

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Srećko Ž. Rajovski

**STUDIJA ASOCIJACIJE VARIJANTI U GENIMA
PRMT6, PEX10, SOX5, MIR27A I MIR146A SA
RIZIKOM ZA RAZVOJ IDIOPATSKE NEPLODNOSTI
KOD MUŠKARACA IZ SEVERNE MAKEDONIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Srećko Ž. Rajovski

**THE STUDY OF ASSOCIATION OF VARIANTS IN
GENES *PRMT6*, *PEX10*, *SOX5*, *MIR27A* AND
MIR146A WITH MALE INFERTILITY RISK AMONG
MEN FROM NORTH MACEDONIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Mentor:

dr Goran Brajušković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Miloš Brkušanin, docent, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Jovan Pešović, docent, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Zorana Dobrijević, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu-Institut za primenu nuklearne energije-INEP

Datum odbrane: _____



Ova doktorska disertacija urađena je u Centru za humanu molekularnu genetiku Univerziteta u Beogradu–Biološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr Gorana Brajuškovića.

Doktorska disertacije je rezultat saradnje sa Privatnom kliničkom bolnicom „Adžibadem Sistina Skopje” Skoplje, Republika Severna Makedonija.

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Goranu Brajuškoviću na uspešnom vođenju moje disertacije, korisnim savetima i konstantnoj podršci.

Veliku pomoć u svim fazama izrade doktorske disertacije imao sam i od prof. dr Dušanke Savić-Pavićević, rukovodioca Centra za humanu molekularnu genetiku kojoj se iskreno zahvaljujem.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem dr Zorani Dobrijević na pomoći tokom interpretacije i statističke obrade rezultata kao i pisanju publikacija proisteklih iz ove teze.

Doc. dr Milošu Brkušaninu i doc. dr Jovanu Pešoviću dugujem zahvalnost na korisnim sugestijama tokom pisanja same teze.

Naravno zahvalnost dugujem i svim kolegama iz Centra za humanu molekularnu genetiku Univerziteta u Beogradu–Biološkog fakulteta na podršci, pomoći i divnoj atmosferi tokom izrade eksperimentalnog dela doktorske disertacije.

Ove doktorske disertacije ne bi bilo bez saradnje sa kolegama iz Privatne kliničke bolnice „Adžibadem Sistina Skopje” Skoplje, Republika Severna Makedonija. Tokom selektovanja muškaraca čiji su biološki uzorci bili uključeni u ovu doktorsku disertaciju bila je važna analiza prisustva delecija Y hromozoma koja je rađena u laboratoriji MANU (mak. *Македонската академија на науките и уметностите*). Svim kolegama iz Severne Makedonije iskreno se zahvaljujem na pomoći i podršci.

Zahvalnost dugujem i svojoj porodici i prijateljima na podršci tokom izrade doktorske disertacije.

Studija asocijacije varijanti u genima *PRMT6*, *PEX10*, *SOX5*, *MIR27A* i *MIR146A* sa rizikom za razvoj idiopatke neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Sažetak

Posle malignih tumora i vaskularnih bolesti, Svetska zdravstvena organizacija neplodnost definiše kao treću najčešću bolest ljudi sa preko 190 miliona neplodnih osoba širom sveta. Klinička neplodnost ili sterilitet definiše se kao nemogućnost začeća kod para koji ima redovne seksualne odnose u vremenskom periodu od godinu dana. Terminološki „muška neplodnost“ ne predstavlja jasno definisan klinički sindrom, već obuhvata skup različitih urođenih ili stečenih stanja heterogene etiologije. Kod skoro trećine parova za problemom začeća odgovorna je muška neplodnost. Muška neplodnosti bez jasne etiologije naziva se idiopatska neplodnost. Među brojnim faktorima koji uzrokuju razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca, dominantni uzročnici su genetičke i epigenetičke promene. Kada je neplodnost muškaraca u pitanju, rezultati prve GWAS pokazale su statistički značajnu asocijaciju tri varijante u genima za proteine: *PRMT6* (rs12097821), *PEX10* (rs2477686) i *SOX5* (rs10842262) sa rizikom za pojavu neplodnosti kod muškaraca poreklom iz Kine. Jedan od ciljeva ove disertacije bila je da se ispita da li se rezultati ove GWAS odnose i na muškarace iz Severne Makedonije. Nakon sprovedene studije slučajeva i kontola, cilj ove disertacije bila je i meta-analiza ove i drugih studija slučajeva i kontrola koje su za temu imale moguću asocijaciju ove tri genetičke varijante sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti. Grupa slučajeva u kojoj je ispitivana asocijacija genetičkih varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262 sa pojavom idiopatske neplodnosti uključivala je 137 muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatske neplodnosti, dok je kontrolnu grupu činilo 130 zdravih dobrovoljaca odgovarajućeg uzrasta koji su imali najmanje jedno dete. Genetičke varijante rs12097821, rs2477686 i rs10842262 nisu pokazale statistički značajnu povezanost sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije. Učestalost alela G genetičke varijante rs10842262 je značajno povećana u grupi neplodnih muškaraca sa niskim volumenom ejakulata, u poređenju sa fertilnim muškarcima, dok je učestalost genotipa GG genetičke varijante rs10842262 kod muškaraca sa oligospermijom oko dva puta bila veća u odnosu na onu utvrđenu kod fertilnih muškaraca. Rezultati meta-analize ukazuju na povezanost između manje učestalog alela G genetičke varijante rs10842262 i muške idiopatske neplodnosti. Nakon stratifikacije prema etničkoj pripadnosti učesnika, rs10842262 je ostao statistički značajno povezan sa neplodnošću kod muškaraca Azijskog porekla. Za drugu testiranu varijantu rs2477686, rezultati kvantitativne sinteze podataka nisu bili statistički značajni. Na kraju, rezultati meta-analize ukazuju na povezanost između genetičke varijante rs12097821 i idiopatske neplodnosti muškaraca. Mikro RNK su mali nekodirajući molekuli RNK koji regulišu ekspresiju gena na postranskripcionom nivou i učestvuju u kontroli širokog spektra ćelijskih procesa. Postoje eksperimentalni podaci da promena u ekspresiji molekula miR-27a i miR-146a imaju uticaj na odvijanje procesa spermatogeneze i posledičan ukupan broj spermatozoida u ejakulatu. Prekomerna ekspresija miR-27a detektovana je u biološkim uzorcima muškaraca sa kliničkom dijagnozom neobstruktivne azospermije. Ekspresija miR-146a je značajno smanjena u uzorcima muškaraca sa azospermijom, dok je povišena u uzorcima muškaraca sa astenozoospermijom. Genetička varijanta rs2910164 locirana je u regionu semena pratećeg

lanca miR-146 i generiše zamenu baznog para G:U sa baznim parom C:U koji ima efekta u procesu sazrevanja zrele miR-146a. Genetička varijanta rs895819 locirana je u regionu klastera gena pri-miRNK za miR-23a, miR-24a i miR-27a. Identifikovan je kao genetička varijanta koja dovodi do promene u sekundarnoj strukturi prekursora miR-27a. Do danas nisu rađene studije asocijacije varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca slovenskog porekla. Grupa slučajeva u kojoj je ispitivana moguća asocijacija genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti obuhvatala je 158 muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatske neplodnosti iz Severne Makedonije. Rezultati ove studije nisu pokazale statistički značajnu povezanost genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije. Rezultati naše studije slučajeva i kontrola pokazali su povezanost genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa određenim podtipovima idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije. Manje učestali alel C rs2910164 statistički je značajno češći kod muškaraca sa astenoteratozoospermijom u odnosu na druge podtipove idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije. Neplodni muškarcima sa prisustvom spermatozoida sa genotipom GC varijante rs2910164 pokazali su niži procenat živih spermatozoida. Nosioци genotipa TC genetičke varijante rs895819 pokazali su niži procenat progresivno pokretnih spermatozoida u poređenju sa neplodnim muškarcima sa najčešćim genotipom TT.

Ključne reči: muška neplodnost, studija slučajeva i kontrola, meta-analiza, *PRMT6*, *PEX10*, *SOX5*, *MIR27A* i *MIR146A*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

The study of association of variants in genes *PRMT6*, *PEX10*, *SOX5*, *MIR27A* and *MIR146A* with male infertility risk among men from North Macedonia

Abstract

Following malignant tumors and vascular diseases, the World Health Organization ranks infertility as the third most prevalent human health condition, affecting over 190 million individuals globally. Clinically, infertility is defined as the inability to conceive after one year of regular, unprotected intercourse in a couple. "Male infertility" does not represent a well-defined clinical syndrome but rather encompasses a variety of congenital and acquired conditions with heterogeneous etiologies. In approximately one-third of infertile couples, male infertility is identified as the primary cause of impaired conception. When no clear cause is identified, the condition is termed idiopathic infertility. Among the various factors contributing to idiopathic male infertility, genetic and epigenetic alterations are predominant. The first genome-wide association study (GWAS) has identified significant associations between male infertility and three genetic variants: *PRMT6* (rs12097821), *PEX10* (rs2477686), and *SOX5* (rs10842262) in Chinese men. One of the goals of this dissertation was to examine whether the results of this GWAS also apply to men from North Macedonia. After conducting a case-control study, the goal of this dissertation was a meta-analysis of this and other case-control studies that had as their topic the possible association of these three genetic variants with the risk for the development of idiopathic infertility. The case group comprised 137 men with clinically diagnosed idiopathic infertility, while the control group included 130 healthy volunteers of comparable age, all of whom had fathered at least one child. The results of the case-control study revealed no statistically significant association between the variants rs12097821, rs2477686, and rs10842262 and the risk of developing idiopathic infertility in men from North Macedonia. However, the frequency of the G allele of rs10842262 was significantly higher in infertile men with low ejaculate volume compared to their fertile counterparts. Additionally, the GG genotype of rs10842262 was found to be approximately twice as frequent in men with oligospermia relative to fertile men. The meta-analysis provided further insight, showing an association between the minor G allele of rs10842262 and male idiopathic infertility. Notably, this association remained statistically significant in Asian populations. Conversely, the rs2477686 variant did not show a significant association in the meta-analysis. In contrast, rs12097821 was found to be associated with male idiopathic infertility. MicroRNAs are small noncoding RNA molecules that function broadly as negative regulators of gene expression to control a wide range of cellular processes. Further examination of the molecular mechanisms underlying male infertility revealed that alterations in the expression of microRNAs, such as miR-27a and miR-146a, play a crucial role in spermatogenesis and sperm quality. Overexpression of miR-27a has been observed in men with non-obstructive azoospermia, while miR-146a expression was significantly decreased in azoospermic men but elevated in men with asthenozoospermia. The genetic variant rs2910164, located in the "seed" region of miR-146a, causes a G:U base pair substitution that affects miR-146a maturation. Similarly, the variant rs895819, situated within the pri-miRNA gene cluster for miR-23a, miR-24a, and miR-27a, alters the secondary structure of the miR-27a precursor. To date, no studies have explored the associations of the rs2910164 and rs895819 variants with idiopathic infertility in Slavic populations. In this study, 158 men from North Macedonia with clinical diagnoses of idiopathic infertility were examined for these genetic variants. The results did not indicate a significant association between either rs2910164 or rs895819 and the risk of idiopathic infertility. However, a closer look at subtypes of idiopathic infertility revealed that the C allele of rs2910164 was significantly more frequent

in men with asthenoteratozoospermia compared to other infertility subtypes. Additionally, men with the GC genotype of rs2910164 exhibited a lower percentage of live sperm. Infertile men carrying the TC genotype of rs895819 demonstrated a lower percentage of progressively motile sperm compared to those with the common TT genotype. These findings suggest that while no overall association was found, these genetic variants may influence specific subtypes of male idiopathic infertility in the North Macedonian population.

Keywords: male infertility, case-control study, meta-analysis, *PRMT6*, *PEX10*, *SOX5*, *MIR27A* and *MIR146A*

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biochemistry and molecular biology

Lista skraćenica

A – Adenin (azotna baza)

AH – Androgeni hormon

AIC – Akaike informacijski kriterijum

AIS – Sindrom neosetljivosti na androgene hormone (eng. *Androgen insensitivity syndrome*, AIS)

ANAPC1 – *Subjedinica 1 kompleksa za inicijaciju anafaze* (eng. *Anapae Promoting Complex Subunit 1, ANAPC1*)

AR – androgeni receptor

ART – Potpomognuta reproduktivna tehnologija (eng. *Assisted Reproductive Technology*, ART)

AZF – Azoospermija faktor (eng. *AZOospemia Factor*, AZF)

BLAST – eng. *Basic Local Alignment Search Tool*

BOMB protokol – eng. *Bio-On-Magnetic-Beads Protocol*

bp – Bazni par

BSA – Govedi serumski albumin (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA)

C – Citozin (azotna baza)

CDY – Protein sa hromodomenom Y-vezan (eng. *Chromodomain protein, Y-linked gene*, CDY)

CFTR – Transmembranski protein povezan sa cističnom fibrozom (eng. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, CFTR)

CI – Interval poverenja (eng. *Confidence Interval*, CI)

CNVs – Varijacije u broju kopija (eng. *Copy number variations*, CNVs)

DBY – Protein sa DEAD domenom DBY (eng. *DEAD box polypeptide 3, Y-linked*, DBY)

DMRs – Diferencijalno metilovani regioni (eng. *Differentially methylated regions*, DMRs)

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

EDTA- Etilendiamintetrasiržetna kiselina (eng. *Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA)

Et-Br – Etidijum-bromid

FAM131C – Član C familije sa sekvencom sličnom 131 (eng. *Family with sequence similarity 131 member C, FAM131C*),

FRET – Transfer fluorescentne rezonantne energije (eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET)

G – Guanin (azotna baza)

GWAS – Studija asocijacije na čitavom genomu (eng. *Genome Wide Association Study*, GWAS)

HLA-DRB1 – Protein MHC, klase II, DR beta 1 (eng. *major histocompatibility complex, class II, DR beta 1, HLA-DRB1*),

HWE – Hardy-Vajnbergova ravnoteža (eng. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE)

I² – indeks nedoslednosti (eng. *Inconsistency Index*)

iRNK – Informaciona ribonukleinska kiselina

K562 – Komercijalno dostupan molekul DNK visoke molekulske mase (eng. *K562 DNA High Molecular Weight*)

KMT2C – Lizin N-metiltransferaza 2C (eng. *Lysine N-methyltransferase 2C, KMT2C*)

MLPA – Metoda višestrukog umnožavanja ligiranih proba (eng. *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification, MLPA*)

NO – Azot-monoksid

NOA – Neobstruktivna azoospermija (eng. *Nonobstructive Azoospermia, NOA*)

NOS3 – Azot-monoksid-sintetaza 3 (eng. *Nitric-oxide synthase 3, NOS3*)

OR – Odnos šansi (eng. *Odds Ratio, OR*)

PCR – Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*)

PEX10 – Faktor biogeneze peroksizoma 10 (eng. *Peroxisomal Biogenesis Factor 10, PEX10*)

PRMT6 – Protein arginin N-metiltransferaza 6 (eng. *Protein arginine N-methyltransferase 6, PRMT6*)

RFLP – Polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*)

RNK – Ribonukleinska kiselina

ROS – Reaktivne vrste kiseonika (eng. *Reactive oxygen species, ROS*)

SAA1 – Amiloid seruma A1 (eng. *Serum Amyloid A1, SAA1*),

SOX 5 – Transkripcioni faktor sa SRY-boksom 5 (eng. *SRY-Box Transcription Factor 5, SOX5*)

SRGAP2 – eng. *SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2*

SUSD2 – Protein sa Sushi domenom 2 (eng. *Sushi Domain Containing 2, SUSD2*)

T – Timin (azotna baza)

TBE pufer – eng. Tris/Borate/EDTA, TBE

TP – Tranzicioni protein (eng. *Transitional protein, TP*)

TSPY 1 – Testis specifičan Y-onom kodiran protein 1 (eng. *Testis-specific Y-encoded protein 1, TSPY 1*)

U – Uracil (azotna baza)

USP9Y – Ubikvitin specifična proteaza 9 Y-vezana (eng. *Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked, USP9Y*)

UV – Ultraljubičasto zračenje

Vit – procenat živih spermatozoida (tokom analize ejakulata spermogramom)

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization, WHO*)

SADRŽAJ

1.	Uvod	1
1.1.	Neploidnost kod muškaraca	1
1.1.1.	Definicija neplodnosti	1
1.1.2.	Etiologija muške neplodnosti	1
1.1.3.	Dijagnostika muške neplodnosti	2
1.1.4.	Lečenje muške neplodnosti	4
1.2.	Molekularna osnova neplodnosti kod muškaraca	4
1.2.1.	Hromozomske aberacije	4
1.2.2.	Mikrodelecije dugog kraka hromozoma Y kao uzročnici muške neplodnosti	5
1.2.3.	Varijacije u broju kopija kao uzročnici muške neplodnosti	5
1.2.4.	Mutacije u genima za proteine kao uzročnici neplodnosti kod muškaraca	6
1.2.5.	Epigenetička regulacija ekspresije gena kao uzročnik muškog steriliteta	7
1.2.6.	Neploidnost muškaraca i mitohondrijska DNK	7
1.3.	Uloga alela niske penetrabilnosti u razvoju idiopatske neplodnosti kod muškaraca	8
1.4.	Uloga fenomena RNK interferencije u patogenezi neplodnosti kod muškaraca	9
2.	Ciljevi rada	11
3.	Materijal i metode	12
3.1.	Materijal	12
3.2.	Metode	13
3.2.1.	Izolacija genomske DNK iz uzoraka periferne krvi	13
3.2.2.	Provera kvaliteta i određivanje koncentracije izolovane genomske DNK	14
3.2.3.	RFLP metoda za genotipizaciju varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262	15
3.2.4.	Provera rezultata genotipizacije varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262 metodom sekvenciranja po Sangeru	17
3.2.5.	Statistička obrada rezultata genotipizacije varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262	19
3.2.6.	Meta-analiza asocijacije varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa razvojem idiopatske muške neplodnosti	20
3.2.7.	Genotipizacija varijanti rs2910164 i rs895819	21
3.2.8.	Statistička obrada rezultata genotipizacije varijanti rs2910164 i rs895819	23
4.	Rezultati	24
4.1.	Rezultati formiranja baze podataka i biobanke uzoraka muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatske neplodnosti i fertilnih muškaraca iz Severne Makedonije	24
4.2.	Rezultati izolovanja genomske DNK iz uzoraka periferne krvi	26
4.3.	Rezultati PCR reakcije za umnožavanje DNK fragmenata koji okružuju genetičke varijante rs10842262, rs2477686 i rs12097821	26
4.4.	Rezultati genotipizaciju genetičkih varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 metodom PCR-RFLP	27
4.5.	Rezultati provere genotipizacije rs10842262, rs2477686 i rs12097821 metodom sekvenciranja po Sangeru	29
4.6.	Rezultati studije asocijacije genetičkih varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne	30

	Makedonije	
4.7.	Rezultati meta-analize asocijacije varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa razvojem idiopatske muške neplodnosti	39
4.8.	Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819	49
4.9.	Rezultati studije asocijacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije	50
5.	Diskusija	62
6.	Zaključci	70
7.	Literatura	72

1. UVOD

1.1. Neplodnost kod muškaraca

1.1.1. Definicija neplodnosti

Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO), klinička neplodnost ili sterilitet definiše se kao nemogućnost začeća kod para koji ima redovne seksualne odnose u vremenskom periodu od godinu dana bez primene kontracepcije. Terminološki, „muška neplodnost“ ne predstavlja jasno definisan klinički sindrom, već obuhvata skup različitih urođenih ili stečenih stanja heterogene etiologije. Približno u svetu 15% parova suočeno je problemom neplodnosti, od čega je muški faktor neplodnosti samostalno odgovoran za 20-30% slučajeva, dok se u polovini kombinuje sa ženskom neplodnošću. Posle malignih tumora i kardio-vaskularnih i cerebro-vaskularnih bolesti, WHO neplodnost definiše kao treću najčešću bolest ljudi sa preko 190 miliona neplodnih osoba širom sveta (1). U 2019. godini registrovan je porast od 76,9% u broju dijagnostikovanih slučajeva muške neplodnosti u odnosu na 1990. godinu. Najveći broj slučajeva dijagnostikovanih je u Zapadnoj sub-saharskoj Africi, Istočnoj Evropi i Istočnoj Aziji (2).

1.1.2. Etiologija muške neplodnosti

Neplodnost ili smanjena plodnost muškaraca može biti uzrokovana starošću, kongenitalnim malformacijama, varikocelom, endokrinopatijama, određenim stilovima života kao što je pušenje, alkoholizam, gojaznost i izloženost zagađenju životne sredine koje ispoljava gonadotoksični efekat (3). Takođe, infekcije poput gonoreje (*Neisseria gonorrhoeae*), hlamidije (*Chlamydia trachomatis*), mikoplazme (*Mycoplasma genitalium*) i ureoplazme (*Ureaplasma urealyticum*) mogu biti uzroci neplodnosti (4). Najčešće identifikovan uzrok neplodnosti kod muškaraca je varikocela koja se manifestuje kao proširenje venskog spleta koji odvodi krv iz testisa (5). Za izlaganje raznovrsnim hemijskim supstancama pokazano je da mogu negativno delovati kao reproduktivni „otrovi“. Tako na primer, testovi funkcionalnosti spermatozoida jasno pokazuju da prisustvo visoke koncentracije olova smanjuju sposobnost njihovog vezivanja, probijanja i oplodivanja jajne ćelije (6).

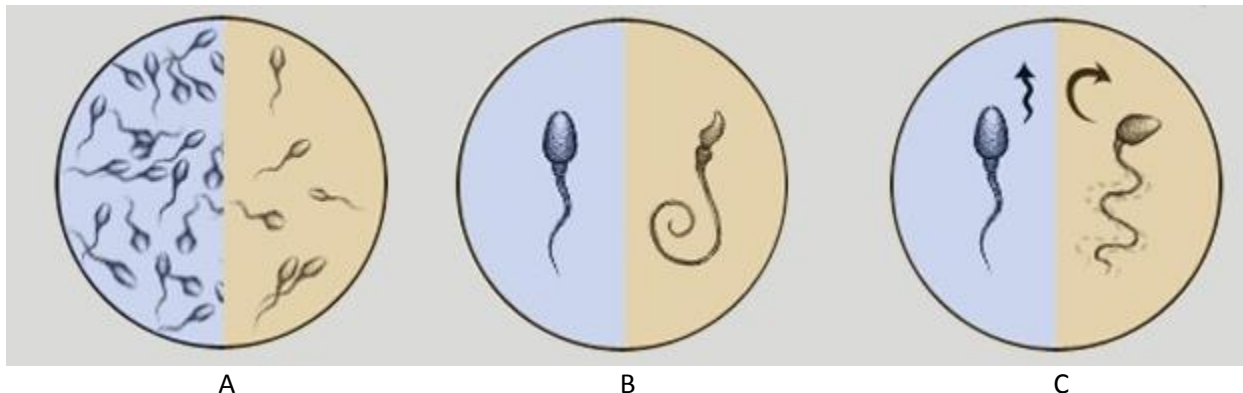
Međutim, za veliki broj slučajeva, 30 do 50%, etiologija i jasan uzrok neplodnosti nije identifikovan i takvi oblici svrstavaju se u kategoriju idiopatske neplodnosti. S obzirom na to da se ovo stanje dijagnostikuje isključivanjem svih drugih poznatih uzročnika, obuhvata vrlo heterogenu grupu bolesnika. Dominantni pretpostavljeni uzročnici idiopatskog steriliteta su dejstvo slobodnih radikala, reaktivnih kiseoničnih vrsta, ali pre svega epigenetičke i genetičke izmene, kao posledica interakcije između genetičkih i sredinskih faktora (7,8).

1.1.3. Dijagnostika muške neplodnosti

Dijagnostika neplodnosti kod muškaraca vrši se integrisanjem podataka o istoriji bolesnika, kliničkim i endokrinološkim pregledom i analizom semene tečnosti, procedurom koja se naziva spermogram. Budući da su infektivni agensi označeni kao važan uzročnik steriliteta, mikrobiološki testovi nakon uzimanja brisa i uzorka mokraće su takođe integralni deo dijagnostičke procedure. Uprkos relativno niskoj učestalosti endokrinopatija kao uzročnika neplodnosti, detaljan opis hormonskog statusa bolesnika predstavlja obavezan korak tokom dijagnostike (9).

Klinički pregled podrazumeva uvid u opšte stanje bolesnika, karakteristike maljavosti, eventualno prisustvo ginekomastije kao i abnormalnosti vezanih za koštani sistem. Takođe, ovaj pregled zahteva detaljnu analizu penisa, kao i skrotuma, testisa, odvodnih kanala i drugih struktura muškog polnog sistema, u svrhu dijagnostikovanja kongenitalnih malformacija ili drugih defektnih stanja koja mogu biti uzrok sterilnosti. Nizom mikrobioloških testova na brisu uretre i spermokulture ispituju se moguće infekcije urogenitalnog trakta. Iako su endokrinopatije odgovorne za manje od 3% slučajeva muške neplodnosti, klinički pregled obavezno obuhvata i analizu hormonskog statusa bolesnika (10).

Rutinska analiza semene tečnosti bolesnika označena kao spermogram, predstavlja okosnicu dijagnostičke procedure s obzirom na to da parametri o koncentraciji, pokretljivosti i morfologiji spermatozoida dobijeni tokom same analize daju najznačajniji uvid u funkcionalni kapacitet muškog reproduktivnog sistema i spermatozoida (slika 1.1) (9).



Slika 1.1. Shematski prikaz rezultata spermograma. A) analiza broja spermatozoida; B) morfologija i C) pokretljivost spermatozoida. U prvim polovinama kruga osenčenih plavom bojom shematski su prikazani rezultati spermograma u fiziološkim granicama a u drugim polovinama kruga osenčenih žutom bojom shematski su prikazani rezultati spermograma smanjenog broja (A), izmenjene morfologije (B) i smanjene pokretljivosti spermatozoida (C) (slika dostupna na URL: <https://nivf.ir/semen-analysis-spermogram/?lang=en>)

Spermogram obuhvata analizu broja, pokretljivosti i morfoloških karakteristika spermatozoida. Biološki uzorak za analizu potrebno je obezbediti nakon perioda apstiniranja od

ejakulacije u periodu od najmanje 4 dana. Godine 2010., WHO je objavila nove referentne vrednosti parametara semene tečnosti analiziranih metodom spermograma koje su prikazane su u tabeli 1.1., a koriste se pri postavljanju dijagnoze muške neplodnosti (11).

Tabela 1.1. Referentne vrednosti spermograma

Karakteristike	Jedinice	Referentne vrednosti (najniže)
Volumen	mL	1,5
Koncentracija spermatozoida	10^6 /mL	39
Ukupan broj spermatozoida	10^6	15
Ukupan broj pokretnih spermatozoida	%	40
Broj progresivno pokretnih spermatozoida	%	32
Ukupan broj "živih" spermatozoida	%	58
Broj spermatozoida neizmenjene morfologije	%	4

Klasifikacija oblika muške neplodnosti na osnovu rezultata dobijenih sprovođenjem spermograma vrši se po uputstvima datim od strane WHO (tabela 1.2.). Najčešće dijagnostikovani oblici neplodnosti kod muškaraca manifestuju se potpunim odsustvom ili smanjenom koncentracijom, slabom pokretljivošću i abnormalnom morfologijom spermatozoida (11).

Tabela 1.2. Tipovi steriliteta

Tip steriliteta	Glavna odlika
Aspermija	Odsustvo ejakulata (bez ili sa retrogradnom ejakulacijom)
Astenozoospermija	% PR spermatozoida ispod referentne vrednosti
Astenoteratozoospermija	% PR i normalnih oblika spermatozoida < referentnih vrednosti
Azoospermija	Bez spermatozoida u ejakulatu
Kriptozoospermija	Spermatozoidi prisutni jedino u precipitatu nakon centrifugiranja
Hemospermija	Prisustvo eritrocita u ejakulatu
Leukospermija	Prisustvo leukocita u ejakulatu iznad granične vrednosti

Nekrozoospermija	Mali procenat vijabilnih i veliki procenat nepokretnih spermatozoida
Oligoastenozoospermija	Ukupan broj i PR (%) spermatozoida ispod referentnih vrednosti
OAT	Astenozoospermija, Oligozoospermija i Teratozoospermija
Oligoteratozoospermija	Broj i % spermatozoida normalnog oblika < referentnih vrednosti
Oligozoospermija	Ukupan broj spermatozoida ispod referentne vrednosti
Teratozoospermija	% spermatozoida normalnog oblika ispod referentne vrednosti

Skraćenice: PR – progresivno pokretni (eng. *Progressive motility*)

1.1.4. Lečenje muške neplodnosti

Lečenje muške neplodnosti zavisi od uzročnika koji je doveo do razvoja bolesti, pa tako kongenitalne malformacije urogenitalnog trakta, opstrukcija semenovoda, kriptorhizam (nespuštanje testisa) i varikocela zahtevaju hiruršku intervenciju, hormonski poremećaji terapiju hormonima, dok se neplodnost izazvana bakterijskim infekcijama leči antibiotskom terapijom. Stanja poput atrofije testisa ili potpunog izostanka spermatozoida ne mogu se lečiti (12,13). Biopsija testisa koja se koristi i kao procedura za utvrđivanje dijagnoze muške neplodnosti, može predstavljati i terapijsku proceduru kojom se prikupljaju spermatozoidi direktno iz testisa neposredno pre sprovođenja postupka vantelesne oplodnje (14).

1.2. Molekularna osnova neplodnosti kod muškaraca

Među brojnim faktorima koji uzrokuju razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca, dominantni uzročnici su genetičke i epigenetičke promene. Stoga je rast broja istraživanja usmerenih na molekularnu osnovu ove složene bolesti sve očigledniji. Veliki napredak postignut je zahvaljujući intenzivnom razvoju genomike i novim metodološkim pristupima u istraživanju. Rezultati do kojih se i dalje dolazi potvrđuju da genetičke izmene, mutacije u genima za proteine i funkcionalne ribonukleinske kiseline (RNK), retke varijacije u broju kopija, epigenetičke izmene i genetičke varijante niske penetrabilnosti direktno ili posredno doprinose ili su uzrok idiopatske neplodnosti muškaraca (15,16).

