

TARTU ÜLIKOOL
ARSTITEADUSKOND

Merli Saare

Androgeeni retseptori ja 5 α -reduktaasi tüüp 2 geenide
polümorfismide seos idiopaatilise mehepoolse
viljatusega

Magistritöö

Juhendajad: Maire Peters, Ph.D.

Helle Karro, MD, Ph.D.

TARTU
2008

Sisukord

Lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	
1.1. Viljatuse olemus ja ulatus	7
1.2. Mehe viljakus	8
1.2.1. Mehe viljakust mõjutavad tegurid ja viljatuse põhjused	8
1.2.2. Mehe viljatuse diagnoosimine	10
1.3. Spermatogenees ja selle hormonaalne regulatsioon	
1.3.1. Spermatogenees	11
1.3.2. Spermatogeneesi hormonaalne regulatsioon	13
1.4. Mehe viljatuse geneetilised põhjused	14
1.4.1. Mehe viljatusega seotud kromosoomanomaaliad	15
1.4.2. Mehe viljatusega seotud geenimutatsioonid	16
1.5. Androgeenide toimed	18
1.6. Androgeeni retseptori geen	19
1.6.1. Androgeeni retseptori geeni polümorfismid	20
1.7. 5 α -reduktaas ja DHT roll spermatogeneesis	21
1.8. 5 α -reduktaasi tüüp 2 geen	23
1.8.1. 5 α -reduktaasi tüüp 2 geeni polümorfismid	23
2. Töö eesmärgid	26
3. Materjal ja meetodika	
3.1. Uuringugrupi iseloomustus	27
3.2. DNA eraldamine	27
3.3. Genotüpiseerimine	
3.3.1. SNP-de valik ja genotüpiseerimine	28
3.3.2. Mikrosatelliitsete järjestuste genotüpiseerimine	29
3.4. Andmete statistiline analüüs	31
4. Tulemused	
4.1. Uuritavate patsientide ja kontrollgrupi kliiniliste andmete analüüs	32
4.2. Androgeeni retseptori geeni haplotüüpide seos viljatusega	33
4.3. Androgeeni retseptori geeni mikrosatelliitsete kordusjärjestuste variatsioonid	34
4.4. Androgeeni retseptori geeni haplotüüpide ning CAG ja GGN mikrosatelliitsete variatsioonide omavahelised seosed	35

4.5. 5 α -reduktaas tüüp 2 geeni polümorfismide seos viljatusega	36
5. Arutelu	
5.1. Androgeeni retseptori geeni polümorfismide seos viljatusega	40
5.2. Androgeeni retseptori geeni CAG/GGN mikrosatelliitsete korduste seos viljatuse tekkega	41
5.3. 5 α -reduktaasi tüüp 2 geeni variatsioonide seos viljatusega	43
Kokkuvõte	46
Summary	47
Tänuavaldused	48
Kasutatud kirjandus	49
Lisad	56

Lühendid

AR	androgeeni retseptor
D'	standardiseeritud ahelduse tasakaalustamatuse (<i>LD</i>) koefitsent D
<i>CFTR</i>	tsüstilise fibroosi transmembraanse juhtivuse regulaatori geen (<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>)
DHT	dihüdrotestosteroon
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon
GnRH	gonadotropiini vabastajahormoon
htSNP	haplotüüpi kirjeldav ühenukleotiidne polümorfism (<i>haplotype tagging SNP</i>)
kb	tuhat aluspaari
<i>LD</i>	ahelduse tasakaalustamatus (<i>Linkage Disequilibrium</i>)
LH	luteiniseeriv hormoon
OR	šansside suhe (<i>Odds Ratio</i>)
p	kromosoomi lühike õlg
PCOS	polütsüstiliste munasarjade sündroom
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP	restriksioonifragmendi pikkuste polümorfism (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SD	standardhälve (<i>standard deviation</i>)
SNP	ühenukleotiidne polümorfism (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SRD5A1	5 α -reduktaas tüüp 1
SRD5A2	5 α -reduktaas tüüp 2
tagSNP	omavahel aheldunud markereid kirjeldav üksik SNP
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> 'e DNA polümeraas
U	ühik (<i>Unit</i>)
WHO	Maailma Tervise Organisatsioon (<i>World Health Organization</i>)

Sissejuhatus

Lastetus puudutab kümmet kuni viitteist protsenti kooselavatest paaridest ja ligikaudu pooltel juhtudel on viljatus tingitud mehepoolsetest põhjustest. Suur osa mehe viljatusest (31-45%) on idiopaatiline ehk teadmata põhjusega viljatus, mille üheks võimalikuks tekkepõhjuseks peetakse geneetiliste variatsioonide esinemist reproduktiivsüsteemiga seotud geenides. Spermatogeneesi protsessiga on seotud rohkem kui 2000 erinevat geeni, mis muudab viljatust põhjustavate potentsiaalsete kandidaatgeeni(de) leidmise äärmiselt keeruliseks. Tõenäoliselt ei vastuta idiopaatilise põhjusega spermatogeneesi häirete tekkimise eest üks kindel geen, vaid muutused spermatogeneesi rajas või spermatogeneesiga seotud süsteemides on seotud mitme geeni mutatsioonide või polümorfismidega.

Üheks võimalikuks mehe viljakust mõjutavaks kandidaatgeeniks on X kromosoomis paiknev androgeeni retseptori geen (*AR*). Spermatogeneesi toimumiseks on androgeenid, testosteroon ning tema bioloogiliselt aktiivne metaboliit 5- α dihidrotestosteroon (DHT) väga olulised. Nii testosteroon kui ka DHT seonduvad *AR*-le, kutsudes esile androgeen seoseliste geenide transkriptsiooni. Kui *AR* geeni mutatsioonid kutsuvad esile erineva raskusastmega androgeenide tundlikkuse häireid, siis geneetilist varieeruvust lisavate ühe nukleotiidiliste polümorfismide (SNP-d) mõju retseptori toimimisele ei osata veel täpselt hinnata.

Teiseks potentsiaalseks kandidaatgeeniks on testosterooni dihidrotestosterooniks (DHT) redutseeriva ensüümi 5 α -reduktaasi tüüp 2 geen (*SRD5A2*). Kui *SRD5A2* mutatsioonid, mille tagajärjel tekivad erineva raskusastmega soo diferentseerumise häired ning enamasti viljatus, on hästi kirjeldatud, siis teadmised *SRD5A2* SNP-de mõjust mehe viljakusele on vähesed.

Antud magistritöö eesmärgiks oli läbi viia assotsiatsiooni uuring Eesti populatsioonis, et välja selgitada *AR* geeni ühenukleotiidiliste polümorfismide ja kahe trinukleotiidsed kordused (CAG ja GGN) ning *SRD5A2* geeni polümorfismide võimalikud seosed mehepoolse viljatuse tekkimisega.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Viljatuse olemus ja ulatus

“Rõõm oma lastest ja lastelastest on üks suurimaid rõõme, mis inimesele elus osaks saab. Seepärast pole ka raske mõista, kui suureks mureks on mure kui lapsi ei saada.” Paul-Eerik Rummo, rahvastikuminister 2003-2006

Viljatuks ehk infertiilseks peetakse järglasi soovivat paari, kus vaatamata regulaarsele suguelule ei ole naine rasestunud aasta jooksul kuigi paar pole kasutatud rasestumisvastaseid vahendeid (Rowe et al. 1993). Kuni eelmise sajandi keskpaigani püsis müüt, et viljatuse põhjused saavad peituda ainult naises, lastetu mees seevastu oli aga valinud endale kaaslasel viljatu naise, kellest võis ennast lasta lahutada. Kui ka uus abielu järglasi ei andnud, arvati et meest saadab ebaõnn naiste valikul. Praeguseks on müüt kummutatud ning teada, et viljatuse naisepoolsete põhjuste osakaal on ligikaudu 39%, mehepoolsed põhjused tingivad viljatuse 20%-l juhtudest, 26%-l on põhjused mõlemapoolsed ja 15%-l juhtudest ei suudeta viljatuse põhjust kindlaks teha ehk tegemist on idiopaatilise viljatusega (WHO 1987).

Vaatamata rahvastiku arvu kiirele kasvule on lastetuse probleem kogu maailmas väga aktuaalne. Arvatakse, et sõltumatult rassist ja geograafilisest asendist puudutab lastetus umbes 15% järglasi soovivatest paaridest (Spira 1986). Tõenäoliselt tõuseb viljatute paaride hulk lähitulevikus veelgi, kuna fertiilses eas paarid lükkavad lapse saamise järjest hilisemale elueale, kus loomulik viljakus hakkab juba langema. Samuti prognoositakse mehepoolse viljatuse osakaalu suurenemist. Seda kinnitab ka viimati avaldatud IVF (*in vitro* fertilization) patsientide uuring, kus vaadeldi ravile pöördunud patsientide diagnoose möödunud 12 aasta lõikes. Selle uuringu tulemusena selgus, et mehepoolse viljatuse osakaal protseduuri läbivate paaride hulgas on aasta-aastalt suurenenud (Terävä et al. 2008).

Eestis arvatakse olevat umbes 15000-20000 viljatut paari, kelledest ainult väike osa jõuab viljakusraviga tegelevatesse kliinikutesse. Tartu Ülikooli naistekliiniku uurimisaruande põhjal esines 16,3%-l naistest, vanuses 16 kuni 44 aastat, elu jooksul viljatust (perioode, mil sooviti rasedaks jääda, kuid see ei olnud õnnestunud ühe aasta jooksul regulaarse suguelu korral). 35 - 44 aastastest naistest oli viljatust esinenud 23%-l ning ligikaudu 40% naistest olid pöördunud uuringutele või ravile viljatuse tõttu (Part et al. 2007). Eesti riik on viimastel aastatel astunud suuri samme toetamaks lastetuse ravi,

muutes sellega raviteenuse paljudele patsientidel kättesaadavamaks. 2008 aasta andmetel teostatakse lastetuse ravi neljas kliinikus— Tartu Ülikooli naistekliinikus, Elite kliinikus, Ida-Tallinna Keskhaigla naistekliinikus ning Nova Vita kliinikus. Kahjuks puudub kõiki kliinikuid hõlmav statistiline andmebaas ning andmed ravile pöördunud patsientide diagnoosidest ning mehepoolse viljatuse osakaalu suuruselt ei ole kättesaadavad. Nova Vita kliiniku patsientidel põhineva uuringu andmetel on 27%-l protseduuri läbinud paaridest viljatuse põhjused mehepoolsed (Sarapik 2005).

1.2. Mehe viljakus

Esimesed statistilised andmed Eesti meeste viljakuse näitajatest pärinevad alles 1996. aastast kui Tartu Ülikooli Kliinikumi Androloogia kabinet liitus taanlaste poolt koordineeritud noorte meeste uuringuga (Jørgensen et al. 2002; Punab et al. 2002). Eesti noorte meeste sperma kontsentratsioonid olid võrreldes teiste balti riikide (Läti, Leedu) ning põhjamaade vastavate näitajatega (Taani, Norra ja Soome) küll suurimad ($62\text{--}67 \times 10^6/\text{ml}$), kuid väärtused jäid tublisti alla Carlseni ja kaasautorite (Carlsen et al. 1992) poolt näidatud poole sajandi vanustele tulemustele. Nimelt tõdes Carlsen koos kaasautoritega (Carlsen et al. 1992) oma 1992 aastal avaldatud metaanalüüsis, et meeste viljakus on langemas. Kui 1938 aastal oli spermatoosidide hulk $113 \times 10^6/\text{ml}$, siis 1990 aastaks oli see langenud ligikaudu poole võrra ($66 \times 10^6/\text{ml}$). Järgnevad meeste viljakuse uuringud on jõudnud mõneti vastuoluliste tulemusteni, kus mõnede autorite tööd näitavad sperma kontsentratsioonide drastilist langust, teiste autorite tulemused kinnitavad sperma kontsentratsioonide stabiilsust läbi aastate (Jørgensen et al. 2006; Jørgensen et al. 2002; Vierula et al. 1996).

1.2.1. Mehe viljakust mõjutavad tegurid ja viljatuse põhjused

Mehe viljakust võivad mõjutada nii pre-testikulaarsed, testikulaarsed, kui ka post-testikulaarsed tegurid (Tabel 1). Spermatogeneesi efektiivsust vähendavad kemo- ja radioterapia, mõningad ravimid, kõrge temperatuur ning keskkonna saastatus (de-Kretser 1997). Samuti vähendavad viljakust ebaterved eluviisid (vähene kehaline koormus, suitsetamine ja alkohol) ning pidev stress.

Seni ilmunud mehe viljatuse põhjuseid käsitlevad andmed viitavad sellele, et idiopaatiline viljatus on kõige suurema osakaaluga (31-45%) viljatuse põhjus (Diemer and

Desjardins 1999; Nieslag 1997; WHO 1987). Enamikes maailma kliinikutes hinnatakse mehe viljakust ainult sperma analüüsi alusel, pööramata tähelepanu teistele mehe viljakust mõjutavatele näitajatele nagu munandi maht ja suguhormoonide tase. Seega võib oletada, et idiopaatilise viljatuse osakaal mehe viljatuse põhjustajana on ülehinnatud. Tõenäoliselt jäävad paljudel juhtumitel spermapatoloogia tegelikud põhjused välja selgitamata (Punab 2007). Siiski on toodud välja viljatutel meestel sagedamini esinevad haigused nagu varikotseele (17%), sugunäärmete infektsioonid (9%), kaasasündinud sugutrakti häired nagu hüpogonadism (9%) ja krüptorhism (9%), süsteemsed haigused (5%) ja immunoloogilised põhjused (4%) (Nieslag 1997). Geneetiliste põhjuste osakaal mehe viljatuse tekkes moodustab umbes 10-15% (Ferlin et al. 2006).

Tabel 1. Mehe viljakust mõjutavad tegurid*	
Pre-testikulaarsed tegurid	
Hüpotaalamuse haigused: Isoleeritud gonadotropiinide puudulikkus (Kallmani sündroom), Isoleeritud luteiniseeriva hormooni (LH) puudulikkus, Isoleeritud follikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) puudulikkus, Kongenitaalne hüpogonadotroopne sündroom	Hüpofüüsi haigused: Hüpofüüsi puudulikkus (kasvajad, infiltratiivsed protsessid, operatsioonid, radiatsioon), Hüperprolaktineemia Eksogeensete hormoonide (östrogeenide, androgeenide, glükokortikoidide) liigtarvitamine
Testikulaarsed tegurid	
Kromosomaalsed häired (Klinefelteri sündroom, XX häired, XYY sündroom)	Bilateraalne anorhia
Müotoonne düstroofia	Sertoli rakkude aplaasia
Gonadotoksiinid (ravimid, radiatsioon)	Traumad
Orhiit	Androgeenide sünteesi või toime häire
Süsteemsed haigused (neerupuudulikkus, maksa haigused)	Varikotseele
Krüptorhism	
Post-testikulaarsed tegurid	
Sperma transpordi häired (kaasasündinud, omandatud ja funktsionaalsed häired)	
Spermatooside liikuvuse või funktsiooni häired (spermatooside saba defektid, küpsemishäired, immunoloogilised häired, infektsioonid)	
Seksuaalne düsfunktsioon	

*<http://www.emedicine.com/med/TOPIC1167.HTM>

Eesti viljatutel meestel esinesid sagedamini varikotseele, sugutraktipõletikud (kaasa arvatud leukotsütoospermia) ning krüptorhism (Punab et al. 2003). Mitmed autorid on näidanud azoospermia ja oligozoospermia eesti viljatute meeste seas suurt geneetiliste häirete [kromosomaalsed häired, *CFTR* (tsüstilise fibroosi transmembraanse juhtivuse regulaator) geeni mutatsioonid, Y kromosoomi mikroleetsioonid] esinemissagedust (Lissitsina et al. 2006; Tamm et al. 2000). Idiopaatilise viljatuse esinemissageduse kohta Eestis andmed puuduvad.

1.2.2. Mehe viljatuse diagnoosimine

Mehe viljakuse hindamise uuringutesse kuuluvad lisaks põletiku analüüsidele ja suguorganite füüsilisele läbivaatlusele veel põhjalik anamnees, milles vaadeldakse nii ümbritsevat keskkonda, eluviise kui ka kahjulikke harjumusi (Punab 2007). Peamiste laboratoorsete uuringumeetoditena kasutatakse suguhormoonide (testosteroon, gonadotropiinid) määramist vereseerumist ning seemnevedeliku analüüsi, milles hinnatakse spermatoosoidide liikuvust, kontsentratsiooni ja morfoloogiat vastavalt WHO (World Health Organization) kriteeriumitele (Tabel 2) (WHO 1999).

Seemnerakkude kvaliteedi määramiseks kasutatavad WHO normatiivid on referentsväärtused, mida tuleks kohandada vastavalt laboratooriumile, geograafilisele asendile, keskkonna faktoritele, uuritavate etnilistele ning geneetilistele erinevustele (Haugen et al. 2006).

Tabel 2. Spermatoosoidide kvaliteedi näitajad (WHO 1999)	
Normozoospermia	Kontsentratsioon $\geq 20 \times 10^6$ /ml Liikuvus: A $\geq$ 25% ja/või A+B $\geq$ 50% Morfoloogia: normaalseid spermatooside >5%
Oligozoospermia	Kontsentratsioon $<20 \times 10^6$ /ml
Asthenozoospermia	Liikuvus: A<25% ja/või A+B<50%
Teratozoospermia	Morfoloogia: normaalseid spermatooside <5%
Azoospermia	Ejakulaadis spermatooside ei leidu
Aspermia	Ejakulaat puudub
Leukotsütoospermia	Leukotsüüte $\geq 1 \times 10^6$ /ml

Bonde ja kaasautorite (1998) poolt läbiviidud uuringust selgus, et sperma kvaliteet ja kontsentratsioon mõjutavad viljakust ning viljastamisvõime väheneb märgatavalt kui spermatooside arv seemnevedelikus on $< 40 \times 10^6$ /ml. Loomulikult rasestumiseks vajalik minimaalne spermatooside hulk on 10×10^6 /ml ning sellest allapoole on raseduse tekkimine vähetõenäoline. Kui patsiendi anamneesist on välistatud kõik muud põhjused, siis spermatooside arvu langus 5×10^6 /ml ja alla seda viitab suure tõenäosusega viljatuse tekke geneetilistele põhjustele (Bonde et al. 1998).

