Mar-Apr;24(2):279-84.
- Mifsud A, Sim CK, Boettger-Tong H, Moreira S, Lamb DJ, Lipshultz LI, Yong EL. Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertil Steril.* 2001 Feb;75(2):275-81.
- Oates RD, Amos JA. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl.* 1994 Jan-Feb;15(1):1-8. Review.
- Patrizio P, Leonard DG, Chen KL, Hernandez-Ayup S, Trounson AO. Larger trinucleotide repeat size in the androgen receptor gene of infertile men with extremely severe oligozoospermia. *J Androl.* 2001 May-Jun;22(3):444-8.

- Pengo M, Ferlin A, Arredi B, Ganz F, Selice R, Garolla A, Foresta C. FSH receptor gene polymorphisms in fertile and infertile Italian men. *Reprod Biomed Online*. 2006 Dec;13(6):795-800.
- Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Sep;85(9):3365-9.
- Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Sep;83(9):3110-4.
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K. Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl*. 2007 Mar;9(2):147-79. Review.
- Robertson DM, Stephenson T, McLachlan RI. Characterization of plasma inhibin forms in fertile and infertile men. *Hum Reprod*. 2003 May;18(5):1047-54.
- Robinson WP, Bernasconi F, Basaran S, Yuksel-Apak M, Neri G, Serville F, Balicek P, Haluza R, Farah LM, Luleci G, et al. A somatic origin of homologous Robertsonian translocations and isochromosomes. *Am J Hum Genet*. 1994 Feb;54(2):290-302.
- Ruhayel Y, Lundin K, Giwercman Y, Hallden C, Willen M, Giwercman A. Androgen receptor gene GGN and CAG polymorphisms among severely oligozoospermic and azoospermic Swedish men. *Hum Reprod*. 2004 Sep;19(9):2076-83. Epub 2004 Jun 30.
- Sasaki M, Sakuragi N, Dahiya R. The CAG repeats in exon 1 of the androgen receptor gene are significantly longer in endometrial cancer patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jun 13;305(4):1105-8.
- Shelling AN, Burton KA, Chand AL, van Ee CC, France JT, Farquhar CM, Milsom SR, Love DR, Gersak K, Aittomaki K, Winship IM. Inhibin: a candidate gene for premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2000 Dec;15(12):2644-9.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev*. 1997 Dec;18(6):739-73. Review.
- Simoni M, Gromoll J, Hoppner W, Kamischke A, Krafft T, Stahle D, Nieschlag E. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Feb;84(2):751-5.

- Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update*. 2002 Sep-Oct;8(5):413-21. Review.
- Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod*. 2002 Oct;8(10):893-9.
- Suter NM, Malone KE, Daling JR, Doody DR, Ostrander EA. Androgen receptor (CAG)_n and (GGC)_n polymorphisms and breast cancer risk in a population-based case-control study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Feb;12(2):127-35.
- Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet*. 1997 Feb;15(2):205-6.
- Terry KL, De Vivo I, Titus-Ernstoff L, Shih MC, Cramer DW. Androgen receptor cytosine, adenine, guanine repeats, and haplotypes in relation to ovarian cancer risk. *Cancer Res*. 2005 Jul 1;65(13):5974-81.
- Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L. CAG repeat expansion in the androgen receptor gene is not associated with male infertility in Indian populations. *J Androl*. 2002 Nov-Dec;23(6):815-8.
- The ESHRE Capri Workshop Group. Physiological determinants of human infertility. *Hum Reprod Update* 2002; 8(5): 435-447
- The ESHRE Capri Workshop. Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility, 1996. *Hum Reprod* 1996; 8: 1775-1807
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Nov;82(11):3777-82.
- Van Golde R, Van Houwelingen K, Kiemeny L, Kremer J, Tuerlings J, Schalken J, Meuleman E. Is increased CAG repeat length in the androgen receptor gene a risk factor for male subfertility? *J Urol*. 2002 Feb;167(2 Pt 1):621-3.
- Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3666-72.

- Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 2005 Jul;130(1):15-28. Review.
- Wallerand H, Remy-Martin A, Chabannes E, Bermont L, Adessi GL, Bittard H. Relationship between expansion of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene and idiopathic male infertility. *Fertil Steril*. 2001 Oct;76(4):769-74.
- Weber, R. (2006) Male Factor Infertility Problems. *Endocrine Factors*. In: Schill W.-B., Comhaire F.H., Hargreave T.B. (Eds.), *Andrology for the Clinician* (pp. 75-77). Springer, 14 Jun 2006.
- Wunsch A, Ahda Y, Banaz-Yasar F, Sonntag B, Nieschlag E, Simoni M, Gromoll J. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Fertil Steril*. 2005 Aug;84(2):446-53.
- Yang, C.Q., Chan, K.Y.K., Ngan, H.Y.S., Khoo, U.S., Chiu, P.M., Chan, Q.K.Y., Xue, W.C., and Cheung, A.N.Y. Single nucleotide polymorphisms of follicle-stimulating hormone receptor are associated with ovarian cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, July 2006; 27, 1502-1506
- Zeegers MP, Kiemeneij LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Nov;13(11 Pt 1):1765-71. Review

Lisa 1. Patsientide ja kontrollide kliiniliste andmete kokkuvõte ja statistiline analüüs.

	Parameetri keskmine väärtus (jaotuse piirid)		Mann-Witney U-test
	Patsiendid (n=161)	Kontrollindiviidid (n=212)	
Vanus (aastat)	31,0 (19,0 – 49,0)	18,0 (17,0 – 25,0)	p < 0,001
Keskmine testiste ruumala (mL)	18,5 (3,0 – 50,0)	26,0 (15,0 – 45,0)	p < 0,001
Aeg viimasest ejakulatsioonist, abstinents (päevad)	4,0 (1,0 – 10,0)	4,6 (0,0 – 13,0)	p < 0,001
Ejakulaadi maht (mL)	3,8 (0,0 – 10,2)	3,2 (0,9 – 8,9)	p = 0,003
Seemnerakkude kontsentratsioon (10⁶/mL)	1,0 (0,0 – 14,0)	122,0 (75,0 – 716,0)	p < 0,001
Seemnerakkude arv ejakulaadis (10⁶/mL)	3,8 (0,0 – 60,2)	391,0 (202,5 – 3079,0)	p < 0,001
Progresseeruvalt liikuvad seemnerakud (%)	16,5 (0,0 – 74,0)	57,5 (30,0 – 80,0)	p < 0,001
S-T (nmol /L)	17,6 (3,5 – 43,7)	20,6 (10,9 – 48,6)	p < 0,001
S-FSH (IU/L)	8,6 (1,1 – 62,2)	3,1 (0,7 – 9,3)	p < 0,001
S-LH (IU/L)	4,5 (0,6 – 23,8)	2,9 (0,9 – 10,2)	p < 0,001
S-INH (pg/mL)	59,6 (0,7 – 362,8)	- ¹	- ¹

¹ – Seerumi inhibiin B väärtused ei ole kontrollindiviididel määratud

Lisa 2. SNPde analüüs.