1.2.1. Hromozomske aberacije

Prisustvo hromozomskih aberacija karakteriše muškarce sa sterilitetom u većem procentu u odnosu na opštu populaciju. Procenjeno je da se incidenca ovog uzročnika kreće u intervalu od 2% do 8% neplodnih muškaraca. Zapažen je i porast ove vrednosti kod azoospermičnih muškaraca na 15%, uglavnom kod osoba sa aneuploidijom X hromozoma (Klinefelterov sindrom, 47, XXY). Predominantne su abnormalnosti polnih hromozoma, ali je i širok spektar stukturalnih autozomalnih poremećaja takođe opisan. Pored Klinefelterovog sindroma, kao najučestalije numeričke aberacije povezane sa neplodnošću kod muškaraca su

aneuploidije hromozoma Y (47, XYY), kao i strukturne aberacije hromozoma Y u vidu inverzija, translokacija i delecija, najčešće u regionu dugog kraka. Prisustvo translokacija karakteriše kako polne, tako i autozomalne hromozome (17).

1.2.2. Mikrodelecije dugog kraka hromozoma Y kao uzročnici muške neplodnosti

Najčešći molekularno-genetički poremećaji povezani sa neplodnošću kod muškaraca su mikrodelecije dugog kraka (q) hromozoma Y čije se prisustvo detektuje kod 10% neplodnih muškaraca, dok ovaj procenat raste na 15% kod muškaraca sa azoospermijom. *De novo* delecije u okviru dugog kraka hromozoma Y su među najčešćim hromozomskim poremećajima kod muškaraca dostižući učestalosti i do 20% u odnosu na ukupan broj muškaraca sa neplodnošću. Postoje eksperimentalni dokazi da ove delecije nastaju prilikom mejoze kao posledica rekombinacionih događaja između visoko repetitivnih sekvenci u okviru molekula dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) (18).

Veliki broj gena uključenih u proces spermatogeneze nalazi se na dugom kraku hromozoma Y, u regionu AZF u okviru lokusa AZFa, AZFb i AZFc, (eng. *Azoospermia factor*, AZF)(8). U najvećem broju slučajeva, mikrodelecije dugog kraka hromozoma Y pogađaju regione AZFb i AZFc, prouzrokujući istovremeno „brisanje“ gena. Delecije u regionu AZFa su prilično retke i mogu dovesti do „brisanja“ samo dva gena *USP9Y* (eng. *Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked*, USP9Y) i *DBY* (eng. *DEAD box polypeptide 3, Y-linked*, DBY) (19).

1.2.3. Varijacije u broju kopija kao uzročnici muške neplodnosti

Uz kompletno brisanje regiona AZFc koje je potvrđeno kao najčešći genetički uzrok poremećaja spermatogeneze i neplodnosti kod muškaraca, intrahromozomalna homologna rekombinacija može generisati i parcijalne delecije, kao i parcijalne duplikacije, unutar regiona AZFc, koje se dovode u vezu sa povećanim rizikom od razvoja muške neplodnosti. Osim mikrodelecije koja obuhvata čitav region AZFc, u okviru istog regiona registruju se i suptilnije strukturne promene po tipu inverzija, delecija ili duplikacija. Danas znamo da neki od opisanih hromozomskih rearanžmana predstavljaju varijacije u broju kopija (eng. *Copy number variations*, CNVs) regiona AZFc (20,21). Genetičke studije sprovedene na različitim etničkim grupama često daju oprečne rezultate, pa se tako jedan isti rearanžman može tumačiti kao potencijalni faktor rizika u jednoj populaciji, dok u drugoj predstavlja samo još jednu genetičku varijantu koja ne pokazuje nikakav doprinos razvoju neplodnosti. Veliki broj studija slučajeva i kontrola pokazao je da CNV po tipu delecija označena kao *gr/gr* predstavlja faktor rizika za razvoj neplodnosti kod muškaraca u različitim populacijama. Među najučestalije CNVs u okviru regiona AZFc spadaju: delecije *gr/gr* i *b2/b3*, kao i duplikacije *gr/gr* i *b2/b3*, a njihovi nazivi označavaju amplikone u okviru kojih se dešavaju strukturne promene (23). Varijacije u broju kopija regiona AZFc detektovane su kako kod neplodnih tako i kod fertilnih muškaraca iz opšte populacije. To je razlog zbog čega je teško utvrditi značaj CNVs u patogenezi muškog steriliteta. Rezultati studija slučajeva i kontrola ukazuju da efekat CNVs na muški sterilitet zavisi od geografske i etničke pripadnosti (20–22).

Standardna metoda za detekciju mikrodelecija i CNVs je multipleks PCR baziran na STS (eng. *Sequence-tagged site*, STS) markerima koji su locirani na granicama amplikona. Ova metoda nema mogućnost detekcije duplikacija i kompleksnih hromozomskih rernanžmana. Za razliku od multipleks PCR-a, metoda višestrukog umnožavanja ligiranih proba (eng. *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*, MLPA) senzitivnija je i efikasija metoda u detekciji CNVs u regionu AZF hromozoma Y, koja ima mogućnost analize preko 50 različitih sekvenci u samo jednoj reakciji. Pored detekcije mikrodelecija i parcijalnih delecija, ima mogućnost detekcije i parcijalnih duplikacija, ali i najrazličitijih kompleksnih rearnžmana (24).

1.2.4. Mutacije u genima za proteine kao uzročnici neplodnosti kod muškaraca

Procenjuje se da je preko sto proteina, odnosno gena, neophodno za seksualni razvoj i diferencijaciju muškog polnog sistema, kao i za njegovo funkcionisanje i proizvodnju spermatozoida. Geni koji učestvuju u tim procesima su locirani na različitim delovima genoma čoveka, i nalaze se kako na polnim, tako i na autozomalnim hromozomima (25,26). Međutim, samo neki od njih imaju klinički značaj u dijagnostici muške neplodnosti, a to su upravo oni geni za koje je kroz različite tipove studija pokazana direktna povezanost sa defektima u funkcionisanju polnog sistema i sterilnošću. Identifikacija gena koji imaju ključnu regulatornu ulogu, pre svega u procesu spermatogeneze, uglavnom se zasnivala na animalnim modelima zbog ograničenja funkcionalne verifikacije na ljudima. Zahvaljujući napretku studija asocijacije koje se danas sprovode na čitavom genomu (eng. *Genome Wide Association Study*, GWAS) i analizama na genskim čipovima, intenzivirana su istraživanja koja za cilj imaju identifikaciju gena kandidata koji mogu doprineti razvoju neplodnosti kod muškaraca (27). U istraživanjima koja se bave muškim sterilitetom pažnja se posvećuje i genu *CDY* (eng. *Chromodomain protein, Y-linked gene*, CDY) koji se eksprimira isključivo u testisima i učestvuje u epigenetičkim promenama koje prate proces spermatogeneze (28, 29).

Do danas je opisano na desetine gena lociranih na polnim hromozomima i autozomima, čije se mutacije mogu dovesti u vezu sa muškom neplodnošću. Kod 95% muškaraca sa cističnom fibrozom utvrđeno je kongenitalno bilateralno odsustvo *vas deferens*-a, koje se manifestuje opstruktivnom azoospermijom, pri čemu se smatra da je kod 70% ovakvih slučajeva uzrok mutacija u genu *CFTR* (eng. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, CFTR) (30).

Fiziološka sinteza androgenih hormona (AH), kao i aktivnost njihovih receptora (AR) neophodni su za normalan razvoj muškog reproduktivnog sistema i proces proizvodnje spermatozoida. Mutacije u genu za androgeni receptor (eng. *Androgen receptor*, AR) lociranim na dugom kraku hromozoma X često dovode do pojave X-vezanog recesivnog poremećaja, sindroma neosetljivosti na androgene hormone (eng. *Androgen insensitivity syndrome*, AIS). Mutacije u genu *AR* prisutne su kod muškaraca sa oligozoospermijom i azoospermijom u relativno malom procentu, 2-3%. Takođe, pokazano je i da postoji asocijacija ekspanzija trinukleotidnih ponovaka CAG i CGG u egzonu 1 gena *AR* sa smanjenim nivoom proizvodnjom spermatozoida (31-33).

Gen *TSPY 1* (eng. *Testis-specific Y-encoded protein 1*, TSPY) poseduje kopije na oba kraka hromozoma Y, i prevashodno se ekspirira u testisima. Smatra se da proteinski produkt ovog gena kontroliše vremenski profil spermatogeneze signalizirajući spermatogonijama da započnu ćeljsku deobu. Pokazano je da je veći broj kopija ovog gena prisutan kod neplodnih muškaraca (34).

1.2.5. Epigenetička regulacija ekspresije gena kao uzročnik muškog steriliteta

Epigenetička regulacija ekspresije gena ima bitnu ulogu u sazrevanju i funkcionisanju spermatozoida, kao i tokom oplodnje i postfertilizacionog perioda. Pakovanje hromatina je esencijalan korak spermatogeneze i veruje se da igra ključnu ulogu u razvoju spermatozoida (35). Tokom procesa remodelovanja hromatina, 85% histona biva zamenjeno protaminima. Prilikom tog procesa dolazi do umetanja intermedijernih tranzicionih proteina u hromatinsku strukturu. Istraživanja na miševima pokazala su da poremećaji u ekspresiji tranzicionih proteina TP1 i TP2 (eng. *Transitional protein*, TP) mogu uzrokovati pojavu sterilnog fenotipa kod muškaraca (36).

Takođe, istraživana je i funkcija 2 protamina, P1 i P2 i njihova povezanost sa neplodnošću. Pokazano je da prevremena translacija informacione RNK prepisane sa gena *P1* dovodi do zaustavljanja procesa spermatogeneze u stupnju spermatida, i to prevremenom kondenzacijom hromatina. Mutacije u bar jednom od ova dva gena uzrokuje pojavu poremećaja u procesima pakovanja hromatina i oštećenja u molekulu DNK, što za posledicu ima pojavu neplodnosti (37,38).

Studija rađena u cilju ispitivanja efekta genetičkog utiskivanja na pojavu neplodnosti pokazala je da približno 14% neplodnih muškaraca imaju poremećen obrazac utiskivanja u vidu demetilacije diferencijalno metilovanog regiona na hromozomima poreklom od oca (eng. *Differentially methylated regions*, DMRs). U većini slučajeva to je rezultiralo ispoljavanjem oligozoospermičnog fenotipa (39).

1.2.6. Neplodnost muškaraca i mitohondrijska DNK

Velika količina energije neophodna je spermatozoidima da podrži njihovo kretanje nakon ejakulacije. Oštećenja na molekulu mitohondrijske DNK koja nastaju kao posledica dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) najčešće dovode do oksidativnog stresa i mutacija u okviru mitohondrijskog genoma sa patološkim posledicama, što se može manifestovati i kroz pojavu steriliteta (40). Delecija dva bazna para u okviru gena *COII* potencijalno dovodi do kreiranja prevremenog stop kodona i sinteze nekompletnog proteina. Druga grupa istraživača pokazala je da dve najčešće nukleotidne zamene na pozicijama 9055. i 11719. u okviru mitohondrijskog genoma stoje u vezi sa smanjenom pokretljivošću spermatozoida (41,42).

1.3. Uloga alela niske penetrabilnosti u razvoju idiopatske neplodnosti kod muškaraca

Neplodnost se svrstava u grupu složenih, multifaktorijalnih bolesti. Varijante u sekvenci molekula DNK još jedan su od faktor rizika za razvoj poligenskih bolesti, kakva je i neplodnost. Za razliku od monogenskih, retkih bolesti koje karakteriše genetička varijanta, označena kao mutacija, sa velikom penetrabilnošću i verovatnoćom ispoljavanja fenotipa bolesti, složene bolesti se najčešće karakterišu prisustvom većeg broja genetičkih varijanti koje mogu, ali i ne moraju da dovedu do razvoja bolesti. Poznata Hipoteza "česta bolest – česta varijanta" govori o tome da su uzročnici čestih multifaktorijalnih bolesti česte genetičke varijante, gde pojedinačna varijanta ima nisku penetrabilnost i samim tim mali udeo u doprinosu bolesti. Na genetičke varijante kao takve gleda se kao na faktore predispozicije, a ne neophodno direktne uzročnike bolesti. Upravo zbog navedenih karakteristika multifaktorijalnih bolesti, pristup njihovog izučavanja kroz familijarne (eng. *Linkage*) studije pokazao se neadekvatnim (43).

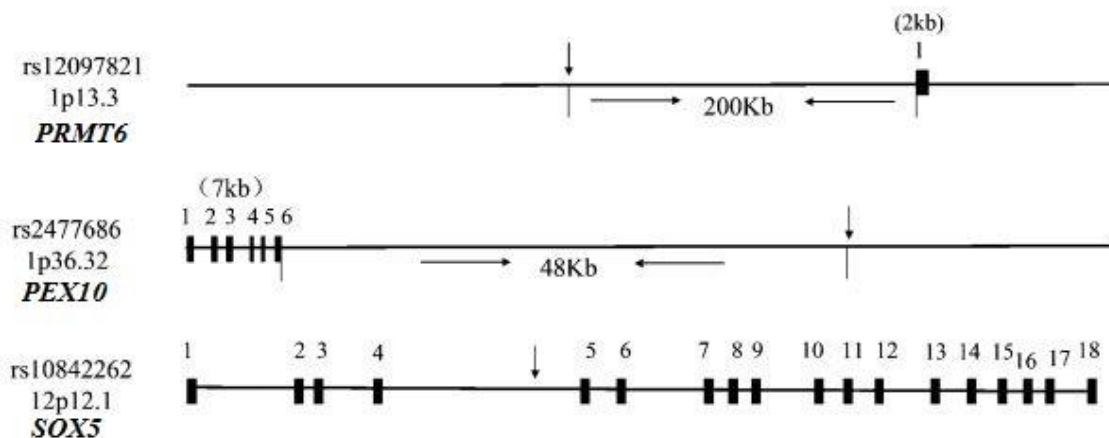
Intenzivni razvoj genomike kao nauke, i novi metodološki pristupi, omogućili su sveobuhvatnije i verodostojnije izučavanje složenih bolesti predstavljeno studijama asocijacija baziranih na analizi čitavog genoma, bez početne hipoteze, odnosno GWA studijama. Ove studije sprovode se sa ciljem identifikacije novih genetičkih varijanti na nivou čitavog genoma povezanim sa rizikom za razvoj bolesti čoveka. Konačno, kroz sprovedene GWA studije demonstrirano je da česte genetičke varijante ne doprinose pojedinačno klinički značajnom riziku za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca (44,45).

Kada je neplodnost muškaraca u pitanju, rezultati prve GWAS pokazale su statistički značajnu asocijaciju tri varijante u genima za proteine: arginin N metiltransferaza 6 (eng. *Protein Arginine N Methyltransferase 6*, PRMT6)(rs12097821), faktor biogeneze peroksizoma 10 (eng. *Peroxisomal Biogenesis Factor*, PEX10) (rs2477686) i transkripcioni faktor sa SRY-boksom 5 (eng. *SRY-Box Transcription Factor 5*, SOX5) (rs10842262) sa rizikom za pojavu neplodnosti kod muškaraca poreklom iz Kine (slika 1.2.) (46). Studija slučajeva i kontrola kod muškaraca iz Srbije nije potvrdila navedenu asocijaciju (47).

Studija GWA iz 2022. godine rađena na uzorcima 100 muškaraca sa idiopatskom neplodnošću i 100 fertilnih muškaraca Evropskog porekla pokazala je postojanje 12 genetičkih varijanti u 9 gena: *ANAPC1* (eng. *Anapahe Promoting Complex Subunit 1*, ANAPC1), *CES1* (eng. *Carboxylesterase 1*, CES1), *FAM131C* (eng. *Family with sequence similarity 131 member C*, FAM131C), *HLA-DRB1* (eng. *major histocompatibility complex, class II, DR beta 1*, HLA-DRB1), *KMT2C* (eng. *Lysine N-methyltransferase 2C*, KMT2C), *NOMO1* (eng. *Nodal modulator 1*, NOMO1), *SAA1* (eng. *Serum Amyloid A1*, SAA1), *SRGAP2* (eng. *SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2*, SRGAP2) i *SUSD2* (eng. *Sushi Domain Containing 2*, SUSD2) asociраниh sa rizikom za pojavu idiopatske neplodnosti (48).

GWAS rađena u grupi muškaraca čija se neplodnost povezuje sa varikocelom nije uspela da identifikuje asocijaciju nijedne genetičke varijante sa rizikom za razvoj neplodnosti kod

muškaraca sa varikocelom. Jedini rezultat ove studije bio je da se varijanta rs1799983 u genu NOS3 (eng. *Nitric Oxide Synthase 3, NOS3*) češće javlja kod muškaraca sa varikocelom(49).



Slika 1.2. Prikaz regiona genoma koji okružuju genetičke varijante rs12097821, rs2477686 i rs10842262. Varijante su označene strelicama, dok su crnim pravougaonicima obeleženi egzoni navedenih gena.

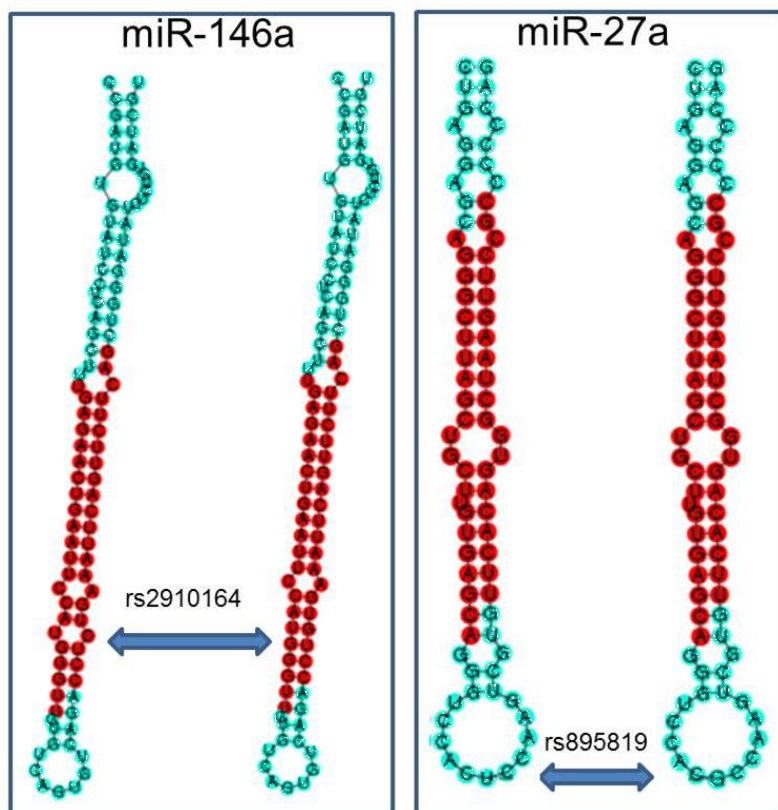
1.4. Uloga fenomena RNK interferencije u patogenezi neplodnosti kod muškaraca

Američki biolog Viktor Ambros je 1993. godine otkrio postojanje jednolančanih (protein) nekodirajućih molekula RNK u model sistemu *C. elegans*. To je bila mikro RNK lin-4. Na istom model sistemu, 1998. godine, Amrikanci Endrju Fajer i Krejg Melo otkrili su fenomen RNK interferencije, postranskripcioni način utišavanja ekspresije gena dvolančanim molekulima RNK. Američki molekularni biolog Geri Ruvkun otkrio je mehanizam kojim lin-4 reguliše translaciju ciljnih iRNK, kao i drugu mikro RNK let-7. Za otkriće fenomena RNK interferencije, 2006. godine Fajer i Krejg podelili su Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu. Osamnaest godina kasnije (2024. godine), istu nagradu za otkriće molekula mikro RNK i njene uloge u postranskripcionoj regulaciji ekspresije gena podelili su Viktor Ambros i Geri Ruvkun (50-52).

Rezultati nedavnih studija pokazali su da se mikroRNK u reproduktivnim organima muškaraca ekspimiraju na način specifičan za tip ćelija i stadijum spermatogeneze. Promene u nivoima ekspresije mikro RNK imaju efekte u različitim fazama spermatogeneze, uključujući nediferencirane i diferencirajuće spermatogonije, spermatocite, spermatide i Sertolijeve ćelije. Pored toga utiču i na kvalitet i količinu sperme, oplodnju, razvoj embriona i rezultate potpomognute reproduktivne tehnologije (eng. *Assisted Reproductive Technology, ART*)(53). Funkcionalne genetičke varijante u genima za mikro RNK imaju uticaj kako na biogenezu, tako i na funkciju molekula mikro RNK i kao takve mogu imati ulogu u procesima koji dovode do razvoja idiopatske neplodnosti kod muškaraca. To je razlog što se mikro RNK danas razmatraju kao potencijalni biomarkeri za dijagnostikovanje muške neplodnosti i ishoda ART (54).

Postoje eksperimentalni podaci da promene u ekspresiji molekula miR-27a i miR-146a imaju uticaj na odvijanje procesa spermatogeneze i posledičan ukupan broj spermatozoida u ejakulatu (55). Kod muškaraca sa azoospermijom utvrđen je poremećaj u regulaciji ekspresije gena koji kodira lizin-specifičnu demetilazu 3A posredovanu miR-27a u tkivu testisa. Prekomerna ekspresija miR-27a detektovana je u biološkim uzorcima muškaraca sa kliničkom dijagnozom neobstruktivne azoospermije (56). Poremećaj ekspresije utvredjen je i za miR-146a bez za sada utvrdjenih ciljnih gena (53,57). Ekspresija miR-146a je značajno smanjena u uzorcima muškaraca sa azoospermijom, dok je povišena u uzorcima muškaraca sa astenoospermijom (58).

Genetička varijanta rs2910164 gena miR-146 a (GRCh38 5:160485411, G > C) locirana je u regionu semena (eng. „seed“ region) pratećeg lanca ove mikro RNK. Ona generiše zamenu baznog para G:U sa baznim parom C:U koji ima efekta u procesu sazrevanja zrele zrelog miR-146a (59) (Slika 1.3.A). Genetička varijanta rs895819 (GRCh38 19:13836478, T>C) locirana je u regionu klastera gena pri-miRNK za miR-23a, miR-24a i miR -27a. Identifikovana je kao genetička varijanta koja dovodi do promene u sekundarnoj strukturi prekursora miR-27a (Slika 1.3.B)(60). Postoje brojni eksperimentalni dokazi o ulozi ove dve genetičke varijante u patogenezi malignih bolesti uključujući i muškarce iz Srbije (61,62).



Slika 1.3. Shematski prikaz sekundarne strukture molekula mikro RNK. A) miR-146a, B) miR-27a. (slika modifikovana na osnovu slike dostupne na prethodnoj verziji MiRNASNP database v2.0.)

Do danas nisu rađene studije asocijacije varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca slovenskog porekla.

2. CILJEVI

Cilj ove doktorske disertacije je razumevanje uloge odabranih tačkastih varijanti u genima za proteine (*PRMT6*, *PEX10*, *SOX5*) i mikro RNK i mogućih populacionih specifičnosti u etiologiji idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije, kao i moguća identifikacija potencijalno novih bioloških markera koji bi se kao pomoćni prognostički parametri koristili u dijagnostici i lečenju ove bolesti.

Specifični ciljevi doktorske disertacije su sledeći:

- Dizajniranje genetičke studije slučajeva i kontrola (eng. case-control study) kroz definisanje uključnih i isključnih kriterijuma za studiju, prikupljanje kliničkih podataka ispitanika, rezultata spermograma i pripremanje kolekcije molekula genomske DNK;
- Genotipizacija tačkastih genetičkih varijanti u genima za proteine PRMT6 (rs12097821), PEX10 (rs2477686) i SOX5 (rs10842262);
- Analiza genetičkih varijanti u genima za proteine selektovanih na osnovu rezultata GWA studije u grupi bolesnika i kontrola i njihove povezanosti sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije;
- Meta-analiza rezultata ove i drugih studija slučajeva i kontrola koje su za temu imale moguću asocijaciju ove tri genetičke varijante sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti;
- Genotipizacija tačkastih genetičkih varijanti u genima za mikro RNK hsa-miR-27a (rs2910164) i hsa-miR-146a (rs895819); i
- Analiza selektovanih genetičkih varijanti u genima za mikro RNK u grupi bolesnika i kontrola i njihove povezanosti sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Studija je rađena na grupi od 158 muškaraca sa dijagnozom idiopatske neplodnosti dijagnostikovanih i lečenih u Kliničkoj bolnici „Adžibadem Sistina Skopje“, Skoplje, Severna Makedonija u periodu od maja do decembra 2018. godine.

Kriterijumi za uključivanje muškaraca sa idiopatskom neplodnošću u grupu za analizu bili su sledeći:

- Odsustvo kongenitalnih malformacija i/ili varikocela prilikom kliničkog pregleda
- Odsustvo hormonskih poremećaja koji mogu uticati na kvalitet spermograma tokom laboratorijskog ispitivanja hormonskog statusa
- Odsustvo poboljšanja u parametrima spermograma nakon primenjene vitaminske terapije i promene životnog stila u periodu od najmanje dva meseca kao što je konzumiranje alkohola i duvana
- Odsustvo Klinefelterovog sindroma nakon citogenetske analize kariotipa muškaraca sa idiopatskom neplodnošću
- Odsustvo mikrodelecija hromozoma Y koje je utvrđeno korišćenjem metodom multipleks PCR na uzorcima genomske DNK ispitanika rađenoj u laboratoriji MANU (Makedonskata akademija na naukite i umetnostite), Skoplje.

Kontrolnu grupu činilo je 130 fertilnih muškaraca približno iste starosne dobi ispitanika svrstanih u grupu muškaraca sa idiopatskom neplodnošću iz populacije Serverne Makedonije.

Za svakog ispitanika uključenog u ovu studiju pribavljeni su rezultati spermograma, izmeren nivo testosterona u krvi kao i osnovni podaci o godištu i životnim navikama uključujući i prisustvo gojaznosti.

Kao biološki uzorak za izolovanje genomske DNK od muškaraca sa dijagnozom idiopatskog steriliteta i fertilnih muškaraca korišćena je puna periferna krv koja je, poštujući propisane uslove (na ledu), iz Kliničke bolnice „Adžibadem Sistina Skopje“, Skoplje, Severna Makedonija transpotovana u Centar za humanu molekularnu genetiku Univerziteta u Beogradu-Biološkog fakulteta sa pribavljenim dozvolama za uvoz biološkog materijala koji se koristi u naučne svrhe.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNK iz uzoraka periferne krvi

Izolacija genomske DNK vršena je korišćenjem magnetnih kuglica sintetisanih u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta-Univerziteta u Beogradu prema BOMB (eng. *Bio-On-Magnetic-Beads*) protokolu (63).

Protokol za izolaciju genomske DNK bio je sledeći:

- U ependorf mikrotube od 1,5 ml dodavano je 500 µl pune periferne krvi, 800 µl TE pufera;
- Ependorf mikrotube su vorteksovane do 15 sekundi, a potom centrifugirane na 10 000 obrtaja u minutu (eng. rotation per minute, rpm) u trajanju od 2 minuta u centrifugi Labofuge 400R (*Heraeus instruments*, Nemačka);
- Nakon odlivanja supernatanta u Ependorf mikrotube je dodavano po 1 ml TE pufera,
- Ependorf mikrotube su vorteksovane do 15 sekundi, a potom centrifugirane na 10 000 rpm u trajanju od 2 minuta;
- Korak centrifugiranja ponavljan je potreban broj puta sve dok talog nije postao bistar;
- U ependorf mikrotube je dodavano 140 µl TE pufera (koji sadrži enzim RNAzu A), 240 µl pufera za lizu *Lysis Buffer B* (*Norgen Biotek Corp.*, Kanada) i 5 µl proteinaze K (*Zymo Research Corp.*, SAD)(rastvor proteinaze K je pre upotrebe vorteksovano);
- Mikrotube su vorteksovane do 15 sekundi;
- Nakon vorteksovanje, mikrotube su inkubirane u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C, u trajanju od dva do tri sata ili preko noći u zavisnosti od kvaliteta biološkog uzorka;
- Nakon inkubacije u vodenom kupatilu, u mikrotube sa smešom je dodavano 320 µl Izopropanola;
- Mikrotube su vorteksovane do 15 sekundi;
- Nakon vorteksovanje, u mikrotube je dodavano 20 µl BOMB magnetnih kuglica nakon čega su mikrotube ponovo vorteksovane;
- Ependorf mikrotube su potom bile poređane na magnetnom stalku i ostavljane dok se magnetne kuglice u rastvoru nisu spustile na dno mikrotuba odnosno našle na strani ependorf mikrotuba okrenutih ka magnetnom stalku;
- Pažljivim rukovanjem, ependorf mikrotube su uklanjane sa stalka i tom prilikom je supernatant odlivan;
- U ependorf mikrotube dodavano je 400 µl izopropanola uz vorteksovanje smeše;
- Iz ependorf mikrotuba pre vraćanja na stalak ponovo je uklanjao supernatant; po vraćanju na stalak je ponovo uklanjao supernatant;
- U identičnom koraku kao korišćenjem Izopropanola, magnetne kuglice su dva puta ispirane sa 300 µl 80% etanola;
- Po odlivanju etanola ependorf mikrotube sa magnetnim kuglicama su 10 minuta inkubirane u vodenom kupatilu na temperaturi od 70°C;
- Nakon inkubacije na temperaturi 70°C koja je vršena sa ciljem sušenja ependorf mikrotuba, u iste je dodavano po 70 µl dejonizovane vode (eng. *Nuclease-Free Water*) (*Qiagen*, Nemačka);

- Ependorf mikrotube su potom vorteksovane 15 sekundi i ponovo postavljane na korišćeni stalak;
- Na kraju, iz ependorf mikrotuba pipetiran je supernatant sa rastvorenim genomskom DNK koji je prebacivan u nove ependorf mikrotube;
- Do dalje upotrebe, ependorf mikrotube čuvane su na temperaturi od -20°C .

3.2.2. Provera kvaliteta i određivanje koncentracije izolovane genomske DNK

Kvalitet izolovane genomske DNK proveravan je elektroforezom u agaroznom gelu, dok su koncentracije izolovanih DNK bile određivane korišćenjem komercijalnog seta za dvolančanu DNK Qubit® *dsDNA BR Assay Kit* (Qiagen, Nemačka) i aparata Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, SAD).

