: 30 4 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 4, 2003, 12

한국인 남성 불임 환자에서 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 유전자의 1298번의 다형성과의 관련성에 관한 연구

차병원 생식의학 및 불임유전체 연구센터[1], 비뇨기과[2], 차병원[3]

정유미[1] · 정태규[2] · 김현주[2] · 이숙환[1] · 박정훈[1] · 김남근[3]
김세현[3] · 차광렬[3] · 이수만[1]

Genetic analysis for Polymorphism of 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) A1298C and Infertile Males in Korea

Yu-Mi Jeong[1], Tae Gue Chung[2], Hyun Joo Kim[2], Sook Hwan Lee[1], Jung Hoon Park[1], Nam Keun Kim[3], Se Hyun Kim[3], Kwang Yul Cha[3], Suman Lee[1]

[1]Genome Research Center for Reproductive Medicine and Infertility, [2]Department of Urology, [3]CHA General Hospital, College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Objective: To investigate the association of genetic background between MTHFR A1298C genotype and male infertility.

Materials and Methods: We compared 377 infertile males with 396 healthy fertile males with one or more offspring. Infertile males were classified into four subtypes (281 azoospermia, 26 oligoasthenoteratozoospermia (OAT), 59 severe OAT and 11 remnants) by World Health Organization (WHO). Pyrosequencing analysis for MTHFR (methylenetetrahydrofolatereductase) A1298C variation was performed on polymerase chain reaction (PCR) product of study group. To validate pyrosequencing data of A1298C variation for randomly selected 50 samples, we compared the pyrosequencing result with the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) result of MTHFR A1298C genotype.

Results: We studied MTHFR A1298C variation by pyrosequencing. A1298C variation data (1298 AC; p=0.2166 and 1298 CC; p=0.5056) of MTHFR gene was no significant difference in between fertile and infertile males.

Conclusion: The genetic analysis in MTHFR gene didn't appear genetic difference in Korean fertile and infertile males. We require further study for MTHFR gene in infertile males.

Key Words: Male infertility/ MTHFR/ Pyrosequencing

MTHFR (methylenetetrahydrofolatereductase) 유전자 (gene)는 11개의 exon과 전체 전사 부위 (coding region) 1,980 bp을 가지며 염색체 (chromosome) 1p-36.3에 위치해 한다.[1,2] MTHFR는 5,10-methylenetetrahydrofolate에서 5-methyltetrahydrofolate로 전환을 촉진시켜주며, 호모시스테인 (homocysteine)에서 메

주관책임자: 이수만, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼 1동 606-5, 생식의학 및 불임 유전체 연구센터
Tel: (02) 3468-3445, Fax: (02) 3468-3464, e-mail: suman@cha.ac.kr
This work was supported by the Genome Research Center for Reproductive Medicine and Infertility (01-PJ10-PG6-01GN13-0002) from the Ministry of Health and Welfare, Korea).

치오닌 (methionine)으로 전환될 때 보조인자인 B_{12}에 의존적인 재매탈화 (remethylation) 과정에 대한 탄소 공여자 (carbon donor)가 되기도 한다. 또한 5-methyltetrahydrofolate는 재메틸화 과정에서 메틸기 공여자 (methyl donor)가 된다.[3] MTHFR 유전자는 알려진 다형성 (polymorphism)인 C677T를 가지고 있으며, 최근에는 MTHFR 유전자의 두 번째 다형성이 밝혀졌는데, 1298번의 exon 7에서 adenine이 cytosine으로 치환 (substitution)된다. MTHFR A1298C의 다형성은 glutamic acid (E)에서 alanine (A)으로 치환하여 효소의 활성 (enzyme activity)을 저하시킨다.[4]

호모시스테인 대사 과정 (homocysteine metabolism)에서 MTHFR의 다형성으로 인해 MTHFR의 활성이 감소되면 메치오닌의 양이 줄게 되어 S-adonosylmethionine (SAM)에 대한 S-adenosylhomocysteine (SAH)의 비율이 감소하게 되어 DNA 저메틸화 (hypomethylation)를 일으키게 된다.[5] MTHFR의 효소의 기능이 떨어지면 5-methyltetrahydrofolate의 양이 줄어 들어 호모시스테인에서 메치오닌으로 전환이 제대로 일어나지 않기 때문에 이전 까지는 고호모시스테인혈증 (hyperhomocysteinemia)을 일으키는 원인으로써 보고되었다. 호모시스테인 대사 과정에서 필수적인 요소 중 하나인 엽산 (folate)은 dihydrofolate로 전환되어 MTHFR 효소를 거쳐 결국 호모시스테인이 메티오닌으로 전환될 수 있도록 도와 주는 역할을 한다. 이러한 엽산과 DNA 합성에 연관된 아연 (zinc)을 처리한 결과 생식능력이 떨어지는 남성에게서 정자의 수가 늘어 난다는 연구 보고가 있다.[6]