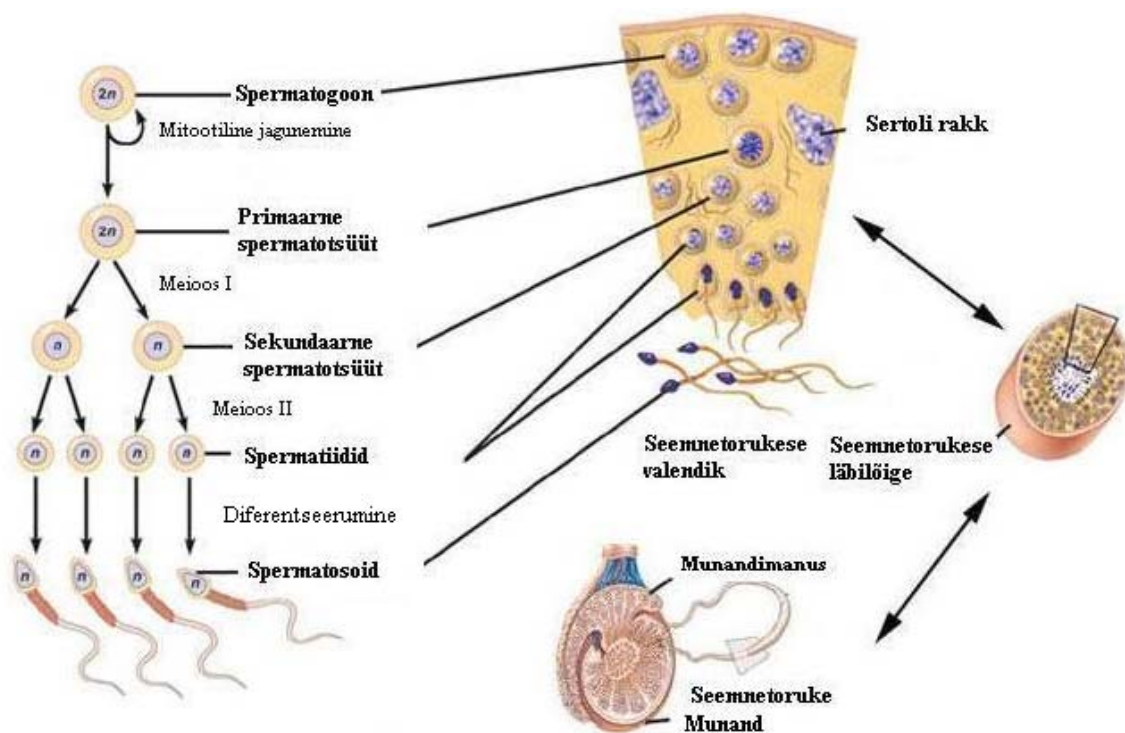
1.3. Spermatogenees ja selle hormonaalne regulatsioon

1.3.1. Spermatogenees

Spermatogenees on kompleksne protsess, milles osalevaid väänilistes seemnetorukestes asuvaid spermatogeneesi rakke kontrollitakse ning juhitakse endokriinsete ja parakriinsete mehhanismide poolt (Holstein et al. 2003). Vead ükskõik millises spermatogeneesi etapis või sellega seotud süsteemis võivad viia spermatooside hulga vähenemiseni ja funktsionaalse võimekuse langemiseni ning seeläbi mõjutada mehe viljakust.

Spermatogenees toimub testistes paiknevate vääniliste seemnetorukeste seintes ning selles võib eristada kolme etappi: spermatogoonide jagunemine mitoosi abil, meiotiline jagunemine, mille käigus tekivad diploidsetest rakkudest haploidsed rakud ning rakkude diferentseerumine, mille käigus tekivad spermatiididest spermatoosid (Joonis 1).

Seemnetorukeste seintes, vahetult basaalmembraanil, asetsevad primitiivsed diferentseerumata tüvirakud— spermatogoonid. Organismi suguküpsuse saabudes lõpetavad osa spermatogoone (*ca* 3 milj. iga päev) mitootilise jagunemise, lähevad meioosi, suurenevad ja muutuvad primaarseteks spermatotsüütideks (sisaldavad kaks korda rohkem DNA-d kui diploidsed somaatilised rakud). Iga primaarne spermatotsüüt läbib meioosi esimese poole ja muutub kaheks sekundaarseks spermatotsüüdiks (sisaldavad kahte kromosoomistiku koopiat). Järgneb meioosi teine pool, kus iga sekundaarne spermatotsüüt annab aluse kahele spermatiidile, mis sisaldavad ainult ühte kromosoomistiku koopiat. Seega tekib igast primaarsest spermatotsüüdist neli spermatidi, mis läbivad keerulise arenemisprotsessi, spermiogeneesi ning saavad küpseteks, liikumis- ja adheesumisvõimelisteks spermideks (Bergmann 2005).



Joonis 1. Skemaatiline ülevaade spermatogeneesist.

<http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/devel/c7.46.12.spermatogenesis.jpg>

Spermatogeneesil degradeeritakse või hävitatakse apoptoosi teel ligikaudu 75% arenevatest seemnerakkudest, vaid 25% kogu toodetud spermatoosididest jõuab ejakulaati ja neist ligi pooled on arenguhäiretega. Seega on viljastamisvõimelised (reproduktiivne potentsiaal) vaid 12 %-l sugurakkudest (Holstein et al. 2003).

Lisaks arenevatele seemnerakkudele asuvad seemnetorukeste seintes tiheliidustega ühendatud, basaalmembraanile toetuvad Sertoli rakud, mis loovad sugurakkude arenguks vajaliku hemato-testikulaarse barjääri ning varustavad arenevaid spermatooside kasvuks vajalike ainetega (Mruk and Cheng 2004; Skinner 2005).

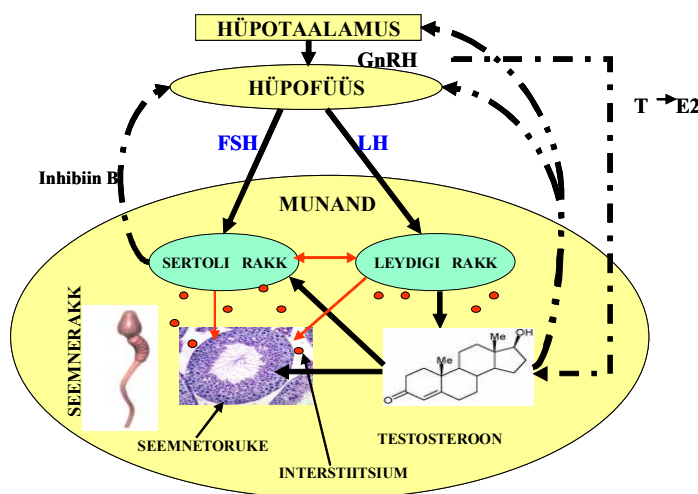
Vääniliste seemnetorukeste vahel, tavaliselt kapillaaride läheduses, asetsevad androgeene, kasvufaktoreid ning neuroendokriinseid ühendeid sekreteerivad Leydigi rakud (Haider 2004; Mendis-Handagama 1997; Walker and Cheng 2005).

Valmis spermatoosidid vabanevad vääniliste seemnetorukeste seinast ja liiguvad mööda valendikku munandimanusesse, kus toimub nende kogunemine, küpsemine ja säilitamine. Spermatogeneesi ühekordne tsükkel toimub täiskasvanud meesterahval ca 65-75 päevaga.

1.3.2. Spermatogeneesi hormonaalne regulatsioon

Seemnerakkude arenemist reguleerib mitmeastmeline hormonaalne kaskaad, kus endokriinsüsteemi rakkudes toodetud peptiid- või steroidhormoonid mõjutavad erinevaid spermatogeneesis osalevaid rakke. Nii on väänilistes seemnetorukestes paiknevad Leydigi rakud (Mendis-Handagama 1997), väänilisi seemnetoruke si ümbritsevad ja toetavad müeloid rakud (Maekawa et al. 1996) ja Sertoli rakud (Griswold 1998) otseseks sihtmärgiks ühele või mitmele erinevale hormoonile (Holdcraft and Braun 2004). Lisaks endokriinsele stimulatsioonile reguleeritakse spermatosoidide arengut, küpsemist ja vabanemist ka parakriinsete regulatsiooni mehhanismide poolt, kus spermatogeneesi rakkude poolt toodetavad bioloogiliselt aktiivsed ühendid mõjutavad nii enda kui naaberrakkude talitlust.

Spermatogeneesi käivitab gonadotropiini vabastajahormooni (GnRH) pulsatiivne sekretsioon, mis stimuleerib ajuripatsi eessagara gonadotropiinide, FSH ja LH sekretsiooni (Holstein et al. 2003) (Joonis 2).



Joonis 2. Spermatogeneesi regulatsioon. GnRH sekretsioon kutsus esile FSH ja LH vabanemise hüpofüüsist. LH stimuleerib testosterooni sünteesi ja sekretsiooni Leydigi rakkudest. Sekreteeritud testosteroon mõjutab spermatosoidide arengut mõjudes nii Sertoli rakkudele kui ka arenevatele spermidele (testosterooni toimed on skeemil toodud pideva joonega). Testosteroon reguleerib enda sünteesi läbi negatiivse tagasiside nii hüpofüüsi kui hüpotaalamuse tasemel (toodud joonisel katkendliku joonega). Testosterooni sekretsiooni pärssivad samuti Sertoli rakkudes toodetud inhibiin B ja kesknärvisüsteemis testosterooni aromatiseerumisel tekkinud östradiol (E2). Nii Leydigi rakud kui Sertoli rakud toodavad spermatogeneesi toimumiseks vajalikke bioaktiivseid ühendeid. Spermatogeneesi parakriinne regulatsioon on joonisel tähistatud punaste nooltega.

Vastusena LH taseme tõusule suureneb androgeenide süntees ja sekretsioon Leydigi rakkudes. FSH mõjutab spermatogeneesi kaudselt, toimides üle FSH retseptorit omavate

Sertoli rakkude, seemnerakkudel endal FSH retseptorid puuduvad (Walker and Cheng 2005). Testosteroon reguleerib oma produktsiooni negatiivse tagasiside abil, vähendades nii GnRH eritumist hüpotaalamusest kui ka LH ja FSH sekretsiooni hüpofüüsis. Testosterooni produktsiooni inhibeeritakse ka kesknärvisüsteemis testosterooni aromatiseerimisel saadud östradiooli abil (Hayes et al. 2001). Lisaks testosteroonile ja östradioolile on ka Sertoli rakkude poolt toodetaval inhibiin B-l FSH eritumist pidurdav toime (Skinner 2005).

Hüpofüüsis sekreteeritud LH sihtmärgiks munandites on ligikaudu 500 miljonit androgeene produtseerivat Leydigi rakku (Neaves et al. 1984), mis lisaks androgeenidele sekreteerivad neuroendokriinseid ühendeid, raku adhesiooni molekule ning kasvufaktoreid, millega mõjutatakse kõrvalasuva Leydigi rakke, veresooni, seemnetorukeste *lamina propria* ja Sertoli rakke (Davidoff et al. 1993; Holstein et al. 2003). Leydigi rakkude poolt sekreteeritud ühendid reguleerivad munandi verevarustust, kontrollivad toitainete ja hormoonide sisaldust ning kutsuvad esile müofibroblastide kontraktiilsuse tõusu, mis tagab spermatooside edasiliikumise seemnetorukeses (Holstein et al. 2003)

FSH stimulatsioon kutsub esile Sertoli rakkudes erinevate valkude ja hormoonide sünteesi ning sekretsiooni. Nii varustatakse arenevaid spermatooside nende metabolismiks vajalike ühenditega nagu laktaat, transferriin, androgeen-seoseline valk, kasvufaktorite (TGF- α ja TGF- β), insuliini sarnane kasvufaktori-I (IGF-I), fibroblastide kasvufaktori (FGF), epidermaalse kasvufaktori (EGF) ning spermatogeneesis oluliste hormoonidega (inhibiin B, östrogeen) (Meachem et al. 2005). Sertoli rakkude poolt sekreteeritud östrogeene vajatakse spermatogeneesi korrektseks toimimiseks (Rochira et al. 2005). Kuna östrogeenide retseptoreid (ER α ja ER β) on leitud spermatooside mitokondrite membraanidest, siis tõenäoliselt vajatakse östrogeene spermatooside liikuvuse tagamiseks (Solakidi et al. 2005).

1.4. Mehe viljatuse geneetilised põhjused

Mehe geneetilist viljatust, mis väljendub tõsise oligo- või azoospermiana, võivad põhjustada nii autosoomsete kui ka sugukromosoomide arvu, struktuuri ning ümberpaiknemise anomaaliad. Samuti võivad spermatogeneesi häired olla tingitud arengu, diferentseerumise ning endokriinsüsteemi, meioosi, spermatogeneesi ning spermatooside funktsioone mõjutavate geenide mutatsioonidest või polümorfismidest (Joonis 3)(Carrell et al. 2006).

1.4.1. Mehe viljatusega seotud kromosoomanomaaliad

Kromosoomanomaaliaid leitakse ligikaudu 5%-l viljatutest meestest. Suurem osa viljatust põhjustavatest anomaaliatest (3,7%) hõlmab sugukromosoome ja vaid väike osa (1,3%) autosoomseid kromosoome. Siiski on selliste häirete esinemissagedus üldpopulatsioonis väike, esinedes vaid 0,2-0,6%-l indiviididest (Ferlin et al. 2006).

Kõige levinum sugukromosoomide arvuga seotud häire mehepoolse viljatuse põhjustajana on Klinefelteri sündroom (47XXY), esinedes 1:700-1000 vastsündinud poisslapse kohta. Klinefelteri sündroomiga meestel on Leydigi rakkude puuduliku funktsiooni tagajärjel langenud testosterooni tase organismis, mis tingib sekundaarsete sugutunnuste arenguhäire (primaarne hüpogonadism), günekomastia ning sageli viljatuse (Hargreave 2000). Enamus seda sündroomi kandvatest meestest on azoospermsed (Ferlin et al. 2006), kuid mosaiiksetel meestel (47,XXY/46,XY), kes toodavad spermatooside erineval hulgal on järglaste saamine võimalik (Seshagiri 2001).

Sugukromosoomide struktuuri muutustest on levinumad Y kromosoomi mikrodeletsioonid. Y kromosoomi pikas õlas esineb kolm spermatogeneesi geenide piirkonda— AZFa, AZFb ja AZFc. AZFa deletsiooni korral puuduvad spermatogeneesi rakud täielikult, AZFb deletsiooni korral tekib spermatogeneesi meiotiline arrest ning AZFc deletsiooni korral produtseeritakse üksikuid küpseid spermatooside. Samuti võivad esineda osalised deletsioonid nii AZFa (Foresta et al. 2000), AZFb kui AZFc piirkonnas, millede tagajärjel tekib oligozoospermia (Foresta et al. 1999).

Viljatuse tekkimisega on seotud ka autosoomsete kromosoomide struktuuri ja ümberpaiknemise anomaaliad, nagu Robertsoni translokatsioonid ja retsiprooksed translokatsioonid. Robertsoni translokatsioonid tekivad kahe akrotsentrilise kromosoomi kokku põimumisel. Selle tagajärjel tekib üks ebanormaalne ditsentriline kromosoom. Kõige sagedasemad kombinatsioonid on 13-nda ja 14-nda ning 14-nda ja 21-e kromosoomi vahel. Sellist translokatsiooni kandvatel meestel esinevad erineva raskusastmega spermatogeneesi häired (Ferlin et al. 2006). Retciprookseid translokatsioone, kus kaks autosoomset kromosoomi vahetavad omavahel osad, kandvate meeste spermas esineb rohkesti defektseid spermatooside, mis võib vähendada normaalset viljakust (Carrell et al. 2006).

Lissitsina ja kaasautorite (2006) poolt läbiviidud infertiilsete Eesti meeste tsütogeneetiline uuring näitas, et kõikide kromosomaalsete häirete esinemissagedus viljatute meeste grupis oli 47,8%, mis on oluliselt suurem (12,6–28,3%) kirjanduses toodust. Viljatutel meestel esinesid autosoomsete kromosoomide struktuurianomaaliad

sagedamini kui sugukromosoomide arvuanomaaliad (vastavalt 7,8% ja 5,6%). Samuti esines 12%-l azoospermiaga meestest sugukromosoomide arvuanomaaliaid (47XXY) ning 10%-l oligozoospermiaga meestest autosoomsete kromosoomide struktuurianomaaliaid (Lissitsina et al. 2006).

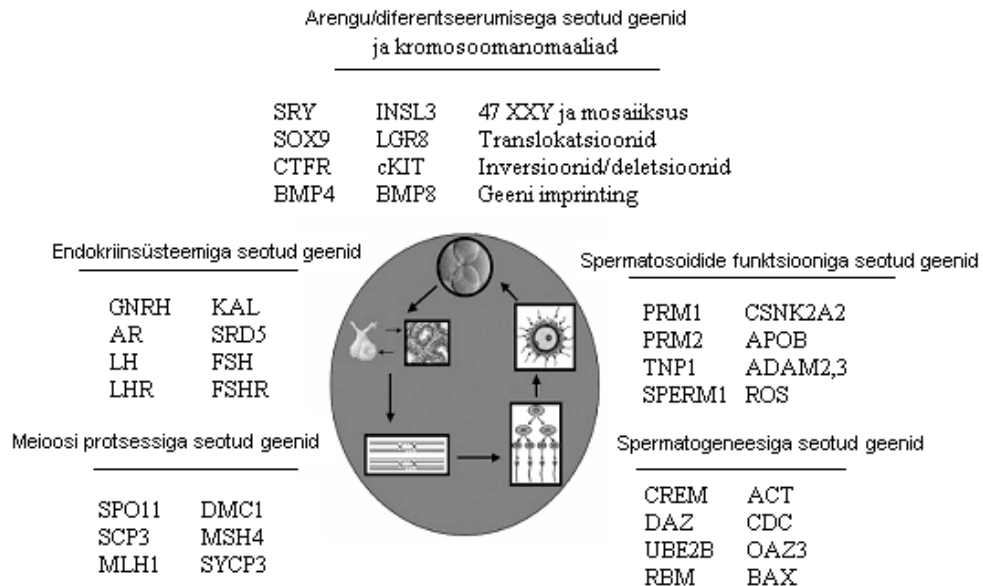
1.4.2. Mehe viljatusega seotud geenimutatsioonid

Siiani teadaolevalt on spermatogeneesi protsessiga seotud ligikaudu 2000 erinevat geeni (Carrell et al. 2005), milledest vaid 30 paiknevad Y kromosoomis. Valdav enamus spermatogeneesi mõjutavatest geenidest paikneb autosoomsetes kromosoomides ning on lisaks spermatogeneesi protsessile seotud kogu organismi elutegevuse regulatsiooniga (Hargreave 2000) (Joonis 3).