Provera kvaliteta izolovane genomske DNK vršena je elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu. Za vizuelizaciju uzoraka korišćen je etidijum-bromid (EtBr) koji je dodavan u gel pre razlivanja. Elektroforeza je vršena u 0,5xTBE puferu, dok je kao boja za nalivanje uzoraka na gel korišćena smeša 0,25% bromfenol-plavo, 0,25% ksilen-cijanol i 30% glicerol. Provera kvaliteta izolacije genomske DNK određivana je posmatranjem gela na transiluminatoru, izlaganjem ultraljubičastom (UV) zračenju talasne dužine 254 nm (64).

Priprema gela vršena je prema sledećem protokolu:

- 0,8% rastvor agaroze (*Serva*, Nemačka) u 0,5xTBE puferu (45 mM Tris – borat, 1 mM EDTA, pH 8) u staklenoj laboratorijskoj čaši zagrevan je na temperaturi od 180°C u mikrotalasnoj pećnici do potpunog razbistrenja rastvora;
- U zagrejan rastvor je dodavan EtBr (finalna koncentracija EtBr u rastvoru bila je 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$);
- Rastvor agaroze je hlađen pod mlazom vode, pa razlivan u kadicu sa češljem i ostavljan 30 minuta na sobnoj temperaturi da polimerizuje;
- Nakon polimerizacije, pažljivim rukovanjem je uklanjan češalj i na taj način su formirani "bunarići" na gelu za nalivanje uzoraka;
- 5 μl uzorka mešano je sa bojom za nalivanje (0,25% bromfenol-plavo, 0,25% ksilen-cijanol i 30% glicerol) u zapreminskom odnosu 5:1, a potom nalivano u bunariće na agaroznom gelu;
- Za poređenje koncentracija izolovanih uzoraka korišćen je komercijalno dostupan standard za količinu K562 (eng. *K562 DNA High Molecular Weight*) (*Promega Corporation*, SAD) koji je nalivan u prvi bunarić agaroznog gela;

Elektroforeza je vršena u 0,5xTBE puferu pri konstantnom naponu od 100 V u vremenskom intervalu od 15 minuta, u sistemu za elektroforezu Wide Mini-Sub® Cell GT (*BioRad*, SAD); Nakon završenog elektroforetskog razdvajanja molekula DNK, gel je izlagan UV svetlu talasne dužine od 254 nm, na transiluminatoru (*Transilluminator*, *Vilber Lourmat*, Francuska). Prisustvo jedinstvenih traka inteziteta jednakog ili većeg od inteziteta K562 govorilo je o uspešnoj izolaciji uzoraka genomske DNK (64).

Protokol za kvantifikaciju izolovane genomske DNK:

- Radni rastvor pripreman je mešanjem 199 µl pufera BR i 1 µl bojenog reagensa BR, po uzorku;
- Radni rastvor je razlivan u ependorf mikrotube od 500 µl, pipetiranjem 190 µl rastvora po tubi;
- U svaku ependorf mikrotubu za uzorke dodavano je 10 µl uzorka DNK, a ista zapremina svakog od standarda dodavana je u dve mikrotube za standarde;
- Smeša je kratko vorteksovana pre merenja koncentracija.

3.2.3. RFLP metoda za genotipizaciju varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262

Genotipizacija genetičkih varijanti u genima za *PRMT6* (rs12097821), *PEX10* (rs2477686) i *SOX5* (rs10842262) vršena je primenom metode analize polimorfizama u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Kako bi se umnožili fragmenti molekula DNK koji okružuju ispitivanu genetičku varijantu korišćena je metoda lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) (65). Proizvodi PCR reakcije bili su podvrgnuti reakciji restrikcione digestije. Produkti nastali dejstvom restrikcionih enzima razdvajani su gel elektroforezom u 3% agaroznom gelu, a očitavanjem rezultata sa gela vršena je genotipizacija.

Za izvođenje reakcije PCR korišćeni su prajmeri navedeni u tabeli 3.1. Dizajn prajmera vršen je korišćenjem softverskog paketa *Primer3 software* (*Whitehead Institute for Biomedical Research*, SAD) (66). Sastav PCR smeše dat je u tabeli 3.2. Temperaturni profili PCR reakcije, kao i očekivane dužine umnoženih fragmenata molekula DNK dati su u tabeli 3.3.

Tabela 3.1. Prajmeri korišćeni u PCR reakciji fragmenata DNK koji okružuju genetičke varijante rs10842262, rs2477686 i rs12097821

Genetička varijanta	Prajmeri	Dužina sekvence
rs10842262-fw rs10842262-rv	5'-GGCCCAGAAAGACAAATACT-3' 5'-ATTGTTATCTCCAGCCATAC-3'	20 bp
rs2477686-fw rs2477686-rv	5'-GCAGTGTTTCGTCCTGCAATC-3' 5'-TGCTAGCAGCATCCACAGTC-3'	20 bp
rs12097821-fw rs12097821-rv	5'-GCAGTTGTATACTTATGCAC-3' 5'-CAGAGAGTTTTAGATTGCCT-3'	20 bp

Tabela 3.2. Sastav PCR smeše za umnožavanje DNK regiona koji okružuju genetičke varijante rs10842262, rs2477686 i rs12097821 volumena 15 μ l

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (μ l)
PCR pufer A (sadrži 15mm MgCl ₂ , <i>Kapa</i>)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, <i>Fermentas</i>)	10 mM	200 μ M	0.3
Prajmer Rv	10 μ M	0.2 μ M	0.3
Prajmer Fw	10 μ M	0.2 μ M	0.3
Taq polimeraza (<i>Kapa</i>)	5 U/ μ l	0.04 U/ μ l	0.12
DNK	/	/	1.5
Dejonizovana voda	/	/	10.98

Tabela 3.3. Temperaturni profili PCR reakcije i dužina amplifikovanih DNK fragmenata

Genetička varijanta	Temperaturni profil			Dužina fragmenata
	1x	40x	1x	
rs10842262	97°C/3 min	95°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min	72°C/10 min 20°C/20 min	225 bp
rs2477686	97°C/3 min	95°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min	72°C/10 min 20°C/20 min	246 bp
rs12097821	97°C/3 min	95°C/1 min 60°C/1 min 72°C/1 min	72°C/10 min 20°C/20 min	217 bp

Provera uspešnosti i specifičnosti PCR reakcije vršena je gel elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu, pripremanom u 0,5xTBE. Procedura izrade gela identična je onoj opisanoj u poglavlju 3.2.2. Prisustvo jedne diskretne trake konkretne dužine potvrdilo je specifičnost PCR reakcije (64). Umesto standarda za količinu korišćen je 50 bp DNA ladder (*Fermentas*, Litvanija). Produkti PCR reakcije u zapremini od 10 μ l korišćeni su prilikom pripreme reakcione smeše za digestiju restrikcionim endonukleazama. U digestionu smešu dodat je restrikcioni enzim, njemu odgovarajući pufer i dejonizovana voda. Osnovne karakteristike restrikcionih enzima korišćenih

za digestiju fragmenata DNK dati su u tabeli 3.4. Restrikciona digestija produkata PCR reakcije vršena je preko noći inkubacijom na temperaturi optimalnoj za aktivnost endonukleaza.

Tabela 3.4. Karakteristika restriktionog enzima korišćenog za digestiju fragmenata DNK umnoženih u PCR reakciji

Enzim	Genetička varijanta	Palindromska sekvenca koju enzim prepoznaje	Oprimalna temperatura digestije	Dužina RFLP	Pufer
FspBI	rs10842262 (G/C)	5'-CTAG-3'	37°C	89 i 136 bp	Tango buffer
FspBI	rs2477686 (C/G)	5'-CTAG-3'	37°C	73 i 173 bp	Tango buffer
AluI	rs12097821 (T/G)	5'-AGCT-3'	37°C	139 i 78 bp	Tango buffer

*alelske varijante koje kreiraju restrikciono mesto prikazane su podebljanim slovima

Produkti restrikcione digestije razdvajani su elektroforezom u 3% agaroznom gelu. Procedura izrade gela identična je onoj opisanoj u poglavlju 3.2.2. Genotip analiziranih uzoraka određivan je interpretacijom rezultata elektroforeze na osnovu očekivanih dužina restrikcionihih produkata:

- Za genotip TT genetičke varijante rs12097821 dve trake dužine 139 i 78 bp, za genotip TG tri trake dužine 217 bp, 139 bp, i 78 bp, a za genotip TT jedna traka dužine 217 bp.
- Za genotip CC genetičke varijante rs2477686 dve trake dužine 173 bp i 73 bp, za genotip CG tri trake 246 bp, 173 bp i 73 bp, a za genotip GG jedna traka 246 bp.
- Za genotip GG genetičke varijante rs10842262 dve trake dužine 136 bp i 89 bp, za genotip GC tri trake dužine 225 bp, 136 bp i 89 bp i jedna traka dužine 225 bp za genotip CC.

3.2.4. Provera rezultata genotipizacije varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262 metodom sekvenciranja po Sangeru

Uzorci pet nasumično izabranih muškaraca sa idiopatskom neplodnošću i pet fertilinih muškaraca korišćeni su za proveru genotipizacije rs10842262, rs2477686 i rs12097821 korišćenjem metode sekvenciranja po Sangeru. Kao početni materijal za ovu proveru korišćeni su PCR produktu dobijeni PCR reakcijom opisanom u poglavlju 3.2.3.

Prečišćavanje produkata amplifikovanih PCR metodom vršeno je upotrebom komercijalnog seta *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Nemačka)* prema uputstvu proizvođača:

- U ependorf tube sa PCR produktima dodavano je 5 volumena pufera PB
- U slučaju pojave ljubičaste boje, koja je ukazivala na pH vrednost veću od 7,5, dodavano je 10 µl 3M Na-acetata

- Sadržaj iz kolona je prebacivan u kolektorske tubu
- Tube su centrifugirane 1 min na 13 000 rpm
- Nakon odlivanja sadržaja kolektorske tube dodavano je 650 µl pufera PE
- Tube su centrifugirane 1 min na 13 000 rpm
- Nakon centrifugiranja odlivan je sadržaj iz kolektorske tube
- Tube su centrifugirane 1 min na 13 000 rpm
- Nakon centrifugiranja kolone su prebacivane u ependorf epruvetu od 1,5 ml
- U Ependorf tube dodavano je µl pufera EB
- Inkubacija je vršena u trajanju od 1-5 min na sobnoj temperaturi
- Ependorf tube su centrifugirane 1 min na 13 000 rpm
- Otvorene Ependorf tube su inkubirane 3 min na 72°C
- Prečišćeni fragmenti DNK čuvani su na +4°C do analize.

Reakciona smeša pripremana je u zapremini od 5 µl i sadržala je 2,2 ml *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100* seta (*Applied Biosystems, SAD*), 0,8 pmol prajmera i 10-40 ng produkta PCR-a, po preporuci proizvođača. Reakcija je izvođena u mašini *Veriti® Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, SAD*) po sledećem temperaturnom profilu:

- inicijalna denaturacija u trajanju od 1 min na 96°C;
- 25 ciklusa denaturacije u trajanju od 10 s na 96°C, hibridizacije prajmera u trajanju od 5 s na 50°C i ekstenzije u trajanju od 4 min na 60°C; i
- Naglo hlađenje na +4°C i čuvanje produkata reakcije na istoj temperaturi do trenutka analize.

Pre nego što se produkti reakcije PCR-a za sekvenciranje podvrgnu analizi kapilarnom elektroforezom, vršena je njihova precipitacija pomoću etanola i EDTA. Prečišćeni produkti rastvarani su u *Hi-Di™ Formamide* (*Applied Biosystems, SAD*).

Protokol za prečišćavanje reakcije sekvenciranja korišćenjem etanol/EDTA precipitacije:

- Nakon reakcije sekvenciranja rađene u zapremini od 5 ml, u svaku 0,2 ml mikrotubu dodavano je 5 ml 125 mM EDTA, pH 8,0 (*Serva, Nemačka*) i 60 ml 96% etanola
- Sadržaj u tubi zapremine 0,2 ml mešan je okretanjem gore-dole 4 puta
- Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min
- Nakon inkubacije tube su stavljane u kolektorske tube zapremine 2 ml i centrifugirane 30 min na 6 000 rpm na temperaturi od +4°C.
- Odlivanje supernatanta vršeno je smeštanjem mikrotube od 0,2 ml, naopako u kolektorsku tubu od 2 ml i centrifugiranjem 1 min na 1 200 rpm
- Nakon odlivanja supernatanta dodavano je 60 ml 70% etanola
- Centrifugiranje je vršeno 15 min na 5 000 rpm i temperaturi od 4°C
- Ponovo je vršeno odlivanje supernatanta istom procedurom
- Talozi su sušeni inkubiranjem 2 min na 90°C
- Nakon dovavanja 15 ml Hi-Di formamida, rastvoreni talozi su 2 puta kratko vorteksovani
- Pripremljeni uzorci opisanom procedurom čuvani su na -20°C do kapilarne elektroforeze.

Kapilarna elektroforeza vršena je u automatskom sekvenatoru *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, SAD*), u kapilari od 36 cm koja je ispunjena polimerom POP4

(*Performance Optimized Polymer™-4*, Applied Biosystems, SAD). Vreme injektiranja uzorka iznosilo je 40 s pri naponu od 3 kV, a elektroforeza se izvodila na 15 kV na 55°C u trajanju od 35 min.

Digitalni zapisi automatskog očitavanja sekvenci tokom kapilarne elektroforeze obrađivani su korišćenjem *Sequencing Analysis v5.2* (Applied Biosystems, SAD) i *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Ibis Biosciences, SAD). Dobijene sekvence DNK upoređivane su sa referentnim sekvencama upotrebom programa BLASTN iz familije programa BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2.5. Statistička obrada rezultata genotipizacije varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262

Studije slučajeva i kontrola porede učestalosti alela i genotipova odabranih varijanti, kod individua iz dve grupe, radi utvrđivanja potencijalno statistički značajnog postojanja vezanosti odabrane genetičke varijante sa rizikom za razvoj bolesti (67). Za potrebe statističke analize korišćena je web bazirana aplikacija SNPStats (*Catalan Institute of Oncology*, Barselona, Španija) (68).

U svrhu provere rezultata genotipizacije, pravilne selekcije kontrolne grupe, kao i stabilne raspodele učestalosti alela i genotipova, vršena je analiza prisustva Hardi-Vajnbergove ravnoteže (eng. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) u obe grupe ispitanika, nezavisno (69). Za navedene analize korišćen je egzaktni test u okviru navedenog softverskog paketa SNPStats.

Nakon proveravanja potencijalnog odstupanje od HWE, pristupilo se testiranju asocijacije analiziranih genetičkih varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije. Statistički test primenjen u tu svrhu zasnivao se na analizi asocijacije posedovanja određenog alela ili genotipa ispitivane genetičke varijante i pripadnosti jednoj od dve grupe ispitanika, slučajeva ili kontrola. Testovi distribucije alela i genotipova između bolesnika i kontrolne grupe bazirani su na logističkoj regresiji, a kao mera asocijacije alela ili genotipa korišćen parameter je odnos šansi (eng. *Odds Ratio*, OR). Ova veličina pokazuje koliko je veća verovatnoća pojave idiopatske neplodnosti kod muškaraca koji poseduju određeni alel ili genotip u odnosu na muškarce koje ovaj alel ne poseduju ili imaju neki drugi genotip iste genetičke varijante. Prilikom izračunavanja vrednosti OR, kao referentni alel ili genotip korišćen je učestaliji alel, odnosno homozigotni genotip učestalijeg alela. Statistički značajnim rezultatom smatran je onaj za koji je dobijena *P* vrednost bila manja od 0,05, dok su *P* vrednosti veće ili jednake 0,05 a manje od 0,1 označavane trendom značajnosti asocijacije (70).

Regresioni testovi korišćeni su za analizu različitih genetičkih modela asocijacije: kodominantnog, dominantnog, recesivnog, overdominantnog i log-aditivnog. Izbor najadekvatnijeg modela za ispitivane genetičke asocijacije bazirao se na primeni Akaike informacionog kriterijuma (eng. *Akaike Information Criterion*, AIC), a čije manje vrednosti u

istom testiranju ukazuju na model koji bolje odgovara ispitivanim asocijacijama, Ukoliko je razlika između dve najmanje dobijene vrednosti AIC u istom testu bila manja od 2, svaki od genetičkih modela kojima odgovaraju ove vrednosti AIC smatran je potencijalno adekvatnim (71).

Za analizu kvantitativnih varijabli, odnosno rezultata analize spermograma, korišćeni su Kolmogorov-Smirnov test za procenu normalnosti distribucije rezultata, F-test za procenu jednakosti varijanse u grupama ispitanika, kao i Studentov T-test za poređenje rezultata sa normalnom raspodelom između grupa. U slučaju odsustva normalne raspodele, za poređenje rezultata analize spermograma u okviru grupa ispitanika korišćen je Man-Vitnijev U-test (72-74).

3.2.6. Meta-analiza asocijacije varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa razvojem idiopatske muške neplodnosti

U okviru meta-analize, pretraga baze literaturnih podataka PubMed sprovedena je sa ciljem identifikacije potencijalno relevantnih publikacija i bazirala se na upotrebi kombinacija ključnih reči:

- a) „neplodnost“ ili “sterilitet” (eng. *infertility*) ili određen tip steriliteta (“Azoospermia”, “Oligospermia”, “Oligozoospermia”, “Asthenospermia”, “Asthenozoospermia”, “Teratospermia”, “Teratozoospermia”, “Oligoasthenozoospermia”, “Asthenoteratozoospermia”, “Oligoteratozoospermia”);
- b) “polimorfizam” (eng. *polymorphism*) ili “varijanta(e)” (eng. *variant(s)*) ili “genotip” (eng. *genotype*);
- c) identifikator varijante ili ime gena (“*PRMT6*” ili “*PEX10*” ili “*SOX5*” ili “rs12097821”, ili “rs2477686” ili “rs10842262”).

Pretraga nije bila ograničena na unose na engleskom jeziku, dok je vremenski okvir publikovanja bio ograničen do 31. decembra 2021. godine. Liste referenci potencijalno pogodnih članaka za uključivanje u meta-analizu analizirane sa ciljem identifikacije dodatnih publikacija za skrining prema naslovima radova i sadržaju apstrakata.

Iščitavanjem naslova i apstrakata eliminisane su iz dalje analize studije koje nisu bile vezane za temu istraživanja.

Procena pogodnosti radova za uključivanje rezultata u kvantitativnu sintezu zasnivala se na primeni predefinisanih kriterijuma:

1. Radovi uključuju rezultate studija genetičkih asocijacija varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262 sa rizikom za pojavu muške idiopatske neplodnosti ili specifičnog podtipa;
2. Dizajn je odgovarajući za studije slučajeva i kontrola;
3. Prikazano je dovoljno podataka za izračunavanje mera veličine efekata, odnosno OR (raspodele genotipova, učestalosti alela) u okviru teksta rada ili pratećeg materijala;
4. Prikazane su informacije o dizajnu studija, procedurama regrutovanja i selekcije ispitanika, karakteristikama kontrolne grupe, kriterijumima za dijagnostiku, etničkom

poreklu ispitanika, metodologiji genotipizacije i statističke analize, i drugi metodološki podaci od značaja za temu istraživanja.

Kriterijumi za eliminaciju studija uključivali su

1. Povlačenje objavljenih članaka;
2. Greške u dizajnu studije; i
3. Veće greške u prezentaciji rezultata.

Iz studija koje su bile zadržane tokom procene pogodnosti za uključivanje u meta-analizu izdvajani su podaci koji su se odnosili na

1. Imena autora i godinu publikovanja;
2. Državu i etničko poreklo ispitanika;
3. Broj ispitanika;
4. Način regrutovanja kontrola;
5. Metode genotipizacije; i
6. Naziv ispitivane genetičke varijante i brojeve genotipova/alela.

Za svaku od ispitivanih genetičkih varijanti (rs12097821, rs2477686 i rs10842262) sprovedene su zasebne meta-analize, dok su na osnovu rezultata studija koje su uključivale više grupa ispitanika ili su analizirale više varijanti formirani višestruki zasebni unosi za statističku sintezu podataka.

Testovi kojima je procenjivana heterogenost rezultata studija, kao i kvantitativna sinteza podataka, sprovedena je uz pomoć statističkih paketa OpenMeta-analyst (*The Center for Evidence-based Medicine, Brown University, SAD*) i MetaGenyo (*Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research, (GENYO), Granada, Španija*) (75). Veličine efekata predstavljani su kao OR i odgovarajući 95% interval poverenja (95% CI).

Heterogenost je procenjivana na osnovu rezultata Kohranovog Q testa i indeksa nedoslednosti (I^2), pri čemu su P vrednost <0.1 или $I^2 \geq 50\%$ ukazivale na značajnu heterogenost rezultata uključenih studija.

U slučajevima značajne heterogenosti, metod DerSimoniana i Lerda korišćen je za kvantitativnu sintezu, dok je u preostalim slučajevima meta-analiza bila zasnovana na primeni Mantel-Hanselovog metoda za model fiksiranog efekta (76). Podaci iz studija uključenih u meta-analizu korišćeni su za konstrukciju „šumskih dijagrama“ (eng. *Forest plots*), u okviru koji su bili predstavljani odgovarajućim simbolom rezultati meta-analize, odnosno veličine efekata i P vrednosti. Kvantitativna sinteza podataka sprovedena je za četiri genetička modela asocijacija: dominantni, recesivni, alelski i overdominantni (77).

3.2.7. Genotipizacija varijanti rs2910164 i rs895819

Genotipizacija varijanti u genima *MIR-27a* (rs2910164) i *MIR-146a* (rs895819) bila je izvršena korišćenjem *TaqMan*[®] eseja za alalsku diskriminaciju (C__3056952_20 i

C_15946974_10) (*Applied Biosystems, SAD*) prema uputstvu proizvođača, i kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR*). Fluorescenca je bila očitavana pre i nakon amplifikacije molekula DNK, uz korišćenje odgovarajuće boje kao pasivne reference. Analiza je izvršena korišćenjem *Step One Real-time PCR System* (*Applied Biosystems, Waltham, MA, USA*), a obrada rezultata upotrebom *StepOne* softvera verzije 2.3.

Eseji alelske diskriminacije se zasnivaju na postojanju jedinstvenog para prajmera i oligonukleotidnih Taqman proba komplementarnih delu sekvence koja se amplifikuje. Svaka Taqman proba obeležena je sa dve fluoroboje – na 5' kraju bojom koja se označava kao reporter, a na 3' kraju bojom koja se označava kao prigušivač. Kao posledica transfera fluorescentne rezonantne energije (eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*), koji predstavlja inhibiciju boje reportera prigušivačem usled njihove bliske pozicioniranosti, ne dolazi do emisije fluorescencije kada je proba intaktna. Nakon koraka denaturacije u PCR reakciji dolazi do hibridizacije probe ukoliko je proba u potpunosti komplementarna ciljnoj sekvenci, a u koraku elongacije i do njene hidrolitičke degradacije od strane Taq polimeraze. Usled degradacije probe dolazi do udaljavanja reporterske boje od prigušivača i emitovanja fluorescencije. Intenzitet fluorescencije raste tokom svakog ciklusa PCR-a kako raste količina matrice sa kojom hibridizuju probe (78).

Svaki esej za alelsku diskriminaciju sadržao je par proba obeleženih različitim fluorescentnim bojama od kojih je jedna bila perfektno komplementarna alelu 1, a druga alelu 2. Merenjem promena u intenzitetu fluorescencije boja određivan je genotip ispitivanog uzorka.

Zapremina pojedinačne reakcione smeše za genotipizaciju iznosila je 5 µl. Reakciona smeša sadržala je 2.5 µl *2xTaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems 2010, SAD*), 0.125 µl *40xTaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assay* i 1.075 µl vode bez nukleaza.

Za genotipizaciju varijante rs2910164 korišćen je esej C__3056952_20 (*Applied Biosystems, SAD*) a za genotipizaciju rs895819 korišćen je esej C_15946974_10 (*Applied Biosystems, SAD*) prema uputstvu proizvođača.

Radi otklanjanja inhibicije dodavan je goveđi serumski albumin (eng. *Bovine Serum Albumin, BSA*) (*Sigma-Aldrich, SAD*) kao aditiv finalne koncentracije 0,6 µg/µl.

Reakciona smeša je nalivana na standardnu reakcionu ploču (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate*) (*Applied Biosystems, SAD*) sa 96 bunarića. U bunarićima A1 i B1 svake reakcione ploče nalivana je kontrola bez matrice (1 µl vode bez nukleaza) koja je služila za proveru kontaminacije reakcije, ali i za očitavanje krajnjeg stepena porasta fluorescencije. U ostale bunariće nalivano je po 1 µl odgovarajućeg uzorka DNK. Pored negativne kontrole, prilikom nalivanja bile su prisutne i pozitivne kontrole za svaki genotip. Nakon završenog nalivanja, ploča je prekrivana optičkom folijom (*MicroAmp™ Optical adhesive film*) (*Applied Biosystems, SAD*) i centrifugirana 1 minut na 3000 rpm. Reakcija je izvođena u mašini *StepOnePlus™* (*Applied Biosystems, SAD*).

Temperaturni profil reakcije bio je:

- inicijalna denaturacija na temperaturi 95°C u trajanju od 10 minuta; i
- 40 ciklusa od kojih je svaki ciklus bio sastavljen iz denaturacije na temperaturi od 92°C u trajanju od 15 sekundi i hibridizacije prajmera sa elongacijom na temperaturi od 60°C u trajanju od 1 minuta.

Analiza podataka vršena je u softveru *StepOnePlusSoftware™* verzija 2.3 (*Applied Biosystems, SAD*) koji pomoću složenog algoritma određuje koji je doprinos svakog alela iz pojedinačnog uzorka u ukupno detektovanoj vrednosti fluorescentnih signala.

Analiza fluorescentnih signala vršena je u sledećim koracima:

- "*Pre-read run*" kada se pre početka amplifikacije merio osnovni nivo fluorescencije poreklom od spontano degradovanih proba;
- "*Amplification run*" tokom koga su se beležili podaci o fluorescenciji poreklom od hidrolize proba tokom PCR-a u realnom vremenu;
- "*Post-read run*" kad se od intenziteta fluorescencije na kraju procesa oduzimo intenzitet fluorescencije izmeren tokom koraka "*Pre-read run*".

Na osnovu korigovanih vrednosti fluorescencije program određuje stvaran porast fluorescencije, a time i koji su aleli prisutni u pojedinačnim uzorcima.

3.2.8. Statistička obrada rezultata genotipizacije varijanti rs2910164 i rs895819

Statistička obrada rezultata genotipizacije varijanti rs2910164 i rs895819 rađena je prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.5.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati formiranja baze podataka i biobanke uzoraka muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatske neplodnosti i fertilnih muškaraca iz Severne Makedonije

Ukupan broj ispitanika u okviru ove doktorske disertacije činilo je 267 muškaraca iz populacije Severne Makedonije koji su dobrovoljno dali uzorak periferne krvi kao i pismeni informisani pristanak za njihovo uključanje u ovu studiju.

Grupa slučajeva u kojoj je ispitivana moguća asocijacija genetičkih varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262 sa pojavom idiopatske neplodnosti uključivala je 137 muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatske neplodnosti koji su dijagnostikovani u bolnici Acibadem Sistina Skopje, Skoplje, Severna Makedonija u vremenskom periodu od početka maja do kraja decembra 2018. godine. Kontrolnu grupu činilo je 130 zdravih dobrovoljaca odgovarajućeg uzrasta koji su imali najmanje jedno dete. Kriterijumi isključenja za grupu slučajeva bili su dijagnoza varikokele, kongenitalna opstrukcija semenovoda, hromozomske abnormalnosti, kao i mikroleucije u regionu AZF hromozoma Y.

Analiza spermograma kod neplodnih muškaraca urađena je u skladu sa smernicama SZO. Na osnovu rezultata spermograma (količine semene tečnosti, pokretljivosti i morfologije spermograma) neplodni muškarci su svrstavane u podgrupe različitog tipa idiopatske neplodnosti. Osnovni podaci o starosti muškaraca, nivou testosterona u serumu i parametrima spermograma u ovoj grupi slučajeva dati su u tabeli 4.1.

Grupa slučajeva u kojoj je ispitivana moguća asocijacija genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti obuhvatala je 158 muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatske neplodnosti iz Severne Makedonije. Podaci o starosti ispitanika i rezultati spermograma za ovu grupu slučajeva dati su u tabeli 4.2.

Tabela 4.1. Kliničke karakteristike neplodnih muškaraca koji su sačinjavali grupu slučajeva u studiji asocijacije genetičkih varijanti rs12097821, rs2477686 i rs10842262 i idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Klinička dijagnoza	NOA**	Drugi tipovi neplodnosti
Broj ispitanika	12	125
Starost (izražena u godinama)*	36.0±5.8	39.9±8.7
Testosteron (ng/ml)	5.70±3.08	4.9±1.23
Parametri spermograma		
Volumen ejakulata (ml)	3.96±2.18	3.00±1.56
Broj spermatozoida (10 ⁶)	-	219.4±167.7
Gustina ejakulata (10 ⁶ /ml)	-	74.7±52.8
Progresivno pokretni (%)	-	33.1±13.9
<i>Rapid progressive motility</i> (%)	-	17.5±8.4
<i>Average progression grade</i> (0-4)	-	2.58±0.78
Udeo živih spermatozoida (%)	-	47.4±17.7

*Podaci prikazani u formi srednjih vrednosti korigovanih za standarnu devijaciju (SD)

**NOA – Neobstruktivna azoospermija (eng. *nonobstructive azoospermia*, NOA)

Tabela 4.2. Kliničke karakteristike neplodnih muškaraca koji su sačinjavali grupu slučajeva u studiji asocijacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 i idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

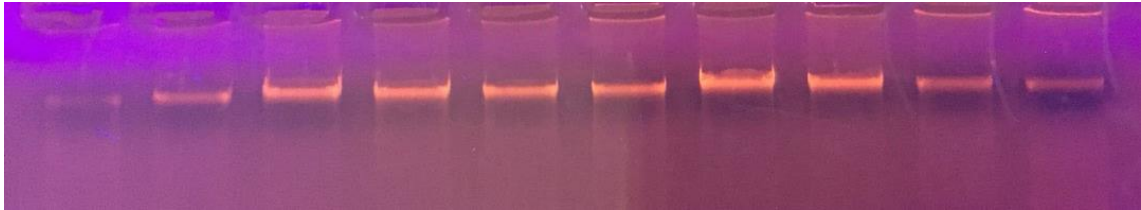
Klinička dijagnoza	NOA**	Drugi tipovi neplodnosti
Broj ispitanika	14	144
Starost (izražena u godinama)*	35.57±5.91	39.79±8.30
Parametri spermograma		
Volumen ejakulata (ml)	4.06±2.04	3.02±1.55
Broj spermatozoida (10 ⁶)	-	225.15±170.32
Gustina ejakulata (10 ⁶ /ml)	-	75.34±52.16
Progresivno pokretni (%)	-	33.57±13.87
<i>Rapid progressive motility</i> (%)	-	17.78±8.30
<i>Average progression grade</i> (0-4)	-	2.59±0.76
Udeo živih spermatozoida (%)	-	47.44±17.59

*Podaci prikazani u formi srednjih vrednosti korigovanih za standarnu devijaciju (SD)

**NOA – Neobstruktivna azoospermija (eng. *nonobstructive azoospermia*, NOA)

4.2. Rezultati izolovanja genomske DNK iz uzoraka periferne krvi

Iz svih uzoraka periferne krvi muškaraca sa idiopatskom neplodnošću i fertilitnih muškaraca iz Severne Makedonije uspešno je izolovana genomska DNK metodom primene magnetnih kuglica (slika 4.1.)