Polümorfismid	Amino- happe muutus	Amplifitseerimiseks kasutatud praimerid; F – forward, R – reverse (5' - 3')	Praimerite Tm (PCR)	Analüüsi meetod	Analüüs	Alleel	Vastav DNA fragment (nt)
AR-SNP1 T/C (rs962458)	-*	F-CCGTAGCCTTCTGGAAAACATC ¹ R-GTCACAATTTTACTTAAAAATGCGC ¹	62°C	RFLP	<i>Bsh1236I</i>	T C	149 24+125
AR-SNP2 A/G (rs6152)	Glu/Glu (213)	F-CTCCGGACGAGGATGACTCA ¹ R-TGGCGTTGTCAGAAATGGTCGAA ¹	60°C	RFLP	<i>Eco147I</i> (<i>StuI</i>)	A G	255 186+69
AR-SNP3 C/T (rs1204038)	-*	F1-GAACTTGGTCTAATTCCCTTC ¹ F2-GAACTTGGTCTAATTCCCTTT ¹ R-CTTCGCTAGACACGAGTTCA ¹	63°C	AS-PCR	F1 + R F2 + R	C T	160
AR-SNP4 A/G (rs2361634)	-*	F-ATGAGGTAAAGTTACAAACCTGG ¹ R-AACATGGTCCCTGGCAGTCTC ¹	62°C	RFLP	<i>XceI</i>	A G	344+54 224+120+54
AR-SNP5 G/A (rs1337080)	-*	F-GAATTGGAGGGAGATAGGTG ¹ R-CTCAATGAGGACAAGGAACTC ¹	60°C	RFLP	<i>NdeI</i>	G A	268 137+131
AR-SNP6 C/T (rs1337082)	-*	F-GGAGGCATCTTGAGACCAAT ¹ R1-ATCTTGAACAATTATTTAACCTTC ¹ R2-ATCTTGAACAATTATTTAACCTTT ¹	59°C	AS-PCR	F + R1 F + R2	C T	217

Lisa 2. SNPde analüüs (jätk).

Polümorfismid	Amino- happe muutus	Amplifitseerimiseks kasutatud praimerid; F – <i>forward</i> , R – <i>reverse</i> (5' - 3')	Praimerite T _m (PCR)	Analüüsi meetod	Analüüs	Alleel	Vastav DNA fragment (nt)
FSHR -29G/A (rs1394205)	-*	F-TCATAAGGGCACTGTGTGGA ¹ R-TTGGCAGAGAAAAACCCTGT ¹	58°C	RFLP	<i>MboII</i>	G A	72+115 187
FSHR 919A/G (rs6165)	The/Ala (307)	F-ACCCTGCACAAAGACAGTGA ¹ R-GCTGTAGCTGGTCTCATTGT ¹	58°C	RFLP	<i>Eam1105I</i>	A G	146+46 192
FSHR 2039A/G (rs6166)	Asn/Ser (680)	F-TCTACCTCACAGTGCGGAAC ¹ R-TAATAGTTCCTGACCAATTTACCTTA ¹	55°C	RFLP	<i>BseNI</i>	A G	585 380+205
INHA 128C/T (rs 35118453)	-*	F-GGAAGACTGGATGAGAAGG ² R-GCTTTTTTCTCAAAGTCATCC ²	60°C	RFLP	<i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>)	C T	446 118+328
INHA 769G/A (rs12720062)	Ala/Thr (257)	F-GGCCCACTCGGACCAGAC ³ R-AGCCCACAACCACCATGACAGTAG ³	60°C	RFLP	<i>Cfr10I</i>	G A	122+121 243

* – SNP asub mittekodeerivas alas

¹ – Praimerid on disainitud käesoleva uuringu raames

² – Montgomery *et al.*, 2006

³ – Jeong *et al.*, 2004

Lisa 3. AR geeni mikrosatelliitide analüüs.

Mikrosatelliitne ala	Amplifitseerimiseks kasutatud praimerid; F – forward, R – reverse (5` - 3`)	Praimerite Tm (PCR)	Amplifitseeritava fragmendi pikkus ning vastav trinukleotiidsete korduste arv
(CAG)_n	F - FAM-GTCTACCCTCGGCCGCGTC ¹ R - TAGCCTGTGGGGCCTCTACG ¹	60°C	297 nt (23 trinukleotiidset kordust)
(GGN)_n	F - TAMRA-CCTGGCACACTCTCTTCACA ¹ R - ACATCAGGTGCGGTGAAGTC ¹	60°C	205 nt (23 trinukleotiidset kordust)

¹ – Praimerid on disainitud käesoleva uuringu raames