Viljatusega seotud geenimutatsioonidest on sagedasemad *CFTR* geeni mutatsioonid. *CFTR* mutatsiooni kandvatel meestel esineb kaasasündinud *vas deferens*'i (viimajuha) obstruktsioon. Sellise geenimutatsiooniga meestel toimub spermatogenees normaalselt, kuid viimajuha obstruktsiooni tõttu puuduvad seemnevedelikus spermatoosoidid (Claustres et al. 2000).

Mutatsioonid ja polümorfismid spermato- ja spermiogeneesiga seotud geenides võivad viia azoospermia või tõsise oligozoospermia tekkimiseni ning vähendada seemneraku funktsionaalset võimekust (seemneraku penetratsiooni häired, akrosoomi reaktsiooni puudulikkus, häiritud pronukleaarne reaktsioon) (Carrell et al. 2006; Feng 2003).

Samuti võivad spermatogeneesi efektiivsust mõjutada ka meioosi ja rekombinatsiooniga seotud geenide mutatsioonid (Seshagiri 2001; Venables and Cooke 2000) ning mutatsioonid endokriinsüsteemi geenides, mis võivad viia soo diferentseerumise häireteni ja põhjustada tõsise spermapatoloogia tekkimist (Dierich et al. 1998; Holdcraft and Braun 2004; Lei et al. 2001; Singh et al. 1995). Ühenukleotiidilised polümorfismid endokriinsüsteemi geenides võivad põhjustada vaevumärgatavaid muutusi kas retseptori afiinsuses või hormoonide bioaktiivsuses, mille tulemusena rikutakse spermatogeneesiks oluline, äärmiselt täpselt reguleeritud hormoonide toime kaskaad (Carrell et al. 2005). Mitmete geenide mutatsioonid kutsuvad esile mehe sugutrakti normaalse arengu kõrvalekaldeid ning mõjutavad primordiaalse sugurakkude migratsiooni ja proliferatsiooni (Bogatcheva and AgoulNIK 2005; Carrell et al. 2006).



Joonis3. Ülevaade mehe viljatusega seotud geenidest (Carrell et al. 2006). **Arengu ja diferentseerumisega seotud geenid:** *SRY* (sex determining region Y), *SOX9* (sex determining region Y-box 9), *INSL3* (insulin-like factor 3), *LGR8* (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8), *c-KIT* (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog), *BMP8* (bone morphogenetic protein 8). **Meioosi protsessiga seotud geenid:** *SPO11* (meiotic protein covalently bound to DSB homolog), *DMC1* (dosage suppressor of mck1 homolog), *SCP3* (synaptonemal complex protein 3), *MSH4* (muts-like protein 4), *MLH1* (mutL homolog 1), *SYCP3* (synaptonemal complex protein 3) **Spermatogeneesi seotud geenid:** *CREM* (cAMP responsive element modulator), *DAZ* (deleted in azoospermia), *ACT* (actin-like protein), *CDC* (cell division cycle related), *UBE2B* (ubiquitin-conjugating enzyme E2B, RAD6 homolog), *RBM* (similar to RNA binding motif protein, Y chromosome, family 2 member B), *OAZ3* (ornithine decarboxylase antizyme 3), *BAX* (BCL2-associated X protein). **Spermatosoidide funktsiooniga seotud geenid:** *PRM1* (protamine 1), *PRM2* (protamine 2) *TNP1* (transition protein 1, during histone to protamine replacement), *CSNK2A2* (casein kinase 2, alpha prime polypeptide), *APOB* (apolipoprotein B), *ADAM 2,3* (metallopeptidase domain 2), *ROS* (v-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1). **Endokriinsüsteemiga seotud geenid:** *GNRH* (gonadotropin-releasing hormone), *KAL* (Kallmann syndrome 1 sequence), *LH* (luteinizing hormone beta polypeptide), *LHR* (luteinizing hormone receptor), *FSH* (follicle stimulating hormone), *FSHR* (follicle stimulating hormone receptor), *SRD5* (steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide), *AR* (androgen receptor).

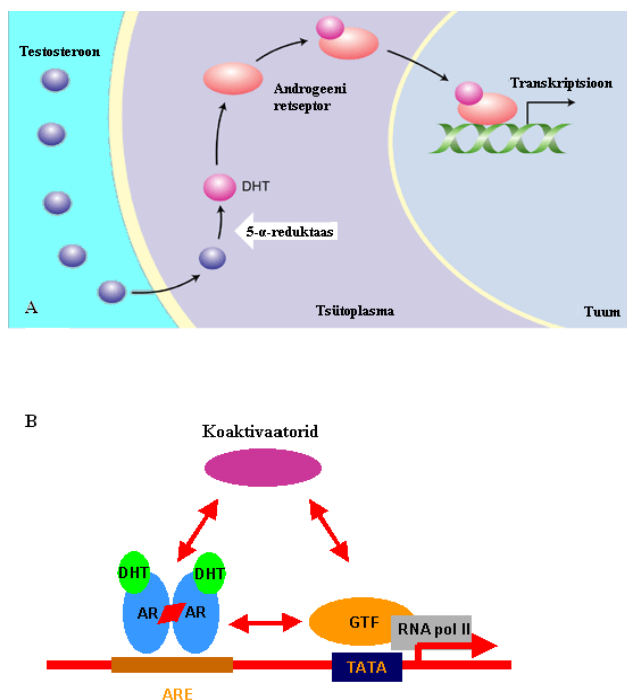
Teadlaste suur huvi mehe reproduktiivsüsteemiga seotud geenide ja geenimutatsioonide vastu lisab spermatogeneesi seotud geenide nimekirja pidevalt uusi potentsiaalseid kandidaatgeene. Kahjuks ei ole siiani leitud spermatogeneesi mõjutavad geenid aidanud lahendada idiopaatilise viljatuse võimalikke tekkepõhjuseid. Võimalik, et idiopaatilist viljatust põhjustav geen või polümorfism on seni veel leidmata, kuid suure tõenäosusega ei ole idiopaatilise azoo- ja oligozoospermia tekkimine seotud vaid ühe kindla geeni mutatsiooni või polümorfismiga, vaid mitmete vastastikku seotud erinevate geenide talitluse häirega, mis kutsuvad esile muutusi spermatogeneesi rajas. Ja kuigi kromosoomanomaaliad ja geenide mutatsioonid on peamised mehe geneetilise viljatuse põhjustajad, on mehe viljatuse tekkes oluline roll ka DNA integreerumise, kromatiini

pakkimise ja epigeneetiliste modifikatsioonide häiretel ning üheaheelaliste DNA katkete esinemisel (Carrell et al. 2006).

1.5. Androgeenide toimed

Androgeenid on mehe fenotüüpi määravad ja säilitavad meessuguhormoonid (George and Wilson 1994). Olulisemaks androgeeniks on Leydigi rakkudes produtseeritud testosteroon, mille toimeefektid võib jagada kolmeks— reproduktiivfunktsioone (mehe suguelundite diferentseerumine, sekundaarsete sugutunnuste avaldumine, spermatogenees) mõjutavad toimed, anaboolseid efekte (lihasmassi ning tugevuse suurenemine, luude kasv ning tiheduse suurenemine, hääle jämenemine, naha paksenemine) vahendavad toimed ning psüühikale (libiido, potents, seksuaalkäitumine) mõjuvad toimed (Rajender et al. 2007).

Ligikaudu 4 % tsirkuleerivast testosteroonist muudetakse sihtmärkkoes bioloogiliselt aktiivsemaks metaboliidiks, dihidrotestosterooniks (Santner et al. 1998). Testosterooni ja DHT bioloogilised toimed sihtmärkkudedes väljenduvadki kas otseselt, seondudes androgeeni retseptorile või kaudselt läbi testosterooni aromatiseerumise östradiooliks (Hayes et al. 2001). Androgeenide interaktsiooni AR-ga ning retseptori aktivatsiooni sihtmärk rakus kirjeldab joonis 4.

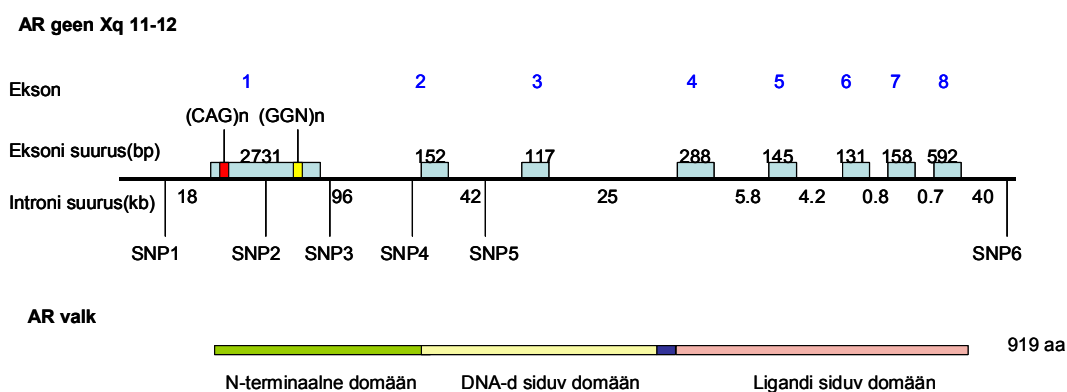


Joonis 4. Androgeeni retseptori aktivatsioon. (A) Leydigi rakkudes sekreteeritud testosteroon difundeerub läbi rakumembraani plasmasse ning kantakse kas albumiiniga või suguhormooni siduva globuliiniga (SHBG sex hormone binding globulin) seotult AR omavatesse sihtmärkorganitesse (osades AR sihtmärkrakkudes konverteerib 5- α reduktas testosterooni 5- α dihidrotestosterooniks (DHT)). Testosteroon või DHT seonduvad androgeeni retseptori C-terminaalse hormooni siduvale domäänile, mis kutsub esile retseptori konformatsioonilise muutuse ning dimerisatsiooni. (B) Retseptor-hormoon kompleks liigub tuuma ning seondub androgeeni vastus elemendile (ARE-androgen responsive element), kus koos koaktivaatorite ja globaalsete transkriptsiooni faktoritega (GTF) põhjustab androgeensõltuvate geenide transkriptsiooni (Lindzey et al. 1994).

On teada, et androgeenid mõjutavad spermatogeneesi läbi reproduktiivkudedes ja rakkudes paiknevate androgeeni retseptorite (Solakidi et al. 2005), kuid millises koes või rakus paikneb androgeenide peamine sihtmärk, pole veel üheselt selge (McLachlan et al. 2002). Munandis on AR retseptoreid leitud nii Leydigi rakkudes (Suarez-Quian et al. 1999), Sertoli rakkudes (Sanborn et al. 1977) kui ka peritubulaarsetes müeloid rakkudes (Bremner et al. 1994). Kuni viimase ajani arvati, et androgeenide toimet arenevatele seemnerakkudele vahendavad Sertoli rakud ning seemnerakkudel endal androgeeni retseptorid puuduvad (Lyon et al. 1975; Walker and Cheng 2005). Hiljutised uuringud on tõestanud AR olemasolu spermatoosoidide kaelaosas asuvates mitokondrites (Solakidi et al. 2005) ning spermatoosoidide pea piirkonnas (Aquila et al. 2007). Seemnerakkude kaelaosas paiknevad mitokondrid sünteesivad liikumiseks vajalikku ATP-d ning mitokondrites leitud AR viitavad võimalusele, et androgeenid võivad muuta mitokondriaalsete geenide ekspressiooni, mille tagajärjel tekivad muutused spermatoosoidide liikuvuses (Solakidi et al. 2005).

1.6. Androgeeni retseptori geen

X kromosoomi pikas õlas (Xq11-12) paiknev *AR* geen koosneb kaheksast eksonist, mis kodeerivad nelja funktsionaalset domääni. AR koosneb polümorfsest N-terminaalsest transaktivatsiooni domäänist (kodeeritud 1. eksoni poolt), konserveerunud DNA-d siduvast domäänist (kodeeritud 2. ja 3. eksoni poolt) ning C-terminaalsest ligandi siduvast domäänist (kodeeritud 4.-8. eksoni poolt) (Lubahn et al. 1989; Lubahn et al. 1988) (Joonis 5).



Joonis 5. *AR* geeni skemaatiline joonis. Joonisel on näidatud eksonite ja intronite paiknemine, nende suurused ja kuue haplotüüpi kirjeldava SNP ning AR valgu funktsionaalsete domäänide paiknemine.

AR mutatsioonide andmebaasis (<http://www.mcgill.ca/androgendb/>) on kirjeldatud 605 erinevat mutatsiooni (Gottlieb et al. 2004). *AR* geeni mutatsioonid võivad põhjustada täielikku või osalist androgeeni resistentsuse sündroomi (vastavalt, complete androgen insensitivity syndrome-CAIS ja partial androgen insensitivity syndrome-PAIS) (Quigley et al. 1995). *AR* täieliku resistentsuse sündroomi nimetatakse ka testikulaarse feminisatsiooni sündroomiks, kus sündinud poisilapsel puuduvad meesterahvale iseloomulikud sugutunnused (46 XY naise fenotüübiga). Ainult mehe viljatusega on seostatud vaid üksikuid *AR* geeni mutatsioone (Rajender et al. 2007).

1.6.1. Androgeeni retseptori geeni polümorfismid

AR geenile lisavad varieeruvust veel 212 erinevat SNP-d (<http://snpper.chip.org>), milledest 6 kirjeldavad enamlevinud haplotüüpe (haplotype-tagging SNPs- htSNP-s) (Terry et al. 2005).

AR haplotüüpide mõju erinevate haiguste, nagu munasarjavähi (Terry et al. 2005), eesnäärmevähi (Freedman et al. 2005a) ja endomeetriumi vähi (McGrath et al. 2006) tekkele on küll uuritud, kuid positiivseid assotsiatsioone pole siiani leitud. Mehe viljatuse tekkeriski ja *AR* haplotüüpide seose kohta puuduvad varasemad uuringud.

AR geeni esimeses eksonis paiknevad kaks polümorfset trinukleotiidsset mikrosatelliitset kordust (CAG ja GGN) (Joonis 5). CAG järjestused kodeerivad polüglutamiinrakti, mille pikkus varieerub 8-31 järjestuseni (Edwards et al. 1992). CAG korduste arvu tõus üle 45 järjestuse põhjustab X-liitelist spinaal- ja bulbaarsete lihaste atroofiat (Kennedy haigus), kus patsientidel esineb lisaks progressiivsele lihaste nõrkusele ning atroofiale ka androgeenide osaline tundetus. Kennedy haigusega kaasnevad ka mitmed erinevaid endokriinsed häired, hüpogonadism, halvenenud sperma kvaliteet ja infertiilsus (La-Spada et al. 1991). See on andnud aluse hüpoteesile, et CAG korduste arvu muutused võivad põhjustada *AR* geeni funktsiooni häirumist ning mõjutada seeläbi mehe viljakust. Seda teooriat toetas ka 1994 aastal avaldatud Chamberlaini ja kaasautorite poolt läbiviidud *in vitro* uuring, kus näidati, et pikemad CAG järjestused põhjustavad *AR* vähenenud transkriptsioonilist aktiivsust (Chamberlain et al. 1994).

Arvukad tööd, kus on otsitud seost CAG korduste arvu varieeruvuse ja viljatuse vahel, on andnud vastukäivaid tulemusi. Mitmed töögrupid on leidnud seose suurenenud CAG korduste ja halvenenud sperma parameetrite vahel (Casella et al. 2003; Dowsing et al. 1999; Mengual et al. 2003; Tut et al. 1997; Wallerand et al. 2001), teiste autorite tööd

tõestavad, et seost CAG järjestuste arvu ja viljatuse vahel ei eksisteeri (Canale et al. 2005; Dadze et al. 2000; Ferlin et al. 2004; Komori et al. 1999; Lund et al. 2003; Thangaraj et al. 2002). Viimati avaldatud metaanalüüsis (hõlmas 33 avaldatud publikatsiooni) leiti, et CAG korduste arvu suurenemine on seotud riskiga mehe viljatuse tekkeks (Davis-Dao et al. 2007).

CAG kordusjärjestuste analüüsi raskendab korduste arvu varieeruvuse esinemine erinevate etniliste gruppide vahel (Esteban et al. 2006; Kittles et al. 2001; Sasaki et al. 2003b). Lühimad CAG alleelid on afro-ameeriklastel (keskmiselt 19-20 järjestust), keskmised kaukasoididel ja asiaatidel (keskmiselt 21-22 järjestust) ning pikimad mehhiko-ameeriklastel (keskmiselt 25 järjestust) (Edwards et al. 1992; Irvine et al. 1994; Mruk and Cheng 2004).