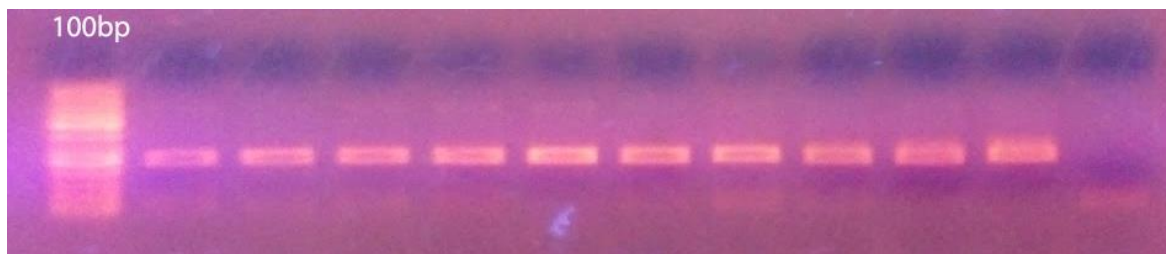
Slika 4.1. Provera kvaliteta i količine izolovane genomske DNK elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu bojenim etidijum bromidom (u prvom bunaricu nalazi se K562 – DNK standard za količinu 1ng/μl). Prisustvo jedne trake je znak da izolovana genomska DNK nije degradovana i da je zadovoljavajućeg kvaliteta za dalje analize. Količina DNK se na agaroznom gelu vrši poređenjem intenziteta traka sa trakom u kojoj se nalazi K562.

4.3. Rezultati PCR reakcije za umnožavanje DNK fragmenata koji okružuju genetičke varijante rs10842262, rs2477686 i rs12097821

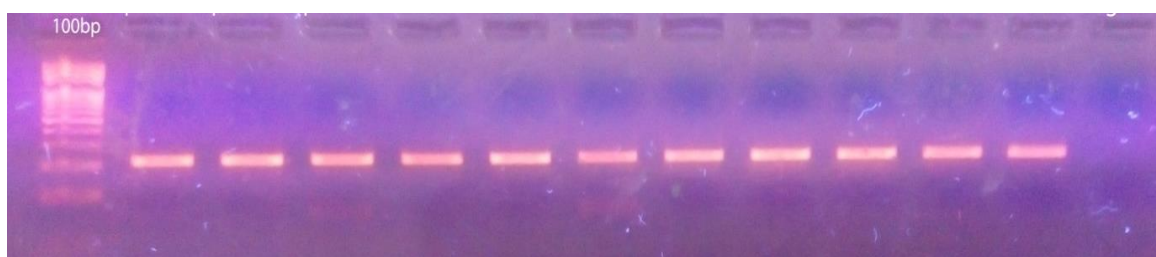
Specifičnost PCR amplifikacije fragmenata molekula DNK u okviru kojih se nalaze genetičke varijante rs10842262 (slika 4.2), rs2477686 (slika 4.3) i rs12097821 (slika 4.4) proveravana je elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu. Prisustvo jedne diskretne trake očekivane dužine ukazivalo je na uspešnu i specifičnu amplifikaciju fragmenta DNK od interesa.



Slika 4.2. Provera uspešnosti i specifičnosti amplifikacije fragmenta DNK u okviru kojeg se nalazi genetička varijanta rs10842262 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu bojenim etidijum bromidom. Očekivana dužina amplifikovanih fragmenata DNK iznosila je 225 bp. (*GeneRuler* 100bp – standard za dužinu; u poslednjem bunariću je negativna kontrola).



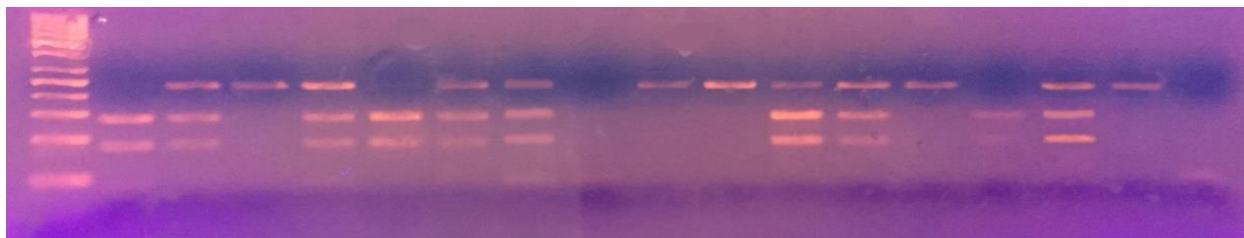
Slika 4.3. Provera uspešnosti i specifičnosti amplifikacije fragmenta DNK u okviru kojeg se nalazi genetička varijanta rs2477686 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu bojenim etidijum bromidom. Očekivana dužina amplifikovanih fragmenata DNK iznosila je 246 bp. (*GeneRuler* 100bp – standard za dužinu; u poslednjem bunariću je negativna kontrola).



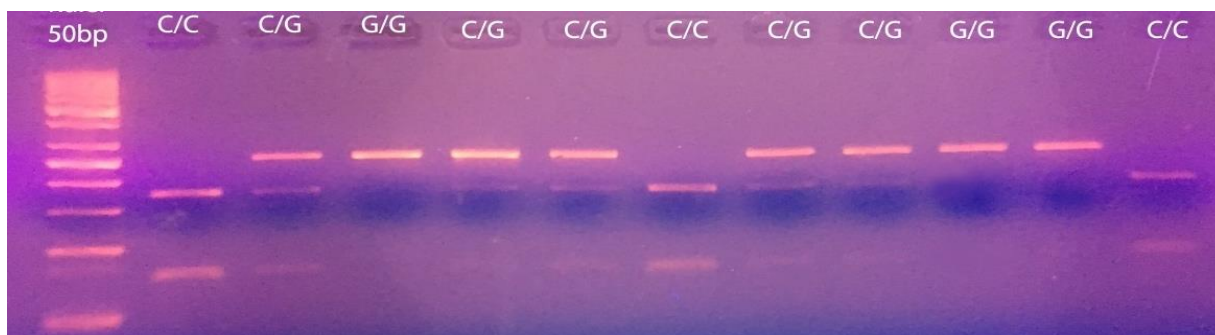
Slika 4.4. Provera uspešnosti i specifičnosti amplifikacije fragmenta DNK u okviru kojeg se nalazi genetička varijanta rs12097821 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu bojenim etidijum bromidom. Očekivana dužina amplifikovanih fragmenata DNK iznosila je 217 bp. (*GeneRuler* 100bp – standard za dužinu; u poslednjem bunariću je negativna kontrola).

4.4. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 metodom PCR-RFLP

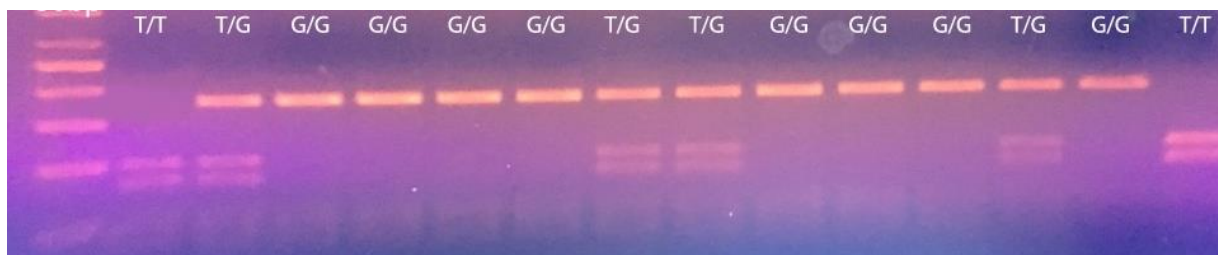
Očitavanje rezultata genotipizacije genetičkih varijanti rs10842262 (slika 4.5.), rs2477686 (slika 4.6) i rs12097821 (slika 4.7.) metodom PCR-RFLP vršeno je u elektroforezom u 3% agaroznom gelu. Genotipizacija sve tri varijante bila je uspešna kod svih učesnika istraživanja.



Slika 4.5. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs10842262 metodom RFLP. Homozigot G/G detektovan je prisustvom dve trake veličina 89 bp i 136 bp, heterozigot G/C prisustvom tri trake veličina 89 bp, 136 bp i 225 bp i homozigot C/C prisustvom jedne trake veličine 225 bp. (*GeneRuler* 50 bp – standard za dužinu).



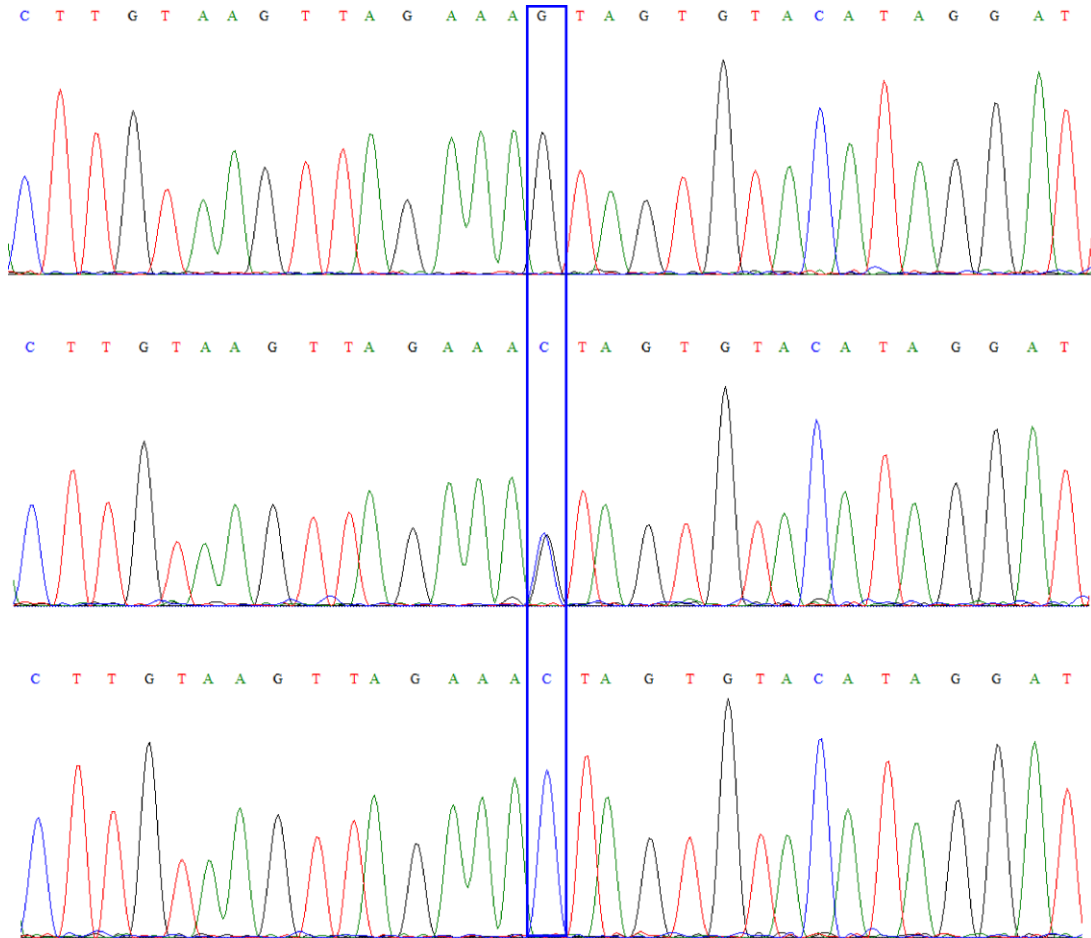
Slika 4.6. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs2477686 metodom RFLP. Homozigot C/C detektovan je prisustvom dve trake veličina 73 bp i 173 bp, heterozigot C/G prisustvom tri trake veličina 73 bp, 173 bp i 246 bp i homozigot G/G prisustvom jedne trake veličine 246 bp. (*GeneRuler* 50 bp – standard za dužinu).



Slika 4.7. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs12097821 metodom RFLP. Homozigot T/T detektovan je prisustvom dve trake veličina 78 bp i 139 bp, heterozigot T/G prisustvom tri trake veličina 78 bp, 139 bp i 217 bp i homozigot G/G prisustvom jedne trake veličine 217 bp. (*GeneRuler* 50 bp – standard za dužinu).

4.5. Rezultati provere genotipizacije rs10842262, rs2477686 i rs12097821 metodom sekvenciranja po Sangeru

Uzorci pet nasumično izabranih muškaraca sa idiopatskom neplodnošću i pet fertilnih muškaraca korišćeni su za proveru genotipizacije rs10842262, rs2477686 i rs12097821 korišćenjem metode sekvenciranja po Sangeru. Rezultai ove analize su pokazali pouzdanost i tačnost metode PCR-RFLP kojom je vršena genotipizacije gore navedenih genetičkih varijanti.



Slika 4.8. Elektroferogram na kojem su prikazani delovi sekvence molekula DNK koji okružuju rs10842262. Na gornjem delu slike prikazan je fragment molekula DNK koji sadrži homozigot G/G rs1084226. U sredini je prikazana sekvenca sa heterozigotom G/C. U donjem delu slike prikazane je sekvenca sa homozigotom C/C rs1084226.

4.6. Rezultati studije asocijacije genetičkih varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Genotipizacija varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 bila je uspešna kod svih učesnika istraživanja. Učestalost genotipova u grupi od 137 neplodnih muškaraca, kao i u grupi od 130 fertilnih kontrola, data je u tabeli 4.3. Za distribucije genotipova u fertilnim kontrolama nisu ustanovljena statistički značajna odstupanja od HWE ($P=0,38$, $P=0,076$ i $P=0,69$ za rs10842262, rs2477686 i rs12097821, respektivno).

Tabela 4.3.a. Asocijacija rs10842262 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC
rs10842262						
Kodominantni						
	CC	36 (27.7)	28 (20.4)	1.00		
	CG	70 (53.9)	84 (61.3)	1.54 (0.86-2.77)	0.35	373.8
	GG	24 (18.5)	25 (18.2)	1.34 (0.63-2.83)		
Dominantni						
	CC	36 (27.7)	28 (20.4)	1.00		
	CG+GG	94 (72.3)	109 (79.6)	1.49 (0.85-2.62)	0.16	372
Recesivni						
	CC+CG	106 (81.5)	112 (81.8)	1.00		
	GG	24 (18.5)	25 (18.2)	0.99 (0.53-1.83)	0.96	374
Overdominatni						
	CC+GG	60 (46.1)	53 (38.7)	1.00		
	CG	70 (53.9)	84 (61.3)	1.36 (0.83-2.21)	0.22	372.4
Log-aditivni						
	-	-	-	1.18 (0.82-1.72)	0.37	373.2

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Tabela 4.3.b. Asocijacija rs2477686 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC
rs2477686						
Kodominantni						
	GG	45 (34.6)	56 (40.9)	1.00		
	GC	54 (41.5)	48 (35)	0.71 (0.41-1.24)	0.49	374.5
	CC	31 (23.9)	33 (24.1)	0.86 (0.46-1.60)		
Dominantni						
	GG	45 (34.6)	56 (40.9)	1.00		
	GC+CC	85 (65.4)	81 (59.1)	0.77 (0.47-1.26)	0.29	372.8
Recesivni						
	GG+GC	99 (76.2)	104 (75.9)	1.00		
	CC	31 (23.9)	33 (24.1)	1.01 (0.58-1.78)	0.96	374
Overdominantni						
	GG+CC	76 (58.5)	89 (65)	1.00		
	GC	54 (41.5)	48 (35)	0.76 (0.46-1.25)	0.27	372.8
Log-aditivni						
	-	-	-	0.90 (0.66-1.23)	0.53	373.6

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Tabela 4.3.c. Asocijacija rs12097821 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Varinata	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs Kontrole		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC
rs12097821						
Kodominantni						
	GG	100 (76.9)	105 (76.6)	1.00		
	GT	29 (22.3)	30 (21.9)	0.99 (0.55-1.76)	0.86	375.7
	TT	1 (0.8)	2 (1.5)	1.90 (0.17-21.34)		
Dominantni						
	GG	100 (76.9)	105 (76.6)	1.00		
	GT+TT	30 (23.1)	32 (23.4)	1.02 (0.58-1.79)	0.96	374
Recesivni						
	GG+GT	129 (99.2)	135 (98.5)	1.00		
	TT	1 (0.8)	2 (1.5)	1.91 (0.17-21.33)	0.59	373.7
Overdominantni						
	GG+TT	101 (77.7)	107 (78.1)	1.00		
	GT	29 (22.3)	30 (21.9)	0.98 (0.55-1.74)	0.94	374
Log-additivni						
	-	-	-	1.05 (0.62-1.78)	0.86	373.9

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

* Statistički značajni rezultati predstavljani su bold

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Rezultati studija asocijacije prikazani u tabeli 4.3a-c ukazuju na nepostojanje statistički značajnih razlika u distribuciji genotipova između muškaraca sa dijagnozom idiopatske neplodnosti i muškaraca iz kontrolne grupe. Za bilo koji testirani genetički model, *P* vrednosti nisu dostigle statističku značajnost.

Ipak, kada su neplodni muškarci stratifikovani prema rezultatima spermograma, učestalost alela G rs10842262 je bila značajno povećana u grupi muškaraca sa niskom koncentracijom spermatozoida u ejakulatu, u poređenju sa kontrolama ($P_{\text{log-aditiv}} = 0,024$, OR = 2,10, 95% CI 1.08–4.06) (Tabela 4.4.a.).

Takođe, utvrđeno je da je učestalost genotipa rs10842262 GG kod ispitanika sa oligospermijom oko dva puta veća u odnosu na onu utvrđenu za kontrolu. Prema AIC

kriterijumima, najprikladniji model asocijacije bio je log-aditivni. To je ujedno i jedini genetički model za koji je utvrđena statistička značajnost, jer je za kodominantni, dominantni i recesivni model postignut je samo statistički trend ($0,05 \leq P < 0,1$) ($P_{\text{codom}}=0,079$, $P_{\text{rec}}=0,062$, $P_{\text{dom}}=0,077$) (Tabela 4.4.a.). Za druge dve ispitivane varijante nije ustanovljena statistički značajna razlika u distribucijama genotipova između grupa muškaraca sa dijagnozom oligospermije i kontrolne grupe (Tabele 4.4.b. i 4.4.c.)

Tabela 4.4.a. Poređenje distribucije genotipa rs10842262 između ispitanika sa niskom koncentracijom spermatozoida u ejakulatu i fertilnih kontrola

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs10842262						
Kodominantni						
	CC	36 (27.7)	3 (12)	1.00		
	CG	70 (53.9)	13 (52)	2.23 (0.60-8.33)	0.079 ^b	137.9
	GG	24 (18.5)	9 (36)	4.50 (1.10-18.34)*		
Dominantni						
	CC	36 (27.7)	3 (12)	1.00		
	CG+GG	94 (72.3)	22 (88)	2.81 (0.79-9.96)	0.077 ^b	137.8
Recesivni						
	CC+CG	106 (81.5)	16 (64)	1.00		
	GG	24 (18.5)	9 (36)	2.48 (0.98-6.29)	0.062 ^b	137.5
Overdominantni						
	CC+GG	60 (46.1)	12 (48)	1.00		
	CG	70 (53.9)	13 (52)	0.93 (0.39-2.19)	0.87	140.9
Log-aditivni						
	-	-	-	2.10 (1.08-4.06)	0.024	135.9

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti

* Statistički značajni rezultati predstavljani su bold

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Tabela 4.4.b. Poređenje distribucije genotipa rs2477686 između ispitanika sa niskom koncentracijom spermatozoida u ejakulatu i fertilnih kontrola

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs2477686						
	Kodominantni					
	GG	45 (34.6)	11 (44)	1.00		
	GC	54 (41.5)	6 (24)	0.45 (0.16-1.33)	0.24	140.1
	CC	31 (23.9)	8 (32)	1.06 (0.38-2.93)		
	Dominanti					
	GG	45 (34.6)	11 (44)	1.00		
	GC+CC	85 (65.4)	14 (56)	0.67 (0.28-1.61)	0.38	140.2
	Recesivni					
	GG+GC	99 (76.2)	17 (68)	1.00		
	CC	31 (23.9)	8 (32)	1.50 (0.59-3.82)	0.4	140.2
	Overdominantni					
	GG+CC	76 (58.5)	19 (76)	1.00		
	GC	54 (41.5)	6 (24)	0.44 (0.17-1.19)	0.09	138.1
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.98 (0.56-1.70)	0.94	141

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Tabela 4.4.c. Poređenje distribucije genotipa rs12097821 između ispitanika sa niskom koncentracijom spermatozoida u ejakulatu i fertilnih kontrola

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs Kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs12097821						
	Kodominantni					
	GG	100 (76.9)	20 (80)	1.00		
	GT	29 (22.3)	5 (20)	0.86 (0.30-2.50)	0.81	142.5
	TT	1 (0.8)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		

Dominantni						
GG	100 (76.9)	20 (80)	1.00			
GT+TT	30 (23.1)	5 (20)	0.83 (0.29-2.41)	0.73	140.8	
Recesivni						
GG+GT	129 (99.2)	25 (100)	1.00			
TT	1 (0.8)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)	0.55	140.6	
Overdominatni						
GG+TT	101 (77.7)	20 (80)	1.00			
GT	29 (22.3)	5 (20)	0.87 (0.30-2.52)	0.8	140.9	
Log-additivni						
-	-	-	0.81 (0.29-2.27)	0.68	140.8	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Kada je distribucija genotipa rs10842262, rs2477686 i rs12097821 upoređena između muškaraca sa abnormalnom pokretljivošću spermatozoida ili izmenjenom morfologijom i fertilnih kontrola, nije bilo statistički značajnih razlika (Tabele 4.5. i 4.6.). Kako je samo kod 12 muškaraca postavljena klinička dijagnoza azospermija, smatrali smo da nije statistički opravdano upoređivati učestalost genotipa tako male grupe neplodnih muškaraca sa kontrolnom grupom.

Tabela 4.5. Poređenje distribucije genotipa rs10842262, rs2477686 i rs12097821 između ispitanika sa abnormalnom pokretljivošću spermatozoida i fertilnih kontrola

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs Kontrole		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost _a	AIC
rs10842262						
Kodominantni						
	CC	36 (27.7)	10 (21.7)	1.00		
	CG	70 (53.9)	25 (54.4)	1.29 (0.56-2.97)	0.35	373.8
	GG	24 (18.5)	11 (23.9)	1.65 (0.61-4.49)		
Dominantni						
	CC	36 (27.7)	10 (21.7)	1.00		
	CG+GG	94 (72.3)	36 (78.3)	1.38 (0.62-3.07)	0.42	205.6

	Recesivni					
	CC+CG	106 (81.5)	35 (76.1)	1.00		
	GG	24 (18.5)	11 (23.9)	1.39 (0.62-3.12)	0.43	205.6
	Overdominantni					
	CC+GG	60 (46.1)	21 (45.6)	1.00		
	CG	70 (53.9)	25 (54.4)	1.02 (0.52-2.00)	0.95	206.2
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.28 (0.78-2.12)	0.32	205.2
rs2477686						
	Kodominantni					
	GG	45 (34.6)	19 (41.3)	1.00		
	GC	54 (41.5)	16 (34.8)	0.70 (0.32-1.52)	0.67	207.4
	CC	31 (23.9)	11 (23.9)	0.84 (0.35-2.01)		
	Dominantni					
	GG	45 (34.6)	19 (41.3)	1.00		
	GC+CC	85 (65.4)	27 (58.7)	0.75 (0.38-1.50)	0.42	205.6
	Recesivni					
	GG+GC	99 (76.2)	35 (76.1)	1.00		
	CC	31 (23.9)	11 (23.9)	1.00 (0.46-2.21)	0.99	206.2
	Overdominantni					
	GG+CC	76 (58.5)	30 (65.2)	1.00		
	GC	54 (41.5)	16 (34.8)	0.75 (0.37-1.51)	0.42	205.6
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.89 (0.57-1.39)	0.61	206
rs12097821						
	Kodominantni					
	GG	100 (76.9)	37 (80.4)	1.00		
	GT	29 (22.3)	9 (19.6)	0.84 (0.36-1.94)	0.68	207.4
	TT	1 (0.8)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		
	Dominantni					
	GG	100 (76.9)	37 (80.4)	1.00		
	GT+TT	30 (23.1)	9 (19.6)	0.81 (0.35-1.87)	0.62	206

Recesivni						
GG+GT	129 (99.2)	46 (100)	1.00	0.44	205.6	
TT	1 (0.8)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)			
Overdominantni						
GG+TT	101 (77.7)	37 (80.4)	1.00	0.7	206.1	
GT	29 (22.3)	9 (19.6)	0.85 (0.37-1.96)			
Log-aditivni						
-	-	-	0.79 (0.35-1.77)	0.56	205.9	

Tabela 4.6. Poređenje distribucije genotipa rs10842262, rs2477686 i rs12097821 između ispitanika sa izmenjenom morfologijom spermatozoida i fertilnih kontrola

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs Kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost _a	AIC
rs10842262						
Kodominantni						
	CC	36 (27.7)	12 (19.7)	1.00	0.38	243.3
	CG	70 (53.9)	39 (63.9)	1.67 (0.78-3.58)		
	GG	24 (18.5)	10 (16.4)	1.25 (0.47-3.35)		
Dominantni						
	CC	36 (27.7)	12 (19.7)	1.00	0.23	241.8
	CG+GG	94 (72.3)	49 (80.3)	1.56 (0.75-3.27)		
Recesivni						
	CC+CG	106 (81.5)	51 (83.6)	1.00	0.73	243.2
	GG	24 (18.5)	10 (16.4)	0.87 (0.39-1.95)		
Overdominantni						
	CC+GG	60 (46.1)	22 (36.1)	1.00	0.19	241.5
	CG	70 (53.9)	39 (63.9)	1.52 (0.81-2.84)		
Log-aditivni						
	-	-	-	1.15 (0.72-1.84)	0.56	242.9
rs2477686						
Kodominantni						

GG	45 (34.6)	25 (41)	1.00		
GC	54 (41.5)	19 (31.1)	0.63 (0.31-1.30)	0.38	243.4
CC	31 (23.9)	17 (27.9)	0.99 (0.46-2.13)		
Dominantni					
GG	45 (34.6)	25 (41)	1.00		
GC+CC	85 (65.4)	36 (59)	0.76 (0.41-1.42)	0.4	242.6
Recesivni					
GG+GC	99 (76.2)	44 (72.1)	1.00		
CC	31 (23.9)	17 (27.9)	1.23 (0.62-2.46)	0.55	242.9
Overdominantni					
GG+CC	76 (58.5)	42 (68.8)	1.00		
GC	54 (41.5)	19 (31.1)	0.64 (0.33-1.21)	0.16	241.4
Log-aditivni					
-	-	-	0.96 (0.65-1.42)	0.85	243.2

rs12097821

Kodominantni					
GG	100 (76.9)	49 (80.3)	1.00		
GT	29 (22.3)	11 (18)	0.77 (0.36-1.68)	0.7	244.6
TT	1 (0.8)	1 (1.6)	2.04 (0.12-33.32)		
Dominantni					
GG	100 (76.9)	49 (80.3)	1.00		
GT+TT	30 (23.1)	12 (19.7)	0.82 (0.38-1.73)	0.59	243
Recesivni					
GG+GT	129 (99.2)	60 (98.4)	1.00		
TT	1 (0.8)	1 (1.6)	2.15 (0.13-34.96)	0.59	243
Overdominantni					
GG+TT	101 (77.7)	50 (82)	1.00		
GT	29 (22.3)	11 (18)	0.77 (0.35-1.66)	0.49	242.8
Log-aditivni					
-	-	-	0.88 (0.44-1.76)	0.71	243.1

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

4.7. Rezultati meta-analize asocijacije varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa razvojem idiopatske muške neplodnosti

Nakon početne pretrage baze podataka, uklanjanja duplih zapisa i procene podobnosti, 8 studija je identifikovano kao relevantno za meta-analizu povezanosti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa idiopatskom muškom neplodnošću (Tabela 4.7.). Među njima je bila studija Hu Z. i saradnika iz 2011. godine (46) koju smo isključili iz daljih analiza da bi se izbeglo uvođenje pristrasnosti, jer je ova GWA studija identifikovala rs10842262, rs2477686 i rs12097821 kao pretpostavljene varijante povezane sa muškim sterilitetom.

Tri sprovedene studije uključivale su više od jedne grupe ispitanika, čime su generisane višestruki unosi za meta-analizu (47,79, 80). Dva unosa za sintezu podataka sačinjena su na osnovu rezultata studije koja je obuhvatala dve faze analize (81). Za meta-analize efekta rs2477686 i rs12097821 ustanovljeno je ukupno 12 unosa, dok je za rs10842262 uključeno 11 unosa (Tabela 4.8.) (82-85).

Rezultati povezanosti između rs10842262 i muške idiopatske neplodnosti prikazani su na slici 4.9. Rezultati dobijeni sintezom podataka sugerišu da je povećan rizik od neplodnosti povezan sa manje učestalim alelom G ove genetičke varijante. Statistička značajnost je utvrđena i za alelne i za recesivne genetičke modele ($P < 0,001$ i $P = 0,002$ za alelski i recesivni model respektivno). Međutim, veličina efekta alela G prema alelskom modelu je relativno skromna, sa odnosom šansi koja iznosi 1,120 (95% CI 1,049-1,196).