A1298C는 C677T와 함께 신경관 결손 (neural tube defect), 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphocytic leukemia) 등을 일으키는 요인으로 연구되어 졌다.[7~10]

MTHFR 두 가지 다형성은 서로 다른 domain에 존재하면서 효소의 활성에 영향을 미치고 있다. MTHFR 677 다형성은 효소의 N-terminal catalytic domain에 존재하지만, MTHFR 1298번의 다형성은 C-terminal regulatory domain내의 exon 7에 위치하면서 1298 다형성이 C-말단 부위에 결합하는 MTHFR의 입체성 저해제 (allosteric inhibitor)인 SAM의 작용을 통해 MTHFR 효소 조절 기능에 영향을 주게 된다.[11] 위에서 언급한 바와 같이 다형성으로 인해 효소의 기능이 저하되어 호모시스테인의 축적이 일어나게 되고 그로 인해 해로운 반응 산소 대사물 (reactive oxygen metabolite)인 H_2O_2 (hydrogen peroxide)를 발생을 유도하여 반응 산소 대사물은 DNA 손상 (damage)을 일으키고, 결국 DNA 손상은 남성 불임 (male infertility)을 일으킬 수 있다.[12~14]

위와 같은 가능성에도 불구하고, 지금까지 MTHFR 활성을 저하시키는 다형성 중 하나인 A1298C의 연구에 대한 정보는 현저히 부족하며 특히, 남성 불임 환자에게서 1298 다형성의 연구 결과는 국내외 적으로 발표된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 한국인 남성 불임 환자들을 대상으로 하여 MTHFR 유전자의 MTHFR 1298 다형성이 불임의 유전적 원인이 될 수 있는지에 대한 연구를 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 2000년 1월부터 2002년 8월 동안 포천중문의대 강남 차병원에서 불임으로 진단받은 남성들 중 연구에 동의한 377명의 불임인 남성들과, 정상인 중에서 자녀를 1명 이상 낳은 396명의 출산 경험이 있는 남성들을 대조군으로 하여 실시하였다. 이들의 평균 나이는 각각 33.3세 (age range, 26~47)와 42.7세 (age range, 26~72)이다. 환자군에 대한 정액 검사 (semen analysis)는 Kruger[15]와 세계보건기구[16]에 의해 네 가지 집단 (281명의 비폐쇄성 무정자증 (non-obstructive azoospermia), 26명의 희소무력기형정자증 (oligoasthenoteratozoospermia (OAT)), 59명의 심각한 희소무력기형정자증 (severe OAT), 11 remnants)으로 분류하였으며, 또 다른 분류방식으로 염색체 이상과 Y 염색체 결실을 가진 (chromosome disorder and Yq deletion) 환자군 즉, 원인을 알 수 있는 환자군과 원인이 밝혀지지 않은 (unexplained males) 환자군으로 두 가지 집단으로 분류하여 분석하였다.