Polüglütsiini kodeerivate GGN trinukleotiidsete korduste arv (10-30 kordust) varieerub vähem, koosnedes peamiselt 22-24 kordusest (Lundin et al. 2003). *In vitro* katsed on näidanud, et GGN trakti pikkus võib olla oluline AR transaktivatsioonis (Gao et al. 1996). Mitmed autorid on leidnud, et AR valgu optimaalseks konformatsiooniks ja aktiivsuseks on vajalikud 23 GGN kordusjärjestust, korduste arvu muutused optimumist vähendavad AR aktiivsust (Lundin et al. 2007; Lundin et al. 2006a; Platz et al. 1998). Viimased uuringud väidavad, et GGN trakti pikkus võib mõjutada AR valgu translatsiooni efektiivsust (Brockschmidt et al. 2007).

Varasemad tööd ei ole leidnud seoseid GGN korduste arvu muutuste ja mehe viljatuse tekkeriski vahel (Ferlin et al. 2004; Lundin et al. 2003; Rajender et al. 2006; Ruhayel et al. 2004; Tut et al. 1997).

1.7. 5 α -reduktaas ja DHT roll spermatogeneesis

Testosteroon muudetakse sihtmärkkudedes ensüümi 5 α -reduktaas (SRD5A) abil bioloogiliselt aktiivseks DHT-ks (Joonis 6). Kuigi DHT-ks muudetakse ainult väike osa (ligikaudu 4%) kogu tsirkuleerivast testosteroonist (Santner et al. 1998) tõestavad *in vitro* uuringud, et võrreldes testosterooniga on DHT-l mitmeid kordi suurem sidumisafiinsus (Kumar et al. 1999), samuti kutsub DHT esile AR-i efektiivsema transaktivatsiooni (Zhou et al. 1995).

Ensüüm SRD5A esineb kahe isovormina (SRD5A1 ja SRD5A2), mis erinevad üksteisest nii kineetiliste omaduste kui ka koospetsiifilise ekspressiooni mustri poolest. SRD5A1 ekspresseeritakse sünni järgselt maksas, nahas (v.a genitaalpiirkond) ning

SRD5A2 ekspresseritakse kogu eluea jooksul aktiivselt eesnäärmes, Wolfi juhades ja genitaalpiirkonna nahas (Thigpen et al. 1993).



Joonis 6. 5 α -reduktaas redutseerib testosterooni 4,5 kaksiksideme, mille tagajärjel tekib DHT

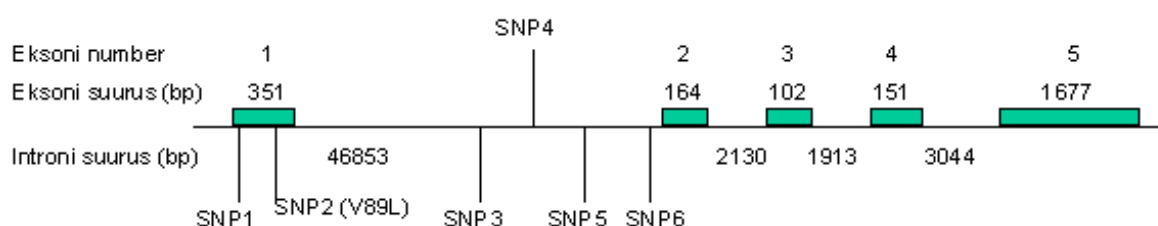
Inimesel on DHT seoseid spermatogeneesi ning fertiilsusega uuritud kasutades SRD5A2 inhibiitoreid finasteriidi (inhibeerib ainult SRD5A2) ja dutasteriidi (inhibeerib nii SRD5A1 kui ka SRD5A2). Katsed on näidanud, et ravimite kestev manustamine kutsub tervetel meestel esile DHT taseme languse seerumis, kuid muutused sperma mahus, liikuvuses ja kontsentratsioonis on vähesed (Amory et al. 2007). Jarow ja Zirkin (2005) näitasid, et kuigi intratestikulaarse testosterooni kontsentratsioon on pea 100 korda suurem kui seerumis, moodustab DHT sellest ainult 2% ja vaatamata DHT suuremale seondumisafiinsusele AR-le ei tohiks see mõjutada tekkivate spermatoosoidide hulka (Jarow and Zirkin 2005). Nii Amory koos kaasautoritega (2007) kui ka Matthiesson koos kaasautoritega (2005) on väitnud, et spermatogeneesi normaalseks toimumiseks vajatakse primaarse androgeeninina testosterooni ning DHT roll spermatogeneesi protsessis võib olla teisejärguline (Amory et al. 2007; Matthiesson et al. 2005). Neid väiteid näib kinnitavat ka fakt, et osadel kaasasündinud SRD5A2 puudulikkusega patsientidel võib olla normaalne sperma kontsentratsioon ja maht (Nordenskjöld and Ivarsson 1998).

Mitmete autorite arvates võib aga DHT reguleerida spermatogeneesi protsessi munandi väliselt, mõjutades seemnepõiekest ja eesnäärme funktsiooni ning arengut (Cai et al. 1994) või munandimanuses spermatoosoidide küpsemist (Henderson and Robaire 2005). Henderson ja Robaire näitasid oma uuringus, et SRD5A inhibiitori PNU157706 kasutamine rotil mõjutas munandimanuse sisese mikrokeskkonna stabiilsuse eest vastutavate geenide ekspressiooni (Henderson and Robaire 2005). Muutused munandimanuse sisese mikrokeskkonnas võivad viia omakorda spermatoosoidide liikuvuse häireteni. Mõningaid muutusi spermatoosoidide liikuvuses täheldasid ka Amory koos kaasautoritega, mida põhjendasid just DHT võimaliku mõjuga munandimanusele (Amory et al. 2007).

Senised teadmised DHT rollist spermatogeneesi protsessis on siiski puudulikud ning vajatakse kindlasti täiendavaid uuringuid (Jarow and Zirkin 2005).

1.8. 5 α -reduktaasi tüüp 2 geen

Ensüümi SRD5A isovormid toodetakse kahe eraldiseisva geeni poolt (Jenkins et al. 1992). *SRD5A1* geen lokaliseerub viiendas kromosoomis (5p15) ning *SRD5A2* geen paikneb teise kromosoomi lühikeses õlas (2p23). *SRD5A2* koosneb viiest eksonist (Joonis 7), millelt transleeritakse 254 aminohappe pikkust valku.



Joonis 7. *SRD5A2* geen. Joonisel on näidatud eksonite ja intronite paiknemine, nende suurused ja kuue tagSNP asukohad

SRD5A2 geenis on kirjeldatud 45 erinevat mutatsiooni, millest 37 on mitteinonüümsed ehk aminohappe muutust põhjustavad mutatsioonid, üks mutatsioon on seotud splaissinguga ja üks mutatsioon asub geeni reguleerivas piirkonnas. Samuti on kirjeldatud ka neli väikest deletsiooni (Human Gene Mutation Database 2007, <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). *SRD5A2* geeni mutatsioonid on harvaesinevad. Kaasasündinud *SRD5A2* puudulikkus põhjustab enamuse 46 XY meestel ebapiisava DHT toime tagajärjel pseudohermafrodismi, kus vastsündinud poistel võivad esineda naisel iseloomulikud välisgenitaalid, bilateraalsed munandid ja normaalselt maskuliseerunud Wolffi juhad, mis lõpevad tupega (Wilson et al. 1993). Kliiniline pilt on siiski väga heterogeenne, varieerudes normaalsest naisel fenotüübist kuni hüpospaadia ja mikropeenise meesteni.

1.8.1. 5 α -reduktaasi tüüp 2 geeni polümorfismid

SRD5A2 geenis paiknevad 174 SNP-d (<http://snpper.chip.org>). Kõige paremini on kirjeldatud neist kolm: valiin-leutsiin muutus 89. koodonis (V89L),alaniini transversioon treoniiniks 49. koodonis (A49T) ning arginiin-glutamiin muutus 227. koodonis (R227Q).

V89L (rs523349) polümorfismi esinemist on uuritud seoses erinevate haigusseisunditega. Nii *in vivo* (Allen et al. 2003; Hsing et al. 2001) kui *in vitro* (Makridakis et al. 2000) uuringud on näidanud, et leutsiini esinemine vähendab SRD5A2 aktiivsust 10-40%. SRD5A2 kineetilised uuringud on näidatud, et 89. positsioon asub ensüümi substraadiga seondumise piirkonna vahetus läheduses ja aminohappe muutus selles positsioonis võibki olla üheks ensüümi aktiivsuse vähenemise võimalikuks põhjuseks (Makridakis et al. 2000).

Kuna eesnäärmevähk on androgeensõltuv kasvaja, siis on arvatud, et L- alleeli esinemine võiks vähendada vähki haigestumise riski, kuid populatsioonide põhised geneetilised uuringud on andnud vastuolulisi andmeid (Giwerzman et al. 2005; Gsur et al. 2004; Hayes et al. 2007). Samuti on näidatud, et L- alleeli esinemine PCOS-i (polütsüstiliste munasarjade sündroom) patsientidel omab protektiivset efekti sündroomi tekkimisele (Goodarzi et al. 2006). Samas hüpospaadiate geneetilised uuringud näitavad, et just madala aktiivsusega L- alleeli esinemine on seotud suurema riskiga hüpospaadia tekkimiseks (Thai et al. 2005). V- alleeli esinemissagedus kaukasoides populatsioonis on ligikaudu 67% ning arvatakse, et V- alleeli esinemine võib soodustada haigestumist levinud haigustesse nagu PCOS (Goodarzi et al. 2006) ja eesnäärmevähk (Nam et al. 2001). Samuti täheldati V- alleeli esinemissageduse tõusu epiteliaalse munasarjavähiga patsientidel, kuid saadud seost ei kinnitanud V89L polümorfismiga tugevalt aheldunud ($r^2 = 0,945$) polümorfismi (rs632148) assotsiatsiooni uuringud (Beesley et al. 2007).

Mehe viljakuse ja V89L polümorfismi vahelisi uuringuid on siiani läbiviidud vaid üks, kus Elzanaty koos kaasautoritega analüüsisid V89L polümorfismi seoseid spermaparameetrite muutusega ning leidsid, et V- alleeli esinemine tagab spermatooside parema liikuvuse (Elzanaty et al. 2006).

A49T (rs9282858) alleelse variandi esinemist on uuritud kui potentsiaalset geneetilist riskitegurit eesnäärmevähi tekkes (Giwerzman et al. 2005). Kõrgenenud DHT taset eesnärves peetakse üheks peamiseks eesnäärmevähi tekkepõhjuseks. Makridakis ja kaasautorite poolt läbi viidud *in vitro* uuringute põhjal tõstab T- alleeli esinemine SRD5A2 aktiivsust 6 korda, kiirendades oluliselt testosterooni konversioon DHT-ks (Makridakis et al. 2004). Eesnäärmevähiga patsientide uuringud on aga jõudnud vastukäivate tulemusteni. Giwerzman ja kaasautorid jõudsid järeldusele, et võrreldes üldpopulatsiooniga esineb T- alleel sagedamini eesnäärmevähki haigestunud meestel (Giwerzman et al. 2005). Seevastu Soome populatsioonis läbi viidud uuringus (Mononen et al. 2001) erinevusi patsientide ja kontrollgrupi vahel ei leitud. Kõrge aktiivsusega T- alleeli esinemist on peetud ka üheks potentsiaalseks geneetiliseks riskiteguriks hüpospaadiate tekkes (Silver and Russel 1999).

A49T polümorfismi ja mehe viljakuse vahelised uuringud on näidanud kõrge aktiivsusega T- alleeli kandvate meeste kõrgemaid sperma kontsentratsioone võrreldes AA alleeli kandvate meestega (Elzanaty et al. 2006).

R227Q (rs9332964) polümorfismi on kirjeldatud vaid Aasia populatsioonides, kus homosügootses olekus Q- alleeli on seostatud hüpospaadia ja mikropeenise tekkimisega (Sasaki et al. 2003a).

2. Töö eesmärgid

Töö eesmärgid olid:

1. Kirjeldada ja analüüsida patsientide ja kontrollindiviidide kliinilisi andmeid, *AR* geeni polümorfismide jaotust, sagedasemaid haplotüüpe, CAG ja GGN mikrosatelliitsete korduste varieeruvust, ning leida geneetiliste variatsioonide võimalik seos ebaselge etioloogiaga mehe viljatuse tekkimisega.

2. Kirjeldada ja analüüsida *SRD5A2* geeni polümorfismide jaotust nii patsientidel kui kontrollindiviididel ning leida nende võimalik seos mehe idiopaatilise viljatuse tekkimisega.

3. Materjal ja metoodika

3.1. Uuringugrupi iseloomustus

Antud töös kasutatud 161 uuritava ja 212 kontrollgrupi indiviidi vereproovid on kogutud koostöös dr. Margus Punabiga (M.D, PhD) TÜ Androloogia keskusest.

Uuritavate grupi moodustasid 2005-2006 aastal Tartu Androloogia keskusesse pöördunud mehed, kellel diagnoositi ebaselge etioloogiaga mitteobstruktiivne azoospermia või tõsine oligozoospermia ($\leq 5 \times 10^6$ spermatoosoidi 1 ml-s ejakulaadis). Uuritavatel määrati munandite suurused kasutades Praderi orhidomeetrit, määrati FSH, LH ja testosterooni sisaldused vereseerumist kasutades kemiluminescentsmeetodit immuunanalüsaatoril IMMULI (Immulite 2000[®] station, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) ning teostati spermaanalüüs järgides WHO soovitusi (WHO 1999). Patsientidel välistati levinumad viljatuse põhjused, nagu sugukromosoomi arvu häired, Y kromosoomi mikroleetsioonid ning eesnäärme patoloogiad.

Kontrollgrupi moodustasid 212 sõjaväe-eelsesesse kontrolli tulnud, heade sperma parameetritega (sperma kontsentratsioon $75 - 716 \times 10^6/\text{ml}$) noort meest, kellel määrati munandite suurused ja FSH, LH ja testosterooni sisaldused vereseerumist ning teostati spermaanalüüs.

Uuringugrupid kliinilised parameetrid on toodud tabelis 4 (Tulemuste osas).

Käesoleva uuringu läbiviimiseks oli Tallinna Inimuuringute Eetikakomitee luba (nr.791/2005).

3.2. DNA eraldamine

DNA eraldamiseks lisati EDTA-verele (2-4 ml) neljakordses mahus puhver A-d [$0,32 \text{ M}$ sahharoos, 1 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, ddH₂O], segati ning tsentrifuugiti temperatuuril 4°C 15 minutit 3000 rpm . Supernatant eemaldati ning korrati sama etappi kahekordse mahu puhver A-ga. Tsentrifuugiti ning supernatant eemaldati. Sademele lisati ($0,9 \times$ esialgse vere ruumala) puhver B-d [400 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH8), 10 mM Tris-HCl (pH7,5), ddH₂O] ning sade lahustati. Seejärel lisati ($0,1 \times$ esialgse vere ruumala) puhver C-d (10% SDS, 2 mg/ml proteinaasK, ddH₂O) ning inkubeeriti üleöö temperatuuril 37°C . Järgmisel päeval lisati inkubeeritud lahusele küllastatud NaCl-i ($0,27 \times$ esialgse vere ruumala) ning segati umbes 15 sekundit. Järgnevalt tsentrifuugiti

toatemperatuuril 15 minutit 4000 rpm. Supernatant tõsteti uude puhtasse tuubi ning lisati kahekordne kogus 96% etanooli. Seejärel segati õrnalt ning saadud DNA sade eemaldati Pasteuri pipetiga, kuivatati ning lahustati sõltuvalt kasutatud EDTA-vere kogusest, 400-600 µl ddH₂O-s.

3.3. Genotüpiseerimine

3.3.1. SNP-de valik ja genotüpiseerimine

AR geenis genotüpiseeriti kuus haplotüüpi kirjeldavat tagSNP-d (rs962458, rs6152, rs1204038, rs2361634, rs1337080, rs1337082) (Terry et al. 2005). Kahe polümorfismi tuvastamiseks (rs1204038 ja rs1337082) teostati alleelspetsiifiline PCR, ülejäänud neli polümorfismi tuvastati restriksioonifragmentide pikkuse polümorfismide e. RFLP meetodil.

SRD5A2 geeni variatsioonide kirjeldamiseks kasutati kuut tagSNP-d (rs11892064, rs2268797, rs632148, rs2300701, rs12470143, rs523349), mis valiti välja kasutades rahvusvahelise HapMap projekti andmebaasi andmeid (*International HapMap Project*), <http://www.hapmap.org/> ning Haploview 3.2 (Haploview version 3.2; <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>) programmi tööriista Tagger (de-Bakker et al. 2005). *SRD5A2* polümorfismide tuvastamiseks kasutati RFLP meetodit.

AR ja *SRD5A2* genotüpiseerimiseks kasutatud PCR praimerite järjestused, kasutatud restriктаasid (MBI Fermentas, Leedu) ning saadud restriksiooni fragmentide pikkused on lisatud tabelis 3.

Iga PCR-i reaktsioonisegu sisaldas ~50 ng DNA-d, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1× PCR puhvrit (Solis BioDyne, Eesti), 10 pmol primereid ja 0,8 U Hot Start termostabiilset DNA polümeraasi HOT FIREPol (Solis BioDyne, Eesti) ning ddH₂O-d lõppmahuni 10 µl. Amplifikatsioonid viidi läbi GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA) PCR-i masinaga. Amplifikatsiooni reaktsioonile eelnes reaktsioonisegude eelkuumutamine 95°C, 15 minutit. PCR-i programm koosnes 35-st amplifikatsiooni tsüklist ja viidi läbi järgmiselt: 1) DNA denaturatsioon temperatuuril 95°C, 30 sekundit 2) praimerite seondumine matriitsile sõltuvalt praimeride seondumistemperatuurist (51-63°C), 30 sekundit, 3) DNA süntees temperatuuril 72°C, sõltuvalt amplifitseeritava fragmendi pikkusest, 30-60 sekundit.

Kõik PCR-i produktid ning restriksioonifragmentide pikkused kontrolliti geelelektroforeesil 2% agarosgeelis 0,5× TBE [(45 mM Tris-boraat; 1 mM EDTA-Na₂ (dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat)] puhvris.