U sintezi podataka koja je pretpostavljala recesivni genetički model, vrednost OR iznosila je 1,203 (95% CI 1,068-1,356). Nakon stratifikacije prema etničkoj pripadnosti učesnika, rs10842262 je ostao statistički značajno povezan sa neplodnošću kod muškaraca Azijskog porekla, što sugerišu i alelski i recesivni genetički model ($P_{\text{alelski}} < 0,001$, $OR_{\text{alelski}} = 1,206$, 95% CI 1,111-1,310; $P_{\text{rec}} < 0,001$, $OR_{\text{rec}} = 1,344$, 95%CI 1.130-1.599 (rezultati nisu prikazani). U grupi muškaraca Azijskog porekla, postoji statistički značajna povezanost ove genetske varijante sa neplodnošću kod muškaraca u slučaju dominantnog genetičkog modela ($P < 0,001$, $OR = 1,244$, 95%CI 1.113-1.391). Dodatno, utvrđena je statistički značajna povezanost u slučaju alelskog i recesivnog genetičkog modela, za one studije koje su uključivale muškarce sa neobstruktivnom azoospermijom (NOA) ($P_{\text{alelski}} < 0,001$, $OR_{\text{alelski}} = 1,155$, 95%CI 1,070-1,246; $P_{\text{rec}} < 0,001$, $OR_{\text{rec}} = 1,283$, 95%CI 1,113-1,478) (isti nisu prikazani).

Tabela 4.7. Studije izabrane za sintezu podataka o povezanosti genetičkih varijanti rs10842262, rs2477686 i rs12097821 sa idiopatskom muškom neplodnošću

Autori	Godina	Zemlja	Etničko poreklo	Dijagnoza	Kontrole	Metod genotipizacije	Broj ispitanika neplodnih/kontrola	Analizirane varijante		
								rs10842262	rs2477686	rs12097821
Hu et al. (sveukupno)	2012	Kina	Azijsko	NOA	zdrave, karcinom pluća	Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0	2920/5727	+	+	+
Hu et al. GWAS	2012	Kina	Azijsko	NOA	zdrave, karcinom pluća	Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0	981/1657	+	+	+
Hu et al. validacija I	2012	Kina	Azijsko	NOA	zdrave	Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0	1177/2077	+	+	+
Hu et al. validacija II	2012	Kina	Azijsko	NOA	zdrave	Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0	762/1993	+	+	+
Liu et al.	2017	Kina	Azijsko	oligozoospermija, astenozoospermija, oligoastenozoospermija	zdrave	Sequenom MassARRAY	134/454	-	+	+
Sato et al. replikaciona studija I	2013	Japan	Azijsko	NOA	zdrave	PCR-RFLP	72/734	+	+	+
Sato et al. replikaciona studija II	2013	Japan	Azijsko	NOA	zdrave	Taqman SNP Genotyping Assay	418/433	+	+	+
Tu et al.	2015	Kina	Azijsko	NOA	zdrave	Taqman SNP Genotyping Assay	545/632	+	+	+
Zou et al.	2014	Kina	Azijsko	NOA	zdrave	sekvenciranje	525/512	+	+	+
Gu et al. (NOA)	2019	Kina	Azijsko	NOA	zdrave	PCR-RFLP	301/720	+	+	+

Gu et al. (oligozoospermia)	2019	Kina	Azijsko	Oligozoospermija	zdrave	PCR-RFLP	330/720	+	+	+
Vučić et al.	2020	Srbija	Evropsko	NOA, oligoastenozoospermija	zdrave	PCR-RFLP	205/205	+	+	+
Vučić et al.	2020	Srbija	Evropsko	NOA	zdrave	PCR-RFLP	94/205	+	+	+
Vučić et al.	2020	Srbija	Evropsko	Oligoastenozoospermija	zdrave	PCR-RFLP	111/205	+	+	+
Cervan-Martin et al. (NOA)	2021	Španija i Portugal	Evropsko	NOA	zdrave	Taqman SNP Genotyping Assay	473/1052	+	+	+
Cervan-Martin et al. (oligospermija)	2021	Španija i Portugal	Evropsko	ozbiljna oligospermija	zdrave	Taqman SNP Genotyping Assay	191/1052	+	+	+

Skraćenice: NOA – neopstruktivna azoospermija; PCR-RFLP – polimorfizam u dužini fragmenata dobijenih restrikcijom digestijom segmenta DNK umnoženog lančanom reakcijom polimeraze.

Tabela 4.8. Distribucije genotipova rs10842262, rs2477686 i rs12097821 u studijama uključenim u meta-analizu

rs10842262	Godina	Broj slučajeva/ kontrola	Distribucija genotipova kod slučajeva			Distribucija genotipova kod kontrola			P_{HWE} kod kontrola
			CC	CG	GG	CC	CG	GG	
Sato et al. replikaciona studija I	2013	72/734	9	36	27	96	335	303	0.822
Sato et al. replikaciona studija II	2013	413/427	72	175	168	50	200	171	0.464
Tu et al.	2015	545/632	58	269	218	65	271	296	0.798
Zou et al.	2014	522/529	65	221	236	41	209	279	0.831
Gu et al. (NOA)	2019	301/720	41	140	120	66	304	350	0.999
Gu et al. (oligozoospermija)	2019	330/720	35	145	150	66	304	350	0.999
Vučić et al. (NOA)	2020	94/206	22	44	28	41	127	38	0.001
Vučić et al. (oligoastenoospermija)	2020	110/206	26	58	26	41	127	38	0.001
Cervan-Martin et al. (NOA)	2021	471/1050	169	207	95	341	519	190	0.759
Cervan-Martin et al. (oligospermija)	2021	189/1050	57	95	37	341	519	190	0.759
Rajevski et al.	2021	137/130	25	84	28	24	70	36	0.326

rs2477686	Godina	Broj slučajeva/ kontrola	Distribucija genotipova kod slučajeva			Distribucija genotipova kod kontrola			P_{HWE} kod kontrola
			GG	GC	CC	GG	GC	CC	
Liu et al.	2017	135/456	7	24	104	5	104	347	0.363
Sato et al. replikaciona studija I	2013	72/734	1	22	49	11	188	535	0.226

Sato et al. replikaciona studija II	2013	413/427	8	91	314	7	89	331	0.719
Tu et al.	2015	545/632	14	126	405	11	138	483	0.753
Zou et al.	2014	524/518	13	112	399	11	95	412	0.054
Gu et al. (NOA)	2019	301/720	6	73	222	10	151	559	0.957
Gu et al. (oligozoospermija)	2019	330/720	3	55	272	10	151	559	0.957
Vučić et al. (NOA)	2020	92/204	28	39	25	51	102	51	1.000
Vučić et al. (oligoastenoospermija)	2020	111/204	38	55	18	51	102	51	1.000
Cervan-Martin et al. (NOA)	2021	473/1052	131	227	114	316	504	229	0.294
Cervan-Martin et al. (oligospermija)	2021	191/1052	50	89	49	316	504	229	0.294
Rajevski et al.	2021	137/130	56	48	33	45	54	31	0.069

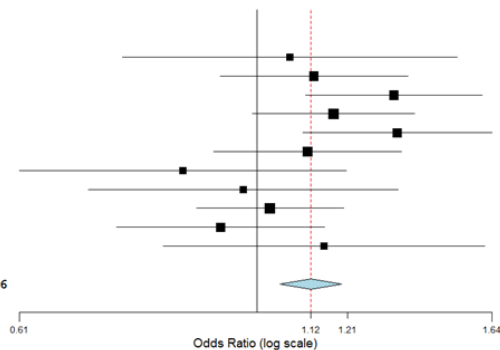
rs12097821	Godina	Broj slučajeva/ kontrola	Distribucija genotipova kod slučajeva			Distribucija genotipova kod kontrola			P_{HWE} kod kontrola
			GG	GT	TT	GG	GT	TT	
Liu et al.	2017	134/454	61	60	13	232	193	29	0.182
Sato et al. replikaciona studija I	2013	72/734	46	25	1	488	220	26	0.845
Sato et al. replikaciona studija II	2013	418/433	276	126	16	300	121	12	0.962
Tu et al.	2015	545/632	280	226	39	317	271	44	0.172
Zou et al.	2014	525/512	265	205	55	255	221	36	0.182
Gu et al. (NOA)	2019	301/720	150	125	26	428	254	38	0.845
Gu et al. (oligozoospermija)	2019	330/720	190	121	19	428	254	38	0.962

Vučić et al. (NOA)	2020	94/205	70	23	1	161	42	2	0.172
Vučić et al. (oligoastenozoospermija)	2020	111/205	82	28	1	161	42	2	0.200
Cervan-Martin et al. (NOA)	2021	473/1052	366	101	6	837	196	19	0.968
Cervan-Martin et al. (oligospermija)	2021	191/1052	149	38	4	837	196	19	0.968
Rajevski et al.	2021	137/130	105	30	2	100	29	1	0.684

Skraćenice: HWE - Hardy-Vajnbergova ravnoteža; NOA – neopstruktivna azoospermija.

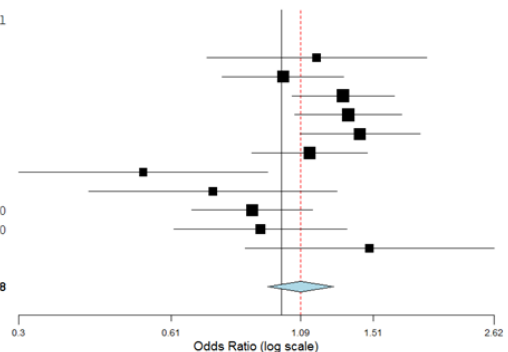
A

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.071 (0.752, 1.526)	54/144	527/1468
Sato et al. replication II 2013	1.128 (0.925, 1.376)	319/830	300/842
Zou et al. 2014	1.335 (1.108, 1.608)	351/1044	291/1058
Tu et al. 2015	1.175 (0.990, 1.395)	385/1090	401/1264
Gu et al. (NOA) 2019	1.345 (1.101, 1.643)	222/602	436/1440
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.113 (0.913, 1.356)	215/660	436/1440
Vucic et al. (NOA) 2020	0.855 (0.605, 1.207)	88/188	209/412
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	0.971 (0.700, 1.347)	110/220	209/412
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	1.028 (0.880, 1.201)	545/942	1201/2100
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	0.926 (0.743, 1.154)	209/378	1201/2100
Rajevski et al. 2021	1.152 (0.820, 1.619)	134/274	118/260
Overall ($I^2=NA$, $P=0.166$)	1.120 (1.049, 1.196)	2632/6372	5329/12796



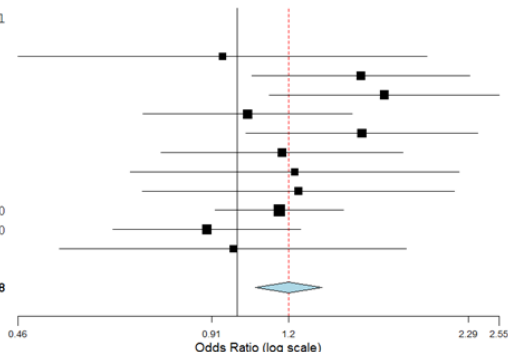
B

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.172 (0.711, 1.930)	45/72	431/734
Sato et al. replication II 2013	1.006 (0.763, 1.325)	247/415	250/421
Zou et al. 2014	1.321 (1.048, 1.666)	327/545	336/632
Tu et al. 2015	1.352 (1.061, 1.724)	286/522	250/529
Gu et al. (NOA) 2019	1.427 (1.086, 1.875)	181/301	370/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.135 (0.874, 1.474)	180/330	370/720
Vucic et al. (NOA) 2020	0.533 (0.303, 0.938)	66/94	168/206
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	0.731 (0.416, 1.284)	84/110	168/206
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	0.874 (0.665, 1.151)	376/471	860/1050
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	0.908 (0.613, 1.343)	152/189	860/1050
Rajevski et al. 2021	1.491 (0.847, 2.625)	109/137	94/130
Overall ($I^2=54.39\%$, $P=0.015$)	1.091 (0.939, 1.268)	2053/3186	4157/6398



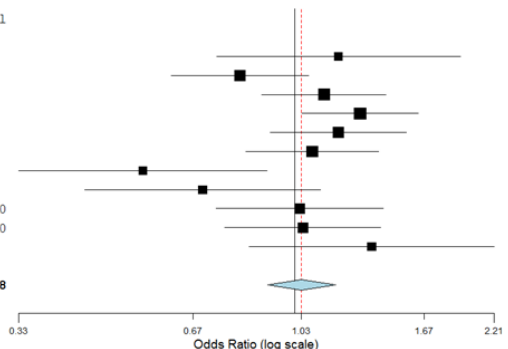
C

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	0.949 (0.457, 1.971)	9/72	96/734
Sato et al. replication II 2013	1.558 (1.055, 2.299)	72/415	50/421
Zou et al. 2014	1.693 (1.122, 2.554)	65/522	41/529
Tu et al. 2015	1.039 (0.715, 1.510)	58/545	65/632
Gu et al. (NOA) 2019	1.563 (1.031, 2.367)	41/301	66/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.176 (0.763, 1.811)	35/330	66/720
Vucic et al. (NOA) 2020	1.230 (0.683, 2.212)	22/94	41/206
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	1.246 (0.714, 2.175)	26/110	41/206
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	1.164 (0.926, 1.462)	169/471	341/1050
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	0.898 (0.641, 1.257)	57/189	341/1050
Rajevski et al. 2021	0.986 (0.530, 1.832)	25/137	24/130
Overall ($I^2=NA$, $P=0.417$)	1.203 (1.068, 1.356)	579/3186	1172/6398



D

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.191 (0.734, 1.933)	36/72	335/734
Sato et al. replication II 2013	0.806 (0.613, 1.059)	175/415	200/421
Zou et al. 2014	1.124 (0.879, 1.438)	221/522	209/529
Tu et al. 2015	1.298 (1.031, 1.634)	269/545	271/632
Gu et al. (NOA) 2019	1.190 (0.908, 1.560)	140/301	304/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.073 (0.825, 1.395)	145/330	304/720
Vucic et al. (NOA) 2020	0.547 (0.334, 0.896)	44/94	127/206
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	0.694 (0.435, 1.108)	58/110	127/206
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	1.021 (0.733, 1.422)	58/471	127/1050
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	1.034 (0.759, 1.409)	95/189	519/1050
Rajevski et al. 2021	1.358 (0.835, 2.211)	84/137	70/130
Overall ($I^2=47.67\%$, $P=0.039$)	1.029 (0.899, 1.178)	1325/3186	2593/6398



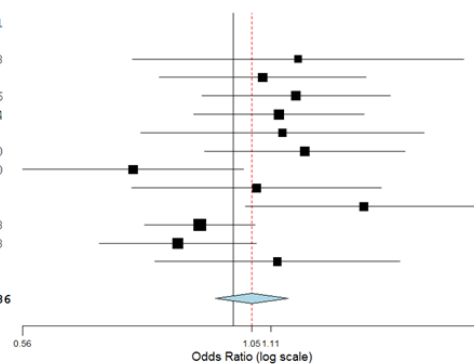
Slika 4.9. Meta-analiza asocijacije rs10842262 sa idiopatskom neplodnošću muškaraca. A) Alelski model; B) Dominantni model; C) Recesivni model; D) Overdominantni model. Rezultati svake studije i ukupan efekat predstavljeni su kao OR, sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja na šumskom dijagramu. Prikazane P vrednosti su rezultat testova heterogenosti (eng. *heterogeneity tests*).

Za drugu testiranu varijantu rs2477686, rezultati sinteze podataka nisu bili statistički značajni po svim testiranim genetičkim modelima (Slika 4.10.). I nakon stratifikacije unosa sprovedena prema etičkoj pripadnosti učesnika i rezultatima spremograma meta-analiza nije pokazala statističku značajnost (rezultati nisu prikazani).

Meta-analiza povezanosti između rs12097821 i idiopatske neplodnosti muškaraca imala je statističku značajnost za alelski, dominantni i recesivni genetički model (Slika 4.11) ($P_{\text{alelski}}=0,006$, $P_{\text{dom}}=0,020$ i $P_{\text{rec}}=0,026$). Ipak, OR dobijeni za alelski i dominantni modeli sugerišu samo blagi efekat rs12097821 alela T ($OR_{\text{alelski}}=1,113$, 95%CI 1,032-1,201; $OR_{\text{dom}}=1,116$, 95%CI 1,018-1,223). S druge strane, kada se pretpostavi recesivni genetički model, OR dobijen sintezom podataka iznosi 1.261 (95% CI 1.029-1.545) (Slika 4.3), a u grupi muškaraca Azijskog porekla pokazuje povećanje na 1.311 (95% CI 1.056-1.627) (podaci nisu prikazani).

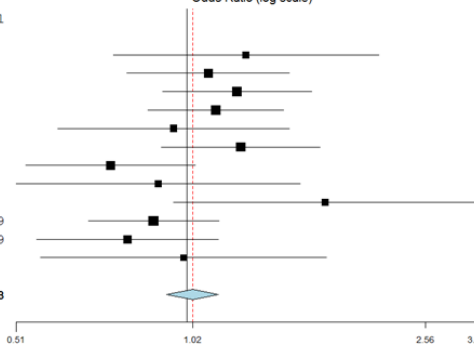
A

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.198 (0.755, 1.902)	24/144	210/1468
Sato et al. replication II 2013	1.085 (0.813, 1.449)	107/826	103/854
Zou et al. 2014	1.191 (0.916, 1.549)	138/1048	117/1036
Tu et al. 2015	1.135 (0.895, 1.440)	154/1090	160/1264
Liu et al. 2017	1.147 (0.772, 1.702)	38/270	114/912
Gu et al. (NOA) 2019	1.220 (0.923, 1.614)	85/602	171/1440
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	0.756 (0.555, 1.028)	61/660	171/1440
Vucic et al. (NOA) 2020	1.067 (0.754, 1.512)	95/184	204/408
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	1.440 (1.034, 2.003)	131/222	204/408
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	0.910 (0.780, 1.061)	489/944	1136/2098
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	0.856 (0.687, 1.066)	189/376	1136/2098
Rajevski et al. 2021	1.131 (0.802, 1.593)	160/274	144/260
Overall (I²=36.82% , P=0.096)	1.053 (0.950, 1.166)	1671/6640	3870/13686



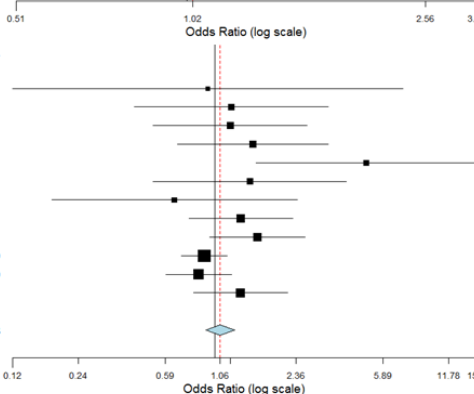
B

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.262 (0.749, 2.126)	23/72	199/734
Sato et al. replication II 2013	1.087 (0.789, 1.498)	99/413	96/427
Zou et al. 2014	1.218 (0.908, 1.632)	125/524	106/518
Tu et al. 2015	1.121 (0.859, 1.462)	140/545	149/632
Liu et al. 2017	0.949 (0.602, 1.496)	31/135	109/456
Gu et al. (NOA) 2019	1.236 (0.905, 1.686)	79/301	161/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	0.740 (0.531, 1.033)	58/330	161/720
Vucic et al. (NOA) 2020	0.893 (0.511, 1.561)	67/92	153/204
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	1.722 (0.949, 3.125)	93/111	153/204
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	0.877 (0.678, 1.134)	358/472	820/1049
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	0.792 (0.554, 1.132)	139/188	820/1049
Rajevski et al. 2021	0.987 (0.562, 1.731)	104/137	99/130
Overall (I²=NA , P=0.220)	1.023 (0.923, 1.133)	1316/3320	3026/6843



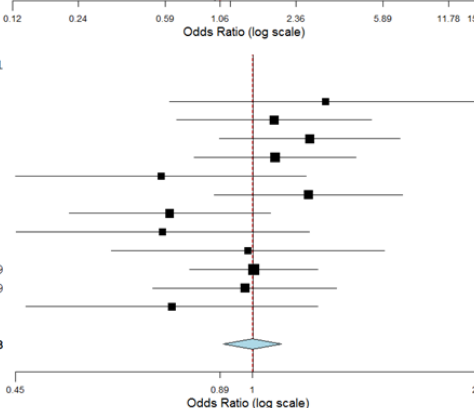
C

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	0.926 (0.118, 7.275)	1/72	11/734
Sato et al. replication II 2013	1.185 (0.426, 3.298)	8/413	7/427
Zou et al. 2014	1.173 (0.520, 2.642)	13/524	11/518
Tu et al. 2015	1.488 (0.670, 3.306)	14/545	11/632
Liu et al. 2017	4.933 (1.540, 15.803)	7/135	5/456
Gu et al. (NOA) 2019	1.444 (0.520, 4.009)	6/301	10/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	0.651 (0.178, 2.383)	3/330	10/720
Vucic et al. (NOA) 2020	1.313 (0.761, 2.265)	28/92	51/204
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	1.562 (0.943, 2.585)	38/111	51/204
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	0.891 (0.700, 1.134)	131/472	316/1049
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	0.840 (0.593, 1.192)	50/188	316/1049
Rajevski et al. 2021	1.306 (0.795, 2.146)	56/137	45/130
Overall (I²=NA , P=0.155)	1.056 (0.909, 1.228)	355/3320	844/6843



D

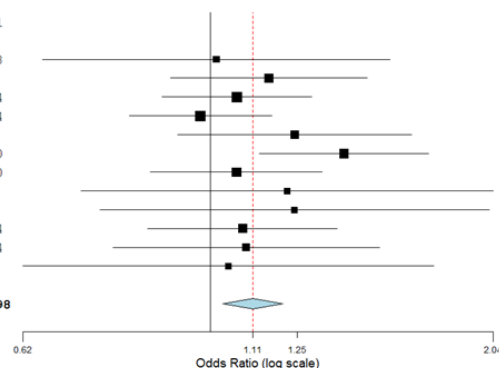
Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.278 (0.754, 2.167)	22/72	188/734
Sato et al. replication II 2013	1.073 (0.772, 1.492)	91/413	89/427
Zou et al. 2014	1.210 (0.892, 1.642)	112/524	95/518
Tu et al. 2015	1.076 (0.818, 1.416)	126/545	138/632
Liu et al. 2017	0.732 (0.447, 1.197)	24/135	104/456
Gu et al. (NOA) 2019	1.206 (0.877, 1.660)	73/301	151/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	0.754 (0.536, 1.059)	55/330	151/720
Vucic et al. (NOA) 2020	0.736 (0.448, 1.209)	39/92	102/204
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	0.982 (0.619, 1.559)	55/111	102/204
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	1.002 (0.806, 1.245)	227/472	504/1049
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	0.972 (0.712, 1.327)	89/188	504/1049
Rajevski et al. 2021	0.759 (0.463, 1.245)	48/137	54/130
Overall (I²=NA , P=0.442)	0.997 (0.904, 1.100)	961/3320	2182/6843



Slika 4.10. Meta-analiza asocijacije rs2477686 sa idiopatskom neplodnošću muškaraca. A) Alelski model; B) Dominantni model; C) Recesivni model; D) Overdominantni model. Rezultati svake studije i ukupan efekat predstavljeni su kao OR, sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja na šumskom dijagramu. Prikazane P vrednosti su rezultat testova heterogenosti (eng. *heterogeneity tests*).

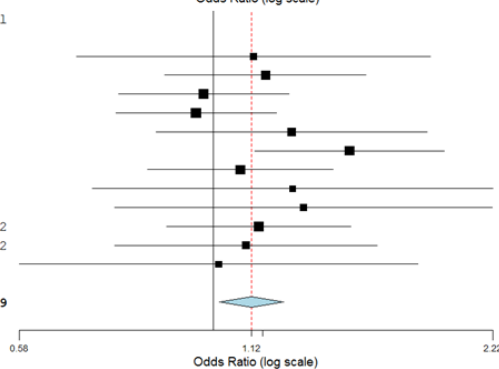
A

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.015 (0.654, 1.573)	27/144	272/1468
Sato et al. replication II 2013	1.159 (0.904, 1.486)	158/836	145/866
Zou et al. 2014	1.069 (0.885, 1.292)	315/1050	293/1024
Tu et al. 2015	0.975 (0.814, 1.168)	304/1090	359/1264
Liu et al. 2017	1.237 (0.921, 1.661)	86/268	251/908
Gu et al. (NOA) 2019	1.401 (1.131, 1.735)	177/602	330/1440
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.068 (0.860, 1.326)	159/660	330/1440
Vucic et al. (NOA) 2020	1.214 (0.721, 2.043)	25/188	46/410
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	1.236 (0.756, 2.022)	30/222	46/410
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	1.084 (0.854, 1.377)	113/946	234/2104
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	1.094 (0.781, 1.532)	46/382	234/2104
Rajevski et al. 2021	1.047 (0.623, 1.759)	34/274	31/260
Overall (I²=NA, P=0.715)	1.113 (1.032, 1.201)	1474/6662	2571/13698



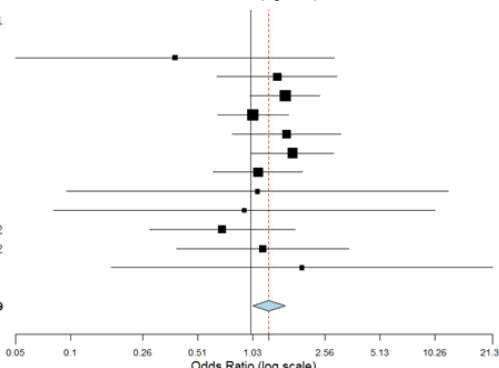
B

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.121 (0.677, 1.857)	26/72	246/734
Sato et al. replication II 2013	1.161 (0.871, 1.547)	142/418	133/433
Zou et al. 2014	0.973 (0.763, 1.242)	260/525	257/512
Tu et al. 2015	0.952 (0.757, 1.198)	265/545	315/632
Liu et al. 2017	1.251 (0.850, 1.841)	73/134	222/454
Gu et al. (NOA) 2019	1.476 (1.126, 1.934)	151/301	292/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.080 (0.829, 1.407)	140/330	292/720
Vucic et al. (NOA) 2020	1.255 (0.709, 2.221)	24/94	44/205
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	1.294 (0.755, 2.218)	29/111	44/205
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	1.138 (0.875, 1.480)	107/473	215/1052
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	1.097 (0.755, 1.595)	42/191	215/1052
Rajevski et al. 2021	1.016 (0.575, 1.793)	32/137	30/130
Overall (I²=NA, P=0.696)	1.116 (1.018, 1.223)	1291/3331	2305/6849



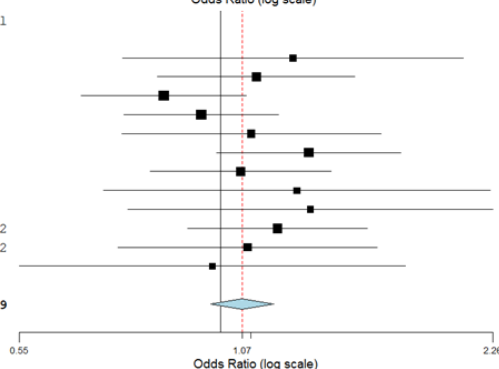
C

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	0.384 (0.051, 2.869)	1/72	26/734
Sato et al. replication II 2013	1.396 (0.652, 2.988)	16/418	12/433
Zou et al. 2014	1.547 (0.997, 2.400)	55/525	36/512
Tu et al. 2015	1.030 (0.659, 1.611)	39/545	44/632
Liu et al. 2017	1.575 (0.794, 3.122)	13/134	29/454
Gu et al. (NOA) 2019	1.697 (1.011, 2.849)	26/301	38/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.096 (0.622, 1.933)	19/330	38/720
Vucic et al. (NOA) 2020	1.091 (0.098, 12.188)	1/94	2/205
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	0.923 (0.083, 10.291)	1/111	2/205
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	0.699 (0.277, 1.760)	6/473	19/1052
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	1.163 (0.391, 3.457)	4/191	19/1052
Rajevski et al. 2021	1.911 (0.171, 21.333)	2/137	1/130
Overall (I²=NA, P=0.822)	1.261 (1.029, 1.545)	183/3331	266/6849



D

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Sato et al. replication I 2013	1.243 (0.746, 2.070)	25/72	220/734
Sato et al. replication II 2013	1.113 (0.827, 1.496)	126/418	121/433
Zou et al. 2014	0.844 (0.658, 1.081)	205/525	221/512
Tu et al. 2015	0.944 (0.748, 1.190)	226/545	271/632
Liu et al. 2017	1.096 (0.744, 1.616)	60/134	193/454
Gu et al. (NOA) 2019	1.303 (0.989, 1.716)	125/301	254/720
Gu et al. (oligozoospermia) 2019	1.062 (0.810, 1.393)	121/330	254/720
Vucic et al. (NOA) 2020	1.257 (0.704, 2.245)	23/94	42/205
Vucic et al. (oligoasthenozoospermia) 2020	1.309 (0.758, 2.261)	28/111	42/205
Cervan-Martin et al. (NOA) 2021	1.186 (0.906, 1.552)	101/473	196/1052
Cervan-Martin et al. (SO) 2021	1.085 (0.736, 1.598)	38/191	196/1052
Rajevski et al. 2021	0.976 (0.548, 1.741)	30/137	29/130
Overall (I²=NA, P=0.665)	1.068 (0.972, 1.173)	1108/3331	2039/6849

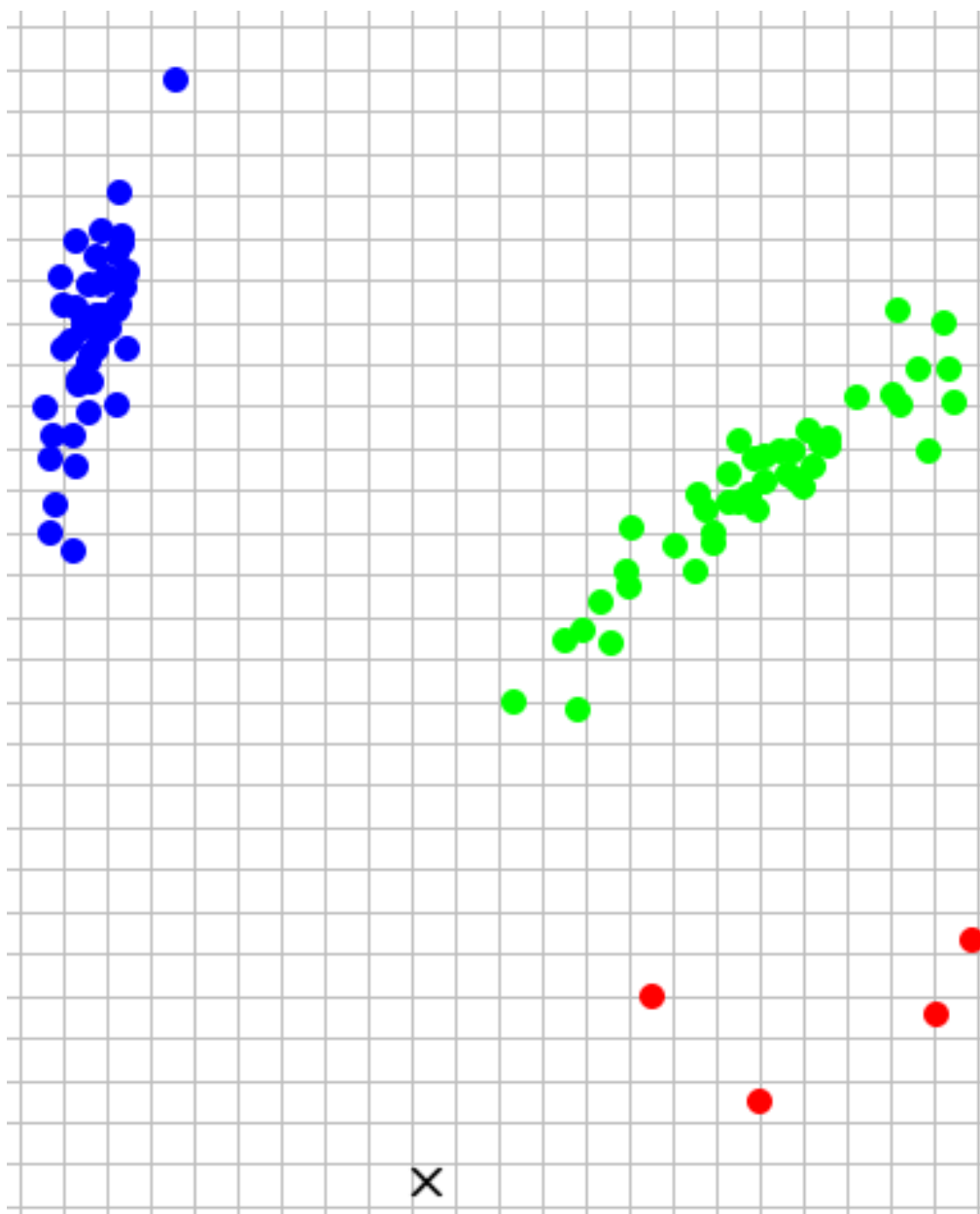


Slika 4.11. Meta-analiza asocijacije s12097821 sa idiopatskom neplodnošću muškaraca. A) Alelski model; B) Dominantni model; C) Recesivni model; D) Overdominantni model. Rezultati svake studije i ukupan efekat predstavljeni su kao OR, sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja na šumskom dijagramu. Prikazane P vrednosti su rezultat testova heterogenosti (eng. *heterogeneity tests*).