2. 연구 방법

Cytogenic 분석은 림프구 (lymphocyte)를 배양해서 유사분열중기 (metaphase)가 전개 (spread)될 때

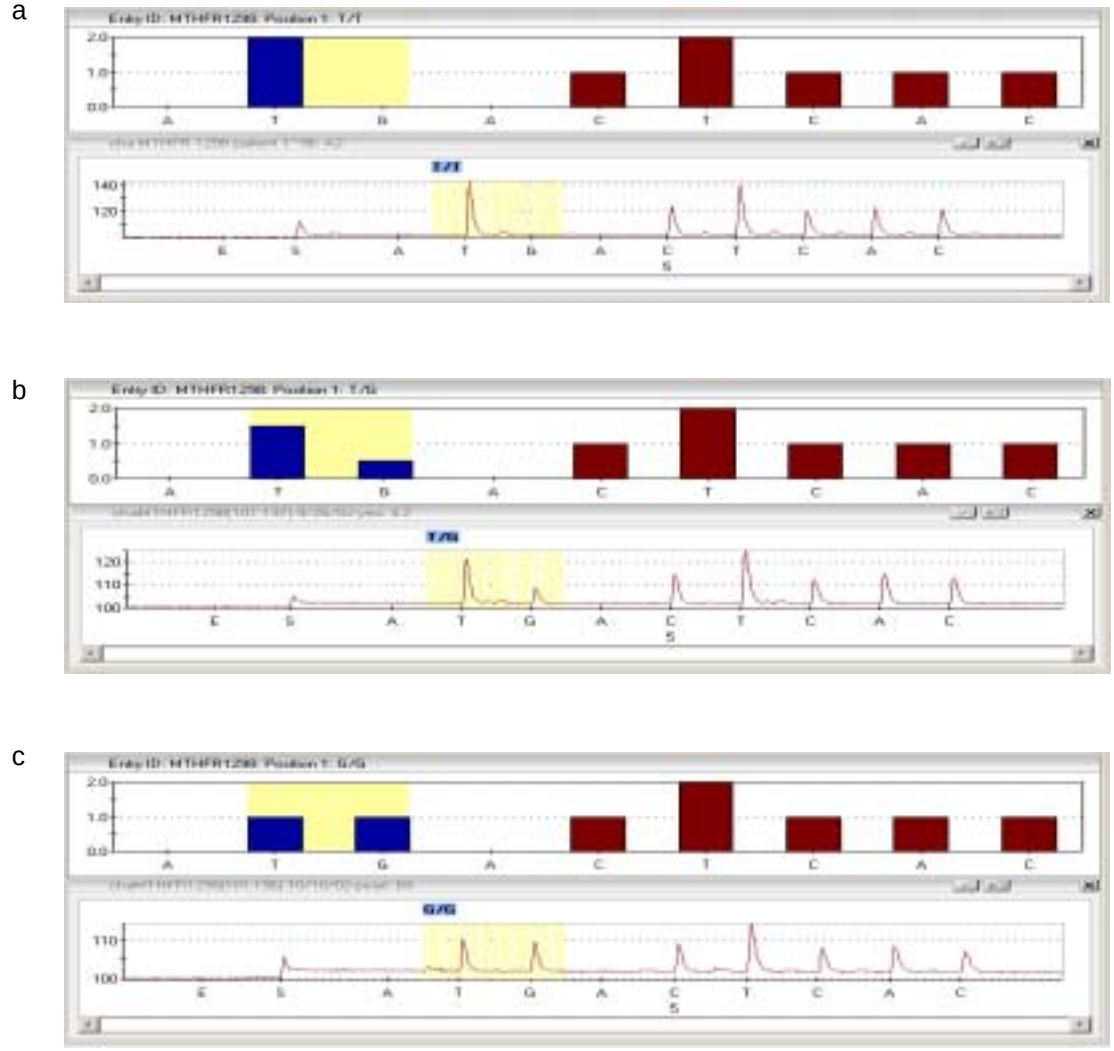

Figure 1. The pyrosequencing and PCR-RFLP results from fertile males and infertile males. The pyrosequencing analysis of the A1298C Polymorphism of MTHFR gene was carried out on all samples for MTHFR **(a)** 1298 AA type, **(b)** 1298 AC type and **(c)** 1298 CC type. The y axis of the bar graph in the pyrosequencing figures (a, b and c) is scaled such that the value of one nucleotide was 0.5. **(d)** The 138-bp of MTHFR 1298 AA undigested by Fnu4H I (Lane M, 1 Kb PLUS DNA ladder; Lane 1, 138-bp PCR product as control; Lane 2, MTHFR 1298 AA type (138 bp); Lane 3, MTHFR 1298 AC type (138 bp and 119 bp); Lane 4, MTHFR 1298 CC type (119 bp)).

수행한다. DNA는 불임인 남성과 정상인 남성의 말초혈액에서 추출한 백혈구로부터 분리하였고, 또한 하나의 SRY와 12개의 서열 표지 부위들 (Sequence Tagged Sites (STSs)) (AZF-a region: sY 84, sY 86, AZF-b region: sY 134, sY 138, MK5, AZF-c region: sY 152, sY 147, sY 254, sY 255, sPGY1, sY 269, sY 158)을 포함하는 13가지 부분을 Y 염색체에 대한 시발체 (primer)를 사용하여 multi-PCR에 의해 증폭시켰다.[17,18]

MTHFR 1298위치의 유전자형 분석은 파이로시퀀싱 (pyrosequencing)을 실시하였으며, 파이로시퀀싱의 원리는 DNA polymerase에 의해 뉴클레오티드 (nucleotide)가 결합된 결과로 피로인산 (PPi; pyrophosphate)이 떨어져 나오게 되는 효소의 연속적인 반응을 통한 시퀀싱 방법의 하나이다. 분리된 피로인산은 ATP sulfurylase에 의해 ATP로 전환되고 다시 luciferase에 의해 빛이 방출되어 원하는 부분의 서열 (sequence)을 찾아내는 원리를 이용하여 1298 다형성에 대한 유전자형 (genotype)을 분석하였다.