3.3.2. Mikrosatelliitsete kordusjärjestuste genotüpiseerimine

AR geeni CAG ja GGN trinukleotiidsete järjestuste pikkuste variatsioonid määrati Anastassia Belousova poolt. CAG kordusi sisaldava *AR* geeni piirkonna amplifitseerimiseks kasutati praimereid 5'-6-FAM-GTCTACCCTCGGCCGCGTC ja 5'-GTAGCCTGTGGGGCCTCTACG ning GGN kordusi sisaldava piirkonna amplifitseerimiseks 5'-TAMRA-CCTGGCACACTCTCTCACA ja 5'-ACATCAGGTGCGGTGAAGTC praimereid. Reaktsioonisegu (15 µl) sisaldas ~50 ng genoomset DNA-d, 0,2 mM dNTP-de segu, 2,5 mM MgCl₂, 1 × PCR puhvrit (Solis BioDyne, Eesti), 10 pmol praimereid ja 0,8 U Hot Start termostabiilset DNA polümeraasi HOT FIREPol (Solis BioDyne, Estonia). GGN fragmentide amplifitseerimiseks lisati veel reaktsioonisegule 2 × solution S (Solis BioDyne, Eesti). PCR-i programm koosnes 34-st amplifikatsiooni tsüklist ja viidi läbi järgmiselt: 1) denaturatsioon 95°C, 30 sekundit, 2) praimeri seondumine 60°C, 30 sekundit 3) ekstensioon 72°C, 30 sekundit. Amplifikatsioonireaktsioonile eelnes reaktsioonisegude eelkuumutamine 95°C, 15 minutit. PCR-l saadud fragmentide suurused määrati vastavalt standardtingimustele ABI Prism 377 DNA sekvenaatoril (PE Applied Biosystems), kasutades Genescan 2.1 tarkvara (PE Applied Biosystems). Fragmentide suuruse määramiseks kasutati Rox 500 (PE Applied Biosystems) suurus-standardit.

Tabel 3. Praimerite järjestused ja restriктаasid				
Polümorfism	Aplifitseerimiseks kasutatud praimeeride järjestused F-forward, R-reverse(5' - 3')	Restrik-taasid	Alleel	DNA fragmendi suurus (bp)
AR				
SNP1 (rs962458)	F-CCGTAGCCTTCTGGAAAACATC *R-CACAATTTTACTTAAAAATGCGC	<i>Bsh1236I</i>	T C	149 24+125
SNP2 (rs6152)	F-CTCCGGACGAGGATGACTCA R-TGGCGTTGTCAGAAATGGTCGAA	<i>Eco147I</i>	A G	255 186+69
SNP3 (rs1204038)	F1-GAACTTGGTCTAATTCCCTTC F2-GAACTTGGTCTAATTCCCTTT R-CTTCGCTAGACACGAGTTCA		C T	160
SNP4 (rs2361634)	F-ATGAGGTAAAGTTACAAACCTGG R-AACATGGTCCCTGGCAGTCTC	<i>XceI</i>	A G	398 224+120+54
SNP5 (rs1337080)	F-GAATTGGAGGGAGATAGGTG R-CTCAATGAGGACAAGGAACTC	<i>NdeI</i>	G A	268 137+131
SNP6 (rs1337082)	F-GGAGGCATCTTGAGACCAAT R1-ATCTTGAACAATTATTTAACCTTC R2-ATCTTGAACAATTATTTAACCTTT		C T	217
SRD5A2				
SNP1 (rs632148)	*F-GAGAGCGCGGCCCCCGCAAGC R-GGCCTTCGTTCTCCTCCGGCCA	<i>Eco47III</i>	C G	180 158+22
SNP2 (rs523349)	F- GTGAAGGCGGCGTCTGTG R- TCGGGCCACCTGGGACGCTA	<i>RsaI</i>	G C	275 235+40
SNP3 (rs2300701)	F-ATCAACTTGAGGTGGATTTTGGGATC R-GCTGCTCTTCATAGGCTTGCTGA	<i>PagI</i>	G A	148 126+22
SNP4 (rs2268797)	F-CACTCCAATGTTTGCCTCTGTC *R-TCATATATTTAGTGTGCCATTGA ^{TC}	<i>BclI</i>	C T	190 166+24
SNP5 (rs12470143)	F-GTTTATTCTTCCAATTGCTTAAGC *R-AATAGATTGCGGTGGAGTAT ^{AC} GT	<i>Eco105I</i>	C T	251 227+24
SNP6 (rs11892064)	*Fw-AATCTAGGTCTTCTGATAAT ^{AC} Rev- CCAAGCTTACTTA ^{CT} ATGGA	<i>BcuI</i>	C T	144 123+21
*Praimer on modifitseeritud, alla joonitud nukleotiidid on modifitseeritud spetsiifilisele restriктаasile lõikamiskoha tekitamiseks				

3.4. Andmete statistiline analüüs

Patsientide ja kontrollgrupi indiviidide kliiniliste parameetrite võrdlemiseks kasutati Mann-Whitney U testi. CAG ja GGN korduste erinevused määrati t-testiga. Seos *AR* ja *SRD5A2* geenide polümorfismide ja kliiniliste parameetrite väärtuste varieerumise vahel leiti lineaarse regressiooni mudeli abil. *AR* ja *SRD5A2* geeni variatsioonide võimalikku seost viljatuse fenotüübiga hinnati logistilise regressioonanalüüsi abil.

Alleelse jaotuvuse erinevuse määramiseks kontrollidel ja patsientidel kasutati χ^2 testi ning tulemuste tähendusrikkust hinnati p-väärtusega. Antud töös loeti statistiliselt oluliseks p-väärtust $< 0,05$.

Haplotüübi analüüs viidi läbi kasutades programmi Haploview 3.2 (Haploview version 3.2; <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). *LD* (ahelduse tasakaalustamatus e. *linked disequilibrium*) hindamiseks kasutati D' väärtust, mis on tuletatud *LD* koefitsiendist D ja hindab kõrvalekallet lookustevahelisest juhuslikust assotsiatsioonist (Lewontin 1988). Antud töös klassifitseeriti *LD* analüüsi tulemused järgmiselt:

$D' > 0,9$ kaks polümorfismi on täielikult aheldunud (absoluutne $D' = 1$)

$D' = 0,8-0,9$ polümorfismid on aheldunud

Markerite vahelise *LD* tugevuse hindamiseks kasutati ka r^2 testi. r^2 näitab statistilist korrelatsiooni kahe markeri vahel ning $r^2 = 1$ kirjeldab olukorda, kus ühe SNP alleeli esinemine ennustab alati teise SNP vastava alleeli esinemist. r^2 väärtused on vahemikus 0 (ei ole *LD*) kuni 1 (täielik *LD*). Käesolevas töös oli tagSNP-de valikukriteeriumiks $r^2 \geq 0,9$ (valitud tagSNP-de keskmine väärtus oli $r^2 = 0,96$).

Haplotüübi efekti hinnati šansside suhtega (OR- *odds ratio*). Antud töös klassifitseeriti OR väärtus järgmiselt:

$OR < 1$ haplotüüp omab protektiivset efekti viljatusele,

$OR > 1$ haplotüüp on seotud suurema riskiga viljatuse tekkeks ehk tegemist on nn. riskihaplotüübiga.

Saadud OR väärtust tõlgendati sõltuvalt 95% usaldusvahemiku intervallist (confidence interval, CI-riskifaktori väärtuste vahemik, kuhu jäävad 95% saadud riskifaktori väärtustest). Haplotüübiefekti statistilist tähendusrikkust hinnati χ^2 p-väärtusega. Korduvanalüüsides vea vähendamiseks kasutati permutatsioon testi.

Statistilised testid teostati koostöös Kadri Halleriga kasutades programmi R 2.0.0 A Language and Environment (Free Software Foundation, Boston, MA).

4. Tulemused

4.1. Uuritavate patsientide ja kontrollgrupi kliiniliste andmete analüüs

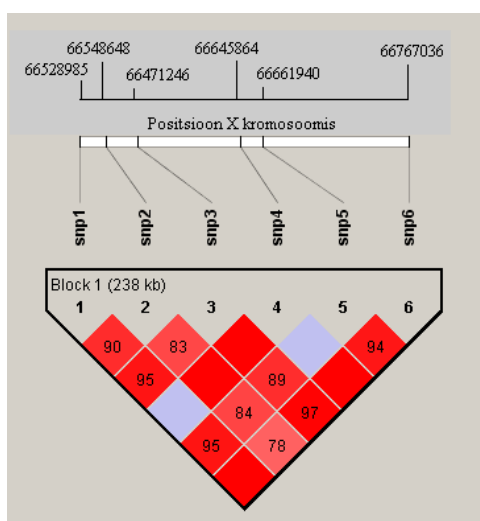
Patsientide ja kontrollgrupi indiviidide kliiniliste näitajate andmed ja statistilise analüüsi tulemused on toodud tabelis 4. Patsientide gruppi kuuluvad mehed olid vanemad, nende keskmine munandi maht oli väiksem, spermogrammi näitajad halvemad, testosterooni kontsentratsioonid madalamad ning FSH ja LH tasemed kõrgemad. Kliiniliste andmete võrdlus näitas, et munandite keskmise mahu tõus oli seotud sperma kontsentratsiooni suurenemisega (Pearsoni korrelatsiooni test; $p < 0,001$).

Tabel 4. Patsientide ja kontrollgrupi isikute kliiniliste näitajate võrdlus kasutades Mann-Witney U-testi							
Iseloomustus	Patsiendid (n = 161)			Kontrollgrupp (n=212)			Mann-Witney U-test
	Mediaan	Min.	Max.	Mediaan	Min.	Max.	p väärtus
Vanus (aastates)	31,0	19,0	49,0	18,0	17,0	25,0	< 0,001
Keskmine testise maht (ml)	18,5	3,0	50,0	26,0	15,0	45,0	< 0,001
Abstinenti kestus (päevades)	4,0	1,0	10,0	4,6	0	13,0	< 0,001
Ejakulaadi maht (ml)	3,8	0	10,2	3,2	0,9	8,9	0,003
Sperma kontsentratsioon (10^6 /ml)	1,0	0	14,0	122,0	75,0	716,0	< 0,001
Sperma A + B liikuvus (%)	16,5	0	74,0	57,5	30	80	< 0,001
Seerumi FSH (IU/l)	8,6	1,1	62,2	3,1	0,7	9,3	< 0,001
Seerumi LH (IU/l)	4,5	0,6	23,8	2,9	0,9	10,2	< 0,001
Seerumi testosteroon (nmol/l)	17,6	3,5	43,7	20,6	10,9	48,6	< 0,001

4.2. Androgeeni retseptori geeni haplotüüpide seos viljatusega

AR geeni haplotüüpide kirjeldamiseks genotüpiseeriti kuus haplotüüpi iseloomustavat htSNP-d: SNP1 (rs962458), SNP2 (rs6152), SNP3 (rs1204038), SNP4 (rs2361634), SNP5 (rs1337080), SNP6 (rs1337082) (joonis 5) 112 patsiendil ja 212 kontrollindiviidil.

LD analüüs patsientide ja kontrollindiviidide ühendgrupis näitas, et kõik analüüsitud SNP-d on omavahel peaaegu täielikult aheldunud ($D' \geq 0,8$) ning moodustavad ühtse, 238 kb suuruse haploloki (Joonis 8).



Joonis 8. *AR* geeni *LD* analüüs patsientide ja kontrollindiviidide ühendgrupis. Joonisel on näidatud uuritavad kuus htSNPd, nende lokalisatsioon X kromosoomis. Kõiki kuut htSNPd iseloomustas tugev *LD*. Iga ruut näitab kahe SNP omavahelist aheldatust (D' väärtused on joonisel korrutatud sajaga). Punane värv märgib tugeva statistilise usaldusväärsusega *LD*-d. Sinakas-lilla värv seevastu märgib tugevat *LD*-d, mis on madala statistilise usaldusväärsusega.

Haplotüübi analüüsil leiti, et need kuus omavahel aheldunud polümorfismi moodustavad 13 erinevat haplotüüpi (andmed pole lisatud), millest neli (HAP1-4) esinevad populatsioonis sagedusega üle 5%-i (Tabel 5). Kontrollindiviidide ja viljatute patsientide haplotüüpide sageduste analüüsil leiti, et HAP4 esines viljatutel patsientidel statistiliselt oluliselt sagedamini kui kontrollindiviididel ($OR = 5,19$; $p = 0,003$). Antud tulemus jäi oluliseks ka peale permutatsioonitesti ($p = 0,002$). HAP4 esinemissageduse tõus oli seotud sperma kontsentratsiooni langusega, esinedes normozoospermiaga kontrollgrupi meeste hulgas 2,4% (5/212), oligozoospermiaga meeste hulgas 6,9% (5/73) ja azoospermiaga meeste hulgas 12,8% (5/39), ($OR = 2,60$; 95% CI 1,61 - 4,20; $p < 0,001$). Kõikide haplotüüpide sagedusi võrreldi esimese haplotüübi (HAP1) suhtes, mille esinemissagedus oli uuritavates gruppides kõige suurem. HAP4 ja reproduktiivhormoonide (T, FSH, LH) ning munandimahu keskmiste väärtuste vahelisi seoseid uuritavates gruppides ei leitud (andmed pole lisatud).

Analüüsides erinevaid polümorfisme üksikult, selgus et SNP2 A alleel (OR = 2,15; p= 0,014), SNP 6 C alleel (OR = 2,02; p = 0,017) ja SNP 3 T alleel (OR = 1,90; p = 0,051) olid seotud kõrgeenenud riskiga mehe viljatuse tekkeks. Riskialleelid jäid samaks ka peale mõõduka oligozoospermiaga (n = 8; sperma kontsentratsioonid 6 – 14 × 10⁶/ml) patsientide välja arvamist analüüsitavast uuringugrupist.

Tabel 5. *AR* geeni sagedasemate haplotüüpide jaotus patsientidel ja kontrollgrupil

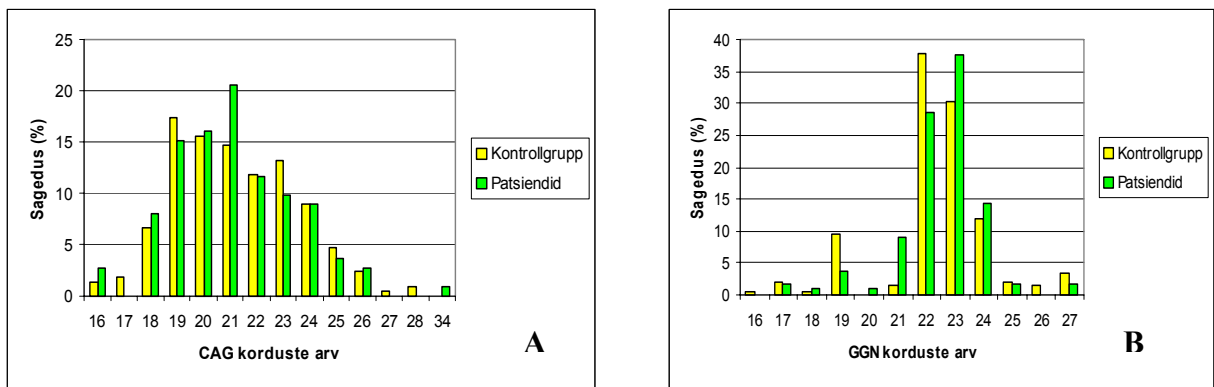
Haplotüübi number	Haplotüüp	Patsiendid % (n)	Kontrollgrupp % (n)	OR (95% CI), p väärtus
*HAP1	TGCAAT	67,0 (75)	75,9 (161)	1
HAP2	TGCGAT	3,6 (4)	7,1 (15)	0,57 (0,18–1,78); 0,336
HAP3	CATAGC	7,1 (8)	5,2 (11)	1,56 (0,60–4,04); 0,359
HAP4	TATAAC	10,7 (12)	2,4 (5)	5,15 (1,75–15,15); 0,003
Teised		11,6 (13)	9,4 (20)	1,40 (0,66–2,95); 0,384

* HAP1 on võetud referents genotüübiks

4.3. Androgeeni retseptori geeni mikrosatelliitsete kordusjärjestuste variatsioonid

AR geeni CAG ja GGN polümorfseid mikrosatelliitseid kordusjärjestused genotüpiseeriti 112 patsiendil ja 212 kontrollindiviidil. Kontroll- ja patsientidegrupi vahelist CAG korduste arvu varieeruvust ei täheldatud (vastav keskmine ± SD oli 21,1 ± 2,5 vs. 21,2 ± 2,4; T-test, p = 0,850). Patsientide CAG alleeli pikkused varieerusid 16-34 korduseni, kontrollgrupis 16-28 korduseni. Samuti ei erinenud üksteisest kahe grupi *AR* GGN korduste arvud (keskmine ± SD 22,5 ± 1,6 vs. 22,4 ± 1,9; T-test, p = 0,618). GGN korduste arvud patsientidel varieerusid 17-27 korduseni ja kontrollgrupil 16-27 korduseni (Joonis 9 A, B). Kõigi uuritud indiviidide andmete analüüs näitas positiivset korrelatsiooni CAG ja GGN korduste arvu suurenemise vahel (Pearson`si korrelatsioon r = 0,147; p = 0,032).

Kõige sagedasem *AR* geeni CAG/GGN kombinatsioon infertiilsetel meestel oli CAG=21/GGN=22 ja CAG=22/GGN=22 kontrollgrupis. Ühegi CAG/GGN haplotüübi puhul ei leitud seost idiopaatilise mehepoolse viljatusega.



Joonis 9 *AR* mikrosatelliitsete kordusjärjestuste arvu varieeruvus patsientide- ja kontrollindiviidide grupis. (A) CAG korduste arvu jaotus kontrollgrupis ja patsientidel. (B) GGN korduste arvu jaotus kontrollgrupis ja patsientidel.