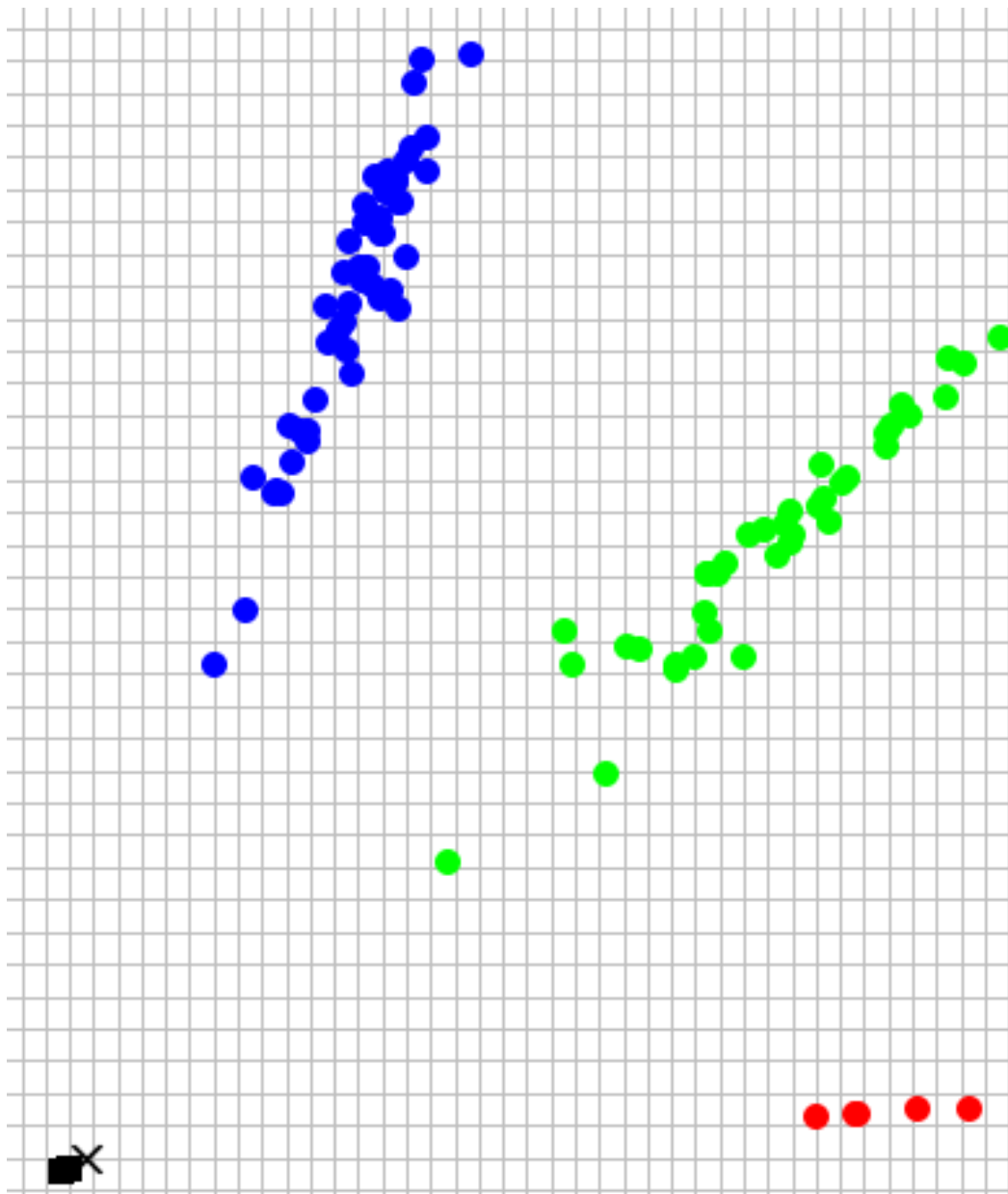
Rezultati Egger-ovog testa i vizuelna analiza Funelovih grafikona (eng. *funnel plots*) nisu pokazali postojanje publikacijske pristrasnosti (eng. *publication bias*) studija obuhvaćenih ovom meta-analizom (rezultati nisu prikazani).

4.8. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819

Genotipizacija varijanti rs2910164 (slika 4.12) i rs895819 (slika 4.13) bila je uspešna za 99,4% (157/158) učesnika studije sa dijagnozom idiopatske neplodnosti i za 98,4% (125/127) fertilnih kontrola.



Slika 4.12. Grafik diskriminacije alela rs2910164. Plavom bojom su označeni homozigoti G/G, zelenom bojom heterozigoti C/G i crvenom bojom homozigoti C/C



Slika 4.13. Grafik diskriminacije alela rs895819. Plavom bojom su označeni homozigoti T/T, zelenom bojom heterozigoti C/T i crvenom bojom homozigot C/C. Crnim kvadratićem označena je negativna kontrola (NTC)

4.9. Rezultati studije asocijacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Distribucija genotipova, prikazana u tabeli 4.9., nije značajno odstupila od HWE kod kontrolnih uzoraka ($P=1$ i $P=0,82$ za rs895819 i rs2910164, respektivno).

Prema rezultatima testova genetske asocijacije predstavljenim u tabeli 4.9., ni rs895819 ni

rs2910164 nisu pokazali povezanost sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti u našoj grupi muškaraca iz Severne Makedonije. Za sve testirane genetičke modele, rezultati nisu bili statistički značajni kada su poređene distribucije genotipova između neplodnih muškaraca i fertilnih kontrola odgovarajućeg uzrasta (Tabela 4.9.).

Table 4.9. Asocijacija genetičkih varijanti rs895819 i rs2910164 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs Kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs895819						
	Kodominantni					
	TT	68 (54.4)	76 (48.4)	1.00		
	TC	48 (38.4)	68 (43.3)	1.29 (0.79-2.12)	0.58	393
	CC	9 (7.2)	13 (8.3)	1.26 (0.51-3.14)		
	Dominantni					
	TT	68 (54.4)	76 (48.4)	1.00		
	TC+CC	57 (45.6)	81 (51.6)	1.29 (0.80-2.06)	0.3	391
	Recesivni					
	TT+TC	116 (92.8)	144 (91.7)	1.00		
	CC	9 (7.2)	13 (8.3)	1.13 (0.46-2.74)	0.79	392
	Overdominantni					
	TT+CC	77 (61.6)	89 (56.7)	1.00		
	TC	48 (38.4)	68 (43.3)	1.25 (0.77-2.03)	0.36	391.2
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.20 (0.82-1.74)	0.35	391.2
rs2910164						
	Kodominantni					
	GG	69 (55.2)	84 (53.5)	1.00		

GC	47 (37.6)	67 (42.7)	1.29 (0.79-2.12)	0.58	393
CC	9 (7.2)	6 (3.8)	1.26 (0.51-3.14)		
Dominantni					
GG	69 (55.2)	84 (53.5)	1.00	0.3	391
GC+CC	56 (44.8)	73 (46.5)	1.29 (0.80-2.06)		
Recesivni					
GG+GC	116 (92.8)	151 (96.2)	1.00	0.79	392
CC	9 (7.2)	6 (3.8)	1.13 (0.46-2.74)		
Overdominantni					
GG+CC	78 (62.4)	90 (57.3)	1.00	0.36	391.2
GC	47 (37.6)	67 (42.7)	1.25 (0.77-2.03)		
Log-aditivan					
-	-	-	1.20 (0.82-1.74)	0.35	391.2

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Kada smo stratifikovali neplodne muškarce u podgrupe idiopatske neplodnosti prema rezultatima spermograma, muškarci sa astenoteratozoospermijom su pokazali veću učestalost heterozigotnog genotipa rs2910164 u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 4.10). Prema AIC skoru, over-dominantni genetički model je izabran kao najpogodniji model povezanosti između rs2910164 i astenoteratozoospermije, dok je odgovarajuća OR vrednost za GC naspram homozigotnih genotipova iznosila 3,66 (95% CI 1,38-9,71, P=80) (Tabela 4.10). Pored toga, statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između muškaraca sa dijagnozom astenoteratozoospermije i fertilnih muškaraca pokazane su i za dominantni i kodominantni genetički model ($P=0,013$ i $P=0,025$, respektivno). Za rs895819 registrovan je samo statistički trend značajnosti ($0,05 \leq P < 0,1$) za recesivni genetički model povezanosti sa astenoteratozoospermijom. Međutim, nijedan ispitanik sa astenoteratozoospermijom nije imao genotip CC, dok je učestalost ovog genotipa u kontrolnoj grupi fertilnih muškaraca iz Severne Makedonije iznosila 7,2% (Tabela 4.10).

Obe analizirane varijante nisu pokazale statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između ispitanika sa drugim tipovima idiopatske muške neplodnosti i fertilnih

kontrola (Tabele 4.11., 4.12. i 4.13.). Smatrali smo da je statistički neopravdano upoređivati učestalost genotipova između muškaraca sa dijagnozom azoospermije i kontrolne grupe, jer je broj učesnika u ovoj grupi neplodnih muškaraca bio samo 14.

Table 4.10. Poređenje distribucije genotipova varijanti rs895819 i rs2910164 između muškaraca sa astenoteratozoospermijom i fertilnih muškaraca

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs895819						
	Kodominantni					
	TT	68 (54.4)	10 (45.5)	1.00		
	TC	48 (38.4)	12 (54.5)	1.72 (0.68-4.32)	0.11	127.7
	CC	9 (7.2)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		
	Dominantni					
	TT	68 (54.4)	10 (45.5)	1.00		
	TC+CC	57 (45.6)	12 (54.5)	1.43 (0.58-3.56)	0.44	129.5
	Recesivni					
	TT+TC	116 (92.8)	22 (100)	1.00		
	CC	9 (7.2)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)	0.082 ^b	127.1
	Overdominantni					
	TT+CC	77 (61.6)	10 (45.5)	1.00		
	TC	48 (38.4)	12 (54.5)	1.94 (0.77-4.87)	0.16	128.1
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.05 (0.50-2.19)	0.9	130.1
rs2910164						
	Kodominantni					
	GG	69 (55.2)	6 (27.3)	1.00		
	GC	47 (37.6)	15 (68.2)	3.77 (1.35-10.51)*	0.025	124.7

CC	9 (7.2)	1 (4.5)	1.27 (0.14-11.80)		
Dominantni					
GG	69 (55.2)	6 (27.3)	1.00	0.013	123.9
GC+CC	56 (44.8)	16 (72.7)	3.35 (1.22-9.16)		
Recesivni					
GG+GC	116 (92.8)	21 (95.5)	1.00	0.63	129.8
CC	9 (7.2)	1 (4.5)	0.61 (0.07-5.08)		
Overdominantni					
GG+CC	78 (62.4)	7 (31.8)	1.00	0.0068	122.7
GC	47 (37.6)	15 (68.2)	3.66 (1.38-9.71)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.87 (0.93-3.78)	0.082 ^b	127.1

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

^b Statistički trend značajnosti

* Statistički značajni rezultati predstavljani su bold

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Tabela 4.11. Poređenje distribucije genotipova varijanti rs895819 i rs2910164 između muškaraca sa oligospermijom i fertilnih muškaraca

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs895819						
Kodominantni						
TT		68 (54.4)	10 (38.5)	1.00		
TC		48 (38.4)	13 (50)	1.90 (0.76-4.71)	0.31	143.9
CC		9 (7.2)	3 (11.5)	2.15 (0.49-9.38)		
Dominantni						
TT		68 (54.4)	10 (38.5)	1.00	0.13	141.9

TC+CC	57 (45.6)	16 (61.5)	1.94 (0.81-4.62)		
Recesivni					
TT+TC	116 (92.8)	23 (88.5)	1.00	0.53	143.8
CC	9 (7.2)	3 (11.5)	1.59 (0.39-6.40)		
Overdominantni					
TT+CC	77 (61.6)	13 (50)	1.00	0.24	142.8
TC	48 (38.4)	13 (50)	1.67 (0.71-3.94)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.60 (0.85-3.02)	0.15	142.2
rs2910164					
Kodominantni					
GG	69 (55.2)	14 (51.9)	1.00		
GC	47 (37.6)	12 (44.4)	1.23 (0.52-2.91)	0.7	149.1
CC	9 (7.2)	1 (3.7)	0.55 (0.06-4.71)		
Dominantni					
GG	69 (55.2)	14 (51.9)	1.00	0.79	147.7
GC+CC	56 (44.8)	13 (48.1)	1.12 (0.49-2.59)		
Recesivni					
GG+GC	116 (92.8)	26 (96.3)	1.00	0.49	147.3
CC	9 (7.2)	1 (3.7)	0.50 (0.06-4.16)		
Overdominantni					
GG+CC	78 (62.4)	15 (55.6)	1.00	0.55	147.4
GC	47 (37.6)	12 (44.4)	1.30 (0.56-3.02)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.99 (0.50-1.94)	0.97	147.8

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Tabela 4.12. Poređenje distribucije genotipova varijanti rs895819 i rs2910164 između muškaraca sa astenozoospermijom i fertilnih muškaraca

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs895819						
	Kodominantni					
	TT	68 (54.4)	20 (40.8)	1.00		
	TC	48 (38.4)	26 (53.1)	1.87 (0.94-3.75)	0.19	211.3
	CC	9 (7.2)	3 (6.1)	1.08 (0.27-4.42)		
	Dominantni					
	TT	68 (54.4)	20 (40.8)	1.00		
	TC+CC	57 (45.6)	29 (59.2)	1.74 (0.89-3.41)	0.1	209.9
	Recesivni					
	TT+TC	116 (92.8)	46 (93.9)	1.00		
	CC	9 (7.2)	3 (6.1)	0.80 (0.21-3.13)	0.75	212.4
	Overdominantni					
	TT+CC	77 (61.6)	23 (46.9)	1.00		
	TC	48 (38.4)	26 (53.1)	1.86 (0.95-3.63)	0.07	209.3
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.37 (0.81-2.32)	0.24	211.2
rs2910164						
	Kodominantni					
	GG	69 (55.2)	21 (42)	1.00		
	GC	47 (37.6)	27 (54)	1.87 (0.94-3.70)	0.14	213.3
	CC	9 (7.2)	2 (4)	0.73 (0.15-3.66)		
	Dominantni					

GG	69 (55.2)	21 (42)	1.00		
GC+CC	56 (44.8)	29 (58)	1.68 (0.87-3.28)	0.12	212.8
Recesivni					
GG+GC	116 (92.8)	48 (96)	1.00		
CC	9 (7.2)	2 (4)	0.54 (0.11-2.61)	0.42	214.5
Overdominantni					
GG+CC	78 (62.4)	23 (46)	1.00		
GC	47 (37.6)	27 (54)	1.93 (0.99-3.76)	0.053 ^b	211.4
Log-aditivni					
-	-	-	1.29 (0.76-2.20)	0.34	214.3

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

^b Statistički trend značajnosti

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Tabela 4.13. Poređenje distribucije genotipova varijanti rs895819 i rs2910164 između muškaraca sa teratozoospermijom i fertilnih muškaraca

Varijanta	Genetički model	Broj kontrola (%)	Broj slučajeva (%)	Slučajevi vs kontrole		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs895819						
Kodominantni						
	TT	68 (54.4)	31 (46.3)	1.00		
	TC	48 (38.4)	30 (44.8)	1.39 (0.75-2.61)	0.54	254.8
	CC	9 (7.2)	6 (9)	1.42 (0.46-4.36)		
Dominantni						
	TT	68 (54.4)	31 (46.3)	1.00		
	TC+CC	57 (45.6)	36 (53.7)	1.40 (0.77-2.54)	0.27	252.8
Recesivni						
	TT+TC	116 (92.8)	61 (91)	1.00	0.71	253.9

CC	9 (7.2)	6 (9)	1.23 (0.42-3.63)		
Overdominantni					
TT+CC	77 (61.6)	37 (55.2)	1.00	0.36	253.2
TC	48 (38.4)	30 (44.8)	1.33 (0.73-2.44)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.27 (0.80-2.03)	0.31	253
rs2910164					
Kodominantni					
GG	69 (55.2)	30 (44.8)	1.00		
GC	47 (37.6)	35 (52.2)	1.70 (0.92-3.15)	0.11	251.7
CC	9 (7.2)	2 (3)	0.51 (0.10-2.52)		
Dominantni					
GG	69 (55.2)	30 (44.8)	1.00		
GC+CC	56 (44.8)	37 (55.2)	1.51 (0.83-2.75)	0.17	252.3
Recesivni					
GG+GC	116 (92.8)	65 (97)	1.00		
CC	9 (7.2)	2 (3)	0.40 (0.08-1.91)	0.21	252.6
Overdominantni					
GG+CC	78 (62.4)	32 (47.8)	1.00		
GC	47 (37.6)	35 (52.2)	1.80 (0.99-3.29)	0.054 ^b	250.5
Log-aditivni					
-	-	-	1.18 (0.72-1.93)	0.5	253.7

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

^b Statistički trend značajnosti

Skraćenice: OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacijski kriterijum.

Neplodni muškarci sa prisustvom spermatozoida dokazanim rezultatima spermograma sa genotipom GC varijante rs2910164 pokazali su niži procenat živih spermatozoida. Slično kao i za povezanost sa astenoteratozoospermijom, over-dominantni genetički model je izabran kao

najpogodniji model povezanosti između rs2910164 i procenta živih spermatozoida, a izračunati OR za GC naspram homozigotnih genotipova bio je 2,65 (95% CI 1,12-6,22, $P=0,02$) (Tabela 4.14). Iako je AIC skor bio najniži za kodominantni model, statistička značajnost je dostignuta i za druga dva genetička modela asocijacije – dominantni i log-aditivni ($P=0,023$ i $P=0,039$, respektivno).

Table 4.14. Poređenje distribucije genotipova rs895819 i rs2910164 između neplodnih muškaraca sa najmanje 60% živih spermatozoida i onih kod kojih je procentat živih spermatozoida manji od 60%

Varijanta	Genetički model	Vit. $\geq 60\%$ (%)	Vit. $< 60\%$ (%)	Vit. $< 60\%$ vs Vit. $\geq 60\%$		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs895819						
	Kodominantni					
	TT	16 (47.1)	47 (46.1)	1.00		
	TC	14 (41.2)	48 (47.1)	1.17 (0.51-2.65)	0.63	160
	CC	4 (11.8)	7 (6.9)	0.59 (0.15-2.29)		
	Dominantni					
	TT	16 (47.1)	47 (46.1)	1.00		
	TC+CC	18 (52.9)	55 (53.9)	1.04 (0.48-2.26)	0.93	158.9
	Recesivni					
	TT+TC	30 (88.2)	95 (93.1)	1.00		
	CC	4 (11.8)	7 (6.9)	0.55 (0.15-2.00)	0.37	158.1
	Overdominantni					
	TT+CC	20 (58.8)	54 (52.9)	1.00		
	TC	14 (41.2)	48 (47.1)	1.27 (0.58-2.79)	0.55	158.5
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.90 (0.49-1.67)	0.75	158.8
rs2910164						
	Kodominantni					

GG	24 (70.6)	50 (48.5)	1.00		
GC	9 (26.5)	50 (48.5)	2.69 (1.13-6.37)*	0.066 ^b	156
CC	1 (2.9)	3 (2.9)	1.39 (0.14-14.20)		
Dominantni					
GG	24 (70.6)	50 (48.5)	1.00	0.023	154.3
GC+CC	10 (29.4)	53 (51.5)	2.56 (1.11-5.88)		
Recesivni					
GG+GC	33 (97.1)	100 (97.1)	1.00	0.98	159.5
CC	1 (2.9)	3 (2.9)	0.97 (0.10-9.69)		
Overdominantni					
GG+CC	25 (73.5)	53 (51.5)	1.00	0.02	154.1
GC	9 (26.5)	50 (48.5)	2.65 (1.12-6.24)		
Log-aditivni					
-	-	-	2.19 (1.01-4.75)	0.039	155.2

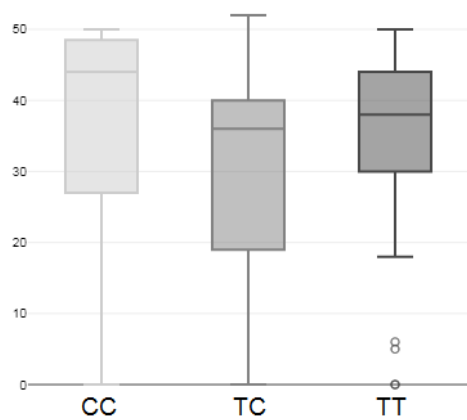
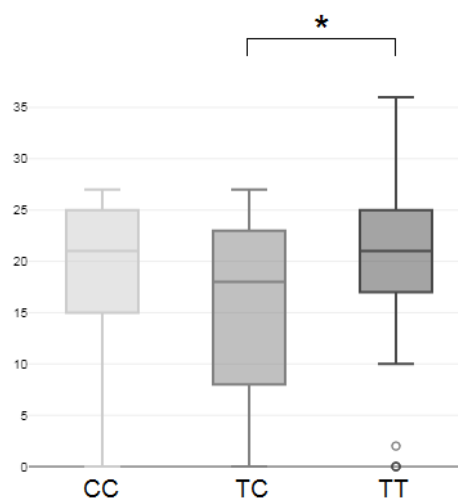
^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika

^b Statistički trend značajnosti

* Statistički značajni rezultati predstavljani su bold

Skraćenice: Vit – procenat živih spermatozoida; OR - odnos šansi; CI- interval poverenja; AIC- Akaike informacioni kriterijum.

Iako studija asocijacije genetičke varijante rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije kao ni sa rezultatima spermograma koji se odnose na pokretljivost spermatozoida (Slika 4.13.A) nisu bili statistički značajni, nosioci genotipa TC pokazali su niži procenat progresivno pokretnih spermatozoida u poređenju sa neplodnim muškarcima sa najčešćim genotipom TT ($P=0,018$) (Slika 4.13.B).

A**B**

Slika 4.13. Udeo pokretnih (A) i progresivno pokretnih spermatozoida (B) kod neplodnih muškaraca prema genotipu rs895819 (* $P < 0,05$).

5. DISKUSIJA

Prirodna želja ljudske vrste za potomstvom sastavni je deo evolucije čoveka. Neplodnost predstavlja težak fizički ali i mentalni problem koga na žalost prati i izražena društvena stigma koja dodatno narušava mentalno zdravlje neplodnih parova sa značajnim efektom i na seksualnu i/ili erektilnu disfunkciju (86,87). Anksioznost, depresija i narušen kvalitet života česta su stanja koja prate neplodnost i muškaraca i žena. Studije iz celog sveta pokazuju slična iskustva nezavisno od podneblja, životnih navika, tradicije i kulture. Ovaj zaključak je donesen na osnovu analize 366 naučnih radova koji su od strane tri nezavisna recenzenta ocenjeni kao relevantni od prvobitno selektovanih 7.947 naučnih članaka (88).

Muška neplodnost je heterogena grupa oštećenja koja obuhvata urogenitalne abnormalnosti, kongenitalne malformacije, maligne bolesti, infekcije urogenitalnog trakta, povišene skrotalne temperature (npr. kao posledica varikocеле), endokrine poremećaje, genetičke abnormalnosti i imunološke faktore. Kod oko 15% neplodnih muškaraca uzrok su izmene na nivou genoma, uključujući hromozomske aberacije i mutacije pojedinačnih gena (14).

Jedan od glavnih faktora koji utiču na mušku neplodnost je fragmentacija DNK spermatozida (SDF). Tokom kasne faze spermatogeneze, tokom procesa kondenzacije hromatina histoni bogati lizinom zamenjuje se protaminima bogatim argininom a u cilju zaštite hromatina od oštećenja. Značajan porast nivoa SDF ometa kondenzaciju hromatina, što dovodi do akumulacije oštećenja u genomima spermatozoida što za posledicu ima promene i u pokretljivosti i u morfologiji spermatozoida (89). Značaj SDF u proceni plodnosti muškarca bila je tema meta-analize 27 studija koje su obuhvatale 4000 muškaraca. Rezultati ove meta-analize sugerišu da je prag SDF koji može razlikovati plodne i neplodne muškarce 20% (90).

Mnoga stanja kao što su varikocela, gojaznost, način života, polne infekcije, poodmakla životna dob, hemijoterapija, radioterapija, urogenitalne infekcije i pušenje povezani su sa povišenim nivoima SDF. Danas su u upotrebi komercijalni kitovi za analizu nivoa fragmentacije DNK spermatozoida SCSA® (eng. *sperm chromatin structure assay*, SCSA). Ovaj kit omogućava analizu fragmentacije molekula DNK u spermatozoidima svetlosnim mikroskopom i često se radi paralelno sa analizom spermatozoida spermogramom. Osim pomoći pri proceni potencijala plodnosti muškarca, korekciji u terapijskim pristupima, i proceni rizika po zdravlje potomaka, do danas nisu razvijeni terapijski pristupi koji bi uticali na smanjene nivoa fragmentacije molekula DNK u spermatozoidima sa pozitivnim efektom na čin oplodnje (91).

Dosadašnja saznanja o genetičkim i epigenetičkim faktorima muške neplodnosti dati su opširno u poglavlju Uvod. Pored genetičkih i epigenetičkih faktora, poslednje dve decenije se intenzivno istražuje moguća povezanost varijacija u molekulu DNK sa idiopatskom neplodnošću muškaraca. Promene sekvence DNK u specifičnom lokusu sa frekvencijom od najmanje 1% u opštoj populaciji nazivaju se varijacije. Varijacije se mogu klasifikovati u tri podgrupe, a to su tačkaste genetičke varijante (SNV), male insercije i delecije (INDEL) i varijacije u broju kopija (CNV)(92).

Poslednja objavljena GWA studija koja je za temu imala i mušku i žensku neplodnost rađena na grupi od 41.200 slučajeva i 687.005 kontrola indentifikovala je 21 lokus (93). Prva GWAS rađena u populaciji muškaraca iz Kine identifikovala je tri tačkaste genetičke varijante rs12097821, rs2477686 i rs10842262 asocirane sa idiopatskom neplodnošću kod muškaraca (46). Radi potvrde rezultata GWAS sprovedeno je više studija slučajeva i kontrola u populacijama azijskog i ne-azijskog porekla (79-85). Samo jedna od ovih studija analizirala je povezanost rs12097821, s2477686 i rs10842262 sa muškom neplodnošću u populacijama slovenskih naroda (47).

Naš cilj bio je da testiramo utvrđene asocijacije u drugoj nezavisnoj grupi muškaraca slovenskog porekla, kao i da pružimo dodatne rezultate za kavkasku podgrupu naroda kada je idiopatska neplodnost muškaraca u pitanju. Vredna pomena je i činjenica da se odabrana metoda genotipizacije pokazala kao pouzdana kroz njenu proveru metodom automatskog sekvenciranja po Sangeru. Pored toga, sprovedene su i meta-analize kako bi kvantitativnom sintezom rezultata ranijih studija i naše studije slučajeva i kontrola bila ustanovljena veličina efekata, odnosno odnos šansi, kao da bi se testirao pretpostavljeni uticaj etničke pripadnosti i/ili specifičnog tipa neplodnosti. Prema nama dostupnim podacima, naša studija slučajeva i kontrola je prva studija tog tipa koja je za temu imala idiopatsku neplodnost kod muškaraca iz Severne Makedonije. Pretraživanje baze *PubMed* (proveravano 24. 11. 2024. godine) korišćenjem ključnih reči „studija slučajeva i kontrola“ (eng. „*case control study*“), „Makedonija“ (eng. „*Macedonia*“), „muška neplodnost“ (eng. „*male infertility*“) i „tačkasta genetička varijanta“ (eng. „*SNP*“) dobija se samo jedan rezultat iz 2017. godine koji je objedinjavao slučajeve neplodnih muškaraca iz Srbije i Severne Makedonije (94).