시발체 세트인 forward primer (5'-Biotin-TTT GGG GAG CTG AAG GAC TA-3')와 reverse primer (5'-TGG TTC TCC CGA GAG GTA AA-3')를 중합효소연쇄반응 (PCR) (MJ research thermal cycler, Waltham, USA)으로 증폭시켰다. 위와 같은 중합효소연쇄반응 증폭 방법을 통하여 1298번의 증폭 단편은 141 bp가 되도록 하여 생성물을 증폭하기 위해 어닐링 온도 (annealing temperature)를 58℃로 정하며 이 과정을 45회 반복하였다. 이 생성물들은 2% 아가로오스 겔 (agarose gel)로 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 증폭 상태를 관찰하였다. 바이오틴 (biotin)이 붙어있는 생성물은 파이로시퀀싱을 수행하기 위한 'sequence primer'인 5'-AAA GAC TTC AAA GAC ACT-3'을 이용하여 유전자형을 분석하였다.[19]

파이로시퀀싱 실험 결과를 유효화 하기 위해서 연구 대상 중 무작위로 50명의 DNA를 선정하여, 중합효소연쇄반응을 통한 제한효소절편길이 다형성 (Restriction Fragment Length Polymorphism)을 실시하였다. 1298번의 다형성은 forward primer (5'-GGG AGG AGC TGA CCA GTG CAG-3')와 reverse primer (5'-GGG GTC AGG CCA GGG GCA G-3')를 사용하여 중합효소연쇄반응 (MJ research thermal cycler, Waltham, USA)으로 138 bp 생성물을 증폭시키기 위해 95℃에서 변성시키고, 61℃에서 30초 동안 프라이머를 어닐링시킨 후, 72℃에서 30초 동안 프라이머 연장 (extension) 반응을 시행하는 과정을 35회 반복하였다. 1298 A→C 다형성을 인식할 수 있는 제한효소 Fnu4H I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)으로 37℃에서 1시간 동안 처리하였다. glutimic acid 대립유전자에서 얻어진 단편은 분해되지 않는 반면 alanine 대립유전자는 119 bp와 19 bp로 분해된다.[4] 제한효소로 처리한 단편들은 3% 아가로오스 겔로 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 다형성 상태를 관찰하였다.

3. 통계분석

통계적 분석은 SAS 통계 소프트웨어 (SAS Institute, Cary, NC)를 이용하여 카이제곱 (Chi-square) 검정, 피셔 (Fisher's exact) 검정을 하였다. 남성 불임의 비교 위험도를 측정하기 위하여 odd ratio 값 (odd ratio; OR)과 95% 신뢰구간 (95 percent confidence intervals, 95% CI)을 나타내었다. p값이 0.05 이하일

Table 1. Distribution of the genotypes of MTHFR (methylenetetrahydrofolatereductase) A1298C in infertile and fertile males

	Fertile males (n=396)	Infertile males (n=377)	OR (95% CI)	P
1298AA	67.93% (n=269)	63.40% (n=239)		
1298AC	28.03% (n=111)	31.83% (n=120)	1.22 (0.89~1.66)	0.2166
1298CC	4.04% (n=16)	4.77% (n=18)	1.27 (0.63~2.54)	0.5056
AC + CC	32.07% (n=127)	36.60% (n=138)	1.22 (0.91~1.65)	0.1843
C allele	18.06% (n=143)	20.69% (n=156)	1.18 (0.92~1.52)	0.1899

OR = odds ratio; CI = confidence interval

때, 통계적으로 유의적인 값을 가진다.

결 과

본 연구의 대상이 되었던 불임인 남성들은 377명, 정상인 남성들은 396명이었다. 파이로시퀀싱의 방법을 통하여 분석된 1298 다형성에 대한 유전자형은 RFLP방법을 통하여 확인되었으며 이 결과는 Figure 1에 나타내었다.