4.4. Androgeeni retseptori geeni haplotüüpide ning CAG ja GGN mikrosatelliitsete variatsioonide omavahelised seosed

Käesolevas uuringus leiti, et *AR* geeni haplotüübid on seotud CAG ja GGN korduste arvuga (Tabel 6). HAP2 genotüübi esinemine on seotud märkimisväärselt pikemate CAG kordustega ($r = 1,17$; $p = 0,033$) ja HAP3 genotüübi esinemine on seotud lühemate CAG kordustega ($r = -2,63$; $p < 0,0001$). Samas on HAP3 ja HAP4 genotüüpide esinemine seotud pikemate GGN järjestustega ($r = 1,35$; $p = 0,001$ ja $r = 1,36$; $p = 0,002$).

Tabel 6. <i>AR</i> geeni sagedasemate haplotüüpide seosed CAG/GGN korduste arvuga.				
Haplotüüp	Keskmine CAG korduste arv $\pm$ SD	**r (p väärtus)	Keskmine GGN korduste arv $\pm$ SD	**r (p väärtus)
*HAP1	21,4 $\pm$ 2,5	-	22,2 $\pm$ 1,9	-
HAP2	22,5 $\pm$ 1,9	1,17 (0,033)	22,4 $\pm$ 0,5	0,14 (>0,100)
HAP3	18,4 $\pm$ 0,7	-2,63 (<0,001)	23,6 $\pm$ 0,6	1,35 (0,001)
HAP4	20,8 $\pm$ 0,8	-0,45 (>0,100)	23,6 $\pm$ 0,5	1,36 (0,002)

* HAP1 on võetud referents genotüübiks **lineaarne regressioon, regressiooni koefitsent (r)

4.5. 5 α -reduktaasi tüüp 2 geeni polümorfismide seos viljatusega

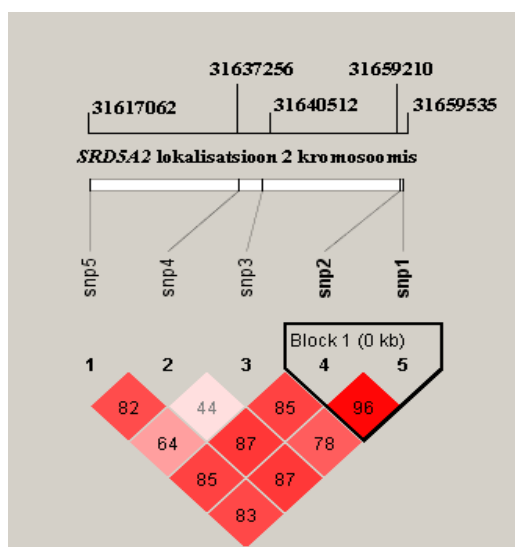
SRD5A2 geeni variatsioonide kirjeldamiseks genotüpiseeriti 161 viljatut patsienti ja 211 kontrollindiviidi, kasutades kuut tagSNP-d: SNP1 (rs632148), SNP2 (rs523349), SNP3 (rs2300701), SNP4 (rs2268797), SNP5 (rs12470143) ja SNP6 (rs11892064).

Uuringus osalevad mehed jagati vastavalt sperma kontsentratsioonidele kolme rühma: (i) azoospermiaga ($n = 39$), (ii) oligozoospermiaga ($n = 122$) ning (iii) normozoospermiaga ($n = 211$).

SNP1 asub geeni 5' mittetransleeritavas piirkonnas, SNP2 (V89L) paikneb 1 eksonis ning põhjustab valgus valiin-leutsiin aminohappe muutuse ning ülejäänud tagSNP-d paiknevad esimeses intronis (Joonis 7. Kirjanduse ülevaade).

SRD5A2 SNP1-5 genotüüpide sagedused on toodud tabelis 7. SNP6-e genotüüpne jaotuvus ei vastanud Hardy Weinbergi tasakaalule ($p < 0,05$) ning eemaldati edaspidisest uuringust.

LD analüüs patsientide ja kontrollindiviidide ühendgrupis näitas, et analüüsitud SNP1 ja SNP2 olid omavahel peaaegu täielikult aheldunud ($r^2 = 0,88$; $D' = 0,96$) ning kuulusid ühte haploblokki (Joonis 10).



Joonis10. *LD* analüüs *SRD5A2* geenis patsientide ja kontrollindiviidide ühendgrupis. Joonisel on näidatud viis uuritavat tagSNP-d ja nende lokaliseerimine teise kromosoomi lühikeses osas. Iga ruut näitab kahe SNP omavahelist aheldatust (D'). Joonisel toodud D' väärtused on korrutatud sajaga. Tumepunane värv märgib tugeva ja valge värv märgib nõrga statistilise usaldusväärsusega *LD*-d.

Logistiline regressioonanalüüs, mis kohandati vanuse ja abstinentsi ajaga, näitas et C alleeli olemasolu SNP1-s (genotüübid CC ja GC) oli seotud riskiga azoo- ja oligozoospermia tekkeks. Samuti olid SNP2 (V89L) madala aktiivsusega G alleel

(genotüübid CG ja GG) ja SNP4 C alleel (genotüübid TC ja CC) seotud riskiga azoospermia ja oligozoospermia tekkimiseks. SNP3 A alleel (genotüübid GA ja AA) oli seotud riskiga oligozoospermia, kuid mitte azoospermia tekkeks. SNP5 genotüüpide jaotus uuritavate gruppide vahel ei erinenud (Tabel 7).

Vaadeldi ka kontrollgrupi kliiniliste andmete seoseid *SRD5A2* erinevate genotüüpidega. Kontrollgrupis ei olnud polümorfismide erinevad variandid seotud ei sperma mahu, liikuvuse ega seerumi testosterooni või FSH tasemega. Samas leiti, et SNP1 C alleel (genotüübid GC+CC) ja SNP 5 T alleel (genotüübid TC+TT) olid seotud väiksema ($r = -1,56$; $p = 0,020$) ja suurema ($r = -1,62$; $p = 0,030$), kuid normi piiridesse jääva munandi mahuga (Tabel 8).

Tabel 7. *SRD5A2* polümorfismide genotüüpide sagedused erinevate spermakontsentratsioonidega meeste gruppides

Uuringu grupp	Genotüüp, n (%)		Kohandatud OR* (95% CI), p
SNP1 rs632148	GG	GC + CC	
Azoospermia	17 (43,6)	22 (56,4)	4,64 (1,57 – 13,67); p = 0,005
Oligozoospermia	52 (42,6)	70 (57,4)	3,81 (1,58 – 8,18); p = 0,003
Normozoospermia	110 (52,1)	101 (47,9)	Referents
SNP2 rs523349	CC	CG + GG	
Azoospermia	19/39 (48,7)	20/39 (51,3)	2,87 (1,01 – 8,19); p = 0,048
Oligozoospermia	53/122 (43,4)	69/122 (56,6)	2,98 (1,26 – 7,05); p = 0,013
Normozoospermia	111/211 (52,6)	100/211 (47,4)	Referents
SNP3 rs2300701	GG	GA + AA	
Azoospermia	15 (38,5)	24 (61,5)	2,12 (0,71 – 6,33); p = 0,18
Oligozoospermia	36 (29,5)	86 (70,5)	2,83 (1,12 – 7,12); p = 0,027
Normozoospermia	83 (39,3)	128 (60,7)	Referents
SNP4 rs2268797	TT	TC + CC	
Azoospermia	12 (30,8)	27 (69,2)	5,14 (1,58 – 16,69); p = 0,007
Oligozoospermia	39 (32,0)	83 (68,0)	4,01 (1,55 – 10,39); p = 0,004
Normozoospermia	77 (36,5)	134 (63,5)	Referents
SNP5 rs12470143	CC	CT + TT	
Azoospermia	11 (28,2)	28 (71,8)	1,19 (0,39 – 3,64); p = 0,758
Oligozoospermia	41 (33,6)	81 (66,4)	0,96 (0,39 – 2,36); p = 0,938
Normozoospermia	60 (28,4)	151 (71,6)	Referents

*OR kohandati vanuse ja abstinentsi ajaga

Tabel 8 SRD542 genotüüpide ja viljakus näitajate vaheline seos kontrollgrupis (keskmine ± SD)										
SNP1		SNP2 (V89L)		SNP3		SNP4		SNP5		
GG ^a	GC + CC	CC ^a	CG + GG	GG ^a	GA + AA	TT ^a	TC + CC	CC ^a	CT + TT	
Spermatooidide A liikuvus (%) ^b										
13,8 ± 12,0 n = 108	13,7 ± 12,7 n = 101	14,0 ± 12,1 n = 109	13,4 ± 12,7 n = 100	13,7 ± 11,9 n = 81	13,7 ± 12,6 n = 128	13,4 ± 11,6 n = 75	13,9 ± 12,7 n = 134	13,0 ± 13,4 n = 60	14,0 ± 11,9 n = 149	
Spermatooidide B liikuvus (%) ^b										
42,4 ± 12,1 n = 108	46,0 ± 11,8 n = 101	42,1 ± 12,2 n = 109	46,3 ± 11,7 n = 100	41,8 ± 11,5 n = 81	45,6 ± 12,2 n = 128	42,0 ± 11,6 n = 75	45,3 ± 12,2 n = 134	45,1 ± 11,5 n = 60	43,7 ± 12,3 n = 149	
Ejakulaadi maht (ml) ^b										
3,4 ± 1,3 n = 110	3,5 ± 1,3 n = 101	3,4 ± 1,4 n = 111	3,5 ± 1,3 n = 100	3,3 ± 1,5 n = 83	3,5 ± 1,2 n = 128	3,4 ± 1,3 n = 77	3,5 ± 1,3 n = 134	3,4 ± 1,3 n = 60	3,5 ± 1,3 n = 151	
Munandi maht (ml) ^c										
27,3 ± 4,7 n = 110	25,8 ± 5,0 n = 101	27,2 ± 4,7 n = 111	26,0 ± 5,0 n = 100	27,1 ± 5,0 n = 83	26,3 ± 4,8 n = 128	27,2 ± 4,9 n = 77	26,2 ± 4,9 n = 134	25,5 ± 4,8 n = 60	27,1 ± 4,9 n = 151	
Seerumi testosteroon väärtus (nmol/l) ^d										
23,1 ± 6,7 n = 32	21,3 ± 7,7 n = 47	22,9 ± 6,8 n = 32	21,4 ± 7,7 n = 47	23,0 ± 6,5 n = 28	21,5 ± 7,8 n = 51	22,9 ± 6,5 n = 17	21,8 ± 7,6 n = 62	21,5 ± 6,7 n = 32	22,4 ± 7,8 n = 47	
Seerumi FSH väärtus (IU/l) ^e										
3,2 ± 1,6 n = 32	3,3 ± 1,6 n = 47	3,2 ± 1,6 n = 32	3,3 ± 1,6 n = 47	3,6 ± 1,9 n = 28	3,1 ± 1,4 n = 51	3,3 ± 1,9 n = 17	3,3 ± 1,6 n = 62	3,6 ± 1,7 n = 32	3,1 ± 1,5 n = 47	
(a) Referents genotüüp, (b) lineaarne regressioonanalüüs, mis kohandati vanuse, abstinentsi aja ja testosterooni väärtustega, (c) lineaarne regressioonanalüüs, mis kohandati vanusega, (d) lineaarse regressioonanalüüs, mis kohandati vanuse ja munandite keskmise mahuga, (e) lineaarne regressioonanalüüs, mis kohandati vanuse, munandite keskmise mahu ja testosterooni väärtustega. Regressiooni koefitsiendid (r) ja olulised p väärtused on antud tekstis.										

5. Arutelu

5.1. Androgeeni retseptori geeni polümorfismide seos viljatusega

Mehe normaalseks suguliseks arenguks ja spermatogeneesi korrektseks toimimiseks vajatakse androgeene ja normaalselt toimivat androgeeni retseptorit. *AR* geenis on kirjeldatud paljusid retseptori funktsiooni muutvaid mutatsioone, mis põhjustavad androgeenide puuduliku toime tagajärjel erineva raskusastmega androgeenide tundlikuse häireid. *AR* olulisust viljakusele on näidatud ARKO (androgen receptor knockout) hiire mudelil, kus *AR* puudumisel väheneb 80% ulatuses munandi maht ja langeb seerumis testosterooni kontsentratsioon (Yeh et al. 2002). Kuigi *AR* geeni mutatsioonidega kaasnevad sageli suured muutused spermatogeneesi efektiivsuses on siiski harvad juhtumid, kus normaalse fenotüübiga meestel oleks viljatuse põhjus tingitud *AR* geeni mutatsioonidest. See on ajendanud otsima võimalikke seoseid retseptori funktsiooni vähemal määral mõjutavate geneetiliste variatsioonide ning viljatuse tekkeriski vahel.

Haplotüüpi kirjeldavate SNP-de kasutamine geneetilise varieeruvuse määramiseks on küllaltki uus ja efektiivne lähenemine, mis võimaldab üksikute htSNP-de abil kirjeldada suuri geeni piirkondi (Gabriel et al. 2002). *AR* geenis on kirjeldatud kahte (Freedman et al. 2005b) või kolme (Terry et al. 2005) suuremasse haplotüübi plokki kuuluvat 32 htSNP-d, milledest indiviidide vahelise geneetilise varieeruvuse kirjeldamiseks piisab kuuest htSNP-st (Terry et al. 2005). Sagedasemaid *AR* haplotüüpe ja nende võimalikke seoseid riskiga haigestuda erinevatesse hormoonsõltuvatesse kasvajatessse nagu eesnäärmevähk (Freedman et al. 2005a), munasarjavähk (Terry et al. 2005) ja endomeetriumi vähki (McGrath et al. 2006) on küll uuritud, kuid seni ei ole leitud ühtegi peamist riskihaplotüüpi.

Käesolevas töös vaadeldi esmakordselt *AR* geeni haplotüüpide mõju spermatogeneesile ja viljatusele. Läbiviidud *AR* haplotüübi analüüsist selgus, et uuritavad kuus htSNP-d olid omavahel tugevalt aheldunud ning moodustasid ühe haplotüübi ploki. Haplotüübi analüüsil saadud kolmeteistkümnest haplotüübist esinesid viljatutel meestel sagedamini HAP1 (67%), HAP4 (10,7%) ja HAP3 (7,1%) ning kontrollgrupil HAP1 (75%), HAP2 (7,1%), HAP3 (5,2%). Ühe haplotüübi, HAP4 esinemissagedus viljatute meeste grupis oli ligikaudu neli korda suurem (10,7% vs. 2,4%) kui kontrollgrupi meestel. 2006 aastal rootsi meeste hulgas läbi viidud uuringus leiti, et HPT3 (käesoleva töö HAP4) esinemissagedus sõjaväe eelsesesse kontrolli tulnud noorte meeste seas oli 6,1%, mis oli märgatavalt kõrgem kui meie kontrollgrupis (2,4%) (Lundin et al. 2006b). Saadud tulemustes võivad olla tingitud uuritud gruppide erinevustest. Käesolevas töös kasutatud

kontrollgrupi mehed olid eranditult väga heade sperma parameetritega, Lundini ja kaasautorite (2006) uuringu grupp koosnes aga määramata sperma kontsentratsioonidega meestest (Lundin et al. 2006b).

Käesoleva töö tulemused näitasid selgelt, et HAP4 esinemissageduse tõus kasvas oluliselt sperma kontsentratsioonide vähenedes. Kuna HAP4 esinemine ei olnud seotud reproduktiivhormoonide väärtuste ega munandite keskmiste mahtudega, siis võib oletada, et sperma kontsentratsioonide vähenemine ei olnud tingitud testikulaarsetest ega hormonaalsetest probleemidest, vaid pigem just meeste geneetilisest taustast. Seega võib töö tulemustest järeldada, et HAP4 riskihaplotüüpi (TATAAC) kandvad mehed on predisponeeritud erinevatele viljakust langetavatele keskkonna, elustiili või haiguste mõjuritele ning neil on suurem risk spermatogeneesi efektiivsuse vähenemiseks ja viljatuse tekkimiseks.

Samuti saab viljatuse tekkeriskiga seostada üksikute SNP-de teatud alleelsete variantide esinemist. Nii SNP2 A alleel, SNP3 T alleel kui ka SNP6 C alleel võivad suurendada riski viljatuse tekkeks. Varasemate uuringute põhjal seostatakse SNP2 (rs6152) G alleeli suurenenud riskiga haigestuda eesnäärmevähki (Hayes et al. 2005). Võimalik, et eesnäärme- vähi ja idiopaatilise viljatuse patogeneesiga on seotud *AR* SNP2 erinevad genotüübid. Kahjuks ei leitud ühtegi viljatuse tekkeriski eest kaitsvat haplotüüpi ega SNP-d.

Kuidas need sünonüümsed ja mittekodeerivad SNP-d ning erinevad haplotüübid mõjutavad *AR* geeni/valgu funktsiooni ning spermatogeneesi täpsemalt on siiani veel ebaselge ning selle väljaselgitamiseks vajatakse edasisi *in vitro* uuringuid.

5.2. Androgeeni retseptori geeni CAG/GGN mikrosatelliitsete korduste seos viljatusega

CAG korduste arvu varieeruvust ning selle seoseid halvenenud sperma parameetrite ja mehe viljatuse vahel on kirjeldatud paljudes erinevates uuringutes, kuid ühtseid tulemusi pole saadud (Dadze et al. 2000; Ferlin et al. 2004; Lund et al. 2003; Ruhayel et al. 2004; Thangaraj et al. 2002; Mengual et al. 2003; Wallerand et al. 2001). Viimati avaldatud metaanalüüsis leiti, et CAG korduste arvu suurenemine on seotud riskiga mehe viljatuse tekkeks (Davis-Dao et al. 2007). Erinevused teadustööde tulemustes võivad peituda uuringugruppide erinevas etnilises taustas (Esteban et al. 2006; Kittles et al. 2001; Sasaki et al. 2003b) ning uuringusse kaasatud gruppide suurustes. Ei saa välistada ka

diagnoosimata jäänud sperma parameetreid mõjutavaid haigusi, mis muudavad idiopaatilise viljatuse diagnoosi heterogeenseks ning patsientide sobivuse uuringugruppi kaheldavaks. Käesolevas töös leiti, et AR-CAG korduste keskmine arv ja jaotus nii viljatute meeste kui kontrollindiviidide vahel ei erinenud.