Rezultati ove studije slučajeva i kontrola, u vezi sa asocijacijom rs12097821 i rizika za razvoj muške neplodnosti, značajno se razlikuju od rezultata inicijalne GWAS (46). Rezultati naše studije poklapaju se sa rezultatima prethodnih replikativnih studija (80-82, 85), uključujući i studiju slučajeva i kontrola rađenu kod muškaraca iz populacije Srbije (47). Međutim, u studiji Gu X i saradnika iz 2019. godine (79), asocijacija rs12097821 sa rizikom za razvoj NOA ostala je statistički značajna i nakon primene Bonferonijeve korekcije za višestruka poređenja. Stoga, među razlozima za uočeno neslaganje rezultata naše i inicijalne GWAS mogao bi biti mali procenat neplodnih muškaraca sa dijagnozom NOA u studiji slučajeva iz Severne Makedonije. Ipak, većina prethodnih studija kod muškaraca azijskog porekla koja je testirala asocijaciju rs12097821 sa rizikom za razvoj NOA nije potvrdila rezultate inicijalne GWA studije. Uzimajući u obzir etničku pripadnost, rezultati naše studije su u skladu sa rezultatima prethodne dve studije slučajeva i kontrola rađenih kod muškaraca evropskog porekla (47,80).

Slično kao i za rs12097821, ova studija slučajeva i kontrola pokazala je odsustvo asocijacije rs2477686 sa rizikom za razvoj muške neplodnosti. Rezultati su ostali isti i nakon stratifikacije neplodnih muškaraca prema kliničkim podtipovima idiopatske neplodnosti (11). Rezultati ove studije slučaja i kontrola koji se odnose na rs2477686 su u suprotnosti sa rezultatima studije slučajeva i kontrola rađenih kod muškaraca iz populacije Srbije. Naime, ta studija slučajeva i kontrola pokazala je statistički značajnu asocijaciju ove genetičke varijante sa

rizikom za razvoj oligozoospermije (47). Razlog za ovako oprečne rezultate kod dve bliske slovenske populacije možda leži u činjenici da je naša studija obuhvatila mali broj muškaraca sa ovim podtipom idiopatske neplodnosti.

Naši rezultati se takođe razlikuju i od rezultata studije Liu S.Y. i saradnika iz 2017. godine (84), koja je pokazala povezanost rs2477686 sa oligoastenozoospermijom, kao i sa merljivim parametrima spermatozoida dobijenih spermogramom. Ipak, broj muškaraca sa dijagnozom oligoastenozoospermije u njihovoj studiji bio je 22. Značajno veći broj muškaraca sa istom dijagnozom bio je uključen u studiju Gu X. i saradnika iz 2019. godine (79), čiji se rezultati poklapaju sa rezultatima naše studije. Rezultati o uticaju ove genetičke varijante na rizik za razvoj NOA takođe su kontradiktorni, pošto druge studije na Azijatima (81, 82, 84, 85) nisu potvrdile rezultate inicijalne GWA studije (46). Rezultati naše studije slučajeva i kontrola ne mogu se uporediti sa prethodno objavljenim rezultatima, pošto u našoj studiji nije vršeno upoređivanje distribucije genotipova rs2477686 između neplodnih muškaraca sa NOA i fertilnih kontrola usled vrlo malog broja ispitanika sa dijagnozom NOA u grupi neplodnih muškaraca.

Jedina genetička varijanta za koju je pokazana statistički značajna povezanost sa muškom neplodnošću u našoj studiji slučajeva i kontrola bila je rs10842262. Iako nismo utvrdili povezanost ove tačkaste genetičke varijante sa idiopatskom neplodnošću muškaraca, pokazana je povezanost alela G sa rizikom za razvoj oligozoospermije. Ovi rezultati se razlikuju od rezultata studije slučajeva i kontrola iz populacije Srbije (47). Razlog tome verovatno leži u činjenici da je u našoj studiji distribucija genotipova bila u skladu sa HWE, dok je njihova distribucija u populaciji iz Srbije statistički značajno odstupala od HWE (47). Statistički značajna asocijacija rs10842262 sa rizikom za razvoj oligozoospermije takođe je pokazana kod Han Kineza (84). Druga studija koja je uključivala učesnike evropskog porekla pokazala je odsustvo statistički značajne asocijacije. Ipak, rezultati naše studije ne mogu se porediti sa njihovim rezultatima, pošto je studija Cervan-Martin M. i saradnika iz 2021. godine (80) regrutovala muškarce sa specifičnim retkim podtipovima oligozoospermije.

Rezultati naše meta-analize pokazali su da je manje učestali alel T rs12097821 povezan sa povećanim rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca. Dobijeni OR za alelski, dominantni i recesivni genetički model su veoma slični onima dobijenim od strane Vučić N. i saradnika iz 2020. godine (47) i ranije od strane Tu W. i saradnika iz 2015. godine (82). Ipak, Tu W. i saradnici testirali su samo alelski genetički model koji nije nužno adekvatan genetički model asocijacije ispitivane varijante, a uključivali su i rezultate inicijalne GWAS (46).

U meta-analizi Vučić N. i saradnika iz 2020. godine, dobijena statistička značajnost se gubila nakon isključivanja rezultata inicijalne GWAS (46,47). Ova neslaganja se objašnjavaju velikim ukupnim efektom GWAS, a koja je opredeljivala i rezultat kvantitativne sinteze. To je razlog što smo i mi tokom meta-analize izvršili isključenje rezultata inicijalne GWAS. Utvrđene razlike u rezultatima naše i meta-analize Vučić N. i saradnika (47) mogu se pripisati povećanju statističke moći nakon uključivanja dodatnih studija slučajeva i kontrola. Stoga, sadašnji rezultati dopunjene i skorije sinteze podataka potvrđuju asocijaciju rs12097821 i idiopatske neplodnosti muškaraca.

Kada je u pitanju rs2477686, rezultati naše meta-analize nisu u skladu sa prethodnim meta-analizama (47, 82). Ipak, u analizi Tu W i saradnika iz 2015. godine (82) rezultati sinteze podataka odnose se samo na povezanost rs2477686 sa NOA, tako da se uočene razlike mogu pripisati efektima specifičnim za klinički podtip neplodnosti, osim uključivanja/isključivanja rezultata inicijalne GWAS. S druge strane, navedena meta-analiza obuhvatila je samo učesnike azijskog porekla, što postavlja pitanje o potencijalnom uticaju etničke pripadnosti na rezultate meta-analize.

Što se tiče naše meta-analize i meta-analize Vučić N. i saradnika iz 2020. godine (47), uključivanje rezultata velike studije kod belaca moglo bi biti razlog za gubljenje statističkog značaja analizirane asocijacije, zajedno sa uključivanjem dodatnih rezultata o povezanosti rs2477686 sa oligospermijom. Naime, meta-analiza Vučić N. i saradnika, pokazala je razlike u efektima ove genetičke varijante kod Azijata i belaca, kao i kod NOA i oligospermije/oligoastenozoospermije. Dakle, donošenje zaključka o povezanosti rs2477686 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca zahteva dodatne studije i klasifikaciju rezultata prema etničkoj pripadnosti i kliničkim podtipovima idiopatske neplodnosti.

Ova meta-analiza ponovila je rezultate prethodnih sinteza podataka o asocijaciji rs10842262 sa rizikom za razvoj idiopatske muške neplodnosti. Kao i u meta-analizi Vučić N. i saradnika (47) pokazana je statistička značajnost i za alelski i za recesivni genetički model. Pored toga, za pomenute genetičke modele, rezultati su ostali statistički značajni i kod Azijata, kao i kod NOA podgrupe, što je odgovaralo prethodnim rezultatima. Pošto su dobijeni rezultati takođe u skladu sa ranijim nalazima Tu W. i saradnika (82), sinteza podataka sugerise da je rs10842262 najperspektivniji kandidat za potencijalni biomarker idiopatske neplodnosti kod muškaraca među navedenim testiranim genetičkim varijantama.

Generalno, neslaganja između rezultata naše i prethodnih studija mogu se pripisati razlikama u dizajnu studije, karakteristikama učesnika, kao što su etničko poreklo i različiti klinički podtipovi idiopatske neplodnosti, kao i statističkoj snazi urađenih studija. Da bi rezultati kvantitativne sinteze podataka bili informativniji, potrebne su dalje studije sa većim brojem ispitanika različitog etničkog porekla, kao i da ispitanici budu klinički dobro okarakterisani na osnovu rezultata spermograma.

U poslednjoj deceniji, molekuli mikro RNK su identifikovani kao važni regulatori procesa spermatogeneze, dok su poremećaji u nivou njihove ekspresije povezani sa smanjenim brojem spermatozoida, smanjenom vitalnošću i/ili pokretljivošću spermatozoida, kao i sa pojavom izmena u morfologiji spermatozoida (54).

Tokom dizajniranja druge studije slučajeva i kontrola kod muškaraca sa idiopatskom neplodnošću iz Severne Makedonije izabrali smo po jednu potencijalno funkcionalnu genetičku varijantu u genima za miR-146a i miR-27a. Prekomerna ekspresija miR-146a i miR-27a detektovana je u brojnim, kako čestim, tako i retkim bolestima čoveka sa različitim efektom na procese uključene u patogenezu tih bolesti (55).

Rezultati prethodnih eksperimentalnih studija pokazali su različite nivoe ekspresije ove dve mikro RNK u biološkim uzorcima muškaraca sa idiopatskom neplodnošću u poređenju sa biološkim uzorcima fertilnih muškaraca (95,96).

Molekul miR-146a ubraja se u inflamatorne mikro RNK zbog dokazane uloge u procesima inflamacije i održavanju homeostaze imunskog sistema (97). Postoje brojni eksperimentalni dokazi o značaju poremećaja u ekspresiji MiR-146a u procesima patogeneze kardiovaskularnih bolesti (98), ateroskleroze (99,100), nekih vrsta kardiomiopatija (101) i bolesti vezanih sa starošću (102). Prekomerna ekspresija miR-146a detektovana je i u mnogim malignim tumorima gde se poremećaji u njenoj ekspresiji dovode u vezu sa narušavanjem tkivne homeostaze blokiranjem procesa apoptoze (103). Brojne autoimunske bolesti takođe karakterišu poremećaji u ekspresiji ove mikro RNK, kao što su reumatoidni artritis (104,105), sistemski eritematozni lupus (eng. *systemic lupus erythematosus*, SLE)(106), Hašimoto tireoiditis (eng. *Hashimoto's thyroiditis*)(107) i giht (108). Izmene u njenoj ekspresiji u autoimunskim bolestima nije neočekivana, s obzirom na ulogu u regulaciji inflamacije i antioksidativnog odgovora i međusobnu povezanost oksidativnog stresa i kontinuirane inflamacije u osnovi oštećujućih mehanizama navedenih patologija. Prekomerna ekspresija miR-146a ima ulogu i u oksidativnom stresu koji je povezan sa razvojem Alchajmerove bolesti (109). I kod kliničke depresije rezistentne na postojeće tretmane (110), šećerne bolesti tipa 2 (111), miastenije gravis (112) i glaukoma (113) detektovani su poremećaji u ekspresiji miR-146a.

U patogenezi kardiovaskularnih bolesti, tokom formiranja ateroskleroznog plaka, prekomerna ekspresija miR-146a može imati protektivan efekat na matične ćelije adipocita (eng. *adipose-derived stem cells*)(114). Protektivni efekat registrovan je i kod akutnih zapaljenskih bolesti bubrega kao što su akutni glomerulonefritisi (115). Istovremeno, pokazana je protektivna uloga miR-146a i u patogenezi karcinoma pluća (116).

Prekomerna ekspresija miR-27a iz uzoraka periferne krvi i/ili egzozoma detektovana je u brojnim bolestima čoveka: reumatoidni artiritis (105), gojaznost (117), Parkinsonova bolest (118), akutna limfoblastna leukemija kod dece (119), Hočkinov limfom (120), itd. Snižen nivo ekspresije miR-27a detekovan je u biološkim uzorcima žena mlađe životne dobi sa kliničkom dijagnozom karcinoma dojke (121). Povišen nivo ekspresije ove mikro RNK ima protektivni efekat na klinički tok sistemske skleroze (122). Dosadašnja istraživanja ukazuju da nivo ekspresije miR-27a u perifernoj krvi (serumu) može predstavljati potencijalni biomarker u dijagnostici predijabetičnih stanja kao i šećerne bolesti tipa 2 (123).

Različiti nivoi ekspresije miR-146a i miR-27a imaju ulogu u kliničkoj manifestaciji Hantingtonove bolesti (124). Dosadašnja istraživanja ukazuju na mogućnost korišćenja miR-146a i miR-27a kao bioloških markera u dijagnostici aksijalnog spondiloartritisa (125). Najnovija istraživanja pokazuju da su prekomerne ekspresije ove dve mikro RNK uključene u patogenezu kardiovaskularnih bolesti koje se dovode u vezu sa infekcijom virusa SARS-CoV-2 (126).

Genetička varijanta rs2910164 (*miR-146a*) bila je tema brojnih studija slučajeva i kontrola koje su za cilj imale utvrđivanje moguće asocijacije funkcionalnih genetičkih varijanti u genima za mikro RNK sa rizikom za razvoj različitih bolesti čoveka. Do danas je kao potencijalni dijagnostički biološki marker identifikovana kod većeg broja autoimunskih bolesti (127), akutne limfoblastne leukemije (128), šećerne bolesti tip 2 (129,130), osteoporoze (131), reumatoidnog artritisa (132), izrazite gojaznosti (eng. *morbid obesity*) (133), karcinoma jajnika (134), koronarne bolesti (135), karcinoma želuca (136), šloga uzrokovanog aterosklerozom (137), akutne limfoblastne leukemije dečijeg doba (138), reumatoidnog artritisa (139), tuberkuloze (podaci iz srpske populacije)(140), ulceroznog kolitisa (141), policističnih jajnika (142).

Rezultati meta-analiza pokazali su odsustvo asocijacije rs2910164 sa rizikom za razvoj karcinoma dojke (143), nesitnoćelijskog karcinoma pluća (144) i grlića materice (145) kao i njenu asociranost sa smanjenim rizikom za razvoj reumatoidnog artritisa (146).

Poslednjih dvadeset godina se zna da molekul miR-27a ima značajnu ulogu u brojnim aspektima procesa neoplastične transformacije, kao što je nekontrolisana proliferacija ćelija, inhibicija ćelijskog umiranja po tipu apoptoze, invaziji i migraciji tumorskih ćelija, kao i u procesima angiogeneze (147). Kod mnogih bolesti koje se karakterišu izmenjenom ekspresijom miR-27a, kao i u slučaju miR-146a, značajna komponenta patoloških mehanizama su oksidativni stres i povezana inflamacija, a u čiju regulaciju je uključena navedena mikro RNK (148-150).

Genetička varijanta rs895819 je statistički značajno asocirana sa višim gradusom bolesti i odsustvom hormonskih receptora kod bolesnica sa karcinomom dojke (151). Meta-analiza 16 studija slučajeva i kontrola pokazala je da je kod osoba evropskog porekla genotip AA rs895819 asociran sa povećanim rizikom za razvoj karcinom dojke, dok alel G i heterozigotni genotip mogu imati protektivnu ulogu (152). Rezultati studija slučajeva i kontrola u većem broju evropskih populacija pokazali su da rs895819 predstavlja potencijalni prediktivni biomarker karcinoma kolona (153).

Takođe, rezultati kako studija slučajeva i kontrola u populacijama širom sveta, tako i meta-analiza, ukazuju na udruženost rs895819 sa rizikom za razvoj šećerne bolesti tipa 2 (154) i srčanog udara (infarkta miokarda)(155), dok je njena asocijacija sa rizikom za razvoj autoimunskih bolesti marginalnog značaja (156). Kada su psihijatrijske bolesti u pitanju, do danas je pokazana asocijacija sa bipolarnim poremećajem (157).

Na kraju, *In silico* analiza pokazala je moguću asocijaciju genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa rizikom od pojave spontanih pobačaja (158).

Do sada su rađene samo dve studije slučajeva i kontrola za genetičku varijantu rs2910164 kada je idiopatska neplodnost kod muškaraca u pitanju. Kod muškaraca iz populacije Turske (159) i Kine (160), slično kao i u našoj studiji slučajeva i kontrola, nije pokazana statistički značajna asocijacija rs2910164 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca. Međutim, ove dve studije nisu procenile povezanost rs2910164 sa astenoteratozoospermijom i nisu dale rezultate o potencijalnom uticaju ove genetičke varijante na morfologiju

spermatozoida ili pokretljivost spermatozoida. To je razlog što rezultati naše studije koji ukazuju na povezanost ređe učestalog alela C rs2910164 sa pojavom astenoteratozoospermije i sa niskom stopom vijabilnosti spermatozoida ne mogu biti predmet upoređivanja.

Kada je u pitanju genetička varijanta rs895819, do sada je sprovedena samo pilot studija slučajeva i kontrola kod muškaraca sa idiopatskom neplodnošću iz populacije Srbije (161). Ova studija u srodnoj populaciji pokazala je odsustvo statistički značajne povezanosti rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti muškaraca, što je u korelaciji sa rezultatima naše studije slučajeva i kontrola kod muškaraca iz populacije Severne Makedonije. Prema podacima baze *PubMed* (gledano 24.11.2024. godine), nisu pronađeni radovi koji za temu imaju studiju asocijacije rs895819 sa rizikom za razvoj muške neplodnosti u drugim populacijama.

Povezanost rs2910164 i rs895819 sa idiopatskom neplodnošću kod muškaraca je generalno malo verovatna, s obzirom na podudarnost rezultata studija rađenih kod muškaraca iz Srbije i Severne Makedonije.

Međutim, obe analizirane varijante pokazuju povezanost sa određenim tipovima muške neplodnosti i parametrima dobijenih analizom spermograma. Za definitivan zaključak o mogućoj asocijaciji rs2910164 i rs895819 sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti muškaraca potrebno je uraditi replikativne studije u populacijama za koje postoje podaci (Srbije i Severne Makedonije), kao i studije slučajeva i kontrola u većem broju drugih evropskih i ne-evropskih populacija. U tom slučaju biće moguće uraditi i meta-analizu koja bi dala pouzdanije podatke o mogućoj asocijaciji ove dve potencijalno funkcionalne genetičke varijante u genima za mikro RNK sa rizikom za razvoj muške neplodnosti.

Generalno, glavni nedostatak obe studije slučajeva i kontrola je mali broj analiziranih ispitanika. Naročito se to odnosi na selekciju muškaraca u grupe sa kliničkim podtipovima idiopatske neplodnosti, uključujući i muškarce u čijim spermogramima nije detektovano prisustvo spermatozoida. Međutim, kako je broj stanovnika Severne Makedonije relativno mali u odnosu na druge evropske države, teško je za očekivati da se studije slučajeva i kontrola mogu dizajnirati na statistički značajno većem uzorku bolesnika sa bilo kojom kliničkom dijagnozom. Objedinjeni ispitanici iz većeg broja slovenskih populacija bi svakako doveli do pouzdanijih rezultata. To bi bilo naročito korisno u utvrđivanju povezanosti analiziranih genetičkih varijanti sa parametrima spermatozoida u studiji čija bi snaga bila viša od dosadašnjih studija kod muškaraca slovenskog porekla.

Pored toga, bilo bi uputno da u sledećim studijama slučajeva i kontrola budu provereni rezultati prve GWA studije iz 2022. godine kod muškaraca iz Evrope (48). Kada su funkcionalne genetičke varijante u genima za mikro RNK u pitanju, buduće studije slučajeva i kontrola treba proširiti na veći broj analiziranih genetičkih varijanti, kao i na genetičke varijante u genima koji kodiraju proteine koji učestvuju u procesima biogeneze molekula mikro RNK.

I pored navedenih nedostataka, vredno značaja je to što su ovo prve dve studije slučajeva i kontrola koje su ispitivale povezanost polimorfizama u sekvenci molekula DNK sa

rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti muškaraca iz Severne Makedonije. Svojim rezultatima one su otvorile novo polje istraživanja idiopatske neplodnosti kod muškaraca u ovoj evropskoj populaciji.

6. ZAKLJUČCI

1. Uspešno je formirana baza podataka i banka bioloških uzoraka muškaraca sa kliničkom dijagnozom idiopatske neplodnosti i fertilnih muškarca kao kontrolne grupe iz populacije Severne Makedonije.
2. Genetičke varijante u genima *PRMT6* (rs12097821), *PEX10* (rs2477686) i *SOX5* (rs10842262) nisu pokazale statistički značajnu povezanost sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije.
3. Učestalost alela G genetičke varijante rs10842262 je značajno povećana u grupi neplodnih muškaraca sa niskom koncentracijom spermatozoida u ejakulatu, u poređenju sa fertilnim muškarcima prema log-aditivnom genetičkom modelu.
4. Učestalost genotipa GG genetičke varijante rs10842262 kod muškaraca sa oligospermijom oko dva puta je veća u odnosu na onu utvrđenu kod fertilnih muškaraca prema log-aditivnom genetičkom modelu.
5. Rezultati meta-analize ukazuju na povezanost između manje učestalog alela G genetičke varijante rs10842262 i muške idiopatske neplodnosti. Nakon stratifikacije prema etničkoj pripadnosti učesnika, rs10842262 je ostao statistički značajno povezan sa neplodnošću kod muškaraca Azijskog porekla, što sugerišu i alelski i recesivni genetički model.
6. Za drugu testiranu varijantu rs2477686, rezultati kvantitativne sinteze podataka nisu bili statistički značajni po svim testiranim genetičkim modelima. I nakon stratifikacije unosa sprovedene prema etičkoj pripadnosti učesnika i rezultatima spremograma meta-analiza nije pokazala statističku značajnost.
7. Rezultati meta-analize ukazuju na povezanost između genetičke varijante rs12097821 i idiopatske neplodnosti muškaraca prema alelskom, dominantnom i recesivnom genetičkom modelu.
8. Genetičke varijante u genima *MIR27a* (rs2910164) i *MIR146a* (rs895819) nisu pokazale statistički značajnu povezanost sa rizikom za razvoj idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije.
9. Rezultati naše studije slučajeva i kontrola pokazali su povezanost genetičkih varijanti u genima *MIR-27a* (rs2910164) i *MIR-146a* (rs895819) sa određenim podtipovima idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije.
10. Manje učestali alel C rs2910164 statistički je značajno češći kod muškaraca sa

astenoteratozoospermijom u odnosu na druge podtipove idiopatske neplodnosti kod muškaraca iz Severne Makedonije prema over-dominantnom genetičkom modelu.

11. Neplodni muškarci sa prisustvom spermatozoida dokazanim rezultatima spermograma sa genotipom GC varijante rs2910164 pokazali su niži procenat živih spermatozoida prema over-dominantnom genetičkom modelu.
12. Nosioци genotipa TC genetičke varijante rs895819 pokazali su niži procenat progresivno pokretnih spermatozoida u poređenju sa neplodnim muškarcima sa najčešćim genotipom TT.

7. LITERATURA

1. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002; 77(5):873-82.
2. Huang B, Wang Z, Kong Y, Jin M, Ma L. Global, regional and national burden of male infertility in 204 countries and territories between 1990 and 2019: an analysis of global burden of disease study. *BMC Public Health*. 2023;23(1):2195.
3. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013; 11(66):1-15.
4. Qing L, Song QX, Feng JL, Li HY, Liu G, Jiang HH. Prevalence of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum infections using a novel isothermal simultaneous RNA amplification testing method in infertile males. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017; 16(1):45.
5. No authors listed. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril*. 1992; 57(6):1289-93.
6. Benoff S, Jacob A, Hurley IR. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*. 2000; 6(2):107-21.
7. Nieschlag E, Behre H, Nieschlag S, Van AH. *Andrology : male reproductive health and dysfunction*. 2nd ed. Nieschlag E, Behre H, editors. Springer, Berlin, Heidelberg; 2011.
8. Kothandaraman N, Agarwal A, Abu-Elmagd M, Al-Qahtani MH. Pathogenic landscape of idiopathic male infertility: new insight towards its regulatory networks. *NPJ Genom Med*. 2016; 16023.
9. World Health Organisation. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2000.
10. Hwang K, Lipshultz LI, Lamb DJ. Use of diagnostic testing to detect infertility. *Curr Urol Rep*. 2011; 12(1):68-76.
11. World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. ed. 5. Geneva, Switzerland: WHO; 2010.
12. Iamarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinkas JG. Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003; 17(2):211-29.
13. Tüttelmann F, Nieschlag E. Classification of Andrological Disorders. In: Nieschlag E, Behre H, Nieschlag S. editors. *Andrology*. 3rd edition. New York: Springer: Completely Revised and Updated Edition. 2010. p. 87-92.
14. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012; 62(2):324-32
15. Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online* 2018; 36(3):327-39.
16. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10(5):303-12.

17. Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl.* 2012; 14(1):32-9.
18. Liu XG, Hu HY, Guo YH, Sun YP. Correlation between Y chromosome microdeletion and male infertility. *Genet Mol Res.* 2016; 15(2).
19. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 2001; 29(3):279-86.
20. Vučić N, Kotarac N, Matijašević S, Radenković L, Vuković I, Budimirović B, Djordjević M, Savić-Pavićević D, Brajušković G. Copy number variants within AZF region of Y chromosome and their association with idiopathic male infertility in Serbian population. *Andrologia.* 2022; 54(1):e14297.
21. Eggers S, DeBoer KD, van den Bergen J, Gordon L, White SJ, Jamsai D, McLachlan RI, Sinclair AH, O'Bryan MK. Copy number variation associated with meiotic arrest in idiopathic male infertility. *Fertil Steril.* 2015; 103(1):214-9.
22. Krausz C, Chianese C, Giachini C, Guarducci E, Laface I, Forti G. The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility. *J Endocrinol Invest.* 2011; 34(5):376-82.
23. Bansal SK, Jaiswal D, Gupta N, Singh K, Dada R, Sankhwar SN, et al. Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Sci Rep.* 2016; 6:19798.
24. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(3):3245-76.
25. Shamsi MB, Kumar K, Dada R. Genetic and epigenetic factors: Role in male infertility. *Indian J Urol.* 2011;27(1):110-20.
26. Waclawska A, Kurpisz M. Key functional genes of spermatogenesis identified by microarray analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2012; 58(5):229-35.
27. Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology* 2014; 2(3):315-21.
28. O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril.* 2010; 93(1):1-12.
29. Vogt PH. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2005;10(1):81-93.
30. Flannigan R, Schlegel PN. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017; 44:26-37.
31. O'Hara L, Smith LB. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015; 29(4):595-605.
32. Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(11):3777-82.
33. Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A et al. 2006a Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clinical Endocrinology* 65, 606–160.

34. Vodicka R, Vrtel R, Dusek L, Singh AR, Krizova K, Svacinova V, Horinova V, Dostal J, Oborna I, Brezinova J, Sobek A, Santavy J. TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(5):579-87.
35. Balder P, Jones C, Coward K, Yeste M. Sperm chromatin: Evaluation, epigenetic signatures and relevance for embryo development and assisted reproductive technology outcomes. *Eur J Cell Biol.* 2024; 103(3):151429.
36. Li N, Wang H, Zou S, Yu X, Li J. Perspective in the Mechanisms for Repairing Sperm DNA Damage. *Reprod Sci.* 2024.
37. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(4):417-35.
38. de la Iglesia A, Jodar M, Oliva R, Castillo J. Insights into the sperm chromatin and implications for male infertility from a protein perspective. *WIREs Mech Dis.* 2023; 15(2):e1588.
39. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet.* 2007; 16(21):2542-51.
40. Wagner AO, Turk A, Kunej T. Towards a Multi-Omics of Male Infertility. *World J Mens Health.* 2023;41(2):272-288.
41. Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Rasalkar AA, Singh L. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility. *J Androl.* 2003; 24(3):388-92.
42. Holyoake AJ, McHugh P, Wu M, O'Carroll S, Benny P, Sin IL, Sin FY. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *Int J Androl.* 2001; 24(3):175-82.
43. Zondervan KT, Cardon LR. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nat Protoc.* 2007; 2(10):2492-501.
44. Sonehara K, Okada Y. Leveraging genome-wide association studies to better understand the etiology of cancers. *Cancer Sci.* 2024.
45. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat RevGenet.* 2001; 2(2):91-9.
46. Hu Z, Xia Y, Guo X, Dai J, Li H, Hu H, Jiang Y, Lu F, Wu Y, Yang X, Li H, Yao B, Lu C, Xiong C, Li Z, Gui Y, Liu J, Zhou Z, Shen H, Wang X, Sha J. A genome-wide association study in Chinese men identifies three risk loci for non-obstructive azoospermia. *Nat Genet.* 2011; 44(2):183-6.
47. Vučić N, Dobrijević Z, Kotarac N, Matijašević S, Vuković I, Budimirović B, Djordjević M, Savić-Pavićević D, Brajušković G. Association study between single-nucleotide variants rs12097821, rs2477686, and rs10842262 and idiopathic male infertility risk in Serbian population with meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2020; 37(11):2839-52. (Napomena: predložena citiranost PubMed je Nemanja V, Zorana D, Nevena K, Suzana M, Ivan V, Branko B, Mirka D, Dusanka SP, Goran B. Association study between single-nucleotide variants rs12097821, rs2477686, and rs10842262 and idiopathic male infertility risk in Serbian population with meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2020; 37(11):2839-52.)
48. Greither T, Behre HM, Herlyn H. Genome-Wide Association Screening Determines Peripheral Players in Male Fertility Maintenance. *Int J Mol Sci.* 2022; 24(1):524.