Table 1은 환자군과 대조군의 전체적인 유전자형의 빈도율 (frequency)을 분석한 결과이다. 1298 A/C (p=0.2166)와 C/C (p=0.5056)는 환자군과 대조군에

Table 2. The frequency of MTHFR (methylenetetrahydrofolatereductase) A1298C genotype according to the subtype of infertile male group

	1298AA	1298AC	1298CC
Azoospermia (n=281)	61.21% (n=172)	33.10% (n=93)	5.69% (n=16)
OR (95% CI)	-	1.31 (0.94~1.83)	1.56 (0.76~3.21)
P	-	0.1139	0.2196
OAT* (n=26)	61.54% (n=16)	34.62% (n=9)	3.84% (n=1)
OR (95% CI)	-	1.36 (0.58~3.18)	1.05 (0.13~8.43)
P	-	0.4714	0.9628
severe OAT† (n=59)	74.58% (n=44)	23.73% (n=14)	1.69% (n=1)
OR (95% CI)	-	0.77 (0.41~1.46)	0.38 (0.05~2.95)
P	-	0.4256	0.3388
Remnant‡ (n=11)	63.64% (n=7)	36.36% (n=4)	-
OR (95% CI)	-	1.38 (0.40~4.82)	-
P	-	0.6077	-
Male control (n=396)	67.93% (n=269)	28.03% (n=111)	4.04% (n=16)

*Oligoasthenoteratozoospermia (sperm count $<20\times10^6$, progressive motility <50%, normal morphology <14%),
†Severe oligoasthenoteratozoospermia (sperm count $<0.5\times10^6$, progressive motility <10%, normal morphology <4%),
‡Retractile testis, oligozoospermia (sperm count $<20\times10^6$), difficulty in ejaculation, OR = odds ratio; CI = confidence interval

Table 3. The frequency of MTHFR (methylenetetrahydrofolatereductase) A1298C in infertile males according to cytogenetic analysis and Yq deletion analysis

	1298AA	1298AC	1298CC
Unexplained males (n=262)	61.83% (n=162)	33.21% (n=87)	4.96% (n=13)
OR (95% CI)	-	1.30 (0.92~1.83)	1.35 (0.63~2.87)
P	-	0.1303	0.4369
Chromosome disorder and Yq deletion (n=115)	66.96% (n=77)	28.70% (n=33)	4.34% (n=5)
OR (95% CI)	-	1.04 (0.65~1.65)	1.09 (0.39~3.08)
P	-	0.8728	0.8681
Male control (n=396)	36.62% (n=145)	50.50% (n=200)	12.88% (n=51)

OR = odds ratio; CI = confidence interval

서 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($p>0.05$). Table 1에서는 A/C와 C/C를 합친 빈도율 (A/C+C/C)과 C 대립유전자 (allele)만의 통계적인 유의성을 찾기 위해 C allele의 빈도율에 대한 통계 분석을 실시하였지만, 이 두가지 사항도 환자군과 대조군 사이의 유의적인 차이가 없었다 ($p>0.05$).

Table 2에서는 정액분석과 염색체 검사를 통한 네 가지 진단명에 따라 분류되는 환자군 유전자형의 빈도수를 대조군과 비교하여 조사하였다. 무정자증, 희소무력기형정자증, 심각한 희소무력기형정자증과 remnant로 이루어진 네 가지 부분 환자 집단에서 MRHFR 1298번의 다형성을 대조군과 비교시 의미있는 결과는 나타나지 않았다 ($p>0.05$).

Table 3에서는 MTHFR 1298의 다형성에 대한 또 다른 분류 방법으로 환자군을 크게 두 가지로 나눠 염색체 이상과 Y 염색체 결실을 가진 원인을 알 수 있는 환자군과 원인이 밝혀지지 않은 환자군으로 나눠서 분석을 하였다. 1298번의 A/C, C/C은 두 집단 모두 통계적 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($p>0.05$).

고 찰

MTHFR 유전자는 심장혈관질환 (Cardiovascular disease),[20] 다운증후군 (Down's syndrome)[9]와 소아뇌졸중 (pediatric Stroke)[21] 등에 대하여 677번 뿐만 아니라 1298번의 다형성에 대한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 현재까지 남성 불임에 대한 MTHFR 유전자의 다형성에 대한 연구 보고는 거의 없었으며, 독일 집단[10]에서 남성 불임과 MTHFR 677의 다형성에 대한 유의성 있는 결과 ($p=0.008$)를 나타낸 것 외에는 남성 불임에 대한 연구는 이루어 지지 않았고, 불임 남성에게서 MTHFR 1298번 유전자 다형성의 연구에 관한 보고는 더욱 더 연구되지 않았다. MTHFR의 677뿐만 아니라 12984 다형성이 효소의 활성을 저하시키므로 본 연구는 남성 불임에서 MTHFR 1298 다형성의 관련성을 분석하고자 하였다.