Kui CAG korduste arvu ja mehe viljatuse vahelisi assotsiatsiooni uuringuid on väga palju läbi viidud, siis GGN korduste arvu ja mehe viljatuse vahelisi seoseid on seni vaadelnud vaid mõned üksikud töögrupid (Ferlin et al. 2004; Lundin et al. 2006a; Lundin et al. 2003; Rajender et al. 2006; Ruhayel et al. 2004; Tut et al. 1997). GGN korduste arvu ja viljatuse vahel on seoseid leidnud Lundin ja kaasautorid. Nad leidsid, et GGN korduste arvu vähenemine (< 23) põhjustab AR aktiivsuse languse tagajärjel vähenenud ejakulaadi hulka (Lundin et al. 2006). Käesolevas töö tulemustest selgus, et GGN korduste arv ja jaotus kahe uuritava grupi vahel ei erinenud ning seoseid GGN korduste arvu ja sperma parameetrite muutuste vahel ei tuvastatud.

In vitro uuringud näivad kinnitavat CAG (Chamberlain et al. 1994) ja GGN (Gao et al. 1996; Lundin et al. 2007) korduste arvu mõju AR aktiivsusele. Sellest tulenevalt on mitmed autorid vaadelnud nende kahe korduse erinevate haplotüüpide seoseid riskiga haigestuda rinnavähki (González et al. 2007), eesnäärmevähki (Irvine et al. 1994), munandivähki (Garolla et al. 2005) ning endomeetriumi vähki (Rodriguez et al. 2006). CAG/GGN haplotüüpide ja mehe viljakuse vaheliste seoste määramisel on saadud vastukäivaid tulemusi (Ferlin et al. 2004; Ruhayel et al. 2004). Käesoleva töö analüüsist ei leitud ühtegi viljatuse tekkeriski eest kaitsevat ega riski suurendavat CAG/GGN haplotüüpi.

Uudse lähenemisena vaadeldi käesolevas töös AR geeni haplotüüpide ning CAG/GGN korduste arvu omavahelisi seoseid. Töö planeerimisel eeldati, et AR aktiivsust muutvad, kuid normi piirides varieeruvad CAG või GGN kordused võiksid olla seotud viljatuse tekkeriski suurendava haplotüübiga HAP4-ga. CAG korduste arvu ja HAP4 vahelisi seoseid mehe viljatuse tekkimisega käesolevas töös ei tuvastatud. Küll aga olid HAP4 ja HAP3 seotud pikemate GGN kordustega. Käesolevas töös olid HAP4 ja HAP3-ga seotud 23 GGN kordusjärjestust, mis peaks olema retseptori suboptimaalseks aktivatsiooniks vajalik korduste arv (Lundin et al. 2007).

Samuti tuvastati kahe haplotüübi (HAP2 ja HAP3) puhul seosed CAG kordusjärjestuste arvuga. Nimelt oli HAP2 seotud pikemate ja HAP3 lühemate, kuid normi piires varieeruvate, CAG korduste arvuga.

5.3. 5 α -reduktaas tüüp 2 geeni polümorfismide seos viljatusega

Kuigi SRD5A2 roll spermatogeneesis ei ole veel üheselt selge, on biokeemilised uuringud näidanud SRD5A2 kõrget aktiivsust nii munandites, eesnäärmes, munandimanuses kui ka seemnepõiekestes (Eicheler et al. 1994). Elzanaty koos kaasautoritega oletasid, et *SRD5A2* geeni polümorfismidest tingitud ensüümi aktiivsuse muutus mõjutab spermatosoidide korrektseks produktsiooniks ja funktsioneerimiseks vajalikke testikulaarseid ja post-testikulaarseid protsesse (Elzanaty et al. 2006). Sarnasele järeldusele tuli ka Amory koos kaasautoritega, kes panid tähele, et 5% indiviididest reageerisid SRD5A2 inhibiitorite manustamisele väga aktiivselt, mille tulemusena indiviidide DHT tase seerumis, sperma kontsentratsioon ja maht langesid drastiliselt. Autorite arvates tuleks selle põhjuseid otsida just indiviidide vaheliste geneetiliste erinevuste olemasolust ehk siis SRD5A2 aktiivsust muutvatest geneetilistest polümorfismidest (Amory et al. 2007).

Eelnevalt on *SRD5A2* geeni polümorfisme põhiliselt uuritud seoses riskiga haigestuda erinevatesse androgeen sõltuvatesse kasvajatesse nagu eesnäärmevähk (Giwerzman et al. 2005; Gsur et al. 2004; Hayes et al. 2007) ja munasarjavähk (Beesley et al. 2007). Samuti on üritatud leida seoseid *SRD5A2* polümorfismide ja androgeen seoseliste haigusseisundite nagu PCOS (Goodarzi et al. 2006) ja meeste kiilanemise (*Alopecia androgenica*) (Hayes et al. 2007) vahel. Spermaparameetrite (sperma kontsentratsioon ja liikuvus) muutusega seoses on *SRD5A2* geeni polümorfisme vaadeldud vaid Elzanaty koos kaasautoritega (Elzanaty et al. 2006).

Käesolevas töös viidi esmakordselt läbi assotsiatsiooni uuring, kus analüüsiti *SRD5A2* geeni viie (SNP1-SNP5) polümorfismi võimalikke seoseid mehe viljatuse tekkimisega. Töö tulemustest selgus, et *SRD5A2* geeni SNP1 C-alleeli kandvatel meestel on suurem risk azoo- ja oligozoospermia tekkeks. Samuti leiti, et SNP1 C alleeli (genotüübid GC+CC) kandvatel kontrollgrupi meestel olid võrreldes GG alleeli kandvate meestega, oluliselt väiksem, kuid siiski normi piiridesse jääv munandimaht. Kuidas võiksid SNP1 erinevad alleelsed variandid SRD5A2 funktsiooni ja aktiivsust mõjutada, ei ole teada. Kuna SNP1 paikneb erinevatel liikidel geeni promootorala hästi konserveerunud piirkonnas, siis võib oletada, et ühe nukleotiidi muutus (guanidiini asendumine tsütosiiniga) võiks potentsiaalselt muuta SRD5A2 transkriptsioonilist aktiivsust. Aheldatuse uuring näitas, et SNP1 oli tugevasti aheldunud SNP2 (V89L) polümorfismiga. Seega on võimalik, et SNP1 mõju mehe infertiilsusele on tingitud hoopis aheldatusest funktsionaalse SNP2-ga (V89L).

Nii *in vitro* kui *in vivo* uuringud on näidanud, et leutsiini esinemine V89L polümorfismis kutsub esile ensüümi aktiivsuse languse (Allen et al. 2003; Makridakis et al. 2000). Siiani on läbi viidud vaid üks V89L polümorfismi ja mehe viljakuse vahelisi seoseid kirjeldav töö, kus leiti, et polümorfismi V89L V- alleel on seotud spermatooside parema liikuvusega (Elzanaty et al., 2006). Kui Elzanaty koos kaasautoritega analüüsisid *SRD5A2* geeni polümorfismide esinemist tervetel sõjaväe eelsesesse kontrolli tulnud meestel, siis käesolevas töös vaadeldi *SRD5A2* polümorfisme nii viljatutel patsientidel kui kontrollgrupis. Käesoleva uuringu meestel, kes kandisid SNP2 (V89L) madala aktiivsusega G (L)- alleeli, oli rohkem kui kaks korda suurem tõenäosus viljatuse tekkimiseks, võrreldes CC genotüüpi kandvate meestega. Kuigi reproduktiivhormoonide väärtuste ja *SRD5A2* alleelsete variantide vahel seoseid ei leitud, on võimalik et muutused *SRD5A2* ensüümi aktiivsuses põhjustavad vaevumärgatava, vereseerumist tuvastamatu nihke just munandisese testosterooni/DHT tasakaalus. Saadud tulemus on kooskõlas Elzanaty ja kaasautorite poolt läbiviidud uuringuga (Elzanaty et al. 2006) ning Amory ja kaasautorite uuringuga (Amory et al. 2007), kus näidati, et *SRD5A2* inhibiitorite kasutamine ei mõjuta seerumi gonadotropiinide väärtusi (LH; FSH, östradiol). Erinevalt Elzanaty ja kaasautorite tööst (2006), ei tuvastatud käesolevas uuringus SNP2 (V89L) erinevate alleelide seoseid spermatooside parema liikuvusega ega sperma hulga.

Lisaks vaadeldi käesolevas töös veel introonis asuvate SNP-de (SNP3 ja SNP4) seoseid viljatuse tekkega. Analüüsil selgus, et nii SNP3 A alleel kui ka SNP4 C alleel olid seotud riskiga oligozoospermia tekkimiseks. Kuid kas *SRD5A2* ensüümi aktiivsust mõjutatakse otseselt või on SNP3 ja SNP4 aheldunud mõne eemalseisva funktsionaalse polümorfismiga, peavad välja selgitama edasised uuringud.

Käesolevas magistritöös leiti seosed *SRD5A2* geeni ühenukleotiidiliste polümorfismide ja mehe viljatuse tekkeriski suurenemise vahel. Leitud *SRD5A2* geeni riskialleelide tähtsuse hindamiseks tuleks järgnevatel uuringutes vaadelda riskialleele koos erinevate mehe reproduktiivtervist mõjutavate teguritega. Võimalik, et riskialleele kandvad mehed on geneetiliselt enam predispooneeritud erinevatele viljakust mõjutavatele teguritele.

Biomeditsiin on hetkel üks kiiremini arenevaid teaduse valdkondi ning esimesed geenikiibid (onkogeenide, apoptoosi geenide, kardio-vaskulaar geenid jt.) on juba edukalt välja töötatud ja praktilises meditsiinis kasutusele võetud. Teadlaste suur huvi mehe reproduktiivsüsteemiga seotud geenide ja geenimutatsioonide vastu lisab mehe viljakust mõjutavate geenide nimekirja pidevalt uusi kandidaatgeene ja kaugel pole aeg, kus mehe viljakuse hindamiseks ning viljatuse geneetiliste põhjuste väljaselgitamiseks on võimalik

kasutada geenikiipi. Käesoleva töö tulemused lisavad mehe viljakust mõjutavate geenide nimekirja kaks võimalikku kandidaatgeeni, *AR* ja *SRD5A2* ja nende polümorfismid

Kokkuvõte

Käesolevas magistritöös uuriti kahe potentsiaalse viljakust mõjutava geeni, *AR* ja *SRD5A2* geneetilisi variatsioone ning nende võimalikke seoseid mehe idiopaatilise infertiilsuse tekkega.

Kirjanduse osas anti ülevaade viljatuse probleemi tõsidusest ning hetke olukorrast Eestis. Omaette peatükis vaadeldi mehe viljakust, seda mõjutavaid tegureid, põhjuseid ja diagnoosimist ning viljatuse geneetilisi põhjusi. Olulise osa moodustas ülevaade spermatogeneesi protsessist ning selle hormonaalsest regulatsioonist. Pikemalt keskenduti androgeenide rollile spermatogeneesi protsessis ning *AR* ja *SRD5A2* geenide iseloomustamisele.

Magistritöö eksperimentaalses osas uuriti kuut *AR* geeni htSNP-d ja CAG/GGN mikrosatelliitseid kordusjärjestusi ning viit *SRD5A2* tagSNP-d idiopaatilise viljatusega eesti meestel ja kontrollindiviididel. *AR* uuringus tuvastati 13 (HAP1 - HAP13) sagedasemat haplotüüpi, millest HAP4 oli seotud riskiga mehe viljatuse tekkimiseks (OR = 5,15; 95% CI = 1,75–15,15; $p = 0,003$). Samuti leiti, et CAG/GGN mikrosatelliitsete kordusjärjestuste arv ei ole seotud riskiga mehe viljatuse tekkeks. Haplotüüpide ja CAG/GGN korduste omavahelisel analüüsil leiti, et HAP2 oli seotud pikemate ($r = 1,17$; $p = 0,033$) ja HAP3 lühemate ($r = 2,93$; $p < 0,001$) CAG kordusjärjestuste arvuga. HAP3 ja HAP4 olid seevastu seotud pikemate GGN väärtustega (regressiooni kordajad vastavalt 1,35 ja 1,36). *SRD5A2* geeni tagSNP-de analüüsil leiti, et SNP2 (rs523349) madala aktiivsusega G alleel oli seotud enam kui kahe kordse riskiga oligozoospermia (OR = 2,98; 95% CI 1,26 – 7,05; $p = 0,013$) ja azoospermia (OR = 2,87; 95% CI 1,01 – 8,19; $p = 0,048$) tekkimiseks. Samuti leiti, et SNP1 C alleel, SNP3 A alleel ja SNP4 C alleel olid seotud suurenenud riskiga mehe viljatuse tekkimiseks.

Magistritöö kokkuvõtteks võib öelda, et *AR* geeni riskihaplotüüpi (HAP4) ja *SRD5A2* geeni riskialleele kandvad meestel on suurenenud risk viljatuse tekkimiseks.

Summary

The purpose of the current study was to evaluate the importance of *AR* gene haplotypes and polymorphic CAG/GGN microsatellites and *SRD5A2* gene polymorphisms in the aetiology of idiopathic male infertility.

In this study six htSNPs and CAG/GGN microsatellites of the *AR* gene and five tagSNPs in the *SRD5A2* gene were genotyped. A total of 13 *AR* haplotypes (HAP1–13) were identified, among which HAP4 was found to confer increased risk for male infertility (OR = 5.15; 95% CI = 1.75–15.15; $p = 0.003$). However, infertile patients and controls had similar lengths and distributions of both *AR* CAG and GGN repeats. In addition, HAP2 was associated with longer CAG repeats ($r = 1.17$; $p = 0.033$) and HAP3 with shorter CAG repeats ($r = 2.93$; $p < 0.001$) than the major haplotype HAP1. HAP3 and HAP4 were associated with longer GGN repeats ($r = 1.35$; $p = 0.001$ and $r = 1.36$; $p = 0.002$, respectively) than HAP1. *SRD5A2* gene (rs523349) low activity G (L) allele of SNP2 (genotypes CG and GG) was associated both with azoospermia (OR = 2.87; 95% CI= 1.01 – 8.19) and oligozoospermia (OR = 2.98; 95% CI = 1.26 – 7.05). Also, the risk for azoospermia and oligozoospermia was higher for SNP1 C-allele and SNP4 C-allele carriers. SNP3 A-allele was a risk factor for oligozoospermia but not for azoospermia.

In conclusion, present work describes the *AR* and *SRD5A2* gene variations in infertile and control men in the Estonian population. The *AR* gene haplotype analysis and *SRD5A2* SNP analyses revealed, for the first time, the existence of an *AR* gene risk haplotype (HAP4) and *SRD5A2* risk alleles for impaired spermatogenesis and male infertility

Tänuavaldused

Kõigepealt soovin ma tänada oma juhendajat Maire Petersit igakülgse abi ja toetuse eest. Samuti tänan kõiki artikli kaasautoreid, eriti Andres Salumetsa, Kadri Hallerit, Anastasija Belousovat ja Andres Metspalu, nende panuse eest artikli valmimisse. Suur tänu ka Margus Punabile, Olev Poolametsale ja Kristo Ausmehele Tartu Ülikooli Kliinikumi Androloogia keskusest, kelle abiga moodustati uuritavad grupid ja saadi kliinilised andmed. Siiras tänu ka juhendaja Helle Karrole, Andres Salumetsa töögrupile, TÜMRI Biotehnoloogia õppetooli sõbralikule kollektiivile ja kõigile teistele, kes aitasid kaasa käesoleva töö valmimisele. Tänan ka oma perekonda mõistva suhtumise, toetuse ja kannatlikuse eest.

Magistritöö valmimist toetasid Eesti Teadusfondi grandid nr. 6498 ja 6585 ning Eesti Haridus- ja Teadusministeeriumi sihtfinatseering 0182582Cs03.

Kasutatud kirjandus

- Allen N, Reichardt J, Nguyen H, Key T: Association between two polymorphisms in the SRD5A2 gene and serum androgen concentrations in British men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:578-581.
- Amory J, Wang C, Swerdloff R, Anawalt B, Matsumoto A, Bremner W, Walker S, Haberer L, Clark R: The effect of 5alpha-reductase inhibition with dutasteride and finasteride on semen parameters and serum hormones in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1659-1665.
- Aquila S, Middea E, Catalano S, Marsico S, Lanzino M, Casaburi I, Barone I, Bruno R, Zupo S, Andò S: Human sperm express a functional androgen receptor: effects on PI3K/AKT pathway *Human Reproduction* 2007; 22:2594-2605
- Beesley J, Jordan S, Spurdle A, Song H, Ramus S, Kjaer SK, Hogdall E, DiCioccio R, McGuire V, Whittemore A, Gayther S, Pharoah PDP, Webb P, Chenevix-Trench G: Association Between Single-Nucleotide Polymorphisms in Hormone Metabolism and DNA Repair Genes and Epithelial Ovarian Cancer: Results from Two Australian Studies and an Additional Validation Set. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2007; 16:2557-2565.
- Bergmann M: Spermatogenesis--physiology and pathophysiology. *Urologe A* 2005 Oct;44(10):1131-2, 1134-8 2005; 44:1131-1138
- Bogatcheva N, AgoulNIK A: INSL3/LGR8 role in testicular descent and cryptorchidism. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:49-54.
- Bonde J, Ernst E, Jensen T, Hjollund N, Kolstad H, Henriksen T, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, . NS: Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet* 1998; 10:1172-1177.
- Bremner W, Millar M, . RS: Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence of a stage dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 1994; 135:1227-1234.
- Brockschmidt F, Nöthen M, Hillmer A: The two most common alleles of the coding GGN repeat in the androgen receptor gene cause differences in protein function. *J Mol Endocrinol* 2007; 39:1-8.
- Cai L, Fratianni C, Gautier T, Imperato-McGinley J: Dihydrotestosterone regulation of semen in male pseudohermaphrodites with 5 alpha-reductase-2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:409-414.
- Canale D, Caglieresi C, Moschini C, Liberati CD, Macchia E, Pinchera A, Martino E: Androgen receptor polymorphism (CAG repeats) and androgenicity. *Clinical Endocrinology* 2005; 63:356-361.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, N E Skakkebaek: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal* 1992; 305:609-613.
- Carrell DT, Jonge CD, Lamb DJ: The Genetics of Male Infertility: A Field of Study Whose Time is Now. . *Arch of Andrology* 2005; 52:269-274.
- Carrell DT, Jonge CD, Lamb DJ: The Genetics of Male Infertility: A Field of Study Whose Time is Now. *Arch of Andrology* 2006; 52:269-274.
- Casella R, Maduro M, Misfud A, Lipshultz L, Yong E, . DL: Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients. *J Urol* 2003; 169:224-227.
- Chamberlain N, Driver E, Miesfeld R: The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994; 11:3181-3186.
- Claustres M, Guittard C, D Bozon , Chevalier F, C Verlingue Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat* 2000; 16:143-156.