49. Mostafa T, Abdel-Hamid I, Taymour M, Ali O. Genetic variants in varicocele-related male infertility: a systematic review and future directions. *Hum Fertil (Camb)*. 2023; 26(3):632-48.
50. Barreda-Sánchez M, Guillén-Navarro E. From basic research to clinical practice: RNA interference. *Med Clin (Barc)*. 2023;159 (Suppl 1):S33-S37.
51. NOBEL PRIZE. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2024. Dostupno na URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2024/summary/>
52. NOBEL PRIZE. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. Dostupno na URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/>
53. Shi Z, Yu M, Guo T, Sui Y, Tian Z, Ni X, Chen X, Jiang M, Jiang J, Lu Y, Lin M. MicroRNAs in spermatogenesis dysfunction and male infertility: clinical phenotypes, mechanisms and potential diagnostic biomarkers. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1293368.
54. Barbu MG, Thompson DC, Suci N, Voinea SC, Cretoiu D, Predescu DV. The Roles of MicroRNAs in Male Infertility. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(6):2910.
55. Bahmyari S, Khatami SH, Taghvimi S, Rezaei Arablouydareh S, Taheri-Anganeh M, Ghasemnejad-Berenji H, Farazmand T, Soltani Fard E, Solati A, Movahedpour A, Ghasemi H. MicroRNAs in Male Fertility. *DNA Cell Biol*. 2024; 43(3):108-24.
56. Norioun H, Motovali-Bashi M, Javadirad SM. Hsa-miR27a-3p overexpression in men with non-obstructive azoospermia: A case-control study. *Int J Reprod Biomed*. 2020; 18: 961–8.
57. Saebnia N, Neshati Z, Bahrami AR. Role of microRNAs in etiology of azoospermia and their application as non-invasive biomarkers in diagnosis of azoospermic patients. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2021; 50(10):102207.
58. Joshi M, Sethi S, Mehta P, Kumari A, Rajender S. Small RNAs, spermatogenesis, and male infertility: a decade of retrospect. *Reprod Biol Endocrinol*. 2023;21(1):106.
59. Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, Tong N, Wang JF, Song NH, Zhang W, Hua LX, Wu HF. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 2010; 70(5):467-72.
60. Shi D, Li P, Ma L, Zhong D, Chu H, Yan F, Lv Q, Qin C, Wang W, Wang M, Tong N, Zhang Z, Yin C. A genetic variant in pre-miR-27a is associated with a reduced renal cell cancer risk in a Chinese population. *PLoS One*. 2012;7(10):e46566.
61. Nikolić ZZ, Savić Pavićević DL, Vučić NL, Romac SP, Brajušković GN. Association between a Genetic Variant in the hsa-miR-146a Gene and Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis. *Public Health Genomics* 2015; 18(5):283-98.
62. Dai J, Chen Y, Gong Y, Gu D, Chen J. Association of microRNA-27a rs895819 polymorphism with the risk of cancer: An updated meta-analysis. *Gene*. 2020; 728:144185.
63. Oberacker P, Stepper P, Bond DM, Höhn S, Focken J, Meyer V, Schelle L, Sugrue VJ, Jeunen GJ, Moser T, Hore SR, von Meyenn F, Hipp K, Hore TA, Jurkowski TP. Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS Biol*. 2019; 17(1):e3000107.
64. Sambrook J, Russel DW. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed Field Agarose Gel Electrophoresis. In: Sambrook J, Russel DW, eds. *Molecular Cloning: a laboratory*

- manual, Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2001; p.5.1.-5.17.
65. Pourzand C, Cerutti P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. *Mutat Res.* 1993; 288(1):113-21.
 66. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(15):e115.
 67. Tenny S, Kerndt CC, Hoffman MR. Case Control Studies. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
 68. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22(15):1928-9.
 69. Lunetta KL. Genetic association studies. *Circulation* 2008; 118(1):96-101.
 70. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011; 6(2):121-33
 71. Dziak JJ, Coffman DL, Lanza ST, Li R, Jeremiin LS. Sensitivity and specificity of information criteria. *Brief Bioinform.* 2020; 21(2):553-565.
 72. Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G. Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance. *Ann Card Anaesth.* 2019; 22(4):407-11.
 73. Perme MP, Manevski D. Confidence intervals for the Mann-Whitney test. *Stat Methods Med Res* 2019; 28(12):3755-68.
 74. Leon A C. 3.12 - Descriptive and Inferential Statistics. In: Bellack AS and Hersen M, editors. *Comprehensive Clinical Psychology*. Oxford:Pergamon. 1998. pp:243-85.
 75. Martorell-Marugan J, Toro-Dominguez D, Alarcon-Riquelme ME, Carmona-Saez P. Metagenyo: A Web Tool For Meta-Analysis Of Genetic Association Studies. *Bmc Bioinform.* 2017; 18:563.
 76. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986; 7(3):177-88.
 77. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315(7109):629-34.
 78. Brajušković G. Metode molekularne biologije. In: Brajušković G. *Molekularna biologija 2*. Beograd:Savremena administracija. 2012. p.41-74.
 79. Gu X, Li H, Chen X, Zhang X, Mei F, Jia M, Xiong C. PEX10, SIRPA-SIRPG, and SOX5 gene polymorphisms are strongly associated with nonobstructive azoospermia susceptibility. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(4):759-768.
 80. Cerván-Martín M, Bossini-Castillo L, Rivera-Egea R, Garrido N, Luján S, Romeu G, Santos-Ribeiro S; IVIRMA Group, Lisbon Clinical Group; Castilla JA, Gonzalvo MDC, Clavero A, Vicente FJ, Guzmán-Jiménez A, Burgos M, Barrionuevo FJ, Jiménez R, Sánchez-Curbelo J, López-Rodrigo O, Peraza MF, Pereira-Caetano I, Marques PI, Carvalho F, Barros A, Bassas L, Seixas S, Gonçalves J, Larriba S, Lopes AM, Carmona FD, Palomino-Morales RJ. Effect and in silico characterization of genetic variants associated with severe spermatogenic disorders in a large Iberian cohort. *Andrology* 2021; 9(4):1151-65.
 81. Sato Y, Jinam T, Iwamoto T, Yamauchi A, Imoto I, Inoue I, Tajima A. Replication study and meta-analysis of human nonobstructive azoospermia in Japanese populations. *Biol Reprod.* 2013; 88(4):87.

82. Tu W, Liu Y, Shen Y, Yan Y, Wang X, Yang D, Li L, Ma Y, Tao D, Zhang S, Yang Y. Genome-wide Loci linked to non-obstructive azoospermia susceptibility may be independent of reduced sperm production in males with normozoospermia. *Biol Reprod.* 2015; 92(2):41.
83. Rajovski S, Vučić N, Karanović J, Matijašević S, Savić-Pavićević D, Dobrijević Y, Brajsković G. Association of PRMT6, PEX10 and SOX5 genetic variants with idiopathic male infertility: Evidence from North Macedonian population and an updated meta-analysis. *Genetika* 2023; 55(1): 355-37.
84. Liu SY, Zhang CJ, Peng HY, Sun H, Lin KQ, Huang XQ, Huang K, Chu JY, Yang ZQ. Strong association of SLC1A1 and DPF3 gene variants with idiopathic male infertility in Han Chinese. *Asian J Androl.* 2017; 19(4):486-92.
85. Zou S, Li Z, Wang Y, Chen T, Song P, Chen J, He X, Xu P, Liang M, Luo K, Zhu X, Tian E, Du Q, Wen Z, Li Z, Wang M, Sha Y, Cao Y, Shi Y, Hu H. Association study between polymorphisms of PRMT6, PEX10, SOX5, and nonobstructive azoospermia in the Han Chinese population. *Biol Reprod.* 2014; 90(5):96.
86. Kelley EL, Kingsberg SA. Sexuality and Infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2024; 51(2):311-22.
87. Sharma RS, Saxena R, Singh R. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian J Med Res.* 2018; 148(Suppl):S10-S14.
88. Braverman AM, Davoudian T, Levin IK, Bocage A, Wodoslawsky S. Depression, anxiety, quality of life, and infertility: a global lens on the last decade of research. *Fertil Steril.* 2024; 121(3):79-383.
89. Andrabi SW, Ara A, Saharan A, Jaffar M, Gugnani N, Esteves SC. Sperm DNA Fragmentation: causes, evaluation and management in male infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2024;28(2):306-19.
90. Roque M, Esteves SC. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. *Int Urol Nephrol.* 2018; 50:583–603.
91. Evenson DP, Djira G, Kasperson K, Christianson J. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity. *Fertil Steril.* 2020; 114(2):311-20.
92. Gunes S, Esteves SC. Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia* 2021; 53(1):e13586.
93. Venkatesh SS, Wittemans LBL, Palmer DS, Baya NA, Ferreira T, Hill B, Lassen FH, Parker MJ, Reibe S, Elhakeem A, Banasik K, Bruun MT, Erikstrup C, Jensen BA, Juul A, Mikkelsen C, Nielsen HS, Ostrowski SR, Pedersen OB, Rohde PD, Sorensen E, Ullum H, Westergaard D, Haraldsson A, Holm H, Jonsdottir I, Olafsson I, Steingrimsdottir T, Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Figueredo J, Karjalainen MK, Pasanen A, Jacobs BM, Hubers N; Genes & Health Research Team; Estonian Biobank Research Team; Estonian Health Informatics Research Team; DBDS Genomic Consortium; FinnGen; Lippincott M, Fraser A, Lawlor DA, Timpson NJ, Nyegaard M, Stefansson K, Magi R, Laivuori H, van Heel DA, Boomsma DI, Balasubramanian R, Seminara SB, Chan YM, Laisk T, Lindgren CM. Genome-wide analyses identify 21 infertility loci and over 400 reproductive hormone loci across the allele frequency spectrum. *medRxiv [Preprint].* 2024:2024.03.19.24304530.

94. Hodžić A, Ristanović M, Zorn B, Tulić C, Maver A, Novaković I, Plaseska-Karanfilska D, Peterlin B. Genetic variation in leptin and leptin receptor genes as a risk factor for idiopathic male infertility. *Andrology* 2017; 5(1):70-74.
95. Abu-Halima M, Galata V, Backes C, Keller A, Hammadeh M, Meese E. MicroRNA signature in spermatozoa and seminal plasma of proven fertile men and in testicular tissue of men with obstructive azoospermia. *Andrologia* 2020; 52(2):e13503.
96. Attia H, Finocchi F, Orciani M, Mehdi M, Zidi Jrah I, Lazzarini R, Balercia G, Mattioli Belmonte M. Pro-inflammatory cytokines and microRNAs in male infertility. *Mol Biol Rep.* 2021; 48(8):5935-5942.
97. Liao Z, Zheng R, Shao G. Mechanisms and application strategies of miRNA-146a regulating inflammation and fibrosis at molecular and cellular levels (Review). *Int J Mol Med.* 2023; 51(1):7.
98. Zapata-Martínez L, Águila S, de Los Reyes-García AM, Carrillo-Tornel S, Lozano ML, González-Conejero R, Martínez C. Inflammatory microRNAs in cardiovascular pathology: another brick in the wall. *Front Immunol.* 2023; 14:1196104.
99. Ardinal AP, Wiyono AV, Estiko RI. Unveiling the therapeutic potential of miR-146a: Targeting innate inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* 2024; 28(19):e70121.
100. Sharma AR, Sharma G, Bhattacharya M, Lee SS, Chakraborty C. Circulating miRNA in Atherosclerosis: A Clinical Biomarker and Early Diagnostic Tool. *Curr Mol Med.* 2022; 22(3):250-62.
101. Ribeiro HG, Galdino OA, de Souza KSC, Rosa Neta AP, Lin-Wang HT, Cunha-Neto E, Rezende AA, Silbiger VN. Unraveling the role of miRNAs as biomarkers in Chagas cardiomyopathy: Insights into molecular pathophysiology. *PLoS Negl Trop Dis.* 2024; 18(2):e0011865.
102. Olivieri F, Prattichizzo F, Giuliani A, Maticchione G, Rippo MR, Sabbatinelli J, Bonafè M. miR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2021; 70:101374.
103. Kookli K, Soleimani KT, Amr EF, Ehyayed HM, Zabibah RS, Daminova SB, Saadh MJ, Alsaikhan F, Adil M, Ali MS, Mohtashami S, Akhavan-Sigari R. Role of microRNA-146a in cancer development by regulating apoptosis. *Pathol Res Pract.* 2024; 254:155050.
104. Mucientes A, Lisbona JM, Mena-Vázquez N, Ruiz-Limón P, Manrique-Arija S, Fernández-Nebro A. miRNA-Mediated Epigenetic Regulation of Treatment Response in RA Patients-A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(21):12989.
105. Pascual-García S, Martínez-Peinado P, Pujalte-Satorre C, Navarro-Sempere A, Esteve-Girbés J, López-Jaén AB, Javaloyes-Antón J, Cobo-Velacoracho R, Navarro-Blasco FJ, Sempere-Ortells JM. Exosomal Osteoclast-Derived miRNA in Rheumatoid Arthritis: From Their Pathogenesis in Bone Erosion to New Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(3):1506.
106. Renaudineau Y, Charras A, Natoli V, Fusaro M, Smith EMD, Beresford MW, Hedrich CM; UK jSLE Cohort Study. Type I interferon associated epistasis may contribute to early disease-onset and high disease activity in juvenile-onset lupus. *Clin Immunol.* 2024; 262:110194.

107. Zadeh-Vakili A, Faam B, Afgar A, Razmpoosh E, Zarkesh M, Amouzegar A. A systematic review of dysregulated microRNAs in Hashimoto's thyroiditis. *Endocrine*. 2024; 84(3):800-811.
108. de Lima JD, de Paula AGP, Yuasa BS, de Souza Smanioto CC, da Cruz Silva MC, Dos Santos PI, Prado KB, Winter Boldt AB, Braga TT. Genetic and Epigenetic Regulation of the Innate Immune Response to Gout. *Immunol Invest*. 2023; 52(3):364-397.
109. Nunomura A, Perry G. RNA and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Focus on microRNAs. *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020:2638130.
110. Cai L, Xu J, Liu J, Luo H, Yang R, Gui X, Wei L. miRNAs in treatment-resistant depression: a systematic review. *Mol Biol Rep*. 2024; 51(1):638.
111. Mata-Monterde M, Serrano-Valcarce A, Almiñana-Pastor PJ, Micó-Martínez P, López-Roldán A. miRNAs as Epigenetic Biomarkers in the Study of the Bidirectional Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(19):10723.
112. Ghafouri-Fard S, Azimi T, Hussien BM, Taheri M, Jalili Khoshnoud R. A Review on the Role of Non-Coding RNAs in the Pathogenesis of Myasthenia Gravis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(23):12964.
113. Romano GL, Platania CB, Forte S, Salomone S, Drago F, Bucolo C. MicroRNA target prediction in glaucoma. *Prog Brain Res*. 2015; 220:217-40.
114. Holvoet P. Aging and Metabolic Reprogramming of Adipose-Derived Stem Cells Affect Molecular Mechanisms Related to Cardiovascular Diseases. *Cells* 2023; 12(24):2785.
115. Mahtal N, Lenoir O, Tinel C, Anglicheau D, Tharaux PL. MicroRNAs in kidney injury and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2022; 18(10):643-62.
116. Wani JA, Majid S, Khan A, Arafah A, Ahmad A, Jan BL, Shah NN, Kazi M, Rehman MU. Clinico-Pathological Importance of miR-146a in Lung Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11(2):274.
117. Flowers E, Stroebel B, Lewis KA, Aouizerat BE, Gadgil M, Kanaya AM, Zhang L, Gong X. Longitudinal associations between microRNAs and weight in the diabetes prevention program. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024; 15:1419812.
118. Jang YO, Roh Y, Shin W, Jo S, Koo B, Liu H, Kim MG, Lee HJ, Qiao Z, Lee EY, Lee M, Lee J, Lee EJ, Shin Y. Transferrin-conjugated magnetic nanoparticles for the isolation of brain-derived blood exosomal MicroRNAs: A novel approach for Parkinson's disease diagnosis. *Anal Chim Acta*. 2024; 1306:342623.
119. Barrios-Palacios D, Organista-Nava J, Balandrán JC, Alarcón-Romero LDC, Zubillaga-Guerrero MI, Illades-Aguiar B, Rivas-Alarcón AA, Diaz-Lucas JJ, Gómez-Gómez Y, Leyva-Vázquez MA. The Role of miRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse and the Associated Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2023; 25(1):119.
120. Paczkowska J, Giefing M. MicroRNA signature in classical Hodgkin lymphoma. *J Appl Genet*. 2021; 62(2):281-8.
121. Chekhun V, Borikun T, Mushii O, Zadvornyi T, Martyniuk O, Kashuba E, Bazas V, Hrybach S, Krotevych M, Lyalkin S, Lukianova N. EXPRESSION PROFILE OF miR-145, -182, -21, -27a, -29b, and -34a IN BREAST CANCER PATIENTS OF YOUNG AGE. *Exp Oncol*. 2024; 45(4):421-31.

122. Bayati P, Kalantari M, Assarehzadegan MA, Poormoghim H, Mojtabavi N. MiR-27a as a diagnostic biomarker and potential therapeutic target in systemic sclerosis. *Sci Rep.* 2022; 12(1):18932.
123. Ghoreishi E, Shahrokhi SZ, Kazerouni F, Rahimpour A. Circulating miR-148b-3p and miR-27a-3p can be potential biomarkers for diagnosis of pre-diabetes and type 2 diabetes: integrating experimental and in-silico approaches. *BMC Endocr Disord.* 2022; 22(1):207.
124. Ghafouri-Fard S, Khoshbakht T, Hussien BM, Taheri M, Ebrahimzadeh K, Noroozi R. The emerging role of long non-coding RNAs, microRNAs, and an accelerated epigenetic age in Huntington's disease. *Front Aging Neurosci.* 2022; 14:987174.
125. Yıldırım NO, Balcı Ş, Tamer L. Reduced expression of miRNAs as potential biomarkers in axial spondyloarthritis. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2024; 70(4):e20231521.
126. Pieri M, Vayianos P, Nicolaidou V, Felekis K, Papanephytous C. Alterations in Circulating miRNA Levels after Infection with SARS-CoV-2 Could Contribute to the Development of Cardiovascular Diseases: What We Know So Far. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(3):2380.
127. Zhang J, Tan H, Cao Q, Su G, Yang P. Meta-Analysis of miRNA Variants Associated with Susceptibility to Autoimmune Disease. *Dis Markers.* 2021;2021:9978460.
128. Jiménez-Morales S, Núñez-Enríquez JC, Cruz-Islas J, Bekker-Méndez VC, Jiménez-Hernández E, Medina-Sanson A, Olarte-Carrillo I, Martínez-Tovar A, Flores-Lujano J, Ramírez-Bello J, Pérez-Saldívar ML, Martín-Trejo JA, Pérez-Lorenzana H, Amador-Sánchez R, Mora-Ríos FG, Peñaloza-González JG, Duarte-Rodríguez DA, Torres-Nava JR, Flores-Bautista JE, Espinosa-Elizondo RM, Román-Zepeda PF, Flores-Villegas LV, Tamez-Gómez EL, López-García VH, Lara-Ramos JR, González-Ulivarri JE, Martínez-Silva SI, Espinoza-Anrubio G, Almeida-Hernández C, Ramírez-Colorado R, Hernández-Mora L, García-López LR, Cruz-Ojeda GA, Godoy-Esquivel AE, Contreras-Hernández I, Medina-Hernández A, López-Caballero MG, Hernández-Pineda NA, Granados-Kraulles J, Rodríguez-Vázquez MA, Torres-Valle D, Cortés-Reyes C, Medrano-López F, Pérez-Gómez JA, Martínez-Ríos A, Aguilar-De-Los-Santos A, Serafin-Díaz B, Gutiérrez-Rivera ML, Merino-Pasaye LE, Vargas-Alarcón G, Mata-Rocha M, Sepúlveda-Robles OA, Rosas-Vargas H, Hidalgo-Miranda A, Mejía-Arangur JM. Association Analysis Between the Functional Single Nucleotide Variants in miR-146a, miR-196a-2, miR-499a, and miR-612 With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol.* 2021; 11:762063.
129. Huang Q, Chen H, Xu F, Liu C, Wang Y, Tang W, Chen L. Relationship of microRNA locus with type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Endocr Connect.* 2021; 10(11):1393-1402.
130. Chang WW, Wen LY, Zhang L, Tong X, Jin YL, Chen GM. Association of rs2910164 in miR-146a with type 2 diabetes mellitus: A case-control and meta-analysis study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:961635.
131. Yalaev B, Deev R, Tyurin A, Salakhov R, Smirnov K, Eremkina A, Mokrysheva N, Minniakhmetov I, Khusainova R. MicroRNA binding site variants-new potential markers of primary osteoporosis in men and women. *Front Genet.* 2024; 15:1470310.

132. Ali YB, Hasan NM, El-Maadawy EA, Bassyouni IH, El-Shahat M, Talaat RM. Association between IL-6, miRNA-146a, MALAT1 genetic polymorphisms and risk of rheumatoid arthritis. *Per Med.* 2024;21(5):277-94.
133. Ozsoy Z, Nursal AF, Ozsoy S, Tekcan A, Yigit S. miR-146a rs2910164 (G/C) variant may predict morbid obesity risk in adults. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2024:1-11.
134. Liu H, Sun L, Liu X, Wang R, Luo Q. Associations between non-coding RNAs genetic polymorphisms with ovarian cancer risk: A systematic review and meta-analysis update with trial sequential analysis. *Medicine (Baltimore).* 2023; 102(39):e35257.
135. Tie J, Takanari H, Ota K, Okuda T. Role of miR-143 and miR-146 in Risk Evaluation of Coronary Artery Diseases in Autopsied Samples. *Genes (Basel).* 2023 ;14(2):471.
136. Xie WQ, Tan SY, Wang XF. MiR-146a rs2910164 polymorphism increases risk of gastric cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(41):15440-7.
137. Jing Y, Hu S, Song J, Dong X, Zhang Y, Sun X, Wang D. Association between polymorphisms in miRNAs and ischemic stroke: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2022; 101(52):e32078.
138. Navabi A, Aznab M, Heydarpour F. The association between microRNA polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2022; 81:102285.
139. Ul Islam Z, Baneen U, Khaliq T, Nurulain SM, Muneer Z, Hussain S. Association analysis of miRNA-146a and miRNA-499 polymorphisms with rheumatoid arthritis: a case-control and trio-family study. *Clin Exp Med.* 2023; 23(5):1667-75.
140. Buha I, Škodrić-Trifunović V, Anđelković M, Pavlović S, Vreća M, Stjepanović M, Milin-Lazović J, Simić M, Antonijević G, Spasovski V. Association between active pulmonary tuberculosis and miRNA-146a: A preliminary study from Serbia. *J Infect Dev Ctries.* 2022; 16(8):1317-22.
141. Kolahi SN, Salehi Z, Sasani ST, Mashayekhi F, Aminian K. Polymorphisms of miR-146a and susceptibility to ulcerative colitis risk: a case-control study. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2023;42(3):206-16.
142. Li R, Yu Y, Jaafar SO, Baghchi B, Farsimadan M, Arabipour I, Vaziri H. Genetic Variants miR-126, miR-146a, miR-196a2, and miR-499 in Polycystic Ovary Syndrome. *Br J Biomed Sci.* 2022; 79:10209.
143. Moazeni-Roodi A, Aftabi S, Sarabandi S, Karami S, Hashemi M, Ghavami S, Taheri M. Association Between miR-146a rs2910164 Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility: An Updated Meta-Analysis of 9545 Cases and 10030 Controls. *Microna* 2021; 10(3):191-99.
144. Qiu H, Xie Z, Tang W, Liu C, Wang Y, Gu H, Zheng Q. Association between microRNA-146a, -499a and -196a-2 SNPs and non-small cell lung cancer: a case-control study involving 2249 subjects. *Biosci Rep.* 2021; 41(2):BSR20201158.
145. Liu J, Dong P, Zhou L, Wang S. The Association between Five Genetic Variants in MicroRNAs (rs2910164, rs11614913, rs3746444, rs11134527, and rs531564) and Cervical Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2021; 2021:9180874.
146. Liu F, Liang Y, Zhao Y, Chen L, Wang X, Zhang C. Meta-analysis of association of microRNAs genetic variants with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 2021; 100(17):e25689.

147. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*. 2012; 6(6):590-610.
148. Ou Y, An R, Wang H, Chen L, Shen Y, Cai W, Zhu W. Oxidative stress-related circulating miRNA-27a is a potential biomarker for diagnosis and prognosis in patients with sepsis. *BMC Immunol*. 2022; 23(1):14.
149. Xie N, Cui H, Banerjee S, Tan Z, Salomao R, Fu M, Abraham E, Thannickal VJ, Liu G. miR-27a regulates inflammatory response of macrophages by targeting IL-10. *J Immunol*. 2014; 193(1):327-334.
150. Wang Z, Ruan Z, Mao Y, Dong W, Zhang Y, Yin N, Jiang L. miR-27a is up regulated and promotes inflammatory response in sepsis. *Cell Immunol*. 2014; 290(2):190-195.
151. Sanguansin S, Saelee P, Kritsiriwuthinan K, Pongstaporn W. The Association of pre-miR27a Gene Polymorphism and Clinicopathological Data in Thai Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023; 24(6):2055-9.
152. Liu Y, Gui YF, Liao WY, Zhang YQ, Zhang XB, Huang YP, Wu FM, Huang Z, Lu YF. Association between miR-27a rs895819 polymorphism and breast cancer susceptibility: Evidence based on 6118 cases and 7042 controls. *Medicine (Baltimore)*. 2021; 100(2):e23834.
153. Radanova M, Levkova M, Mihaylova G, Manev R, Maneva M, Hadgiev R, Conev N, Donev I. Single Nucleotide Polymorphisms in microRNA Genes and Colorectal Cancer Risk and Prognosis. *Biomedicines*. 2022; 10(1):156.
154. Choi Y, Hong SH. Genetic association between miR-27a and miR-449b polymorphisms and susceptibility to diabetes mellitus. *Biomed Rep*. 2022; 16(5):37.
155. Yang Y, Shi X, Du Z, Zhou G, Zhang X. Associations between genetic variations in microRNA and myocardial infarction susceptibility: a meta-analysis and systematic review. *Herz* 2022;47(6):524-35.
156. Zhang J, Tan H, Cao Q, Su G, Yang P. Meta-Analysis of miRNA Variants Associated with Susceptibility to Autoimmune Disease. *Dis Markers* 2021; 2021:9978460.
157. Yang Y, Lu W, Ning M, Zhou X, Wan X, Mi Q, Yang X, Zhang D, Zhang Y, Jiang B, He L, Liu J, Zou Y. A functional SNP rs895819 on pre-miR-27a is associated with bipolar disorder by targeting NCAM1. *Commun Biol*. 2022; 5(1):309.
158. Bahari G, Taheri M, Mokhtari M, Moudi M, Majidpour M, Ghadimi HS. Association between Mir-499, Mir-27a, and Mir-146a polymorphisms and their susceptibility to recurrent spontaneous abortion; in silico analysis. *Turk J Obstet Gynecol*. 2024;21(3):158-165.
159. Tunçdemir M, Yenmiş G, Tombultürk K, Arkan H, Soydaş T, Burak Tek R, Altıntaş Ö, Özkara H, Kanıgür-Sultuybek G. NFKB1 rs28362491 and pre-miRNA-146a rs2910164 SNPs on E-Cadherin expression in case of idiopathic oligospermia: A case-control study. *Int J Reprod Biomed*. 2018; 16(4):247-254.
160. Lu J, Gu H, Tang Q, Wu W, Yuan B, Guo D, Wei Y, Sun H, Xia Y, Ding H, Hu L, Chen D, Sha J, Wang X. Common SNP in hsa-miR-196a-2 increases hsa-miR-196a-5p expression and predisposes to idiopathic male infertility in Chinese Han population. *Sci Rep*. 2016; 6:19825.
161. Vucic N, Nikolic Z, Savic Pavicevic D, Kanazir S, Vukotic V, Romac S, Brajušković G. Assessment of possible association between genetic variant rs895819 in miR-27a gene and infertility in males diagnosed with non-obstructive azoospermia (NOA) from

Serbian population [abstract]. EAU 10th South Eastern European Meeting (SEEM); 2014 Oct 24-26; Belgrade, Serbia. Eur Urol Suppl 2014; 13: e1475

Biografija autora

Srećko Rajovski rođen je 11. 3. 1990. godine u Skoplju, Severna Makedonija. Osnovne studije Biologija - Biohemija i Fiziologija na Univezitet Ćirilo i Metodije - Prirodno-matematički fakultet, Skoplje, Severna Makedonija upisao je školske 2009/10. godine i završio u roku sa srednjom prosečnom ocenom (9,32/10). Školske 2014/2015. godine upisao je master studije na Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu, smer Molekularna biologija i fiziologija, modul Eksperimentalna biomedicina. Master studije završio je 2016. godine, sa prosečnom ocenom 10.00. Godine 2016. upisuje doktorske studije na Univerzitetu u Beogradu-Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od 2016. do 2020. godine u Odeljenju za biohemijsku dijagnostiku privatne zdravstvene ustanove Ađibadem Sistina bio je anganžovan na radnom mesto biohemičar. Godine 2020. godine u istoj ustanovi imenovan je za rukovodioca Molekularnog odeljenje, gde ima značajan doprinos za podršku zdravstvenog sistema Severne Makedonije u PCR testiranju za vreme panedimije. Krajem 2023. godine pored rukovođenja odeljenjema nganžovan je na poziciji menađer za rast i razvoj dijagnostičkih odeljenja. Do sada, kao prvi autor objavio je dva rada u međunarodnim časopisima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Срећко Рајовски

број индекса M3010/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Студија асоцијације варијанти у генима за протеине (rs12097821, rs2477686 и rs10842262) и генима за микро РНК (rs2910164 и rs895819) са ризиком за развој идиопатске неплодности код мушкараца из Северне Македоније “

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 29.11.2024

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Срећко Рајовски

Број индекса М3010/2016

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Студија асоцијације варијанти у генима за протеине (rs12097821, rs2477686 и rs10842262) и генима за микро РНК (rs2910164 и rs895819) са ризиком за развој идиопатске неплодности код мушкараца из Северне Македоније “

Ментор др Горан Брајушковић, редовни професор Универзитета у Београду-Биолошког факултета

Потписани/а Срећко Рајовски

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 29. 11. 2024

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Студија асоцијације варијанти у генима за протеине (rs12097821, rs2477686 и rs10842262) и генима за микро РНК (rs2910164 и rs895819) са ризиком за развој идиопатске неплодности код мушкараца из Северне Македоније “

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 29. 11. 2024

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.