본 연구는 파이로시퀀싱의 방법을 이용하여 MTHFR 1298 다형성에 대한 분석을 실시하였다. 파이로시퀀싱은 라벨이 붙은 뉴클레오티드와 프라이머를 사용하며, 네 가지 효소 (polymerase, ATP sulfurylase, apyrase, luciferase)를 사용하여 검출하므로 전기영동이 요구되지 않으며, 짧은 시간과 실시간으로 확인이 가능한 장점을 가지고 있어서 기존의 단일 염기 다형성 (Single Nucleotide Polymorphism)에 대한 방법보다 편리하고 정확하다.[19]

남성 불임 환자에 대한 MTHFR 1298 다형성의 결과를 진단명에 따른 집단 (Table 2)과 원인의 유무 (Table 3)에 따라 세분화 하여 분류하였다.

연구 결과 Table 1에서는 1298 A/C와 C/C에서 정상인 남성 집단과 불임 남성 집단에서의 차이를 나타내지 못했을 뿐만 아니라, Table 2에서의 진단명 (무정자증, 희소무력기형정자증, 심각한 희소무력기형정자증, remnant)에 따라 나타날 수 있는 1298의 A/C, C/C의 특이적인 관련성에 대한 결과와 Table 3에서 남성 불임 환자의 cytogenic 분석과 Y 염색체 결실 검사를 통해 원인의 유무 (염색체 이상과 Y 염색체 결실 집단, 원인을 알 수 없는 집단)에 따른 두 집단을 정상 남성 그룹과 비교한 결과도 모두 유의성 차이를 보이지 못했다. 따라서 MTHFR 1298 다형성은 남성 불임의 유전적 원인이 될 수 없다.

MTHFR 1298은 독립적으로 효소의 활성은 저하시킬 수 있지만, 호모시스테인의 수치 증가와 낮은 엽산의 수치에 대한 독립적인 요소가 아니라는 연구 결과가 보고된 적이 있다.[8] 본 연구 결과를 바탕으로 하여 1298 다형성과 호모시스테인 증가, 엽산의 결핍과 관련이 있는 MTHFR 677 다형성의 복합적인 작용이 남성 불임에 대한 유전적 요소가 될 가능성도 배제할 수 없다. 677 변이뿐만 아니라 호모시스테인 대사 과정의 CBS (cystathionine beta-synthase), MS (methionine synthase)와 같은 다른 유전자에 대한 다형성 분석을 통하여 남성 불임에 대한 정확하고 종합적인 판단이 필요하다.

참 고 문 헌

1. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Mamm Genome 1998; 9: 652-6.
2. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate re-

ductase. J Nephrol 2000; 13: 20-33.
3. Chango A, Boisson F, Barbe F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, et al. The effect of 677C- ->T and 1298A- ->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. Br J Nutr 2000; 83: 593-6.
4. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab 1998; 64: 169-72.
5. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. Cancer Res 1992; 52: 2071s-7s.
6. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertil Steril 2002; 77: 491-8.
7. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 12810-5.
8. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? Am J Hum Genet 1998; 62: 1044-51.
9. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. Am J Clin Nutr 1999; 70: 495-501.
10. Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. N Engl J Med 2001; 344: 1172-3.
11. Rozen R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. J Inherit Metab Dis 1996; 19: 589-94.
12. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. J Clin Invest 1986; 77: 1370-6.
13. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. J Clin Invest 1996; 98: 5-7.
14. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. Mol Hum Reprod 1996; 2: 613-9.
15. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118-23.
16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interation. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.
17. Simoni M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. Hum Reprod 2001; 16: 402-9.
18. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Muller CR, et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Int J Androl 1999; 22: 292-9.
19. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyren P, Uhlen M, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. Anal Biochem 2000; 280: 103-10.
20. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. Am J Clin Nutr 2000; 72: 324-32.
21. Akar N, Akar E, Ozel D, Deda G, Sipahi T. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. Thromb Res 2001; 102: 115-20.