- Dadze S, Wieland C, Jakubiczka S, Funke K, Schröder E, Royer-Pokora B, Willers R, . PFW: 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. *Molecular Human Reproduction* 2000; 6:207-214.
- Davidoff M, Schulze W, Middendorff R, . AH: The Leydig cell of the human testis--a new member of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res* 1993; 271:429-439.
- Davis-Dao C, Tuazon E, Sokol R, Cortessis V: Male infertility and variation in CAG repeat length in the androgen receptor gene: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4319-4326.
- de-Bakker P, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel S, Daly M, . DA: Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 2005; 37:1217-1223.
- de-Kretser D: Male infertility.Review. *Lancet* 1997; 15:787-790.
- Diemer T, Desjardins C: Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Human Reproduction Update* 1999; 5:120-140.
- Dierich A, Sairam M, Monaco L, Fimia G, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P: Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13612-13617.
- Dowsing A, Yong E, Clark M, McLachlan R, Kretser Dd, . AT: Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet* 1999; 21:640-643.
- Edwards A, Hammond H, Jin L, Caskey C, Chakroborty R: Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12:241-253.
- Eicheler W, Tuohimaa P, Vilja P, Adermann K, Forssmann W, Aumüller G: Immunocytochemical localization of human 5 alpha-reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. *J Histochem Cytochem* 1994; 42:667-675.
- Elzanaty S, Giwercman Y, Giwercman A: Significant impact of 5alpha-reductase type 2 polymorphisms on sperm concentration and motility. *Int J Androl* 2006; 29:414-420.
- Esteban E, Rodon N, Via M, Gonzalez-Perez E, Santamaria J, Dugoujon J, Chennawi FE, Melhaoui M, Cherkaoui M, Vona G, Harich N, Moral P: Androgen receptor CAG and GGC polymorphisms in Mediterraneans: repeat dynamics and population relationships. *J Hum Genet* 2006; 51:129-136.
- Feng HL: Molecular Biology of Male Infertility. *Arch of Andrology* 2003; 49:19-27.
- Ferlin A, Arredi B, Foresta C: Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology* 2006; 22:133-141.
- Ferlin A, Garolla A, Garolla A, Foresta C, Bartoloni L, Rizzo G, Roverato A: Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Molecular Human Reproduction* 2004; 10:417-421.
- Foresta C, Ferlin A, Moro E: Deletion and expression analysis of AZFa-genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 2000; 9:1161-1169.
- Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A: Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3660-3665.
- Freedman M, Pearce C, Penney K, Hirschhorn J, Kolonel L, Henderson B, . DA: Systematic evaluation of genetic variation at the androgen receptor locus and risk of prostate cancer in a multiethnic cohort study. *Am J Hum Genet* 2005a; 76:82-90.
- Freedman M, Pearce C, Penney K, Hirschhorn J, Kolonel L, Henderson B, 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* 2005b:82-90.

- Gabriel S, Schaffner S, Nguyen H, Moore J, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero S, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander E, Daly M, Altshuler D: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296:2225-2229.
- Gao T, Marcelli M, McPhaul M: Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 59:9-20.
- George FW, Wilson JD: Sex determination and Differentiation. In Knobil E, Neill JD (eds.): *In The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd, New York, 1994.
- Giwerzman Y, Abrahamsson P, Giwerzman A, Gadaleanu V, Ahlgren G: The 5alpha-reductase type II A49T and V89L high-activity allelic variants are more common in men with prostate cancer compared with the general population. *Eur Urol* 2005; 48:679-685.
- Goodarzi M, Shah N, Antoine H, Pall M, Guo X, Azziz R: Variants in the 5alpha-reductase type 1 and type 2 genes are associated with polycystic ovary syndrome and the severity of hirsutism in affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4085-4091.
- Gottlieb B, Beitel L, Wu J, Trifiro M: The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 2004; 23:527-533.
- Griswold M: The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9:411-416.
- Gsur A, Feik E, Madersbacher S: Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol* 2004; 21:414-423.
- Haider S: Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 2004; 233:181-241.
- Hargreave T: Genetic basis of male fertility. *Med Bull* 2000; 56:650-671.
- Haugen T, Egeland T, Magnus O: Semen parameters in Norwegian fertile men. *J Androl* 2006 27:66-71.
- Hayes F, DeCruz S, Seminara S, Boepple P, Crowley W: Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:53-58.
- Hayes V, Severi G, Eggleton S, Padilla E, Southey M, Sutherland R, Hopper J, Giles G: The E211 G>A androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:993-996.
- Hayes V, Severi G, Padilla E, HA Morris HA, Tilley W, Southey M, English D, Sutherland R, Hopper J, Boyle P, Giles G: 5alpha-Reductase type 2 gene variant associations with prostate cancer risk, circulating hormone levels and androgenetic alopecia. *Int J Cancer* 2007; 120:776-780.
- Henderson N, Robaire B: Effects of PNU157706, a dual 5alpha-reductase inhibitor, on rat epididymal sperm maturation and fertility. *Biol Reprod* 2005; 72:436-443.
- Holdcraft R, Braun R: Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004; 27:335-342.
- Holstein A, Schulze W, Davidoff M: Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 1:1-22.
- Hsing A, Chen C, Chokkalingam A, Gao Y, Dightman D, Nguyen H, Deng J, Cheng J, Sesterhenn I, Mostofi F, Stanczyk F, JK JR: Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1077-1082.
- Irvine R, Yu M, Ross R, . GC: The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res* 1994; 1:1937-1940.
- Jarow J, Zirkin B: The androgen microenvironment of the human testis and hormonal control of spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1061:208-220.

- Jenkins E, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson J, Russell D: Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alpha-reductase. *J Clin Invest* 1992; 89:293-300.
- Jørgensen N, Asklund C, Carlsen E, Skakkebaek N: Coordinated European investigations of semen quality: results from studies of Scandinavian young men is a matter of concern. *Int J Androl* 2006; 29:54-61.
- Jørgensen N, Carlsen E, Nermoen I, Punab M, Suominen J, Andersen A, Andersson A, Haugen T, Horte A, Jensen T, Magnus Ø, Petersen J, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek N: East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002; 17:2199-2208.
- Kittles R, Young D, Weinrich D, Hudson J, Argyropoulos G, Ukoli F, Adams-Campbell L, Dunston G: Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Hum Genet* 2001; 109:253-261.
- Komori S, Kasumil H, Kanazawa R-i, Sakata K, Nakata Y, Kato H, Koyama K: CAG repeat length in the androgen receptor gene of infertile Japanese males with oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction* 1999; 5:14-16.
- Kumar N, Crozat A, Li F, Catterall J, Bardin C, Sundaram K: 7alpha-methyl-19-nortestosterone, a synthetic androgen with high potency: structure-activity comparisons with other androgens. *Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 71:213-222.
- La-Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH: Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; 352:77-79.
- Lei Z, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao C: Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 2001; 15:184-200.
- Lewontin R: On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988; 120:849-852.
- Lindzey J, MV Kumar , M Grossman , C Young , Tindall D: Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm* 1994; 49:383-432.
- Lissitsina J, Mikelsaar R, Punab M: Cytogenetic analyses in infertile men. *Arch Androl* 2006; 52:91-95.
- Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Wilson HN, French FS: Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9534-9538.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French F, Wilson E: Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localisation of the X chromosome. *Science* 1988; 240:327-330.
- Lund A, Tapanainen J, Lahdetie J, Savontaus M, Aittomaki K: Long CAG repeats in the AR gene are not associated with infertility in Finnish males. *Acta Obstet Gynecology Scand* 2003; 82:162-166.
- Lundin K, Giwercman A, Dizeyi N, Giwercman Y: Functional in vitro characterisation of the androgen receptor GGN polymorphism. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 29:184-187.
- Lundin K, Giwercman Y, Rylander L, Hagmar L, . AG: Androgen receptor gene GGN repeat length and reproductive characteristics in young Swedish men. *Eur J Endocrinol* 2006a; 155:347-354.
- Lundin K, Nordenskjöld A, Giwercman A, Giwercman Y: Frequent finding of the androgen receptor A645D variant in normal population. *J Clin Endocrinol Metab* 2006b; 91:3228-3231.
- Lundin KB, Giwercman A, Richthoff J, Abrahamsson P-A, Giwercman YL: No association between mutations in the human androgen receptor GGN repeat and inter-sex conditions. *Molecular Human Reproduction* 2003; 9:375-379.
- Lyon M, Glenister P, Lamoreux M: Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature* 1975; 258:620-622.

- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T: Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* 1996; 59:1-13.
- Makridakis N, Akalu A, Reichardt J: Identification and characterization of somatic steroid 5alpha-reductase (SRD5A2) mutations in human prostate cancer tissue. *Oncogene* 2004; 23:7399-7405.
- Makridakis N, Salle Ed, Reichardt J: Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 alpha-reductase type II. *Pharmacogenetics* 2000; 10:407-413.
- Matthiesson K, Amory J, Berger R, Ugoni A, McLachlan R, Bremner W: Novel male hormonal contraceptive combinations: the hormonal and spermatogenic effects of testosterone and levonorgestrel combined with a 5alpha-reductase inhibitor or gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:91-97.
- McGrath M, Lee I, Hankinson S, Kraft P, Hunter D, Buring J, Vivo. ID: Androgen receptor polymorphisms and endometrial cancer risk. *Int J Cancer* 2006; 1:1261-1268.
- McLachlan R, O'Donnell L, Meachem S, Stanton P, Kretser Dd, Pratis K, Robertson D: Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:149-179.
- Meachem S, Ruwanpura S, Ziolkowski J, Ague J, Skinner M, Loveland K: Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J Endocrinol* 2005; 183:429-446.
- Mendis-Handagama S: Luteinizing hormone on Leydig cell structure and function. *Histol Histopathol* 1997; 12:869-882.
- Mengual L, Oriola J, Ascaso C, Ballesca JL, Olivia R: An Increased CAG Repeat Length in the Androgen Receptor Gene in Azoospermic ICSI Candidates. *Journal of Andrology* 2003; 24:279-284.
- Mononen N, Ikonen T, Syrjäkoski K, Matikainen M, Schleutker J, Tammela T, Koivisto P, Kallioniemi O: A missense substitution A49T in the steroid 5-alpha-reductase gene (SRD5A2) is not associated with prostate cancer in Finland. *Br J Cancer* 2001; 18:1344-1347.
- Mruk D, Cheng C: Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 2004; 25:747-806.
- Nam R, Toi A, Vesprini D, Ho M, Chu W, Harvie S, Sweet J, Trachtenberg J, Jewett M, Narod S: V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology* 2001; 57:199-204.
- Neaves W, Johnson L, Porter J, Parker C, Petty C: Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 55:756-763.
- Nieschlag E: Classification of andrological diseases. In Nieschlag, E and Behre, H.(eds). *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. Berlin: Springer-Verlag, 1997:81-83.
- Nordenskjöld A, Ivarsson S: Molecular characterization of 5 alpha-reductase type 2 deficiency and fertility in a Swedish family.
- Nordenskjöld A, Ivarsson SA. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3236-3238.
- Part K, Laanpere M, Rahu K, Haldre K, Rahu M, Karro H: Eesti naiste tervis: seksuaal- ja reproduktiivtervis, tervisekäitumine, hoiakud ja tervishoiuteenuste kasutamine. Uurimisaruanne Tartu Ülikooli naistekliinik 2007.
- Platz E, Giovannucci E, Dahl D, Krithivas K, Hennekens C, Brown M, Stampfer M, Kantoff P: The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:379-384.
- Punab M: *Male Fertility and its Risk Factors in Estonia*. Tartu Ülikooli Kirjastus, 2007.
- Punab M, Korrovits P, Peetsalu A: Meeste viljakust mõjutavad haigused. *Eesti Arst* 2003; 82:181-187.

- Punab M, Zilaitiene B, Jørgensen N, Horte A, Matulevicius V, Peetsalu A, Skakkebaek N: Regional differences in semen qualities in the Baltic region. *Int J Androl* 2002; 25:243-252.
- Quigley C, Bellis AD, Marschke K, MK eA, Wilson E, French F: Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 1995; 16:371-321.
- Rajender S, Rajani V, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K: No association of androgen receptor GGN repeat length polymorphism with infertility in Indian Men. *Journal of Andrology* 2006.
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K: Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. Review. *Asian J Androl* 2007; 9:147-179.
- Rochira V, Granata A, Madeo B, Zirilli L, Rossi G, Carani C: Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years. *Asian J Androl* 2005; 7:3-20.
- Rowe JP, Comhaire FH, Hagraeve TB, Mahmoud A: WHO manual for the standadized investigation, diagnosis and management of intertile male. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- Ruhayel Y, Lundin K, Giwercman Y, Hallden C, Willen M, . AG: Androgen receptor gene GGN and CAG polymorphisms among severely oligozoospermic and azoospermic Swedish men. *Human Reproduction* 2004; 19:2076-2083.
- Sanborn B, Steinberger A, Tcholakian R: Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cells. *Steroids* 1977; 29:493-502.
- Santner S, Albertson B, Zhang G, Zhang G, Santulli M, Wang C, Demers L, Shackleton C, Santen R: Comparative rates of androgen production and metabolism in Caucasian and Chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2104-2109.
- Sarapik A: Autoantikehad viljatuse korral –kehavälise viljastamisega patsientide näitel. Tartu Ülikool (Bakalaureusetöö) 2005.
- Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Sato S, Homma K, Takahashi T, Hasegawa T, Matsuo N: Micropenis and the 5-alpha-reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *J Clin Endocr Metab* 2003a; 88:3431-3436.
- Sasaki M, Kaneuchi M, Sakuragi N, Fujimoto S, Carroll P, Dahiya R: The polyglycine and polyglutamine repeats in the androgen receptor gene in Japanese and Caucasian populations. *Biochem Biophys Res Commun* 2003b; 312:1244–1247.
- Seshagiri P: Molecular insiht into the causes of male infertility. *J Biosci* 2001; 26:429-435.
- Silver R, Russel D: 5-a-reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol* 1999; 162:1142-1145.
- Singh J, O'Neill C, Handelsman D: Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 1995; 136:5311-5321.
- Skinner M: Sertoli cell secreted regulatory factors In Skinner M, Griswold M (eds.): *Seroli Cell Biology* San Diego: Elsvier Science, 2005.
- Solakidi S, Psarra A, Nikolaropoulos S, Sekeris C: Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005; 20:3481-3487.
- Spira A: Epidemiology of human reproduction. *Human Reproduction* 1986; 1:111-115.
- Suarez-Quian C, Martknez-Garcça F, Nistal M, Regadera J: Androgen Receptor Distribution in Adult Human Testis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84:1350-1358.
- Zhou Z, Lane M, Kemppainen J, French F, Wilson E: Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 1995; 9:208-218.
- Tamm A, Västriik A, Sõritsa A, Poolamets O, Punab M: Y chromosome microdeletions as a cause of male infertility in Estonia. *Conference of Baltic Association for Andrology*. Kaunas, Lithuania, 2000.

- Terry KL, Vivo ID, LindaTitus-Ernstoff, Shih M-S, Cramer DW: Androgen Receptor Cytosine, Adenine, Guanine Repeats, and Haplotypes in Relation to Ovarian Cancer Risk. *Cancer Research* 2005; 65:5974-5981.
- Terävä A, Gissler M, Hemminki E, Luoto R: Infertility and the use of infertility treatments in Finland: Prevalence and socio-demographic determinants 1992-2004. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 136:61-66.
- Thai H, Kalbasi M, Lagerstedt K, Frisen L, Kockum I, A AN: The valine allele of the V89L polymorphism in the 5 α -reductase gene confers a reduced risk for hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:6695-6698.
- Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Gupta NJ, Chaktavarty B, Singh L: CAG Repeat Expansion in the Androgen Receptor Gene Is Not Associated With Male Infertility in Indian Populations. *Journal of Andrology* 2002; 23:815-818.
- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW: Tissue distribution and ontogeny of steroid 5-alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 1993; 92:903-910.
- Tut T, Ghadessy F, Trifiro M, Pinsky L, Yong E: Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3777-3782.
- Walker W, Cheng J: FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 2005; 130:15-28.
- Wallerand H, Remy-Martin A, Chabannes E, Bermont L, Adessi G, Bittard H: Relationship between expansion of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene and idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 2001; 76:769-774.
- Venables J, Cooke H: Lessons from knockout and transgenic mice for fertility in men. *J Endocrinol Invest* 2000; 23:584-591.
- WHO: Towards more objectivity in diagnosis and treatment of male infertility. *Int J Androl* 1987; 7.
- WHO: *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge, United Kingdom: University Press, 1999.
- Vierula M, Niemi M, Keiski A, Saaranen M, S Saarikoski, Suominen J: High and unchanged sperm counts of Finnish men. *Int J Androl* 1996; 19.
- Wilson J, Griffin J, Russel D: Steroid 5-a-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 1993; 14:577-593.
- Yeh S, Tsai M, Xu Q, Mu X, Lardy H, Huang K, Lin H, Yeh S, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce B, Hung M, Zhang S, Gan L, Chang C: Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13498-13503.

Lisad